

# **Etablierung eines humanisierten Mausmodells zur *in vivo* Analyse von DC-adressierenden Nanopartikeln**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Maria Sommer**

geb. am 28.11.1981 in Karlsburg

Mainz 2013

Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:


Tag der mündlichen Prüfung: 11.09.2013

## Erklärung

Hiermit versichere ich, gemäß § 11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30.04.1990, die als Dissertation vorgelegte Arbeit selbst angefertigt und alle benutzten Hilfsmittel in der Arbeit angegeben zu haben.

Mainz, 02.10.13

Ort, Datum



Maria Sommer



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>3</b>
1.1 Das Immunsystem . . . . .	3
1.1.1 Natürliche und adaptive Immunität . . . . .	3
1.1.2 Das HLA System . . . . .	4
1.1.3 T-Lymphozyten . . . . .	4
1.2 Antigenpräsentierende Zellen . . . . .	4
1.2.1 Dendritische Zellen . . . . .	5
1.2.2 Langerhans Zellen . . . . .	7
1.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation . . . . .	9
1.4 <i>Graft versus Host Disease</i> - GvHD . . . . .	10
1.5 APC im Kontext der allogenen HSCT und der GvHD . . . . .	11
1.6 Das humanisierte Mausmodell . . . . .	13
1.6.1 Die Entwicklung der humanisierten Maus . . . . .	13
1.6.2 Anwendung der humanisierten Maus . . . . .	15
1.7 Nanopartikel und ihre Interaktion mit humane Zellen . . . . .	16
<b>2 Material</b>	<b>18</b>
2.1 Geräte . . . . .	18
2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial . . . . .	18
2.3 Zellkulturmedien . . . . .	19
2.3.1 Einfriermedium . . . . .	19
2.3.2 DC-Medium . . . . .	20
2.4 Zytokine . . . . .	20
2.5 Puffer und Lösungen . . . . .	20
2.6 Antikörper . . . . .	22
2.6.1 Antikörper für die Immunhistochemie . . . . .	22
2.6.2 Antikörper für ELISpot-Assay . . . . .	22
2.6.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie . . . . .	23
2.7 Kits . . . . .	24
2.8 Zellen . . . . .	24
2.8.1 Blutlymphozyten . . . . .	24
2.9 Versuchstiere . . . . .	24
2.10 Nanopartikel . . . . .	24
<b>3 Methoden</b>	<b>26</b>
3.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutlymphozyten . . . . .	26
3.2 Kryokonservierung von Zellen . . . . .	26
3.3 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten . . . . .	26
3.4 Isolierung von peripheren Blutstammzellen . . . . .	27
3.5 MACS-Isolation von T-Zellen und CD34 <sup>+</sup> Stammzellen . . . . .	28

3.6	Interferon $\gamma$ ELISpot-Assay . . . . .	28
3.7	Beladung von dendritischen Zellen mit Nanopartikeln . . . . .	29
3.8	Durchflusszytometrie . . . . .	29
3.9	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie . . . . .	30
3.10	Immunhistochemie . . . . .	31
3.10.1	Immunhistochemische Färbung . . . . .	31
3.11	Humanisierung . . . . .	32
3.12	Biopsieentnahme . . . . .	32
3.13	Organentnahme . . . . .	32
3.13.1	Herstellung von Zellsuspension . . . . .	32
3.14	Biofluorescence imaging . . . . .	33
3.15	Statistik . . . . .	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
4.1	Humanisierung . . . . .	34
4.1.1	Etablierung des Färbeprotokolls für die Durchflusszytometrie . . . . .	34
4.1.2	Etablierung des humanisierten NSG-Mausmodells . . . . .	35
4.1.3	Anwachsen humaner Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten . . . . .	39
4.1.4	Einfluss der verabreichten Zelldosis auf den Humanisierungserfolg . . . . .	43
4.1.5	Einfluss von Interleukin 7 auf die Humanisierung . . . . .	47
4.1.6	Einfluss von Flt3L auf die Humanisierung . . . . .	50
4.1.7	Humane Langerhans Zellen in muriner Epidermis . . . . .	54
4.1.8	Funktionalität der rekonstituierten humanen Zellen <i>in vivo</i> . . . . .	58
4.2	Nanopartikel . . . . .	68
4.2.1	Einfluss der Nanopartikel auf die DC-Vitalität . . . . .	68
4.2.2	Phänotypisierung Nanopartikel-beladener DC . . . . .	70
4.2.3	Einfluss der Nanopartikel auf die DC-Funktionalität . . . . .	74
4.2.4	Nanopartikel-Aufnahme von DC mittels kLSM . . . . .	79
4.2.5	<i>In vivo</i> Untersuchungen . . . . .	81
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
5.1	Ziele und Ausblick . . . . .	89
5.2	Entwicklung einer humanen Hämatopoese im humanisierten Mausmodell . . . . .	89
5.3	Nutzen und Anwendung von Nanopartikeln im Mausmodell . . . . .	103
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>135</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	135
7.2	Danksagung . . . . .	137
7.3	Lebenslauf . . . . .	139

## Abbildungsverzeichnis

1	Pathophysiologie der GvHD . . . . .	11
2	Gating-Strategie für DCs . . . . .	35
3	Rekonstitution von hCD45 <sup>+</sup> Zellen in Knochenmark und Milz . . . . .	37
4	Rekonstitution unterschiedlicher Zellpopulationen in Knochenmark und Milz . . . . .	38
5	Versuchsaufbau für Versuch S 09.1 und T 10.1 . . . . .	40
6	Nachweis einer durchschnittlichen humanen Hämatopoese bis Woche 36 nach Transplantation . . . . .	41
7	Rekonstitution einzelner Zellpopulationen bis 36 Wochen nach Transplantation . . . . .	42
8	Rekonstitution von CD14 <sup>+</sup> Monozyten und DC-Subpopulationen bis Woche 36 nach Transplantation . . . . .	43
9	Dosisabhängige Rekonstitution einer humanen Hämatopoese nach Humansierung mit frischen CD34 <sup>+</sup> PBSC . . . . .	44
10	Rekonstitution verschiedener Zellpopulationen nach dosisabhängiger Humansierung mit frischen CD34 <sup>+</sup> PBSC . . . . .	45
11	Rekonstitution humaner CD45 <sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit der verabreichten Dosis von aufgetauten CD34 <sup>+</sup> PBSC . . . . .	46
12	Unterschiedliche Zellpopulationen nach Humansierung mit aufgetauten CD34 <sup>+</sup> PBSC . . . . .	47
13	Einfluss von IL 7 auf das Anwachsen von hCD45 <sup>+</sup> Zellen in Knochenmark und Milz . . . . .	48
14	Rekonstitution diverser Zellpopulationen unter dem Einfluss von IL 7 in Knochenmark und Milz . . . . .	49
15	Einfluss von kontinuierlicher Flt3L-Applikation auf das Anwachsen einer humanen Hämatopoese in Knochenmark und Milz . . . . .	51
16	Effekt von konstanter Flt3L-Applikation auf die Entwicklung verschiedener humaner Zellpopulationen in Knochenmark und Milz . . . . .	52
17	Rekonstitution von hCD45 <sup>+</sup> Zellen nach Behandlung mit Flt3L zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Humansierung . . . . .	53
18	Anwachsen humaner APCs nach Applikation von Flt3L zu verschiedenen Zeitpunkten nach Humansierung . . . . .	54
19	Humane LC in muriner Dermis und Epidermis über 32 Wochen nach Humansierung . . . . .	56
20	Humane LC in muriner Epidermis zwölf Wochen nach Transplantation . . . . .	57
21	Schematische Darstellung der Modelle S 11.1 und Z 12.1 . . . . .	58
22	HLA Typisierung von Spender S 11.1 und T-Zellspender . . . . .	59
23	Einfluss der alloreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen auf die Rekonstitution humaner CD45 <sup>+</sup> Zellen . . . . .	60
24	Anteil der humanen B-Zellen nach Applikation alloreaktiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	61
25	Verteilung der humanen CD14 <sup>+</sup> Monozyten und cDCs nach Applikation alloreaktiver CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	62

## Abbildungsverzeichnis

26	Effekt der alloreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen auf die Rekonstitution von humanen pDCs . . . . .	63
27	HLA Typisierung des CD34-Spenders Z 12.1 und T-Zellspender . . . . .	64
28	Rekonstitution der humanen CD45 <sup>+</sup> Zellen nach Applikation von alloreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	65
29	Einfluss der alloreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen auf die Rekonstitution von humanen B-Zellen . . . . .	66
30	Rekonstitution von humanen CD14 Monozyten und cDCs nach der Applikation von alloreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Zellen . . . . .	67
31	Effekt der alloreaktiven CD8 <sup>+</sup> T-Zell Gabe auf den Anteil der humanen pDCs im Knochenmark . . . . .	68
32	Vitalität von Nanopartikel beladenen DCs . . . . .	70
33	Expression des Oberflächenmarkers CD11c auf Nanopartikel-beladenen mDCs	71
34	CD83-Expression auf mDCs nach Beladung mit Nanopartikeln . . . . .	72
35	Expression von CD86 auf Nanopartikel-beladenen mDCs . . . . .	72
36	Expression des Oberflächenmarkers HLA DR auf Nanopartikel-beladenen mDCs . . . . .	73
37	Oberflächenexpression von CCR7 auf Nanopartikel-beladenen mDCs . . . .	73
38	Antigenpräsentation von DCs beladen mit BR 59 . . . . .	74
39	Antigenpräsentation von DCs beladen mit GB-PS-61 . . . . .	76
40	DCs beladen mit GB-PS-62 und deren Antigenpräsentation . . . . .	77
41	Antigenpräsentation von DCs beladen mit GB-PS-63 . . . . .	78
42	Testung der vier Nanopartikel mit DCs und CD8 <sup>+</sup> / CD4 <sup>+</sup> T-Zellen eines <i>buffy coat</i> Spenders . . . . .	79
43	kLSM Aufnahmen von DCs nach Beladung mit den vier verschiedenen Nanopartikeln . . . . .	80
44	Imaging der vier verschiedenen Nanopartikel . . . . .	82
45	Kinetikuntersuchung der Biodistribution verschiedener NP in NSG Mäusen	83
46	Analyse einzelner Organe 96 h nach NP-Applikation . . . . .	83
47	Quantitative Analyse einzelner Organe 96 h nach Nanopartikel-Applikation	84
48	Kinetikuntersuchungen des Partikels GB-PS-63 in humanisierten Mäusen .	85
49	kLSM von Milz- und Knochenmarkzellen 48 h nach der Applikation von GB-PS-63 . . . . .	86
50	kLSM von Milz- und Knochenmarkzellen von humanisierter Maus 48 h nach Applikation des Partikels GB-PS-63 . . . . .	87
51	Darstellung einzelner Organe 96 h nach Applikation von GB-PS-63 in humanisierte Mäuse . . . . .	88



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient als Schutz vor Infektionen durch Pathogene wie Bakterien, Viren und Parasiten. Des Weiteren kann es auch fehlerhafte körpereigene Zellen (Tumorzellen) erkennen und diese zerstören. Nach der Transplantation von fremdem Spendergewebe kann es ebenfalls zu einer Reaktion des Immunsystems kommen.

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus verschiedenen Zelltypen und Molekülen. Die ersten Schutzbarrieren des Immunsystems bilden physikalische und biochemische Mechanismen. Zu den physikalischen Barrieren zählt die Haut, Schleimhäute sowie die Atemwege. Biochemische Barrieren sind u.a. antimikrobielle Enzyme (z.B. Lysozym) im Tränenfilm und im Speichel. Überwindet ein Pathogen diese Schutzbarrieren, wird als Reaktion darauf eine Immunantwort eingeleitet. Diese besteht, je nachdem ob erregerspezifisch oder -unspezifisch, aus der natürlichen bzw. der adaptiven Immunantwort.

### 1.1.1 Natürliche und adaptive Immunität

Die natürliche Immunantwort besteht aus einem zellulären und einem humoralen Anteil. Den zellulären Anteil bilden Makrophagen und Granulozyten (Phagozyten), natürliche Killerzellen (NK-Zellen) sowie Monozyten und dendritische Zellen (DCs). Durch Phagozytose werden eingedrungene Pathogene aufgenommen, prozessiert und zerstört. Die Erkennung der Pathogene erfolgt u.a. über Toll-like Rezeptoren (TLR), die zur Gruppe der PRR (*pattern recognition receptor*) gehören (KAWAI *et. al.*). Zum humoralen Teil der Immunantwort gehören das Komplementsystem und Zytokine. Das Komplementsystem hat mehrere Funktionen. Zum einen können Proteine des Systems Phagozyten chemotaktisch anlocken. Zum anderen bilden sie Transmembranporen in der Zielzelle, was zu deren Tod führt.

Das adaptive Immunsystem kann zwischen fremden und eigenen Strukturen unterscheiden. Darüber hinaus ist es in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden (DELVES *et. al.*). Es besteht ebenfalls aus einem zellulären und einem humoralen Anteil. Im Mittelpunkt der zellulären Immunantwort stehen die T-Lymphozyten. Diese erkennen infizierte Zellen sowie Tumorzellen spezifisch und können diese lysieren. Die nötige Spezifität wird über die jeweiligen T-Zellrezeptoren gewährleistet, wobei für die Initiation der Prozess der Antigenpräsentation benötigt wird. Dies geschieht durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs). Exogene Antigene werden durch Endo-, Phago- oder Pinozytose aufgenommen. Nach der Prozessierung durch Proteasen werden immunogene Peptide über MHC Klasse II Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Endogene Antigene werden über MHC Klasse I Moleküle präsentiert. Zu den APCs gehören die dendritischen Zellen (DCs), welche Antigene phagozytieren. Anschließend wandern die DCs in die sekundären lymphatischen Organe, wo sie das Antigen den T-Lymphozyten präsentieren. Es folgt die Aktivierung und Differenzierung dieser Zellen, wodurch eine spezifische Immunantwort ausgelöst wird. Nach Kontakt mit dem Antigen liegen die antigenspezifischen T-Lymphozyten im Blut vor und können bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger eine schnellere und verstärkte antigenspezifische Immunantwort

## 1 Einleitung

einleiten (DELVES *et. al.*). Der humorale Anteil der adaptiven Immunantwort richtet sich gegen extrazelluläre Pathogene und wird durch lösliche Antikörper vermittelt. Diese werden von aktivierten B-Zellen und Plasmazellen produziert.

### 1.1.2 Das HLA System

Der MHC (*major histocompatibility complex*) stellt einen genetischen Locus dar, welcher für Proteine codiert, die für die Antigenpräsentation entscheidend sind. Benannt wurde er nach seiner Rolle bei der Gewebsverträglichkeit von Transplantaten (HORTON *et. al.*). Der humane MHC wird auch HLA genannt (*human leukocyte antigen*), da er auf Leukozyten identifiziert wurde (KLEIN *et. al.*). Die Gene des HLA befinden sich auf Chromosom 6. Man kann aufgrund der Struktur und der Funktion zwischen zwei unterschiedlichen Klassen von HLA Molekülen unterscheiden.

Zu den HLA-Klasse I Moleküle gehören HLA-A, HLA-B und HLA-C (LI *et. al.*). Sie werden auf fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert. MHC-Klasse I gebundene Antigene können nur von zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden.

HLA-Klasse II Moleküle sind HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ (LI *et. al.*). Diese Moleküle sind in Ruhe auf spezialisierten APCs (B-Zellen, DCs) zu finden und können nur von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden. Bei Aktivierung des Immunsystems ist die Expression jedoch auf fast jeder Körperzelle möglich.

### 1.1.3 T-Lymphozyten

Phänotypisch sind alle T-Lymphozyten durch die Expression des Oberflächenmarkers CD3 charakterisiert. Man unterscheidet zwei Subtypen, die sich in ihrer Spezifität zu MHC Molekülen unterscheiden. Zum einen gibt es die CD8<sup>+</sup> T-Zellen (auch zytotoxische T-Zellen genannt). Diese erkennen ihr Antigen über HLA-Klasse I Moleküle und zerstören die befallene Zelle sofort (SIGAL *et. al.*). Zum anderen gibt es die CD4<sup>+</sup> T-Zellen, welche ihr Antigen über HLA-Klasse II Moleküle erkennen. Sie werden auch als T-Helferzellen (Th) bezeichnet, da sie nach ihrer Aktivierung Zytokine sezernieren, welche weitere immunologische Zellen anlocken. Desweiteren sind sie entscheidend für die Immunregulation, da unterschiedliche Th Subpopulationen verschiedenste Aufgaben übernehmen. Th 1 Zellen sind primär für die zytotoxische, Th 2 Zellen für die humorale Immunantwort zuständig (ZHU *et. al.*).

Die Erkennung von Antigenen findet über T-Zellrezeptoren (TCRs) statt. Diese bilden zusammen mit CD3 einen Komplex auf der Oberfläche der T-Lymphozyten. Man unterscheidet zwischen zwei Formen des TCR: den  $\alpha\beta$  TCR und den  $\gamma\delta$  TCR, wobei der  $\alpha\beta$  TCR am häufigsten bei T-Lymphozyten vorkommt (GIRARDI *et. al.*).

## 1.2 Antigenpräsentierende Zellen

Antigenpräsentierende Zellen (APCs) spielen für das Immunsystem eine elementare Rolle, da sie spezifische Immunantworten einleiten können. Fast alle kernhaltigen Körperzellen sind in der Lage, Antigene über MHC Moleküle zu präsentieren. Mit der Bezeichnung

APC definiert man jedoch professionelle APCs des Immunsystems. Dazu zählen Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und DCs, wobei DCs die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind (PARKIN *et. al.*).

### 1.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) sind APCs, die auf die Aufnahme, den Transport, die Prozessierung und Präsentation von Antigenen spezialisiert sind (STEINMAN *et. al.*, HART *et. al.*, MATZINGER *et. al.*). Somit können sie primäre Immunantworten gegen eingedrungene Pathogene induzieren. Darüber hinaus können sie die Abwehrmechanismen der natürlichen wie auch der adaptiven Immunität aktivieren (BANCHEREAU *et. al.*). Im unangereiften Stadium (*immature* DCs, iDCs) persistieren sie im peripheren Gewebe. Sie kontrollieren ihre Umgebung auf Pathogene oder zerstörtes Gewebe, welche sie aufnehmen und gegebenenfalls eine Immunantwort induzieren. In diesem Stadium können sie T-Lymphozyten nur geringfügig stimulieren.

Die Aufnahme von Antigenen erfolgt über unterschiedliche Mechanismen. Zum einen können Partikel und Mikroben über Phagozytose aufgenommen werden (INABA *et. al.*, REIS E SOUSA *et. al.*). Extrazelluläre Flüssigkeiten gelangen über Makropinozytose in DCs (SALLUSTO *et. al.*). Über die Expression von diversen Rezeptoren, wie z.B. der C-Typ Lektine, DEC-205 sowie Fc- $\gamma$  Rezeptoren findet die rezeptorvermittelte Endozytose von Antigenen statt (ENGERING *et. al.*, FANGER *et. al.*, JIANG *et. al.*, ).

Die folgende Prozessierung der Antigene steht in engem Zusammenhang mit dem Reifungsprozess der iDCs zu *mature* DCs (mDCs). Zum einen verändert sich die Morphologie: Adhäsionsmoleküle werden herunterreguliert, das Zytoskelett wird reorganisiert und die DCs werden beweglicher (TROMBETTA *et. al.*). Es folgt die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 und CD86 (CAUX *et. al.*) und die Expression von HLA-Klasse II Molekülen auf der Zelloberfläche (CELLA *et. al.*). Zum anderen werden Chemokine sekretiert, die weitere immunologische Zellen anlocken (SALLUSTO *et. al.*, TANG *et. al.*). Zusätzlich verlieren die DCs die Fähigkeit zur Endo- und Phagozytose.

Nach der Aktivierung und Prozessierung migrieren die DCs in T-Zell Areale (primäre lymphatische Organe). Dort angelangt, aktivieren sie spezialisierte B- und T-Lymphozyten (HART *et. al.*). Diese bewirken daraufhin eine Immunreaktion. Exogene Antigene werden über HLA-Klasse I und endogene Antigene über HLA-Klasse II Moleküle präsentiert. Neuere Studien zeigen, dass DCs zur sog. "*Crosspräsentation*" fähig sind, d.h. exogene Antigene können über beide MHC Moleküle präsentiert werden (SHEN *et. al.*). Somit fungieren DCs als Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort. In Abhängigkeit der lokalen externen Faktoren sind DCs in der Lage eine Vielfalt an T-Zellen zu stimulieren. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen können, entgegen ihrer üblichen Eigenschaft, zur Proliferation angeregt werden (BHARDWAJ *et. al.*) und in Anwesenheit von IL-12 führen DCs zur Differenzierung von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zu IFN  $\gamma$  Th1-Zellen. Die Produktion von IFN  $\gamma$  führt zur Aktivierung von Makrophagen, welche wiederum antimikrobiell wirken können. In Anwesenheit von IL-4 induzieren DCs die Differenzierung zu Th2-Zellen, welche ihrerseits IL-5 und IL-4 sezernieren. Diese Zytokine aktivieren Eosinophile und unterstützen B-Zellen in ihrer Antikörperproduktion (BANCHEREAU *et. al.*).

## 1 Einleitung

Worauf diese Interaktionen von DCs und T-Zellen basieren, ist bis heute nicht vollständig geklärt. Zum einen lässt sich die Effektivität der DCs durch die vermehrte Expression von HLA Molekülen auf der Zelloberfläche erklären (INABA *et. al.*). Im Vergleich zu B-Zellen und Monozyten exprimieren DCs das 10-100 fache an HLA Molekülen. Zum anderen exprimieren DCs vermehrt akzessorische Moleküle, die über die Interaktion mit TCRs zu einer verbesserten Adhäsion oder zu verstärkten Signalwegen führen (CAUX *et. al.*, INABA *et. al.*). Darüber hinaus können DCs z.B. über die vermehrte Produktion von IL-12, die natürliche und adaptive Immunität verstärken (CELLA *et. al.*, REIS E SOUSA *et. al.*).

Neben der Funktion als Initiatoren einer Immunantwort scheinen DCs auch eine zentrale Rolle bei der Vermittlung von Toleranz zu besitzen. Man unterscheidet zwischen der zentralen und der peripheren Toleranz. Bei der zentralen Toleranz spielt der Prozess der negativen und positiven Selektion von T-Zellen im Thymus eine wichtige Rolle (KAPPLER *et. al.*). Im Thymus lokalisierte DCs können die Apoptose von potentiellen selbstreaktiven T-Zellen induzieren (BROCKER *et. al.*). Sie unterscheiden sich in soweit von dem klassischen DC Modell, dass sie aus Vorläufern im Thymus entstehen, sich dort entwickeln und auch dort sterben (ARDAVIN *et. al.*). Folglich besitzen sie keine migratorischen Eigenschaften und sind primär auf die Präsentation von Selbstantigenen spezialisiert. BOUNEAUD *et. al.* konnten zeigen, dass 25-40 % der reaktiven T-Zellen der negativen Selektion im Thymus entgehen können. Dies legt das Vorhandensein einer peripheren Toleranz nahe. Für die Vermittlung der peripheren Toleranz gibt es zwei Modelle. Zum einen wird postuliert, dass eine Subpopulation von regulatorischen DCs beteiligt ist (SÜSS *et. al.*, FAZEKAS DE ST GROTH *et. al.*), zum anderen soll der Entwicklungs- und Aktivierungsgrad von DCs Einfluss auf die Vermittlung von Toleranz haben. Hier war bisher die gängige Ansicht, dass iDCs Toleranz vermitteln, wohingegen mDCs für die Immunität wichtig sind (STEINMAN *et. al.*). Im Jahr 2001 brachten ALBERT *et. al.* eine neue Theorie zur Vermittlung von Toleranz durch DCs auf. Demnach wird periphere Toleranz durch sog. *quiescent* DCs vermittelt. Diese DCs sind soweit ausgereift, dass sie HLA-Klasse II und kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, jedoch das Potenzial zur Antigenaufnahme und Prozessierung noch nicht komplett verloren haben. Immunität hingegen wird nur von vollständig ausgereiften DCs vermittelt.

Durch ihre positiven und negativen Regulationsmechanismen besitzen DCs und ihre Subpopulationen wichtige Funktionen im Immunsystem. Je nach Ausreifungs- und Aktivierungszustand und ihrer Lokalisation übernehmen DCs unterschiedliche Rollen in der Vermittlung von Immunität und Toleranz. Die molekularen Mechanismen sind nur ansatzweise verstanden und die Identifizierung von beeinflussenden Faktoren ist entscheidend für die Entwicklung neuer DC-basierter therapeutischer Ansätze.

Im Laufe der letzten Jahre sind immer mehr DC Subtypen in Mäusen wie auch im Menschen beschrieben worden. Sie unterscheiden sich in der Expression von Oberflächenmolekülen und können unterschiedlichste Immunantworten induzieren. Für die Entwicklung und Spezialisierung von DCs spielen, wie schon erwähnt, unterschiedliche Vorstufen unter dem Einfluss von lokalen externen Faktoren (z.B. Zytokine) eine entscheidende Rolle (SHORTMAN *et. al.*). Zusätzlich ist der räumliche Faktor von Bedeutung, sprich in welchen

## 1 Einleitung

Milieu oder Gewebe sich DCs entwickeln und differenzieren.

Die klassische Abgrenzung unterteilt DCs in zwei Subtypen (UENO *et. al.*). Zum einen die konventionellen DCs (cDCs), zum anderen die plasmazytoiden DCs (pDCs). Beide stammen von denselben Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab (IDOYAGA *et. al.*). cDCs kommen *in vivo* in unterschiedlichen Kompartimenten vor: im peripheren Gewebe (s. 1.2.2), in den sekundären lymphatischen Organen und zirkulierend im Blut. Die im Blut zirkulierenden DCs sind charakterisiert als Lin<sup>-</sup>, HLA DR<sup>+</sup> und CD11c<sup>+</sup>, sowie BDCA-3<sup>+</sup> und BDCA-1<sup>+</sup> Zellen (STEINMAN *et. al.*). Sie nehmen Antigene in der Peripherie auf und wandern anschließend zu den T-Zellarealen.

DCs in peripheren Geweben lassen sich zusätzlich, je nach Gewebe, unterscheiden. Es gibt residuale DCs, die in den lymphatischen Organen sitzen und es gibt migratorische DCs, die sich ähnlich der im Blut zirkulierenden DCs verhalten (IDOYAGA *et. al.*). Beide unterscheiden sich in ihrer Expression der Oberflächenmarker. cDCs in den lymphatischen Organen exprimieren mehr CD11c und weniger HLA-Klasse II Moleküle als migratorische DCs. Sobald sie mit Antigenen in Kontakt kommen, wandern sie zu den Lymphknoten, wo sie diese den T-Zellen präsentieren. Darüber hinaus besitzen DCs die Fähigkeit des *Priming* von T-Zellen. Dabei tasten die T-Zellen mit ihren T-Zellrezeptoren die Oberfläche der DCs nach Antigenen ab. Bei erfolgter Bindung werden die naiven T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen angeregt.

Die pDCs zirkulieren ebenfalls im Blut, können aber auch in entzündete sekundäre lymphatische Organe wandern (YONEYAMA *et. al.*). Darüber hinaus sekretieren sie große Mengen an Typ I Interferonen und weiteren Zytokinen als Antwort auf virale Infektionen (SIEGAL *et. al.*, GROUARD *et. al.*, LIU *et. al.*). pDCs exprimieren neben HLA DR auch CD123, BDCA-2 und BDCA-4.

Beide Subtypen, pDCs und cDCs, unterscheiden sich zusätzlich in der Expression von spezifischen Rezeptoren (TLRs, CLRs), was die jeweilige Spezialisierung der DCs noch verdeutlicht (SHORTMAN *et. al.*). Zusätzlich besteht die Möglichkeit, dass sich Monozyten aus dem Blut zu DCs (Mo-DCs) differenzieren können (IDOYAGA *et. al.*). Diese Mo-DCs wurden im *steady state* in Lymphknoten der Haut gefunden, jedoch bedarf es hier noch weiterer Studien hinsichtlich der Lokalisation dieses DC Subtyps. Es wird deutlich, dass sich in den unterschiedlichsten Geweben spezialisierte DCs finden, die sich sowohl in ihrer Oberflächenmarkerexpression wie auch in ihrer Reaktion auf Pathogene unterscheiden lassen. Dadurch ist ein großes Spektrum an APCs gegeben.

### 1.2.2 Langerhans Zellen

Langerhans Zellen (LCs) sind DCs, die in der humanen Epidermis lokalisiert sind. Sie wurden erstmals 1868 von Paul Langerhans beschrieben (LANGERHANS). Mittels Goldchlorid-Färbungen machte er sie sichtbar, hielt sie jedoch für Nervenzellen. Sie besitzen lange Dendriten, mit denen sie ein Netzwerk in der Epidermis bilden. Es dauerte jedoch noch zwölf Jahre, bis LCs definitiv dem Zelltyp der DCs zugeordnet wurden. Dies geschah 1985 durch Schuler und Steinman (SCHULER *et. al.*), welche gleichzeitig das "LC-Paradigma" aufstellten. Dies besagt, dass LCs in unterschiedlichen Reifestadien vorliegen. Als unreife LCs exprimieren sie kaum HLA-Klasse II Moleküle und zeigen eine außerordentliche

## 1 Einleitung

Fähigkeit zur Antigenaufnahme und deren Prozessierung (ROMANI *et. al.*). Nach der Aufnahme beginnt der Reifungsprozess, welcher die Hochregulation von HLA-Klasse II und von kostimulatorischen Molekülen zur Folge hat. Gleichzeitig wird der Chemokinrezeptor CCR7 exprimiert und E-Cadherin herunterreguliert (TANG *et. al.*), was den LCs erlaubt, die Haut zu verlassen und zu den Lymphknoten zu migrieren (ROMANI *et. al.*, STOITZNER *et. al.*). In den Lymphknoten angekommen, stimulieren sie die T-Lymphozyten und leiten somit eine Immunantwort ein (WILSON *et. al.*).

LCs kommen nicht nur in der Epidermis, besonders im *stratum spinosum* (ROMANI *et. al.*) vor, sondern auch in den unterschiedlichsten Hautregionen. Besonders diverse Schleimhäute und die Cornea sind reich an LCs (MAYER *et. al.*, IJIMA *et. al.*, ALLAM *et. al.*). Darüber hinaus ist bekannt, dass die LC-Dichte je nach Hautareal variieren kann (THOMAS *et. al.*). LC exprimieren das “*common leukocyte antigen*” CD45, jedoch nicht andere typische linienspezifische Antigene wie CD3, CD14, CD19 oder CD56 (ROMANI *et. al.*). Sie wurden lange über die Expression von HLA-DR und CD1a charakterisiert, bis 1999 VALLADEAU *et. al.* Langerin / CD207 als den LC spezifischen Marker entdeckten. Langerin / CD207 ist die molekulare Hauptkomponente der Birbeck Granula, welche nur auf LCs vorkommen (BIRBECK *et. al.*, VALLADEAU *et. al.*). Birbeck Granula haben eine tennisschlägerartige Form und spielen eine Rolle bei der Antigenaufnahme (VALLADEAU *et. al.*). Ein weiterer wichtiger Marker von LCs ist das EpCAM Molekül, welches eine Rolle bei der Zelladhäsion spielt. Besonders interessant ist dieses Molekül bei der Differenzierung zwischen epidermalen LCs und den erst neu entdeckten dermalen Langerin / CD207<sup>+</sup> dermalen DCs (POULIN *et. al.*, GINHOUX *et. al.*, BURSCH *et. al.*). NAGAO *et. al.* konnten zeigen, dass epidermale LC EpCAM exprimieren, dermale Langerin / CD207<sup>+</sup> DCs jedoch nicht. Die Charakterisierung von LCs über ihre Oberflächenmarker ist jedoch noch lange nicht vollständig und je nach Gewebe gibt es unterschiedliche Expressionsmuster.

Bereits 1984 konnte gezeigt werden, dass LCs ursprünglich aus dem Knochenmark stammen (PELLETIER *et. al.*) und eine hohe Lebensdauer aufweisen (KRUEGER *et. al.*). Darüber hinaus sind sie resistent gegenüber radioaktiver Bestrahlung (MERAD *et. al.*). Ein Auswandern kleiner Mengen von LC findet im *steady-state* der Epidermis ständig statt. Das Auffüllen von LCs in der Epidermis findet durch die Proliferation von Vorläuferzellen statt, deren Ursprung immer noch unklar ist. Es konnte zumindest gezeigt werden, dass diese Vorläuferzellen nicht aus dem peripheren Blut in die Epidermis einwandern und ausreifen (MERAD *et. al.*).

Tritt jedoch eine Entzündung der Epidermis durch Pathogene oder physikalische Reize ein, verlassen die LCs die Epidermis Richtung Lymphknoten und nach Kurzem kann wieder die gleiche LC-Dichte wie vor dem Stimuli in der Epidermis beobachtet werden. In Abhängigkeit des Ausmaßes der Depletion, werden die LCs durch lokale Proliferation oder durch das Einwandern von Bluzellen ersetzt (MERAD *et. al.*, GINHOUX *et. al.*). Ähnliche Beobachtungen konnten auch beim Menschen nach HSCT gemacht werden (MURPHY *et. al.*).

In den letzten Jahren wurde das klassische “LC-Paradigma” durch mehrere neue Erkenntnisse erweitert. Neben den klassischen epidermalen LC müssen in Zukunft auch dermale Langerin / CD207<sup>+</sup> DCs und in Lymphknoten lokalisierte Langerin / CD207<sup>+</sup>

## 1 Einleitung

DCs in ihrer immunologischen Funktion berücksichtigt werden. Des Weiteren weiß man mittlerweile, dass DCs neben ihrer Rolle als APCs auch eine Rolle in regulatorischen Prozessen haben können (BONIFAZ *et. al.*, STEINMAN *et. al.*). Ob dies auch auf LC zutrifft, bleibt zu klären. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob LCs tatsächlich selbst Antigene aufnehmen und den T-Zellen präsentieren, oder ob sie diese an lymphatische DCs weitergeben (KISSENPENNIG *et. al.*, BENNETT *et. al.*). Zumindest konnte in Mäusen gezeigt werden, dass bei einer Infektion mit Herpesviren nicht die migrierten LCs das Antigen den T-Zellen präsentierten, sondern die in den Lymphknoten lokalisierten Langerin / CD207<sup>+</sup> DCs dies taten (ALLAN *et. al.*).

### 1.3 Hämatopoetische Stammzelltransplantation

Unter einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT) versteht man den Transfer von pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen. Stammen sie von dem Empfänger selbst, handelt es sich um eine autologe Transplantation. Werden sie einem zweiten Individuum gegeben, spricht man von einer allogenen Transplantation. Die HSCT wird bei Patienten mit malignen Erkrankungen der Blutbildung eingesetzt. Ziel ist es, die Hämatopoese des Patienten dauerhaft durch eine gesunde Blutbildung zu ersetzen. In den meisten Fällen ist eine HSCT die einzige kurative Option. 1956 führte E.D. Thomas die ersten Knochenmarktransplantationen durch. Seitdem wird daran gearbeitet, diese Therapie weiterzuentwickeln und zu optimieren.

Vor der Transplantation der Stammzellen erhalten die Patienten eine Konditionierung. Diese besteht aus Chemotherapie und / oder Bestrahlung (TBI, *total body irradiation*). Zum einen dient dies der Suppression des Empfänger-Immunsystems, die das spätere Anwachsen des Transplantats erleichtern soll, zum anderen werden auch maligne Zellen dadurch zerstört. Hämatopoetische Stammzellen werden aus dem Knochenmark oder mittels Leukapherese aus dem peripheren Blut gewonnen. Darüber hinaus ist auch die Verwendung von Blutstammzellen aus Nabelschnurblut möglich. Die periphere Blutstammzellgewinnung ist inzwischen das häufigste Verfahren. Um genügend Stammzellen zu gewinnen, werden die Zellen durch Wachstumsfaktoren wie G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) oder GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) mobilisiert (LANE *et. al.*).

In den letzten fünf Jahrzehnten hat sich die allogene HSCT von einer experimentellen Prozedur zu einer effektiven, kurativen Zelltherapie für die Behandlung diverser Krebsarten des hämatopoetischen Systems mit einer Erfolgsrate von über 80 % entwickelt (BARON *et. al.*). Trotz stetiger Verbesserungen der Therapiekonditionen ist die Behandlung nicht ausgereift und es können diverse Komplikationen auftreten. Zum einen kann es zu konditionierungsinduzierten Toxizitäten oder zu einem Rezidiv kommen. Um die Toxizität der Konditionierung zu umgehen, wird z.B. die Intensität reduziert (RIC, *reduced irradiation conditioning*, WONG *et. al.*). Durch die verlängerte Immundefizienz nach Transplantation können Infektionen durch opportunistische Keime auftreten. Zum anderen kann das Transplantat vollständig abgestoßen werden oder ein Teil der Spenderzellen reagiert gegen das Gewebe des Empfängers (GvHD). Um das Auftreten einer akuten GvHD zu vermeiden, können depletierende Antikörper eingesetzt werden (s. 1.4).

#### 1.4 Graft versus Host Disease - GvHD

Die GvHD ist eine der schwersten Komplikationen nach einer allogenen HSCT. Sie ist einer der Hauptgründe für Mortalität und Morbidität (FERRARA *et. al.*). Es handelt sich dabei um eine Reaktion der immunkompetenten T-Lymphozyten des Spenders gegen gesunde, nicht hämatopoetische Zellen des Empfängers. Die GvHD kann einen akuten oder einen chronischen Verlauf zeigen (PIDALA *et. al.*).

BILLINGHAM *et. al.* postulierten bereits 1966 drei Voraussetzungen zur Entstehung der GvHD: 1) Das Transplantat muss immunkompetente Zellen enthalten, 2) der Empfänger muss das Transplantat als fremd erkennen, darf es aber nicht abstoßen, und 3) der Empfänger muss Antigene exprimieren, welche nicht auf Spenderzellen vorhanden sind. Das Risiko sowie der Schweregrad einer GvHD werden vor allem durch die Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger bestimmt (LOISEAU *et. al.*). Empfänger, die ein HLA-identisches Transplantat eines Geschwisterteils erhalten, haben ein geringeres Risiko als Empfänger, die ein nicht HLA-identisches Transplantat erhalten. Desweiteren ist die Qualität des Transplantats entscheidend (wieviele CD34<sup>+</sup> PBSCs sind enthalten) und die Art der GvHD-Prophylaxe (PRZEPIORKA *et. al.*). Die GvHD betrifft am häufigsten Haut, Darm, Leber und Auge (PIDALA *et. al.*, FERRARA *et. al.*). Dabei treten Symptome wie Dermatitis und Kolitis auf. Je nach Intensität der GvHD und der beteiligten Organe wird die GvHD in vier Stadien, von mild bis schwerwiegend, eingeteilt (PRZEPIORKA *et. al.*).

2009 stellten FERRARA *et. al.* ein aktuelles Modell des Pathomechanismus der GvHD vor. Abbildung 1 zeigt ein vereinfachtes Schema. In der ersten Phase werden durch die Konditionierung (RIC, TBI oder Chemotherapie) Gewebsschäden hervorgerufen. Es folgt die vermehrte Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Dies führt zur Aktivierung der APCs des Empfängers, welche ausreifen und die zytotoxischen T-Lymphozyten in der zweiten Phase aktivieren. Es kommt zur Produktion von inflammatorischen Molekülen wie TNF- $\alpha$  und IL-1. In der dritten Phase bewirken diese Moleküle zusammen mit zytotoxischen T-Lymphozyten Entzündungen und Schädigungen im Gewebe des Empfängers.

In allen Phasen der GvHD spielen DCs eine kritische Rolle. Dennoch ist die komplette Pathophysiologie der Entstehung einer GvHD nicht vollständig geklärt. Anfang der 90er Jahre konnten CHAPLIN *et. al.* zeigen, dass T-Lymphozyten des Spenders eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer GvHD spielen. Die Depletion dieser CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten führte zu einer reduzierten GvHD Rate. Die direkte Depletion von CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten kann *ex vivo* oder *in vivo* durch Antikörper erfolgen. So konnte die Rate der akuten und chronischen GvHD deutlich gesenkt werden (MARMONT *et. al.*, PLATZBECKER *et. al.*). Jedoch gab es diverse Nachteile dieser Verfahren. Einerseits erfolgte das Anwachsen des Transplantats deutlich schlechter und es traten häufiger Rezidive auf, da der *Graft versus Leukemia* (GvL) Effekt nicht mehr herbeigeführt werden konnte; andererseits kam es zu vermehrten Infektionen, aufgrund der fehlenden T-Zellfunktionen.

Um eine gerichtete Rekonstitution des Empfänger-Immunsystems zu ermöglichen, wur-



## 1 Einleitung

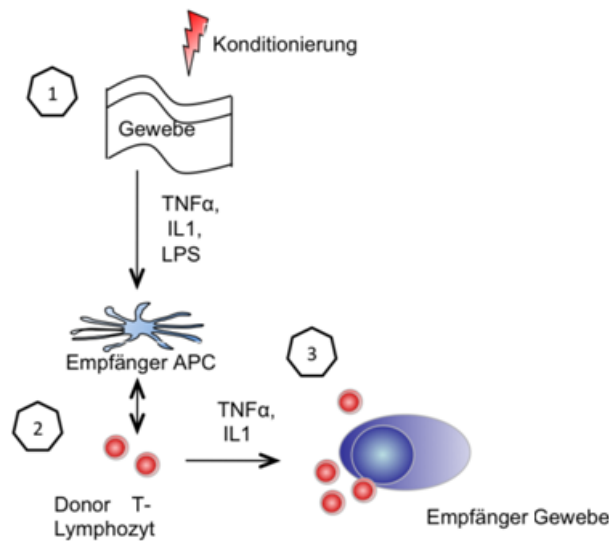


Abbildung 1: **Pathophysiologie der GvHD:** 1) Konditionierung des Empfängers führt zu Gewebeschädigung und Aktivierung von Empfänger APCs. 2) Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten. 3) Entzündungen und Gewebeschädigungen. Abbildung nach FERRARA *et. al.*

den diverse Strategien entwickelt. Hierzu gehört die Applikation von Spenderlymphozyteninfusionen (*donor lymphocyte injection*, DLI) nach allogener HSCT (KOLB *et. al.*). Neueste Studien befassen sich mit der Modifizierung der DLI-Therapien, um den gewünschten GvL Effekt zu verstärken und im Gegenzug den GvHD Effekt zu reduzieren (GIRALT *et. al.*, ALYEA *et. al.*). Ein Ansatz ist die Depletion alloreaktiver  $CD8^+$  T-Lymphozyten des Spenders, um die Entstehung einer GvHD zu vermeiden. Eine  $CD8$ -depletierte HSCT mit anschließender Gabe einer  $CD8$ -depletierten DLI zeigte einen adäquaten GvL Effekt mit reduzierter GvHD Rate (MEYER *et. al.*).

### 1.5 APC im Kontext der allogenen HSCT und der GvHD

Heutzutage wird vermehrt auf periphere Blutstammzellen für die HSCT zurückgegriffen. Diese stammen aus G-CSF mobilisierten Spendern und zeigen eine schnellere Neubildung der Hämatopoese als bei Verwendung anderer Quellen (GRATWOHL *et. al.*). Transplantate aus gesunden peripheren Blutstammzellspendern besitzen das 10-fache an T-Zellen, im Vergleich zu Stammzellen aus dem Knochenmark. Trotz dessen zeigt sich kein vermehrtes Auftreten von akuter GvHD, jedoch steigt das Risiko für eine chronische GvHD signifikant. Gleichzeitig kommt es verringerten Rezidivraten und verbesserten Überlebenschancen der Patienten (CUTLER *et. al.*, HORAN *et. al.*, KÖRBLING *et. al.*). Darüber hinaus ist die Konzentration an pDCs erhöht (ARPINATI *et. al.*, KLANGSINSIRIKUL *et. al.*).

## 1 Einleitung

Hinsichtlich der Monozyten und cDCs konnte eine verminderte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  und IL-12, beobachtet werden, welche im Zusammenhang mit der Pathogenese der GvHD stehen (KRENGER *et. al.*, KITABAYASHI *et. al.*). Transplantate aus dem Knochenmark, mit erhöhten Anteilen an pDCs, stehen im Zusammenhang mit einem verringerten Auftreten von chronischer GvHD und einer Zunahme der Rezidivrate (WALLER *et. al.*). Für die akute GvHD konnte in murinen Transplantationsmodellen (SHLOMCHIK *et. al.*, DUFFNER *et. al.*) sowie im Menschen (CHAN *et. al.*) gezeigt werden, dass ausschließlich Empfänger-APCs über die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen dafür verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu scheinen für das Auftreten einer chronischen GvHD sowohl Empfänger- wie auch Spender-APCs benötigt zu werden (ANDERSON *et. al.*). Diese führen zu einer CD4-vermittelten GvHD, welche, je nach befallenen Organ, entweder über Empfänger- oder Spender-APCs oder über beide vermittelt wird. Im Jahr 2004 konnten MERAD *et. al.* in einem murine Mausmodell durch die Depletion der Empfänger-LC in der Haut ein verringertes Auftreten von GvHD zeigen. Vergleichbare Ergebnisse konnten nach Depletion von Empfänger-APCs in der Leber und Milz beobachtet werden (ZHANG *et. al.*).

Das Anwachsen der verschiedenen Zellpopulationen des neuen Immunsystems nach allogener HSCT findet zu unterschiedlichen Zeitpunkten statt. Dies ist abhängig von der Art der Konditionierung vor Transplantation, der Stammzellquelle und die Auswirkungen von akuter bzw. chronischer GvHD und deren Behandlung (PARKMAN *et. al.*). Spender-DCs können ab Tag 7 nach Transplantation detektiert werden, erreichen jedoch selbst nach einem Jahr nicht die Dichte vor Transplantation (FAGNONI *et. al.*). Der Anteil der cDCs kann hierbei höher sein als der von pDCs. Findet kurz nach Transplantation nur eine schwache Rekonstitution von DCs statt, geht dies mit einem erhöhten Risiko für Rezidive und dem Auftreten einer akuten GvHD einher (REDDY *et. al.*). Im Hinblick auf das Anwachsen von pDCs zeigt sich, dass bei einer hohen Zellzahl drei Monate nach Transplantation, die Überlebensrate steigt und das Risiko für Infektionen sinkt (MOHTY *et. al.*). Jedoch findet man bei solchen Patienten ein vermehrtes Auftreten von chronischer GvHD (CLARK *et. al.*).

Untersuchungen hinsichtlich der Rekonstitutionskinetiken von Mo-DCs zeigten, dass ein Wechsel zu einem kompletten Spender Chimärismus die Entwicklung einer akuten GvHD begünstigte (CHILDS *et. al.*, NACHBAUR *et. al.*). Nach einer allogenen HSCT werden Empfänger-APCs in Leber, Milz und den Lymphknoten zeitnah durch Donor-APCs ersetzt. Dies gilt jedoch nicht für LC der Haut, welche bis 18 Monate nach Transplantation zu finden sind (MERAD *et. al.*).

Im bisherigen Modell der Entstehung der GvHD sind DCs die wesentlichen Initiatoren. Die Tatsache, dass die selektive Depletion von DCs während der Konditionierung vor Transplantation so gut wie nicht möglich ist, erlaubt bisher keine genaueren Untersuchungen in dieser Richtung. Dennoch beleuchten neueste Arbeiten von BENNETT *et. al.* und KOYAMA *et. al.* die Rolle von LC und der von nicht-hämatopoetischen APCs für das Auftreten einer GvHD neu. In einem DC-deplitierten Mausmodell konnte gezeigt werden, dass professionelle Empfänger-APCs nicht für das Auftreten einer tödlichen GvHD benötigt werden, sondern dass sie sogar die Expansion von alloreaktiven T-Zellen unterdrücken können. Darüber hinaus scheinen nicht-hämatopoetische APCs eine wich-

## 1 Einleitung

tigere Rolle als bisher angenommen zu spielen. Hinsichtlich der LC und ihrer Rolle in der Generierung von kutaner GvHD zeigten BENNETT *et. al.* zwar eine Förderung der GvHD in der Effektorphase, jedoch scheinen sie auch regulatorische Funktion der LC auf die Effektorphase von CD8<sup>+</sup> CTLs in kutaner GvHD zu haben.

Trotz modernster Technik hat die Methodik der allogenen HSCT noch nicht ihr vollständiges Potential erreicht. Entscheidene Limitationen hierbei sind die, auf Grund von ethischen Beschränkungen, fehlenden *in vivo* Studien zum genauen Verständnis der Entwicklung der neuen Hämapoese nach Transplantation. Frühere *in vitro* Modelle erlaubten genauere Charakterisierungen von DCs und deren Subpopulationen (CAUX *et. al.*, HUBERT *et. al.*, SALLUSTO *et. al.*, RANDOLPH *et. al.*); in wie weit diese Erkenntnisse jedoch auf den Menschen übertragbar sind, ist unklar. Ebenso ist es von Interesse, die Rolle der DCs im Kontext der GvHD spezifischer zu untersuchen, um so neue therapeutische Ansätze zu entwickeln.

### 1.6 Das humanisierte Mausmodell

Diverse Tiermodelle haben es bisher ermöglicht, komplexe biologische und immunologische Prozesse zu untersuchen. Jedoch sind diese Erkenntnisse nicht übertragbar auf den Menschen und *in vivo* Experimente am Menschen sind aus ethischer und technischer Sicht nicht möglich. Daher ist das Interesse groß, Tiermodelle zu entwickeln, die *in vivo* Studien von humanen Zellen, Geweben und Organen erlauben. Mit der Entdeckung der immundefizienten CB17-*scid* Maus 1983 (BOSMA *et. al.*) war es möglich, humanisierte Mäuse zu generieren.

Der Begriff humanisierte Maus umschreibt eine Maus, die mit humanem Gewebe oder mit humanen Zellen transplantiert wurde, welche im Idealfall die selben biologischen Eigenschaften und Funktionen wie im menschlichen Körper zeigen. Dadurch können für den Menschen wichtige Fragestellungen, z.B. hinsichtlich der Pathophysiologie und Behandlung von humanen Erkrankungen, in der Maus reproduzierbar beantwortet werden. Das humanisierte Mausmodell, welches ständig weiter entwickelt wird, stellt somit ein gutes Instrument für Untersuchungen der humanen Hämatopoese, der natürlichen und adaptiven Immunität und von Infektionskrankheiten dar. Des Weiteren wird es für die Krebsforschung und seit neuestem für Forschung der regenerativen Medizin genutzt.

#### 1.6.1 Die Entwicklung der humanisierten Maus

Die Entwicklung von immundefizienten Mäusen war für die Herstellung von humanisierten Mäusen unabdingbar. Nachdem festgestellt wurde, dass *nude* Mäuse zwar das Anwachsen von diversen humanen Krebsarten begünstigten, aber nicht das Anwachsen von normalem humanen Gewebe (DAO *et. al.*), kam der erste große Durchbruch mit der Entdeckung der CB17-*scid* Maus (BOSMA *et. al.*). Sie besitzt die *Prkdc<sup>scid</sup>* Mutation (*protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide; severe combined immunodeficiency (scid)*) und daher keine B- und T-Zellen. Die *scid* Mutation führt zu einem defektem DNA Reparaturmechanismus, weshalb die Mäuse eine verstärkte Strahlungssensitivität zeigen (FULOP *et. al.*). Fünf Jahre später, im Jahr 1988, konnten verschiedene Gruppen

## 1 Einleitung

ein erfolgreiches Anwachsen von humanen PBMCs, HSCs und fötalem hämatopoetischen Gewebes in diesen Mäusen zeigen (MOSIER *et. al.*, MCCUNE *et. al.*, LAPIDOT *et. al.*). Jedoch zeigten die Mäuse nur ein schwaches Anwachsen der humanen Zellen. Gründe dafür waren die Entwicklung von murinen NK-Zellen und die spontane Entwicklung von murinen B- und T-Zellen (*leakiness*) während des Alterns der Mäuse. Gerichtete Mutationen des *Rag1* und *Rag2* (*recombinant-activating gene 1 / 2*) Locus umgingen die *leakiness* und die Strahlungssensitivität, jedoch blieb die hohe NK-Zellaktivität und das daraus resultierende schwache Anwachsen von humanen HSCs (GREINER *et. al.*, SHINKAI *et. al.*).

Der zweite Durchbruch war die Entwicklung der immundefizienten *non-obese diabetic* (NOD)-*scid* Maus im Jahr 1995 (SHULTZ *et. al.*). NOD-*scid* Mäuse zeigen eine geringere NK-Zellaktivität als CB17-*scid* Mäuse und vermehrt Defekte in der natürlichen Immunität, wodurch ein verbessertes Anwachsen von humanen PBMCs (HESSELTON *et. al.*) wie auch HSCs (LOWRY *et. al.*, PFLUMIO *et. al.*, PALUCKA *et. al.*) gewährleistet wird. Seit 1995 wurde dieses Mausmodell durch genetische Modifikationen immer weiter entwickelt, um das Anwachsen und die Funktion von humanen Zellen und Geweben zu verbessern. Trotz allem ist auch dieses Modell limitiert. Die Mäuse zeigen eine verkürzte Lebensdauer aufgrund der Bildung von Lymphomen und auch die verbliebene schwache NK-Zellaktivität behindert das Anwachsen von humanen Zellen. Ebenso wachsen keine reifen humanen B- und T-Zellen an.

2002 erfolgte der dritte Durchbruch in der Entwicklung der humanisierten Maus durch eine gerichtete Mutation im Locus der IL 2 Rezeptor  $\gamma$  Kette (*Il2rg*<sup>-/-</sup>). Dieses Molekül ist essentiell für die Rezeptoren von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21 und die durch die Bindung resultierenden Signalwege (SUGAMURA *et. al.*). Somit zeigen Mäuse, die diese Mutation tragen, eine Beeinträchtigung ihrer natürlichen und adaptiven Immunantwort und keine Entwicklung von murinen NK-Zellen (OHBO *et. al.*). Sie besitzen ebenfalls keine reifen murinen B- und T-Zellen, sind Strahlungssensitiv und haben eine längere Lebensdauer als NOD-*scid* Mäuse. Mäuse, die sowohl die *scid*-Mutation als auch die *Il2rg*-Mutation tragen, zeigen ein deutlich verbessertes Anwachsen von humanem Gewebe, von HSCs und von PBMCs (ITO *et. al.*, SHULTZ *et. al.*, ISHIKAWA *et. al.*). Aber auch dieses Modell hat seine Limitierungen. Zum einen besitzen diese Mäuse keine Lymphknoten und keinen Thymus, zum anderen scheinen ihnen einige human-spezifische Zytokine zu fehlen, welche für die Entwicklung und das Überleben von humanen Zellen benötigt werden. Mithilfe des aktuellen Forschungsstands und der Erfahrung von über zehn Jahren mit humanisierten Mäusen werden auch für dieses Modell Weiterentwicklungen entstehen, die das Anwachsen humaner Gewebe und Zellen noch weiter verbessern und verlässlicher machen.

Vier Gruppen haben unabhängig voneinander immundefiziente Mäuse mit der *Il2rg*-Mutation entwickelt (SHULTZ *et. al.*, YAHATA *et. al.*, TRAGGIAI *et. al.*, GIMENO *et. al.*). Die Applikation von humanen HSCs führt zum Anwachsen eines kompletten humanen Immunsystems, welches Thymozyten, periphere ausgereifte B- und T-Zellen, myeloide Zellen und diverse DC Subpopulationen beinhaltet (SHULTZ *et. al.*).

### 1.6.2 Anwendung der humanisierten Maus

#### Hämatopoese

HSCs sind pluripotente Zellen, die sich über längere Zeit selbsterneuern, das komplette hämatopoetische System eines Transplantatempfängers wiederherstellen und dieses auch aufrechterhalten können (BRYDER *et. al.*). Für die Untersuchung dieser Eigenschaften von HSCs bietet sich das humanisierte Mausmodell an. Es wurden zwei Modelle entwickelt, das SCID-hu Maus Modell und das Hu-SRC-SCID Maus Modell. Im SCID-hu Maus Modell wird humanes fötales Gewebe in CB17-*scid* Mäuse transplantiert (MCCUNE *et. al.*). Für das zweite Modell (Hu-SRC-SCID Maus) werden humane HSCs in zuvor bestrahlte CB17-*scid* Mäuse gegeben (LAPIDOT *et. al.*). Mäuse mit der *Il2rg*-Mutation werden vermehrt im Hu-SRC-SCID Mausmodell verwendet. Da in diesen Mäusen die erfolgreiche Differenzierung von humanen HSCs in verschiedene hämatopoetische Zellpopulationen stattfindet, sind diese ideal für Untersuchungen der humanen Hämatopoese.

#### Funktion des humanen Immunsystems

Ein großer Gewinn für die immunologische Forschung wäre die Etablierung eines funktionalen humanen Immunsystems in Mäusen mit einer primären und sekundären Immunantwort. Dafür gibt es verschiedene Ansätze. Zum einen kann mit HLA-transgenen Mäusen gearbeitet werden, die es ermöglichen, nach Antigenen zu suchen, die den T-Zellen über HLA Moleküle präsentiert werden. Zum anderen gibt es das Hu-PBL-SCID Mausmodell, welches den Transfer von humanen PBMCs in CB17-*scid* Mäuse beinhaltet (MOSIER *et. al.*). Dieses Modell wird bevorzugt für Studien von Vakzinen und Autoimmunität verwendet (IFVERSEN *et. al.*, MURPHY *et. al.*). Zuletzt kann das Hu-SRC-SCID Modell verwendet werden. In diesem Modell führt die Applikation von HSCs zum Anwachsen von B- und T-Zellen (SHULTZ *et. al.*) sowie von myeloiden und pDCs. Nach der Immunisierung mit T-Zell-abhängigen Antigenen kann eine Antikörperantwort beobachtet werden (ISHIKAWA *et. al.*). Zudem entwickeln sich im Thymus regulatorische T-Zellen (TRAGGIAI *et. al.*). Ein weiteres Modell ist das NOD/SCID-hu BLT Mausmodell. Hier werden NOD-*scid* Mäuse mit humanen fötalen Leberstammzellen transplantiert. In diesem Modell zeigen die Mäuse eine humanen T-Zellantwort auf das *toxic shock syndrome toxin 1* (TSST1) und nach einer Epstein-Barr Virus (EBV) Infektion (MELKUS *et. al.*, STROWIG *et. al.*).

#### Infektionskrankheiten

Viele Infektionskrankheiten im Menschen werden durch Organismen verursacht, die weder Mäuse noch andere Labortiere infizieren können. Darunter fallen z.B. die Erreger von AIDS, Malaria und dem Denguefieber. Die humanisierte Maus stellt eine Möglichkeit dar, diese human-spezifischen Pathogene zu untersuchen und potentielle Vakzine zu testen. Mittlerweile gibt es u.a. Modelle zur Infektion mit Denguefieber (BENTE *et. al.*), EBV (ISLAS-OHLMAYER *et. al.*), Hepatitis C (KNETEMAN *et. al.*) und *Mycobacterium tuberculosis* (GUIRADO *et. al.*). Neueste Studien hinsichtlich der HIV Infektion von hu-

## 1 Einleitung

manisierten Mäusen zeigen eine langfristige Persistenz der HIV Virämie und eine CD4<sup>+</sup> T-Zelldepletion (BAENZIGER *et. al.*, BERGES *et. al.*). In anderen humanisierten Modellen findet man HIV-spezifische Antikörper und eine hohe Viruslast (WATANABE *et. al.*).

### Krebs

Die Krebsforschung am Menschen wird zum einen durch ethische Bedenken, zum anderen durch den erschwerten Zugang zum betroffenen Gewebe erschwert. Um diese Restriktionen zu überwinden und um das Tumorwachstum, die Angiogenese und Metastasierung untersuchen zu können, bietet sich das humansisierte Mausmodell an. In der CB17-*scid* Maus konnte das Anwachsen von humanen hämatologischen Tumoren beschrieben werden (HUDSON *et. al.*). Für Studien über humane AML (*acute myloid leukaemia*), Myelome, Brust- und Darmkrebs und Gehirntumore bietet sich das NOD-*scid* Mausmodell an (DICK *et. al.*, PILARSKI *et. al.*, AL-HAJJ *et. al.*, O'BRIEN *et. al.*, SINGH *et. al.*). Die Entwicklung des NOD-*scid* *IL2rg*<sup>-/-</sup> Stammes soll in Zukunft dabei helfen, primäre humane Tumore zu untersuchen, die in den anderen Modellen nicht angewachsen waren (NAKAMURA *et. al.*, DISTLER *et. al.*).

### Regenerative Medizin

Die Hoffnung der regenerativen Medizin liegt in der Transplantation von Stammzellen in den Menschen, um verloren gegangene Funktionen wiederherzustellen. Humanisierte Mäuse bieten die Möglichkeit für präklinische Studien dieser Stammzelltherapie. In den letzten Jahren lag der Fokus auf der Transplantation von adulten (SERAKINCI *et. al.*) oder embryonalen (SOLTER *et. al.*) Stammzellen, um zerstörtes Gewebe und Organe zu behandeln. Im hämatopoetischen System konnte gezeigt werden, dass die Gabe von adulten Stammzellen aus dem Knochenmark und dem Nabelschnurblut zur Bildung von humanen Hepatozyten (KAKINUMA *et. al.*), Skelettmuskeln (TORRENTE *et. al.*), Endothelien (DROETTO *et. al.*) und Nervenzellen (TAGUCHI *et. al.*) in humanisierten Mäusen führte. Darüber hinaus können humane embryonale Stammzellen Insulin-produzierte Zellen entwickeln und bieten somit Hoffnung für Patienten mit Typ 1 Diabetes (BROLEN *et. al.*).

### 1.7 Nanopartikel und ihre Interaktion mit humane Zellen

Nanopartikel werden über ihre Größe definiert. Sie bewegen sich in einem Bereich von bis zu 100 nm, jedoch werden teilweise auch Partikel mit einer Größe von bis zu 1 µm als Nanopartikel bezeichnet. Sie sind somit kleiner als Zellen, aber größer als einzelne Moleküle, wie z.B. Proteine. Es gibt unterschiedliche nanopartikuläre Strukturen. Dazu zählen Matrixpartikel, Mizellen, Kapseln, Liposome und Dendrimere (MCNEIL *et. al.*). Mizellen bilden sich durch Assoziation von Tensiden. Dendrimere sind verästelte Polymere, die jedoch aufwändig herzustellen sind. Liposome bestehen aus einer Doppelschicht, in der Tenside und Lipide als Doppelmembran angeordnet sind. Die Matrixpartikel können günstig und mit einem breiten Größenspektrum hergestellt werden. In die Matrix

## 1 Einleitung

können Wirkstoffe oder Reporter eingebaut sein und die Partikel sind gut lagerfähig. Im Gegensatz dazu besitzen Nanokapseln einen flüssigen Innenraum.

Im Bereich der Biologie und Medizin kommen z.B. superparamagnetische Nanopartikel aus Eisenoxid für die Zelselektion (Miltenyi) und als Kontrastmittel für das *magnetic resonance imaging* (MRI) zum Einsatz. Ebenfalls dienen liposomale Strukturen dem Medikamententransport (VENKATRAMAN *et. al.*).

Die Interaktion von diversen Nanomaterialien mit humanen Zellen wird schon seit einigen Jahren untersucht, da sich daraus vielversprechende Möglichkeiten für die Zelltherapie ergeben. Die Verwendung von Nanopartikel als Medikamenten-Carrier stellt eine der Anwendungsmöglichkeiten dar (WANG *et. al.*). Darüber hinaus sind neue Applikationswege, wie z.B. die orale Gabe, für Insulin oder Heparin denkbar (SULLIVAN *et. al.*, JIAO *et. al.*).

Im Jahr 2006 konnten LORENZ *et. al.* zeigen, dass verschieden funktionalisierte, polymere Nanopartikel mit einer Größe von 50-200 nm von diversen Zelllinien (z.B. HeLa- und Jurkat-Zellen) und mesenchymalen Stammzellen ohne Zugabe von Transfektionsreagenzien aufgenommen wurden. In Bezug auf DCs konnten bereits andere Gruppen mithilfe von *quantum dots* erste *homing*- und Migrationsstudien durchführen (CAMBI *et. al.*, SEN *et. al.*). Hier wurden bereits mit spezifischen Antikörpern konjugierte *quantum dots* erfolgreich getestet. Neuere Arbeiten mit polymeren Nanopartikeln zeigen, dass durch die Funktionalisierung mit Aminogruppen eine verbesserte Aufnahme der Partikel stattfindet (ZUPKE *et. al.*). Ebenso führt die Funktionalisierung mit Sulfonat oder Phosphonat zu einer gesteigerten Aufnahme in DCs (FRICK *et. al.*). Diese beladenen DCs zeigten nach ihrer Ausreifung eine verstärkte Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Für Studien am Menschen sind Nanopartikel aus Polystyrol nicht geeignet, hier bieten sich Nanopartikel aus Dextranen (STARK *et. al.*) oder anderen abbaubaren Stoffen an.

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel wurden mithilfe des Miniemulsions Prozesses synthetisiert (LANDFESTER *et. al.*). Dies erlaubt die Synthese von Nanopartikeln mit einer definierten Größe und die gezielte Modifikation der Partikel. Als Ausgangsmaterial wurde Polystyrol verwendet, da es in Experimenten auf lange Sicht stabil und nicht abbaubar ist. Des Weiteren erlaubt die hydrophobe Eigenschaft von Polystyrol das Einbauen von diversen Reportern (Eisenoxid, PMI, BODIPY, IR-Farbstoff) und durch Kopolymerisation eine einfache Funktionalisierung (NH<sub>3</sub>, COOH<sup>-</sup>). Durch kovalente Oberflächenfunktionalisierungen kann die Hydrophobizität der Polystyrolpartikel verringert werden. Über stabilisierende ionische Tenside wie Natriumdodecylsulfat (SDS) und Cetyltrimethylammoniumchlorid (CTMA-Cl) kann die Oberflächenfunktionalisierung recht einfach durchgeführt werden. Als nichtionisches Tensid wurde Lutensol AT50 verwendet.

Die Kombination von diversen Reportern ermöglicht es, das Verhalten von Nanopartikeln *in vitro* und *in vivo* auf verschiedenen Wegen zu untersuchen. Fluoreszierende Reporter (BODIPY, PMI) können mittels Durchflusszytometrie oder konfokaler Laser scanning Mikroskopie detektiert werden, Eisenoxid über MRI und IR-Farbstoffe ermöglichen ein *in vivo imaging*.

## 2 Material

### 2.1 Geräte

Dampfgarer	Tevion, Seefeld
Kamera	Leica, Bensheim
BD FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg
Tissue-Tek	Sakura, Staufen
Tierbestrahlungsanlage	Buchler, Braunschweig
Zeiss LSM 710-UV	Carl Zeiss, Jena
Xenogen IVIS <sup>®</sup> Spectrum	Caliper Lifescience, Massachusetts
ImmunoSpot S5 Versa Analyzer	C.T.L., Bonn

### 2.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Aceton	Merck, Darmstadt
AEC (3-Amino-9-Ethyl-Carbazol)-Tabletten	Sigma, Deisenhofen
Albumin, bovine serum	Sigma, Deisenhofen
Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovativ, Hamburg
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen
Bepanthen Augen-und Nasensalbe	Bayer, Leverkusen
Borgal 24%-Infektionslösung	Virbac, Bad Oldesloe
BSA ( bovin serum albumin)	Sigma, Steinheim
CellMask <sup>™</sup> Orange	Invitrogen, Darmstadt
Cellstrainer	BD Falcon
Dispase 2	Roche, Mannheim
DMSO	Merck, Darmstadt
DMF	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, Deisenhofen
EDTA Disodiumsalz, Titriplex R III	Merck, Darmstadt
Einbettkapseln für Paraffin	NeoLab, Heidelberg
Einfrier-Röhrchen Cryotube 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden
Einmalpipetten, steril	Greiner, Nürtingen
Entellan Eindeckmedium	Merck, Darmstadt
Eosin Y Lösung	Sigma, Steinheim
Ethanol (70 %)	Brüggemann Alkohol, Heilbronn
Ethanol reinst	Merck, Darmstadt
Ethylalkohol (Ethanol 96 % vergällt)	M&W Mundo, Mainz-Kostheim
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg
Falcons, PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen
FCS Peroxidase Blocking Solution	PAA, Paschingen
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Genitacin (G418)	Gibco BRL, Karlsruhe
Gewebeeinbettungsschwamm	Deltalab, Barcelona



## 2 Material

Gewebekulturplatten	Greiner, Nürtingen
Heparin	Roche, Grenzach-Wyhlen
Humanalbumin	Octapharm, Langenfeld
Ketamin	Ratiopharm, Ulm
Roti-Histofix, 4,5 % Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
Isopropanol	Fluka, Deisenhofen
Isofluran, Forene	Abbott, Wiesbaden
Kaliumchlorid	Applichem, Heidelberg
Separationsmedium, Ficoll	PAA, PaschingenMeyers
Haemalaun Lösung	Merck, Darmstadt
Mikrotiterplatten	Greiner, Nürtingen
Nahtmaterial	Ethicon, Norderstedt
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Natriumcitrat	Serva, Heidelberg
Natronlauge	Merck, Darmstadt
Operationsbesteck	FST-Fine Science Tools, Heidelberg
Paraffin	Klinika Medical, Usingen
Paraformaldehyd	Applichem, Heidelberg
PBS	Gibco, BRL, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Peroxidase Blocking Solution	Dako, Hamburg
PHA	Murex Biotech Ltd., Kent
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Spritzen	Braun, Melsungen
Tris	Applichem, Heidelberg
Trypanblau	Merck, Darmstadt
Tween20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol reinst	Merck, Darmstadt
Xylazin	Bayer, Leverkusen
Zellkulturflaschen	Greiner, Nürtingen

### 2.3 Zellkulturmedien

AIM-V Medium	Gibco, BRL, Karlsruhe
RPMI 1640	Gibco, BRL, Karlsruhe
X-Vivo15	Biowhittaker, Viersen

#### 2.3.1 Einfriermedium

AIM-V Medium +	8 % Humanalbumin
	10 U/ml Heparin

## 2 Material

Für die Kryokonservierung wurde dem Medium kurz vor Verwendung noch 10 % DMSO zugegeben.

### 2.3.2 DC-Medium

RPMI +                    2 % Humanserum  
                              1 % P/S

### 2.4 Zytokine

GM-CSF	Bayer, Leverkusen
Interleukin 1 $\beta$	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
Interleukin 4	Promokine, Heidelberg
Interleukin 6	Miltenyi, Bergisch-Gladbach
PGE <sub>2</sub>	Sigma, Deisenhofen
TNF- $\alpha$	Promokine, Heidelberg

### 2.5 Puffer und Lösungen

#### Acetatpuffer

46,9 ml	H <sub>2</sub> O
4,6 ml	Essigsäure 0,2 M
11 ml	Natriumacetat 0,2 M

#### AEC

1x	3-Amino-2-Ethyl-Carbazol Tablette
5 ml	Dimethylformamid
ad 50 ml	Acetatpuffer
steril filtrieren	

#### Citratpuffer

Stammlösung A	0,1 M	Zitronensäure
	ad 1 L	H <sub>2</sub> O
Stammlösung B	0,1 M	Natriumacetat
	ad 1 L	H <sub>2</sub> O
Arbeitslösung	9 ml	Lösung A
	41 ml	Lösung B
	ad 500 ml	H <sub>2</sub> O
	pH 6,1	

## 2 Material

<b>EDTA-Puffer</b>	0,375 g ad 1 Lösung pH 8,0	Disodiumsalz H <sub>2</sub> O
<b>Eosin Färbelösung</b>	100 ml 0,5 ml	Eosin Y Eisessig
<b>FACS-Puffer</b>	500 ml 0,25 g	PBS 0,5 % BSA
<b>FACS-Fix</b>	243 ml 6,8 ml	PBS 37 % Formaldehyd
<b>Hämalaun-Färbelösung</b>	50 ml 200 ml	Meyers Hämalaun A. dest.
<b>MACS-Puffer</b>	500 ml 0,25 g 2mM EDTA	PBS 0,5 % BSA
<b>Maus-Narkose</b>	0,8 ml 2 ml 2,8 ml	Xylazin Ketamin H <sub>2</sub> O
<b>TBS 20x</b>	4 g/L 160 g/L 60 g/L	KCl NaCl Tris
auf pH 7,4 einstellen		
<b>Trypanblau</b>		
Stammlösung	2 g ad 1 L	Trypanblau H <sub>2</sub> O
Gebrauchslösung	75 ml 25 ml	Stammlösung 150 mM NaCl

## 2 Material

### Tris-Puffer

(Stammlösung 10x)	60,5 g	TRIS PUFFERAN
	ad 600 ml	H <sub>2</sub> O
auf pH 7,6 einstellen		
	90 g	NaCl
	ad 1L	H <sub>2</sub> O
Gebrauchslösung	100 ml	Stammlösung
	ad 1 L	H <sub>2</sub> O

## 2.6 Antikörper

### 2.6.1 Antikörper für die Immunhistochemie

Anti CD1a, Klon 010	Dako, Hamburg
Anti CD3, Klon LN10	Novocastra, Newcastle upon Tyne
Anti CD207, Klon 12D6	Novocastra, Newcastle upon Tyne

### 2.6.2 Antikörper für ELISpot-Assay

Primärantikörper Anti hIFN $\gamma$ 1-D1K	Mabtech AB, Nacka
Sekundärantikörper Anti hIFN $\gamma$ 7-B6-1	Mabtech AB, Nacka

## 2.6.3 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Bezeichnung	Spezies	Konjugation	Hersteller
A2	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
B7	Maus	PE	Merk Millipore, Darmstadt
CD1a	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD1c (BDCA 1)	Maus	APC	eBioscience, Frankfurt
CD3	Maus	APC, FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD3	Maus	V450, PeCy7	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	Maus	PE, APC	Beckman Coulter, Krefeld
CD4	Maus	APC H7, APCCy7	BD Biosciences, Heidelberg
CD8	Maus	PE, APC	Beckman Coulter, Krefeld
CD11c	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD11c	Maus	V450	BD Biosciences, Heidelberg
CD14	Maus	FITC, V450	BD Biosciences, Heidelberg
CD14	Maus	APC	Beckman Coulter, Krefeld
CD16	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD16	Maus	Pacific Blue	BioLegend, Niederlande
CD19	Maus	PE, PC5	Beckman Coulter, Krefeld
CD33	Maus	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD34	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD34	Maus	PeCy7	BD Biosciences, Heidelberg
CD45	Maus	FITC, PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD45	Maus	PeCy7	BD Biosciences, Heidelberg
CD45RA	Maus	V450	BD Biosciences, Heidelberg
CD56	Maus	APC	Beckman Coulter, Krefeld
CD80	Maus	FITC	Beckman Coulter, Krefeld
CD83	Maus	FITC, APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD86	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD123	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
CD123	Maus	PeCy7	BD Biosciences, Heidelberg
CD141 (BDCA 3)	Maus	PE	Miltenyi Biotec, Teterow
CD303 (BDCA 2)	Maus	APC	Miltenyi Biotec, Teterow
CD304 (BDCA 4)	Maus	PE	Miltenyi Biotec, Teterow
CCR7	Maus	APC	Miltenyi Biotec, Teterow
HLA DR	Maus	PE	Beckman Coulter, Krefeld
HLA DR	Maus	PerCPCy5.5	BD Biosciences, Heidelberg
IgG1	Maus	FITC, PE, APC	Beckman Coulter, Krefeld
IgG1	Maus	V450, PeCy7, APCCy7 PerCPCy5.5	BD Biosciences, Heidelberg
lineage 1	Maus	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
mCD45	Ratte	APCCy7	BD Biosciences, Heidelberg

## 2.7 Kits

Dako REAL <sup>TM</sup> EnVision <sup>TM</sup> Detection System, Peroxidase/DAB+	Dako, Hamburg
Vectastain Elite Kit	Vector Lab, Burlingame
CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec
CD34 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec

## 2.8 Zellen

### 2.8.1 Blutlymphozyten

Es wurden mononukleäre Zellen des peripheren Bluts verwendet (*peripheral blood mononuclear cell*, PBMC). Diese wurden aus Routine-Blutspenden der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz gewonnen. Aus einer Vollblutspende von etwa 450 ml wurden *buffy coats* maschinell abgetrennt. Diese enthalten Leukozyten, aus denen durch Ficoll-Separation Lymphozyten isoliert und weiter verwendet werden können.

## 2.9 Versuchstiere

NOD.Cg-*Prkdc*<sup>scid</sup>*Il2rg*<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG)                      The Jackson Laboratory, Maine

Die Haltung der Tiere erfolgte in der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg Universität Mainz unter SPF (*specific pathogen free*) Bedingungen. Das Trinkwasser enthielt zusätzlich Sulfadoxin und Trimethoprim (Borgal<sup>®</sup>). Es lagen folgende genehmigte Tierversuchsanträge vor: "In vivo targeting menschlicher dendritischer Zellen durch optimierte Nanopartikel im humanisierten Mausmodell". Beginn: 08.04.2011, Aktenzeichen der Genehmigung durch LUA: 23 177-07/G 11-1-01. "Der Einfluss verschiedener Effektor T Zell-Subpopulationen auf murine Entzündungsmodelle." Beginn: 12.06.2008, Aktenzeichen der Genehmigung durch LUA: 23 177-07/G 08-1-010.

## 2.10 Nanopartikel

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel wurden vom Max Planck Institut für Polymerforschung von Dr. Grit Baier zur Verfügung gestellt. Die Synthese der Partikel fand mit Hilfe der Miniemulsionstechnik statt (LANDFESTER *et. al.*). Die Partikel bestehen aus Polystyrol, einem hydrophobes Polymer. Dieses Material erlaubt eine recht einfache Funktionalisierung durch Ko-Polymerisation und ist durch seine Stabilität gut geeignet für Langzeitstudien. Das Polystyrol hatte in den verwendeten Partikeln drei unterschiedliche Reporter eingeschlossen. Zum einen Platin (Platin(II)acac), für die *in vitro* Versuche den Fluoreszenzfarbstoff BODIPY und für die *in vivo* Analysen den Infrarotnahen Farbstoff IR 780. In Tabelle 3 sind die Eigenschaften der Partikel aufgelistet. Neben der Funktionalisierung und der Größe unterscheiden die Partikel sich auch hinsichtlich des Detergenz, welches für die Stabilisierung der Oberfläche verwendet wurde. Bevor

## 2 Material

die Nanopartikel in den Versuchen eingesetzt werden konnten, wurden sie dialysiert, um überschüssige Monomere und einen Großteil des Detergenz zu entfernen.

<b>Nanopartikel</b>	<b>Funktionalisierung</b>	<b>Oberfläche</b>	<b>Diameter, nm (STDN, %)</b>
GB-PS-61	/	Lutensol AT 50	145 (17,7)
GB-PS-62	COOH	Lutensol AT 50	139 (14,0)
GB-PS-63	NH <sub>2</sub>	Lutensol AT 50	153 (8,9)
BR 59	/	SDS	125 (15,7)

Tabelle 3: **Verwendete Nanopartikel**

## 3 Methoden

### 3.1 Isolierung von peripheren mononukleären Blutlymphozyten

Mononukleären Zellen (PBMC) des peripheren Blutes wurden aus *buffy coats* mittels Ficoll-Separation gewonnen. Das Prinzip beruht auf einer Dichtegradientenzentrifugation ( $D = 1,077 \text{ g/ml}$ ). Für einen *buffy coat* wurden in vier 50 ml Falcons je 15 ml Ficoll-Separationsmedium vorgelegt. Der *buffy coat* wurde mit PBS auf das entsprechende Endvolumen verdünnt und anschließend auf das Separationsmedium gegeben, ohne dass sich die beiden Lösungen vermischen. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2300 rpm ohne Beschleunigung und Bremse. Nach der Zentrifugation befanden sich die PBMC zwischen Plasma und Ficoll-Separationsmedium als weißlicher Ring und konnten vorsichtig mit einer Pipette abgesaugt und in ein neues 50 ml Falcon überführt werden. Die Falcons wurden mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und wurden für acht min bei 1800 rpm zentrifugiert. Da das Zellpellet teilweise sehr weich war, musste beim Verwerfen des Überstandes vorsichtig gearbeitet werden. Die Zellen wurden erneut in 50 ml PBS resuspendiert und es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte für fünf min bei 1500 rpm. Danach wurden die Zellen in 50 ml PBS aufgenommen, gezählt und entsprechend weiterverwendet.

### 3.2 Kryokonservierung von Zellen

Für eine Langzeitaufbewahrung von Zellen, wurden diese bei ca.  $-196^\circ\text{C}$  in der Gasphase eines flüssigen Stickstofftanks kryokonserviert. Hierfür wurden die Zellen für fünf min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden sie in 1 ml Einfriermedium + 10 % DMSO aufgenommen, resuspendiert und in Einfrier Röhrchen überführt. Diese wurden in Kryokonservierungsboxen gestellt, welche durch eine Ummanntelung aus Isopropanol ein kontrolliertes Abkühlen von  $1^\circ\text{C}$  pro Minute gewährleisten. Das Abkühlen erfolgte zunächst in einem  $-80^\circ\text{C}$  Gefrierschrank, bevor die Röhrchen anschließend in den Stickstofftank überführt wurden. Maximal wurden  $100 \times 10^6$  Zellen pro Röhrchen eingefroren.

### 3.3 Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Monozyten wurden aus PBMCs (s.3.1) mittels Plastikadhärens gewonnen. Hierfür wurden  $10\text{-}15 \times 10^6$  PBMCs pro well in einer 6-well Platte in DC-Medium ausgesät und für 60 min bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden nicht adhärenzte Zellen mit warmem (RT) PBS abgespült. Für die Ausreifung der Monozyten zu dendritischen Zellen (DC) wurde dem DC-Medium 800 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 zugegeben und die Zellen damit zwei Tage bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert.

An Tag drei und fünf wurde ein halber Mediumwechsel durchgeführt. Es wurden aus jedem well 800  $\mu\text{l}$  Überstand entnommen und durch 1 ml DC-Medium mit 1600 U/ml



### 3 Methoden

GM-CSF und 500 U/ml IL-4 ersetzt. Dafür wurde der Überstand, wenn möglich, gepoolt und für fünf min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in der entsprechenden Menge supplementiertem DC-Medium aufgenommen und auf die *wells* verteilt. Die Zellen wurden weitere 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

An Tag sechs der DC Generierung konnten unreife DC (iDC) geerntet werden. Hierfür wurde das Medium abgenommen und die wells zwei mal mit kaltem (4°C) PBS gewaschen. Mittels mikroskopischer Kontrolle wurde überprüft, ob sich die iDC gelöst hatten. War dies nicht der Fall, wurde PBS/2 mM EDTA auf die Zellen gegeben und max. 10 min bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die wells erneut mit kaltem PBS gespült. Zeigte die mikroskopische Kontrolle immer noch adhärenente iDCs, wurde die 6-well Platte kurz auf Eis gestellt und dann erneut mit kaltem PBS gespült. Die so gewonnenen iDCs konnten entweder kryokonserviert (s.3.2) oder direkt weiterverwendet werden.

Zur Generierung von ausgereiften DC (mDC) wurde an Tag sechs anstatt eines halben ein ganzer Mediumwechsel durchgeführt. Hierfür wurde das Medium komplett entnommen und fünf min bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in DC-Medium mit 800 U/ml GM-CSF, 250 U/ml IL-4, 10 ng/ml IL1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1000 U/ml IL-6 und 1  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub> aufgenommen und auf die wells verteilt. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> für 48 h. Zuletzt wurden die *wells* dreimal mit kaltem PBS gewaschen und mittels mikroskopischer Kontrolle wurde überprüft, ob alle mDC geerntet wurden. Die Zellen wurden entweder kryokonserviert oder direkt weiter verwendet.

#### 3.4 Isolierung von peripheren Blutstammzellen

Für die Isolierung von peripheren Blutstammzellen wurden Leukapheresepreparate verwendet, die von allogenen (z.B. Familienspendern) oder autologen Spendern nach einer Stammzellspende übrig geblieben waren. Leukapheresen und Blutproben von Patienten und Spendern wurden im Rahmen von "Untersuchungen zur Rekonstitution des Immunsystems in Patienten nach Stammzelltransplantation" gewonnen. Die Approbation erfolgte durch die Ethikkommission der Landesärztekammer [837.185.00 (2551)].

Hierfür wurde zunächst eine Ficoll-Separation durchgeführt. Für ein Leukapherasat mit einem Volumen von ca. 80 ml wurde in zwölf 50 ml Falcons je 15 ml Ficoll-Separationsmedium vorgelegt. Anschließend wurde das Leukapherasat auf das entsprechende Volumen mit PBS/2 mM EDTA verdünnt und vorsichtig auf das Separationsmedium gegeben. Es folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 2000 rpm ohne Beschleunigung und Bremse. Die PBMCs konnten dann als weißlicher Ring zwischen Plasma und Ficoll-Separationsmedium abgenommen und in eine neues 50 ml Falcon überführt werden. Die Zellen wurden mit PBS/2 mM EDTA aufgefüllt und erneut zehn min bei 1800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig unter Sicht dekantiert und das Zellpellet erneut in PBS/2 mM EDTA resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte, zunächst zehn min bei 1400 rpm und anschließend fünf min bei 1400 rpm. Das Zellpellet wurde dann in 50 ml MACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und gezählt. Lagerung auf Eis.

### 3.5 MACS-Isolation von T-Zellen und CD34<sup>+</sup> Stammzellen

Das Prinzip der MACS (*magnetically activated cell sorting*) Isolation beruht darauf, dass Zellen mit sogenannten MicroBeads gekoppelt werden. Diese MicroBeads bestehen aus kleinen paramagnetischen Partikeln, an die unterschiedliche murine anti-humane Antikörper oder Fabs (*fragment antigen binding*) gekoppelt sein können. Dadurch ist eine spezifische Bindung an die Zellen gegeben, die das entsprechende Antigen auf der Oberfläche exprimieren. Die so markierten Zellen werden anschließend über eine magnetisierte Separationssäule gegeben und in der Säule gehalten. Nach Entfernen des Magneten können die markierten Zellen aus der Säule eluiert und weiter verwendet werden.

Für die Isolierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden PBMC aus *buffy coats* verwendet. Zunächst wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen isoliert und anschließend aus der Negativfraktion CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Es wurde nach dem CD8- und CD4-MicroBeads Kit gearbeitet. Zunächst wurden die PBMCs in kaltem (4°C) MACS-Puffer aufgenommen und gewaschen (Zentrifugation, fünf min bei 1500 rpm). Nachdem anschließend die Zellzahl bestimmt wurde, wurden je 10<sup>6</sup> Zellen 80 µl MACS Puffer und 20 µl Mikrobeads dazugegeben. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 4°C. Die inkubierten Zellen wurden mit fünf ml MACS Puffer gewaschen (fünf min, 1500 rpm). Während dieses Waschschrittes wurden die Säulen vorbereitet. Dafür wurden die Säulen mit Filtern in den Magneten eingesetzt und beide mit 500 µl MACS Puffer eluiert. Das Zellpellet wurde in 500 µl MACS Puffer resuspendiert und möglichst blasenfrei über den Filter auf die Säule gegeben. Der Filter wurde mit 500 µl MACS Puffer gespült und anschließend verworfen. Die Säule wurden ebenfalls mit 500 µl MACS Puffer gespült. Es folgte die Eluierung der Zellen. Dafür wurde die Säule aus dem Magneten entnommen und auf ein 15 ml Falcon gesetzt. Nun wurden 1000 µl MACS Puffer auf die Säule gegeben und diese zügig mit dem Stempel durch die Säule gedrückt. Dieser Vorgang wurde ein zweites Mal wiederholt. Die Säule wurde verworfen. Die Zellen wurden für fünf min bei 1500 rpm abzentrifugiert, im gewünschten Medium aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

CD34<sup>+</sup> Stammzellen wurden mit dem CD34 MicroBead Kit aus peripheren Blutstammzellen isoliert. Das Protokoll ist an die Isolation von T-Zellen angelehnt, es wurden lediglich Säulen mit einer höheren Kapazität und größere Volumen des MACS Puffer eingesetzt. Für eine höhere Reinheit, wurden die Zellen über zwei Säulen gegeben.

### 3.6 Interferon $\gamma$ ELISpot-Assay

Der Interferon (IFN)  $\gamma$  ELISpot-Assay dient dem Nachweis von IFN  $\gamma$ , das von einzelnen T-Zellen antigenabhängig sezerniert werden. Das Prinzip beruht auf dem Anfärben der IFN  $\gamma$  - Sekretion jeder einzelnen T-Zelle als Spot und erlaubt somit eine Aussage über Anzahl der Zellen, die IFN  $\gamma$  sezernieren (z.B. n / 1 Mio Zellen). Hierfür wird ein Antikörper gegen humanes IFN  $\gamma$  verwendet, welcher mit dem konstanten Teil der schweren Kette an eine Nitrozellulosemembran bindet. Der variable Bereich bindet an freies IFN  $\gamma$ , das von T-Zellen nach Antigenerkennung freigesetzt wird. Die Detektion erfolgt über eine selektive Bindung eines an Biotin gekoppelten Sekundärantikörpers an ein IFN  $\gamma$  Epitop, gefolgt von der Bindung von Streptavidin und Peroxidase. Durch das

### 3 Methoden

Enzym fällt ein Farbstoff an der Sekretionsstelle aus und kann anschließend durch eine automatische Auszählung quantifiziert werden (ImmunoSpot<sup>®</sup> S5 Versa Analyzer und Software ImmunoSpot v 5.0, C.T.L.).

Zunächst wurde die ELISpot Platte (96-well Mikrotiterplatte) mit 35 % EtOH aktiviert und mit PBS (RT) dreimal gewaschen. Anschließend folgte die Beschichtung mit dem anti-INF  $\gamma$ -Primärantikörper (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS) und eine Inkubation  $\text{üN}$  bei 4°C. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper dreimal mit PBS abgewaschen und die Platte mit entsprechendem Medium + 10 % FCS für eine h bei 37°C im Brutschrank blockiert. Anschließend erfolgte die Belegung der Platte mit einem Endvolumen von 100  $\mu\text{l}$  pro well. Als Zielzellen wurden diverse DC mit einer Zellzahl von  $2 \times 10^4$  Zellen pro well und als Effektorzellen CD4/CD8 T-Zellen mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  eingesetzt. Als Antigen wurde das pp65<sub>495-503</sub> Epitop des CMV verwendet (KERN *et. al.*) oder ein Peptidmix aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell Epitopen des CMV. Es folgte eine Inkubation von 20 h bei 37°C im Brutschrank. Für die Detektion wurde die Platte zuerst sechsmal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen. Anschließend wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  in PBS/0,5 % BSA) auf die wells gegeben und für zwei h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Platte sechsmal mit PBS/0,05 % Tween gewaschen, 100  $\mu\text{l}$  des Avidin-Peroxidase-Komplexes (Vectastain Kit) pro well zugegeben und für eine h bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Platte je dreimal mit PBS/0,05 % Tween und anschließend mit PBS gewaschen. Durch Zugabe der Substratlösung AEC wurde das Entwickeln gestartet. Nach 15 bis 30 min konnte die Reaktion durch Spülen mit fließendem Leitungswasser abgestoppt werden. War die Nitrozellulosemembran komplett getrocknet, erfolgte die automatisierte Auswertung.

#### 3.7 Beladung von dendritischen Zellen mit Nanopartikeln

Für die Beladung wurden  $1,5 \times 10^5$  iDCs (s.3.3) pro well in DC-Medium in 48-well Platten ausgesät. Das DC-Medium wurde mit 1600 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 supplementiert. Nach einer Inkubation von einer h bei 37°C im Brutschrank, wurden die jeweiligen Nanopartikel in unterschiedlichen Konzentrationen (25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Inkubation von 16 h bei 37°C im Brutschrank. Anschließend wurde das nanopartikelhaltige DC-Medium abgenommen und die wells mit Zellen wurden mit vorgewärmten DC-Medium gespült. Für die Ausreifung der DC wurde dem DC-Medium mit 1600 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1000 U/ml IL-6 und 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  PGE<sub>2</sub> zugesetzt. Die Zellen wurden für zwei Tage bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zum Ernten der mDC wurden die wells mit kaltem PBS mehrmals gewaschen. Die mDC wurden anschließend direkt weiter verwendet.

#### 3.8 Durchflusszytometrie

Unterschiedliche Zellpopulationen können anhand der Expression bestimmter Oberflächenmoleküle charakterisiert und unterschieden werden. Dies geschieht mit Hilfe eines Durchflusszytometers (FACS, *fluorescence-activated cell sorting*). Spezifische monoklo-

nale Antikörper, die mit Fluorochromen konjugiert sind, binden an bestimmte Oberflächenmoleküle und können im FACS detektiert werden. Fluorochrome sind Farbstoffe, die durch bestimmte Wellenlängen angeregt werden und Licht eines entsprechenden Spektrums emittieren, welches detektiert werden kann.

Durch die Kombination von drei verschiedenen Lasern und Einzel- sowie Tandem-Farbstoffen konnte eine Färbung von bis zu sieben verschiedenen Oberflächenmolekülen gleichzeitig gewährleistet werden. Dadurch konnten Zellen sehr spezifisch definiert werden. Je nachdem welche Zellen untersucht werden sollten, wurde die entsprechende Zellmenge zentrifugiert (fünf min bei 1500 rpm) und in entsprechendes Volumen FACS Puffer aufgenommen. Pro FACS Röhrchen sollte nicht mehr als 100  $\mu\text{l}$  Volumen vorliegen, da die Antikörper sonst zu sehr verdünnt würden. Anschließend wurden die entsprechenden Fluorochrom-gekoppelten Antikörper zu den Zellen gegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen (fünf min bei 1500 rpm) und entweder mit FACS-Fix fixiert oder frisch weiter verwendet. Fixierte Zellen konnten bei 4°C bis zu einer Woche aufbewahrt werden, frische Zellen bis zu 4 h ebenfalls bei 4°C.

Für einige Versuche war eine 7 aminoactinomycin D (7 AAD) Färbung notwendig. 7 AAD ist ein Peptid, das in die DNA interkalieren kann und dabei seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. Es kann ausschließlich DNA von nicht viablen Zellen färben, da es nur in Zellen ohne Zellmembran eindringen kann. In allen Fällen wurde die 7 AAD Färbung mit einer FACS-Färbung kombiniert. Dafür wurden die Zellen zunächst für die gewünschten Oberflächenmoleküle gefärbt und dann frisch weiter verwendet. Die Zellen wurden in 300  $\mu\text{l}$  PBS aufgenommen. Anschließend wurden 12.5  $\mu\text{g/ml}$  7 AAD dazugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 650  $\mu\text{l}$  PBS gewaschen (fünf min bei 1500 rpm) und in 300  $\mu\text{l}$  FACS-Puffer aufgenommen. Die Proben konnten bis zu vier h bei 4°C gelagert werden.

### 3.9 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie

Bei der Laser-Scanning-Mikroskopie (LSM) werden Fluorochrome durch fokussierte Laserstrahlen mit spezieller Wellenlänge angeregt. Die Emission der Fluorochrome wird detektiert und sichtbar gemacht. Mit einer konfokalen LSM (kLSM) ist es möglich, dicke Präparate, wie biologische Zellen in ihrem Gewebeverbund, zu untersuchen. Zudem gelingt bei Mehrfachfärbungen die simultane Aufnahme und Darstellung der einzelnen Kanäle bei hinreichender Kanaltrennung.

Für diese Arbeit wurde ein Zeiss LSM 710-UV (Carl Zeiss, Germany) mit Zeiss LSM Image Examiner Software (v 3.2.0.115) verwendet. Nanopartikel beladene mDC (s.3.7) wurden wie beschrieben geerntet, in PBS aufgenommen und  $1 \times 10^5$  Zellen pro well in 8-well *chamber slides* überführt. Die Zellen wurden zunächst bei 4°C gelagert, damit sie sich setzen konnten und kurz vor der Mikroskopie wurde der Zellkern mit 0,5 mM DRAQ 5 und die Zellmembran mit 2,5  $\mu\text{g/ml}$  CellMask<sup>TM</sup> Orange pro well angefärbt. Anschließend konnten die Zellen mikroskopiert werden.

#### 3.10 Immunhistochemie

Für die Immunhistochemie (IHC) musste das zu untersuchende Gewebe vorher für mindestens 24 h in einer 4 %igen Formaldehydlösung fixiert werden. Um die Gewebe anschließend in Paraffin zu erhalten, wurden sie in Einbettkassetten überführt. Die Entwässerung erfolgte in einem Vakuum Gewebe-Infiltrationsautomat. Dabei wurde die Formaldehydlösung zunächst durch Alkohol und anschließend durch das Lösungsmittel Xylol ersetzt. Zum Schluss wurde Paraffin zugesetzt. Im Anschluss konnten die Proben in Metallförmchen ausgebettet werden und sind so dauerhaft haltbar. Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte mit einem Rotationsmikrotom, wobei Schnitte im Bereich von 3-6 µm angefertigt wurden. Die Schnitte wurden auf Objektträger überführt und für 60 min bei 80°C zum Anschmelzen und Trocknen gebracht, um eine Fixierung der Gewebe auf dem Objektträger zu gewährleisten. Die Schnitte wurden nicht länger als 4 Wochen bei RT gelagert.

Vor der Färbung der Schnitte musste das Gewebe entparaffiniert und rehydriert werden. Die Entparaffinierung erfolgte durch Inkubation in Xylol für zweimal fünf min. Anschließend folgte die Rehydrierung durch Inkubation für je fünf min in einer absteigender Alkoholreihe (100 % Isopropanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, Aqua dest.).

##### 3.10.1 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistologische Färbung wurde mit dem Dako Real™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+ durchgeführt. Das Prinzip der Färbung beruht darauf, dass zunächst ein Primärantikörper an ein gewünschtes humanes Antigen bindet. Für die Detektion wird ein Sekundärantikörper verwendet, an den HRP (*Horseradishperoxidase*) Moleküle gekoppelt sind. Die Farbreaktion erfolgt mit Hilfe eines DAB+ Chromogens, einer Diaminobenzidinlösung (DAB) und einem peroxidhaltigen Substratpuffer. Die HRP Moleküle katalysieren eine Oxidation des DAB zu einem braunen, wasserunlöslichen Farbstoff, der im Mikroskop sichtbar ist.

Für die Färbung wurden die Proben zunächst entparaffiniert und rehydriert (s.3.10). Anschließend wurden die Schnitte, je nach gewünschter Färbung, mit entsprechendem Puffer vorbehandelt. Dafür wurden sie im Dampfgarer für 40 min gekocht. Danach wurden sie für 20 min bei RT abgekühlt. Die Schnitte wurden in eine feuchte Kammer gelegt und für fünf min mit Peroxidase Blocker inkubiert. Anschließend wurden sie für fünf min mit Aqua dest. und zweimal für fünf min mit Tris-Puffer gespült. Der verdünnte Primärantikörper wurde auf die Schnitte gegeben und in der feuchten Kammer für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit Tris-Puffer für je fünf min wurde der Sekundärantikörper auf die Schnitte gegeben. Es folgte eine Inkubation in der feuchten Kammer für 30 min mit anschließendem Spülen mit Tris-Puffer für fünf min. Der Farbkomplex wurde für fünf min auf die Schnitte gegeben und mit Leitungswasser für fünf min gespült. Zur Gegenfärbung der Zellkerne wurde anschließend mit Mayers Hämalaun für eine min inkubiert und unter laufendem Leitungswasser gespült. Die so gefärbten Schnitte wurden getrocknet und entwässert (zweimal 100 % Isopropanol und anschließend Xylol). Die Schnitte wurden danach mit Entellan eingedeckelt und bei RT gelagert.

### 3.11 Humanisierung

In dieser Arbeit wurde mit der NSG Maus gearbeitet. Es wurden ausschließlich Weibchen mit einem Alter von fünf bis neun Wochen verwendet. Periphere Blutstammzellen (PBSC) wurden über CD34 isoliert und angereichert (s.3.5). Vor der Humanisierung (6 - 24 h) wurden die Tiere mit 150 rad bestrahlt (Cs-137 Quelle). Die PBSC wurden intravenös über die Schwanzvene appliziert. Dafür wurden die Tiere mit einer Rotlichtlampe vorgewärmt, um die Venen besser sichtbar zu machen und die aufgereinigten PBSCs in PBS aufgenommen. Pro Tier wurden zwischen  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  PBSCs in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  appliziert.

### 3.12 Biopsieentnahme

Für die Entnahme von Biopsien wurden die Tiere mit einer Narkosemischung analgosediert (5 % Ketamin-ratiopharm<sup>®</sup> + 2 % Xylazin (Rompun<sup>®</sup>)). Zum Schutz der Augen vor Austrocknung wurden diese mit Augen- und Nasensalbe geschützt. Anschließend wurden die Tiere interskapulär rasiert und desinfiziert. Es wurde eine Biopsie mit der Größe von ca.  $2 \times 2 \text{cm}$  entnommen und in 4 % Formaldehydlösung konserviert. Die Probe wurde dann für die IHC (s.3.10) weiterverwendet. Die Wundstelle wurde vernäht und mit Sprühpflaster versehen.

### 3.13 Organentnahme

Ein Teil der Tiere wurde vor der Organentnahme und der damit verbundenen zervikalen Dislokation geblutet. Dafür wurden die Tiere analgosediert und auf eine flache Unterlage gespannt. Anschließend wurde mit einer Spritze das Herz punktiert und somit bis zu zwei ml peripheres Blut entnommen. Es folgte eine sofortige Tötung der Tiere durch zervikale Dislokation. Zunächst wurden Hautproben genommen von Rücken, Bauch und Ohr. Anschließend wurde sowohl der Bauchraum wie auch der Brustkorb geöffnet und Milz, Leber und Lunge entnommen. Desweiteren wurde in einigen Versuchen auch das Gehirn entnommen. Zur Gewinnung von Knochenmark wurden der hintere Oberschenkel und das Wadenbein verwendet. Ein Teil der Organe und Gewebe wurde für die IHC (s.3.10) oder für das *biofluorescence imaging* (BFI, s.3.14) weiterverwendet, der andere Teil diente der Herstellung von Zellsuspensionen.

#### 3.13.1 Herstellung von Zellsuspension

Die Organe wurden wie in 3.13 beschrieben entnommen und in PBS auf Eis ( $4^\circ\text{C}$ ) gelagert. Die Milz wurde durch Verreiben auf einem Zellsieb in Suspension gebracht. Die Zellen wurden für fünf min bei 1500 rpm zentrifugiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. Das Knochenmark wurde mit Hilfe feiner Kanülen und PBS aus Oberschenkel und Wadenbein gespült, anschließend resuspendiert und über einen Filter gegeben. Danach wurden die Zellen für fünf min bei 1500 rpm zentrifugiert und auf Eis gelagert.

### 3.14 Biofluorescence imaging

Für die Untersuchung der Biodistribution von unterschiedlichen Nanopartikeln (*Biofluorescence Imaging*, BFI) wurden NSG Mäusen Nanopartikel intravenös injiziert und diese anschließend über einen definierten Zeitraum gescreent. Das Xenogen IVIS<sup>®</sup> Spectrum erlaubte die Untersuchung lebendiger Tiere; zur Detektion der Nanopartikel wurde der eingebaute IR 780 Iodid Farbstoff genutzt. Die Tiere waren zwischen 8 Wochen und 6 Monaten alt und sowohl weiblich als auch männlich. Die Nanopartikel lagen in Suspension vor und wurden den Tieren intravenös über die Schwanzvene appliziert. Hierfür wurden die Tiere vorher mit einer Rotlichtlampe erwärmt und anschließend wurde ihnen ein Volumen von 100 bis 200  $\mu\text{l}$  injiziert. Es wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Biodistribution geschaut (direkt nach Applikation, zwei, vier, sechs, 24, 48 und 96 h danach). Dafür wurden die Tiere mit 2,5 % Isofluran über eine Inhalationsnarkose in einer Kammer betäubt und anschließend in die Messkammer des Xenogens auf den Rücken gelegt. In der Messkammer wurden die Tiere ebenfalls mit 2,5 % Isofluran in Narkose gehalten. Nach der Messung wurden die Tiere zurück in ihre Käfige gesetzt und bis zum Aufwachen überwacht. Nach 96 h wurden die Tiere nach der letzten Messung Herzpunktiert, durch zervikale Dislokation getötet und Gewebe und Organe entnommen (s.3.13). Die Organe wurden in Petrischalen in PBS auf Eis gelagert und ebenfalls unter das Xenogen gelegt. Anschließend wurden Zellsuspensionen aus den Organen hergestellt oder diese verworfen.

### 3.15 Statistik

Bei der statistischen Auswertung wurde mittels zweiseitigem t-Test überprüft, ob die Ergebnisse im Mittel signifikant von den Kontrollen abwichen. Als statistisch signifikant wurden Abweichungen mit einem p-Wert von  $< 0,05$  angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Humanisierung

#### 4.1.1 Etablierung des Färbeprotokolls für die Durchflusszytometrie

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war die Etablierung eines sieben Farben Färbeprotokolls, welches den Nachweis einer erfolgreiche Humanisierung *in vivo* erlauben sollte.

Bis zu Beginn dieser Arbeit wurden lediglich dreifach Färbungen mit dem Marker CD45 in Kombination mit je CD4, CD8, CD3, CD19, CD14, CD16, CD56 und CD11c durchgeführt. So konnten grundlegende Aussagen über die Rekonstitution humaner hämatopoetischer Zellen gemacht werden. Nachdem in ersten Modellen ein erfolgreiches Anwachsen von humanen hämatopoetischen Zellen beobachtet werden konnte, sollte in den folgenden Modellen der Fokus stärker auf den Nachweis von DC-Subpopulationen und -Vorläufern gerichtet werden. Zunächst wurde zusätzlich gegen CD83 und HLA DR gefärbt. Nachdem PALUCKA *et. al.* humane pDCs und myeloide DC Vorläufer nach Transplantation mit humanen CD34<sup>+</sup> Zellen in NOD SCID Mäusen nachweisen konnten, sollte auch in den in dieser Arbeit transplantierten NSG Mäusen nach diesen DC Populationen untersucht werden. Dafür wurde gegen die humanen Marker CD123, CD33 und CD34 gefärbt. In Tabelle 4 ist das Färbeprotokoll abgebildet, welches bis zum Ende dieser Arbeit etabliert wurde. Es erlaubte eine detaillierte Analyse der verschiedenen rekonstituierten humanen Zellpopulationen in unterschiedlichen Organen. In Zukunft kann dieses Färbeprotokoll mit weiteren DC-spezifischen Markern, wie z.B. CCR7, DC-SIGN und BDCA 1, 2, 3 und 4 erweitert werden.

FITC	PE	APC	V450	PeCy7	APC Cy7	PerCPCy5.5
CD45	CD4	CD8	CD3	/	/	/
CD45	CD19	CD14	CD3	/	/	/
CD45	CD16	CD56	CD11c	CD3	/	/
CD45	CD11c	CD83	CD3	/	/	HLA DR
CD45	CD123	CD4	CD14	CD3	/	HLA DR
CD14	/	CD33	/	CD34	/	HLA DR
lin1	CD123	CD4	CD45RA	CD34	mCD45	HLA DR

Tabelle 4: Färbeprotokoll für die Durchflusszytometrie

Im Folgenden ist kurz die *gating*-Strategie für einen Teil der humanen Zellen dargestellt (s. Abb. 2).

Wenn die Mehrfachfärbung es zugelassen hatte, wurde zunächst auf humanes CD45 gated. Um cDCs zu definieren, wurde aus den humanen CD45<sup>+</sup> Zellen nach HLA



## 4 Ergebnisse

DR / CD11c doppelt-positive Zellen selektiert. Die pDCs wurden zunächst auf CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> Zellen gated und anschließend über die Expression des Markers CD123 definiert. Myeloide DC Vorläufer (mDCs) wurden über die Expression von HLA DR bestimmt und im Anschluss aus dem myeloiden Kompartiment (CD33<sup>+</sup>) auf CD14 gated.

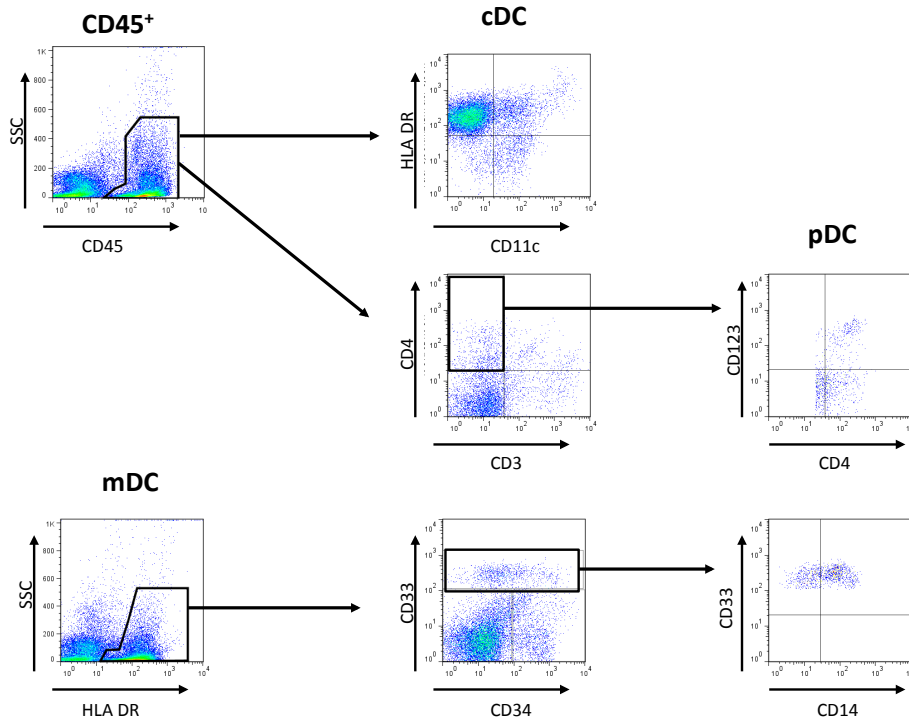


Abbildung 2: **Gating-Strategie für DCs:** Für cDCs und pDCs wurde zunächst auf hCD45 gated. Aus dieser Population ergaben sich dann die cDCs (HLA DR<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>) und die pDCs (CD4<sup>+</sup> CD3<sup>-</sup> CD123<sup>+</sup>). Für die mDCs wurde aus der HLA DR<sup>+</sup> Population auf CD33<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup> Zellen gated.

### 4.1.2 Etablierung des humanisierten NSG-Mausmodells

Viele Erkenntnisse über die Differenzierung von humanen hematopoetischen Stammzellen in diverse DC Typen, stammen von *in vitro* Versuchen (DELVENNE *et. al.*, STRUNK *et. al.*). Inwieweit dies der Entwicklung der DCs im Menschen entspricht, ist jedoch noch unklar. Da es nicht möglich ist, dies direkt am Menschen zu erforschen, ist das Interesse an einem humanisierten *in vivo* Modell groß. In dieser Arbeit wurde ein Modell entwickelt, in dem die immundefiziente NOD.Cg-*Prkdc*<sup>scid</sup>*Il2rg*<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) Maus mit humanen peripheren Blutstammzellen (PBSC) transplantiert wurde. In Tabelle 5 ist ein Überblick aller durchgeführten Modelle dargestellt. Alle Tiere, die Werte > 0,1 % aufwiesen, wurden

## 4 Ergebnisse

als humanisiert betrachtet.

Model	Quelle	Parameter	Reinheit (%)	Gabe	Tierzahl (n)	Humanisiert (n)
S 09.1	allogen	+ Fc-IL 7	90	frisch	28	16
S 09.2	allogen	+ Fc-IL 7	90	aufgetaut	28	11
F 09.1	autolog	+ Fc-IL 7	90	aufgetaut	18	18
T 10.1	allogen	+ Fc-IL 7	77	frisch	24	24
T 10.2	allogen	+/- Mitoxantron	77	aufgetaut	8	8
V 10.1	allogen	+/- Fc-IL 7	75	frisch	6	6
Y 10.1	allogen	+/- Fc-Flt3L	66	aufgetaut	10	6
Ü 10.1	allogen	Dosiseskalation	73	frisch	12	8
Ü 11.2	allogen	Dosiseskalation	73	aufgetaut	12	4
P 11.1	autolog	+/- Fc-Flt3L	89,7	frisch	29	19
K 11.1	autolog	Campath	/	aufgetaut	8	/
S 11.1	autolog	+/- T-Zellen	93,6	aufgetaut	27	27
S 11.2	autolog	+/- Fc-Flt3L	93,6	aufgetaut	15	15
Z 12.1	allogen	+/- T-Zellen	n.a.	aufgetaut	40	38

Tabelle 5: **Überblick der Humanisierungsexperimente:** Insgesamt wurden 14 Transplantationen mit CD34<sup>+</sup> PBSC von zehn verschiedenen Spendern durchgeführt

Es wurden 14 Modelle mit zehn verschiedenen CD34 Spendern etabliert. Der Einfluss verschiedener Parameter auf die Humanisierungseffizienz wurde untersucht. Mäuse im Alter von fünf bis neun Wochen wurden 24 h vor Transplantation mit 150 rad bestrahlt und anschließend mit  $1\text{-}5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC transplantiert (s. 3.11). Mittels durchflusszyometrischer Messungen wurde ab Woche 6 nach Transplantation die Rekonstitution im peripheren Blut über humanes CD45 nachgewiesen. Danach wurden die Mäuse, je nach Versuchsaufbau, weitere sechs bis 30 Wochen im Versuch gehalten. Bei Kohortenende wurden die Milz, das periphere Blut und das Knochenmark in der Durchflusszytometrie auf die Rekonstitution humaner Zellen hin untersucht.

Insgesamt wurden 265 Tiere mit einer Erfolgsrate von 76 % humanisiert. Um einen allgemeinen Überblick über die Rekonstitution aller Tiere zu erhalten, wurden in Abb. 3 alle die Tiere dargestellt, die humanisiert wurden, jedoch keine zusätzliche Behandlung erhielten (d.h. ohne IL-7, Flt3L, Mitoxantron, Campath, T-Zellen). Diese 36 Tiere zeigten eine Rekonstitution von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark von 35 % und in der Milz von 15 %. In beiden Organen gab es starke Schwankungen, abhängig von der Qualität der CD34<sup>+</sup> PBSC und dem jeweiligen Versuchsaufbau. Im Knochenmark war das Maximum an humanen CD45<sup>+</sup> Zellen bei 65% und das Minimum bei 1,5 %, in der Milz bei maximal 28 % bis minimal 3,5 %.

## 4 Ergebnisse

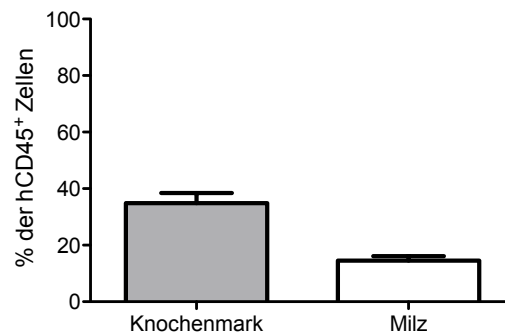


Abbildung 3: **Rekonstitution von hCD45<sup>+</sup> Zellen in Knochenmark und Milz:** Dargestellt sind alle unbehandelten Tiere aus allen 14 Modellen. Die Tiere wurden mit  $1-5 \times 10^6$  PBSC transplantiert und in Woche 6 bis Woche 36 nach Transplantation auf humane CD45<sup>+</sup> Zellen untersucht.  $n=36$ , MW plus Standardabweichung

Betrachtete man weitere Zellpopulationen der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen, sah man, dass im Knochenmark (s. Abb. 4 A) wie auch in der Milz (s. Abb. 4 B) primär humane B-Zellen zu finden waren. Im Knochenmark war der Anteil größer (71 %) als in der Milz (62 %). Desweiteren konnten in beiden Organen humane Monozyten nachgewiesen werden (Knochenmark 4,8 %, Milz 3 %). Ebenso waren cDCs, mit 5 % im Knochenmark und 7,7 % in der Milz, sowie pDCs, 1,8 % im Knochenmark und 1,3 % in der Milz, vorhanden.

## 4 Ergebnisse

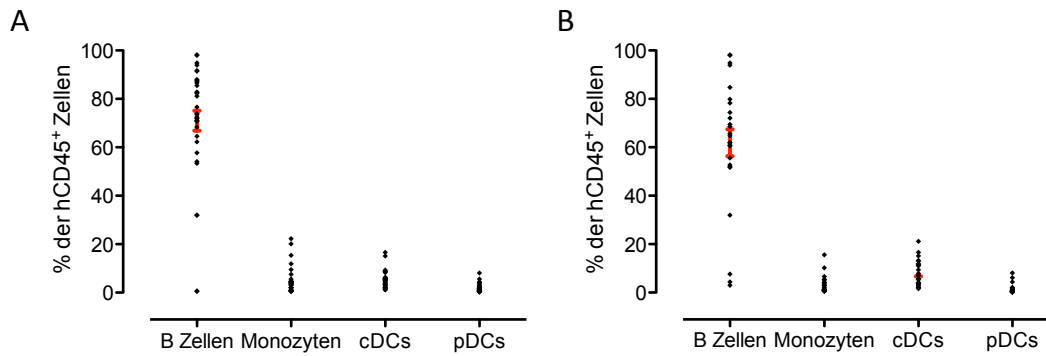


Abbildung 4: **Rekonstitution unterschiedlicher Zellpopulationen in Knochenmark und Milz:** Die Tiere wurden mit  $1-5 \times 10^6$  PBSC transplantiert und in Woche sechs bis 36 nach Transplantation auf B Zellen, Monozyten, cDCs und pDCs untersucht. (A) Knochenmark, (B) Milz,  $n=36$ , jeder Punkt repräsentiert ein Tier

In elf der 14 Humanisierungsmodelle konnten diese Zellpopulationen ab Woche 12 nach Transplantation in Knochenmark und Milz gefunden werden. Somit ist es gelungen, ein humanisiertes Mausmodell zu etablieren, in dem NSG Mäuse erfolgreich mit  $CD34^+$  PBSC i.v. transplantiert werden. Die Entwicklung einer humanen Hämatopoese, mit allen immunologisch Zelltypen, ist in diesem Modell möglich. Tabelle 6 gibt einen Überblick über alle getesteten Modelle mit dem Prozentsatz humaner  $CD45^+$  Zellen im Knochenmark zwölf Wochen nach Transplantation.

In dieser Arbeit sollte zum einen das Anwachsen der humanen Hämatopoese zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transplantation nachvollzogen werden, zum anderen sollten Faktoren evaluiert werden, die das Anwachsen speziell von humanen DCs verbessern könnten. Zum Ende der Arbeit konnten erste Funktionalitätstest mit den angewachsenen DC Subtypen durchgeführt werden.

## 4 Ergebnisse

Model	Woche nach Transplantation	CD45 <sup>+</sup> im Knochenmark (%)
S 09.1	12	4,15
S 09.2	12	2,11
F 09.1	12	13,43
T 10.1	12	8,1
T 10.2	12	33,44
V 10.1	12	59,02
Y 10.1	12	29,45
Ü 10.1	12	46,71
Ü 11.2	12	53,47
P 11.1	12	8,74
K 11.1	12	n.a.
S 11.1	12	79,15
S 11.2	12	19,26
Z 12.1	12	44,75

Tabelle 6: **Überblick über alle 14 getesteten Modelle:** Dargestellt sind die CD45 Zellen im Knochenmark in Woche zwölf nach Transplantation.

### 4.1.3 Anwachsen humaner Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Modell S 09.1, S 09.2, F 09.1 und T 10.1 liefen über maximal 36 Wochen. In diesen Versuchen sollten zu bestimmten Zeitpunkten (alle sechs Wochen, s. Abb. 5) Mäuse hinsichtlich des Anwachsens einer humanen Hämatopoese untersucht werden. In Modell S 09.1 und S 09.2 wurden CD34<sup>+</sup> PBSC vom gleichen Spender verwendet. In Modell S 09.2 kam es jedoch zu keinem Anwachsen humaner Zellen und ein Großteil der Mäuse verstarb während des Versuches aus ungeklärten Gründen, daher konnte nur Modell S 09.1 ausgewertet werden. Die Tiere aus Modell F 09.1 zeigten ebenfalls kein Anwachsen einer humanen Hämatopoese und waren somit nicht auswertbar. Im Folgenden werden die gepoolten Ergebnisse der Modelle S 09.1 und T 10.1 gezeigt. Es wurden insgesamt 52 Tiere humanisiert, 40 Tiere überlebten und konnten analysiert werden, wobei davon 32 Tiere humanisiert waren und verwertbare Werte lieferten.

#### Modell S 09.1 und T 10.1

Für diese Versuche wurden die Tiere mit frischen CD34<sup>+</sup> PBSC von je zwei unterschiedlichen Spendern humanisiert. Um eine Beobachtungsdauer von bis zu 36 Wochen gewährleisten zu können, wurden die Tiere in sechs Kohorten eingeteilt (s. Abb. 5). Die Kohorten wurden nacheinander analysiert. Jede Kohorte wurde sechs Wochen lang beobachtet, indem nach zwei und vier Wochen peripheres Blut entnommen und dieses auf humanes CD45 untersucht wurde. Außerdem wurden Hautbiopsien vom Rücken entnommen, welche auf diverse humane DC Marker gefärbt wurden (s. 4.1.7). Nach sechs Wochen wurden

## 4 Ergebnisse

die Tiere der jeweiligen Kohorte getötet und ihnen wurden Milz, Knochenmark und peripheres Blut entnommen, die in der Durchflusszytometrie auf unterschiedliche humane Marker gefärbt wurden (s. Tabelle 4). Des weiteren wurden Proben von Milz, Lunge und Haut für die IHC genommen. Dargestellt sind nur Ergebnisse des Knochenmarks.

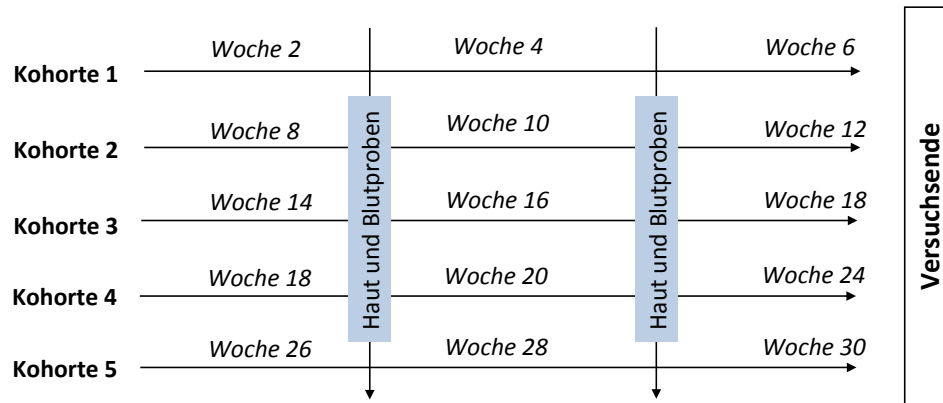


Abbildung 5: **Versuchsaufbau für Versuch S 09.1 und T 10.1:** Die Mäuse wurden in bis zu 6 Kohorten eingeteilt. Alle 2 Wochen nach Transplantation wurden Proben vom peripheren Blut und von muriner Haut genommen. Alle sechs Wochen wurden Tiere der jeweiligen Kohorte aufgearbeitet. Dies ermöglichte eine Analyse der humanen Hämatopoese in den rekonstituierten Tieren von bis zu 36 Wochen.

## 4 Ergebnisse

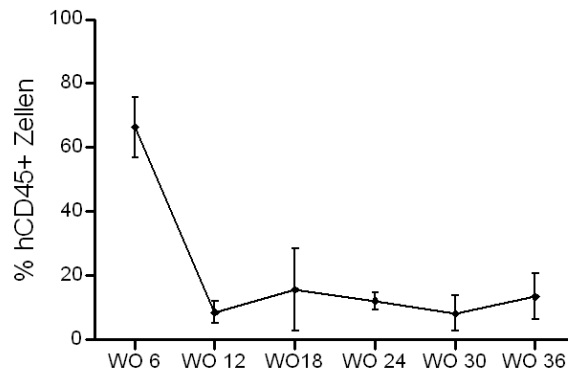


Abbildung 6: **Nachweis einer durchschnittlichen humanen Hämatopoese bis Woche 36 nach Transplantation:** Dargestellt ist der Anteil humaner CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark von 32 Tieren, die mit  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert und in sechs Kohorten eingeteilt wurden. Alle sechs Wochen nach Transplantation wurde je eine Kohorte mit zwei bis vier Tieren aufgearbeitet und für humane Zellen untersucht. Modell S 09.1 und T 10.1, MW mit Standardabweichung

In Abbildung 6 ist der zeitliche Verlauf der humanen Hämatopoese anhand der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen von Woche acht bis 36 dargestellt. In Woche sechs nach Transplantation konnten 66 % humane CD45 Zellen gefunden werden. Ab Woche zwölf lag der Wert durchschnittlich bis Woche 36 bei 10 % ein. Dieser Verlauf konnte in zwei Experimenten nachgewiesen werden.

Innerhalb der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen konnten auch weitere hämatopoetische Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. 7). Dargestellt ist der Anteil positiver Zellen an der Gesamtzellzahl. In Woche sechs waren bereits B-Zellen (24 %) und NK-Zellen (13 %) angewachsen. Im Laufe des Versuchs nahm der Anteil beider Zellpopulation stark ab. CD8<sup>+</sup> wie auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnten erst zu späteren Zeitpunkten, nach Woche 18, nachgewiesen werden. Hier zeigte sich bei den CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine stetige Zunahme von 4 auf 10 % von Woche 24-36 nach Transplantation. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen blieben in diesem Zeitraum konstant mit 1-2,5 % vertreten.

Neben B-, NK- und T-Zellen, wurden ebenfalls Zellen detektiert, die positiv für CD14 und DC-Marker waren (s. Abb. 8). CD14<sup>+</sup> Monozyten konnte bereits in Woche sechs nach Transplantation mit 7 % detektiert werden, zeigten jedoch zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Anteile (Woche 18 mit 0,2 % und Woche 36 mit 2,3 %). Ebenfalls in Woche sechs nach Transplantation waren 4,5 % der Zellen positiv für cDC-Marker. Auch hier schwankte der Anteil innerhalb der Wochen 12 bis 24 mit 1,6-0,2 %. Nach Woche 30 konnten keine pDCs mehr detektiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass bereits ab Woche sechs nach Transplantation humane

## 4 Ergebnisse

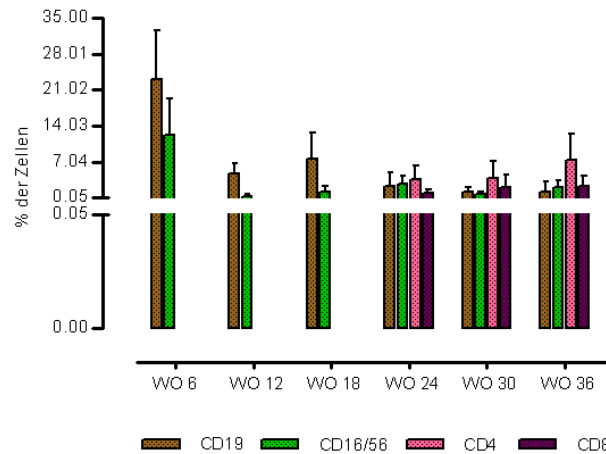


Abbildung 7: **Rekonstitution einzelner Zellpopulationen bis 36 Wochen nach Transplantation:** Nach der Humanisierung mit  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC, wurden die Tiere in 6 Kohorten geteilt und alle sechs Wochen nach Transplantation wurde eine Kohorte aufgearbeitet. n=32, Modell S 09.1 und T 10.1, MW mit Standardabweichung

Zellen positiv für CD45, CD14 und DC-Marker (CD11c, HLA DR, CD123) angewachsen waren. Diese Zellen waren bis zu 36 Wochen nachweisbar. B- und NK-Zellen konnten ebenfalls in Woche sechs beobachtet werden, allerdings sank der Anteil der B- und NK-Zellen deutlich. T-Zellen konnten erst ab Woche 24 nachgewiesen werden, blieben aber bis zum Versuchsende konstant in ihrem Anteil. Hervorzuheben ist, dass im Rahmen dieser Arbeit cDCs und pDCs ab Woche sechs konstant für mindestens 18 Wochen vorhanden waren.



## 4 Ergebnisse

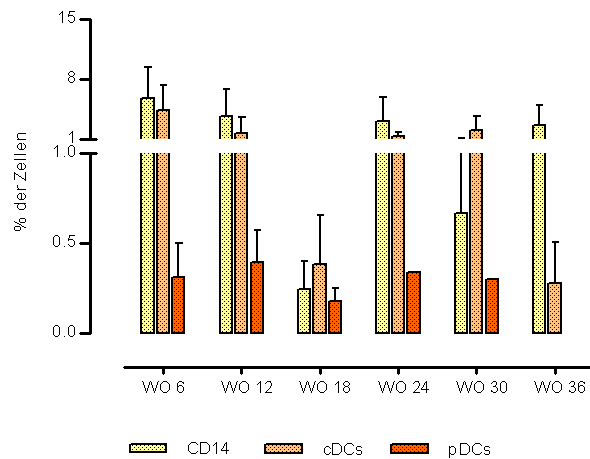


Abbildung 8: **Rekonstitution von CD14<sup>+</sup> Monozyten und DC-Subpopulationen bis Woche 36 nach Transplantation:** Die Mäuse wurden mit  $1 \times 10^6$  PBSC humanisiert und in sechs Kohorten eingeteilt. Anschließend wurden alle sechs Wochen Tiere einer Kohorte aufgearbeitet.  $n=32$ , Modell S 09.1 und T 10.1, MW mit Standardabweichung

### 4.1.4 Einfluss der verabreichten Zelldosis auf den Humanisierungserfolg

Nachdem zu verschiedenen Zeitpunkten nach Humanisierung humane hämatopoetische Zellpopulationen nachgewiesen werden konnten, stellte sich als nächstes die Frage, ob eine Applikation von mehr als  $1 \times 10^6$  humanen CD34<sup>+</sup> PBSC zu größeren Zellzahlen in den einzelnen Zellpopulationen führen würde. Desweiteren war von Interesse, ob die Applikation von frischen oder aufgetauten CD34<sup>+</sup> PBSC zu Unterschieden in der Rekonstitution führt. In Modell Ü 10.1 wurden drei unterschiedliche Dosen von frischen CD34<sup>+</sup> PBSC verabreicht. Modell Ü 11.2 war wie Versuch Ü 10.1 aufgebaut, jedoch wurden vorher kryokonservierte und dann aufgetaute CD34<sup>+</sup> PBSC appliziert. In beiden Versuchen wurden CD34<sup>+</sup> PBSC von ein und demselben Spender verwendet.

#### Modell Ü 10.1

In diesem Versuch wurden 12 Mäuse mit drei unterschiedlichen Konzentrationen von frischen CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Kohorte 1 erhielt  $1 \times 10^6$  PBSC, Kohorte 2  $2 \times 10^6$  PBSC und Kohorte 3  $5 \times 10^6$  PBSC. Nach zwölf Wochen wurden alle Tiere getötet und das Knochenmark und die Milz mittels Durchflusszytometrie auf eine humane Hämatopoese hin untersucht. Dargestellt (s. Abb. 9) sind insgesamt sechs Tiere mit zwei Tieren in Kohorte 1, einem Tier in Kohorte 2 und drei Tieren in Kohorte 3.

Abbildung 9 zeigt, dass sowohl in der Milz wie auch im Knochenmark in allen drei Kohorten humane CD45<sup>+</sup> Zellen zu finden waren. Die Tiere, die  $1 \times 10^6$  PBSC erhielten

## 4 Ergebnisse

(weißer Balken), zeigten im Knochenmark 12 % und in der Milz 6,50 % positive Zellen. Im Vergleich dazu, war die Zellzahl der Tiere mit  $2 \times 10^6$  PBSC (grauer Balken) deutlich erhöht. Im Knochenmark fanden sich 52,60 % humane  $CD45^+$  Zellen, in der Milz 12,70 %. Kohorte 3, mit den Tieren die mit  $5 \times 10^6$  PBSC transplantiert wurden (schwarzer Balken), zeigte im Vergleich zur Kohorte 1 ebenfalls deutlich höhere Zellzahlen (Knochenmark 58 %, Milz 19,70 %), jedoch war der Unterschied zu Kohorte 2 nur minimal, jedoch nicht signifikant.

In diesem Versuch korrelierte das verbesserte Anwachsen von humanen  $CD45^+$  Zellen mit der Transplantation von höheren Zellzahlen und unter Verwendung von frischen  $CD34^+$  PBSC.

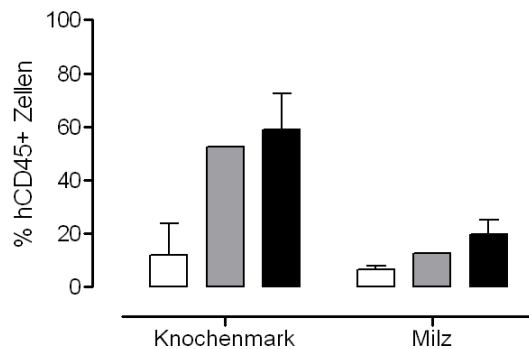


Abbildung 9: **Dosisabhängige Rekonstitution einer humanen Hämatopoese nach Humanisierung mit frischen  $CD34^+$  PBSC:** 12 Mäuse wurden mit unterschiedlichen Mengen von frischen  $CD34^+$  PBSC humanisiert und nach zwölf Wochen auf humane  $CD45^+$  Zellen untersucht. Weißer Balken (Kohorte 1):  $1 \times 10^6$  PBSC, grauer Balken (Kohorte 2):  $2 \times 10^6$  PBSC, schwarzer Balken (Kohorte 3):  $5 \times 10^6$  PBSC. n=6, Modell Ü 10.1, MW mit Standardabweichung

Mithilfe des detaillierten Färbeprotokolls (s. Tabelle 4) sollten weitere humane Zellpopulationen identifiziert werden (s. Abb. 10). Zunächst wurde deutlich, dass sowohl im Knochenmark als auch in der Milz B-Zellen rekonstituiert waren. In beiden Organen gab es für diese Zellpopulation keine Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten. Im Knochenmark lag der Anteil zwischen 80,7 und 89 %, in der Milz zwischen 70 und 79,9 %. Des Weiteren wurden  $CD14^+$  Monozyten, cDCs und pDCs detektiert.  $CD14^+$  Monozyten waren im Knochenmark (s. Abb. 10 A) mit Zellzahlen von 2,26-3,9 % nachweisbar. Analysen der Milz lieferten ein anderes Bild (s. Abb. 10 B). Ein Vergleich von unterschiedlichen Dosierungen der PBSC Injektionsmenge ergab eine erhöhten, relativen Anteil an Monozyten in den Tieren, die  $1 \times 10^6$  frische PBSC appliziert bekamen, (weißer Balken, 7 %) im Vergleich zu den Tieren mit  $5 \times 10^6$  PBSC (schwarzer Balken, 1 %). pDCs konnten in beiden Organen mit Prozentzahlen um 1,5 % im Knochenmark und 0,5 % in der Milz

## 4 Ergebnisse

gefunden werden. Für die cDCs war im Knochenmark eine Rekonstitution von 4,5-9 % zu beobachten, wobei die Tiere, die  $2 \times 10^6$  PBSC (grauer Balken) appliziert bekamen, die höchste Rekonstitutionsrate mit 9 % zeigten. In der Milz war dieser Unterschied nicht sichtbar, hier waren alle Tiere mit 0,4-0,6 % der cDCs rekonstituiert.

Allgemein lässt sich sagen, dass die Gabe von hohen Zellzahlen ( $2 \times 10^6$  -  $5 \times 10^6$ ) nur wenig Auswirkungen auf die Rekonstitution von einzelnen Zellpopulationen zeigte.

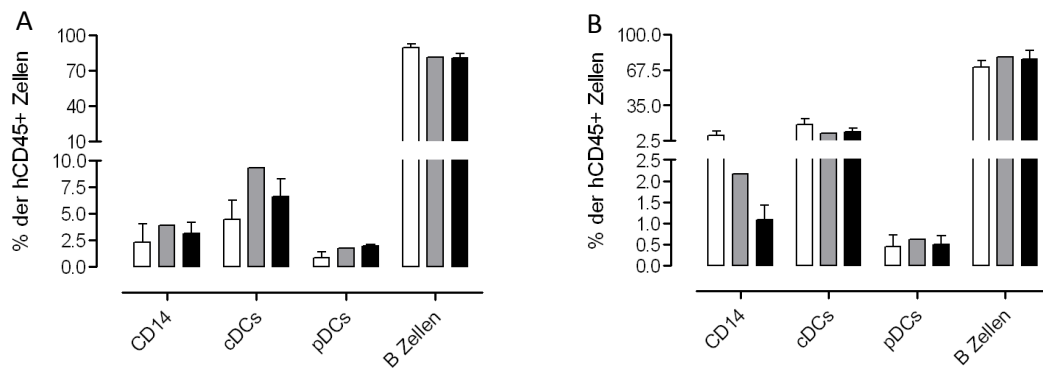


Abbildung 10: **Rekonstitution verschiedener Zellpopulationen nach dosisabhängiger Humanisierung mit frischen CD34<sup>+</sup> PBSC:** Zunächst wurden 12 Mäuse mit 3 unterschiedlichen Dosen frischer CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Nach zwölf Wochen wurden alle Tiere getötet und das Knochenmark (A) und die Milz (B) untersucht. Weißer Balken:  $1 \times 10^6$  PBSC, grauer Balken:  $2 \times 10^6$  PBSC, schwarzer Balken:  $5 \times 10^6$  PBSC. n=6, Modell Ü 10.1, MW mit Standardabweichungen

### Modell Ü 11.2

In diesem Versuch wurden CD34<sup>+</sup> PBSC des gleichen Spenders wie in Versuch Ü 10.1 verwendet. Der Versuchsaufbau war ebenfalls analog, d.h. es wurden 12 Tiere mit 3 unterschiedlichen Zellzahlen humanisiert. Kohorte 1 erhielt  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC, Kohorte 2  $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC und Kohorte 3  $5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC. Der Unterschied bestand darin, dass die Zellen vor der Transplantation kryokonserviert (s. 3.2) und vor der Applikation aufgetaut wurden. Am Versuchsende, nach zwölf Wochen, wurden alle Tiere getötet und das Knochenmark und die Milz aufgearbeitet. Dargestellt sind insgesamt vier Tiere (Kohorte 1 und 3 je ein Tier, Kohorte 2 umfasste zwei Tiere).

Abbildung 11 zeigt, dass die Applikation von höheren Zellzahlen keinen Effekt auf die Rekonstitution von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen in beiden Organen hatte. Im Knochenmark fanden sich 52,5-57,50 % positive Zellen. In der Milz waren es mit 15,5-24 % weniger CD45<sup>+</sup> Zellen. Im Gegensatz zu der Applikation von frischen CD34<sup>+</sup> PBSC (s. Abb. 9) führte die Applikation von höheren Zellzahlen der aufgetauten CD34<sup>+</sup> PBSC zu keiner verbesserten Rekonstitution von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen.

## 4 Ergebnisse

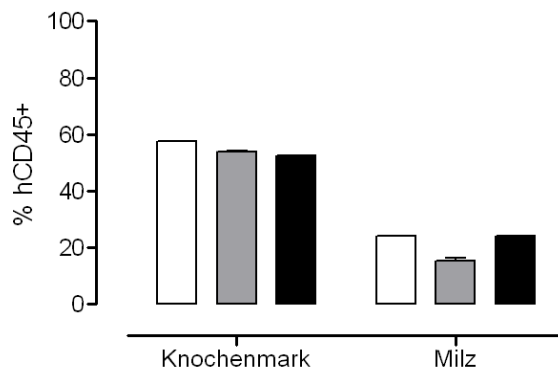


Abbildung 11: **Rekonstitution humaner CD45<sup>+</sup> Zellen in Abhängigkeit der verabreichten Dosis von aufgetauten CD34<sup>+</sup> PBSC:** Die Mäuse wurden mit verschiedenen Dosen aufgetauter CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Kohorte eins (weißer Balken) erhielt 1x10<sup>6</sup> PBSC, Kohorte zwei (grauer Balken) 2x10<sup>6</sup> PBSC und Kohorte drei (schwarzer Balken) 5x10<sup>6</sup> PBSC. Nach zwölf Wochen wurden das Knochenmark und die Milz analysiert. Modell Ü 11.2

Abbildung 12 zeigt die Rekonstitution verschiedener Zellpopulationen nach Applikation unterschiedlicher Zellmengen. Dargestellt sind die Prozentzahlen der CD45<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 11) in Knochenmark und Milz. In beiden Organen stellten die B-Zellen mit 58-73 % im Knochenmark und 93-98 % in der Milz den größten Anteil innerhalb der CD45<sup>+</sup> Zellen dar. Im Knochenmark (s. Abb. 12 A) war bei der Gabe von höheren Zellzahlen (2x10<sup>6</sup> und 5x10<sup>6</sup> PBSC) eine stetige Zunahme der B-Zellen zu erkennen.

CD14<sup>+</sup> Monozyten konnten ebenfalls in beiden Organen gefunden werden. Hier wurden kaum Unterschiede zwischen den einzelnen Kohorten sichtbar. Im Knochenmark waren 3,8-5,6 % positiv. In der Milz zeigten die Tiere der Kohorte 1 eine Rekonstitution von 0,4 %, mit steigenden Prozentzahlen bei steigender applizierter Zellzahl (Kohorte 2: 0,7 %, Kohorte 3: 0,9 %). Bei der Rekonstitution der pDCs waren die Prozentzahlen der Kohorte 3 im Knochenmark mit 3 % leicht höher als die der Kohorte 1 (1,5 %) und Kohorte 2 (1 %). In der Milz war eine ähnliche Verteilung, mit geringeren Prozentzahlen, zwischen den Kohorten zu beobachten. Die Zellzahlen der cDCs waren im Knochenmark in allen drei Kohorten ähnlich zwischen 2,1 und 2,4 %. In der Milz konnte mit 3,3 % der größte Anteil in Kohorte 1 beobachtet werden. Die Tiere der Kohorte 2 und 3 lagen mit 1,9-2 % etwas niedriger in der Zellzahl.

Bei der Applikation von aufgetauten CD34<sup>+</sup> PBSC scheint die verabreichte Zellzahl keinen Einfluss auf die Rekonstitution einzelner Zellpopulationen zu haben.

## 4 Ergebnisse

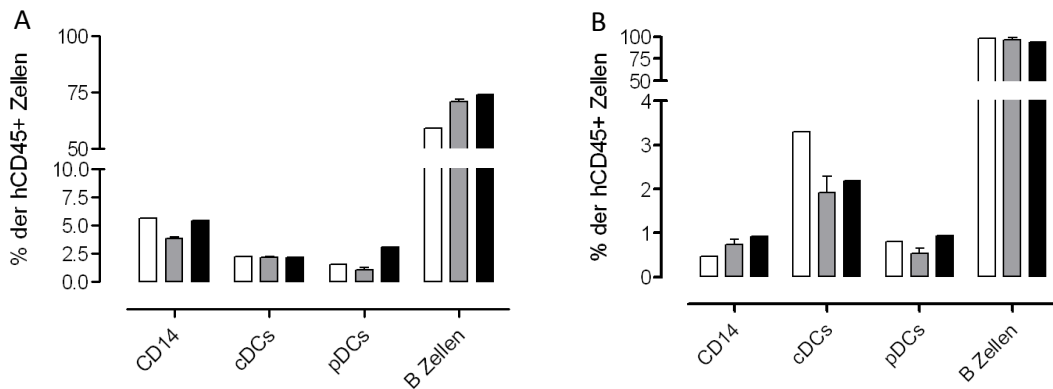


Abbildung 12: **Unterschiedliche Zellpopulationen nach Humansierung mit aufgetauten CD34<sup>+</sup> PBSC:** Nachdem Mäuse mit drei unterschiedlichen Dosen von aufgetauten CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert wurden, konnte nach zwölf Wochen das Knochenmark (A) und die Milz (B) mittels Durchflusszytometrie untersucht werden. Weißer Balken: 1x10<sup>6</sup> PBSC, grauer Balken: 2x10<sup>6</sup> PBSC, schwarzer Balken: 5x10<sup>6</sup> PBSC. Dargestellt ist Modell Ü 11.2

### 4.1.5 Einfluss von Interleukin 7 auf die Humanisierung

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die Humanisierung mit der wöchentlichen Gabe von humanem Interleukin 7 (Fc-IL 7) supplementiert. Es ist bekannt, dass die zusätzliche Gabe von IL 7 die humane Rekonstitution, besonders von T-Zellen, fördert (ANDRÉ *et al.*). In dieser Arbeit lag der Fokus jedoch auf der Rekonstitution humaner DCs, welche schon ab Woche 6 (s. Abb. 8) nachweisbar waren. Somit stellte sich die Frage, ob eine Supplementierung mit IL 7 zwingend notwendig war. Wie sich die humane Hämatopoese in Abwesenheit von humanem IL 7 entwickelt, wurde im folgenden Versuch untersucht.

#### Modell V 10.1

Es wurden zwei Kohorten aus je drei Mäusen gebildet. Beide Kohorten wurden mit frischen CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Die Kontroll Kohorte blieb unbehandelt, wohingegen die Tiere der Kohorte Fc-IL 7 einmal wöchentlich 20 µg humanes Fc-IL 7 appliziert bekamen. Nach zwölf Wochen wurden die Tiere getötet und einzelne Organe aufgearbeitet. Die Milz und das Knochenmark wurden durchflusszytometrisch auf eine humane Hämatopoese hin untersucht (Färbung s. Tabelle 4).

In Abbildung 13 ist der direkte Vergleich der zwei Kohorten dargestellt. Im Knochenmark zeigte die Kontroll Kohorte (ohne Behandlung) 61 % humane CD45<sup>+</sup> Zellen. Wurden die Tiere mit Fc-IL 7 behandelt, hatten sie 58 % humane CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark. In der Milz konnte man eine ähnliche Verteilung sehen. Die Kontrolltiere

## 4 Ergebnisse

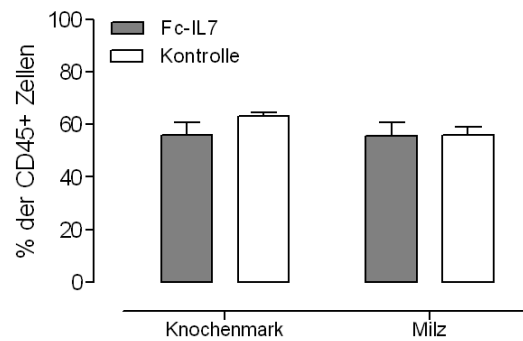


Abbildung 13: **Einfluss von IL 7 auf das Anwachsen von hCD45<sup>+</sup> Zellen in Knochenmark und Milz:** Sechs Tiere wurden mit  $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Kohorte 1 (drei Tiere, Kontrolle) blieb unbehandelt, Kohorte 2 (drei Tiere, Fc-IL 7) wurde wöchentlich mit 20  $\mu$ g pro Tier Fc-IL 7 supplementiert. Zwölf Wochen nach Transplantation wurden die Tiere getötet und Milz und Knochenmark mittels Durchflusszytometrie auf hCD45<sup>+</sup> Zellen untersucht. Dargestellt ist der Anteil der hCD45<sup>+</sup> Zellen in Knochenmark und Milz mit je n=3 Mäusen pro Kohorte, Modell V 10.1, MW mit Standardabweichung

hatten einen Anteil von 59 % humaner CD45<sup>+</sup> Zellen, bei den mit Fc-IL 7 behandelten Tieren konnten 58 % humane CD45<sup>+</sup> Zellen gefunden werden. Ein signifikanter Vorteil der IL 7 Applikation konnte nicht gezeigt werden (Knochenmark,  $p=0,27$ ; Milz,  $p=0,96$ ).

Mit Hilfe des detaillierten Färbeprotokolls (s. Tabelle 4) konnten die humanen CD45<sup>+</sup> Zellen in weitere Subpopulation unterteilt werden.

Im Knochenmark (s. Abb. 14 A) konnten CD14<sup>+</sup> Monozyten, pDCs, cDCs, B Zellen und myeloide DC Vorläufer (mDCs) gefunden werden. Zunächst fiel auf, dass ein Großteil der hCD45<sup>+</sup> Zellen sowohl in der Kontrollgruppe als auch der Fc-IL 7-behandelten Gruppe aus B Zellen bestand. Im Gegensatz dazu konnten nur wenige cDCs und pDCs gefunden werden. Die Kontrollen waren mit 60 % positiv für B Zellen und mit 27 % positiv für mDCs, wohingegen die mit Fc-IL 7 behandelten Tiere für B Zellen 70 % positive Zellen aufwiesen und für mDCs 31 % positive Zellen. Die Rekonstitution der pDCs und cDCs wurde in diesem Versuch von einer zusätzlichen Applikation von Fc-IL 7 nicht beeinflusst. Für die CD14<sup>+</sup> Monozyten zeigte die Kontrollgruppe 16 % positive Zellen, im Gegensatz dazu wies die mit Fc-IL 7-behandelte Gruppe nur 10 % positive Zellen auf ( $p=0,12$ , nicht signifikant).

Auswertungen der Milz (s. Abb. 14 B) ergaben, dass auch hier ein Großteil der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen die B Zellen ausmachten. Es konnten kaum pDCs und cDCs sowie CD14<sup>+</sup> Monozyten nachgewiesen werden. B Zellen waren in beiden Gruppen mit 49 % (Fc-IL 7) bis 51 % (Kontrolle) vertreten.

Trotz der minimal sichtbaren Unterschiede, besonders im Knochenmark, schien die Applikation von Fc-IL 7 keinen entscheidenden Einfluss auf das Anwachsen von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen und dem von DC-Populationen zu haben. Somit wurde IL 7 als supple-

## 4 Ergebnisse

mentierender Faktor für weitere Versuche nicht mehr verwendet.

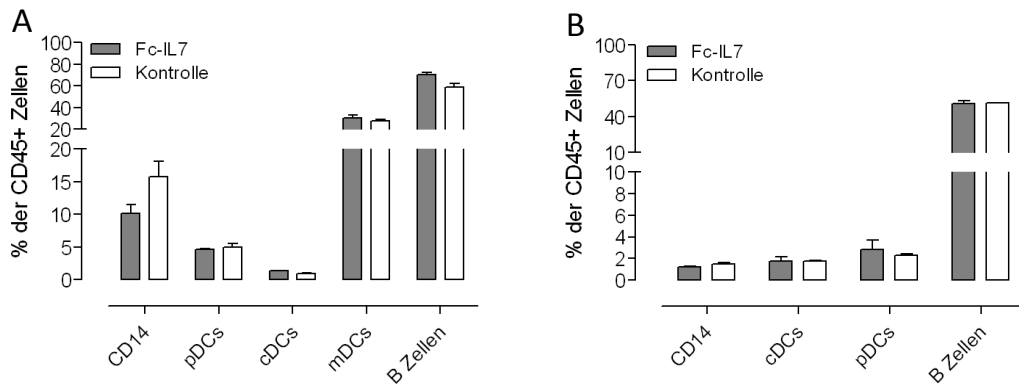


Abbildung 14: **Rekonstitution diverser Zellpopulationen unter dem Einfluss von IL 7 in Knochenmark und Milz:** Zwölf Wochen nach der Humanisierung von 6 Mäusen mit  $2 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC, wurden Knochenmark (A) und Milz (B) auf diverse Zellpopulationen untersucht. Die Prozentangaben beziehen sich auf den Anteil der bereits bestimmten (s. Abb. 13) hCD45<sup>+</sup> Zellen in diesen Geweben. Abgebildet sind je n=3 pro Kohorte, Modell V 10.1., MW mit Standardabweichungen

### 4.1.6 Einfluss von Flt3L auf die Humanisierung

*In vitro* und *ex vivo* konnte bisher die Rolle von Flt3L für die Entwicklung und Differenzierung von DCs untersucht werden (MCKENNA *et. al.*, BRAWAND *et. al.*). *In vivo* zeigen FL-KO Mäuse verminderte murine DC Zellzahlen (BRAWAND *et. al.*), besonders in Hinblick auf pDCs. Es konnte gezeigt werden, dass die *in vivo* Applikation von Flt3L zu einer Zunahme von murinen pDCs in der Milz führt, was Befunde aus dem humanen System stützen (PULENDRAN *et. al.*, MARAKOVSKY *et. al.*). CHEN *et. al.* zeigten, dass die Applikation von Flt3L im humanisierten Mausmodell zu einer erhöhten Zunahme von humanen CD14<sup>+</sup> Monozyten, myeloiden DCs, pDCs und B-Zellen in diversen Organen führte.

Für das in dieser Arbeit etablierte humanisierte Mausmodell stellte sich die Frage, ob die Applikation von Flt3L ebenfalls zu einer Zunahme der humanen hämatopoetischen Zellen, besonders der Monozyten und diversen DC-Subpopulationen, führen würde. Hierfür wurden zwei Versuchsansätze gewählt. In Versuch Y 10.1 wurde Flt3L konstant über den Versuchszeitraum von zwölf Wochen verabreicht, in Versuch S 11.2 sollte die Frage beantwortet werden, ob der Zeitpunkt und der Zeitraum der Flt3L Applikation eine Rolle spielt.

#### Modell Y 10.1

In diesem ersten Versuch wurden insgesamt zehn Mäuse mit je  $1 \times 10^6$  aufgetauten humanen CD34<sup>+</sup> PBSC transplantiert. Anschließend wurden die Tiere in zwei Kohorten unterteilt. Kohorte 1 diente als Kontrollgruppe und erhielt keine weitere Behandlung bis zum Versuchsende. Den Tieren aus Kohorte 2 wurde für zwölf Wochen alle 72 h je 20 µg Fc-Flt3L intravenös gespritzt. Nach zwölf Wochen wurden die Tiere getötet und einzelne Organe mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind Ergebnisse aus Knochenmark und Milz mit je 4 Mäusen pro Kohorte.

Betrachtete man die humane Hämatopoese anhand der Rekonstitution humaner CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark und der Milz (s. Abb. 15), sah man zunächst, dass im Knochenmark mehr humane CD45<sup>+</sup> Zellen angewachsen waren als in der Milz. Vergleich man die beiden Kohorten, fiel auf, dass im Knochenmark die Tiere der Kontroll Kohorte mit 43 % mehr positive Zellen aufwiesen als die Fc-Flt3L Kohorte (32 %,  $p=0,30$ , nicht signifikant). In der Milz waren minimal mehr positive Zellen in der Fc-Flt3L Kohorte (10 %) als in der Kontrollkohorte (8 %). Flt3L schien keinen Vorteil für das Anwachsen humaner CD45<sup>+</sup> Zellen in Knochenmark und Milz zu bieten.



## 4 Ergebnisse

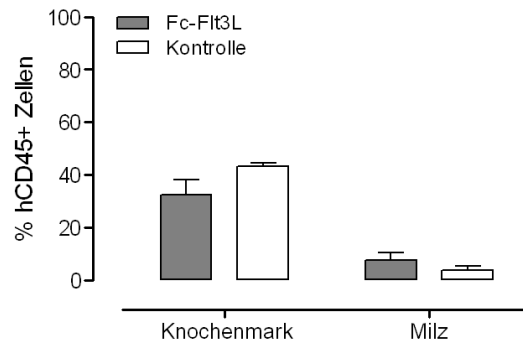


Abbildung 15: **Einfluss von kontinuierlicher Flt3L-Applikation auf das Anwachsen einer humanen Hämatopoese in Knochenmark und Milz:** Mäuse wurden mit  $1 \times 10^6$  humanen  $CD34^+$  PBSC transplantiert und in zwei Kohorten unterteilt. Die Kontrolle blieb unbehandelt, Tiere der Fc-Flt3L Kohorte wurden für zwölf Wochen alle 72 h mit  $20 \mu\text{g}$  Fc-Flt3L pro Tier supplementiert. Nach zwölf Wochen wurden die Mäuse getötet und das Knochenmark und die Milz durchflusszytometrisch auf eine humane Hämatopoese untersucht. Abgebildet sind Ergebnisse von  $n=4$  Tieren pro Kohorte. Modell Y 10.1, MW mit Standardabweichung

Abbildung 16 zeigt den Einfluss von Flt3L auf B-Zellen und DC Subpopulationen. Im Knochenmark (s. Abb. 16 A) wie auch in der Milz (s. Abb. 16B) waren bei den Fc-Flt3L behandelten Tieren vermehrt  $CD14^+$  Monozyten nachweisbar. Im Knochenmark waren es anteilig 20 % und in der Milz 3 % der humanen  $CD45^+$  Zellen. Im Vergleich dazu fanden sich 10 %  $CD14^+$  Monozyten in der Kontrollgruppe des Knochenmarks und 3 % in der Milz. Differenzierte man die DC Subpopulationen, wurde deutlich, dass die Anzahl der cDCs im Knochenmark in der Fc-Flt3L-behandelten Gruppe mit 12 % doppelt so hoch waren wie in der Kontrollgruppe (6 %). In der Milz konnte kein solcher Effekt beobachtet werden. Die Population der pDCs war wiederum in der Milz in der Fc-Flt3L-behandelten Gruppe größer (2,5 %) als in der Kontrollgruppe (1 %). Im Knochenmark wurde in beiden Kohorten vergleichbare Zellzahlen gefunden. In beiden Organen konnte ein Unterschied in der Anzahl der B-Zellen beobachtet werden. Im Knochenmark machten die B-Zellen in der Kontrollgruppe 58 % der Zellen aus, in der Fc-Flt3L-behandelten Gruppe waren es nur 10 %. In der Milz war eine ähnliche Verteilung zu erkennen. Die Kontrollgruppe zeigte hier 50 % aller humanen  $CD45^+$  Zellen positiv für B-Zellmarker, im Gegensatz zur Kontrollgruppe, in der 10 % positive Zellen nachgewiesen werden konnten.

Die Applikation von Flt3L zusätzlich zur Humanisierung schien einen deutlichen Einfluss auf  $CD14^+$  Monozyten und B-Zellen zu haben. Darüber hinaus war auch die Entwicklung der cDCs und pDCs in einzelnen Organen davon betroffen.

## 4 Ergebnisse

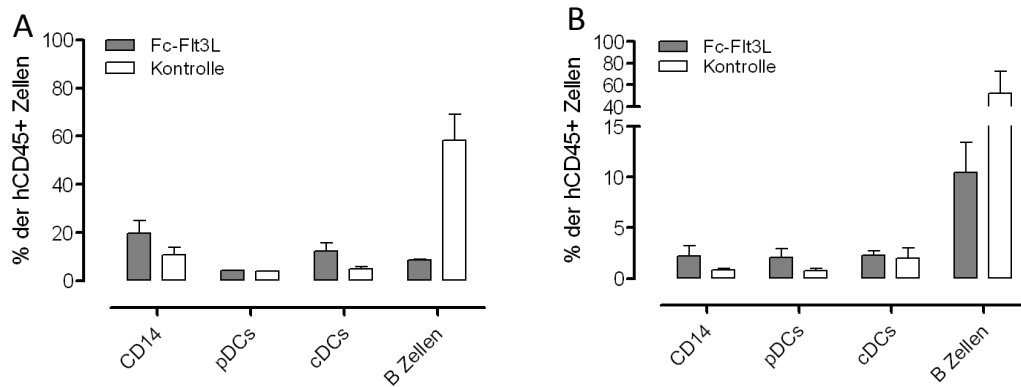


Abbildung 16: **Effekt von konstanter Flt3L-Applikation auf die Entwicklung verschiedener humaner Zellpopulationen in Knochenmark und Milz:** Zwölf Wochen nach der Transplantation von  $1 \times 10^6$  humanen  $CD34^+$  PBSC wurden das Knochenmark (A) und die Milz (B) auf unterschiedliche humane Zellen gefärbt. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Tiere der Fc-Flt3L Kohorte erhielten durchgehend je  $20 \mu\text{g}$  Fc-Flt3L i.v. alle 72 h. Dargestellt sind je  $n=4$  pro Kohorte. Modell Y 10.1, MW mit Standardabweichung

### Modell S 11.2

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Flt3L das Anwachsen einzelner humaner Zellpopulation beeinflusst, sollte in einem nächsten Ansatz genauer untersucht werden, inwieweit der Zeitpunkt der Flt3L-Applikation eine Rolle spielt.

Hierfür wurden erneut Mäuse mit humanen  $CD34^+$  PBSC humanisiert. Die Tiere wurden in drei Kohorten eingeteilt. Die Kontrolle blieb für den Versuchszeitraum von zwölf Wochen unbehandelt. Tiere der Fc-Flt3L Woche 7 Kohorte erhielten in Woche sieben nach Transplantation bis zum Versuchsende alle 72 h  $20 \mu\text{g}$  Fc-Flt3L appliziert. Tiere der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte wurden in Woche elf nach Transplantation, eine Woche vor Versuchsende, alle 72 h mit  $20 \mu\text{g}$  Fc-Flt3L pro Tier behandelt. Nach zwölf Wochen wurden alle Mäuse getötet und das Knochenmark und die Milz untersucht. Es wurden 15 Mäuse humanisiert. Dargestellt sind 12 Tiere mit  $n=4$  Mäusen pro Kohorte.

In Abbildung 17 ist die Rekonstitution von humanen  $CD45^+$  Zellen zwölf Wochen nach Transplantation in allen drei Kohorten dargestellt. Im Knochenmark fanden sich in der Kontrolle 60 %  $hCD45^+$  Zellen, vergleichbar mit der Zellzahl der Fc-Flt3L Woche 7 Kohorte (60 %). In der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte waren die  $hCD45$  Zellen deutlich reduziert (20 %). Ein ähnliches Bild fand sich in der Milz. Hier waren die gemessenen Zellzahlen generell niedriger als im Knochenmark. Die Kontrolle zeigte 22 %  $hCD45^+$  Zellen, ebenso wie Fc-Flt3L Woche 7 (24 %). Die Tiere der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte zeigten auch hier ein deutlich geringere Zellzahl (10 %) als die Kontrolle. Allein die Applikation von Flt3L zum späteren Zeitpunkt nach Humanisierung (Woche elf) hatte zur Folge, dass die Zellzahlen der  $hCD45^+$  Zellen deutlich reduziert waren.

## 4 Ergebnisse

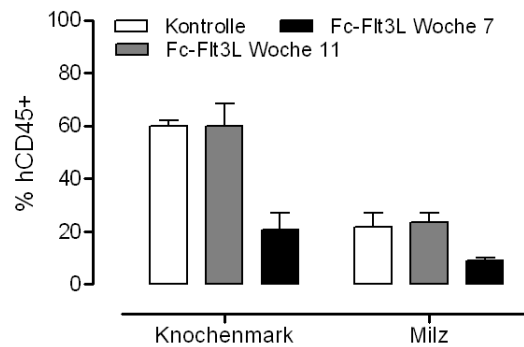


Abbildung 17: **Rekonstitution von hCD45<sup>+</sup> Zellen nach Behandlung mit Flt3L zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Humanisierung:** Zunächst wurden die Mäuse mit  $1 \times 10^6$  humanen CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Die Kontrolle blieb unbehandelt. Kohorte Fc-FLt3L Woche 7 erhielt Flt3L (20  $\mu$ g/Maus) ab Woche sieben nach Transplantation bis Versuchsende. Kohorte Fc-Flt3L Woche 11 wurde in Woche elf nach Transplantation mit Flt3L (20  $\mu$ g/Maus) behandelt. Nach zwölf Woche wurden das Knochenmark und die Milz aller Tiere isoliert und mittels Durchflusszytometrie untersucht. n=4 pro Kohorte. Modell S 11.2, MW mit Standardabweichung

Die Analyse der Zellpopulationen von den zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Flt3L substituierten humanisierten Tieren ist in Abb. 18. In der Milz und im Knochenmark konnten CD14<sup>+</sup> Monozyten gefunden werden. Im Knochenmark (s. Abb. 18 A) hatten die Tiere der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte die höchste Anzahl an CD14<sup>+</sup> Zellen (8 %) verglichen zu den Tieren der Kontrolle (5 %) und der Fc-FLt3L Woche 7 Kohorte, die mit 4 % den geringsten Anteil an CD14<sup>+</sup> Monozyten enthielt. In der Milz (s. Abb. 18 B) waren in allen drei Kohorten vergleichbare Zellzahlen zu finden (0,8-1,2 %). Bei der Analyse des DC Kompartiments waren ebenfalls Unterschiede in den einzelnen Kohorten und Organen zu erkennen. Im Knochenmark konnten in den Tieren der Fc-FLt3L Woche 7 Kohorte 6 % positive Zellen gefunden werden, im Gegensatz zu den anderen beiden Kohorten, in denen die Tiere nur 0,6 % positive Zellen in der Kontrolle und 1 % in der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte zeigten. In der Milz konnte diese Verteilung nicht beobachtet werden, hier hatten die Tiere der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte die geringsten Zellzahlen (5 %). Die Kontrolle und die Fc-FLt3L Woche 7 Kohorte hatten 6,4 % bzw. 6,5 % positive Zellen.

pDCs konnten ebenfalls in beiden Organen gefunden werden. Im Knochenmark ähnelte die Verteilung der der cDCs. Die Fc-FLt3L Woche 7 Kohorte hatte mit 19 % die höchste Zellzahl positiver Zellen, verglichen mit der Kontrolle (5,5 %) und der Kohorte Fc-Flt3L Woche 11 (10 %). In der Milz konnte in den Tieren der Fc-FLt3L Woche 7 und Woche 11 Kohorten vergleichbare Zellzahlen für pDCs gefunden werden (0,9 % bzw. 1 %). In der Kontrolle waren nur 0,2 % der Zellen positiv.

## 4 Ergebnisse

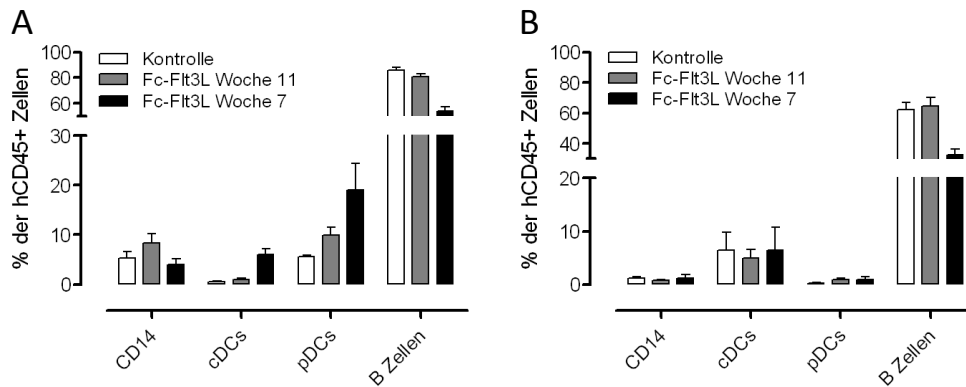


Abbildung 18: **Anwachsen humaner APCs nach Applikation von Flt3L zu verschiedenen Zeitpunkten nach Humanisierung:** Nach der Humanisierung der Mäuse mit  $1 \times 10^6$  humanen  $CD34^+$  PBSC wurden die Tiere in drei Kohorten aufgeteilt. Die Kontrolle blieb unbehandelt, die Fc-Flt3L Woche 7 Kohorte wurde in Woche sieben nach Transplantation alle 72 h mit  $20 \mu\text{g}$  Fc-Flt3L pro Maus behandelt. Tiere der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte erhielten in Woche elf nach Transplantation alle 72 h  $20 \mu\text{g}$  Fc-Flt3L pro Maus bis Versuchsende. Nach zwölf Wochen wurde der Versuch beendet und das Knochenmark (A) und die Milz (B) aller Tiere durchflusszytometrisch für humane Zellen untersucht.  $n=4$  pro Kohorte. Modell S 11.2, MW mit Standardabweichung

Den Großteil der humanen  $CD45^+$  Zellen machten sowohl im Knochenmark wie auch in der Milz die B-Zellen aus. Im Knochenmark konnten in der Kontrolle 86 % positive Zellen detektiert werden, Tiere der Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte zeigten mit 80 % minimal weniger positive Zellen. Tiere der Fc-Flt3L Woche 7 Kohorte hingegen zeigten deutlich verringerte B-Zellzahlen (53 %). Dieses Verteilungsmuster in den drei Kohorten konnte ebenfalls in der Milz bestätigt werden (Kontrolle: 62 %, Fc-Flt3L Woche 7 Kohorte: 32 %, Fc-Flt3L Woche 11 Kohorte: 64 %).

Auch in diesem Versuch zeigte die Applikation von Flt3L einen deutlichen Einfluss auf die Rekonstitution der B-Zellen in der Milz wie auch im Knochenmark, jedoch nur, wenn es zu einem frühen Zeitpunkt nach der Humanisierung appliziert wurde. Das gleiche Bild zeigte sich für die Entwicklung von cDCs und pDCs, hier allerdings nur im Knochenmark. Für die Rekonstitution von  $CD14^+$  Monozyten schien eine späte Applikation von Flt3L förderlich zu sein.

### 4.1.7 Humane Langerhans Zellen in muriner Epidermis

Während dieser Arbeit sollte neben der Rekonstitution von humanen DCs in peripheren Organen auch nach einem möglichen Anwachsen von humanen LCs in muriner Epidermis geschaut werden.

## 4 Ergebnisse

PALUCKA *et. al.* konnten bereits 2008 im humanisierten NOD/SCID Mausmodell humane Zellen in der murine Haut wiederfinden. Diese Zellen exprimierten neben CD207 auch HLA DR und CD11c, schienen aber aufgrund der intrazytoplasmatischen Lokalisation dieser Marker noch im unreifen Zustand vorzuliegen. Da bekannt ist, dass die LC-Dichte beim Menschen je nach Hautareal variiert (THOMAS *et. al.*), wurden in dieser Arbeit verschiedene murine Hautproben genommen. Zum einen wurden Biopsien vom Rücken und aus der Bauchregion genommen. Darüberhinaus wurden die Ohren der Mäuse auf humane LC hin untersucht.

Die Hautproben wurden entweder als Biopsie während des Versuches (s. 3.12) oder am Versuchende (s. 3.13) entnommen und für die IHC präpariert (s. 3.10). Als Marker für humane LC wurde CD1a und CD 207 verwendet, wobei CD207 ausschließlich von LC exprimiert wird und somit einen LC-spezifischen Marker darstellt. Humane Zellen, die diese Marker exprimieren, sollten in der murinen Epidermis lokalisiert sein. Die Färbung gegen humanes CD1a führte in der Dermis zu unspezifischen Reaktionen, wo hingegen humane CD207<sup>+</sup> Zellen auch in der Dermis vorkommen können.

### Modell S 09.1

In diesem Modell wurden Mäuse mit  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert, in Kohorten geteilt und Hautproben vom Rücken der Tiere alle zwei Wochen entnommen. Von Woche vier an bis Woche 32 konnten humane LC in der murinen Dermis und Epidermis detektiert werden. Es wurde gegen humanes CD1a und CD207 gefärbt, dargestellt ist jedoch nur der Marker CD207.

In Abb. 19 sieht man im zeitlichen Verlauf die Rekonstitution von humanen CD207<sup>+</sup> Zellen in der Dermis und Epidermis. Zum frühen Zeitpunkt nach Transplantation (Woche vier) waren diese nur in der murinen Dermis zu finden. Ab Woche sechs konnten humane CD207<sup>+</sup> Zellen ebenfalls in der Epidermis beobachtet werden. Dies war bis in Woche 32 nach Transplantation möglich.

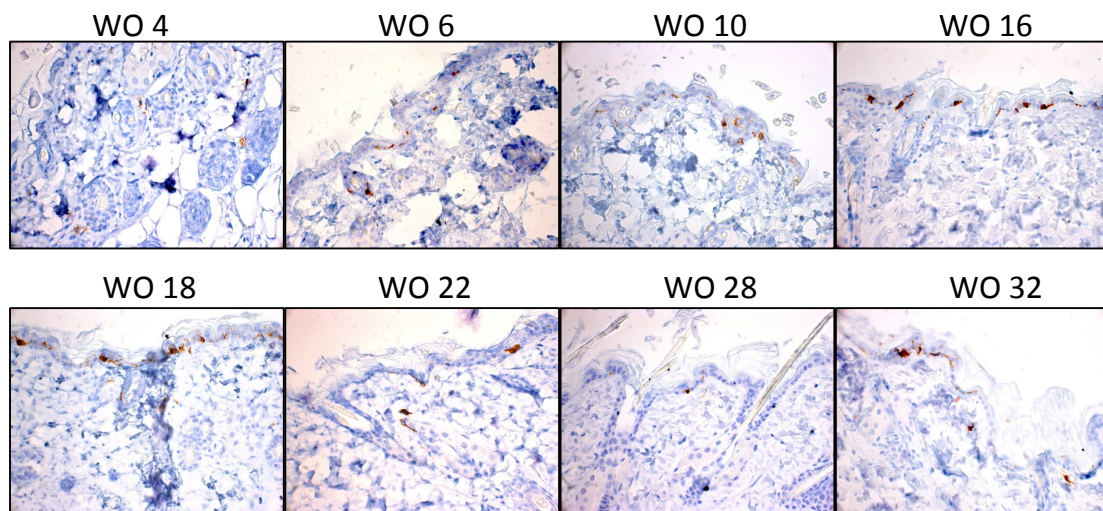


Abbildung 19: **Humane LC in muriner Dermis und Epidermis über 32 Wochen nach Humanisierung:** Mäuse wurden mit  $1 \times 10^6$  PBSC transplantiert, in Kohorten eingeteilt und zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf eine humane Hämatopoese hin untersucht. Gleichzeitig wurden murine Hautproben vom Rücken entnommen und mittels IHC für humane LC gefärbt. Es wurde gegen humanes CD207 (1:100) gefärbt. Positive Zellen sind in braun zu erkennen. Modell S 09.1

### Modell Ü 10.1

Tiere im Modell Ü 10.1 wurden mit  $1-5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Nach zwölf Wochen wurden Hautproben vom Rücken, dem Bauch und vom Ohr für die IHC genommen. Die murine Haut wurde gegen humanes CD1a und CD207 gefärbt. Bei drei der acht humanisierten Tiere konnten humane LC in der Epidermis gefunden werden, wobei die applizierte Zellzahl keinen Einfluss auf die Rekonstitution von humanen LC in der murinen Epidermis zeigte. Abbildung 20 zeigt Hautproben einer Maus, die  $5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC appliziert bekam. In der Epidermis waren deutlich CD1a- und CD207-positive Zellen zu erkennen.

In fünf von 14 Modellen konnten humane LCs in der murinen Dermis und Epidermis nachgewiesen werden. Modell S 09.1, T 10.1, V 10.1, Ü 10.1 und Ü 11.2 (s. Tabelle 5) waren positiv für humane LCs. Zur Überprüfung der Proliferationsfähigkeit der LCs wurden positive Proben aus Modell V10.1, Ü 10.1 und Ü 11.2 zusätzlich gegen Ki67, ein Proliferationsmarker, gefärbt. Alle Proben waren negativ. Somit zeigen auch NSG Mäuse, die mit humanen CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert wurden, die Entwicklung von humanen LC in der murinen Haut. Diese sind jedoch nicht zur Proliferation fähig, was die Färbung gegen Ki67 zeigte.

#### 4 Ergebnisse

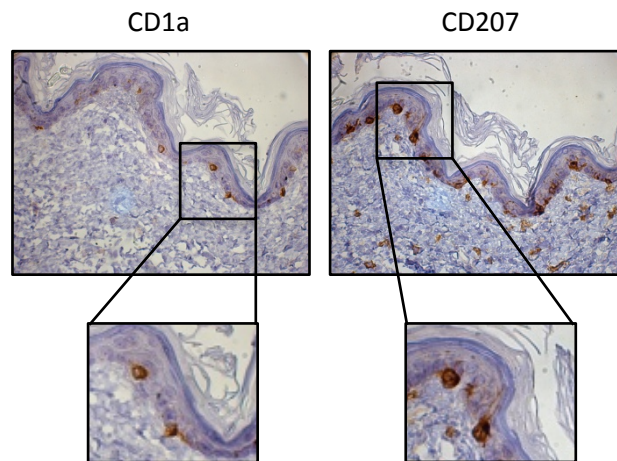


Abbildung 20: **Humane LC in muriner Epidermis zwölf Wochen nach Transplantation:** Mäuse wurden mit  $1-5 \times 10^6$  PBSC humanisiert und nach zwölf Wochen analysiert. Hautproben vom Rücken wurden mittels IHC für humane LC untersucht, indem gegen humanes CD1a (1:100) und CD207 (1:100) gefärbt wurde. Positive Zellen sind braun angefärbt. Abgebildet ist die Hautprobe einer Maus, die  $5 \times 10^6$  PBSC appliziert bekam. Dargestellt ist die Hautprobe einer Maus 12 Wochen nach Humanisierung. Modell Ü 10.1

#### 4.1.8 Funktionalität der rekonstituierten humanen Zellen *in vivo*

Nachdem das humanisierte Mausmodell soweit etabliert wurde, dass ein reproduzierbares Anwachsen von humanen hämatopoetischen Zellen in den NSG Mäusen gewährleistet werden konnte und diese Zellen auch phänotypisch denen im humanen System glichen, stellte sich die Frage, ob die Funktionalität dieser Zellen vergleichbar war. Hierfür wurden in Kooperation mit der Gruppe von Dr. Simone Thomas zwei Versuche durchgeführt. Es wurden alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zur Verfügung gestellt, die auf ihre Potenzial der Alloreaktivität in einem *in vivo* Modell getestet werden sollten (THOMAS, in Bearbeitung). Im gleichen Ansatz konnte gleichzeitig die Funktionalität der rekonstituierten DC Populationen *in vivo* getestet werden.

Zunächst wurden Mäuse mit  $1 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC eines Spender humanisiert und in zwei Kohorten geteilt. Eine Kohorte erhielt zu einem frühen Zeitpunkt nach Transplantation (Woche acht bis neun)  $1 \times 10^7$  alloreaktive T-Zellen i.v., die andere Kohorte erhielt zu einem späteren Zeitpunkt (Woche 14 bis 15) die gleichen alloreaktiven T-Zellen ( $1 \times 10^7$ ) i.v. verabreicht. Jede Kohorte war noch einmal unterteilt in ein Gruppe von Tieren, denen die T-Zellen appliziert wurden und einer Kontrollgruppe, die keine T-Zellen erhielt.

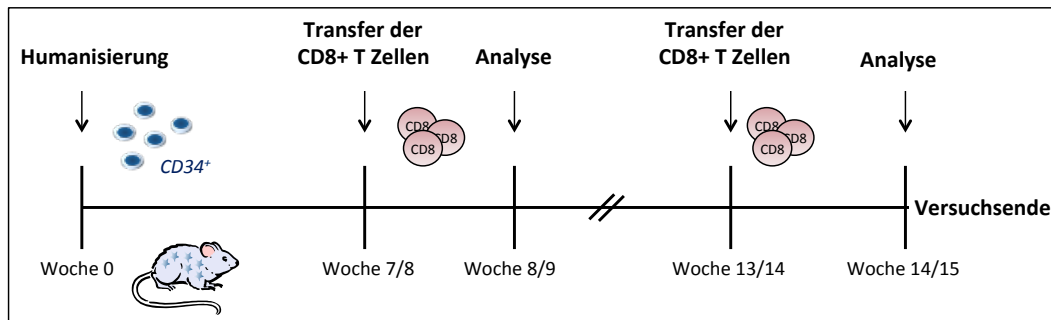


Abbildung 21: Schematische Darstellung der Modelle S 11.1 und Z 12.1

Da für die Humanisierung CD34<sup>+</sup> PBSC verwendet wurden, war es möglich, vom gleichen Spender aus der CD34<sup>-</sup> Fraktion PBMCs zu erhalten. Gleichzeitig wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus einem *buffy coat* eines zweiten Spenders generiert. Diese T-Zellen wurden mit den PBMCs des CD34-Spenders stimuliert (THOMAS, in Bearbeitung). Somit konnten T-Zellen mit einer maximalen Alloreaktivität generiert werden. Diese alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden anschließend den mit CD34<sup>+</sup> PBSC humanisierten Mäusen appliziert. Vor der T-Zell Applikation wurden die Mäuse auf das Vorhandensein von humanem CD45 im peripheren Blut getestet und nur positive Mäuse wurden verwendet. Je eine Woche nach der T-Zell Gabe wurden die Tiere getötet und das Knochenmark, das Blut und die Milz der Mäuse analysiert. Es wurden zwei Modelle (S 11.1 und Z 12.1) getestet mit je einem anderen CD34-Spender.



**Modell S 11.1**

Insgesamt wurden 14 Mäuse humanisiert und in zwei Kohorten geteilt. Die beiden Kohorten erhielten die alloreaktiven T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Je eine Kohorte wurde zusätzlich in zwei Gruppen unterteilt. Eine Gruppe (n=4) erhielt die alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die andere Gruppe (n=3) diente als Kontrolle und erhielt keine weitere Behandlung nach der Humanisierung. Um die Zellen des CD34-Spenders von den T-Zellen des zweiten Spenders in der Durchflusszytometrie voneinander unterscheiden zu können, wurde darauf geachtet, dass beide Zell-Spender sich in mindestens einem HLA Merkmal unterschieden. In diesem Modell wurde in der Durchflusszytometrie zusätzlich gegen humanes A2 gefärbt. Da der T-Zellspender positiv für A2 war, der CD34-Spender jedoch nicht, war eine Unterscheidung der Zellen möglich (s. Abb. 22).

	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
<b>T-Zellspender</b>	2	3	35	44	-	-
<b>CD34-Spender</b>	1	3	15	50	3	6

Abbildung 22: **HLA Typisierung von Spender S 11.1 und T-Zellspender:** Um in der Durchflusszytometrie zwischen den Zell-Spendern unterscheiden zu können, wurde zusätzlich gegen humanes A2 gefärbt. Der T-Zellspender war positiv für A2, der CD34-Spender jedoch nicht. Somit war eine Trennung der Zellen möglich.

Abbildung 23 zeigt den Anteil humaner CD45<sup>+</sup> Zellen nach Applikation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Transplantation. Zunächst wurde deutlich, dass das Knochenmark (s. Abb. 23 A) einen höheren Anteil von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen zeigte als die Milz (s. Abb. 23 B) Acht Wochen nach Transplantation hatte das Knochenmark einen Anteil von 70 % ; die Milz zeigte 35 % positive Zellen. Im Knochenmark wurde zu keinem Zeitpunkt ein Effekt der alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet. Im Gegensatz dazu wurde in der Milz der Anteil der humanen CD45 Zellen durch die Applikation der alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum frühen und späten Zeitpunkt nach Transplantation sichtbar verringert.

## 4 Ergebnisse

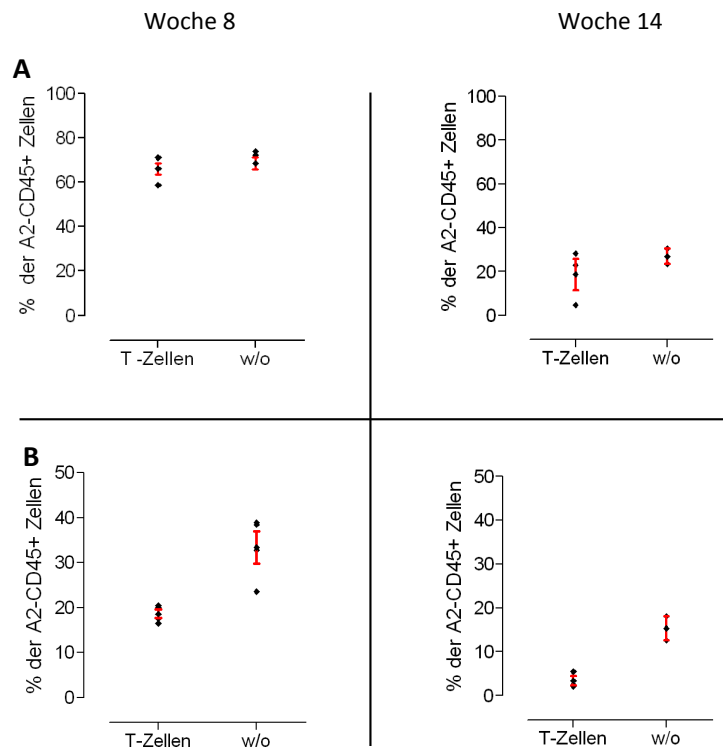


Abbildung 23: **Einfluss der alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Rekonstitution humaner CD45<sup>+</sup> Zellen:** Es wurden 14 Mäuse mit  $1 \times 10^6$  PBSC humanisiert und in zwei Kohorten geteilt. Kohorte 1 (n=4) erhielt in Woche sieben nach Transplantation  $1 \times 10^7$  CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die Kohorte 2 (n=3) erhielt in Woche 13 nach Transplantation die gleichen T-Zellen in gleicher Menge injiziert. Je eine Woche nach Applikation wurden die Tiere getötet und das Knochenmark (A) und die Milz (B) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Modell S 11.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

Da B-Zellen bisher die größte Zellfraktion innerhalb der angewachsenen humanen CD45<sup>+</sup> Zellen in allen humanisierten Modellen darstellte und auch zu der Gruppe der APCs gehört, wurde zunächst der mögliche Einfluss von alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf diese Population untersucht (s. Abb. 24). Es wurde deutlich, dass in den Kontrollgruppen sowohl in der Milz wie auch im Knochenmark 70-90 % der CD45<sup>+</sup> Zellen positiv für CD19 waren. Zum frühen Zeitpunkt (Woche 8) nach Transplantation war sowohl im Knochenmark (A) als auch in der Milz (B) der Anteil der humanen B-Zellen in den Tieren, die alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen appliziert bekamen signifikant reduziert. Besonders auffällig war dies im Knochenmark, da sich der Anteil der humanen CD45<sup>+</sup> zu diesem Zeitpunkt nicht verändert hatte (s. Abb. 23 A, Woche 8). Wurden die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zum späteren Zeitpunkt appliziert (Woche 14), war nur noch im Knochenmark eine leichte Abnahme der humanen B-Zellen zu beobachten.

## 4 Ergebnisse

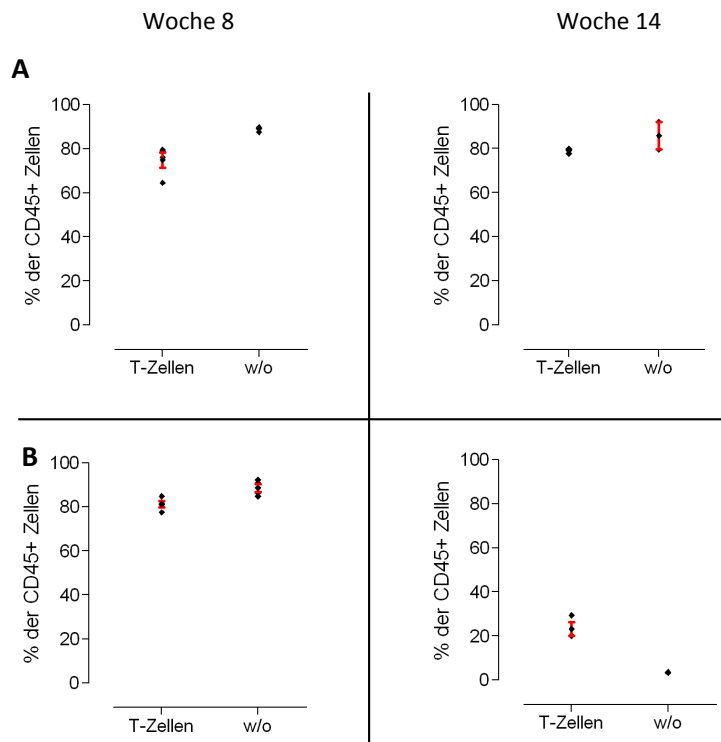


Abbildung 24: **Anteil der humanen B-Zellen nach Applikation alloreaktiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen:** Nach der Humanisierung von 14 Mäusen mit  $1 \times 10^6$  PBSC wurden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten  $1 \times 10^7$  alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.v. appliziert. Kohorte 1: Woche sieben nach Transplantation, n=4. Kohorte 2: Woche 13 nach Transplantation, n=3. Je eine Woche nach T-Zellgabe wurde das Knochenmark (A) und die Milz (B) analysiert. Modell S 11.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

In Abbildung 25 ist der Anteil der CD14<sup>+</sup> Monozyten und der cDCs (CD11c<sup>+</sup> Zellen) nach der Applikation der alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt. Ab Woche 8 nach Transplantation konnten sowohl im Knochenmark wie auch in der Milz humane CD14<sup>+</sup> Monozyten und cDCs gefunden werden. Die Menge der CD14<sup>+</sup> Monozyten wurde durch die Gabe der T-Zellen nicht beeinflusst. Weder zum frühen (Woche 8) noch zum späteren Zeitpunkt (Woche 14) zeigte sich ein Unterschied zur Kontrollgruppe in beiden Organen. Für die Population der cDCs konnte für den frühen Zeitpunkt ein ähnliches Bild beobachtet werden. Hier wurde kein Unterschied in der Zellzahl zwischen den beiden Gruppen und Organen deutlich. Zum späten Zeitpunkt war, besonders in der Milz, der Anteil der CD11c<sup>+</sup> Zellen in den Tieren, die alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen verabreicht bekommen hatten, deutlich reduziert. Da in der Kontrollgruppe jedoch nur ein Tier messbare Ergebnisse lieferte, ist dieses Ergebnis nicht aussagekräftig.

Im Knochenmark wurde zusätzlich zu den schon erwähnten Markern auch gegen hu-

## 4 Ergebnisse

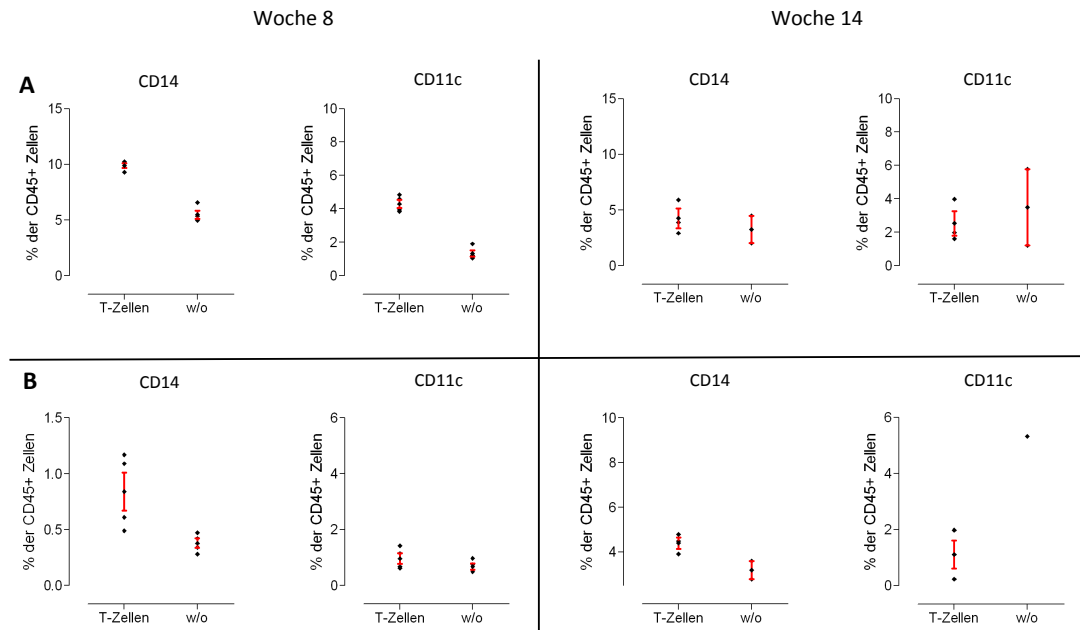


Abbildung 25: Verteilung der humanen  $CD14^+$  Monozyten und cDCs nach Applikation alloreaktiver  $CD8^+$  T-Zellen: Zunächst wurden 14 Mäuse mit  $1 \times 10^6$  PBSC transplantiert und in zwei Kohorten geteilt. Tiere der Kohorte 1 ( $n=4$ ) erhielt sieben Wochen nach Transplantation  $1 \times 10^7$  alloreaktive  $CD8^+$  T-Zellen, Tiere der Kohorte ( $n=3$ ) erhielten die gleichen T-Zellen in Woche 13 nach Transplantation. Je eine Woche nach der Applikation wurden das Knochenmark (A) und die Milz (B) der Tiere mittels Durchflusszytometrie untersucht. Modell S 11.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

manes  $CD123$  gefärbt, um eine mögliche Rekonstitution von pDCs nachzuweisen. Bereits in Woche acht nach Transplantation konnten pDCs detektiert werden. Es zeigte sich jedoch kein Einfluss der alloreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen auf deren Zellzahl. Betrachtete man den Anteil der pDCs zum späteren Zeitpunkt (Woche 14), war der Anteil in den Tieren, die T-Zellen appliziert bekamen, geringer als in der Kontrollgruppe. Jedoch ist dieses Ergebnis nicht aussagekräftig genug, da in der Kontrollgruppe nur zwei Tiere auswertbar waren diese große Schwankungen untereinander zeigten.

## 4 Ergebnisse

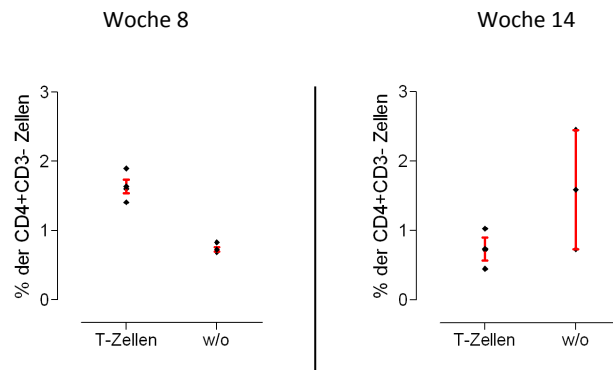


Abbildung 26: **Effekt der alloreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen auf die Rekonstitution von humanen pDCs:** Es wurden 14 Mäuse mit  $1 \times 10^6$  PBSC transplantiert und anschließend in zwei Kohorten geteilt. Tiere der Kohorte 1 ( $n=4$ ) erhielt in Woche sieben nach Transplantation  $1 \times 10^7$  alloreaktive  $CD8^+$  T-Zellen, Tiere der Kohorte 2 ( $n=3$ ) erhielt die gleichen T-Zellen in der gleichen Konzentration in Woche 13 nach Transplantation. Je eine Woche nach Applikation, wurden das Knochenmark und die Milz untersucht. Abgebildet sind Ergebnisse des Knochenmarks. Modell S 11.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

In diesem Modell schienen zum frühen Zeitpunkt (Woche 8) nach der Humanisierung die humanen B-Zellen die primären Zielzellen der alloreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen zu sein. Besonders deutlich wurde dies im Knochenmark. Die  $CD14^+$  Monozyten, cDCs und pDCs waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht funktionell. Betrachtete man den späteren Zeitpunkt nach Transplantation (Woche 14), machte es den Anschein, dass immer noch die B-Zellen ein Teil der Zielzellen waren, jedoch schienen auch die cDCs und pDCs als solche erkannt zu werden.

### Modell Z 12.1

Es wurden insgesamt 20 Mäuse humanisiert, die in zwei Kohorten geteilt wurden. Innerhalb der einzelnen Kohorten wurden die Tiere zusätzlich in zwei Gruppen (je  $n=5$ ) unterteilt. Die eine Gruppe erhielt die alloreaktiven  $CD8^+$  T-Zellen, die zweite Gruppe diente als Kontrolle. In diesem Modell wurde zusätzlich gegen B7 gefärbt, um die Zellen des CD34-Spenders von denen des T-Zellsenders zu unterscheiden (s. Abb. 27).

#### 4 Ergebnisse

	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
<b>T-Zellspender</b>	2	26	7	51	3	7
<b>CD34-Spender</b>	2	3	44	56	1	5

Abbildung 27: **HLA Typisierung des CD34-Spenders Z 12.1 und T-Zellspender:** Um in der Durchflusszytometrie zwischen den Zell-Spendern unterscheiden zu können, wurde zusätzlich gegen humanes B7 gefärbt. Der T-Zellspender war positiv für B7, der CD34-Spender jedoch nicht. Somit war eine Trennung der Zellen möglich.

Betrachtete man die Rekonstitution der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 28) im Knochenmark (A) und in der Milz (B) wurde zunächst deutlich, dass der Anteil im Knochenmark mit 60 % in der Kontrollgruppe höher war als in der Milz (20 %). Die Applikation von alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt (Woche 9) führte in beiden Organen zu einem Verlust der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen. Tiere, die T-Zellen appliziert bekamen zeigten im Knochenmark 23 % CD45<sup>+</sup> Zellen, wohingegen 55 % positive Zellen in der Kontrollgruppe zu finden waren. In der Milz war eine ähnliche Verteilung zu beobachten (1,5 % gegen 15 %). Wurden die gleichen T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt in die humanisierten Tiere gegeben (Woche 15), war kein Effekt der T-Zellen zu beobachten, da sich der Anteil der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen kaum von dem der Kontrollgruppe unterschied.

Abbildung 29 zeigt den Anteil der humanen B-Zellen zu den zwei Zeitpunkten im Knochenmark (A) und in der Milz (B). Sowohl im Knochenmark wie auch in der Milz war der Großteil der CD45<sup>+</sup> Zellen positiv für CD19. Die Applikation von alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt (Woche 9) nach Transplantation führte zu niedrigeren B-Zellzahlen im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Im Knochenmark war der Anteil der humanen B-Zellen in der Kontrollgruppe doppelt so hoch (82 %), wie in der mit T-Zellen behandelten Gruppe (40 %). Ein ähnliches Bild lieferten die Werte der Milzen. Wurde den Tieren zu einem späteren Zeitpunkt (Woche 15) nach Transplantation die T-Zellen gegeben, sah man in beiden Organen keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

## 4 Ergebnisse

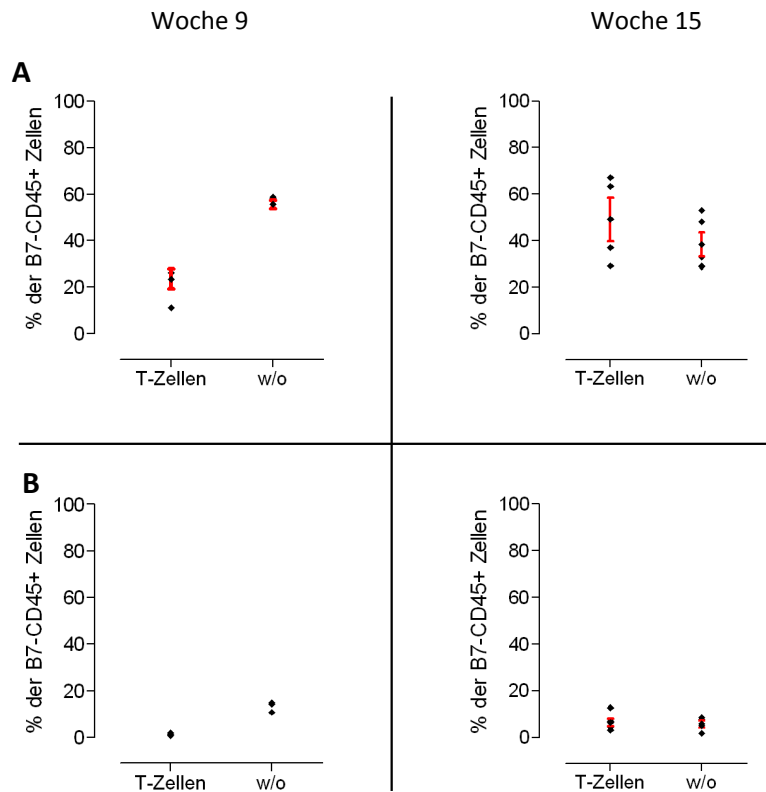


Abbildung 28: **Rekonstitution der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen nach Applikation von alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen:** Zunächst wurden 20 Mäuse mit  $1 \times 10^6$  PBSC humanisiert und in zwei Kohorten geteilt. Tiere der Kohorte 1 (n=5) erhielt in Woche acht nach Transplantation  $1 \times 10^7$  alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.v. appliziert, Tiere der Kohorte 2 (n=5) bekam die gleichen T-Zellen in gleicher Konzentration in Woche 14 nach Transplantation appliziert. Je eine Woche nach T-Zell Gabe wurden die Tiere getötet und das Knochenmark (A) und die Milz (B) mittels Durchflusszytometrie analysiert. Modell Z 12.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

In Abbildung 30 sind die Zellzahlen der humanen CD14<sup>+</sup> Monozyten und der cDCs (CD11c<sup>+</sup> Zellen) nach Applikation der alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen abgebildet. Beide Zellpopulationen sind ab Woche neun nach Transplantation im Knochenmark und in der Milz wiederzufinden. Wurden die T-Zellen zum frühen Zeitpunkt (Woche 9) appliziert, konnte weder im Knochenmark noch in der Milz ein Einfluss auf den Anteil der CD14<sup>+</sup> Monozyten wie auch auf den der cDCs festgestellt werden. Das gleiche Bild zeigte sich bei der T-Zell Gabe zum späteren Zeitpunkt (Woche 15). Auch hier war keine Veränderung zur Kontrollgruppe und zum früheren Zeitpunkt sichtbar.

## 4 Ergebnisse

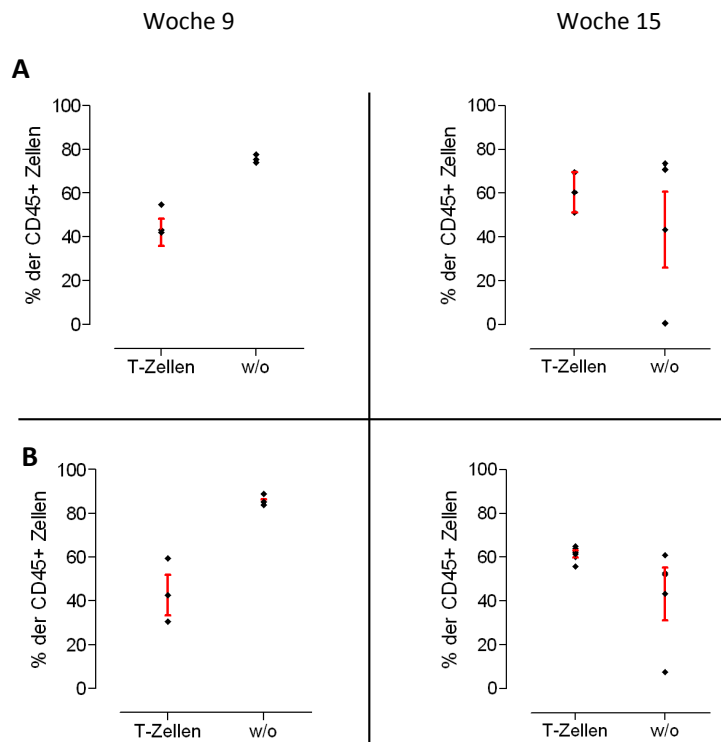


Abbildung 29: **Einfluss der alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Dichte von humanen B-Zellen:** Nachdem 20 Mäuse mit  $1 \times 10^6$  PBSC humanisiert und in zwei Kohorten geteilt wurden, bekam Tiere der Kohorte 1 ( $n=5$ ) acht Wochen nach Transplantation  $1 \times 10^7$  alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.v. appliziert. Tiere der Kohorte 2 ( $n=5$ ) erhielt die gleichen T-Zellen in derselben Menge in Woche 14 nach Transplantation verabreicht. Je eine Woche nach der T-Zell Gabe wurden das Knochenmark (A) und die Milz (B) der Tiere untersucht. Modell Z 12.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

Zellen des Knochenmarks wurde zusätzlich gegen humanes CD123 gefärbt, um humane pDCs zu identifizieren. Abbildung 31 zeigt, bereits ab Woche neun nach Transplantation humane pDCs im Knochenmark und der Milz. Die Applikation von alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigte jedoch keine Auswirkung, unabhängig vom verabreichten Zeitpunkt.



## 4 Ergebnisse

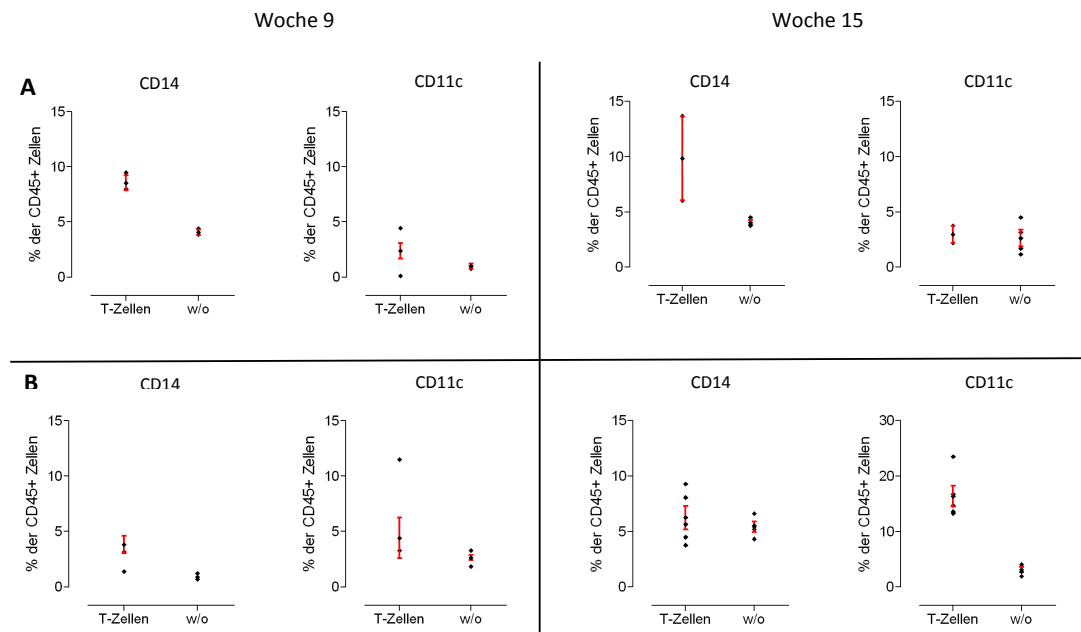


Abbildung 30: **Rekonstitution von humanen CD14 Monozyten und cDCs nach der Applikation von alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen:** 20 Mäuse wurden mit  $1 \times 10^6$  PBSC transplantiert und in zwei Kohorten geteilt. Tiere der Kohorte 1 (n=5) erhielt in Woche 8 nach Transplantation, Tiere der Kohorte 1 (n=5) in Woche 14 nach Transplantation  $1 \times 10^7$  alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Eine Woche nach T-Zell Gabe wurden das Knochenmark (A) und die Milz (B) untersucht. Modell Z 12.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

## 4 Ergebnisse

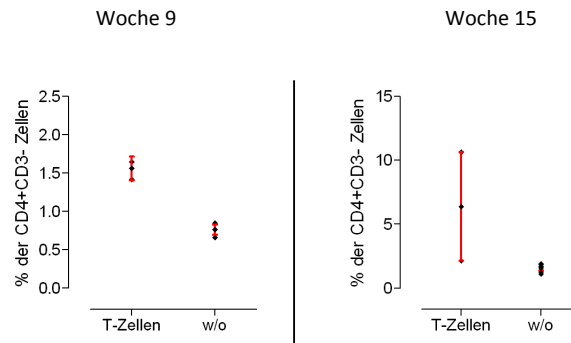


Abbildung 31: **Effekt der alloreaktiven CD8<sup>+</sup> T-Zell Gabe auf den Anteil der humanen pDCs im Knochenmark:** Es wurden 20 Mäuse mit  $1 \times 10^6$  PBSC humanisiert und in zwei Kohorten geteilt. Anschließend wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten  $1 \times 10^7$  alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen i.v. appliziert. Kohorte 1 (n=5): acht Wochen nach Transplantation, Kohorte 2 (n=5): 14 Wochen nach Transplantation. Je eine Woche später wurden das Knochenmark der Tiere auf humane pDCs hin untersucht. Modell Z 12.1, jeder Punkt repräsentiert ein Tier

### 4.2 Nanopartikel

Für Migrationsstudien von DCs wurden bisher *ex vivo* Versuche mit Hilfe von *quantum dots* durchgeführt (CAMBI *et. al.*, SEN *et. al.*). Hinsichtlich der Biodistribution *in vivo* konnten MANOLOVA *et al.* in einem murinen Modell zeigen, dass Polystyrolpartikel mit einer Größe von 250 nm und mehr am Injektionsort verbleiben und eher von residuellen DCs und Makrophagen zu den Lymphknoten transportiert werden, wohingegen kleinere Partikel (20-200 nm) schnell die Injektionsstelle verlassen und über DCs zu den Lymphknoten wandern.

Das Ziel dieser Arbeit war, zunächst mittels *in vitro* Untersuchungen, die Aufnahme der Polystyrolpartikel in DCs zu testen. Darüber hinaus sollten diese Partikel hinsichtlich einer möglichen Toxizität und deren Einfluss auf die Funktion von DCs untersucht werden. Dazu gehörte auch die Analyse der Expression von DC-spezifischen Oberflächenmarkern. *In vivo* wurde mit Hilfe des *in vivo imaging*s die Biodistribution der einzelnen Partikel überprüft. Hierfür wurde die NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup> Il2rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) Maus verwendet, da somit die Möglichkeit besteht, Nanopartikel auch in einem humanisierten Mausmodell zu untersuchen.

#### 4.2.1 Einfluss der Nanopartikel auf die DC-Vitalität

Zunächst sollte überprüft werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten Polystyrolpartikel toxisch für DCs sind. Dafür wurden vier verschiedene Konzentrationen eingesetzt, von

## 4 Ergebnisse

25 bis 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Zunächst wurden die Partikel in der jeweiligen Konzentration für 16 h mit iDCs bei 37°C inkubiert (s. 3.7). Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit einem Zytokincocktail für 48 h zu mDC ausgereift (s. 3.3). Die Zellen wurden geerntet und gegen CD11c und mit 7 AAD gefärbt. CD11c ist ein transmembranes Protein, das größtenteils auf DCs, aber auch auf Monozyten, Makrophagen und einigen B-Zellen exprimiert wird. 7 AAD erlaubt die Unterscheidung von vitalen, apoptotischen und toten Zellen. Danach konnten sie im Durchflusszytometer untersucht werden. Die Nanopartikel konnten aufgrund des eingebauten BODIPY Farbstoffes im FL1 Kanal (Filter 530/30 nm) detektiert werden. Der CD11c Antikörper ist an APC konjugiert und konnte somit im FL2 Kanal (Filter 660/20 nm) gemessen werden. Für die Auswertung wurde zuerst auf CD11c positive Zellen gated, anschließend auf Nanopartikel-positive Zellen und zum Schluss auf 7 AAD. Somit konnte eine Aussage darüber getroffen werden, inwieweit die jeweiligen Nanopartikel toxisch sind für DCs. Da bei der Herstellung der Partikel nicht exakt die gleiche Menge an BODIPY in jeden Partikel eingebaut werden konnten, wurde nach den Messungen ein Korrekturfaktor errechnet (s. Tabelle 7). Dieser bezog sich auf den am stärksten leuchtenden Partikel. Somit waren auch Vergleiche unter den Partikeln möglich.

Partikel	Normierungsfaktor (N)	Korrekturfaktor (1/N)
GB-PS-61	1,25	0,80
GB-PS-62	1,14	0,87
GB-PS-63	1,00	/
BR 59	0,90	1,11

Tabelle 7: Korrekturfaktor zur Normalisierung des MFI für *in vitro* Versuche

Zunächst wurde deutlich, dass unbeladene mDCs (0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) eine Vitalität von 90 % aufwiesen. Betrachtete man nun die einzelnen Partikel, fiel auf, dass der Nanopartikel GB-PS-62 (s. Abb. 32 B) selbst bei der höchsten Konzentration nicht toxisch für DCs war. Man erkennt, dass bei 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  die Vitalität immer noch bei 90 % der Zellen lag, was der Negativkontrolle entsprach. Die Nanopartikel GB-PS-61 und BR 59 (s. Abb. 32 A und D) hingegen zeigten bei steigender Konzentration eine zunehmende Toxizität, wobei BR 59 bei der höchsten Konzentration von 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  einen starken Abfall der Vitalität auf 70 % zeigte. Betrachtete man Partikel GB-PS-63 (s. Abb. 32 C), sah man bei einer Konzentration über 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eine extreme Abnahme der vitalen Zellen (55 % bei 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mit gleichzeitiger Zunahme der apoptotischen Zellen (20 % bei 150  $\mu\text{g}/\text{ml}$  und Verdopplung (40 %) bei 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Von allen vier Nanopartikeln schien der Partikel GB-PS-63 die stärkste Toxizität für DCs aufzuweisen; Partikel GB-PS-62 dagegen die Geringste.

## 4 Ergebnisse

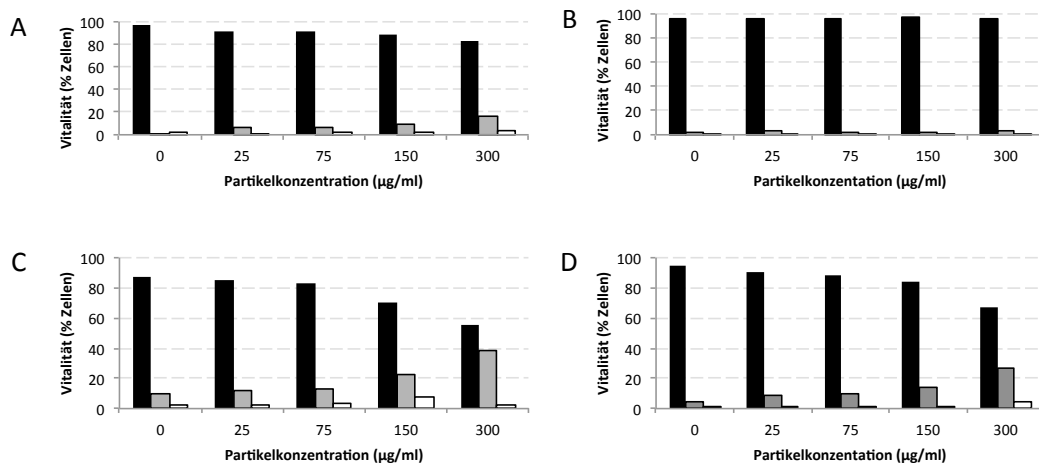


Abbildung 32: **Vitalität von Nanopartikel beladenen DCs:** iDCs wurden 16 h lang mit vier verschiedenen NP und vier verschiedenen Konzentrationen (25, 75, 150 und 300 µg/ml) inkubiert und anschließend für 48 h zu mDC ausgefreit. Es folgte eine Färbung mit einem hCD11c Antikörper und 7 AAD. Messung mit dem BD FACS Canto II. Schwarze Balken: hCD11c<sup>pos</sup> / NP<sup>pos</sup> / 7 AAD<sup>neg</sup>, graue Balken: hCD11c<sup>pos</sup> / NP<sup>pos</sup> / 7 AAD<sup>low</sup>, weiße Balken: hCD11c<sup>pos</sup> / NP<sup>pos</sup> / 7 AAD<sup>pos</sup>. (A) GB-PS-61, (B) GB-PS-62, (C) GB-PS-63, (D) BR 59

### 4.2.2 Phänotypisierung Nanopartikel-beladener DC

Neben der Morphologie verändert sich auch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle während der Ausreifung von iDC zu mDC. Zum einen werden, neben HLA-Klasse-II-Molekülen, kostimulatorische Moleküle, wie CD80 und CD86 hochreguliert, zum anderen wird u.a. der *homing* Rezeptor CCR7 exprimiert. Desweiteren werden Aktivierungsmarker wie CD83 exprimiert. Diese Reifung macht es den DC erst möglich, T-Zellantworten zu generieren und somit als professionelle APC zu fungieren.

Daher war es von Interesse, den möglichen Einfluss der Nanopartikel auf die Expression der genannten Oberflächenmoleküle zu untersuchen. Hierfür wurden iDCs von einem *buffy coat* Spender mit den jeweiligen Nanopartikeln mit einer Konzentration von 75 µg/ml beladen (s. 3.7) und nach der Ausreifung zu mDC mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Vergleich dienten Nanopartikel-unbeladene iDCs und mDCs. Die Nanopartikel-unbeladenen iDCs dienten dazu, die Ausreifung anhand der Oberflächenmarker bei mDCs sichtbar zu machen. Die Nanopartikel-unbeladenen mDCs sollten den direkten Vergleich mit den Nanopartikel-beladenen mDCs ermöglichen. Da sowohl die Nanopartikel-unbeladenen iDCs und mDCs sowie die Nanopartikel-beladenen und ausgereiften mDCs von ein und demselben *buffy coat* stammten, konnte eine Spendervariabilität als Grund für eventuelle Unterschiede in der Markerexpression ausgeschlossen

## 4 Ergebnisse

werden.

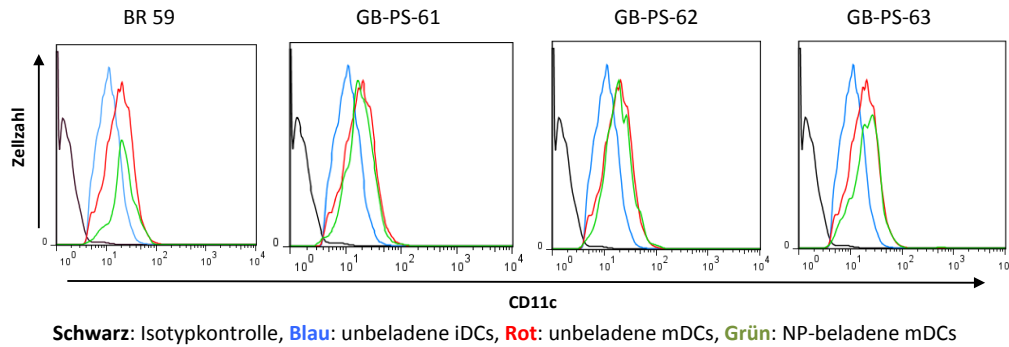


Abbildung 33: **Expression des Oberflächenmarkers CD11c auf Nanopartikel-beladenen mDCs:** Es wurden iDCs mit 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des jeweiligen Nanopartikels für 16 h inkubiert und im Anschluss 48 h lang ausgereift zu mDCs (grüne Linie). Die Analyse erfolgte über durchflusszytometrische Messungen. Als Vergleich dienten unbeladene mDCs (rote Linie) und iDCs (blaue Linie). Zusätzlich ist noch die Isotypkontrolle abgebildet (schwarze Linie).

Betrachtet man die Expression des DC-Markers CD11c (s. Abb. 33), konnte man zunächst eine Hochregulation nach Ausreifung der iDCs zu mDCs erkennen. Wurden die iDCs nun mit den einzelnen Partikeln beladen und ausgereift, konnte keine veränderte Expression beobachtet werden. Der Marker wurde auf den Nanopartikel-beladenen mDCs stärker exprimiert als auf den Nanopartikel-unbeladenen iDCs, es war jedoch keine Veränderung des Expressionsmuster im Verleich zu Nanopartikel-unbeladenen mDCs zu erkennen. Somit scheinen die Partikel die Expression des DC Markers CD11c nicht zu beeinflussen.

Der Aktivierungsmarker CD83 wurde auf mDCs stärker exprimiert als auf iDCs (s. Abb. 34). Die Nanopartikel-beladenen mDCs zeigten eine verstärkte Expression im Vergleich zu den Nanopartikel-unbeladenen iDCs, jedoch keinen Unterschied im Expressionsmuster verglichen zu den Nanopartikel-unbeladenen mDCs. Die Expression des Markers CD83 wird durch die Beladung mit den einzelnen Partikeln nicht beeinflusst.

## 4 Ergebnisse

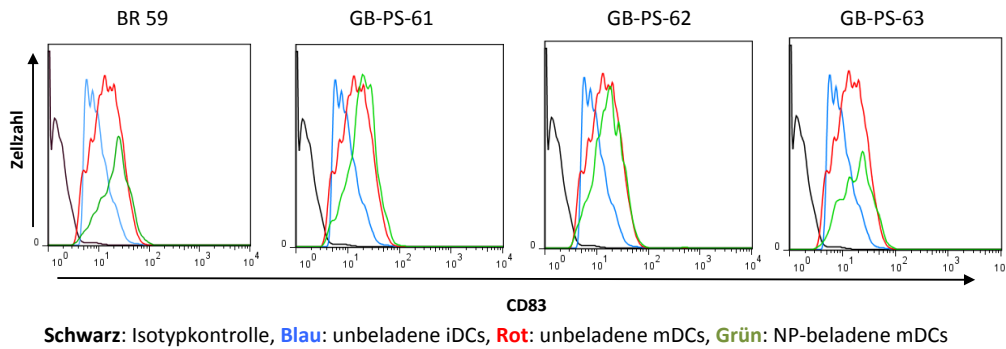


Abbildung 34: **CD83-Expression auf mDCs nach Beladung mit Nanopartikeln:** iDCs wurden mit 75 µg/ml des jeweiligen Partikels 16 h lang inkubiert und anschließend für 48 h zu mDCs ausgereift (grüne Linie). Zum Vergleich wurden unbeladene iDCs (blaue Linie) und mDCs (rote Linie) ebenfalls auf ihre CD83-Expression hin untersucht. Schwarze Linie: Isotypkontrolle

Abbildung 35 zeigt die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86. Man erkannte, dass der Marker auf Nanopartikel-unbeladenen mDCs hochreguliert wurde. Wurden iDCs mit dem Partikel GB-PS-61 beladen, sah man ebenfalls eine Hochregulation im Vergleich zu Nanopartikel-unbeladenen iDCs, jedoch keinen Unterschied in der Expression zu den Nanopartikel-unbeladenen mDCs. Im Gegensatz dazu, schien die Beladung mit BR 59, GB-PS-62 und -63 zu einer minimal verstärkten Expression von CD86 zu führen, was an dem leichten *shift* der grünen Linie nach rechts zu erkennen ist. Somit scheint die Expression des Markers CD86 von einzelnen Partikeln gefördert zu werden.

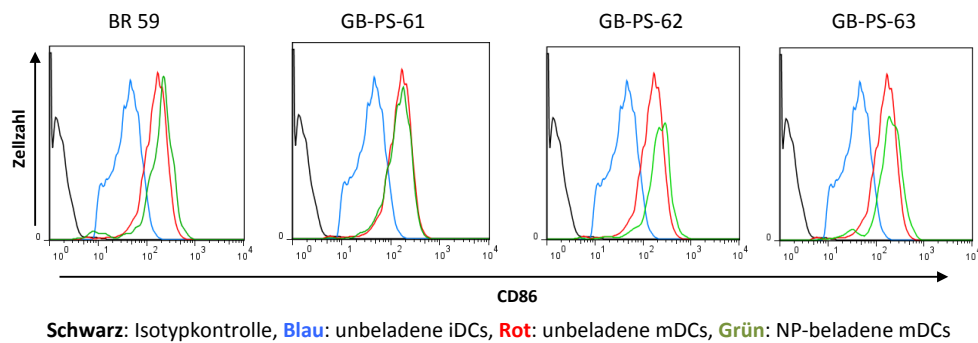


Abbildung 35: **Expression von CD86 auf Nanopartikel-beladenen mDCs:** Zunächst wurden iDCs mit den jeweiligen Partikeln für 16 h beladen (75 µg/ml) und danach für 48 h zu mDCs ausgereift (grüne Linie). Im Anschluss wurden sie in der Durchflusszytometrie auf ihre CD86-Expression hin untersucht. Unbeladene iDCs (blaue Linie) und mDCs (rote Linie) wurden als Vergleich mitgeführt. Als Kontrolle diente IgG (schwarze Linie).

## 4 Ergebnisse

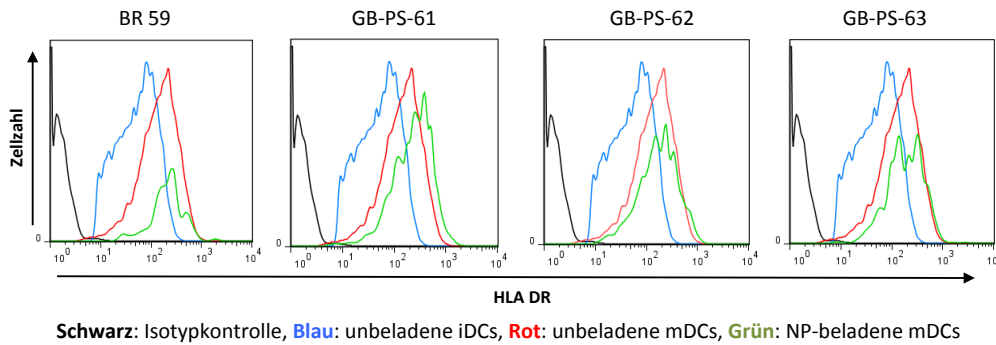


Abbildung 36: **Expression des Oberflächenmarkers HLA DR auf Nanopartikel-beladenen mDCs:** iDCs wurden 16 h lang mit 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  des jeweiligen Partikels inkubiert und anschließend 48 h lang zu mDCs ausgereift. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit IgG (schwarze Linie). Zum Vergleich der Expression wurden ebenfalls unbeladene iDCs (blaue Linie) und mDCs (rote Linie) für HLA DR gefärbt.

HLA DR wurde erwartungsgemäß vermehrt auf mDCs vorgefunden, im Vergleich zu iDCs (s. Abb.36). Betrachtete man die Expression auf Nanopartikel-beladenen mDCs, fiel auf, dass bei den mDCs, die mit Partikel GB-PS-61 beladen wurden, eine leichte Hochregulation des Markers beobachtet werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigte die Beladung mit den anderen Partikeln keinen Effekt auf die HLA DR Expression. Diese war vergleichbar mit der Expression auf Nanopartikel-unbeladenen mDCs.

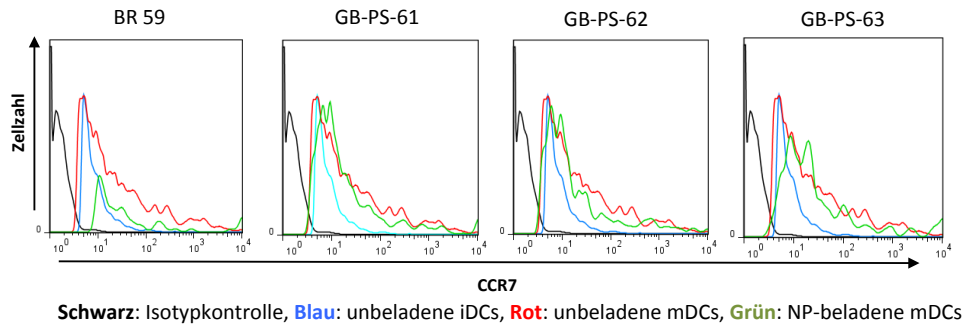


Abbildung 37: **Oberflächenexpression von CCR7 auf Nanopartikel-beladenen mDCs:** Es wurden iDCs mit den einzelnen Partikeln beladen (75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) und 16 h lang inkubiert. Es folgte die Ausreifung zu mDCs für 48 h. Unbeladene iDCs (blaue Linie) und mDCs (rote Linie) dienten als Vergleich und ein IgG-Ansatz (schwarze Linie) als Kontrolle.

Abbildung 37 zeigt die Expression des *homing* Markers CCR7 (*C-C chemokine receptor type 7*). Der Antikörper lieferte keine deutliche Auftrennung der einzelnen Populatio-

nen, dennoch wurde deutlich, dass CCR7 auf Nanopartikel-unbeladenen mDCs stärker exprimiert wurde als auf Nanopartikel-unbeladenen iDCs. Die Beladung von DCs mit den Nanopartikeln führte zu keinem veränderten Expressionsmuster. Die Expression des CCR7 Markers entsprach der von Nanopartikel-unbeladenen mDCs.

#### 4.2.3 Einfluss der Nanopartikel auf die DC-Funktionalität

Das Beladen von DCs mit Nanopartikeln kann auch deren Funktionalität beeinflussen, d.h. dass sie eventuell nicht mehr in Lage sind, virale Antigene T-Zellen zu präsentieren oder dies sogar verstärkt tun. Um das zu überprüfen, wurde mit Nanopartikel-beladenen mDCs ein IFN  $\gamma$  ELISpot durchgeführt (s. 3.6). Dafür wurden iDCs von einem CMV-seropositiven Spender mit den unterschiedlichen Nanopartikeln beladen und nach 16 h für weitere 48 h zu mDC ausgereift. Als Vergleich wurden DCs ohne Nanopartikel ausgereift und ebenfalls im ELISpot getestet. Die DCs wurden in einem Verhältnis von 1:5 (DC : E (T-Zellen)) im IFN  $\gamma$  ELISpot Assay eingesetzt. Als Antigen wurde ein Peptidmix aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell Epitopen des CMV verwendet. Die T-Zellen wurden vorher mittels magnetischer Beads (s. 3.5) isoliert. Zunächst wurde jeder Nanopartikel mit einem anderen Spender getestet.

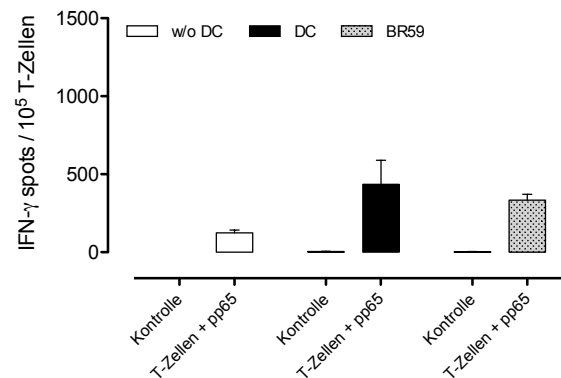


Abbildung 38: **Antigenpräsentation von DCs beladen mit BR 59:** iDCs wurden mit dem Partikel BR 59 (75  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 16 h beladen und anschließend zu mDCs ausgereift. Anschließend wurden sie auf ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation mit autologen CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einem IFN  $\gamma$  ELISpot getestet. Verhältnis 5:1 (T-Zellen:DC). Als Kontrollen dienten Ansätze ohne das Peptid pp65. Weißer Balken: Ansatz ohne DCs + CD8<sup>+</sup> T-Zellen; schwarzer Balken: unbeladene mDCs + CD8<sup>+</sup> T-Zellen; gemusterter Balken: Nanopartikel-beladene mDCs + CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Repräsentatives Ergebnis von drei Versuchen. MW mit Standardabweichung

Zunächst wurde der Partikel BR 59 getestet. Als Kontrolle diente jeweils ein An-



## 4 Ergebnisse

satz ohne das Peptid pp65. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten eine leichte Autoreaktivität (s. Abb. 38, Kontrolle schwarzer und gemusterter Balken). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit den Nanopartikel-unbeladenen mDCs stimuliert wurden, zeigten ein IFN  $\gamma$  Produktion von 435 Spots / 10<sup>5</sup> T-Zellen (s. Abb. 38, schwarzer Balken). Nanopartikel-beladene mDCs stimulierten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen schwächer (s. Abb. 38, 333 Spots / 10 T-Zellen, gemusterter Balken).

Der Partikel BR 59 schien die Antigenpräsentation von DCs nicht wesentlich zu beeinflussen. Es schien, als ob der Partikel die Antigenpräsentation sogar eher leicht hemmte, jedoch war der Unterschied nicht signifikant ( $p=0,09$ ). Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Versuchen.

Der Partikel GB-PS-61 zeigte keinen Einfluss auf die Antigenpräsentation von DCs. Als Kontrolle diente erneut je ein Ansatz ohne das Peptid pp65. Hier zeigten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine höhere Autoreaktivität als bei der Beladung mit BR 59 (s. Abb. 39, Kontrolle schwarzer und gemusterter Balken). Vergleich man die unbeladenen mDCs (s. Abb. 39, schwarzer Balken) mit den Nanopartikel-beladenen mDCs (s. Abb. 39, gemusterter Balken), so konnte man keinen deutlichen Unterschied in der Antigenpräsentation erkennen. CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit den unbeladenen mDCs inkubiert wurden, zeigten 976 Spots / 10<sup>5</sup> T-Zellen; wurden sie mit Nanopartikel-beladenen mDCs inkubiert 934 Spots / 10<sup>5</sup> T-Zellen. In diesem Versuch konnte sowohl bei den unbeladenen (39 Spots) wie auch bei den Nanopartikel-beladenen mDCs (22 Spots) eine leichte Stimulierung der CD8<sup>+</sup> T-Zellen auch ohne pp65 beobachtet werden. Jedoch gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Ansätzen ( $p=0,33$ ). Der Versuch wurde zweimal mit vergleichbarem Ergebnis wiederholt.

## 4 Ergebnisse

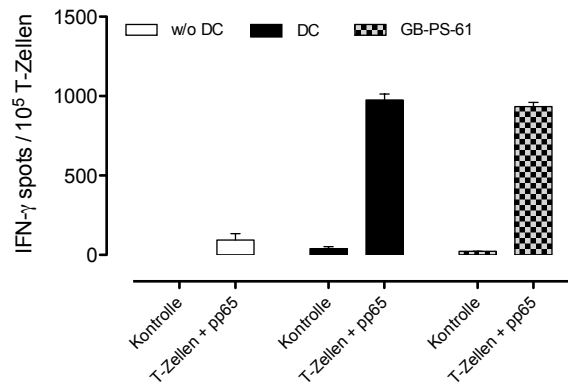


Abbildung 39: **Antigenpräsentation von DCs beladen mit GB-PS-61:** Es wurden iDCs mit 75  $\mu\text{g/ml}$  des Partikels GB-PS-61 für 16 h inkubiert und danach für weitere 48 h zu mDCs ausgereift. Die mDCs wurden dann in einem IFN  $\gamma$  ELISpot mit  $\text{CD8}^+$  T-Zellen eingesetzt (Verhältnis 1:5). Als Vergleich dienten zum einen ein Ansatz ohne DCs +  $\text{CD8}^+$  T-Zellen (weiße Balken), sowie ein Ansatz mit unbeladenen mDCs +  $\text{CD8}^+$  T-Zellen (schwarzer Balken). Kontrollen waren jeweils Ansätze ohne das Peptid pp65. Gemusterter Balken: Nanopartikel-beladene mDCs +  $\text{CD8}^+$  T-Zellen. Ein repräsentatives Ergebnis von zwei Versuchen dargestellt. MW mit Standardabweichung

Auch Partikel GB-PS-62 zeigte kaum einen Einfluss auf die antigenpräsentierende Funktion der DCs. In diesem Versuch war bei den unbeladenen DCs kaum eine Autoreaktivität der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen zu messen, jedoch wurde diese durch die Beladung mit GB-PS-62 verstärkt (s. Abb. 40, Kontrolle schwarzer und gemusterter Balken). Sowohl die unbeladenen wie auch die Nanopartikel-beladenen mDCs stimulierten die  $\text{CD8}^+$  T-Zellen gleich stark. Unbeladene mDCs führten zu 240 Spots /  $10^5$  T-Zellen (s. Abb. 40, schwarzer Balken) und Nanopartikel-beladene mDCs zu 316 Spots /  $10^5$  T-Zellen (s. Abb. 40, gemusterter Balken), wobei hier auch eine Stimulation der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen ohne pp65 zu beobachten war (79 Spots). Die Fähigkeit der Antigenpräsentation von DCs schien durch den Partikel GB-PS-62 leicht verstärkt gewesen zu sein, allerdings war dies nicht signifikant ( $p=0,21$ ). Auffällig war, dass generell nur eine geringe IFN  $\gamma$  Spotproduktion zu sehen war. Der Versuch wurde ein zweites Mal wiederholt mit vergleichbaren Ergebnissen.

## 4 Ergebnisse

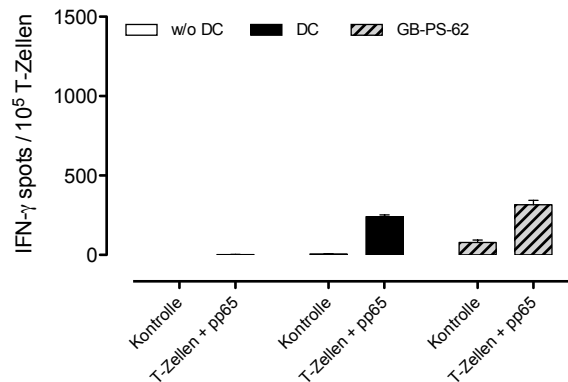


Abbildung 40: **DCs beladen mit GB-PS-62 und deren Antigenpräsentation:** iDCs wurden für 16 h mit 75 µg/ml des Partikels GB-PS-62 inkubiert und anschließend für 48 h zu mDCs ausgereift. Im Anschluss wurden diese DCs in einem IFN  $\gamma$  ELISpot mit CD8<sup>+</sup> T-Zellen getestet. Zum Vergleich wurden ebenfalls unbeladene mDCs getestet. Als Kontrolle diente jeweils ein Ansatz ohne pp65. Weiße Balken: Ansatz ohne DCs + CD8<sup>+</sup> T-Zellen; schwarze Balken: Ansatz mit unbeladenen mDCs + CD8<sup>+</sup> T-Zellen; gemusterte Balken: Nanopartikel-beladene DCs + CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Repräsentatives Ergebnis von zwei Versuchen. MW mit Standardabweichung

Zuletzt wurde Partikel GB-PS-63 hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Antigenpräsentation von DCs getestet. Auch in diesem Versuch zeigten die CD8<sup>+</sup> T-Zellen nur eine geringe Autoreaktivität (s. Abb. 41, Kontrolle schwarzer und gemusterter Balken). Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die mit den Nanopartikel-beladenen mDCs stimuliert wurden, zeigten mit 1352 Spots / 10<sup>5</sup> T-Zellen (s. Abb. 41, gemusterte Balken) eine leicht stärkere IFN  $\gamma$  Produktion im Vergleich zu denen, die mit den unbeladenen mDCs stimuliert wurden (s. Abb. 41, 1173 Spots, schwarzer Balken).

Der Partikel GB-PS-63 schien die Antigenpräsentation von DCs zu verstärken (p=0,03, signifikant). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von drei Versuchen.

## 4 Ergebnisse

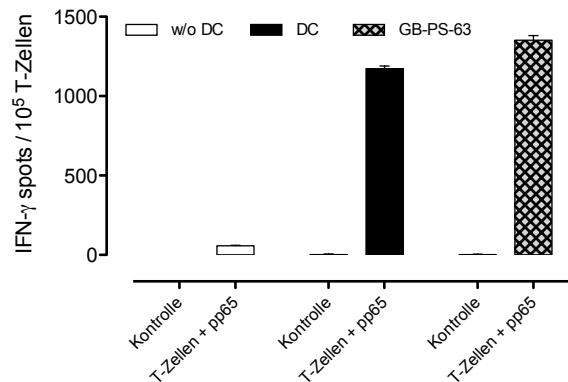


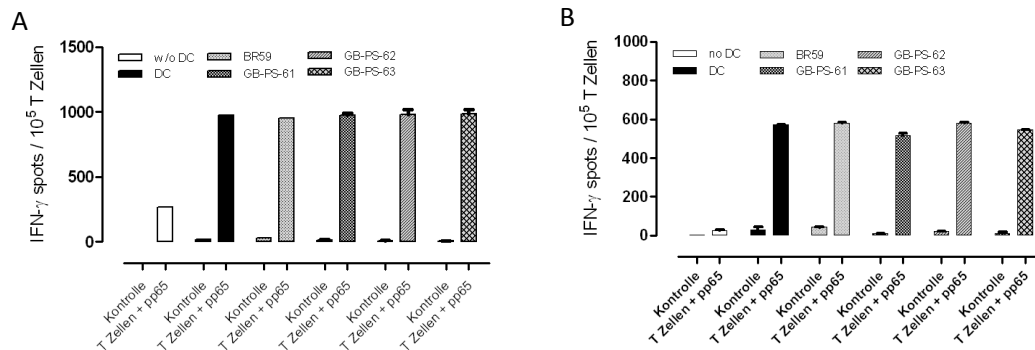
Abbildung 41: **Antigenpräsentation von DCs beladen mit GB-PS-63:** iDCs wurden mit 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  beladen und für 16 h inkubiert. Danach wurden sie für 48 h zu mDCs ausgereift. Zum Vergleich wurden unbeladene mDCs getestet. Als Kontrolle diente je ein Ansatz ohne pp65. Weiße Balken: ohne DC +  $\text{CD8}^+$  T-Zellen; schwarze Balken: mDCs +  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, gemusterte Balken: Nanopartikel-beladene mDCs +  $\text{CD8}^+$  T-Zellen. Ein repräsentatives Ergebnis von zwei dargestellt. MW mit Standardabweichung

Die Partikel GB-PS-61, -62 und BR59 schienen DC nicht deutlich hinsichtlich ihrer Antigenpräsentation gegenüber  $\text{CD8}^+$  T-Zellen zu beeinflussen. Partikel GB-PS-63 hingegen führte zu einer leicht verstärkten Aktivität von DCs. Besonders das Beladen von DCs mit GB-PS-61 und -62 führte zu einer Autoreaktivität der  $\text{CD8}^+$  T-Zellen. Die DCs und  $\text{CD8}^+$  T-Zellen, die in diesen Versuchen verwendet wurden, stammten alle von verschiedenen *buffy coat* Spendern. Somit waren die Ergebnisse stark abhängig vom jeweiligen Immunstatus des Spenders und Vergleiche der Partikel untereinander waren so nicht möglich. Zudem sollte mituntersucht werden, ob die Beladung der DCs mit den Nanopartikeln Einfluss auf die Stimulation von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen hat. Daher wurden aus einem *buffy coat* genug DCs und  $\text{CD8}^+$  und  $\text{CD4}^+$  T-Zellen generiert und isoliert, damit alle vier Partikel gleichzeitig getestet werden konnten. Es wurden je 75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  auf die iDCs gegeben und 16 h lang inkubiert. Es folgte die Ausreifung für 48 h zu mDCs. Als Vergleich wurden erneut unbeladene mDCs mitgetestet. Als Kontrolle dienten jeweils die Ansätze ohne das pp65 Peptid.

Betrachtet man Abb. 42, sieht man die Ergebnisse der Nanopartikel GB-PS-61, -62 und BR59 bestätigt. Bei der Verwendung von DCs von einem Spender zeigte Partikel GB-PS-63 keinen Einfluss auf die DC Aktivierung. Die  $\text{CD8}^+$  T-Zellen zeigten eine leichte Autoreaktivität, wie in Abb. 42 (A) an dem weißen Balken zu erkennen ist (269 Spots). Die  $\text{CD4}^+$  T-Zellen waren kaum autoreaktiv (s. Abb. 42 B, 25 Spots). Im Ansatz mit den unbeladenen mDCs erzeugten die  $\text{CD8}^+$  T-Zellen mehr IFN  $\gamma$  (976 Spots) als die  $\text{CD4}^+$  T-Zellen (572 Spots). Dies war auch bei den Nanopartikel-beladenen mDCs der

## 4 Ergebnisse

Fall. Wurden die DCs mit dem Partikel BR 59 beladen, zeigten die  $CD8^+$  T-Zellen 955  $IFN\ \gamma$  Spots, wohingegen die  $CD4^+$  T-Zellen 579  $IFN\ \gamma$  Spots bildeten. Die Beladung mit Partikel GB-PS-61 führte zu 975 Spots bei den  $CD8^+$  und zu 515 Spots bei den  $CD4^+$  T-Zellen.  $CD8^+$  T-Zellen, die mit GB-PS-62 beladenen DCs stimuliert wurden, bildeten 982 Spots, die  $CD4^+$  T-Zellen 578 Spots. Wurden DCs mit GB-PS-63 beladen, produzierten die  $CD8^+$  T-Zellen 986  $IFN\ \gamma$  Spots, die  $CD4^+$  T-Zellen 545 Spots /  $10^5$  T-Zellen.



2

Abbildung 42: **Testung der vier Nanopartikel mit DCs und  $CD8^+$  /  $CD4^+$  T-Zellen eines buffy coat Spenders:** iDCs wurden mit den jeweiligen NP beladen und 16 h inkubiert. Es folgte eine Ausreifung über 48 h zu mDC und eine anschließende Testung als Zielzellen für  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen im  $IFN\ \gamma$  ELISpot Assay. Weiße Balken: Ansatz ohne DCs + T-Zellen; schwarze Balken: Ansatz mit unbeladenen mDCs + T-Zellen; gemusterte Balken: Ansätze mit Nanopartikel-beladenen DCs + T-Zellen. (A)  $CD8^+$  T-Zellen (B)  $CD4^+$  T-Zellen. MW mit Standardabweichung

Die Beladung der DCs mit den vier verschiedenen NP zeigte weder einen positiven noch negativen Effekt auf die antigenpräsentierenden Eigenschaften der DCs (keine Signifikanz), was sich im Vergleich mit den Nanopartikel-unbeladenen mDCs zeigte. Somit scheinen die in dieser Arbeit getesteten NP die CMV Peptidpräsentation der DCs nicht zu beeinflussen.

### 4.2.4 Nanopartikel-Aufnahme von DC mittels kLSM

Die Untersuchungen dieser Arbeit mittels Durchflusszytometrie von Nanopartikel-beladenen mDCs zeigten zwar Signale für Zellen, die sowohl positiv für die Nanopartikel als auch für DC-Marker waren, jedoch wurde daraus nicht ersichtlich, ob diese Signale von aufgenommenen Nanopartikeln stammten, oder ob die Partikel eventuell nur mit der Zelloberfläche assoziiert waren. Um nach möglicher intrazellulärer Lokalisation der Partikel zu schauen, wurde mit Nanopartikel-beladenen mDCs kLSM durchgeführt. Hierfür wurden iDCs wie in 3.7 beschrieben mit unterschiedlichen Konzentrationen der Na-

## 4 Ergebnisse

nopartikel beladen und zu mDCs ausgereift und anschließend mittels eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (710 UV, Carl Zeiss) analysiert.

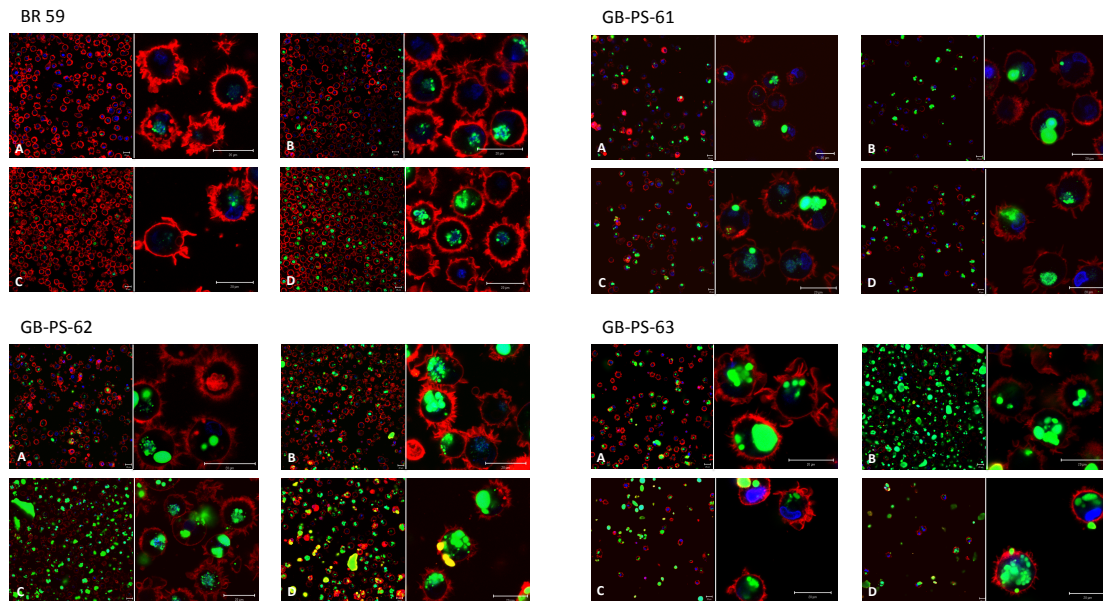


Abbildung 43: **kLSM Aufnahmen von DCs nach Beladung mit den vier verschiedenen Nanopartikeln:** iDCs wurden mit vier verschiedenen Konzentrationen der verschiedenen Nanopartikel für 16 h inkubiert und anschließend für 48 h zu mDCs ausgereift. Die Zellmembran wurde mit CellMask<sup>TM</sup> Orange (rot, 2,5 µg/ml) und die Zellkerne mit DRAQ 5 (blau, 0,5 mM) gefärbt. Der Partikel leuchtete grün. (A) 25 µg/ml, (B) 75 µg/ml, (C) 150 µg/ml, (D) 300 µg/ml.

Abbildung 43 zeigt mDCs die mit vier verschiedenen Konzentration der vier verschiedenen Nanopartikel beladen wurden. Zunächst ist in allen Ansätzen eine deutliche DC Morphologie zu erkennen. Betrachtet man Partikel BR59, erkennt man in der jeweilige Übersicht (linkes Bild A-D), dass alle Partikel intrazellulär zu finden waren. Bei höheren Konzentrationen (s. Abb. 43 B-D, 75-300 µg/ml) erkannte man teilweise größere grüne Punkte, die auf eine intrazelluläre Aggregation des Partikels hinwiesen. Außerdem war auffällig, dass der Partikel primär in der Region des Zellkernes zu finden war (s. Abb. 43 B und D). Der Partikel BR 59 wurde bei allen getesteten Konzentrationen in die Zellen aufgenommen und zeigte selbst bei der höchsten Konzentration (300 µg/ml) nur ein leichtes Aggregationsverhalten. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis von zehn Versuchen.

Bei Partikel GB-PS-61 fiel zunächst auf, dass nur wenige DCs an sich vorhanden waren. Allerdings zeigte der Partikel schon bei der geringsten Konzentration (25 µg/ml) Anzeichen von Aggregation. Dies wurde mit zunehmender Konzentration deutlicher. Dennoch

## 4 Ergebnisse

konnte der Großteil der Partikel intrazellulär gefunden werden. Dieser Versuch wurde viermal durchgeführt. Abgebildet ist ein repräsentatives Ergebnis.

Die Beladung von DCs mit dem Partikel GB-PS-62 zeigte neben der typischen DC-Morphologie ab einer Konzentration von 150 µg/ml eine starke Aggregation und somit nur eine teilweise Aufnahme in DCs. Bei den Konzentrationen 25 und 75 µg/ml waren nur einige Partikel aggregiert, aber dennoch intrazellulär lokalisierbar. Stellvertretend für fünf Versuche ist ein Ergebnis abgebildet.

Partikel GB-PS-63 aggregierte schon bei geringen Konzentrationen stark. Ab einer Konzentration von 150 µg/ml waren auch kaum noch DCs vorhanden und der Großteil der Zellen befand sich als Aggregate außerhalb der Zellen. Somit konnte keine eindeutige Aussage über eine mögliche Aufnahme des Partikels in DCs gemacht werden, da die Partikelaggregation diese eventuell verhindert hat. In allen sieben durchgeführten Versuchen war ein ähnliches Ergebnis zu beobachten.

### 4.2.5 *In vivo* Untersuchungen

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu etablieren in dem das targetieren humaner Zellen mit Nanopartikeln *in vivo* untersucht werden sollte. Neben den *in vitro* Arbeiten und den Untersuchungen der *in vivo* Biodistribution in nicht humanisierten Mäusen sollten die Nanopartikel ebenfalls in einem humanisierten Modell untersucht werden. Daher wurden für die *in vivo* Versuche die NOD.Cg-*Prkdc*<sup>scid</sup>*Il2rg*<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ (NSG) Maus verwendet. Zunächst war von Interesse, wo die Zellen generell wiederzufinden wären und ob die unterschiedlichen Eigenschaften der Nanopartikel (Größe, Oberfläche und Ladung) einen Einfluss auf die *in vivo* Verteilung hätten oder sogar toxisch für die Tiere wären. Die Detektion der Nanopartikel war durch den eingebauten IR 780 Iodid Farbstoff mittels eines Xenogen IVIS<sup>®</sup> Spektrum Messgeräts möglich.

Für die Applikation wurden 8-40 Wochen alte NSG Mäuse zunächst mit einer Rotlichtlampe erwärmt. Anschließend wurde ihnen 100 µl des jeweiligen, unverdünnten Nanopartikels (3,7 %) intravenös injiziert. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation (0h-96h) untersucht (s. 3.14).

Vor der Applikation wurden das Signal des IR Farbstoffs 780 Iodid überprüft (s. Abb. 44). Hier zeigte sich, dass der Partikel GB-PS-63 das stärkste und Partikel BR 59 das schwächste optische Signal lieferte. Für die späteren quantitativen Analysen der einzelnen Organe wurde die gemessenen Werte mit einem Korrekturfaktor, der sich auf den Partikel mit dem stärksten Signal bezog (GB-PS-63), multipliziert. Dies erlaubte den Vergleich der Partikel untereinander.

## 4 Ergebnisse

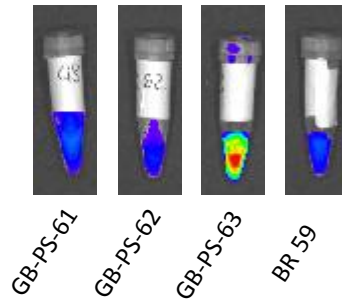


Abbildung 44: **Imaging der vier verschiedenen Nanopartikel:** Die Partikel wurden mittels des Xenogen IVIS<sup>®</sup> Spectrum gemessen. Der eingebaute IR Farbstoff 780 Iodid wurde mit einer Excitation von 745 nm angeregt und zeigte eine Emission bei 820 nm.

Pro Partikel wurden drei Mäuse verwendet (s. Abb. 45). Als Kontrolle (jeweils rechts im Bild) diente eine Nanopartikel-unbehandelte Maus. Die erste Messung erfolgte direkt nach Applikation der Nanopartikel (0 h). Hier sah man bereits eine unterschiedliche Verteilung der einzelnen Partikel. Partikel GB-PS-62 und BR 59 waren nur in der Leberregion detektierbar. Dies änderte sich auch nicht nach längerer Zeit (4 h-96 h). Bei den Partikeln GB-PS-61 und -63 war jedoch auch eine Verteilung in die Region der Lungen zu beobachten, wobei der Partikel GB-PS-61 zunächst nur in der Lunge nachweisbar war und erst nach 4 h in der Leber. Der Partikel GB-PS-63 zeigt darüber hinaus eine Lokalisation im Bereich der Speicheldrüsen. Dieses Verteilungsmuster der beiden Partikel blieb während des untersuchten Zeitraumes gleich. Generell fiel auf, dass der Partikel BR 59 nur ein schwaches Signal lieferte, wohingegen Partikel GB-PS-63 der Partikel mit dem stärksten Signal war. Dieser Versuch wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Nach 96 h wurden die Tiere getötet und einzelne Organe wurden mit Hilfe des Xenogen IVIS Spektrum Messgeräts untersucht.



## 4 Ergebnisse

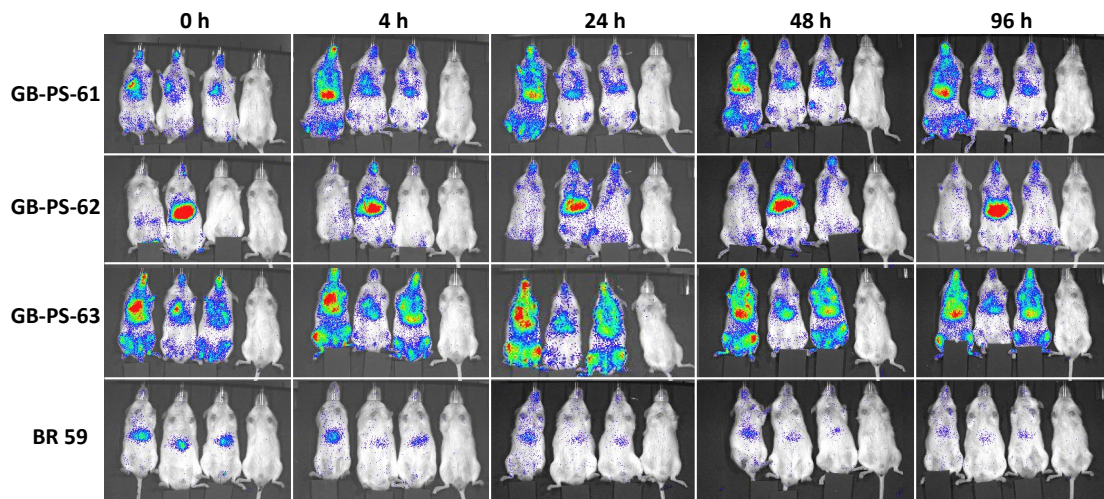


Abbildung 45: **Kinetikuntersuchung der Biodistribution verschiedener NP in NSG Mäusen:** Es wurde ein Volumen von 100  $\mu$ l pro NP intravenös appliziert mit einer Konzentration von 37  $\mu$ g/ml. Die Messung zu 5 unterschiedlichen Zeitpunkten (0, 4, 24, 48 und 96 h) erfolgte im Xenogen IVIS Spektrum. In jedem Bild ist rechts die unbehandelte Kontrollmaus abgebildet. Hier ist ein repräsentatives Experiment von drei Versuchen gezeigt.

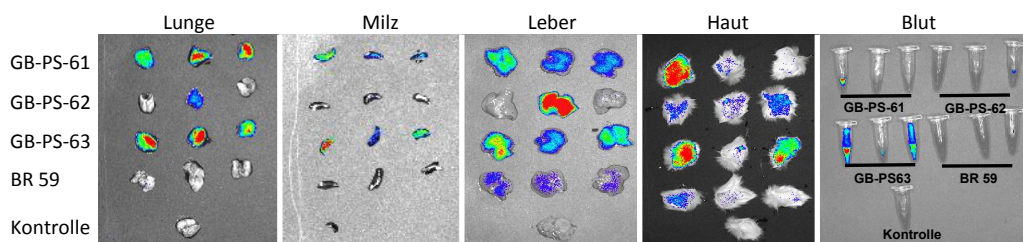


Abbildung 46: **Analyse einzelner Organe 96 h nach NP-Applikation:** Nach 96 h wurden die Tiere getötet und die Lunge, Milz und Leber entnommen. Es wurden ebenfalls Hautproben und Blut untersucht. Die Organe wurden bis zur Messung auf Eis in PBS gelagert. n= 3 von einem Versuch

Abbildung 46 zeigt, dass wie bereits an den lebenden Tieren zu sehen war (s. Abb. 45), alle Partikel in der Leber nachweisbar waren. Hier wurde bestätigt, dass der Partikel BR 59 optisch ein sehr schwaches Signal lieferte. Alle vier Partikel waren ebenfalls in der Haut detektierbar. In diesem Versuch konnte kein sichtbares Signal des Partikels BR 59 in Lunge, Milz und Blut nachgewiesen werden, ebenso war Partikel GB-PS-62 nicht messbar in Milz und Blut. Dies bedeutete jedoch nicht, dass in diesen Organen

## 4 Ergebnisse

überhaupt keine Partikel vorhanden waren, das Signal lag eventuell nur unter der optisch nachweisbaren Grenze. Daher wurden die Organe zusätzlich quantitativ ausgewertet. Für die quantitative Analyse (s. Abb. 47) wurden zwei Versuche mit  $n=5$  gepoolt. Zunächst wurde der Wert des jeweiligen Kontrollorgans subtrahiert und anschließend mit einem Korrekturfaktor multipliziert (s.o.).

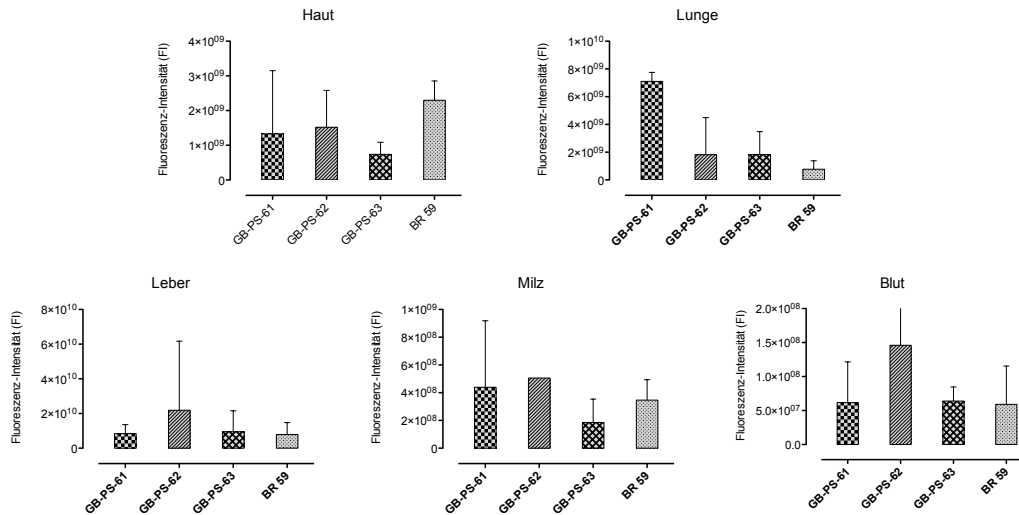


Abbildung 47: **Quantitative Analyse einzelner Organe 96 h nach Nanopartikel-Applikation:** 96 h nach der Nanopartikel-Applikation wurden Leber, Milz und Lunge entnommen, sowie Proben vom Blut und der Haut. Alle Proben wurden mit dem Xenogen IVIS<sup>®</sup> Spektrum Messgerät gemessen und quantitativ ausgewertet. Um die Werte untereinander vergleichen zu können, wurde ein Korrekturfaktor eingebaut. Dargestellt sind Ergebnisse aus zwei Versuchen mit  $n=5$

So wurde auch deutlich, dass der Partikel GB-PS-63 zwar am stärksten leuchtete, dies aber nicht unbedingt auf eine verstärkte Anreicherung in dem jeweiligen Organ zurückzuführen war. In der Haut zeigte der Partikel BR 59 das stärkste Signal ( $2 \times 10^9$  Fluoreszenzintensität (FI)) und Partikel GB-PS-63 das Schwächste (unter  $1 \times 10^9$  FI). Partikel GB-PS-61 und -62 zeigten Signale im Bereich von  $1,5 \times 10^9$ . Anders in den Lungen, dort zeigte der Partikel GB-PS-61 mit Abstand die stärkste Fluoreszenzintensität ( $7 \times 10^9$ ), die anderen drei Partikel zeigten Fluoreszenzintensitäten im Bereich von  $2 \times 10^9$  (GB-PS-62 und -63) und  $1 \times 10^9$  (BR 59). In den Lebern konnte verstärkt Partikel GB-PS-63 nachgewiesen werden ( $2 \times 10^{10}$  FI), Partikel GB-PS-61, -62 und BR 59 zeigten Signale bei  $1 \times 10^{10}$ . Die Milzen zeigten Signale der Partikel von  $2 \times 10^8$  (GB-PS-63) bis  $5 \times 10^8$  (GB-PS-62). Im Blut wurde vermehrt Partikel GB-PS-62 nachgewiesen ( $1,5 \times 10^8$  FI), wobei die anderen drei Partikel mit Fluoreszenzintensitäten um  $5 \times 10^7$  messbar waren.

## 4 Ergebnisse

Vergleich man alle Organe untereinander, wurde auch hier deutlich, dass primär die Leber von den Partikeln infiltriert wurde. Die geringste Konzentration an Partikeln zeigte das Blut und die Milz. Überraschenderweise konnte ein recht starkes Signal von allen Partikeln in der Haut detektiert werden.

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass in *in vitro* Versuchen alle vier verschiedenen Partikel von DCs aufgenommen wurden und dass die Partikel nicht toxisch waren in den *in vivo* Untersuchungen, war der nächste Schritt, die Partikel im humanisierten Mausmodell zu untersuchen. Hierfür wurden humanisierte Mäuse aus dem Versuch T 10.1 verwendet. Die Mäuse waren 40 Wochen alt und in Woche 30 nach Transplantation. Für die *in vivo* Applikation wurde der Partikel GB-PS-63 gewählt, da dieser *in vivo* das stärkste Signal lieferte und die Verteilung nicht nur auf die Leber konzentriert war. Je 100  $\mu$ l wurden drei humanisierten Tieren intravenös appliziert, wobei eine zusätzliche humanisierte Maus als Kontrolle diente. Zum Vergleich wurden ebenfalls 100  $\mu$ l drei nicht humanisierten Tieren appliziert und eine zusätzliche Maus diente als Kontrolle. Für die Kinetikversuche, wurden die Tiere zu sechs verschiedenen Zeitpunkten mit dem Xenogen IVIS Spektrum Messgerät gemessen (0, 2, 6, 24, 48 und 96 h).

Direkt nach der Nanopartikel-Applikation (s. Abb. 48, 0 h) sah man sowohl bei den humanisierten (hu) wie auch bei den nicht humanisierten (wt) Tieren Signale in der Leberregion, in den Lungen und in der Gegend der Speicheldrüsen. Diese Verteilung veränderte sich nicht im Laufe des Experiments, teilweise wurden die Signale nur stärker in den genannten Regionen. Vergleich man die beiden Tiergruppen, wurde kein Unterschied hinsichtlich der Verteilung der Nanopartikel und deren Kinetik sichtbar. Das Vorhandensein einer humanen Hämatopoese scheint die Verteilung und die Kinetik des Partikels GB-PS-63 nicht zu verändern.

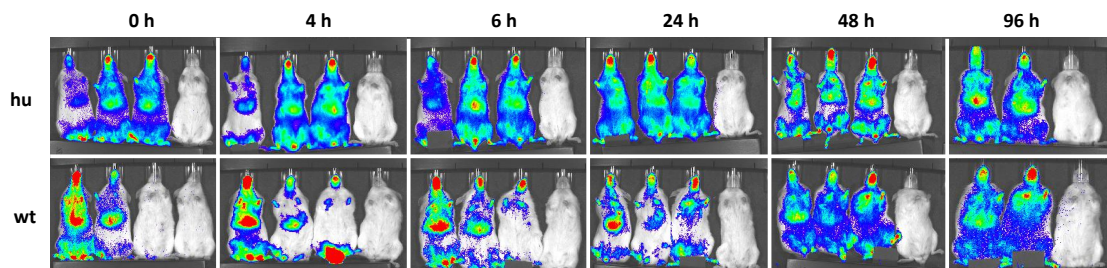


Abbildung 48: **Kinetikuntersuchungen des Partikels GB-PS-63 in humanisierten Mäusen:** Humanisierten (hu) und nicht humanisierten (wt) Mäusen wurden 100  $\mu$ l des GB-PS-63 mit einer Konzentration von 3,7 % intravenös injiziert. Die Messungen erfolgten zu sechs verschiedenen Zeitpunkten mit dem Xenogen IVIS Spektrum. Nach 48 h wurde je ein Tier aus der humanisierten und der nicht humanisierten Kohorte untersucht, daher wurden nach 96 h nur zwei Tiere pro Kohorte gemessen. Die Kontrolle befindet sich jeweils rechts im Bild.

## 4 Ergebnisse

Nach 48 h wurde jeweils ein Tier aus jeder Gruppe getötet. Die Milz und das Knochenmark wurden entnommen und für kLSM Untersuchungen (s.3.9) aufgearbeitet.

Bei der Milz konnten sowohl in der humanisierten (hu) wie auch in der nicht-humanisierten (wt) Probe nur wenig Zellen gemessen werden (s. Abb. 49 A). Ebenso waren kaum Nanopartikel zu finden. In beiden Mäusen konnte keine intrazelluläre Lokalisation des Partikels beobachtet werden. Die Partikel waren außen an den Zellen gebunden. Es konnte auch kein Unterschied in der Lokalisation des Nanopartikels zwischen Milzzellen der humanisierten und der nicht-humanisierten Maus gesehen werden.

Im Knochenmark konnten ebenfalls nur wenige Zellen detektiert werden (s. Abb. 49 B). Außerdem war ein Großteil der Zellen tot, was an der kompletten Rotfärbung der Zellen zu erkennen war. Auch hier konnte der Partikel GB-PS-63 nur vereinzelt gemessen und nicht intrazellulär wiedergefunden werden. Die wenigen Partikel, die vorhanden waren, waren außen an den Zellen lokalisiert.

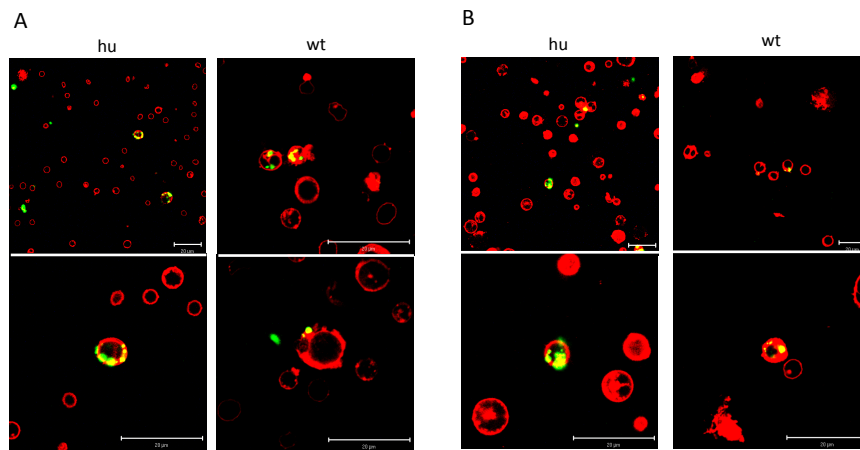


Abbildung 49: **kLSM von Milz- und Knochenmarkszellen 48 h nach der Applikation von GB-PS-63:** Humanisierten (hu) und nicht humanisierten (wt) Mäusen wurden 100  $\mu$ l des GB-PS-63 (c= 3,7 %) intravenös injiziert. Nach 48 h wurde jeweils eine Maus aufgearbeitet und die Milz- und Knochenmarkszellen für die kLSM gefärbt. Der Partikel GB-PS-63 konnte über den eingebauten BODIPY Farbstoff (grün) detektiert werden. Die Zellmembranen wurden mit CellMask<sup>TM</sup> Orange (2,5  $\mu$ g/ml) angefärbt (rot). (A) Milzzellen, (B) Knochenmarkszellen

In einem weiteren Ansatz wurden die Milz und das Knochenmark mit einem humanen CD45 Antikörper gefärbt. Die humanisierten Mäuse sollten aufgrund der vorhandenen humanen Hämatopoese humane CD45<sup>+</sup> Zellen aufweisen. Die kLSM Untersuchungen sollten zeigen, ob eine eventuelle Kolokalisation von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen mit dem Partikel vorlag. In Abb. 50 sind die gefärbten Milz- und Knochenmarkszellen dargestellt.

## 4 Ergebnisse

Zunächst war auffällig, dass nur wenige Zellen vorhanden und davon nur vereinzelt Zellen positiv für humanes CD45 waren. Desweiteren konnten kaum Partikel detektiert werden. In der Milz (s. Abb. 50 A) konnten vereinzelt Partikel gefunden werden, die außen an der Zellmembran von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen lokalisiert waren. Im Knochenmark (s. Abb. 50 B) konnten sowohl vereinzelt Partikel wie auch humane CD45<sup>+</sup> Zellen gefunden werden, allerdings war keine Kolo-kalisation zu beobachten.

Nach 96 h und der letzten Kinetikmessung wurden die restlichen Mäuse getötet und aufgearbeitet. Es wurden Milz, Leber und Lunge sowie peripheres Blut und Hautproben entnommen und mit dem Xenogen IVIS Spektrum Messgerät untersucht.

Der Partikel GB-PS-63 konnte in allen Organen wiedergefunden werden (s. Abb. 51) und bestätigt damit vorherige Ergebnisse (s. Abb. 46). Das optisch stärkste Signal konnte in der Leber detektiert werden. Verglich man die Organe der humanisierten (hu) mit denen der nicht-humanisierten (wt) Tiere, war kein Unterschied in der Verteilung des Partikels zu beobachten. Daher wurde auf die quantitative Auswertung dieser Daten verzichtet. Somit scheint das Vorhandensein einer humanen Hämatopoese keinen Einfluss auf das Verteilungsmuster des Partikels GB-PS-63 zu haben.

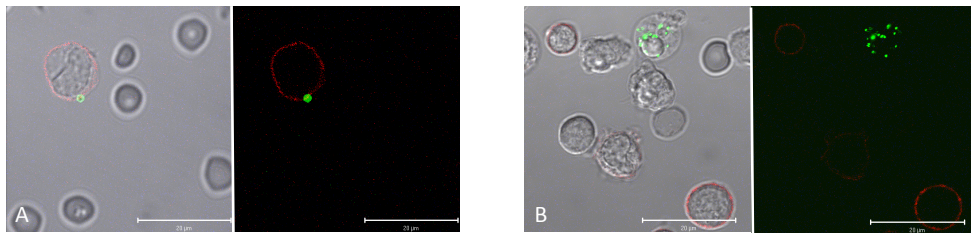


Abbildung 50: **kLSM von Milz- und Knochenmarkszellen von humanisierter Maus 48 h nach Applikation des Partikels GB-PS-63:** Dargestellt sind die Milz- und Knochenmarkszellen einer humanisierten Maus, 48 h nachdem 3,7 % des Partikels GB-PS-63 intravenös appliziert wurden. Die Zellen wurden gegen humanes CD45 gefärbt (rot). Der Partikel konnte über den grün leuchtenden BODIPY Farbstoff detektiert werden. (A) Milzzellen, (B) Knochenmarkszellen

#### 4 Ergebnisse

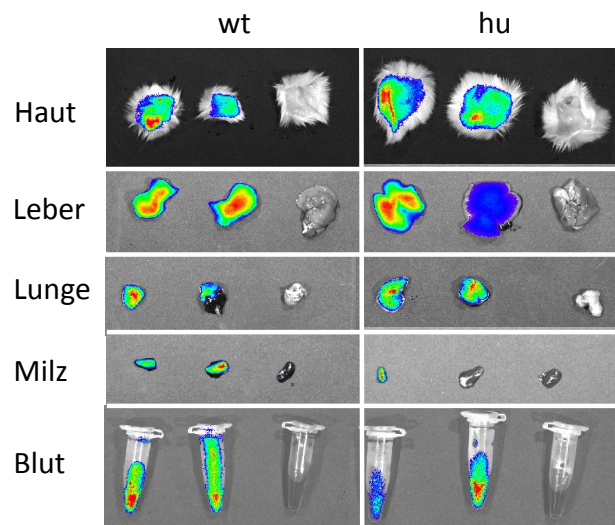


Abbildung 51: Darstellung einzelner Organe 96 h nach Applikation von GB-PS-63 in humanisierte Mäuse: Partikel GB-PS-63 wurde humanisierten Mäusen (hu, Woche 30 nach Transplantation) und nicht-humanisierten Mäusen (wt) intravenös injiziert und nach 96 h wurden einzelne Organe mit dem Xenogen IVIS Spektrum Messgerät auf Nanopartikel-Infiltration hin untersucht.

## 5 Diskussion

### 5.1 Ziele und Ausblick

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines humanisierten Mausmodells zur Untersuchung der Interaktion von humanen APCs mit funktionalisierten Nanopartikeln *in vivo*. Der Fokus lag auf der Rekonstitution humaner DC Subpopulationen im hämatopoetischen und peripheren Gewebe. Zum einen wurde die Kinetik des Anwachsens einer humanen Hämatopoese untersucht und die Differenzierung in diverse DC Subpopulationen. Zum anderen wurden Parameter getestet, die speziell das Anwachsen von DCs unterstützen und somit eine effiziente Humanisierung gewährleisten sollten. Auch Funktionalität einzelner APCs wurde nachgewiesen. In Zukunft soll das etablierte Modell die Möglichkeit bieten, DCs im Kontext einer GvHD zu untersuchen.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Möglichkeit untersucht werden, humane DCs mit polymeren Nanopartikeln gezielt zu markieren und zu manipulieren. In einem systematischen Ansatz wurden oberflächenfunktionalisierte polymere Nanopartikel hinsichtlich einer möglichen Aufnahme und Toxizität sowie deren Einfluss auf die Funktion von DCs *in vitro* getestet. In *in vivo* Untersuchungen wurde die Biodistribution, das Migrationsverhalten und das Überleben dieser Partikel untersucht. Außerdem beinhaltet diese Arbeit erste Versuche, Nanopartikel in humanisierten Tieren zu testen.

In Zukunft soll das humanisierte Mausmodell zu weiteren Erkenntnissen hinsichtlich der Biologie von humanen DCs führen und den möglichen Nutzen aber auch die Grenzen eines solchen Modells für die Analyse humaner DCs aufzeigen. Zum einen erlaubt es Untersuchungen hinsichtlich der Entwicklung, Differenzierung, Aktivierung und Funktion humaner DCs *in vivo*. Zusätzlich bieten sich Migrations-, sowie Depletionsstudien an. Zum anderen sollen Möglichkeiten zu einer gezielten Manipulation von DCs zur Verhinderung einer akuten GvHD *in vivo* getestet werden. Darüber hinaus ist das gezielte Adressieren von DCs auch für Vakzinationsstudien und anderen DC-vermittelten Therapien von Interesse.

### 5.2 Entwicklung einer humanen Hämatopoese im humanisierten Mausmodell

Als Stammzellquelle bieten sich drei Hauptquellen an. Zum einen mobilisierte adulte PBSC, Zellen aus Nabelschnurblut und zum anderen fötale Leberstammzellen. Die am meisten genutzte Quelle sind Stammzellen aus Nabelschnurblut. Hier werden, je nach Mausmodell und Protokoll, nur  $1 \times 10^5$  bis  $5 \times 10^5$  Zellen für die Humanisierung benötigt. Die Rekonstitutionsraten zeigen Werte von bis zu 75 % positive Zellen im peripheren Blut (DRAKE *et. al.*, ISHIKAWA *et. al.*).

Die Nutzung von fötalen Leberstammzellen ist von ethischen Seite her nicht einfach durchzuführen. Dennoch bietet sie großes Potential für erfolgreiche Humanisierungen. Normalerweise werden um die  $5 \times 10^5$  Zellen in neugeborene Mäuse appliziert. Je nach Mausstamm findet man Humanisierungsraten zwischen 30-90 % (ZHANG *et. al.*, DRAKE *et. al.*).

In dieser Arbeit wurden adulte PBSC aus G-CSF-mobilisierten Spendern verwendet. Diese zeigen zwar im Vergleich zu den beiden anderen Quellen die niedrigsten Rekonstitutionsraten (SHULTZ *et. al.*, MATSUMURA *et. al.*, HAYAKAWA *et. al.*), bieten aber auch Vorteile in ihrer Anwendung. Zum einen gewinnt die Methodik der allogenen und autologen HSCT immer mehr an Bedeutung und viele Transplantationszentren bevorzugen die Gewinnung von Stammzellen aus mobilisierten Spendern. Außerdem können große Mengen an Stammzellen aus Resttransplantaten gewonnen werden. Zum anderen kann man aus den Leukapherasaten neben den Stammzellen auch weitere periphere Zellen, wie T-Zellen und DCs, gewinnen. Adulte PBSCs wurden bisher von nur wenigen Gruppen für die Humanisierung von Mäusen verwendet.

Die Anreicherung von Stammzellen für ihre Applikation im Rahmen der Humanisierung von Tieren ist bis heute noch nicht optimal. Die Aufreinigung findet über den Marker CD34 statt. Hierbei geht ein Großteil der Zellen verloren. Dieser Schritt ist jedoch notwendig, da dadurch eine Depletion der T-Zellen stattfindet, die wichtig ist, um eine xenogene GvHD nach Transplantation zu verhindern. Ein weitere Herausforderung ist die Tatsache, dass die Anreicherung von CD34<sup>+</sup> Zellen nur aus frischen Präparaten gelingt. Kryokonservierte Stammzellen können somit nicht für die Humanisierung verwendet werden.

### **Anwachsen einer humanen Hämatopoese - Einfluss verschiedener Parameter**

Mit der Entwicklung der NSG Maus im Jahr 2002 konnten SHULTZ *et. al.* die Entwicklung einer humanen Hämatopoese und eines funktionellen humanen Immunsystems durch Transplantation von adulten PBSCs in diesen Mäusen zeigen. Die Zellen wurden von gesunden Spendern gewonnen, die zuvor mit G-CSF mobilisiert wurden. Anschließend wurden die Zellen über den CD34 Marker mit einer Reinheit von > 90 % isoliert. 24 h vor der Applikation von  $7 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup> PBSCs wurden die Tiere bestrahlt. 10 Wochen nach Transplantation konnten im Knochenmark etwa 35 % CD45<sup>+</sup> humane Zellen detektiert werden. In der Milz waren es sogar > 50 %. Sowohl im Knochenmark wie auch in der Milz war ein Großteil dieser Zellen positiv für den B-Zellmarker CD19. Darüber hinaus konnten im Knochenmark CD56<sup>+</sup> NK Zellen, sowie CD14<sup>+</sup> Monozyten und pDCs gefunden werden.

Die während dieser Arbeit mit  $1-5 \times 10^6$  CD34<sup>+</sup> PBSC humanisierten Tiere zeigten, ab Woche 12 nach Transplantation, vergleichbare Werte mit 35 % CD45<sup>+</sup> humaner Zellen im Knochenmark, jedoch weniger in der Milz (15 %, s. Abb. 3). Auch hier war der Großteil der Zellen positiv für CD19 (B-Zellen) und es konnten ebenfalls humane CD14<sup>+</sup> Monozyten, pDCs und cDCs in vergleichbaren Mengen nachgewiesen werden (s. Abb. 4). SHULTZ *et. al.* fanden zusätzlich CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und im Thymus der Tiere. In unseren Tieren konnten humane T-Zellen frühestens in Woche 24 nach Transplantation im Knochenmark und der Milz nachgewiesen werden (s. Abb. 7). Untersuchungen des Thymus waren nicht möglich, da NSG Mäuse aufgrund ihrer Immunsuppression keinen Thymus ausbilden. Alle anderen humanen Zellpopulationen, wie B-Zellen, CD14<sup>+</sup> Monozyten und DC Subpopulationen konnten ab Woche sechs nach Transplantation detektiert werden (s. Abb. 7 und 8). In dieser Arbeit konnten in keinem Modell vor Woche



24 nach Transplantation humane T Zellen detektiert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass SHULTZ *et. al.* neugeborene, bzw. sehr junge Tiere humanisiert hatten, da in solchen Modellen schon zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation eine komplette humane Hämatopoese beobachtet werden kann (DRAKE *et. al.*). Zusätzlich muss der sog. Dramatyp der Tiere miteinbezogen werden. Im Jahr 1959 erweiterten RUSSELL UND BURCH das Modell des Phänotyps um den des Dramatyps. Dieser stellt die Reaktion der Tiere auf die unmittelbare Umgebung, sprich Temperatur, Luftfeuchtigkeit, Nahrung und Tierpflegepersonal, dar. Um repräsentative Ergebnisse zu erzielen, muss der Dramatyp bekannt sein und, wenn möglich, gleich gehalten werden. Oft ist es jedoch der Fall, dass sich der Dramatyp von Labor zu Labor unterscheidet, wodurch unterschiedliche Ergebnisse beobachtet werden können, obwohl Zellen aus vergleichbaren Quellen und der gleiche Mausstamm verwendet wurden. Zusätzlich scheint die Rekonstitutionskinetik spenderabhängig zu sein, da humane Zellen in Modellen mit unterschiedlichen Spendern zu gleichen Zeitpunkten verschiedene Rekonstitutionsraten zeigten.

In den 14 etablierten Modellen wurden Stammzellen mit unterschiedlicher Reinheit verwendet (s. Tabelle 5). Somit stellte sich die Frage, ob die angewachsenen humanen Zellen tatsächlich aus der Entwicklung einer neuen Hämatopoese oder aus der Expansion von Spenderzellen stammen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht für jede Zellpopulation beantwortet werden. Um dies zu überprüfen, würde sich eine Färbung mit BrdU, oder anderen Proliferationsmarkern anbieten. Speziell für einzelne Subpopulationen kann gegen Marker gefärbt werden, die im Laufe der Entwicklung herunterreguliert werden und somit auf ausgereiften Zellen nicht oder reduziert vorhanden sein sollten. Dies wurde bei den Färbungen für diverse DC Subpopulation gemacht. Hier konnten DC-Vorläufer aus dem myeloiden Kompartiment identifiziert werden. Hinsichtlich der T-Zellen würde es sich in zukünftigen Modellen anbieten, zusätzlich gegen Marker wie CD45RA und CD45RO zu färben, um naive bzw. *memory* T Zellen voneinander zu unterscheiden.

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Rekonstitution von humanen DCs und der Charakterisierung der einzelnen Subpopulationen. Die Differenzierung von humanen HSCs in Subpopulationen der mDCs und pDCs wurde in den letzten Jahren detailliert in *in vitro* Ansätzen erforscht (CAUX *et. al.*, SALLUSTO *et. al.*, BLOM *et. al.*). So konnten diverse Kultivierungsbedingungen für die Generierung von mDCs bestimmt und die Differenzierung von humanen CD34<sup>+</sup> Zellen zu pDCs genauer untersucht werden. In welchem Maß diese Erkenntnisse die DC Entwicklung im Menschen widerspiegeln, ist noch unklar. *In vivo* Studien zeigten im Jahr 2003 ein erfolgreiches Anwachsen von humanen DC Subpopulationen in NOD-*scid* Mäusen unter Verwendung von adulten PBSCs (PALUCKA *et. al.*). Zwei Jahre darauf konnten CRAVENS *et. al.* verschiedene Entwicklungsstufen von DCs, besonders der myeloiden DC Vorläufer, in NOD-*scid* Mäusen aufzeigen. Sechs bis acht Wochen alte Mäuse wurden mit Stammzellen aus Nabelschnurblut humanisiert und zwölf Wochen nach Transplantation untersucht. Hierbei konnte die Entwicklung von CD14<sup>+</sup> Monozyten aus dem myeloiden Kompartiment beobachtet werden, wohingegen keine Zellen aus dem CD33<sup>-</sup>CD34<sup>-</sup> bzw. dem CD33<sup>-</sup>CD34<sup>+</sup> Kompartiment stammten. Diese Zellentwicklung entspricht der Entwicklung von DC-Vorläuferzellen in humanem peripheren Blut, dem Nabelschnurblut und fötalem Knochenmark (OLWEUS *et. al.*, THOMAS *et. al.*, CAUX *et. al.*). Im Großteil der während dieser Arbeit etablierten Modelle

konnten diese Ergebnisse bestätigt werden. Auch in den mit CD34<sup>+</sup> PBSC humanisierten NSG Mäusen konnten CD33<sup>+</sup>CD14<sup>+</sup> Zellen gefunden werden. Darüber hinaus konnten, wie schon von CRAVENS *et. al.* beschrieben, in allen Modellen CD123<sup>+</sup> pDCs im Knochenmark und der Milz detektiert werden. In der neuesten Arbeit von TANAKA *et. al.* wurden neugeborene NSG Mäuse mit Stammzellen aus Nabelschnurblut humanisiert und entwickelten humane, funktionelle myeloide Zellen in diversen Organen. Unter der Population der angewachsenen APCs wurden CD14<sup>+</sup> Monozyten und cDCs, positiv für BDCA 1/3, sowie pDCs, positiv für BDCA2 gefunden. Diese Zellen zeigten Antworten auf die zusätzliche Gabe von humanen Zytokinen *in vitro* und *in vivo*, sowie inflammatorische Antworten auf TLR *signaling*. Die Ko-Färbungen mit BDCA Markern stehen in unserem Modell noch aus, die Färbung ist jedoch schon etabliert. Desweiteren konnten bereits BDCA1<sup>+</sup> und BDCA2<sup>+</sup> Zellen aus dem Knochenmark von Modell S 11.2 isoliert werden. Diese Zellen wurden jedoch noch nicht auf ihre Funktionalität hin untersucht. Dafür muss zunächst die *ex vivo* Isolation dieser Zellen, besonders von BDCA2<sup>+</sup> Zellen, optimiert werden, um eine ausreichende Zellmenge zu erhalten.

Vergleicht man die Rekonstitutionsraten von DC Subpopulationen in verschiedenen Organen mit Daten aus dem humanen System, ist eine vergleichbare Verteilung zu beobachten. Der Großteil der pDCs konnte im Knochenmark der humanisierten Tiere gefunden werden, wohingegen das periphere Blut nur wenig humane pDCs aufwies. Ob diese Verteilung im humanisierten Mausmodell auf ein verändertes Migrationsverhalten der Zellen im *steady state* zurückzuführen oder ob das Knochenmark tatsächlich das Hauptreservoir dieser Zellen darstellt, ist bisher nicht geklärt und bedarf weiterer Untersuchungen. EGNER *et. al.* konnten bereits 1995 eine Population von allostimulatorischen mononukleären Zellen im Knochenmark gesunder Spender beschreiben, die negativ für *lineage* Marker (CD3, CD8, CD14, CD16, Cd19, CD56) waren und DC Morphologie aufwiesen. Besonders in Bezug auf DC-Populationen bietet sich das während dieser Arbeit etablierte Mausmodell in Zukunft auch für Mobilisierungs- und Migrationsstudien an.

Neben der Rekonstitution humaner DCs in peripheren Organen, war auch die mögliche Besiedelung muriner Dermis und Epidermis mit humanen Zellen von Interesse. Hier lag der Fokus auf den CD207/Langerin<sup>+</sup> LCs. Bisher gibt es nur wenige Studien hinsichtlich der Rekonstitution humaner LC in muriner Epidermis nach Transplantation von humanen PBSCs. Im Jahr 2003 fanden PALUCKA *et. al.* nach Transplantation von humanen CD34<sup>+</sup> PBSCs in NOD-*scid* Mäuse humane unreife LCs in der murinen Haut. Diese LCs waren positiv für humanes HLA-DR, CD11c und CD207/Langerin. Anders als bei PALUCKA *et. al.* wurden die Proben von Modell S 09.1 und Ü 10.1 mittels IHC auf humane Marker in der Dermis und Epidermis untersucht. Hier konnten ab Woche vier nach Transplantation humane LCs in der murinen Dermis beobachtet werden (s. Abb. 19). Ab Woche sechs wurde die Migration in die murine Epidermis sichtbar. Dort konnten humane LCs bis in Woche 32 nach Transplantation detektiert werden. In fünf von 14 Modellen konnten humane LCs in der murinen Epidermis nachgewiesen werden. In den Modellen V 10.1, Ü 10.1 und Ü 11.2 wurden neben Hautproben vom Rücken auch Proben der Bauchregion und Ohr auf humane Zellen gefärbt. Hier konnte explizit kein Unterschied in der LC-Dichte hinsichtlich der Region beobachtet werden, wie THOMAS *et. al.* bereits 1984 beim Menschen zeigen konnte. Während dieser Arbeit war es

nicht mögliche, Faktoren zu identifizieren, die ein kontinuierliches Anwachsen humaner LC in muriner Haut gewährleisten. Es scheint unerheblich zu sein, ob die Stammzellen von Patienten oder von gesunden Spender stammen, ob die Zellen frisch oder aufgetaut appliziert und welche Dosis an Zellen appliziert wurden. Die in dieser Arbeit getesteten Zytokine zeigten ebenfalls keinen Einfluss auf die LCs.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode der IHC zum Nachweis der humanen LC waren keine Ko-Färbungen von CD1a und CD207/Langerin möglich. Zudem konnten aufgrund der in Paraffinblöcken liegenden Proben nur einzelne Ebenen angeschnitten und gefärbt werden. Da vermutet wird, dass sich LCs in Form von Clustern in sog. *lipid rafts* anreichern, würde sich eine Färbung des kompletten Transplantants, d.h. Epidermis und Dermis, anbieten. Dies wäre mittels Immunfluoreszenzfärbungen möglich, die gleichzeitig auch Ko-Färbungen erlauben würden. Hierfür müssten die Proben jedoch anders aufgearbeitet werden. Bei einigen Modellen wurden neben IHC Proben auch *epidermal sheets* der murinen Epidermis angefertigt. Hier bedarf es jedoch weiterer Optimierungen der Methodik. Als Vorteil der IHC ist zu nennen, dass Dermis und Epidermis gleichzeitig gefärbt und somit auch Verläufe der LC-Rekonstitution innerhalb verschiedener Hautbereiche untersucht werden können.

Für die Applikation der humanen HSC wurde die intravenöse Applikation gewählt, da sich dieses Route bei Tieren dieses Alters am ehesten anbietet und ein verbessertes Anwachsen der humanen Stammzellen im Vergleich zur intraperitonealen Applikation beobachtet werden konnte (SHULTZ *et. al.*). Durch die direkte intrafemorale und intratibiale Applikation oder *in utero* Gabe, ließ sich das Anwachsen, zumindest in NOD-*scid* Mäusen, von humanen Stammzellen noch weiter optimieren (MAZURIER *et. al.*, WANG *et. al.*, SCHOEBERLEIN *et. al.*). Der grundlegende Gedanke dabei ist, dass das *homing* der Stammzellen umgangen wird und diese direkt in eine entwicklungsfördernde Umgebung platziert werden. Diese Applikationswege wurden bisher nur in NOD-*scid* Mäusen getestet, Studien hinsichtlich der NSG Maus stehen noch aus. Bei neugeborenen Mäusen scheint die intrakardiale oder intrahepatische Gabe die erfolgsversprechendste zu sein, allerdings fehlen dafür vergleichende Studien.

Für diese Arbeit wurden ausschließlich weibliche NSG Mäuse verwendet, da diese ein effizienteres Anwachsen humaner Zellen zeigen als männliche Tiere (MCDERMOTT *et. al.*). Zum Zeitpunkt der Humanisierung hatten die Tiere ein Alter von sechs bis zehn Wochen. Diverse Arbeiten konnten zeigen, dass die Humanisierung von neugeborenen Mäusen die größte Effizienz zeigte. Da dies jedoch weitere rechtliche Zulassungen erfordert, die während dieser Arbeit nicht vorlagen, wurden bisher Mäuse mit fünf Wochen oder älter verwendet. Für einige Fragestellungen innerhalb dieses Modells ist die Verwendung von neugeborenen Mäusen angedacht.

Die Wahl des Mausstammes, der Stammzellquelle, des Alters und Geschlechts der Mäuse und die Art der Applikation hängt sehr stark von der Fragestellung ab. So scheint bei der Gabe von großen Mengen an Stammzellen das Geschlecht der Mäuse keinen Einfluss mehr auf die Humanisierungseffizienz zu haben. Des weiteren zeigt die neueste Arbeit von GILLE *et. al.*, dass die Entwicklung und Differenzierung von humanen Monozyten in neu-

geborenen Mäusen, transplantiert mit Zellen aus Nabelschnurblut, verzögert ist. Darüber hinaus wiesen sie einen unreifen Phänotyp auf und zeigten funktionelle Einschränkungen. Nach Transplantation von adulten PBSC in adulte NSG Mäuse hingegen zeigten Monozyten zum gleichen Zeitpunkt nach Transplantation einen ausgereiften Phänotyp mit allen funktionellen Eigenschaften.

Zum Schluss stellte sich die Frage, ob man frisches oder eingefrorenes Material für die Humanisierung verwendet. Bei der Verwendung von frischem Material stehen einem mehr Zellen zur Verfügung und die Zellen sind keinem zusätzlichen Stress, wie Einfrieren und Auftauen, ausgesetzt. Allerdings ist es aus organisatorischen Gründen nicht immer möglich, frisches Material zu verwenden und man muss auf eingefrorene Zellen zurück greifen.

### **Einfluss der verabreichten Zelldosis auf den Humanisierungserfolg**

Ob die Verwendung von eingefrorenen Zellen zu einem Nachteil hinsichtlich der Rekonstitution humaner Zellen führt, sollte im Laufe dieser Arbeit geklärt werden. Hierfür wurden frische und gefrorene CD34<sup>+</sup> PBSC von einem Spender verwendet. Im gleichen Ansatz sollte geklärt werden, ob die Dosis der applizierten Stammzellen Einfluss auf die Rekonstitutionsrate hat. Dafür wurden je 12 Mäuse mit drei verschiedenen Konzentrationen an frischen CD34<sup>+</sup> PBSC humanisiert. Analog dazu bekamen 12 weitere Mäuse die gleichen Dosen an gefrorenen CD34<sup>+</sup> PBS appliziert. 12 Wochen nach Transplantation wurden die Milz und das Knochenmark mittels Durchflusszytometrie untersucht. In allen analysierten Tieren konnte eine humane Hämatopoese nachgewiesen werden. Es wurde deutlich, dass bei der Gabe von frischen CD34<sup>+</sup> PBSC das Anwachsen von humanen CD45<sup>+</sup> Zellen mit der Transplantation von höheren Zelldosen korrelierte (s. Abb. 9). Betrachtet man im Vergleich dazu die Zellzahlen der Tiere, die mit eingefrorenen Zellen humanisiert wurden (s. Abb. 11), war kein Unterschied zwischen den einzelnen Dosen zu beobachten. Mehr noch, die Gabe von  $1 \times 10^6$  eingefrorenen CD34<sup>+</sup> PBSC führte zu einer vergleichbaren Rekonstitution wie die Applikation von  $2 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  frischer CD34<sup>+</sup> PBSCs. Somit war die Humanisierung mit gefrorenen Stammzellen effektiver.

Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass im Pool der CD34<sup>+</sup> Zellen die Stammzellen zwar einen Großteil der Zellen darstellen, es jedoch auch noch andere mesenchymale Zellen, wie Endothelzellen, gibt, die diesen Marker exprimieren. Durch die Kryokonservierung der CD34<sup>+</sup> Zellen scheint eine Selektion der Stammzellen und gleichzeitig der vitalen und potenten Zellen stattzufinden. Die in dieser Arbeit verwendeten PBSC wurden zunächst aus einem Leukapherasat mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert und anschließend mittels magnetischer Beads auf CD34 selektioniert. Im Laufe dieser Prozesse waren die Zellen diversen Stressfaktoren wie Temperaturwechsel und physikalischen Kräften ausgesetzt, welche dazu führten, dass den Mäusen eine heterogene Zellpopulation unterschiedlicher Vitalität verabreicht wurde. Um die Vitalität von Stammzellen zu bestimmen bieten sich durchflusszytometrische Untersuchungen, wie Apoptosefärbungen an, die in Kombination mit der Bestimmung der Reinheit durchgeführt werden könnten. Je mehr Zellen verabreicht wurden, umso mehr humane CD45<sup>+</sup> Zellen konnten nachgewiesen werden. Dies wurde besonders deutlich bei der Applikation von frischen  $2 \times 10^6$

Zellen im Vergleich zu  $1 \times 10^6$ . Die Gabe von frischen  $5 \times 10^6$  Zellen führte jedoch zu keinem weiteren Anstieg humaner  $CD45^+$  Zellen.

Betrachtet man die einzelnen Subpopulationen (s. Abb. 10, Abb. 12) hinsichtlich der verabreichten Zellzahlen von frischen und eingefrorenen PBSC wird deutlich, dass die Applikation von unterschiedlichen Zelldosen keinen Einfluss auf deren Rekonstitution hat. Im Fall der frischen  $CD34^+$  PBSCs scheint somit die Applikation von erhöhten Zelldosen zu einem vermehrten Anwachsen von humanen  $CD45^+$  Zellen zu führen; für das Anwachsen einzelner Subpopulation hingegen ist die verabreichte Zellmenge nicht relevant. Bei der Applikation von gefrorenen  $CD34^+$  PBSCs konnte kein Unterschied hinsichtlich der Rekonstitutionsrate humaner  $CD45^+$  Zellen zwischen den einzelnen Zelldosen beobachtet werden. Interessanterweise führte die Gabe von  $1 \times 10^6$   $CD34^+$  PBSCs zu einer vergleichbaren Rekonstitution wie mit frischen  $2 \times 10^6$   $CD34^+$  PBSCs oder mehr.

In den für diese Arbeit etablierten Modellen waren starke Schwankungen hinsichtlich der Rekonstitutionsraten zu erkennen. Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Betrachtet man die Rekonstitution anhand der humanen  $CD45^+$  Zellen im Knochenmark (s. Abb. 6) wird deutlich, dass im zeitlichen Verlauf die Prozentzahl an positiven Zellen stieg. Dies ist primär auf die zunehmende Erfahrung hinsichtlich der Handhabung der Proben zurückzuführen. Die Aufreinigung der  $CD34^+$  PBSCs fand zügiger statt, wodurch die Zellen weniger Stress ausgesetzt waren. Darüber hinaus konnten immer bessere Reinheiten erzielt werden. Auch das Applizieren der Zellen wurde routinierter, wodurch mehr Zellen in den Organismus gelangten, als vielleicht noch bei den ersten Modellen. Dennoch gab es immer wieder Modelle mit schlechten Rekonstitutionsraten. Zum einen lag dies an der Qualität der Stammzellen. Teilweise wurden autologe Stammzellen von Patienten verwendet, bei denen nicht klar war, in wie weit die Zellen durch Vorbehandlungen schon geschädigt, bzw. gestresst waren. Allerdings konnte man auch Schwankungen zwischen zwei Modellen des gleichen Spenders beobachten. In diesen Fällen liegt die Vermutung nahe, dass die Mäuse unterschiedlich auf die Rekonstitution reagiert hatten. Zum einen war es nicht möglich, exakt gleich alte Mäuse zu verwenden und zum anderen können sich die Tiere innerhalb und zwischen den Zuchtgenerationen hinsichtlich ihrer Vitalität und der vorhandenen Immunsuppression unterscheiden.

Um nicht vermeidbare Variabilitäten in Humanisierungsmodellen zu kompensieren und auch um eine zuverlässige und effektive Rekonstitution von humanen Zellen gewährleisten zu können, wurden bereits verschiedene Optimierungsmöglichkeiten getestet. Zum einen wurde das Anwachsen, die Differenzierung und die Funktion der humanen Zellen durch diverse Supplementationen unterstützt, zum anderen gab es Ansätze, in denen das noch vorhandene natürliche Immunsystem der Mäuse depletiert wurde, um somit das Anwachsen humaner Zellen und Gewebe zu erleichtern. Die Art der Optimierung richtet sich nach der Fragestellung, für die das Mausmodell verwendet werden soll. In dieser Arbeit wurden zunächst die beiden Zytokine IL 7 und Flt3L hinsichtlich ihres Einflusses auf das Anwachsen humaner DCs untersucht.

## **Einfluss von Interleukin 7 und Flt3L auf die Humanisierung**

### **IL7**

IL-7 gehört zu der Gruppe der Interleukine, die zu den Peptidhormonen zählen. Ihre Aufgabe ist die Vermittlung zwischen Leukozyten. IL-7 wird primär von Stromazellen des lymphoiden Gewebes wie dem Thymus, der Milz, dem Knochenmark und der Lymphknoten, jedoch nicht von hämatopoetischen Zellen produziert (JIANG *et. al.*). Im Gegensatz dazu ist die Expression des IL-7 Rezeptor Komplexes, die IL-7R $\alpha$  und  $\gamma$  Kette, auf hämatopoetischen Zelllinien restringiert. Dazu zählen u.a. lymphoide Vorläuferzellen, ausgereifte T-Zellen und Makrophagen (MAZZUCHELLI *et. al.*, BLOM *et. al.*). IL-7 spielt eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von Lymphozyten und ist ein Modulator der T-Zell Homeostase (LUNDSTRÖM *et. al.*).

In IL-7 depletierten Mäusen fand man einen starken Rückgang von T- und B-Vorläuferzellen (VON FREEDEN-JEFFRY *et. al.*). Darüber hinaus waren diese Zellen in ihrer weiteren Entwicklung und Differenzierung beeinträchtigt. Ein ähnliches Bild zeigte sich in Mäusen, die die IL-7R $\alpha$  Rezeptorkette nicht mehr exprimierten (MAKI *et. al.*). Im humanen System führen Mutationen der IL-7R $\alpha$  Kette zu Funktionsverlusten und Betroffene leiden an dem *syndrome of severe combined immunodeficiency* (SCID), welches charakterisiert ist durch Infektionen mit opportunistischen Keimen, Diarrhöe und Wachstumsstörungen (BUCKLEY *et. al.*). Ohne Behandlung führt diese Erkrankung zum Tod. Aufgrund der Rolle von IL-7 für die Entwicklung des lymphoiden Kompartiments, ist es eine attraktiver Ansatzpunkt für immunbasierende Therapien und für die Modulierung von Immundefiziten.

Die ersten Modelle dieser Arbeit wurden ebenfalls mit der zusätzlichen Applikation von IL-7 durchgeführt. Dass IL-7 im humanisierten Mausmodell das Anwachsen von humanen T-Zellen fördern und beschleunigen kann, konnten bereits SHULTZ *et. al.* zeigen. Inwieweit die exogene Gabe von IL-7 die Rekonstitution humaner DCs beeinflusst, wurde in Modell V 10.1 untersucht. Wie schon SHULTZ *et. al.* in humanisierten NSG Mäusen zeigen konnte, gab es keine Zunahme der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen durch die Applikation von IL-7 (s. Abb. 13). Betrachtet man die Population der CD45<sup>+</sup> Zellen, zwölf Wochen nach Transplantation, konnten in Knochenmark und Milz neben CD14<sup>+</sup> Monozyten und DC Populationen primär humane B-Zellen detektiert werden (s. Abb. 14). Die Applikation von IL-7 zeigte jedoch keinerlei Wirkung auf die Rekonstitutionsraten der humanen DCs. Somit kann IL-7 alleine als supplementierender Faktor ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von SHULTZ *et. al.* konnten keine humane T-Zellen in den untersuchten Organen gefunden werden. Wurden zusätzlich 20  $\mu$ g Fc-IL7 den Tieren appliziert, führte dies in der Arbeit von SHULTZ *et. al.* zu einer Zunahme der T-Zellen von ca. 70 %. Im Laufe dieser Arbeit konnten T-Zellen nicht vor Woche 18 nach Transplantation detektiert werden und die Ergebnisse von Modell V 10.1 zwölf Wochen nach Transplantation zeigen, dass die Applikation von IL-7 zu keiner Beschleunigung dieser Kinetik führt. Ähnliche Beobachtungen machten ANDRÉ *et. al.* im Jahr 2010. Hier konnten humane T-Zellen ebenfalls erst ab Woche 20 nach Transplantation in den Mäusen detektiert werden.

**Flt3L**

Flt3 (CD135) gehört zu der Familie der Typ III Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK, AGNES *et. al.*), welche ebenfalls die PDGF (*platelet-derived growth factor*) Rezeptoren beinhalten. Die Aktivierung findet über den Flt3 Liganden (Flt3L) statt (LYMAN *et. al.*). Im Menschen wird Flt3 auf CD34<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark (SMALL *et. al.*) und auf CD34-exprimierenden Zellen im Thymus, der Milz und den Lymphknoten exprimiert (ROSNET *et. al.*). Der Ligand (Flt3L) zeigt ein weites Expressionsmuster im Menschen (HANNUM *et. al.*). Man findet ihn auf verschiedenen Zellen des hämatopoetischen Systems, aber auch auf Zellen der Plazenta, Lunge, Milz, Leber, Niere und des Pankreas. Die primäre Expression des Flt3 auf CD34<sup>+</sup> Zellen führte zu der Vermutung, dass Flt3L eine wichtige Rolle in der Regulation der frühen Hämatopoese besitzt. Es konnte gezeigt werden, dass der Ligand, vergleichbar zu SCF und M-CSF, die Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung von frühen murinen und humanen hämatopoetischen Vorläuferzellen stimulieren kann (BRASEL *et. al.*, LYMAN *et. al.*, VEIBY *et. al.*). Darüber hinaus konnte im *Colony-forming assay* die Bildung von hämatopoetischen Kolonien durch antisense RNA inhibiert werden (SMALL *et. al.*). Somit stellt Flt3L einen Faktor dar, welcher auch in dem in dieser Arbeit verwendeten Modell einen positiven Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Mobilisierung von DCs haben kann.

Im murinen System konnte in Flt3L-KO Mäusen ein vermindertes Wachstum von pDCs in der Milz beobachtet werden (BRAWAND *et. al.*). In der gleichen Arbeit führte die Kultivierung von isoliertem murinen Knochenmark unter der zusätzlichen Gabe von Flt3L zur Ausdifferenzierung in verschiedene DC Subpopulationen. Wurde Flt3L *in vivo* verabreicht, konnten vermehrt murine pDCs in der Milz beobachtet werden (BJÖRCK *et. al.*). In anderen Arbeiten stieg der Anteil der HLA DR-, CD11c- und DEC 205-exprimierenden Zellen in Milz, Lymphknoten und peripherem Blut (MARASKOVSKY *et. al.*). DIEHL *et. al.* konnten in einer neueren Arbeit zusätzlich zeigen, dass bei der Kultivierung von murinem Knochenmark mit SCF und Flt3L nicht nur eine Expansion der Zellen stattfand, sondern diese auch ihre Fähigkeit zum *homing* und zur Selbsterneuerung behielten. Bei der Verwendung von anderen Zytokincocktails war dies nicht der Fall.

Hinsichtlich eines Effekts von Flt3L im humanen System konnten im Jahr 2000 verschiedene Gruppen zeigen, dass zum einen im peripheren Blut und im Knochenmark der Probanden, die Flt3L verabreicht bekamen, der Anteil der CD11c<sup>+</sup> DCs, der pDCs und der CD14<sup>+</sup> Monozyten deutlich stieg und zum anderen diese DCs auch in der Lage waren, T-Zellen zu stimulieren (MARASKOVSKY *et. al.*, PULENDRAN *et. al.*, CHKLOVSKAIA *et. al.*). Neben *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* Versuchen im murinen und humanen System wurden ebenfalls bereits Untersuchungen im humanisierten Mausmodell hinsichtlich der Bedeutung von Flt3L auf die Entwicklung und Differenzierung von humanen CD34<sup>+</sup> PB-SCs durchgeführt. Für das in dieser Arbeit etablierte humanisierte Mausmodell stellte sich ebenfalls die Frage, ob die Applikation von Flt3L zu einer Zunahme der humanen hämatopoetischen Zellen, besonders des myeloiden Kompartiments, führen würde.

Bei einer konstanten Gabe von 20 µg humanem Flt3L alle 72 h (Modell Y 10.1) sah man zwölf Wochen nach Transplantation einen Rückgang der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark im Vergleich zu den Kontrolltieren (s. Abb. 15).

Bereits im Jahr 1998 konnte in humanisierten NOD-*scid* Mäusen ein Effekt von Flt3L auf lymphoide und myeloide humane Zellen nachgewiesen werden (KAPP *et. al.*). Hier konnte ebenfalls eine Abnahme der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark von Flt3L-behandelten Mäusen beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine Abnahme von Lymphozyten in den Flt3L-behandelten Gruppen beobachtet. Im Gegenzug dazu, stieg der Anteil des myeloiden Kompartments deutlich. Dies konnte auch in dieser Arbeit beobachtet werden. Der Anteil der CD14<sup>+</sup> Monozyten stieg im Knochenmark (s. Abb. 16), ebenso nahmen die CD11c<sup>+</sup> DCs (cDCs) zu. Wie schon im murine System zu beobachten war (BJÖRCK *et. al.*), stieg in Modell Y 10.1 der Prozentsatz der humanen pDCs in der Milz im Vergleich zu den Kontrolltieren. Hinsichtlich der Entwicklung von Lymphozyten konnten keine Aussagen getroffen werden, da in diesem Modell humane T-Zellen nicht vor Woche 18 nach Transplantation vorhanden waren. In Bezug auf die humanen B-Zellen zeigte sich eine drastische Abnahme in der Flt3L-behandelten Gruppe (s. Abb. 16).

Da bekannt ist, dass Flt3L eher im frühen Stadium der hämatopoetischen Entwicklung wirkt, wurde in dieser Arbeit die Rolle des Zeitpunkt der Flt3L Applikation nach Rekonstitution genauer untersucht. Hierfür wurden Mäusen jeweils ab Woche sieben und elf nach Transplantation humanes Flt3L bis zum Endes des Versuchs in Woche zwölf verabreicht (Modell S 11.2). Auch hier wurde ein Rückgang der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark und in der Milz beobachtet, allerdings nur in der Gruppe, die Flt3L zum frühen Zeitpunkt nach Transplantation (Woche sieben) erhielt (s. Abb. 17). Auch in diesem Modell konnten keine humanen T-Zellen nachgewiesen werden. Wurde das Flt3L erst ab Woche elf nach Transplantation gegeben, konnte in der Milz keine Veränderung hinsichtlich der Rekonstitutionsraten diverser Zellpopulationen beobachtet werden (s. Abb. 18, B). Auch die Applikation ab Woche sieben nach Transplantation zeigten keine unterstützenden Effekt, lediglich der Anteil der humanen B-Zellen war erneut deutlich niedriger. Anders sah es im Knochenmark aus (s. Abb. 18, A). Hier führte das Flt3L zum frühen Zeitpunkt nach Transplantation zu einem deutlichen Anstieg der humanen cDCs und pDCs. Gleichzeitig konnte eine verminderte B-Zellzahl in dieser Gruppe beobachtet werden. Die Gabe von Flt3L ab Woche elf nach Transplantation führte, schon wie in der Milz, zu keinen deutlichen positiven oder negativen Effekten.

B-Zellen umfassen die Hauptpopulation in rekonstituierten Mäusen. Dies konnte in diversen Mausmodellen bereits gezeigt (HOGAN *et. al.*, PFLUMIO *et. al.*) und in allen Modellen dieser Arbeit bestätigt werden.

Die Behandlung der Tiere mit Flt3L führte zu einem deutlichen Rückgang der CD19<sup>+</sup> Zellen, sowohl im Knochenmark wie auch in der Milz. Ähnliche Beobachtungen machten bereits KAPP *et. al.* 1998 in humanisierten NOD-*scid* Mäusen. Besonders deutlich war hier der Effekt hinsichtlich der CD19<sup>+</sup> CD20<sup>+</sup> Vorläufer B-Zellen. Dass Flt3L primär auf Vorläuferzellen der B-Zellen wirkt, konnte auch im murinen Modell beschrieben werden (CEREDIG *et. al.*). Es ist bekannt, dass die Expression des Rezeptors Flt3 im Laufe der B-Zellentwicklung stufenweise abnimmt (ROSNET *et. al.*, LYMAN *et. al.*). Diese Tatsache erklärt, warum in den Modellen dieser Arbeit nur bei Gabe zum frühen Zeitpunkt (Woche 0 bzw. Woche 7) nach Transplantation ein Rückgang der humanen B-Zellen zu beobachten war.

Dass es bei der zusätzlicher Gabe von Flt3L überhaupt zu einem Rückgang von hu-



manen B-Zellen kam, war überraschend. Bisher konnte in Flt3L-KO Mäusen eine Depletion von murinen B-Zellen beobachtet werden (MACKAREHTSCHIAN *et. al.*) und *in vitro* Kulturen mit Flt3L zeigten ein gesteigertes Wachstum des lymphoiden Kompartments (HUNTE *et. al.*). Wurden Stromazellen zu den Kulturen gegeben, konnte dieser Effekt noch gesteigert werden, was darauf hindeutet, dass die B-Lymphopoese noch weitere Faktoren benötigt, die im humanisierten Mausmodell nicht gegeben sind. In zukünftigen Modellen mit zusätzlicher Applikation von humanem Flt3L könnte man zusätzlich gegen diverse Marker für B-Vorläuferzellen färben. Hier bieten sich Färbungen gegen Aktivierungsmarker wie CD20 und CD23, sowie gegen lymphoide Vorläufer über CD10 an. Dadurch könnte man den Effekt von Flt3L auf diverse Vorläuferstufen detaillierter untersuchen.

In Bezug auf die Rekonstitution humaner DCs und CD14<sup>+</sup> Monozyten konnte bei zusätzlicher Gabe von humanem Flt3L eine Zunahme im Knochenmark und in der Milz beobachtet werden. In Modell S 11.2 war dies nur im Knochenmark der Fall. Es scheint demnach auch Spenderabhängig zu sein, wie weit Flt3L auf diese Zellen wirkt. Darüber hinaus scheint der Zeitpunkt der Flt3L Applikation entscheidend zu sein. Wurde Flt3L direkt nach Transplantation verabreicht (s. Abb. 16), konnte zwar eine Zunahme der Monozyten und DC Populationen beobachtet werden, jedoch war der Effekt deutlicher bei der Gabe von Flt3L ab Woche sieben nach Transplantation (s. Abb. 18). Hier war fast eine Verdopplung einzelner Populationen zu beobachten. Das Flt3L auch auf die Entwicklung von myeloiden Zellen wirkt, konnten neben KAPP *et. al.* ebenfalls CHEN *et. al.* im Jahr 2009 in einem humanisierten Modell zeigen. Hier führte die hydrodynamische Gabe von DNA Vektoren, die diverse Zytokine exprimierten, zu einer Erhöhung myeloider Zellen im Blut, der Milz, Leber und dem Knochenmark.

Es scheint, dass den immundefizienten Mäusen doch humane, bzw. krossreaktive murine Zytokine, Wachstumsfaktoren und Hormone fehlen, die für das Anwachsen, Überleben, die Differenzierung und Funktion humaner Zellen benötigt werden.

Das humanisierte Mausmodell konnte somit soweit etabliert werden, das ein reproduzierbares Anwachsen von humanen hämatopoetischen Zellen in den NSG Mäusen gewährleistet werden kann. Darüber hinaus zeigen diese Zellen einen zum humanen System vergleichbaren Phänotyp. Ein weiterer entscheidender Faktor für die weitere Nutzung dieses humanisierten Mausmodells ist die Funktionalität der angewachsenen Zellen. Hierzu wurden bisher keine *ex vivo* Untersuchungen durchgeführt.

### Funktionalität humaner DCs im Mausmodell

Untersuchungen hinsichtlich der Funktionalität *in vivo* haben den großen Vorteil, dass die Zellen keine Veränderungen, bzw. Stress erfahren, wie er durch die Isolation hervorgerufen werden kann. Dies kann sich unter Umständen auch auf die Funktion der Zellen auswirken und spiegelt somit nicht mehr die tatsächliche *in vivo* Situation wider.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Studien, wurden humanisierten Mäusen alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen appliziert. Somit sollte die Alloreaktivität dieser Zellen *in vivo* und gleichzeitig die Funktionalität der rekonstituierten APCs getestet werden. Beides

sollte durch den Rückgang der humanen Hämatopoese in den mit T-Zellen behandelten Tieren messbar gemacht werden. Zur Unterscheidung der Zellen des Stammzellspenders und des T-Zellspenders wurde zusätzlich gegen ein HLA-Allel gefärbt, dass zwischen den beiden Spendern nicht übereinstimmte (s. Abb. 22 und 27). Das die verwendeten CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vitro* ein alloreaktives Potential aufwiesen, konnte von Sebastian Klobuch in seiner Dissertation gezeigt werden.

Im ersten getesteten Modell (Modell S 11.1) konnten primär in der Milz Effekte der alloreaktiven T-Zellen beobachtet werden. Diese zeigte zu beiden Zeitpunkten einen deutlichen Rückgang der humanen CD45<sup>+</sup> Zellen (s. Abb. 23). Beobachtete man die einzelnen Zellpopulationen fiel auf, dass in Woche acht nach Transplantation nur die humanen B-Zellen sowohl im Knochenmark wie auch in der Milz reduziert waren (s. Abb. 24). CD14<sup>+</sup> Monozyten blieben unbeeinflusst, ebenso die CD11c<sup>+</sup> DCs zum frühen Zeitpunkt (s. Abb. 25 und 25). In Woche 14 nach Transplantation zeigten die humanen CD11c<sup>+</sup> DCs jedoch einen Rückgang in der Milz (s. Abb. 25). Da hier in der Kontrollgruppe jedoch nur Werte eines Tieres ausgewertet werden konnten, ist dieses Ergebnis nicht verwertbar. Hinsichtlich der pDCs zeigte sich ein ähnliches Bild wie für die CD11c<sup>+</sup> DCs (s. Abb. 26). Zum späten Zeitpunkt nach Transplantation war der Anteil der pDCs in den Tieren, die alloreaktive T-Zellen appliziert bekamen, reduziert. Auch hier war durch die geringen Mäusezahlen keine eindeutige Aussage möglich. Die *in vivo* Untersuchungen zeigen, dass in diesem Modell die CD19<sup>+</sup> B-Zellen das primäre Ziel der alloreaktiven T-Zellen zu sein schienen. Die Tatsache, dass zu einem späteren Zeitpunkt nach Transplantation ebenfalls CD11c<sup>+</sup> DCs und pDCs reduziert waren, spricht dafür, dass diese Zellen, trotz eines kompletten Phenotyps in Woche acht nach Transplantation, länger für ihre Reifung und Aktivierung benötigen.

Vergleicht man diese Daten mit den ersten Modellen (Modell S 09.1 und T 10.1) könnte die späte Rekonstitution von humanen T-Zellen dadurch erklärt werden, dass spenderabhängig erst ab Woche 14 bis 24 nach Transplantation ausreichend funktionelle autologe APCs vorhanden sind, um den neu gebildeten T-Zellen entsprechende Signale für eine Proliferation liefern zu können. Dass die zusätzlich transferierten alloreaktiven T-Zellen tatsächlich proliferierten und nicht nur einfach überlebt haben, konnte durch eine zusätzliche BrdU Färbung gezeigt werden (KLOBUCH). Um eine Xenoreaktivität auszuschließen, wurden *ex vivo* Milzzellen mit CD34<sup>+</sup> PBSC des Spenders stimuliert und zeigten eine spezifische IFN  $\gamma$  Freisetzung und somit auch eine Alloreaktivität.

Modell Z 12.1. führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Es konnte ebenfalls ein Rückgang humaner CD45<sup>+</sup> Zellen im Knochenmark und der Milz beobachtet werden (s. Abb. 28). Ebenso schienen die alloreaktiven T-Zellen primär die humanen CD19<sup>+</sup> B-Zellen zu depletieren (s. Abb. 29). Es zeigte sich jedoch zu keinem Zeitpunkt ein Effekt auf CD11c<sup>+</sup> DCs, CD14<sup>+</sup> Monozyten oder pDCs (s. Abb. 30 und 31). Dies verdeutlicht, dass diese Versuche stark spenderabhängig sind und eventuell ein anderer Versuchsaufbau gewählt werden muss. Zum einen müssen größere Tierzahlen pro Kohorte eingesetzt werden und zum anderen bietet sich eine längere Versuchsdauer an.

Da für diese Versuche große Mengen an PBMCs des Stammzellspenders benötigt und bei großen Tierzahlen ebenfalls viele CD34<sup>+</sup> PBSCs und alloreaktive T-Zellen benötigt werden, gestalten sich diese Versuche je nach Verfügbarkeit von Material nicht einfach.

Um dies zu umgehen, bestehen auch andere Möglichkeiten, die Funktionalität von humanen Zellen *in vivo* zu testen. Ein simples Modell zur Untersuchung hinsichtlich einer möglichen Aktivierung einer natürlichen Immunantwort durch DCs im humanisierten NOD-*scid* Modell zeigten CRAVENS *et. al.* im Jahr 2005. Hier führte die Gabe von LPS zur Produktion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-10, IL-1 $\beta$  und IFN- $\alpha$ . Darüber hinaus führte es zur Ausreifung und Aktivierung von myeloiden DCs. Dieser Ansatz wäre auch für das hier etablierte humanisierte NSG Mausmodell denkbar, besonders da bereits TANAKA *et. al.* in seiner neuesten Arbeit ebenfalls eine funktionierende Zytokinantwort in seinem humanisierten NSG Mausmodell zeigen konnten. Für *ex vivo* Untersuchungen der DCs bieten sich zusätzlich Phagozytose Assays und T-Zell Proliferations Assays an, um das Modell zu ergänzen.

### Ausblick - Optimierung der humanisierten Maus

Die exogene Gabe von Zytokinen, die für das *homing* von HSCs in das Knochenmark und für die Differenzierung in hämatopoetische Zellen zuständig sind, wurde bereits erfolgreich untersucht. Hierzu zählen neben Flt3L (CASHMAN *et. al.*, KAPP *et. al.*) auch der *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1, PEREZ *et. al.*), sowie GM-CSF / G-CSF, IL-3 (LAPIDOT *et. al.*) und SCF. Für die Entwicklung humaner myeloider Zellen wurde in den letzten Jahre deutlich, dass Flt3L einen entscheidenden Faktor darstellt. Jedoch konnte bereits im Jahr 1995 MCKENNA *et. al.* zeigen, dass Flt3L nur synergistisch, mit anderen Zytokinen, einen positiven Effekt auf die *ex vivo* Expansion von humanen CD34<sup>+</sup> PBSC zu haben scheint. In der Arbeit von KAPP *et. al.* wurde ebenfalls deutlich, dass Flt3L am effektivsten zusammen mit IL-7 die Entwicklung myeloider Zellen fördert. Hierbei wurde jedoch gleichzeitig das Anwachsen des lymphoiden Kompartments deutlich gehemmt. Wurde den Tieren eine Kombination von SCF, GM-CSF und IL-3 verabreicht, sank der Anteil der lymphoiden Zellen nur leicht, myeloide Zellen wuchsen jedoch auch vermehrt an, im Vergleich zu den Zytokin-unbehandelten Kontrollen.

Für das in dieser Arbeit etablierte humanisierte Mausmodell konnte ein positiver Effekt von Flt3L auf das Anwachsen von DC Populationen gezeigt werden. IL-7 alleine zeigte keinen Effekt auf das myeloide Kompartiment; hinsichtlich lymphoider Zellen konnten in dem getesteten Modell keine Aussagen getroffen werden. Weitere Zytokine wurden bisher noch nicht getestet, wobei jedoch besonders die Kombination von Flt3L mit IL-7 vielversprechend zu sein scheint. Ebenfalls interessant für die Entwicklung myeloider Zellen im humanisierten Mausmodell ist die Kombination von Flt3L mit SCF und IL-3. Auch einzelne Applikationen von Flt3L mit SCF sind denkbar. Die für die *in vitro* Generierung von DCs notwendigen Zytokine GM-CSF und IL-4 führen auch bei einer *in vivo* Gabe zu einer deutlichen Zunahme von cDCs im humanisierten Mausmodell (CHEN *et. al.*). Im humanen System führt darüber hinaus die Applikation von GM-CSF nach allogener HSCT zu einem schnelleren Aufbau weißer Blutzellen und auch von myeloiden DCs (FAGNONI *et. al.*).

Bei der Kombination der Zytokine ist es entscheidend, welche Fragestellung hinter dem Modell steht. Liegt der Fokus mehr auf der Rekonstitution lymphoider Zellen, bietet sich eher die Kombination von SCF, GM-CSF und IL-3 an. Speziell für die verbesserte Rekon-

stitution von T-Zellen ist neben IL-7 auch TNF- $\alpha$  ein potentielles Zytokin. SAMIRA *et. al.* zeigten, dass die Applikation von TNF- $\alpha$  vor Transplantation von NOD-*scid* Mäusen mit humanen CD34<sup>+</sup> PBSCs zur Rekonstitution von humanen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz und dem Thymus führte. Allerdings konnte gleichzeitig eine deutliche Abnahme unreifer B-Zellen und NK-Vorläuferzellen beobachtet werden. Um in dem in dieser Arbeit etablierten humanisierten Mausmodell die Rekonstitution humaner T-Zellen nachzuvollziehen und im Detail analysieren zu können, sind weitere Langzeitversuche, mit einer Dauer von mind. 30 Wochen, notwendig. Das TNF- $\alpha$  jedoch auch für die Entwicklung von DCs ein entscheidende Rolle spielen kann, zeigten ABBASIAN *et. al.* durch die Applikation von T-Zellen parallel zur Transplantation von CD34<sup>+</sup> PBSCs. Diese führte u.a. über die Produktion von TNF- $\alpha$  zu einer verbesserten Differenzierung von cDCs *in vivo*.

Je nach Fragestellung gibt es diverse weitere Zytokine und Wachstumsfaktoren, die das Anwachsen humaner Zellen in immundefizienten Mäusen optimieren. Für die Rekonstitution von humanen CD56<sup>+</sup> NK-Zellen bietet sich die Applikation von IL-15 / IL-15R $\alpha$  an (CHEN *et. al.*, HUNTINGTON *et. al.*). Humanisierte Thrombopoetin *knock-in* Mäuse unterstützen die Rekonstitution von humanen Thrombozyten und Granulozyten (RONGVAUX *et. al.*). Für die Rekonstitution von humanen Makrophagen bieten sich CSF-1 *knock-in* Mäuse an (RATHINAM *et. al.*), sowie IL-3 / GM-CSF *knock-in* Mäuse für die Rekonstitution von humanen alveolären Makrophagen (WILLINGER *et. al.*).

Hinsichtlich der Rekonstitution humaner LCs sind die Zytokine TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  von Bedeutung. *In vitro* Studien zeigten, dass bei der Generierung von DCs eine Supplementation mit TGF- $\beta$ 1 zu einer Hochregulierung von E-Cadherin und CD207 / Langerin auf den Zellen führte (KWIEK *et. al.*). Die zusätzliche Gabe von Tacrolimus, ein Calcineurin Inhibitor, führte zu einem noch stärkeren Effekt. Wurden CD34<sup>+</sup> PBSC *in vitro* mit einem Cocktail von TGF- $\beta$ 1, Flt3L, GM-CSF, SCF und TNF- $\alpha$  kultiviert, zeigten über 2/3 der Zellen vermehrt einen LC-ähnlichen Phenotyp als den von mDCs (STROBL *et. al.*). Zusätzlich konnten LC-spezifische Birbeck Granula nachgewiesen werden. Für die Mobilisierung und Migration von LC *in vivo* zeigte sich eine synergetische Wirkung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (GRIFFITHS *et. al.*). Activin A, welches auch zur Familie der TGF $\beta$  Familie gehört, konnte sowohl in *in vitro* Kulturen wie auch nach intradermaler Applikation in Hautkulturen zu einer 2- bis 10-fachen Zunahmen humaner LC (MUSSO *et. al.*) führen. Eine intradermale Gabe dieser Zytokine in die humanisierten Tiere hätte eventuell eine verstärkte Migration von LC in die murine Epidermis und die Ausdifferenzierung von LC-Vorläufern zur Folge.

Eine neueste Studie von WANG *et. al.* beleuchtet die Rolle von IL-34 im Kontext der Entwicklung von primären LCs neu. Es konnte gezeigt werden, dass IL-34 primär von Keratinozyten und Neuronen produziert wird und dass das Fehlen dieses Zytokins in einer verminderten Anzahl von LC in der Epidermis und der Mikroglia im zentralen Nervensystem (ZNS) resultiert. In der Entwicklung von primären LCs führt das *signaling* über IL-34 und den entsprechenden Rezeptor (SDF, *stromal cell-derived factor*) zur Expansion und Differenzierung der LC-Vorläuferzellen, sobald diese die Epidermis erreicht haben. LCs, die aus der Hämatopoese entstehen, werden jedoch nicht über IL-34 in Kombination mit SDF stimuliert, sondern über den Liganden CXCR4. Somit könnte man über die Gabe von IL-34 auch mehr über den Ursprung von LCs herausfinden. Dies

ist besonders in unserem Xenotransplantationsmodell von Interesse (HEMMERLING *et. al.*), da hier die Repopulation humaner Epidermis mit LCs noch ungeklärt ist. Im humanisierten Mausmodell könnte man sich eine topische sowie intradermale Applikation von IL-34 bzw. CXCR4 gerade zu frühen Zeitpunkten nach Transplantation vorstellen. Da LCs im humanen System eine starke Vernetzung und Interaktion mit Keratinozyten zeigen, und diese die primären Produzenten von IL-34 sind, stellt sich die Frage, ob humane LC generell Keratinozyten in ihrer Umgebung benötigen, um zu differenzieren und um im Gewebe zu verbleiben. Die zusätzliche Applikation von primären Keratinozyten in die humanisierten Mäuse gestaltet sich jedoch schwierig. Da für dieses Modell nur Leukapherese verwendet wurden, besteht keine Möglichkeit, Keratinozyten des gleichen CD34 Spenders zu erhalten.

Eine weitere Möglichkeit, das Vorhandensein von human-spezifischen Faktoren in den humanisierten Mäusen zu gewährleisten, ist es, neben den HSCs auch mesenchymale Stammzellen (MSCs), USSC (*unrestricted somatic stem cells*) oder humane Zytokintransduzierte Stromazellen zu applizieren (NOORT *et. al.*, DI IANNI *et. al.*, CHAN *et. al.*, DAO *et. al.*). Dadurch soll ein Mikromilieu entstehen, in dem human-spezifische Faktoren sezerniert werden, die von den humanen hämatopoetischen Zellen nicht produziert werden können.

Da Mäusen, die die *scid*-Mutation oder die *Rag1* oder *Rag2* Mutation besitzen, zwar das adaptive Immunsystem fehlt, sie aber dennoch eine robuste natürliche Immunität aufweisen, kann diese immer noch ein großes Hindernis für das Anwachsen von humanem Gewebe und Zellen sein. Während der Entwicklung der humanisierten Maus über die letzten zehn Jahre wurden diverse Methoden eingesetzt, um diese natürliche Immunität in den Mäusen zu unterdrücken. Zunächst wurden die murine NK-Zellen angegriffen. Hier wurden Antikörper verwendet, die zum Teil spezieübergreifend wirkten und auch humane NK-Zellen sowie aktivierte CD8<sup>+</sup> T-Zellen und Makrophagen angriffen (SUTTLES *et. al.*, MERCURIO *et. al.*). Als weiterer Ansatz dient der Einsatz des Antikörpers anti-Gr1 (SANTINI *et. al.*) um Neutrophile zu depletieren. Ein Ansatz für die verbesserte Rekonstitution von human LC wäre die Nutzung von LC-depletierten Mäusen oder das Bestrahlen der Mäuse mit UV Licht, um murine LC zu depletieren (ABERER *et. al.*). Dadurch würde Raum für humane LC in der Haut geschaffen werden.

### 5.3 Nutzen und Anwendung von Nanopartikeln im Mausmodell

Die Untersuchung der Biologie humaner DCs ist besonders in Hinblick auf ihr Migrationsverhalten von Interesse, da darüber ein Großteil ihrer Funktion definiert ist. Das bessere Verständnis dieser Migrationsmuster hilft bei der Differenzierung einzelner DC Subpopulationen, bei der Verbesserung der therapeutischen Funktionen von DCs und durch das Ausschalten bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten. Als eine Möglichkeit, das *homing* und Migrationsverhalten von Zellen zu untersuchen bietet sich die Methode des *labeling* von Zellen an. Hier sollte die Methode sowohl für das Tiermodell als auch für Klinik anwendbar sein.

### Beladen von DCs mit polymeren Nanopartikeln - Toxizität und Aufnahme

Ein Ansatz zum Markieren von DCs besteht in der Nutzung ihrer Eigenschaft, Partikel in ihrer Umgebung über Phagozytose aufzunehmen (ISHIMOTO *et. al.*). Mittels künstlich hergestellter Partikel können so z.B. depletierende Agenzien oder bestimmte Antigene in DCs gebracht oder das Markieren von DCs ermöglicht werden (NOH *et. al.*, DEMENTO *et. al.*, ELAMANCHILI *et. al.*). Für Nanopartikel in der Größenordnung von 20-200 nm konnte bereits in Tiermodellen gezeigt werden, dass sie den Injektionsort schnell in Richtung Lymphknoten verlassen, wohingegen Partikel mit einer Größe von 250 nm und mehr zunächst von DCs und Makrophagen aufgenommen und anschließend zu den Lymphknoten transportiert werden (MANOLOVA *et. al.*).

Die in dieser Arbeit verwendeten Nanopartikel hatten eine Größe von 100-155 nm (s. Tabelle 3). Alle Partikel wurden mittels des Miniemulsions Prozesses synthetisiert (LANDFESTER *et. al.*). Dadurch konnten die Partikel gezielt modifiziert werden. Es wurden drei verschiedene Reporter eingebaut, wobei das BODIPY als Nachweis für die Durchflusszytometrie und der IR-Farbstoff für das *in vivo imaging* diente. Zusätzlich enthielten die Partikel Platin. Platin kommt nicht in Körperzellen vor, somit sollte durch Messungen von Organproben die Verteilung der Nanopartikel nachverfolgt und gleichzeitig die Ergebnisse des BFI kontrolliert werden. Da die Partikel einen unterschiedlichen Gehalt von BODIPY aufwiesen, wurde nach den Messungen der MFI mit einem Korrekturfaktor normalisiert (s. Tabelle 7). Dieser Korrekturfaktor bezog sich auf den am stärksten fluoreszierenden Partikel. Nach der Anwendung dieses Faktors konnten die Partikel trotz unterschiedlichen MFI Werten untereinander verglichen werden. Durch die *in vitro* Beladung von iDCs mit den Nanopartikeln, sollte zum einen deren mögliche Toxizität, zum anderen deren Einfluss auf die Ausreifung und Aktivierung auf DCs untersucht werden. Partikel GB-PS-62 war der einzige Partikel, der auch bei höheren Konzentrationen nicht toxisch war (s. Abb. 32). Er wurde mit demselben Tensid (Lutensol AT50) hergestellt wie Partikel GB-PS-61 und -63, welche beide bei Konzentrationen von über 150 µg/ml toxisch wirkte. Dieser Effekt war bei Partikel GB-PS-63 am stärksten sichtbar.

Die Verwendung von Tensiden kann zu Veränderung der Zellmembran und zu deren Zerstörung führen (CSERHATI *et. al.*). Steffen Lorenz testete während seiner Doktorarbeit am MPI für Polymerforschung, Mainz, die Toxizität der Tenside SDS und Lutensol AT50. Dafür wurden freie Tenside in unterschiedlichen Konzentrationen auf humane Zelllinien gegeben. Lutensol AT50 zeigte ab einer Konzentration von 120 µmol/L toxische Effekte, wohingegen SDS selbst bei hohen Konzentrationen keine Toxizität aufwies. Bei der Synthese der hier verwendeten Partikel wurden 10.000 µmol/L Lutensol AT50 eingesetzt. Da die Partikel GB-PS-61, -62 und -63 mit demselben Tensid hergestellt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass zum einen die Dialyse der Partikellösung nicht ausreichend und noch freies Tensid vorhanden war, zum anderen schien die Stabilität der Partikel zu variieren und somit zu einer vermehrten Freisetzung von Lutensol AT50 zu führen. Partikel GB-PS-61 und besonders -63 zeigten zusätzlich in den kLSM-Aufnahmen eine starke Aggregation (s. Abb. 43), was mit dem Zerfall der Partikel assoziiert sein könnte. Betrachtet man hingegen Partikel GB-PS-62 wird erst bei höheren Konzentrationen eine Aggregation der Partikel sichtbar. Im Gegensatz zu den mit Lutensol AT50 hergestellten

Partikeln zeigte der mit SDS hergestellte Partikel BR 59 auch bei höheren Konzentrationen kaum Aggregationsverhalten und wurde zum Großteil in die Zellen aufgenommen (s. Abb. 43). Jedoch war die Toxizität in allen durchgeführten Versuchen recht hoch, was der Publikation von LORENZ *et. al.* widerspricht.

Was dennoch bei allen Partikeln auffiel, war, dass sie trotz teilweiser Aggregation größtenteils im Zytosol der Zellen gefunden wurden. Hier stellt sich die Frage, ob die Partikel bereits im Medium aggregierten und dann aufgenommen wurden, oder ob sie erst nach ihrer Aufnahme in die DCs aggregierten. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass nur der bei dem Partikelzerfall freigewordene Farbstoff aufgenommen wurde. Hier würden EM-Aufnahmen der Nanopartikel-beladenen DCs helfen, um zu schauen, in welchen Kompartimenten der Zellen sich die Partikel anreichern.

Die Wahl der Tenside ist ebenfalls von Bedeutung für die Aufnahmen von Partikeln, denn durch die Verwendung unterschiedlicher Tenside, kann die Oberflächenladung der Partikel verändert werden (LORENZ *et. al.*). Generell führen ionische Tenside (SDS, CTMA-Cl) zu einer verbesserten Aufnahme, wohingegen die Verwendung von nichtionischen Tensiden (Lutensol AT50) das Aufnahmeverhalten nicht verbessert, sondern sogar eher verschlechtert. Dies wurde nicht explizit während dieser Arbeit untersucht und kann daher weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Die Funktionalisierung von Partikeln kann ebenfalls einen Einfluss auf deren Aufnahme von Zellen haben, wobei hier auch die Zielzelle eine Variable darstellt. So führt eine Funktionalisierung mit Carboxylgruppen zu keiner vermehrten Aufnahme in DCs (ZUPKE *et. al.*), jedoch zeigen mesenchymale Stammzellen und HeLa Zellen ein gesteigerte Aufnahme (MAILÄNDER *et. al.*). Die Funktionalisierung mit Aminogruppen hingegen führt zu einer verbesserten Aufnahmen von Nanopartikeln in DCs, jedoch zeigen auch hier mesenchymale Stammzellen eine höhere größenunspezifische Aufnahme (ZUPKE *et. al.*, LORENZ *et. al.*). Die während dieser Arbeit getesteten Partikel waren zum einen unfunktionalisiert (GB-PS-61, BR 59) oder mit Amino- bzw. Carboxygruppen versehen (GB-PS-62, -63). Es konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme einzelner Partikel beobachtet werden. Dies kann möglicherweise durch die doch recht unspezifischen phagozytotischen Eigenschaften von APCs erklärt werden. Hier würden sich spezifischere Aufnahmewege, z.B. über Rezeptor-vermittelte Endozytose, anbieten. In unserer Gruppe werden dahingehend bereits Untersuchung mit DEC-205- und DCIR-konjugierten Nanokapseln durchgeführt. Ebenfalls wurden bereits erste Versuche mit Mannose-konjugierten Nanokapseln gemacht. DIEBOLD *et. al.* zeigten, dass der Einbau von Mannose zu einer bevorzugten Aufnahme von Nanopartikeln in Makrophagen und DCs führt. Desweiteren wären Kopplungen mit weiteren DC-spezifischen Markern, wie MHC, möglich. Hier steht bereits ein entsprechendes Hybridom zur Verfügung. Um eine unspezifische Phagozytose zu vermeiden, könnten auch Polyethylenglykol (PEG)-Konjugate an die Partikel gekoppelt werden. Diese sollen die Proteinadsorption senken bzw. ganz vermeiden (COLEMAN *et. al.*, GBADAMOSI *et. al.*). Die Verwendung von hydrophilen Polymeren ermöglicht eine vollständige Umhüllung der Nanopartikel (BESHEER *et. al.*) und somit werden die Partikel zuverlässig gegen einen vorzeitigen Abbau geschützt (GREF *et. al.*). Die Konjugation von weiteren Materialien, z. B. Antikörper ist über sog. *linker* möglich. Inwieweit dies die Eigenschaften der Partikel verändert, muss individuell getestet werden.

Über den speziellen Aufnahmemechanismus der getesteten Nanopartikel konnten bisher keine Aussagen getroffen werden. Für Partikel  $< 200$  nm wurde die Aufnahme primär über Clathrin-vermittelte Endozytose beobachtet (REJMAN *et. al.*, MACHO-FERNANDEZ *et. al.*). Mit zunehmender Größe der Partikel gewinnt eher die Caveolae-vermittelte Endozytose an Bedeutung (REJMAN *et. al.*, HE *et. al.*). Zusätzlich sind APCs in der Lage, Nanopartikel über Phagozytose aufzunehmen (ELAMANCHILI *et. al.*). Um mögliche Aufnahmewege zu identifizieren, müssten zunächst Lokalisationsstudien mittels EM durchgeführt werden. Sollten die Partikel im Endosom, ER oder Golgi Apparat lokalisiert sein, kann man von endozytotischen Prozessen ausgehen. Hier bieten sich diverse Inhibitionsstudien an, durch die der spezifische Transportweg identifiziert werden sollte. Desweiteren sind zelluläre Bestandteile wie Aktin, Dynamin oder Cholesterin an unterschiedlichen Aufnahmemechanismen bzw. intrazellulärem Transport beteiligt. Hier bieten sich ebenfalls Inhibitionsstudien an.

### Phänotypisierung und Funktion Nanopartikel-beladener DCs

DCs nehmen die Nanopartikel in intrazelluläre Kompartimente auf, in denen normalerweise die Prozessierung von Antigenen stattfindet. Diese Prozessierung führt wiederum zur Ausreifung der DCs, zu deren Aktivierung und zu einer damit verbundenen veränderten Expression von Oberflächenmolekülen. Diese Funktionen sollte durch eine Beladung mit Nanopartikeln nicht verändert werden. ELAMANCHILI *et. al.* konnten bei der Beladung von murinen, aus dem Knochenmark stammenden DCs mit bioabbaubaren poly-L-Lysin Nanopartikeln eine Hochregulation von MHC-Klasse-II Molekülen beobachten. Ebenso veränderte sich die Expression kostimulatorischer Moleküle bei der Beladung von humanen DCs mit bioabbaubaren Nanopartikeln (DIWAN *et. al.*). Wurden jedoch humane Mo-DCs mit einem Amino-funktionalisierten polymeren Nanopartikel beladen, zeigten sich keine Veränderung der Expression von HLA-Klasse-II und anderen spezifischen DC Oberflächenmolekülen (ZUPKE *et. al.*). Dies konnte ebenfalls bei der Beladung von DCs mit poly(lactid-co-glycolid) Nanopartikeln gezeigt werden (FISCHER *et. al.*). Hinsichtlich der Expression von HLA-Klasse-II Molekülen zeigten lediglich DCs, die mit dem unfunktionalisierten Partikel (GB-PS-61) beladen wurden eine leichte Hochregulation (s. Abb. 36). Die Expression der Marker CD11c (s. Abb. 33), CD83 (s. Abb. 34) und des *homing* Markers CCR7 (s. Abb. 37) zeigten ebenfalls keine Veränderung. Allein die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 wurde durch die Partikel GB-PS-62, -63 und BR 59 leicht gesteigert (s. Abb. 35).

Meistens ist eine veränderte Oberflächenmarker-Expression mit einer veränderten Funktionalität der Zellen assoziiert. Um die Funktionalität der Nanopartikel-beladenen DCs zu untersuchen, wurde ein IFN  $\gamma$  ELISpot mit CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen durchgeführt. Dafür wurden iDCs von einem CMV-seropositiven Spender mit den jeweiligen Nanopartikeln beladen und nach deren Ausreifung getestet. Als Antigen wurde ein Peptidmix aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell Epitopen des CMV, verwendet. Wurden DCs mit den Partikeln GB-PS-61, -62 oder BR59 beladen, zeigte sich keine veränderte IFN  $\gamma$  Ausschüttung im Vergleich zu den unbeladenen DCs (s. Abb. 38, 39 und 40). Somit waren die Nanopartikel-beladenen DCs in der Lage, Viruspeptide aufzunehmen, zu prozessieren



und den T-Zellen zu präsentieren. Wurden DCs jedoch mit dem Amino-funktionalisierten Partikel GB-PS-63 beladen und ausgereift, zeigte sich eine höhere Spotzahl ( $p=0,03$ , s. Abb. 41). Dies steht im Gegensatz zu der Arbeit von ZUPKE *et. al.*, der keine Veränderung von DC Funktionalität bei Beladung mit Amino-funktionalisierten Nanopartikeln feststellen konnte. Die von ihm verwendeten Partikel wurden jedoch mit dem Detergenz CTMA-Cl hergestellt, was die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnte. Wurden jedoch alle Nanopartikel mit DCs und T-Zellen eines Spenders getestet, konnte das Ergebnis hinsichtlich des Partikels GB-PS-63 nicht reproduziert werden (s. Abb. 42). Daher liegt die Vermutung nahe, dass die verstärkte Aktivierung auf die Spendervariabilität zurückzuführen ist. Das eine Funktionalisierung von Nanopartikeln zu veränderten Eigenschaften führen kann, zeigten FRICK *et. al.* in ihrer neuesten Arbeit. Hier führte die Funktionalisierung mit Phosphonat-, bzw. Sulfonatgruppen zu einer gesteigerten CD4 T-Zell Aktivität, besonders bei der Beladung von iDCs. Hinsichtlich der Aktivierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten die Partikel in dieser Arbeit eine stärkere Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Die Beladung von iDCs würde sich auch für die in dieser Arbeit getesteten Nanopartikel anbieten. Dass die ausgereiften Nanopartikel-beladenen mDCs keine Veränderungen in ihrer Funktionalität hinsichtlich T-Zell Aktivierung haben, konnte gezeigt werden. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Nanopartikel die Kinetik der Reifung und Aktivierung von DCs beschleunigen und somit auch schon Nanopartikel-beladene iDCs in der Lage sind, Peptide aufzunehmen und T Zellen zu präsentieren.

Neben der *in vitro* Beladung von humanen DCs ist auch das *in vivo targeting* von DCs mittels Nanopartikel von Interesse. Hierbei ergaben sich verschiedene Fragestellungen. Zum einen sollte eine mögliche Toxizität der Partikel ausgeschlossen werden. Zum anderen sollte die Verteilung nach systemischer Applikation in diversen Organen untersucht werden. Eine spezifische Aufnahme der Nanopartikel in DCs und die gezielte Beeinflussung von Zellfunktionen sind letztendlich das Ziel.

### **In vivo Untersuchungen - Biodistribution der Nanopartikel**

Eine verbreitete Methode für Tiermodelle in Hinblick auf Migrationsstudien ist die stabile Transfektion von DCs mit biolumineszenten Stoffen mit anschließenden *imaging* Methoden *in vivo* (CREUSOT *et. al.*, EGGERT *et. al.*, BAUMJOHANN *et. al.*). Erste *homing*- und Migrationsstudien von DCs wurden bereits mit Hilfe von *quantum dots* durchgeführt (CAMBI *et. al.*, SEN *et. al.*). Besonders in der Tumorforschung werden vermehrt mit Medikamenten beladene Nanopartikel verwendet (LEE *et. al.*, HE *et. al.*). Partikel mit einer Größe von 80 bis mehreren hundert Nanometern werden primär von der Leber und Milz aufgenommen, wohingegen sehr kleine Partikel, mit einer Größe  $< 5$  nm, primär in Bereichen des Gehirns, Herz und der Lunge wandern können (HIRN *et. al.*).

In dieser Arbeit sollte zunächst die *in vivo* Verteilung der vier *in vitro* getesteten Partikel untersucht werden. Dafür wurden NSG Mäusen die jeweiligen Nanopartikel i.v. verabreicht. Für die Kinetikuntersuchungen wurden die Tiere anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Xenogen IVIS<sup>®</sup> Spektrum gemessen. Nach 96 h wurden einzelne Organe der Mäuse ebenfalls mit dem Xenogen IVIS<sup>®</sup> Spektrum gemessen. Keiner der

Partikel zeigte toxische Effekte, bzw. die Partikel führten nach der i.v. Applikation auch zu keiner Lungenembolie, was bei der Applikationen von Partikeln  $> 200$  nm beobachtet werden konnte (interne Daten). Bei den verschiedenen Messungen wurde deutlich, dass bei der Messung der einzelnen Organe Signale detektiert werden konnten, die beim Messen der kompletten Maus nicht messbar waren, da die Organe, bzw. Teile der Organe zu tief im Gewebe lagen. Desweiteren ermöglichte erst die quantitative Auswertung der Messungen verlässliche Aussagen über die gemessenen Signale.

Die Kinetikuntersuchungen zeigten, dass die verschiedenen Partikel zum einen unterschiedlich starke Signale lieferten und zum anderen eine unterschiedliche Verteilung *in vivo* aufwiesen (s. Abb. 45). Der Großteil aller Partikel wurde in der Leber der Tiere gefunden. Dies konnte ebenfalls bei der Messung der einzelnen Organe beobachtet werden (s. Abb. 46) und konnte bei der quantitativen Auswertung bestätigt werden (s. Abb. 47). Partikel GB-PS-62 und BR59 konnten zumindest bei diesen Kinetikmessungen in keinen anderen Organen detektiert werden, was jedoch bei der quantitativen Auswertung widerlegt wurde (s. Abb. 47). Partikel GB-PS-61 und -63 lieferten durch ihre stärkeren Signale bereits in den ersten Stunde nach Applikation messbare Signale in der Lunge (s. Abb. 45). Alle Partikel zeigten eine konstante Zirkulation im Organismus und konnten auch noch 96h nach ihrer Applikation detektiert werden.

Für die quantitative Auswertung der Signale, wurde zunächst der Wert des jeweiligen Kontrollorgans subtrahiert und anschließend mit einem Korrekturfaktr, der sich auf den Partikel mit dem stärksten Signal bezog (GB-PS-63), multipliziert. Dies erlaubte den Vergleich der Partikel untereinander. So wurde auch deutlich, dass der Partikel GB-PS-63 zwar am stärksten leuchtete, dies aber nicht unbedingt auf eine verstärkte Anreicherung in dem jeweiligen Organ zurückzuführen war. Der unfunktionalisierte Partikel GB-PS-61 zeigte das breiteste Verteilungsmuster (s. Abb. 47). Primär war er in der Leber zu finden, zeigte jedoch auch starke Signale in der Lunge mit sinkenden Werten für Haut, Milz und peripheres Blut. Die anderen Partikel konnten ebenfalls primär in der Leber gefunden werden und verteilten sich gleichmäßig auf Haut und Lunge, mit geringeren Anteilen in Milz und peripherem Blut. Hinsichtlich der Funktionalisierungen konnte kein Einfluss auf Migrationsmuster beobachtet werden. Das besonders Partikel im Größenbereich von 80-200 nm primär von Kupferschen Sternzellen der Leber und von Makrophagen der Milz aufgenommen werden, wurde bereits von einigen Gruppen beschrieben (OWENS *et. al.*, DECUZZI *et. al.*, MOGHIMI *et. al.*). Hier zeigten ARNIDA *et. al.*, dass die Veränderung hin zu stäbchenförmigen Partikeln zu einer verminderten Aufnahme in Makrophagen führte. Eine weitere Möglichkeit, die Anreicherung in der Leber zu umgehen, ist die PEGylierug der Partikel (OZCAN *et. al.*, MALDINEY *et. al.*). In Ratten konnte so die Aufnahme von Nanopartikel in mononukleäre Zellen über Phagozytose verhindert werden.

Von allen vier Partikeln konnten Signale in der Haut gemessen werden (s. Abb. 47). Da diese deutlich höher lagen als die gemessenen Werte im Blut, kann davon ausgegangen werden, dass die Partikel tatsächlich in die Haut migriert sind und nicht nur Signale von Partikeln in Blutgefäßen gemessen wurde. FAURE *et. al.* zeigten, dass die Änderung von PEG-Kettenlängen und deren endständigen Gruppen (carboxyliertes PEG) die Effizienz der in der Haut aufgenommenen Nanopartikel erhöhen kann. Diesen Effekt von Carboxylgruppen konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden, allerdings waren Partikel

GB-PS-62 auch nicht pegyliert. Wie schon für die Toxizität und Aufnahme von Nanopartikeln *in vitro* gezeigt werden konnte, spielt auch für die *in vivo* Verteilung das Material der Partikel eine Rolle. So zeigten SEMETE *et. al.* im Jahr 2010 eine veränderte Verteilung bei Verwendung von Poly-(Laktid-co-glykolid) Partikeln. Diese wurden weniger in der Leber wiedergefunden, jedoch vermehrt in Niere, Herz und Gehirn.

Das Verfahren der Miniemulsion erlaubt die gezielte Änderung bestimmter Parameter und sollte es somit in Zukunft ermöglichen, Nanopartikel in verschiedenen Kombinationen zu testen. Neben der Optimierung der Oberflächeneigenschaften wird ebenfalls die Nutzung von bioabbaubare Polymere für die Synthese von Partikeln angestrebt. In unserer Gruppe testet Diplom Biologin Patricia Okwieka, im Zuge ihrer Doktorarbeit, auf Hydroxyethylstärke (HES) und PEG basierende Nanokapseln hinsichtlich ihrer *in vitro* Aufnahmen in DCs. Mit den HES Kapseln wurden bereits erste *in vivo* Versuche hinsichtlich der Biodistribution durchgeführt, allerdings zeigte sich hier ein rasches Ausscheiden der Kapseln, wodurch eine Detektion nicht mehr möglich war. Hier bedarf es weiterer Optimierungen hinsichtlich der Stabilität der Kapeln.

Mit unterschiedlichen Applikationswegen können ebenfalls unterschiedliche Regionen und damit auch Zellen adressiert werden. Neben der intravenösen Applikation bietet sich der Vergleich zur intraperitonealen Gabe an. Sollen speziell DCs der Haut markiert werden, könnte die lokal intradermale oder das externe Aufbringen der Nanopartikel von Vorteil sein.

### Verteilung der Nanopartikel im humanisierten Mausmodell

Um humane DCs *in vivo* mit Nanopartikeln zu adressieren, bietet sich das während dieser Arbeit etablierte humanisierte Mausmodell an. Für diese Untersuchungen sollen optimierte Nanopartikel verwendet werden, die sich durch eine bevorzugte Aufnahme in DCs auszeichnen. Dies konnte während dieser Arbeit noch nicht realisiert werden. Desweiteren waren alle vier Partikel nur suboptimal, da sie entweder toxisch waren, Aggregate bildeten oder eine schlechte *in vivo* Verteilung zeigten. Um dennoch einen ersten Eindruck von einem eventuell veränderten Verhalten von Nanopartikeln in humanisierten Mäusen zu bekommen, wurde Partikel GB-PS-63 in humanisierte NSG Mäuse appliziert. Primär wurde dieser Partikel aufgrund seiner starken Fluoreszenz und seinem weiten Verteilungsmuster *in vivo* ausgewählt. Dafür wurden Tiere 30 Wochen nach Transplantation gewählt. Hier konnte vom Anwachsen einer kompletten humanen Hämatopoese ausgegangen werden. Hinsichtlich der Kinetiken des Partikels konnte kein Unterschied zu nicht humanisierten Mäusen beobachtet werden (s. Abb. 48). Sowohl in den humanisierten wie auch den nicht humanisierten Mäusen konnte das Verteilungsmuster der Versuche zuvor bestätigt werden. Bei der Messung der einzelnen Organe zeigte sich ebenfalls eine Verteilung in Leber, Lunge, Milz, peripheres Blut und der Haut (s. Abb. 51). Somit scheint das Vorhandensein einer humanen Hämatopoese die Verteilung und die Kinetik des Partikels GB-PS-63 nicht zu verändern.

48 h nach Transplantation konnten in Milz und Knochenmark vereinzelt Nanopartikel wiedergefunden werden (s. Abb. 49). Diese waren teilweise außen an Zellen gebunden, aber auch frei im Medium zu finden. Da nur sehr wenige Zellen und Nanopartikel vorhan-

den waren, konnten keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Da Cell Mask Orange alle Zellmembranen anfärbt, konnte man in dem Ansatz keinen Unterschied zwischen murinen und eventuell humanen Zellen feststellen. Durch eine Färbung gegen humanes CD45 sollten die humanen Zellen in den humanisierten Mäusen wiedergefunden werden. Das der AK spezifisch ist, wurde durch das komplette Fehlen positiver Zellen in Proben nicht humanisierter Mäuse bestätigt. Tatsächlich konnten in der Milz und dem Knochenmark von humanisierten Mäusen CD45<sup>+</sup> Zellen beobachtet werden (s. Abb. 50). In der Milz zeigten einzelne Partikel Kolokalisationen mit humanen Zellen. Diese waren jedoch nur an der Zelloberfläche der Zellen zu finden. Im Knochenmark war keine Kolokalisation von Partikeln mit humanen Zellen zu beobachten. Da jedoch auch in diesen Proben nur vereinzelt Nanopartikel zu finden waren und auch ein Großteil der Zellen nicht mehr vital waren, ist es schwierig aussagekräftige Ergebnisse daraus zu gewinnen.

Treten Nanopartikel in Kontakt mit biologischen Materialien (*in vitro* und *in vivo*), interagieren sie mit den darin enthaltenen Proteinen. Somit bildet sich eine neue Nanopartikeloberfläche aus, die die Interaktion der Nanopartikel mit Zellen und Geweben beeinflussen kann. LUNDQVIST *et. al.* postulierten, dass die Nanopartikel von einer "weichen" sowie einer "harten" Proteinkorona umgeben sind. Die weiche Korona enthält Proteinen mit einer schwachen Bindungsaffinität und einer hohen Austauschrate, wohingegen die harte Korona aus Proteinen mit einer hohen Bindungsaffinität und geringer Austauschrate besteht. Der Prozess der kompetitiven Adsorption von Proteinen auf Oberflächen ist bekannt als "Vroman Effekt" (VROMAN *et. al.*, GOPPERT *et. al.*). Besonders für die Biodistribution von Partikeln in Gegenwart von Serum können Unterschiede in Proteinkonzentrationen und deren unterschiedliche Bindungsaffinitäten einen entscheidenden Einfluss auf die Zusammensetzung der Proteinkorona haben, je nachdem in welchen Kompartimenten sich die Partikel befinden. Darüber hinaus spielen Parameter wie die Größe, Form, Hydrophobizität, das Material und eventuelle Funktionalisierungen der Partikel eine entscheidene Rolle.

Kinetikstudien mit festen Lipidnanopartikeln (*solid lipid nanoparticles* - SLN<sup>TM</sup>) zeigten, dass das zunächst gebundenes Albumin mit der Zeit durch Fibrinogen und anschließend durch Apolipoproteine ersetzt wird (BLUNK *et. al.*, GOPPERT *et. al.*). Interessanterweise ist die Konzentration von Apolipoproteinen im humanen Plasma geringer als die von Fibrinogen, jedoch ist die Bindungsaffinität, besonders zu hydrophoben Oberflächen, deutlich höher und somit kann das Fibrinogen verdrängt werden.

Einflüsse von Nanopartikeleigenschaften auf die Bildung einer Proteinkorona im Zusammenhang mit der Aufnahme in Zellen wurden primär mit Makrophagen durchgeführt. Die Größe der Partikel ist für Bildung der Proteinkorona unerheblich, die einzelne Zusammensetzung der Korona wird jedoch durch die chemischen Eigenschaften der Partikel (z.B. Funktionalisierungen) bestimmt (LUNDQVIST *et. al.*). Für Polystyrol Nanopartikel konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die an der Bildung einer Proteinkorona beteiligt sind. Dazu zählen Immunglobuline (IgG), Lipoproteine, Proteine des Komplementsystems, akute-Phase Proteine und Koagulationsfaktoren. Hinsichtlich der chemischen Eigenschaften von Nanopartikeln zeigten Carboxy-funktionalisierte Partikel einer vermehrte Bindung von Immunglobulinen, wohingegen Lipoproteine bevorzugt

an Amino-funktionalisierten Partikeln banden. Andere Arbeiten zeigten, dass ungeladene Nanopartikel eine verlangsamte Opsonisierungsrate aufwiesen als geladene Partikel (ROSER *et. al.*, OWENS *et. al.*). Positiv geladene Polystyren Partikel banden bevorzugt Proteine mit einem isoelektrischen Punkt unter 5.5 (z.B. Albumin), wobei negativ geladene Partikel eher mit Proteinen höherer isoelektrischer Wertes interagierten (z.B. IgG) (GESSNER *et. al.*). Die in dieser Arbeit getesteten Nanopartikel wurden ebenfalls hinsichtlich ihrer Proteinkorona untersucht und es zeigte sich, dass primär Gerinnungsproteine beteiligt waren (unveröffentlichte Daten). Detaillierte Studien konnten bisher jedoch noch nicht durchgeführt werden.

Durch die Bildung einer Proteinkorona wird ebenfalls die Biodistribution der Partikel verändert, da sich deren Größe und Oberflächenladung ändern kann. Diverse gebundene Proteine führen zu einer bevorzugten Erkennung der Partikel durch Makrophagen des retikuloendothelialen Systems (RES) (OWENS *et. al.*). So führen die Bindungen von IgG, Komplementfaktoren und Fibrinogen zu einer Entfernung von Partikeln aus dem Blutstrom über Zellen des RES (CAMNER *et. al.*) und einer anschließenden Anreicherung in der Leber und Milz (OWENS *et. al.*). Im Gegensatz dazu führen Proteine wie Albumin oder andere Dysopsonine zu einer verlängerten Verweildauer im peripheren Blut (OWENS *et. al.*, OGAWARA *et. al.*). Die Anlagerung von Apolipoproteinen (z. B. ApoE, ApoA-1 und ApoB-100) ermöglicht einen Transport von Medikamenten-beladenen Nanopartikeln in das Gehirn (KREUTER *et. al.*). In den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Biodistribution konnte in der Leber primär der Carboxy-funktionalisierte Partikel detektiert werden (s. Abb. 47). Dies könnte auf eine verstärkte Bindung von Proteinen wie IgG oder Komplementfaktoren hinweisen.

Die Bildung einer Proteinkorona kann in Hinsicht auf die praktische Anwendung von Nanopartikeln positiv sowie negativ betrachtet werden. Da die Eigenschaften der Proteinkorona schnell Immunantworten in Patienten hervorrufen können (LYNCH *et. al.*), sind oftmals Nanopartikel gefragt, die keine Bildung einer Proteinkorona zulassen und somit weniger Nebenwirkungen zeigen. Auf der anderen Seite ist manchmal eine spezifische Aufnahme von Nanopartikeln in bestimmte Zellen bzw. Gewebe erwünscht, was durch die Bindung spezifischer Plasmaproteine ermöglicht werden kann. Um Nanopartikel als Transportsysteme zu nutzen, ist es somit von großem Interesse, Partikel zu konstruieren, welche nur gewünschte Proteine auf ihrer Oberfläche binden. Ein gutes Beispiel dafür ist das Medikament Abraxane<sup>TM</sup> (FOOTE *et. al.*). Abraxane ist eine lösliche Form des Medikamentes Paclitaxel, welches in Albumin-gebundene Nanopartikel eingebaut ist. Es wird in der Chemotherapie verwendet und führt über die Albuminhülle zu einer erleichterten Penetration des Tumors.

Dennoch benötigt es noch viele weitere Studien hinsichtlich der Nanopartikel-Protein Komplexe. Wie binden Proteine an die Nanopartikel, welche Faktoren beeinflussen die Bindungsaffinitäten und wie kann man die Proteinspezifitäten für ein direktes "targeting" der Nanopartikel nutzen; all diese Fragen sind Bestandteil der derzeitigen Forschung und deren Lösungen werden dabei helfen, Nanopartikel-basierende Therapien in die Praxis umzusetzen.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde zunächst ein humanisiertes Mausmodell entwickelt für die Analyse von humanen DCs *in vivo*. Darüber hinaus wurden erste Versuche mit Nanopartikel-beladenen DCs durchgeführt, mit der Intention, durch diese Kombination humane DCs zu untersuchen. Es wurden immunsupprimierte NOD/LtSz-scid IL2R (NSG) Mäuse verwendet und mit humanen CD34<sup>+</sup> PBSCs transplantiert. Es wurden insgesamt 14 Modelle getestet, mit einer durchschnittlichen Humanisierungsrate von 76 %. In allen Modellen konnten ab Woche sechs nach Transplantation humane CD45<sup>+</sup> Zellen sowie humane B- und NK-Zellen und CD14<sup>+</sup> Monozyten gefunden werden. Darüber hinaus waren myeloide DC-Vorläuferzellen, konventionelle HLA DR CD11c DCs (cDCs) und plasmazytoide DCs (pDCs) vorhanden. Humane T-Zellen konnten nicht vor Woche 18 nach Transplantation beobachtet werden. Neben der Rekonstitution humaner DCs in peripheren Organen, wurde ebenfalls nach gewebsständigen DCs, insbesondere den Langerhans Zellen (LCs) der Epidermis geschaut. Waren humane LC vorhanden, konnten diese ab Woche zwölf nach Transplantation in der murinen Epidermis detektiert werden. Diese waren konstant bis in Woche 30 nach Transplantation nachweisbar. In Hinblick auf die Etablierung der DCs in diesem humanisierten Mausmodell wurden verschiedene Einflussgrößen getestet. IL-7 führte zu keiner veränderten Hämatopoese, wohingegen Flt3L zu einer Zunahme von CD14<sup>+</sup> Monozyten und cDCs führte. Darüber hinaus konnte eine drastische Abnahme humaner B-Zellen beobachtet werden. Es zeigte sich, dass der Zeitpunkt der Flt3L Applikation einen entscheidenden Faktor für den Effekt von Flt3L auf die Rekonstitution humaner Zellen darstellt.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen *in vivo* Studien, wurden humanisierten Mäusen alloreaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen appliziert. Somit sollte die Funktionalität der rekonstituierten humanen APCs getestet werden. Es wurde deutlich, dass Monozyten und DCs ihre Funktionalität erst ab Woche 14 nach Transplantation zu entwickeln schienen, wohingegen B-Zellen bereits zu früheren Zeitpunkten als Zielzellen für die alloreaktiven T-Zellen dienten. Dies wurde durch den Rückgang der jeweiligen Zellen nach Applikation der T-Zellen sichtbar. Zu erwähnen ist, dass das Anwachsen einer humanen Hämatopoese stark spenderabhängig ist und somit keine allgemeingültigen Aussagen hinsichtlich der *in vivo* Funktion getroffen werden können.

Um im Gewebe verbliebende APCs zu manipulieren gibt es verschiedene Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden auf Polystyren-basierende Nanopartikel getestet. Die verwendeten Partikel hatten eine Größe von 80 bis 160 nm und waren unfunktionalisiert oder mit Amino- bzw. Carboxy-Gruppen versehen. Zusätzlich wurden die Partikel mit BODIPY (Durchflusszytometrie und kLSM-Messungen), einem Infrarotnahem Farbstoff IR 780 (BFI-Messungen) und Platin (*in vivo* Messungen) beladen. Der Carboxy-funktionalisierte Partikel zeigte den geringsten Einfluss auf die Vitalität von humanen DCs, wohingegen der Amino-funktionalisierte Partikel bei steigender Konzentration toxisch wirkte. Bei unfunktionalisierten Partikeln stieg die Toxizität bei zunehmender Konzentration. Hinsichtlich der Expression diverser DC spezifischer Oberflächenmoleküle nach Beladung mit Nanopartikeln zeigte sich, dass allein der unfunktionalisierte, mit Lutensol AT50 hergestellte Partikel zu einer leichten Hochregulation von MHC-Klasse-II

## 6 Zusammenfassung

Molekülen führte. Die Expression von CD86 wurde im Gegenzug nur durch die Beladung mit den Amino-, bzw. Carboxy-funktionalisierten Partikeln und dem unfunktionalisierten, mit SDS hergestellten Partikel leicht gesteigert. Trotz der teilweise leicht veränderten Expression von Oberflächenmarkern, konnte mit Hilfe von IFN- $\gamma$  ELISpots keine Beeinflussung der Funktion als APCs von Nanopartikel-beladenen DCs beobachtet werden. In den *in vivo* Untersuchungen zeigten alle vier Partikel eine konstante Zirkulation im Organismus und konnten bis 96 h nach Applikation nachgewiesen werden. Alle Partikel konnten primär in der Leber detektiert werden, wobei der unfunktionalisierte, mit Lutensol AT50 hergestellte Partikel das weiteste Verbreitungsmuster zeigte. Erste Versuche im humanisierten Mausmodell zeigten keine Beeinflussung der Verteilung und Kinetik von Nanopartikeln durch die humane Hämatopoese.

Mit dem in dieser Arbeit etablierten humanisierten Mausmodell ist es möglich, die Entwicklung, Differenzierung, Aktivierung und Funktionalität humaner DCs *in vivo* zu untersuchen. Darüber hinaus kann das gezielte Adressieren von DCs *in vivo* analysiert werden, was sowohl die Möglichkeit der Manipulation von DCs zur Vermeidung einer akuten GvHD bietet als auch Verwendung in anderen DC-vermittelten Therapien (z.B. Vakzinationsstudien) findet.

## Literatur

- [Abbasian] Abbasian, J. et. al. (2006) Allogeneic T cells induce rapid CD34+ cell differentiation into CD11c+CD86+ cells with direct and indirect antigen-presenting function. *Blood* 108:203
- [Aberer] Aberer, W., Romani, A., Elbe, and G. Stingl (1986) Effect of physiochemical agents on murine epidermal Langerhans cells and Thy-1-positive dendritic epidermal cells. *J. Immunol.* 136:1210-1216
- [Agnes] Agnes, F. et. al. (1994) Genomic structure of the downstream part of the human FLT3 gene: exon/intron structure conservation among genes encoding receptor tyrosine kinase (RTK) of subclass III. *Genes* 145:283-288
- [Albert] Albert, M.L., Jegathesan, M., Darnell, R.B. (2001) Dendritic cell maturation is required for the cross-tolerization of CD8+ T cells. *Nature Immunol* 11:1010-1017
- [Al-Hajj] Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., Clarke, M.F. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:3983-3988
- [Allam] Allam, J.P. et. al. (2006) Comparative analysis of nasal and oral mucosa dendritic cells. *Allergy* 61:166-172
- [Allan] Allan, R.S., et. al. (2003) Epidermal viral immunity induced by CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells but not by Langerhans cells. *Science* 301:1925-1928
- [Alyea] Alyea, E.P., Canning, C., Neuberg, D., Daley, H., Houde, H., Giralt, S. et. al. (2004) CD8+ cell depletion of donor lymphocyte infusions using cd8 monoclonal antibody-coated high-density microparticles (CD8-HDM) after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a pilot study. *Bone Marrow Transplant* 34: 123-8
- [Anderson] Anderson, B.E., McNiff, J.M., Jain, D., Blazar, B.R., Shlomchik, W.D., Shlomshik, M.J. (2005) Distinct roles for donor- and host-derived antigen-presenting cells and costimulatory molecules in murine chronic graft-versus-host disease: requirements depend on target organs. *Blood* 105:2227-2234
- [André] André, M.C., Erbacher, A., Gille, C., Schmauke, V., Goecke, B., Hohberger, A., Mang, P., Wilhelm, A., Mueller, I., Herr, W., Lang, P., Handgretinger, R., Hartwig, U.F. (2010) Long-term human CD34+ stem cell-engrafted nonobese diabetic/SCID/IL-2R gamma(null) mice show impaired CD8+ T cell maintenance and a functional arrest of immature NK cells. *J Immunol* 185:2710-20
- [Ardavin] Ardavin, C., Wu, L., Li, C., Shortman, K. (1993) Thymic dendritic cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature* 362:761-763
- [Arnida] Arnida et. al. (2011) Geometry and surface characteristics of gold nanoparticles influence their biodistribution and uptake by macrophages. *Eur. J Pharm. Biopharm.* 77:417
- [Arpinati] Arpinati, M., Green, C.L., Heimfeld, S., Heuser, J.E., Anasetti, C. (2000) Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 95:2484-2490



## Literatur

- [Baenzinger] Baenzinger, S. et. al. (2006) Disseminated and sustained HIV infection in CD34<sup>+</sup> cord blood cell-transplanted Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup> mice. *Proc. Natl Acad. Sci.* 103:15951-15956
- [Banchereau] Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-52
- [Baron] Baron, F., Storb, R., Little, M.T. (2003) Hematopoietic cell transplantation. *Archives of Medical Research* 34:528-544
- [Baumjohann] Baumjohann, D., Lutz, M.B. (2006) Non-invasive imaging of dendritic cell migration in vivo. *Immunobiology* 211:587-597
- [Berges] Berges, B.K., Wheat, W.H., Palmer, B.E., Connik, E., Akkina, R. (2006) HIV-1 infection and CD4 T cell depletion in the humanized Rag2<sup>-/-</sup>γc<sup>-/-</sup>(RAG-hu) mouse model. *Retrovirology* 3:76
- [Bennett] Bennett, C.L. et. al. (2005) Inducible ablation of mouse Langerhans cells diminishes but fails to abrogate contact hypersensitivity. *J Cell Biol* 169:569-576
- [Bennett] Bennett, C.L., et. al. (2011) Langerhans cells regulate cutaneous injury by licensing CD8 effector cells recruited to the skin. *Blood* 117:7063-7069
- [Bente] Bente, D.A., Melkus, M.W., Garcia, J.V., Rico-Hesse, R. (2005) Dengue fever in humanized NOD/SCID mice. *J Virol.* 79:13797-13799
- [Besheer] Besheer, A., Vogel, J., Glanz, D., Kressler, J., Groth, T., Mäder, K. (2009) Characterization of PGLA nanospheres stabilized with amphiphilic polymers:hydrophobically modified hydroxyethyl starch cs pluronics. *Molecular Pharmaceutics* 6:407-415
- [Bhardwaj] Bhardwaj, N. et. al. (1994) Influenza virus-infected dendritic cells stimulate strong proliferative and cytolytic responses from human CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Clin. Invest.* 94:797-807
- [Billingham] Billingham, R. (1966) The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey lectures* 62:21-78
- [Birbeck] Birbeck, M.S., Breathnach, A.S., Everall, J.D., (1961) An electron microscopic study of basal melanocytes and high level clear cells (Langerhans cells) in vitiligo. *J Invest Dermatol* 37:51-64
- [Björck] Björck, P. (2001) Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood* 98:3520-3526
- [Blom] Blom, B., Spits, H. (2006) Development of human lymphoid cells. *Annu. Rev. Immunol.* 24:287-320
- [Blunk] Blunk, T., Hochstrasser, D.F., Sanchez, J.C., Muller, B.W., Muller, R.H. (1993) Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-electrophoresis. *Electrophoresis* 14:1382-1387

## Literatur

- [Bonifaz] Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., Steinman, R.M. (2002) Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8<sup>+</sup> T cell tolerance. *J Exp Med* 196:1627-1638
- [Bosma] Bosma, G.C., Custer, R.P., Bosma, M.J. (1983) A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. *Nature* 301:527-530
- [Bouneaud] Bouneaud, C., Kourilsky, P., Bousso, P. (2000) Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity* 13:829-40
- [Brasel] Brasel, K., McKenna, H.J., Morrissey, P.J., Charrier, K., Morris, A.E., Lee, C.C., Williams, D.E., Lyman, S.D. (1996) Hematologic effects of flt3 ligand in vivo in mice. *Blood* 88:2004-2012
- [Brawand] Brawand, P., Fitzpatrick, D.R., Greenfield, B.W., Brasel, K., Maliszewski, C.R., De Smedt, T. (2002) Murine plasmacytoid pre-dendritic cells generated from flt3 ligand-supplemented bone marrow cultures are immature APCs. *J of Immunol* 169:6711-6719
- [Brocker] Brocker, T., Riedinger, M., Karjalainen, K. (1997) Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* 185:541-550
- [Brolen] Brolen, G.K., Heins, N., Edsbagge, J., Semb, H. (2005) Signals from the embryonic mouse pancreas induce differentiation of human embryonic stem cells into insulin-producing  $\beta$ -cell-like cells. *Diabetes* 54:2867-2874
- [Bryder] Bryder, D., Rossi, D.J., Weissman, I.L. (2006) Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* 169:338-346
- [Buckley] Buckley, R.H. (2004) Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. *Annu Rev Immunol* 22:625-55
- [Bursch] Bursch, L.S. et. al. (2007) Identification of a novel population of langerin<sup>+</sup> dendritic cells. *J Exp Med* 204:3147-3156
- [Camacho] Camacho, R.E., Wnek, R., Shah, K., Zaller, D.M., O'Reilly, R.J., Collins, N., Fitzgerald-Bocarsly, P., Koo, G.C. (2004) Intra-thymic/splenic engraftment of human T cells in HLA-DR1 transgenic NOD/scid mice. *Cell Immunol* 232:86-95
- [Cambi] Cambi, A., Lidke, D.S., Arndt-Jovin, D.J., Figdor, C.G., Jovin, T.M. (2007) Ligand-conjugated quantum dots monitor antigen uptake and processing by dendritic cells. *Nano Lett* 7:970-7
- [Camner] Camner, P., Lundborg, M., Lastbom, L., Gerde, P., Gross, N., Jarstrand, C. (2002) Experimental and calculated parameters on particle phagocytosis by alveolar macrophages. *J. Appl. Physiol.* 92:2608-2616
- [Cashman] Cashman, J.D., Eaves, C.J. (1999) Human growth factor-enhanced regeneration of transplantable human hematopoietic stem cells nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Blood* 93:481-7

## Literatur

- [Caux ] Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., Banchereau, J. (1992) GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261
- [Caux ] Caux, C. et. al. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* 180:1263-1272
- [Cella] Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J., Lanzavecchia, A. (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388:782-787
- [Ceredig] Ceredig, R., Rauch, M., Balciunaite, G., Rolink, A.G. (2006) Increasing Flt3L availability alters composition of a novel bone marrow lymphoid progenitor compartment. *Blood* 108:1216-1222
- [Chakrabarti] Chakrabarti, S. et. al. (2003) T-cell depletion with Campath-1H "in the bag" for matched related allogeneic peripheral blood stem cell transplantation is associated with reduced graft-versus-host disease, rapid immune constitution and improved survival. *Br J Haematol.* 121:109
- [Chan] Chan, G.W., Gorgun, G., Miller, K.B., Foss, F.M. (2003) Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol of Blood Marrow Transpl* 9:170-176
- [Chen] Chen, Q., Khoury, M., Chen, J. (2009) Expression of human cytokines dramatically improves reconstitution of specific human-blood lineage cells in humanized mice. *PNAS* 106:21783-21788
- [Childs] Childs, R., Clave, E., Contentin, N. et. al. (1999) Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood* 94:3234-3241
- [Chklovskaja] Chklovskaja, E., Nowbakht, P., Nissen, C., Gratwohl, A., Bargetzi, M., Wodnar-Filipowicz, A. (2004) Reconstitution of dendritic and natural killer-cell subsets after allogeneic stem cell transplantation: effects of endogenous flt ligand. *Blood* 103:3860-3868
- [Clark] Clark, F.J., Freeman, L., Dzionek, A. et. al. (2003) Origin and subset distribution of peripheral blood dendritic cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Transpl* 75:221-225
- [Coleman] Coleman, D.L., Gregonis, D.E., Andrade, J.D. (1982) Blood materials interactions: the minimum interfacial free energy and the optimum polar/apolar ratio hypotheses. *J Biomed Mat Research* 16:381-398
- [Cravens] Cravens, P.D., Melkus, M.W., Padgett-Thomas, A., Islas-Ohlmayer, M., del P.Martin, M., Garcia, J.V. (2005) Development and Activation of human dendritic cells in vivo in a xenograft model of human hematopoiesis. *Stem Cells* 23:264-278
- [Creusot] Creusot, R.J., Yaghoubi, S.S., Chang, P., Chia, J., Contag, C.H., Gambhir, S.S. et. al. (2009) Lymphoid-tissue-specific homing of bone-marrow-derived dendritic cells. *Blood* 113:6638-47
- [Cserhati] Cserhati, T., Forgacs, E., Oros, G. (2002) Biological activity and environmental impact of anionic surfactants. *Environ Int.* 28:337-48

## Literatur

- [Cutler] Cutler, C., Giri, S., Jeyapalan, S., Paniagua, D., Viswanathan, A., Antin, J.H. (2001) Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and bone marrow transplantation. *J Clinical Oncology* 19:3685-3691
- [Dao] Dao, M.A., Shah, A.J., Crooks, G.M., Nolta, J.A. (1998) Engraftment and retroviral marking of CD34<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> human hematopoietic progenitors assessed in immune-deficient mice. *Blood* 91:1243-55
- [Dao] Dao, M.A., Pepper, K.A., Nolta, J.A. (1997) Long-term cytokine production from engineered primary human stromal cells influences human hematopoiesis in an in vivo xenograft model. *Stem Cells* 15:443-454
- [Delves ] Delves, P., Roitt, I. (2000) The immune system-First of two parts. *New Eng J Med* 343:37-49
- [Delves ] Delves, P., Roitt, I. (2000) The immune system-Second of two parts. *New Eng J Med* 343:108-117
- [Demento] Demento, S.L., Eisenbarth, S.C., Foellmer, H.G., Platt, C., Caplan, M.J., Mark Saltzman, W. et. al. (2009) Inflammasome-activating nanoparticles as modular systems for optimizing vaccine efficacy. *Vaccine* 27:3013-21
- [Di Ianni] Di Ianni, M., Del Papa, B., De Ioanni, M., Sportoletti, P., Moretti, L., Falzetti, F., Martelli, M.F., Tabilio, A. (2004) Mesenchymal cells: a vehicle for gene therapy. *Blood Cells Mol Dis* 33:267-70
- [Dick] Dick, J.E., Lapidot, T. (2005) Biology of normal and acute myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol* 82:389-396
- [Diebold] Diebold, S. S. et. al. (2002) Mannose receptor-mediated gene delivery into antigen presenting dendritic cells. *Soamt. Cell Mol. Genet.* 27:65
- [Diehl] Diehl, A., Stoelting, S., Nadrowith, R., Wagner, T., Peters, S.O. (2007) Improved hematopoietic stem cell engraftment following ex vivo expansion of murine marrow cells with SCF and Flt3L. *Cytotherapy* 9:532-538
- [Distler] Distler, E., Wölfel, C., Köhler, S., Nonn, M., Kaus, N., Schnürer, E., Meyer, R.G., Wehler, T., Huber, C., Wölfel, T., Hartwig, U.F., Herr, W. (2008) Acute myeloid leukemia (AML)-reactive cytotoxic T lymphocyte clones rapidly expanded from CD8<sup>+</sup> CD62L<sup>(high)</sup> T cells of healthy donors prevent AML engraftment in NOD/SCID IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice. *Exp. Hematol* 36:451-463
- [Diwan] Diwan, M. et. al. (2004) Biodegradable nanoparticle mediated antigen delivery to human cord blood derived dendritic cells for induction of primary T cell responses. *J of Drug Targeting* 11:495
- [Drake] Drake, A.C., Khoury, M., Leskov, I., Iliopoulou, B.P., Fragoso, M., Lodish, H. et.al. (2011) Human CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> hematopoietic stem cells cultured with growth factors including Angptl5 efficiently engraft adult NOD-SCID Il2r $\gamma$ <sup>-/-</sup> (NSG) mice. *PLoS One* 6:e18382
- [Droetto] Droetto, S. et. al. (2004) Vasculogenic potential of long term repopulating cord blood progenitors. *FASEB J* 18:1273-1275
- [Duffner] Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R. et. al. (2004) Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* 172:7393-7398

## Literatur

- [Eggert] Eggert, A., Schreurs, M., Boeman, O. et. al. (1999) Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. *Cancer Res.* 59:3340-3345
- [Egner] Egner, W., Hart, D.N. (1995) The phenotype of freshly isolated and cultured human bone marrow allostimulatory cells: possible heterogeneity in bone marrow dendritic cell populations. *Immunology* 85:611-620
- [Elamanchili] Elamanchili, P., Lutsiak, C.M.E., Hamdy, S., Diwan, M., Samuel, J. (2007) Pathogen-mimicking nanoparticles for vaccine delivery to dendritic cell. *J Immun* 30:378-395
- [Engering] Engering, A.J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E.C., Lanzavecchia, A., Pieters, J. (1997) The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur J Immunol* 27:2417-25
- [Fagnoni] Fagnoni, F.F., Oliviero, B., Giorgiani, G., et. al. (2004) Reconstitution dynamics of plasmacytoid and myeloid dendritic cell precursors after allogeneic myeloablative hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 104:281-289
- [Fanger] Fanger, N.A., Wardell, K., Shen, L., Tedder, T.F., Guyre, P.M. (1996) Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157:541-8
- [Fazekas de St Groth] Fazekas de St Groth, B.F. (1998) The evolution of self-tolerance: a new cell arises to meet the challenge of self-reactivity. *Immunol. Today* 19:448-454
- [Ferrara] Ferrara, J. et. al. (2009) Graft-versus-host disease. *The Lancet* 373:1550-1561
- [Foote] Foote, M. (2007) Using nanotechnology to improve the characteristics of antineoplastic drugs: improved characteristics of *nab*-paclitaxel compared with solvent-based paclitaxel. *Biotechnol. Annu. Rev.* 13:345-357
- [Frick] Frick, S.U., Bacher, N., Baier, G., Mailänder, V., Landfester, K., Steinbrink, K. (2012) Functionalized polystyrene nanoparticles trigger human dendritic cell maturation resulting in enhanced CD4<sup>+</sup> T cell activation. *Macromol. Biosci.* DOI:10.1002/mabi.201200223
- [Fulop] Fulop, G.M., Phillips, R.A. (1990) The scid mutation in mice causes a general defect in DNA repair. *Nature* 347:479-482
- [Gbadamosi] Gbadamosi, J.K., Hunter, A.C., Moghimi, S.M. (2002) PEGylation of microspheres generates a heterogeneous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *FEBS Lett.* 532:338-44
- [Gessner] Gessner, A., Lieske, A., Paulke, B.R., Müller, R.H. (2002) Functional groups on polystyrene model nanoparticles: Influence on protein adsorption. *J. Biomed. Mater. Revs. A.* 65:319-326
- [Gille] Gille, C., Orlikowsky, T.W., Spring, B., Hartwig, U.F., Wilhelm, A., Wirth, A., Goecke, B., Handgretinger, R., Poets, C.F., André, M.C. (2012) Monocytes derived from humanized neonatal NOD/SCID/IL2R $\gamma$ <sup>null</sup> mice are phenotypically immature and exhibit functional impairments. *Human Immunol* 73:346-354

## Literatur

- [Gimeno] Gimeno, R., Weijer K., Voordouw, A., Uittenbogaart, C.H., Legrand, N., Alves, N.L., Wijnands, E., Blom, B., Spits, H. (2004) Monitoring the effect of gene silencing by RNA interference in human CD34+ cells injected into newborn RAG2-/-gammac-/-mice: functional inactivation of p53 in developing T cells. *Blood* 104:3886-93
- [Ginhoux ] Ginhoux, F. et. al. (2007) Blood-derived dermal langerin<sup>+</sup> dendritic cells survey the skin in the steady state. *J Exp Med* 204:3133-3146
- [Ginhoux] Ginhoux, F. et. al. (2006) Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol* 7:265-273
- [Giralt] Giralt, S., Hester, J., Huh, Y., Hirsch-Ginsberg, C., Rondon, G., Seong, D. et. al. (1995) CD8-depleted donor lymphocyte infusion as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 86:4337-43
- [Girardi] Girardi, M. (2006) Immunosurveillance and immunoregulation by  $\gamma\delta$  T cells. *J Invest Dermatol* 126:25-31
- [Goppert] Goppert, T.M., Muller, R.H. (2005) Adsorption kinetics of plasma proteins on solid lipid nanoparticles for drug targeting. *Int. J. Pharm.* 302:172-186
- [Gratwohl] Gratwohl, A. (2004) EBMT JACIE Accreditation office. Overview of transplant activity in Europe. *Hematology Journal* 5:29-33
- [Gref] Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M.T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., Langer, R. (1994) Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science* 263:1600-3
- [Greiner] Greiner, D.L., Hesselton, R.A., Shultz, L.D. (1998) SCID mouse models of human stem cell engraftment. *Stem Cells* 16:166-77
- [Griffiths] Griffiths, C.E.M., Dearman, R.J., Cumberbatch, M., Kimber, I. (2005) Cytokines and Langerhans cell mobilisation in mouse and man. *Cytokine* 32:67-70
- [Grouard] Grouard, G., Rissoan, M.C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., Liu, Y.J. (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin(IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 185:1101-1111
- [Guirado] Guirado, E. et. al. (2006) Passive serum therapy with polyclonal antibodies against Mycobacterium tuberculosis protects against post-chemotherapy relapse of tuberculosis infection in SCID mice. *Microbes Infect* 8:1252-1259
- [Hannum] Hannum, C., Culpepper, J., Campbell, D., McClanahan, T., Zurawski, S., Bazan, J.F., Kastelein, R., Hudak, S., Wagner, J., Mattson, J. et. al. (1994) Ligand for flt3/flk2 receptor regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs. *Nature* 368:643-648
- [Hart] Hart, D.N. (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287
- [Hayakawa] Hayakawa, J., Hsieh, M.M., Uchida, N., Phang, O., Tisdale, J.F. (2009) Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2R $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice. *Stem Cells* 27:175-182

## Literatur

- [He] He, C. et. al. (2010) Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31:3657
- [Heath] Heath, W.R., Mueller, S.N. (2012) Hair follicles: gatekeepers to the epidermis. *Nat. Immunol.* 13:715-717
- [Hemmerling] Hemmerling, J., Wegner-Kops, J., von Stebut, E., Wolff, D., Wagner, E.M., Hartwig, U.F., André, M.C., Theobald, M., Schopf, R.E., Herr, W., Meyer, R.G. (2011) Human epidermal langerhans cells replenish skin xenografts and are depleted by alloreactive t cells in vivo. *J Immunol* 187:1142-1149
- [Hesselton] Hesselton, R.M. , Greiner, D.L., Mordes, J.P., Rajan, T.V., Sullivan, J.L., Shultz, L.D. (1995) High levels of human peripheral blood mononuclear cell engraftment and enhanced susceptibility to HIV-1 infection in NOD/LtSz-scid/scid mice. *J Inf Dis* 172:774-782
- [Hirn] Hirn, S. et. al. (2011) Particle size-dependent and surface charge-dependent biodistribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 77:407
- [Hogan] Hogan, C.J., Shpall, E.J., McNulty, O., McNiece, I., Dick, J.E., Shultz, L.D., Keller, G. (1997) Engraftment and development of human CD34 (+)-enriched cells from umbilical cord blood in NOD/LtSz-scid/scid mice. *Blood* 90:85
- [Horan] Horan, J.T., Liesveld, J.L., Fernandez, I.D. et. al. (2003) Survival after HLA-identical allogeneic peripheral blood stem cell and bone marrow transplantation for hematologic malignancies: meta-analysis of randomized controlled trials. *Bone Marrow Transpl* 32:293-298
- [Horton] Horton, R. et. al. (2004) Gene map of the extended human MHC. *Nat Rev Genet* 5:889-899
- [Hubert] Hubert, P., Bousarghin, L., Greimers, R., Franzen-Detrooz, E., Boniver, J., Delvenne, P. (2005) Production of large numbers of Langerhans' cells with intraepithelial migration ability in vitro. *Exp. Dermatol.* 14:469-477
- [Hudson] Hudson, W.A., Li, Q., Le, C., Kersey, J.H. (1998) Xenotransplantation of human lymphoid malignancies is optimized in mice with multiple immunologic defects. *Leukemia* 12:2029-2033
- [Hunte] Hunte, B.E., Hudak, S., Campbell, D., Xu, Y., Rennick, D. (1996) Flk2/flt3 ligand is a potent cofactor for the growth of primitive B cell progenitors. *J Immunol.* 156:489-96
- [Huntington] Huntington, N.D. et. al. (2009) IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo. *J Exp Med* 206:25-34
- [Idoyaga] Idoyaga, J., Steinman, R.M. (2001) Snap shot: Dendritic cells. *Cell* 146:660-660.e2.
- [Ifversen] Ifversen, P., Borrebaeck, C.A., (1996) SCID-hu-PBL: a model for making human antibodies? *Semin Immunol* 8:243-248
- [Iijima] Iijima, N., Thmpson, J.M., Iwasaki, A. (2008) Dendritic cells and macrophages in the genitourinary tract. *Mucosal Immunol* 1:451-459

## Literatur

- [Inaba] Inaba, K., Turley, S., Yamaide, F., Iyoda, T., Mahnke, K., Inaba, M., Pack, M., Subklewe, M., Sauter, B., Sheff, D., Albert, M., Bhardwaj, Mellman, I., Steinman, R.M. (1998) Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 188:2163-73
- [Inaba] Inaba, K. et. al. (1997) High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from lymph node. *J. Exp. Med.* 186:665-672
- [Inaba] Inaba, K. et. al. (1994) The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells *in situ* and during maturation *in vitro*. *J. Exp. Med.* 180:1849-1860
- [Ishikawa ] Ishikawa, F. et. al. (2005) Development of functional human blood and immune systems in NOD/SCID/IL2 receptor  $\gamma$ -chain(null) mice. *Blood* 106:1565-1573
- [Ishikawa ] Ishikawa, F., Shimazu, H., Shultz, L.D., Fukata, M., Nakamura, R., Lyons, B., Shimoda, K., Shimoda, S., Kanemaru, T., Nakamura, K, Ito, H., Kaji, Y., Perry, A.C., Harada, M. (2006) Purified human hematopoietic stem cells contribute to the generation of cardiomyocytes through cell fusion. *FASEB J* 20:950-2
- [Ishimoto] Ishimoto, H., Yanagihara, K., Araki, N., Mukae, H., Sakamoto, N., Izumikawa, K. et. al. (2008) Single-cell observation of phagocytosis by human blood dendritic cells. *Jpn J Infect Dis* 61:294-7
- [Islas-Ohlmayer] Islas-Ohlmayer, M. et. al. (2004) Experimental infection of NOD/SCID mice reconstituted with human CD34<sup>+</sup> cells with Epstein-Barr virus. *J. Virol.* 78:13891-13900
- [Ito] Ito, H., Hiramatsu, H., Kobayashi, K., Suzue, K., Kawahata, M., Hioko, K., Ueyama, Y., Koyanagi, Y., Sugamura, K., Tsuji, K., Heike, T., Nakahata, T. (2002) NOD/SCID gammac<sup>-/-</sup> mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 100:3175-82
- [Jiang] Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., Nussenzweig, M.C. (1995) The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375:151-5
- [Jiang] Jiang, Q., Li, W.Q., Aiello, F.B., Mazzucchelli, R., Asefa, B., Khaled, A.R., Durum, S.K. (2005) Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 16:513-533
- [Jiao] Jiao, Y., Ubrich, N., Marchand-Arvier, M., Vigneron, C., Hoffman, M., Leconte, T., Maincent, P. (2002) *Circulation* 105:230-235
- [Kakinuma] Kakinuma, S. et. al. (2003) Human umbilical cord blood as a source of transplantable hepatic progenitor cells. *Stem Cells* 21:217-227
- [Kapp] Kapp, U., Bhatia, M., Bonnet, D., Murdoch, B., Dick, J.E. (1998) Treatment of Non-Obese Diabetic (NOD)/Severe-combined immunodeficient mice (SCID) with flt3 ligand and interleukin-7 impairs the B-lineage commitment of repopulating cells after transplantation of human hematopoietic cells



## Literatur

- [Kappler] Kappler, J.W. et. al. (1987) T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49:273-280
- [Kawai] Kawai, T., Akira, S. (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11:373-84
- [Kissenpfennig] Kissenpfennig, A. et. al. (2005) Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity* 22:643-654
- [Kitabayashi] Kitabayashi, A., Hirokawa, M., Hatano, Y. et. al. (1995) Granulocyte colony-stimulating factor down-regulate allogeneic immune responses by posttranscriptional inhibition of tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Blood* 86:2220-2227
- [Klanginsirikul] Klanginsirikul, P., Russell, N. (2002) Peripheral blood stem cell harvests from G-CSF-stimulated donors contain a skewed TH2 CD4 phenotype and a predominance of type 2 dendritic cells. *Exp Hematol* 30:495-501
- [Klein ] Klein, J., Sato, A. (2000) The HLA System- First of two parts. *New Engl J Med* 343:702-709
- [Klein ] Klein, J., Sato, A. (2000) The HLA System-Second of two parts. *New Eng J Med* 343:782-786
- [Kneteman] Kneteman, N.M. et. al. (2006) Anti-HCV therapies in chimeric scid-Alb/uPA mice parallel outcomes in human clinical application. *Hepatology* 43:1346-1353
- [Kolb] Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W. et. al. (1995) Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood* 86:2041-50
- [Koyama] Koyama, M. et. al. (2011) Recipient nonhematopoietic antigen-presenting cells are sufficient to induce lethal acute graft-versus-host disease. *Nature Medicine* 18:135-143
- [Körbling] Körbling, M., Anderlini, P. (2001) Peripheral blood stem cell versus bone marrow allotransplantation: does the source of hematopoietic stem cells matter? *Blood* 98:2900-2908
- [Krenger] Krenger, W., Hill, G.R., Ferrara, J.L. (1997) Cytokine cascades in acute graft-versus-host disease. *Transplantation* 64:553-558
- [Kreuter] Kreuter, J., Hekmatara, T., Dreis, S., Vogel, T., Gelperina, S., Langer, K. (2007) Covalent attachment of apolipoprotein A-1 and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain. *J. Control. Release* 118:54-58
- [Krueger] Krueger, G.G., Daynes, R.A., Emam, M. (1983) Biology of Langerhans cells: selective migration of Langerhans cells into allogeneic and xenogeneic grafts on nude mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1650-1654
- [Kwiek] Kwiek, B., Peng, W.M., Allam, J.P., Langner, A., Bieber, T., Novak, N. (2008) Tacrolimus and TGF- $\beta$  act synergistically on the generation of Langerhans cells. *J Allergy Clin Immunol.* 122:126-132

## Literatur

- [Landfester] Landfester, K. (2006) Surfactant concentration regime in miniemulsion polymerization for the formation of MMA nanodroplets by high-pressure homogenization. *Annu. Rev. Mater. Res.* 36:231-27
- [Lane] Lane, T.A., Law, P., Maruyama, M., Young, D., Burgess, J., Mullen, M., Mealiffe, M., Terstappen, L.W., Hardwick, A., Moubayed, M. et. al. (1995) Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by GM-CSF or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 85:275-82
- [Langerhans] Langerhans, P. (1868) Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch* 44:325-337
- [Lapidot] Lapidot, T., Pflumio, F., Deodens, M., Murdoch, B., Williams, D.E., Dick, J.E. (1992) Cytokine stimulation of multi lineage hematopoiesis from immature human cells engrafted in SCID mice. *Science* 255:1137-1141
- [Li] Li, X., Raghavan, M. (2010) Structure and function of major histocompatibility complex class I antigens. *Curr Op Org Transpl* 15:499-504
- [Li] Li, H. et. al. (2011) Langerhans cells are not required for graft-versus-host disease. *Blood* 117:697-707
- [Loiseau] Loiseau, P., Espérou, H., Busson, M., Sghiri, R., Tamouza, R., Hilarius, M., Raffoux, C., Devergie, A., Ribaud, P., Socié, G., Gluckmann, E., Charron, D. (2002) DPB1 disparities contribute to severe GVHD and reduced patient survival after unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 30:497-502
- [Lorenz] Lorenz, M.R., Holzapfel, V., Musyanovych, A., Nothelfer, K., Walther, P., Frank, H., Landfester, K., Schrezenmeier, H., Mailänder, V. (2006) Uptake of functionalized fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells. *Biomaterials* 27:2820-8
- [Lowry] Lowry, P.A., Shultz, L.D., Greiner, D.L., Hesselton, R.M., Kittler, E.L., Tiarks, C.Y., Rao, S.S., Reilly, J., Leif, J.H., Ramshaw, H., Stewart, F.M., Quesenberry, P.J. (1996) Improved engraftment of human cord blood stem cells in NOD/LtSz- scid/scid mice after irradiation or multiple-day injections into unirradiated recipients. *Biol Blood Marrow Transplant* 2:15-23
- [Lundström] Lundström, W., Fewkes, N.M., Mackall, C.L. (2012) IL-7 in human health and disease. *Semin Immunol* 24:218-24
- [Lynch] Lynch, I., Cedervall, M., Lundqvist, Cabaleiro-Lago, C., Linse, S., Dawson, K.A. (2007) The nanoparticle-protein complex as a biological entity: a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. *Adv. Colloid Interface Sci.* 167-174
- [Lyman] Lyman, S.D., Brasel, K., Rousseau, A.-M., Williams, D.E. (1994) The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. *Stem Cells* 12:99-107
- [Lyman] Lyman, S.D., Maraskovsky, E., McKenna, H.J. (1998) Flt3 Ligand. In the *Cytokine Handbook*, Thompson AW (Ed). Academic Press, San Diego (in press), 1998

## Literatur

- [Lyman] Lyman, S.D., Jacobsen, S.E. (1998) c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91:1101-1134
- [Macho-Fernandez] Macho-Fernandez, E. et. al. (2012) Activation of invariant natural Killer T lymphocytes in response to the alpha-galactosylceramide analogue KRN7000 encapsulated in PGLA-based nanoparticles and microparticles. *Int. J. Pharm.* 423:45-54
- [Mackarehtschian] Mackarehtschian, K., Hardin, J.D., Moore, K.A., Boast, S., Goff, S.P., Lemischka, I.R. (1995) Targeted disruption of the *flk2/flt3* gene leads to deficiencies in primitive hematopoietic progenitors. *Immunity* 3:147
- [Maki] Maki, K., Sunaga, S., Komagata, Y., Kodaira, Y., Mabuchi, A., Karasuyama, H., Yokomuro, K., Miyazaki, J.I., Ikuta, K. (1996) Interleukin 7 receptor-deficient mice lack  $\gamma\delta$  T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:7172-7177
- [Maldiney] Maldiney, T. et. al. (2011) Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice. *ACS Nano*. 5:854
- [Manolova] Manolova, V., Flace A., Bauer, M., Schwarz, K., Saudan, P., Bachmann, M.F. (2008) Nanoparticles target distinct dendritic cell populations according to their size. *Eur J Immunol* 38:1404-13
- [Maraskovsky] Maraskovsky, E., Daro, E., Roux, E., Teepe, M., Maliszewski, C.R., Hoek, J., Caron, D., Lebsack, M.E., McKenna, H.J. (2000) In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand. *Blood* 96:878-884
- [Maraskovsky] Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., McKenna, H.J. (1996) Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med* 184:1953-1962
- [Marmont] Marmont, A.M., Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sobocinski, K., Ash, R.C., van Bekkum, D.W. et. al. (1991) T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 78:2120-30
- [Matsumura] Matsumura, T., Kametani, Y., Ando, K., Hirano, Y., Katano, I., Ito R. et al. (2003) Functional CD5<sup>+</sup> B cells develop predominantly in the spleen of NOD/SCID/ $\gamma c^{-/-}$  (NOG) mice transplanted either with human umbilical cord blood, bone marrow or mobilized peripheral blood CD34<sup>+</sup> cells. *Exp. hematol* 31:789-797
- [Matzinger] Matzinger, P. (1994) Tolerance, danger and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045
- [Mayer] Mayer, W.J. et. al. (2007) Characterization of antigen-presenting cells in fresh and cultured human corneas using novel dendritic cell markers. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:4459-4467
- [Mazurier] Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O.I., Dick, J.E. (2003) Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat Med* 9:959-63
- [Mazzucchelli] Mazzucchelli, R., Durum, S.K. (2007) Interleukin-7 receptor expression: intelligent design. *Nat. Rev. Immunol.* 7:144-154

## Literatur

- [McCune] McCune, J.M., Namikawa, R., Kaneshima, H., Shultz, L.D., Lieberman, M., Weissman, I.L. (1988) The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function. *Science* 241:1632-9
- [McDermott] McDermott, S.P., Eppert, K., Lechman, E.R., Doedens, M., Dick, J.E. (2010) Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains. *Blood* 116:193-200
- [McKenna] McKenna, H.J., Stocking, K.L., Miller, R.E., Brasel, K., De Smedt, T., Marakovsky, E., Maliszewski, C.R., Lynch, D.H., Smith, J., Pulendran, B. et al. (2000) Mice lacking Flt3 ligand have deficient hematopoiesis affecting hematopoietic progenitor cells, dendritic cells and natural killer cells. *Blood* 95:3489
- [McKenna] McKenna, H.J., de Vries, P., Brasel, K., Lyman, S.D., Williams, D.E. (1995) Effect of flt3 ligand on the ex vivo expansion of human CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 86:3413-3420
- [McNeil] McNeil, S.E., et al. (2005) Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.* 78:585
- [Mekus] Mekus, M.W. et al. (2006) Humanized mice mount specific adaptive and innate immune response to EBV and TSST-1. *Nature Med* 12:1316-1322
- [Merad] Merad, M., Hoffmann, P., Ranheim, E. et al. (2004) Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat Med* 10:510-517
- [Merad] Merad, M., Manz, M.G., Karsunky, H. et al. (2002) Langerhans cells renew in skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 3:1135-1141
- [Mercurio] Mercurio, A.M., Schwarting, G.A., Robbins, P.W. (1984) Glycolipids of the mouse peritoneal macrophage. *J. Exp. Med.* 160:1114-1125
- [Miltenyi] Miltenyi, S. (1997) CD34<sup>+</sup> Selection: The Basic component for graft engineering. *Oncologist* 2:410-413
- [Mohty] Mohty, M., Blaise, D., Faucher, C. et al. (2005) Impact of plasmacytoid dendritic cells on outcome after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 19:1-6
- [Mombaerts] Mombaerts, P. et al. (1992) RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes. *Cell* 68:869-877
- [Mosier] Mosier, D.E., Gulizia, R.J., Baird, S.M., Wilson, D.B. (1988) Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* 335:256-9
- [Murphy] Murphy, G.F., Messadi, D., Fonferko, E., Hancock, W.W. (1986) Phenotypic transformation of macrophages to Langerhans cells in the skin. *Am J Pathol* 123:401-406
- [Murphy] Murphy, W.J., Taub, D.D., Longo, D.L. (1996) The huPBL-SCID mouse as a means to examine human immune function in vivo. *Semin Immunol* 8:233-241
- [Musso] Musso, T. et al. (2008) Activin A induces langerhans cell differentiation in vitro and in human skin explants. *PLoS ONE* 3:e3271

## Literatur

- [Nachbaur] Nachbaur, D., Kircher, B., Eisendle, K., Lätzer, K., Haun, M., Gastl, G. (2003) Phenotype, function and chimerism of monocyte-blood derived dendritic cells after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *British J Of Hematol* 123:119-126
- [Nagao] Nagao, K. et. al. (2009) Murine epidermal Langerhans cells and langerin-expressing dermal dendritic cells are unrelated and exhibit distinct functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:3312-3317
- [Nagao] Nagao, K., et. al. (2012) Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat. Immunol.* 13:744-754
- [Nakamura] Nakamura, Y. et. al. (2005) Engraftment of NOD/SCID/ $\gamma$ c(null) mice with multilineage neoplastic cells from patients with juvenile myelomonocytic leukemia. *Br J Haematol* 130:51-57
- [Noh] Noh, Y.W., Lim, Y.T., Chung, B.H. (2008) Noninvasive imaging of dendritic cell migration into lymph nodes using near-infrared fluorescent semiconductor nanocrystals. *FASEB J* 22:3908-18
- [O'Brien] O'Brien, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., Dick, J.E. (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumor growth in immunodeficient mice. *Nature* 445:106-110
- [Ogawara] Ogawara, K., Furumoto, K., Nagayama, S., Minato, K., Higaki, K., Kai, T., Kimura, T. (2004) Precoating with serum albumin reduces receptor-mediated hepatic disposition of polystyrene nanosphere: implications for rational design of nanoparticles. *J. Control Release* 100:451-455
- [Ohbo] Ohbo, K., Suda, T., Hashiyama, M., Mantani, A., Ikebe, M., Miyakawa, K., Moriyama, M., Nakamura, M., Katsuki, M., Takahashi, K., Yamamura, K., Sugamura, K. (1996) Modulation of hematopoiesis in mice with a truncated mutant of the interleukin-2 receptor gamma chain. *Blood* 87:956-67
- [Olweus] Olweus, J., Bitmansour, A., Warnke R. et. al. (1997) Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:1255-12556
- [Owens] Owens, D.E., Peppas, N.A. (2006) Opsonization, biodistribution and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 307:93-102
- [Ozcan] Ozcan, I., et. al. (2010) Pegylation of poly(gamma-benzyl-L-glutamate) nanoparticles is efficient for avoiding mononuclear phagocyte system capture in rats. *Int. J Nanomedicine* 5:1103
- [Palucka] Palucka, A.K., Gatlin, J., Blanck, J.P., Melkus, M.W., Clayton, S., Ueno, H., Kraus, E.T., Cravens, P., Bennett, L., Padgett-Thomas, A., Marches, F., Islas-Ohlmayer, M., Garcia, J.V., Banchereau, J. (2003) Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitors. *Blood* 102:3302-10
- [Parkin] Parkin, J., Cohen, B. (2001) An overview of the immune system. *Lancet* 357:1777-89

## Literatur

- [Parkman] Parkman, R., Weinberg, K.I. (2004) Immune reconstitution following hematopoietic cell transplantation. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editors. Thomas' hematopoietic cell transplantation. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing p 853-861
- [Pelletier] Pelletier, M., Perreault, C., Landry, D., Davis, M., Montplaisir, S. (1984) Ontogeny of human epidermal Langerhans cells. *Transplantation* 38:544-546
- [Perez] Perez, L.E., Alpdogan, O., Shieh, J.H., Wong, D., Merzouk, A., Salari, H., O'Reilly, R.J., van den Brink, M.R., Moore, M.A. (2004) Increased plasma levels of SDF-1/CXCL12 enhance human thrombopoiesis and mobilize human colony-forming cells (CFC) in NOD/SCID mice. *Exp Hematol.* 32:300-7
- [Pflumio] Pflumio, F., Izac, B., Katz, A., Shultz, L.D., Vainchenker, W., Coulombel, L. (1996) Phenotype and function of human hematopoietic cells engrafting immune-deficient CB17-severe combined immunodeficiency mice and nonobese diabetic-severe combined immunodeficiency mice after transplantation of human cord blood mononuclear cells. *Blood* 88:3731-40
- [Pidala] Pidala, J. (2011) Graft-versus-host disease following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Cancer Control* 18:268-76
- [Pilarski] Pilarski, L.M., Belch, A.R. (2002) Clonotypic myeloma cells able to engraft myeloma to nonobese diabetic severe combined immunodeficient mice copurify with CD34+ hematopoietic progenitors. *Clin Cancer Res* 8:3198-3204
- [Platzbecker] Platzbecker, U., Ehniger, G., Bornhauser, M. (2004) Allogeneic transplantation of CD34+ selected hematopoietic cells-clinical problems and current challenges. *Leuk Lymphoma* 45:447-53
- [Poulin] Poulin, L.F., Henri, S., de Bovis, B., Devillard, E., Kissenpfennig, A., Malissen, B. (2007) The Dermis contains langerin<sup>+</sup> dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 204:3119-3131
- [Przepiorka] Przepiorka, D., Anderlini, P., Saliba, R., Cleary, K., Mehra, R., Khouri, I., Huh, Y.O., Giral, S., Braunschweig, I., van Besien, K., Champlin, R. (2001) Chronic graft-versus-host disease after allogeneic blood stem cell transplantation. *Blood* 98:1695-700
- [Przepiorka] Przepiorka, D., Weisdorf, D., Martin, P., Klingemann, H.G., Beatty, P., Hows, J. et. al. (1994) Consensus Conference on acute GVHD grading. *Bone Marrow Transplant* 15:825-8
- [Pulendran] Pulendran, B., Banchereau, J., Burkeholder, S., Kraus, E., Guinet, E., Chalouni, C., Caron, D., Maliszewski, C., Davoust, J., Fay, J., Palucka, K. (2000) Flt3-Ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets in vivo. *J of Immunol* 165:566-572
- [Randolph] Randolph, G.J., Beaulieu, S., Lebecque, S., Steinman, R.M., Muller, W.A. (1998) Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282:480-483
- [Rathinam] Rathinam, C., Poueymirou, W. T., Rojas, J., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Rongvaux, A., Eynon, E.E., Manz, M.G., Flavell, R.A. (2011) Efficient differentiation and function of human macrophages in humanized CSF-1 mice. *Blood* 118:3119-3128

## Literatur

- [Reddy] Reddy, V., Iturraspe, J.A., Tzolas, A.C., Meier-Kriesche, H.U., Schold, J., Wingard, J.R. (2004) Low dendritic cell count after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation predicts relapse, death and acute graft-versus-host disease. *Blood* 103:4330-4335
- [Reis e Sousa] Reis e Sousa, C., Stahl, P.D., Austyn, J.M. (1993) Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* 178:509-19
- [Rejman] Rejman, J., Oberle, V., Zuhorn, I.S., Hoekstra, D. (2004) *Biochem J.* 377:159-169
- [Romani ] Romani, N. et. al. (1989) Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones: intact protein is presented best by immature epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 169:1169-1178
- [Romani] Romani, N. et. al. (2001) Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation and relevance. *Int Rev Cytol* 207:237-270
- [Romani ] Romani, N. et. al. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180:83-93
- [Rongvaux] Rongvaux, A., Willinger, T., Takizawa, H., Rathinam, C., Auerbach, W., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Eynon, E.E., Stevens, S., Manz, M.G., Flavell, R.A. (2010) Human thrombopoietin knockin mice efficiently support human hematopoiesis in vivo. *PNAS* 108:2378-2383
- [Roser] Roser, M., Fischer, D., Kissel, T. (1998) Surface-modified biodegradable albumin nano- and microspheres: Effect of surface charges on in vitro phagocytosis and biodistribution in rats. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 46:255-263
- [Rosnet] Rosnet, O., Schiff, C., Pebusque, M.-J., Marchetto, S., Tonnelle, C., Toiron, Y., Birg, F., Birnbaum, D. (1993) Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells. *Blood* 82:1110-1119
- [Rosnet] Rosnet, O., Buhring, H.J., Marchetto, S. et. al. (1996) Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia* 10:238-248
- [Russell] Russell, W.M.S., Burch, R.L. (1959) The principals of humane experimental technique. Methuen, Bethesda 238pp
- [Sallusto] Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182:389-100
- [Sallusto] Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999) Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function.
- [Samira] Samira, S., Ferrand, C., Peled, A., Nagler, A., Tovbin, Y., Ben-Hur, H., Taylor, N., Globerson, A., Lapidot, T. (2004) Tumor necrosis factor promotes human T-cell development in nonobese diabetic/severe combined immunodeficient mice. *Stem Cells* 22:1085-100

## Literatur

- [Santini] Santini, S.M., Spada, M., Parlato, S., Logozzi, M., Lapenta, C., Proietti, E., Belardelli, F., Fais, S. (1998) Treatment of severe combined immunodeficiency mice with anti-murine granulocyte monoclonal antibody improves human leukocyte xenotransplantation. *Transplantation* 65:416-20
- [Schoeberlein] Schoeberlein, A., Schatt, S., Troeger, C., Surbek, D., Holzgreve, W., Hahn, S. (2004) Engraftment kinetics of human cord blood and murine fetal liver stem cells following in utero transplantation into immunodeficient mice. *Stem Cells* 13:677-84
- [Schuler] Schuler, G., (1985) Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro. *J. Exp. Med.* 161:526-546
- [Semete] Semete, B., et. al. (2010) In vivo evaluation of the biodistribution and safety of PGLA nanoparticles as drug delivery systems. *Nanomedicine* 6:662
- [Sen] Sen, D., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H., Parker, I., Cahalan, M.D. (2008) Quantum dots for tracking dendritic cells and priming an immune response in vitro and in vivo. *PLoS One* 3:e3290
- [Serakinci] Serakinci, N., Keith, W.N. (2006) Therapeutic potential of adult stem cells. *Eur J Cancer* 42:1243-1246
- [Shen] 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
- [Shinkai] Shinkai, Y. et. al. (1992) RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867
- [Shlomchik] Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B. et. al. (1999) Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285:412-415
- [Shortman ] Shortman, K., Heath, W.R. (2001) Immunity or tolerance? That is the quwstion for dendritic cells. *Nature Immunol* 2:988-989
- [Shortman ] Shortman, K., Liu, Y.J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nature Rev Immunol* 2:151-161
- [Shultz] Shultz, L., Lyons, B., Burzenski, L., Gott, B., Chen, X., Chaleff, S., Kotb, M., Gillies, S., King, M., Greiner, D., Handgretinger, R. (2005) Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2rg null mice engrafted with mobilized human hematopoietic stem cells. *J Immunol* 174:6477-6489
- [Shultz ] Shultz, L.D., Schweitzer, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Schweitzer, I.B., Tennent, B., McKenna, S., Mobraaten, L., Rajan, T.V., Greiner, D.L. et. al. (1995) Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice. *J Immunol* 154:180-91
- [Shultz ] Shultz, L.D., Lang, P.A., Christianson, S.W., Gott, B., Lyons, B., Umeda, S., Leiter, E., Hesselton, R., Wagar, E.J., Leif, J.H., Kollet, O., Lapidot, T., Greiner, D.L. (2000) NOD/LtSz-Rag1null mice: an immunodeficient and radioresistant model for engraftment of human hematolymphoid cells, HIV infection, and adoptive transfer of NOD mouse diabetogenic T cells. *J Immunol* 164:2496-507



## Literatur

- [Shultz ] Shultz, L.D., Banuelos, S., Lyons, B., Samuels, R., Burzenski, L., B.G, L and P, Leif, J., M.A., A.R. and Greiner, D.L. (2003) NOD/LtSz-Rag1nullPfpnull mice: a new model system to increase levels of human peripheral leukocyte and hematopoietic stem cell engraftment. *Transplantation* 76:1036-1042
- [Shultz ] Shultz, L.D., Ishikawa, F., Greiner, D.L. (2007) Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 7:118-30
- [Sigal] Sigal, F.P. et. al. (1999) The nature of the principal type I interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837
- [Singh] Singh, S.K. et. al. (2004) Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432:396-401
- [Small] Small, D., Levenstein, M., Kim, E., Carow, C., Amin, S., Rockwell, P., Witte, L., Burrow, C., Ratajczak, M.Z., Gewirtz, A.M., Civin, C.L. (1994) STK-1, the human homolog of Flk-2/Flt-3, is selectively expressed in CD34-human bone marrow cells and is involved in the proliferation of early progenitor/stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:459-463
- [Solter] Solter, D. (2006) From teratocarcinomas to embryonic stem cells and beyond: a history of embryonic stem cell research. *Nature Rev Genet* 7:319-327
- [Stark] Stark, D.D., Weissleder, R., Elizondo, G., Hahn, P.F., Saini, S., Todd, L.E., Wittenberg, J., Ferrucci, J.T. (1988) *Radiology* 168:297-301
- [Steinman ] Steinman, R.M. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9:271-296
- [Steinman ] Steinman, R.M., Hawiger, D., Nussenzweig, M.C. (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21:685-711
- [Stoitzner] Stoitzner, P., Pfaller, K., Stössel, H., Romani, N. (2002) A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J Invest Dermatol* 118:117-125
- [Strowig] Strowig, T., Gurer, C., Ploss, A., Liu, Y., Arrey, F., Sashihara, J., Koo, G., Rice, C.M., Young, J.W., Chadburn, A., Cohen, J.I., Münz, C. (2009) Priming of protective T cell responses against virus-induced tumors in mice with human immune system components. *J. Exp. Med.* 206:1423-1434
- [Strunk] Strunk, D., Rappersberger, K., Egger, C., Strobl, H., Kromer, E., Elbe, A., Maurer, D., Stingl, G. (1996) Generation of human dendritic cells/Langerhans cells from circulating CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:1292-1302
- [Sugamura] Sugamura, K., Asao, H., Kondo, M., Tanaka, N., Ishii, N., Ohbo, K., Nakamura, M., Takeshita, T. (1996) The interleukin-2 receptor gamma chain: its role in the multiple cytokine receptor complexes and T cell development in XSCID. *Annu Rev Immunol* 14:179-205
- [Sullivan] Sullivan, K.M. (2004) Graft-versus-host disease. In. Blume KG, Forman SJ, Appelbaum FR, editors. *Thomas' hematopoietic cell transplantation*. 3<sup>rd</sup> ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing p 635-664
- [Sullivan] Sullivan, C.O., Birkinshaw, C. (2004) *Biomaterials* 25:4375-4382

## Literatur

- [Süss] Süss, G., Shortman, K. (1996) A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 183:1789-1796
- [Suttles] Suttles, J.G., Schwarting, G.A., Stout, R.D. (1986) Flow cytometric analysis reveals the presence of asialo-Gm on the surface membrane of alloimmune cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 136:1586-1591
- [Taguchi] Taguchi, A. et. al. (2004) Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 114:330-338
- [Takagi] Takagi, S., Saito, Y., Hijikata, A., Tanaka, S., Watanabe, T., Hasegawa, T., Mochizuki, S., Kunisawa, J., Kiyono, H., Koseki, H., Ohara, O., Saito, T., Taniguchi, S., Shultz, L.D., Ishikawa, F. (2012) Membrane-bound human SCF/KL promotes in vivo human hematopoietic engraftment and myeloid differentiation. *Blood* 119:2768-2777
- [Tanaka] Tanaka, S., Yoriko, S., Kunisawa, J., Kurashima, Y., Wake, T., Suzuki, N., Shultz, L.D., Kiyono, H., Ishikawa, F. (2012) Development of mature and functional human myeloid subsets in hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/Il2r $\gamma$ KO mice. *J Immunol* 188:6145-6155
- [Tang] Tang, A., Amagai, M., Granger, L.G., Stanley, J.R., Udey, M.C. (1993) Adhesion of epidermal Langerhans cells to keratinocytes mediated by E-cadherin. *Nature* 361:82-85
- [Tang] Tang, H.L., Cyster, J.G. (1999) Chemokine upregulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science* 284:819-822
- [Thomas] Thomas, J., Biggerstaff, M., Sloane, J. (1984) Immunological and histochemical analysis of regional variations of epidermal Langerhans cells in normal human skin. *Histo J* 16:507-519
- [Thomas] Thomas, S., Klobuch, S., Sommer, M., van Ewijk, R., Theobald, M., Meyer, R.G., Herr, W. (2013) Human memory versus naive derived CD8<sup>+</sup> T cells induce lower graft-versus-hematopoiesis effect in stem cell-engrafted NOD/SCID/IL-2R $\gamma$ c mice<sup>null</sup> making them attractive for T-cell receptor RNA therapy in allogeneic transplantation. in *Bearbeitung*
- [Torrente] Torrente, Y. et. al. (2004) Human circulating AC133+ stem cells restore dystrophin skeletal muscle. *J Clin Invest.* 114:182-195
- [Traggiai] Traggiai, E., Chicha, L., Mazzucchelli L., Bronz, L., Piffaretti, J.C., Lanzavecchia, A., Manz, M.G. (2004) Development of a human adaptive immune system in cord blood cell-transplanted mice. *Science* 304:104-7
- [Trombetta] Trombetta, E.S., Mellman, I. (2005) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23:975-1028
- [Ueno] Ueno, H. et.al. (2007) Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 219:118-142
- [Valladeau ] Valladeau, J. et.al. (2000) Langerin, a novel C-type lectin specific to Langerhans cells, is an endocytotic receptor that induces the formation of Birbeck granules. *Immunity* 12:71-81
- [Valladeau ] Valladeau, J. et.al. (2002) Identification of mouse Langerin/CD207 in Langerhans cells and some dendritic cells of lymphoid tissues. *J Immunol* 168:782-792

## Literatur

- [Valladeau ] Valladeau, J., Dezutter-Dambuyant, C., Saeland, S. (2003) Langerin/CD207 sheds light on formation of Birbeck granules and their possible function in Langerhans cells. *Immunol Res* 28:93-107
- [Veiby] Veiby, O.P., Jacobsen, F.W., Cui, L., Lyman, S.D., Jacobsen, S.E. (1997) The flt3 ligand promotes the survival of primitive hemopoietic progenitor cells with myeloid as well as B lymphoid potential. Suppression of apoptosis and counteraction by TNF-alpha and TGF-beta. *J Immunol* 157:2953-2960
- [Venkatraman] Venkatraman, S. S., et. al. (2010) Polymer-and liposome-based nanoparticles in targeted drug delivery. *Front Biosci (Schol. Ed)* 2:801
- [Von Freeden-Jeffrey] Von Freeden-Jeffrey, U., Vieira, P., Lucian, L.A., McNeil, T., Burdach, S.E., Murray, R. (1995) Lymphopenia in interleukin-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. *J Exp Med* 181:1519-1526
- [Vroman] Vroman, L., Adams, A.L., Fischer, G.C., Munoz, P.C. (1980) Interaction of high molecular weight kininogen, factor XII and fibrinogen in plasma at interfaces. *Blood* 55:156-159
- [Walker] Walker, E.K., Rosenthal, H., Jones, T.W. et. al. (2001) Larger numbers of CD4 bright dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantations. *Blood* 97:2948-2956
- [Waller] Waller, E.K., Rosenthal, H., Jones, T.W. et. al. (2001) Larger numbers of CD4 (bright) dendritic cells in donor bone marrow are associated with increased relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 97:2948-2956
- [Wang] Wang, G., Uludag, H. (2008) Recent developments in nanoparticle-based drug delivery and targeting systems with emphasis on protein-based nanoparticles. *Expert Opin. Drug Delivery* 5:499-515
- [Wang] Wang, J., Kimura, T., Asada, R., Harada, S., Yokota, S., Kawamoto, Y., Fujimura, Y., Tsuji, T., Ikehara, S., Sonoda, Y. (2003) SCID-repopulating cell activity of human cord blood-derived CD34- cells assured by intra-bone marrow injection. *Blood* 101:2924-31
- [Wang] Wang, Y., Szretter, K.J., Vermi, W., Gilfillan, S., Rossini, C., Cella, M., Barrow, A.D., Diamond, M.S., Colonna, M. (2012) IL-34 is a tissue-restricted ligand of CSF1R required for the development of Langerhans cells and microglia. *Nat. Immunol.* 13:753-762
- [Watanabe] Watanabe, S. et. al. (2007) Hematopoietic stem cell-engrafted NOD/SCID/Il2r $\gamma$ (null) mice develop human lymphoid system and induce long-lasting HIV-1 infection with specific humoral immune responses. *Blood* 109:212-218
- [Willinger] Willinger, T., Rongvaux, A., Takizawa, H., Yancopoulos, G.D., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Auerbach, W., Eynon, E.E., Stevens, S., Manz, M.G., Flavell, R.A. (2010) Human IL-3/GM-CSF knock-in mice support human alveolar macrophage development and human immune responses in the lung. *PNAS* 108:2390-2395
- [Wilson] Wilson, N.S., Villadangos, J.A. (2004) Lymphoid organ dendritic cells: beyond the Langerhans cells paradigm. *Immunol Cell Biol* 82:91-98

## *Literatur*

- [Wong] Wong, R., Giral, S., Martin, T. (2003) Reduced-intensity conditioning for unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation as treatment for myeloid malignancies in patients older than 55 years. *Blood* 102:3052-3059
- [Yahata] Yahata, T., Ando, K., Nakamura, Y., Ueyama, Y., Shimamura, K., Tamaoki, N., Kato, S., Hotta, T. (2002) Functional human T lymphocyte development from cord blood CD34+ cells in non-obese diabetic/Shi-scid, IL-2 receptor gamma null mice. *J Immunol* 169:204-9
- [Yoneyama] Yoneyama, H. et. al. (2004) Evidence for recruitment of plasmacytoid dendritic cell precursors to inflamed lymph nodes through high endothelial venules. *Int Immunol* 16:915-928
- [Zhang] Zhang, Y., Shlomchik, D., Joe, G. et. al. (2002) APCs in the liver and spleen recruit activated allogeneic CD8+ T cells to elicit hepatic graft-versus-host disease. *J Immunol* 169:7111-7118
- [Zupke] Zupke, O., Distler, E., Baumann, D., Strand, D., Meyer, R.G., Landfester, K., Herr, W., Mailänder, V. (2010) Preservation of dendritic cell function upon labeling with amino functionalized polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 31:7086-7095

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

7 AAD	7- Aminoactinomycin
Abb	Abbildung
AEC	3-Amino-9-Ethyl-Carbazol
APCs	Antigen-präsentierende Zellen
APC	Allophycocyanin
BFI	<i>biofluorescence imaging</i>
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDC	konventionelle DC
CMV	Cytomegalievirus
DCs	Dendritische Zellen
DLI	Donor Lymphozyten Infusion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein Barr Virus
ELISpot	<i>enzyme linked immuno spot technique</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GvHD	<i>Graft versus Host Disease</i>
GvL	<i>Graft versus Leukemia</i>
h	Stunde
HSC	hämatopoetische Stammzelle
HSCT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
iDC	<i>immature DC</i>
IFN	Interferon gamma
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IR	Infrarot
LCs	Langerhans Zellen
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	<i>magnetically activated cell sorting</i>
mDC	<i>mature DC</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
mg	Miligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Mililiter

## 7 Anhang

Mo-DC	<i>monocyte-derived DC</i>
n.a.	<i>not available</i>
NK Zellen	natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NOD	non-obese diabetic
NP	Nanopartikel
NSG	NOD- <i>scid</i> gamma chain
PBS	<i>phosphat-buffered saline</i>
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBSC	periphere Blutstammzellen
pDC	plasmazytoide DC
PE	Phycoerythrin
pp65	Phosphoprotein 65
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RES	retikuloendotheliales System
RIC	<i>reduced intensity conditiong</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SDF	<i>stromal cell-derived factor</i>
sec	Sekunde
TBI	<i>total body irradiation</i>
TCR	T-Zellrezeptor
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor

## 7.2 Danksagung





### 7.3 Lebenslauf

#### PERSÖNLICHE ANGABEN

---

Name  
Adresse

Geburtsdatum  
Geburtsort  
Staatsangehörigkeit

#### BERUFSERFAHRUNG

---

Wissenschaftliche Mitarbeiterin,  
Doktorandin 05/2009 - 2013      Johannes Gutenberg Universität, Mainz, Gruppe  
von PD R.G. Meyer  
“ Etablierung eines humanisierten Mausmodells  
zur in vivo Analyse DC-adressierter Nanopartikel”

Diplomarbeit, 05/2008 - 01/2009      Biomedizinisches Forschungszentrum, Marburg  
Gruppe von Prof. A. Maisner  
“Einfluss des Matrixproteins auf die Glykoprotein-  
vermittelte Zell-Zellfusion des Masern- und Nipah-  
virus”

#### AUSBILDUNG

---

05/2009 - 2013      Promotion an der Johannes Gutenberg Universität Mainz

10/2003 - 02/2009      Biologiestudium an der Philipps-Universität Marburg, Abschluss:  
Diplom

1994 - 2001      Walther Rathenau Gymnasium, Berlin, Abschluss: Abitur

## 7 Anhang

### PRAKTIKA

---

06/2007 - 09/2007 Laborpraktikum, Gruppe von Prof. Dr. Maisner, Virologie

### ZUSÄTZLICHE TÄTIGKEITEN

---

12/2006 - 02/2007

09/2002 - 08/2003

### WEITERE KENNTNISSE / QUALIFIKATIONEN

---

Qualifikationen Versuchstierkundliche Zertifizierung nach FELASA-Kategorie B, Grundkurs analytische Durchflusszytometrie bei BD

#### Sprachen

Deutsch	Muttersprache
Englisch	sehr gut in Wort und Schrift
Französisch	Basiswissen

Computerkenntnisse

### AUSSERUNIVERSITÄRE TÄTIGKEITEN

---

2011 - heute

PUBLIKATIONEN & KONGRESSBEITRÄGE

---

Publikationen:

Kongressbeiträge:

- National** M. Sommer, P. Okwieka, O. Zupke, M. Diken, G. Baier, D. Wolff, E. Distler, M. Theobald, U. Sahin, K. Landfester, W. Herr, V. Mailänder, R.G. Meyer: *Targeting dendritic cells with functionalized nanoparticles*; Cellular Therapy - Erlangen 2011
- M. Sommer, J. Hemmerling, D. Wolff, M.C. André, M. Diken, S. Meixlsperger, S. Kreiter, C. Münz, M. Theobald, W. Herr, R.G. Meyer: *Reconstitution of human dendritic cell subsets in humanized NSG mice*; CIMT - Association for cancer immunotherapy - Mainz 2011
- M. Sommer, P. Okwieka, O. Zupke, M. Diken, G. Baier, D. Wolff, E. Distler, M. Theobald, K. Landfester, W. Herr, V. Mailänder, R.G. Meyer: *Targeting dendritic cells with functionalized nanoparticles*; CIMT - Association for cancer immunotherapy - Mainz 2012
- International** M. Sommer, J. Hemmerling, D. Wolff, J. Wegner-Kops, U.F. Hartwig, M.C. André, W. Herr, M. Theobald, R. G. Meyer: *Reconstitution of human DC subsets in humanized NSG mice*; International Symposium DC2010, Forum on vaccine Science - Lugano 2010
- M. Sommer, J. Hemmerling, D. Wolff, J. Wegner-Kops, T. Schmitt, U.F. Hartwig, M.C. André, S. Kreiter, M. Diken, M. Theobald, W. Herr, R.G. Meyer: *Reconstitution of human dendritic cell populations in humanized mice*; EBMT - European bone marrow transplantation - Paris 2011

## 7 Anhang

M. Sommer, J. Hemmerling, D. Wolff, M.C. André, M. Diken, S. Meixlsperger, S. Kreiter, C. Münz, M. Theobald, W. Herr, R.G. Meyer: *Reconstitution of human DC populations in humanized NSG mice*; DGFI - Deutsche Gesellschaft für Immunologie - Riccione 2011

M. Sommer, S. Klobuch, D. Wolff, S. Thomas, M. Theobald, W. Herr, R.G. Meyer: *Studying HLA-restricted allo-reactivity in vivo using mice reconstituted with human antigen-presenting cells*; EBMT - European bone marrow transplantation - Genf 2012 - oral presentation