

Aus der Hautklinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Evaluierung eines nanobasierten TLR7-Liganden (AdiFectin™) für die Adressierung und
Aktivierung von dendritischen Zellen und eine nachfolgende T-Zell-Aktivierung

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Verena Achart
aus Regensburg

Mainz, 2022

Wissenschaftlicher Vorstand:

Univ.-Prof. Dr. med. U. Förstermann

1. Gutachter:

[REDACTED]

2. Gutachterin:

[REDACTED]

Tag der Promotion:

06. Dezember 2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis.....	IX
Tabellenverzeichnis.....	X
1 Einleitung / Ziel der Dissertation	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Das Immunsystem – Wächter des Körpers	3
2.2 Dendritische Zellen.....	4
2.3 Antigen-präsentierende Zellen	5
2.4 Mustererkennungsrezeptoren.....	6
2.4.1 Toll-like Rezeptoren	7
2.4.1.1 TLR-Liganden	7
2.4.1.2 Intrazelluläre Signalweiterleitung nach TLR-Stimulation	8
2.4.2 Subpopulationen dendritischer Zellen	9
2.4.2.1 Funktionelle Unterschiede der DC-Subpopulationen	10
2.4.2.2 Unterschiede zwischen murinen und humanen Subpopulationen.....	11
2.5 Reifung, Migration und damit verbundene Funktionen von DC.....	12
2.6 Natürliche Killerzellen	13
2.7 T-Zellen.....	14
2.7.1 T-Zell-Reifung	14
2.7.2 T-Zell Stimulation durch DC	15
2.7.3 T-Zellsubpopulationen und ihre Interaktionen mit DC.....	15
2.7.3.1 T _H 1- und T _H 2-Zellen	16
2.7.3.2 T _H 17-Zellen	16
2.8 Nanopartikel.....	17
2.8.1 Lipidnanopartikel.....	17
2.9 Nanovakzine	18
2.9.1 Modifikation von Nanovakzinen.....	19
2.9.1.1 APC-Adressierung durch Nanovakzine	19
2.9.1.2 Adjuvantien für Nanovakzine.....	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Materialien	21
3.1.1 Laborgeräte.....	21
3.1.2 Laborutensilien.....	23
3.1.3 Verbrauchsmaterialien	23
3.1.4 Zelllinien.....	24
3.1.5 Chemikalien und Reagenzien.....	25
3.1.6 Lösungen und Puffer	25
3.1.7 Medien und Supplemente	26
3.1.8 Transfektionsreagenzien und Nukleinsäure.....	26

3.1.9	Antikörper.....	27
3.1.10	Färbungsreagenzien und Blockierungssubstanzen	27
3.1.11	CBA-Reagenzien	28
3.1.12	Kits.....	29
3.1.13	Software und elektronische Medien.....	29
3.2	Methoden	30
3.2.1	Zellkulturen	30
3.2.1.1	Gewinnung von Knochenmarkszellen aus Mäusen	30
3.2.1.2	Bestimmung der Zellkonzentration mittels einer Neubauer-Zählkammer ..	30
3.2.1.3	Kultivierung von BMDC	31
3.2.1.4	Gewinnung und Aufbereitung von Milzzellen aus Mäusen.....	32
3.2.1.5	Isolierung von CD8+ T-Zellen.....	32
3.2.2	Zellkultur-assoziierte Methoden.....	33
3.2.2.1	Fluoreszenz Markierung der Nukleinsäure	33
3.2.2.2	Komplexierung der Nukleinsäure mit Nanopartikeln	34
3.2.2.3	Stimulierungsansätze für die FACS-Analyse	35
3.2.2.4	Stimulierungsansätze für den CBA.....	37
3.2.2.5	Kokultivierung mit OT-I.....	38
3.2.3	Mikroskopie.....	40
3.2.3.1	Fluorescence-activated cell scanning (FACS) - Analyse	40
3.2.3.2	Cytometric Bead Array (CBA) - Analyse	42
3.2.3.3	Proliferationsassay	44
4	Ergebnisse	45
4.1	Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die Viabilität unterschiedlicher Immunzelltypen	45
4.2	Bindung von Nanopartikeln an verschiedene Immunzelltypen.....	47
4.3	Expression des Oberflächen-Aktivierungsmarkers CD86 für verschiedene Immunzelltypen	48
4.4	Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die BMDC-Viabilität	50
4.5	Bindung von Nanopartikeln an die BMDC	51
4.6	Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern für die BMDC	52
4.7	Zytokinproduktion aktivierter BMDC	54
4.8	Proliferation von T-Zellen	56
4.9	Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen.....	58
5	Diskussion.....	61
5.1	Darstellung der Studienergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur	61
6	Zusammenfassung.....	68
7	Literaturverzeichnis	70
8	Anhang	80
9	Danksagung	89
10	Tabellarischer Lebenslauf.....	90

Abkürzungsverzeichnis

³ HTdR	radioaktives ³ H-Thymidin
AP-1	Aktivator-Protein-1
APC	Antigen präsentierende Zelle; engl.: antigen-presenting cell
BC	B-Zelle; engl.: b cell
BCG	Bacillus-Calmette-Guérin
BMDC	Knochenmark-abgeleitete dendritische Zelle; engl.: bone marrow derived dendritic cell
CBA	dt./engl.: Cytometric Bead Array
CD	spezifisches Oberflächenmolekül; engl.: cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cDC	konventionelle dendritische Zelle; engl.: conventional dendritic cell
CDP	gemeinsame DC-Vorläuferzelle; engl.: common DC precursor
CLP	gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle; engl.: common lymphoid progenitor
cpm	Impulse pro Minute; engl.: counts per minute
CTL	zytotoxische T-Zelle; engl.: cytotoxic t cell
CTLA4	zytotoxisches T- Lymphozyten-assoziierten Antigen 4; engl.: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4
Cy5	Cyanin 5
DAMP	Schadens-assoziiertes molekulares Muster; engl.: damage-associated molecular pattern
DC	dendritische Zelle; dendritic cell
dsRNA	Doppelstrang-RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	dt./engl.: Enhanced Green Fluorescent Protein
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung; engl.: fluorescence activated cell scanning

FcR	Immunglobulinrezeptor
FCS	Fötiales Kälberserum
FLT3L	FMS-ähnlicher Tyrosinkinase-3-Ligand; engl.: FMS-like tyrosine kinase 3 ligand
FVD	dt./engl.: Fixable Viability Dye
GM-CSF	muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor; engl.: granulocyte-macrophage colony- stimulating factor)
GS	Grundstock
H ₂ O	Ampuwa Aqua dest.
hATTR Amyloidose	Hereditäre Transthyretin-vermittelte Amyloidose
HSC	hämatopoetische Stammzelle; engl.: haematopoietic stem cell
iDC	Inflammatorische DC
IFN	Interferon
IFR	IFN-regulierenden Faktor
IL	Interleukin
IMDM	dt./engl.: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
IRF	IFN-regulierenden Faktor
ISRE	dt./engl.: interferon-sensitive response element
LC	Langerhans-Zelle; engl.: Langerhans cell
LPS	Lipopolysaccharid
MAC	Makrophage; engl.: macrophage
MACS	immunmagnetische Zellseparation; engl.: magnetic cell separation
MAK	Membranangriffskomplex
MAPK	mitogen-aktivierendes Protein-Kinase
MBL	Mannose-bindendes-Lektin
M-CSF	Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor; engl.: macrophage colony- stimulating factor

MFI	mittlere Fluoreszenzintensität; engl.: mean fluorescence intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex; engl.: major histocompatibility complex
MoDC	von Monozyten abgeleiteten DC
mRNA	dt./engl.: messenger RNA
NF-κB	nukleärer Faktor κB
NK	Natürliche Killerzelle; engl.: natural killer cell
NO	Stickstoffmonoxid
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster; engl.: pathogen-associated molecular pattern
PBMC	periphere mononukleäre Blutzelle; engl.: peripheral blood mononuclear cell
PBS	dt./engl.: Dubbecco's Phosphate Buffered Saline
PD	Programmierter-Zelltod-Protein; engl.: programmed cell death protein
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PDL	PD-Liganden
pDNA	Plasmid DNA
PE	Phycoerythrin
PLGA	Polymilch-co-glykolsäure; engl.: polylactic-co-glycolic acid
PMN	neutrophiler Granulozyt; engl.: polymorphonuclear leukocyte
PRR	Mustererkennungsrezeptor; engl.: pattern recognition receptor
RNAi	RNA-Interferenz
RT	Raumtemperatur
SARM	Steril-α und Armadillo Motiv enthaltendes Protein
siRNA	small interfering RNA
ssRNA	Einzelstrang-RNA; engl.: single-stranded RNA
TAA	tumorassoziiertes Antigen

TC	T-Zelle; engl.: t cell
TCR	T-Zell-Rezeptor; engl.: t cell receptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor; engl.: transforming growth factor
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TIP-DC	TNF/NO produzierende DC
TIR	Toll/IL-1Rezeptor
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAP	TNF-assoziiertes Aktivierungsprotein; engl.: TNF-related activation protein,
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
TRIF	dt./engl.: TIR-domain-containing adapter-inducing interferon
UC	unbehandelte Probe; engl.: untreated control
μCi	Mikrocurie

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung einer Antigen-vermittelten Immunantwort.	5
Abbildung 2: TLR-Signalpfad am Beispiel für TLR7/8.	8
Abbildung 3: Differenzierung verschiedener DC-Subpopulationen aus einer CD34+ hämatopoetischen Stammzelle.	10
Abbildung 4: Lebenszyklus dendritischer Zellen.	12
Abbildung 5: Ausschnitt einer 96-Well Platte für die Ansätze der Kokultur.	39
Abbildung 6: Standard-Verdünnungsreihe für den CBA.	43
Abbildung 7: Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die Viabilität unterschiedlicher Immunzelltypen.	46
Abbildung 8: Bindung von Nanopartikeln an unterschiedliche Immunzelltypen.	47
Abbildung 9: Expression des Oberflächen-Aktivierungsmarkers CD86 für verschiedene Immunzelltypen.	49
Abbildung 10: Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die BMDC-Viabilität.	51
Abbildung 11: Bindung von Nanopartikeln an die BMDC.	52
Abbildung 12: Expression von Oberflächen-Aktivierungsmarkern für die BMDC.	53
Abbildung 13: Zytokinproduktion aktivierter BMDC nach Behandlung mit verschiedenen Nanopartikeln.	55
Abbildung 14: T-Zellproliferation nach Kokultivierung mit unterschiedlich behandelten BMDC.	57
Abbildung 15: Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen nach Kokultivierung mit unterschiedlich behandelten BMDC.	59

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte.....	21
Tabelle 2: Verwendete Laborutensilien.....	23
Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien.....	24
Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	25
Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer.....	25
Tabelle 7: Verwendete Medien und Supplemente	26
Tabelle 8: Verwendete Transfektionsreagenzien und Nukleinsäure.....	26
Tabelle 9: Verwendete Anti-Maus-Antikörper	27
Tabelle 10: Verwendete Färbungsreagenzien und Blockierungssubstanzen	27
Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für die CBA-Analyse	28
Tabelle 12: Verwendete Kits.....	29
Tabelle 13: Verwendete Software und elektronische Medien.....	29
Tabelle 14: Fütterung der BMDC-Kulturen.....	32
Tabelle 15: Reagenzien für die Fluoreszenzmarkierung der Nukleinsäure	34
Tabelle 16: AdiFectin Ansatz für die FACS-Analyse	36
Tabelle 17: jetOptimus Ansatz für die FACS-Analyse.....	36
Tabelle 18: DOTAP Ansatz für die FACS-Analyse.....	36
Tabelle 19: Milzzellen-Ansätze für die FACS-Analyse	36
Tabelle 20: AdiFectin Ansatz für den CBA.....	37
Tabelle 21: DOTAP Ansatz für den CBA	38
Tabelle 22: Ansätze für den CBA der OT-I Kokultur	38
Tabelle 23: Kontrollansätze und Einzelfärbungen für die FACS-Analyse der BMDC	41
Tabelle 24: Kontrollansätze und Einzelfärbungen für die FACS-Analyse der Milzzellen	42

1 Einleitung / Ziel der Dissertation

„Die wirksamste Medizin ist die (natürliche) Heilkraft, die im Inneren eines jeden von uns liegt“
(Hippokrates von Kos, geboren um 460 v.Chr.).

Als Nanopartikel werden kleinste Partikel mit einer Größe im Nanometerbereich bezeichnet. Sie eignen sich als Transportvehikel, um bioaktive Moleküle in den Körper einzubringen. Da ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften für entsprechende Anforderungen modifiziert werden können, gewinnen sie in immun-interventionellen Therapien sowie in der personalisierten Medizin immer mehr an Bedeutung [1, 2]. So könnten sie zukünftig zur Behandlung von Autoimmunkrankheiten sowie Malignomen verwendet werden oder für die Erstellung individueller auf jeden Patienten speziell zugeschnittene Tumorthérapien von Bedeutung sein. Die wohl bekanntesten Beispiele für die Erfolge nanobasierter Arzneistoffe sind die im Rahmen der Coronapandemie eingesetzten mRNA-Impfstoffe Comirnaty® und Spikevax® der Pharmaunternehmen BioNTech/Pfizer und Moderna [3, 4].

Dendritische Zellen (DC) bilden das Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. Sie dienen daher oft als Zielstruktur in immun-interventionellen Studien, da sie in der Lage sind, Nanopartikel durch Endozytose aufzunehmen und im aktivierten Zustand T-Zellen für eine suffiziente Immunantwort zu stimulieren [5]. Dafür ist die gemeinsame Verabreichung einer Nanovakzine, die Antigen und Adjuvans beinhaltet, von Nöten [6]. Die Entwicklung nanobasierter Tumorstoffe, die DC gezielt adressieren, T-Zell-Antwort induzieren und dadurch eine antitumorale Wirkung entfalten können, steht aktuell im Zentrum der Tumorforschung [5]. Dazu lieferte die LipoMERIT-Studie mit einer lipidbasierten mRNA-Impfung gegen das maligne Melanom bereits vielversprechende Ergebnisse *in vivo* [7].

Zukünftig könnten Tumorstoffe neben Checkpoint-Inhibitoren eine weitere Säule in der Kombinationstherapie mit konventionellen Behandlungsmöglichkeiten darstellen [6]. Trotz zahlreicher Vorteile und innovativer Forschungsprojekte sind bis zum jetzigen Zeitpunkt nur wenige nanobasierte Impfstoffe zugelassen [5]. Das kann vermutlich daran liegen, dass die neu gewonnen Erkenntnisse in Studien im Tiermodell nicht einfach auf den Menschen übertragbar sind, da sich seine (Patho-)Physiologie von der im Tiermodell unterscheidet. Um weitere Erkenntnisse über diese Differenzen zu erlangen, bedarf es weiterer Studien, die für den klinischen Einsatz von Nanovakzinen essentiell sind [1].

Um einen weiteren Beitrag auf dem Forschungsgebiet der Immunintervention zu leisten, wird im Rahmen dieser Arbeit der neu entwickelte nanopartikelartige Toll-like-Rezeptor (TLR)7-Ligand AdiFectin der Firma InvivoGen untersucht. AdiFectin ist ein Derivat aus CL307 (TLR7-Ligand), das mit einer Bis(phytanyl)phosphonat-Gruppe konjugiert wurde und zur Transfektion von Nucleinsäure genutzt werden kann. Es stellt einen lipidbasierten Nanopartikel dar, der

sowohl zur Transfektion von Nukleinsäure fähig ist als auch Adjuvans-Funktionen zur Stimulation von DC vermitteln kann. *In vitro*-Studien der Hersteller-Firma InvivoGen (nicht publiziert) konnten zeigen, dass eine Behandlung von RAW-Blue Makrophagen mit pDNA/AdiFectin-Komplexen aus einer starken Interferonantwort resultiert. Außerdem konnten die verabreichten pDNA/AdiFectin-Komplexe im murinen Tumormodell eine effektive antitumor Antwort *in vivo* induzieren (nicht publiziert). Das Tumorstadium wurde reduziert und führte zu einer 50%igen Überlebensrate. Außerdem scheint AdiFectin eine tumorspezifische Immun-Gedächtnisfunktion zu vermitteln, da es bei behandelten Mäusen in Tumorremission zu keinerlei Rezidiven kam [8]. Nach aktuellem Kenntnisstand wurde bis jetzt nur eine weitere *in vitro*-Studie mit AdiFectin durchgeführt. Dabei wurden amphiphile Poly(esteracetale) (AdiFectin) als geeignete pH-Wert abhängige Trägermoleküle für Immunarzneimittel untersucht [9]. AdiFectin zeigte in einer Formulierung mit speziellen Blockcopolymermizellen, die einen Ringöffnungsmechanismus enthalten, effiziente Stimulierungseigenschaften an einer nukleären-Faktor κB (NF- κB)-responsiven Makrophagen-Reporterlinie.

Ziel der Arbeit ist AdiFectin bezüglich der Eignung zur Adressierung und Aktivierung von DC in Dosiskinetik-Studien im Vergleich zu den beiden bekannten nanopartikulären Verbindungen jetOPTIMUS und DOTAP zu untersuchen. Für die Analyse der DC-Adressierung werden murine Milzzellen sowie BMDC-Kulturen mit fluoreszierenden pDNA/AdiFectin-Komplexen behandelt und anschließend im Durchflusszytometer gemessen. Außerdem soll die Aktivierung der DC im Hinblick auf die Expression stimulations-assoziiert aufregulierter DC-Oberflächenrezeptoren sowie die Zytokingehalte von DC-Kulturüberständen durchflusszytometrisch analysiert werden. Für eine mögliche durch den Nanopartikel angesprochene DC-vermittelte T-Zell-Stimulation wird im Anschluss das Modelantigen Ovalbumin (Peptidform) oder Ovalbumin-mRNA (antigen-kodierende mRNA) durch den Nanopartikel in die BMDC transfiziert. Am Folgetag werden die DC mit antigen-responsiven T-Zellen kokultiviert. Nach mehreren Tagen Inkubation soll die Proliferation sowie die Stimulation, in Form der von stimulierten T-Zellen produzierten Zytokine, ebenfalls durchflusszytometrisch gemessen werden.

2 Literaturdiskussion

2.1 Das Immunsystem – Wächter des Körpers

Der menschliche Körper ist täglich einer Vielzahl von Erregern ausgesetzt. Um sich vor einer Erkrankung zu schützen, verfügt er über eine Kontroll- und Abwehrinstanz: das Immunsystem. Es schützt vor (un)bekannten und potenziell krankmachenden Eindringlingen, indem es diese erkennt und unschädlich macht. Man unterscheidet das angeborene vom adaptiven Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem ist genetisch verankert, aber nicht zur spezifischen Anpassung an ein Pathogen fähig. Von Vorteil ist eine rasche Immunantwort, die den eindringenden Erreger eliminieren soll. Seine wichtigsten zellulären Vertreter sind zur Phagozytose fähige Makrophagen und neutrophile Granulozyten [10]. Erwähnenswert sind außerdem natürliche Killerzellen (natural killer cell, NK), die vor allem an der Bekämpfung strukturell veränderter Zellen wie zum Beispiel Tumorzellen oder virusinfizierter Zellen beteiligt sind [11]. Zusätzlich verfügt das angeborene Immunsystem über eine Vielzahl an im Blut gelösten oder membranständigen Proteinen: den Komplementfaktoren. Sie verkörpern zahlreiche Enzyme, die im aktivierten Zustand kaskadenartig weitere Komplementfaktoren stimulieren, um so Pathogene abzutöten. Dies geschieht entweder durch direkte Lyse nach Bildung eines Membranangriffskomplexes (MAK) oder indirekt durch Verstärkung der Entzündungsreaktion zum Beispiel mittels Zytokinausschüttung und durch Opsonierung, was die Phagozytose durch verschiedene Immunzellen erleichtert [12]. Das Komplementsystem kann über drei unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden: der klassische Weg stellt die Bindung von Antigen-Antikörper-Komplexen dar. Beim Lektinweg werden Kohlehydratstrukturen auf mikrobiellen Oberflächen erkannt. Der alternative Signalweg wird durch spontane Hydrolyse des Komplementfaktors C3b gestartet [13]. Die gemeinsame Endstrecke der Komplementkaskaden mündet in der Bildung des MAK [12].

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch seine Spezialisierung auf bestimmte Fremdstoffe oder Erregertypen aus. Es beinhaltet zelluläre sowie humorale Abwehrmechanismen. Der vorherrschende Zelltyp sind hier die Lymphozyten, die ein immenses Repertoire an Antigenrezeptoren ausbilden [14]. Unterteilt wird diese Zellpopulation zum einen in B-Lymphozyten/B-Zellen, die im hochdifferenzierten Stadium als Plasmazellen Antikörper produzieren [15]. Antikörper stellen den humoralen Teil des adaptiven Immunsystems dar, indem sie Erreger durch Bindung neutralisieren. Außerdem machen sie Antigene für phagozytierende Zellen durch Opsonierung sichtbar (s. auch Komplementsystem) [10]. Die erstmalige Entdeckung der B-Zellen in der Bursa fabricii von Hühnern und die Reifung im Knochenmark (englisch: bone marrow) war für ihre Namensgebung entscheidend [16, 17].

Die zweite Gruppe von Lymphozyten stellen die T-Lymphozyten/T-Zellen dar, die im Thymus ausreifen und nach Antigenkontakt zu spezialisierten Zellsubtypen differenzieren [14]. Eine adaptive Immunantwort findet verzögert statt, da sie Differenzierungs- und Reifungsprozesse der beteiligten Zellpopulationen erfordert [18].

Im Fokus dieser Arbeit stehen dendritische Zellen (dendritic cell, DC). Ihre Eigenschaften machen sie zu einem bemerkenswerten Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem [19].

2.2 Dendritische Zellen

DC zählen zu den wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen (antigen-presenting cell, APC) (s. Kapitel 2.3). Ihre Funktionen sind für die Forschung von so großer Bedeutung, dass Ralph Steinmann für deren Entdeckung 2011 der Nobelpreis für Physiologie oder Medizin verliehen wurde [19]. Für die Namensgebung war vor allem das äußere Erscheinungsbild dieses Immunzelltyps verantwortlich, da aktivierte DC viele baumähnliche Verzweigungen (griechisch *dendros*: Baum) ausbilden [20]. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie als unreife Vorläuferzellen im Gewebe Antigene aufnehmen, auf ihrer Oberfläche präsentieren und T-Zell-Toleranz induzieren. Außerdem sind sie in der Lage, in Folge einer Aktivierung zum Beispiel durch pathogen-assoziierte molekulare Muster, T-Zellen zu stimulieren, um so eine Immunantwort gegen pathogen-spezifische Antigene auszulösen [21].

2.3 Antigen-präsentierende Zellen

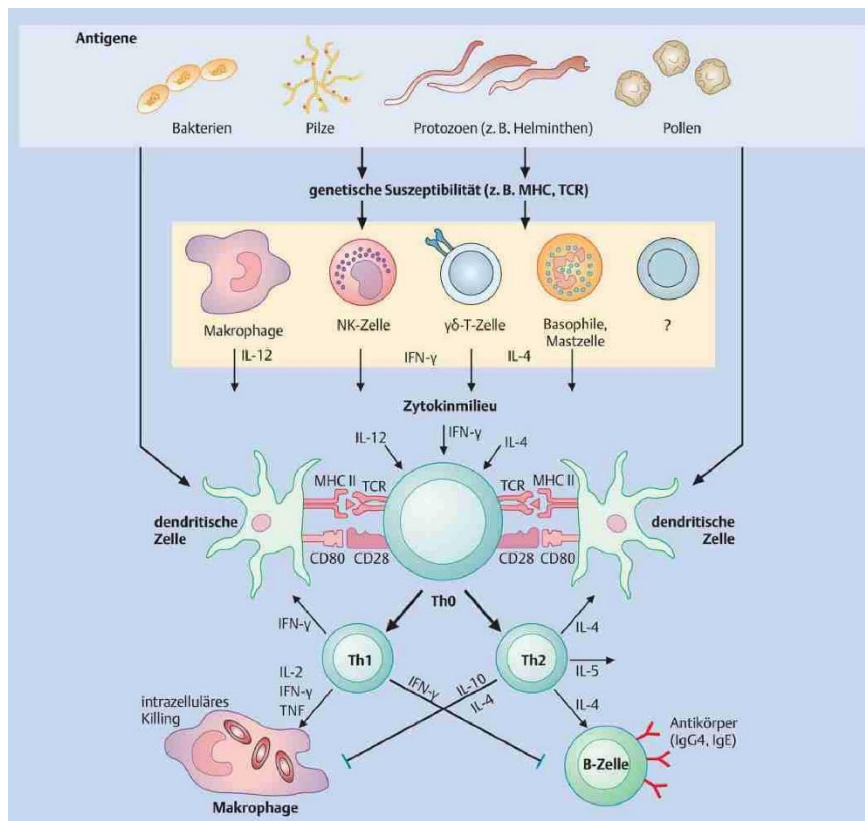


Abbildung 1: Darstellung einer Antigen-vermittelten Immunantwort.

Eine Antigenaufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen (antigen-presenting cell, APC) führt zu Interaktionen mit anderen Immunzelltypen und zur Aktivierung des Immunsystems. Die interzelluläre Kommunikation stimulierter Immunzellen findet durch Zell-Zell-Kontakt sowie mit Hilfe produzierter Zytokine statt [22]. Weitere Erläuterungen zu den Signalwegen im Rahmen von Immunantworten finden sich in den nachfolgenden Kapiteln.

DC, Makrophagen und B-Zellen repräsentieren die heterogene Gruppe der APC (s. Abbildung 1). Sie sind zur Phagozytose fähige Immunzellen, die aufgenommene Protein-Antigene im Zellinneren prozessieren und abgeleitete Peptid-Antigene auf ihrer Zelloberfläche präsentieren können. Dazu verfügen sie über zwei Klassen von Oberflächenproteinen: den Haupthistokompatibilitätskomplexen (major histocompatibility complex, MHC) I und II. MHC-I Moleküle dienen der Präsentation von nukleären und zytosolischen Selbst-Proteinbestandteilen. Sie werden nahezu von allen kernhaltigen Körperzellen ausgebildet. MHC-II tragen nur spezialisierte APC. Sie werden mit Antigenen extrazellulärer Herkunft beladen [23]. In diesem Zusammenhang ist es wichtig, das Phänomen der Kreuzreaktion zu erklären. Vermutlich ist insbesondere die spezialisierte DC-Subpopulation cDC1 (s. Kapitel 2.4.2.2) dazu in der Lage MHC-I-Moleküle auch mit exogenen Pathogenen zu beladen [24].

Der zugrundeliegende Mechanismus dafür ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Ebenso bleibt zu klären, ob auch andere DC-Untergruppen dazu fähig sind. Der Vorgang der Kreuzpräsentation ist für eine DC-vermittelte Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen (s. Kapitel 2.7) essenziell, da diese eine entscheidende Rolle in der Immuntherapie spielen [25].

2.4 Mustererkennungsrezeptoren

DC nehmen Antigene über Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose auf [21]. Wie bereits erwähnt, liegen DC im peripheren Gewebe im unreifen Zustand vor. DC verfügen über eine Reihe an Erkennungsrezeptoren (pattern recognition receptor, PRR), welche bestimmte Gefahrensignale detektieren und zur DC-Aktivierung führen. Diese Gefahrensignale können exogenen oder endogenen Ursprungs sein. Endogene Gefahrensignale werden in Form von Schadens-assoziierten molekularen Mustern (damage-associated molecular pattern, DAMP) im Rahmen einer Gewebsschädigung freigesetzt. Hierzu zählen unter anderem Hitzeschockproteine, Fibrinogen, ATP oder auch Nukleinsäure-Fragmente [26]. Exogene Gefahrensignale erkennen APC über Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular pattern, PAMP), welche physiologisch im Menschen nicht vorkommen [27]. Ein Beispiel für PAMP stellt bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) dar, das auch zur Stimulation von Immunzellen im Labor verwendet wird [28]. Durch Interaktion mit PRR kommt es bei APC beziehungsweise DC zur Aufregulation von MHC-II-Molekülen und kostimulatorischen Markern, wodurch T-Zellen aktiviert werden können [29]. Zudem führt eine Stimulation von PRR, zum Beispiel im Rahmen bakterieller Infektionen in der APC, unter anderem auch zur Ausschüttung chemischer Substanzen wie dem Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und der Interleukine (IL)-1 und -6 [23]. Als Mediatoren des angeborenen und adaptiven Immunsystems ermöglichen Zytokine eine interzelluläre Kommunikation. So sind sie einerseits an der zellvermittelten Induktion von Entzündungsprozessen und andererseits an der Bekämpfung von Krankheitserregern sowie Tumorzellen beteiligt. Eine Dysbalance der Zytokinproduktion wird mit Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, was einen Ansatzpunkt für therapeutische Behandlungsmethoden liefert [30]. Die DC-produzierten Zytokine beeinflussen die Polarisation interagierender T-Zellen (s. Kapitel 2.7.2 und 2.7.3).

Zu den wichtigsten Vertretern der PRR zählen die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die Scavenger Rezeptoren und verschiedene C-Typ-Lektin-Rezeptoren wie zum Beispiel der Mannose-Rezeptor [31]. Die Charakteristika von TLR werden in einem eigenen Kapitel behandelt.

2.4.1 Toll-like Rezeptoren

Mittlerweile sind 10 humane und 12 murine strukturhomologe funktionale TLR bekannt [32]. TLR7 und TLR8 sind strukturell verwandt [33]. Von TLR8 wird angenommen, dass er in Mäusen funktionslos ist [34, 35]. Murine TLR10 konnten bis jetzt nur in Teilen einer funktionslosen Genomsequenz nachgewiesen werden [36]. TLR1-2, TLR4-6 und TLR10 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert, während TLR3, TLR7-9 und TLR11-13 intrazellulär liegen. Extrazelluläre TLR zeichnen sich dadurch aus, dass sie vor allem Bestandteile von Mikroben binden, wohingegen intrazelluläre TLR mit deren Nukleinsäure-Fragmenten interagieren [32]. Jedoch sind nicht alle APC beziehungsweise DC mit dem gesamten Repertoire an TLR ausgestattet. Plasmazytoide DC (pDC), eine Subpopulation von DC (s. Kapitel 2.4.2), exprimieren vornehmlich TLR7 und TLR9, während konventionelle DC (conventional dendritic cell, cDC), eine weitere DC-Untergruppe (s. Kapitel 2.4.2), in ihrer Gesamtheit ein umfangreiches Repertoire an TLR ausbilden können [37].

2.4.1.1 TLR-Liganden

Im Laufe der Jahre wurden diverse natürliche exogene Liganden identifiziert, die für die einzelnen TLR spezifisch sind: das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Ligand für TLR4 [28]. Virale Einzelstrang-RNA (single-stranded RNA, ssRNA) bindet an TLR7 [38]. Zu den künstlich hergestellten TLR-Liganden zählen unter anderem Imiquimod (TLR7) [39] und CpG-Oligonukleotide (TLR9) [40]. Auch endogene Faktoren, die zum Beispiel bei Gewebeschädigung oder im Rahmen einer Virusreplikation von intrazellulär freigesetzt werden, können als TLR-Liganden fungieren. Doppelstrang (ds)RNA sowie mRNA binden an TLR3 und lösen damit immunmodulatorische Funktionen durch die Zielzelle aus [41]. Zahlreiche TLR7/8-Liganden werden mit der Produktion von Typ-I-Interferonen wie zum Beispiel Interferon (IFN)- α und IFN- β und der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine assoziiert. Dadurch bekleiden sie eine entscheidende Rolle bei der antiviralen Antwort, der Entstehung von Autoimmunerkrankungen sowie der antitumoralen Immunabwehr [33]. Die Synthese und Erprobung neuer, effizienterer TLR-Liganden für den therapeutischen Einsatz stehen daher im Mittelpunkt zahlreicher (prä)klinischer Studien [33]. Imiquimod (Handelsname Aldara®) beispielsweise wurde bereits 1998 zur topischen Behandlung von Condyloma acuminata (äußerliche Feigwarzen) und aktinischen Keratosen für den europäischen Markt zugelassen [42]. Welche Immunzelltypen am Wirkmechanismus beteiligt sind, blieb zunächst unklar. Forscher der medizinischen Universität Wien fanden heraus, dass topisches Imiquimod seine zytostatische Wirkung durch eine TLR7-induzierte pDC-vermittelte IFN- α Produktion ausübt [39]. Ein weiteres Beispiel für einen TLR7-Agonisten stellt DSR-6434 dar

[43]. Nach intravasaler Injektion konnte die Effektivität der Strahlentherapie verbessert und die Metastasierung in die Lunge beim kolorektalen Karzinom im Mausmodell reduziert werden.

2.4.1.2 Intrazelluläre Signalweiterleitung nach TLR-Stimulation

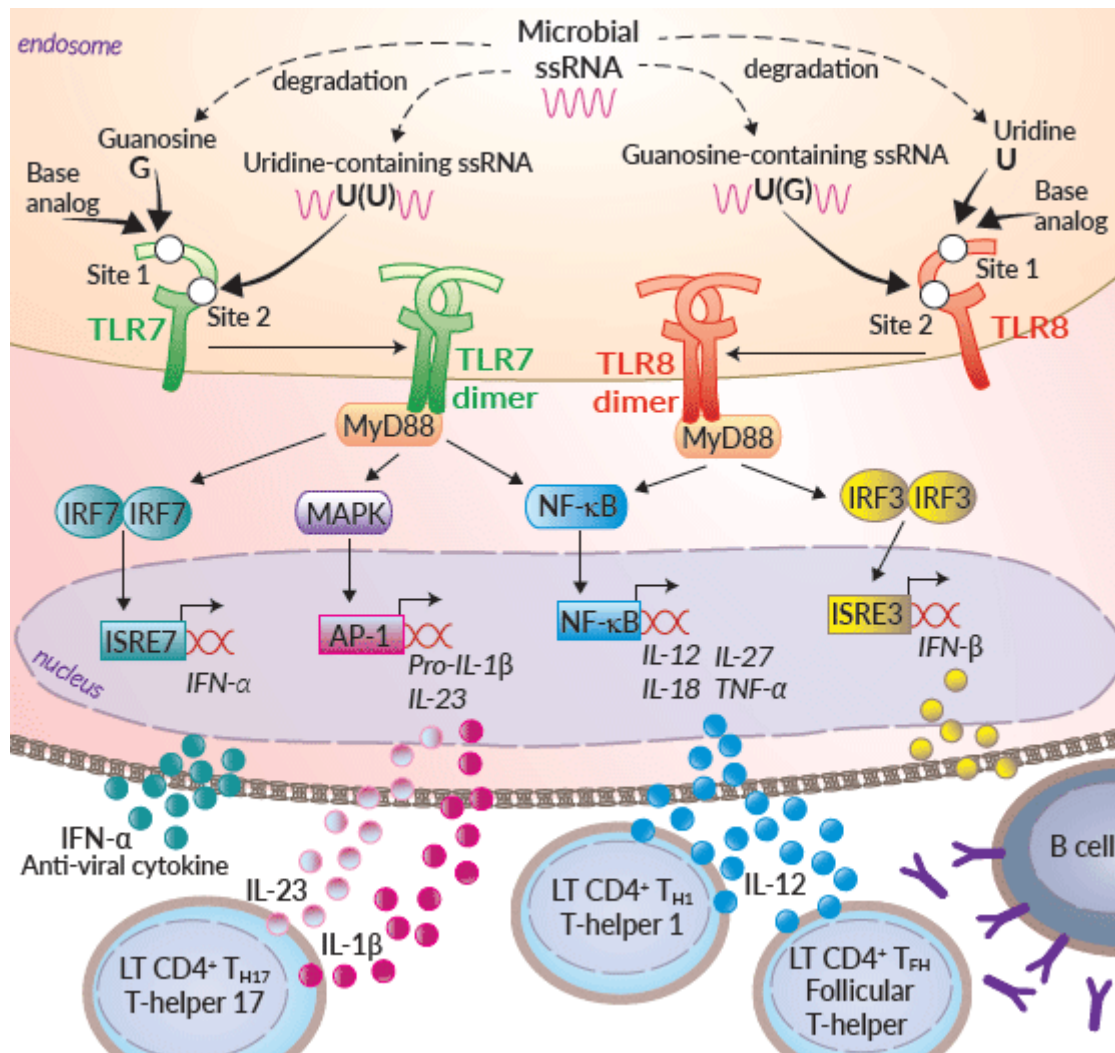


Abbildung 2: TLR-Signalfad am Beispiel für TLR7/8.

TLR7 und TLR8 erkennen virale Einzelstrang-RNA (single-stranded RNA, ssRNA) sowie kleine synthetische Moleküle. Der TLR7/8-Signalfad ist MyD88-abhängig und resultiert am Ende in einer Ausschüttung diverser Zytokine, die zur nachgeschalteten Stimulation weiterer Immunzellen dienen. nukleärer-Faktor κB (NF-κB); mitogen-aktivierendes-Protein-Kinase (MAPK); IFN-regulierenden Faktor (IRF)-Komplex; interferon-sensitive response-element (ISRE); Interferon (IFN) [44].

Eine Aktivierung von TLR führt zu Konformationsänderungen von TLR-assoziierten Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domänen und anschließend zur Einleitung eines intrazellulären Signalpfades, in den Adaptermoleküle eingebunden sind. Sie initiieren die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Induktion von Genen für die Proteinbiosynthese.

Das Adaptermolekül MyD88 ist stromabwärts bei allen TLR außer TLR3 vorhanden und induziert den MyD88-abhängigen-Signalpfad, an dessen Ende die Expression von Genen für eine proinflammatorische Immunantwort durch die Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel dem Nukleären-Faktor κ B (NF- κ B) und der Aktivator-Protein-1 (AP-1)-Familie stehen (s. Abbildung 2) [27]. Zu AP-1 zählen unter anderem die Transkriptionsfaktoren Jun und Fos, welche durch mitogen-aktivierende-Protein-Kinase (MAPK) aktiviert werden [45]. Außerdem wurde durch Studien mit MyD88-knockout-Mäusen die Existenz eines zweiten Signalweges gezeigt, der nicht durch MyD88 verantwortet wird [46]. Dieser MyD88-unabhängige-Signalpfad wird durch Aktivierung von TLR3 und TLR4 über das Adaptermolekül TIR-domain-containing adapter-inducing interferon (TRIF) - β initiiert. Am Ende dieser Signalkaskade steht neben NF- κ B auch die Aktivität der IFN-regulierenden Faktor (IRF)-Transkriptionsfaktoren. Diese induzieren das Interferon-stimulierte Response-Element (ISRE), wodurch vor allem eine Produktion von Typ-I-IFN vermittelt wird. MyD88-abhängige- sowie MyD88-unabhängige-Signalwege konvergieren an ihren Endstrecken und stellen somit ineinander verwobene Kreisläufe dar (s. Abbildung 2) [47].

2.4.2 Subpopulationen dendritischer Zellen

DC stellen eine heterogene Zellpopulation dar, die sich in Bezug auf ihre Lokalisierung Lebensdauer, Funktion und Morphologie unterscheidet. Dies ermöglicht eine diversifizierte Reaktion auf unterschiedliche Krankheitserreger [48, 49]. DC-Subpopulationen wurden früher nach ihrer jeweiligen Funktion eingeteilt [50]. Klare Grenzen konnten jedoch nicht definiert werden. Die Einteilung nach ihrer Ontogenie mit Hilfe in jüngerer Zeit entdeckter Transkriptionsfaktoren sowie nach Expression ihrer Oberflächenproteine (cluster of differentiation, CD) hat sich als neueres Einteilungsverfahren bewährt und korreliert in den meisten Fällen auch mit der Zuordnung nach Funktion [51]: die meisten DC entstehen aus einer CD34+ hämatopoetischen Stammzelle (haematopoietic stem cell, HSC) im Knochenmark und differenzieren über Zwischenstufen entlang zweier Entwicklungslinien: einer myeloischen und einer lymphoiden Zellreihe (s. Abbildung 3 sowie Kapitel 2.4.2.2) [21].

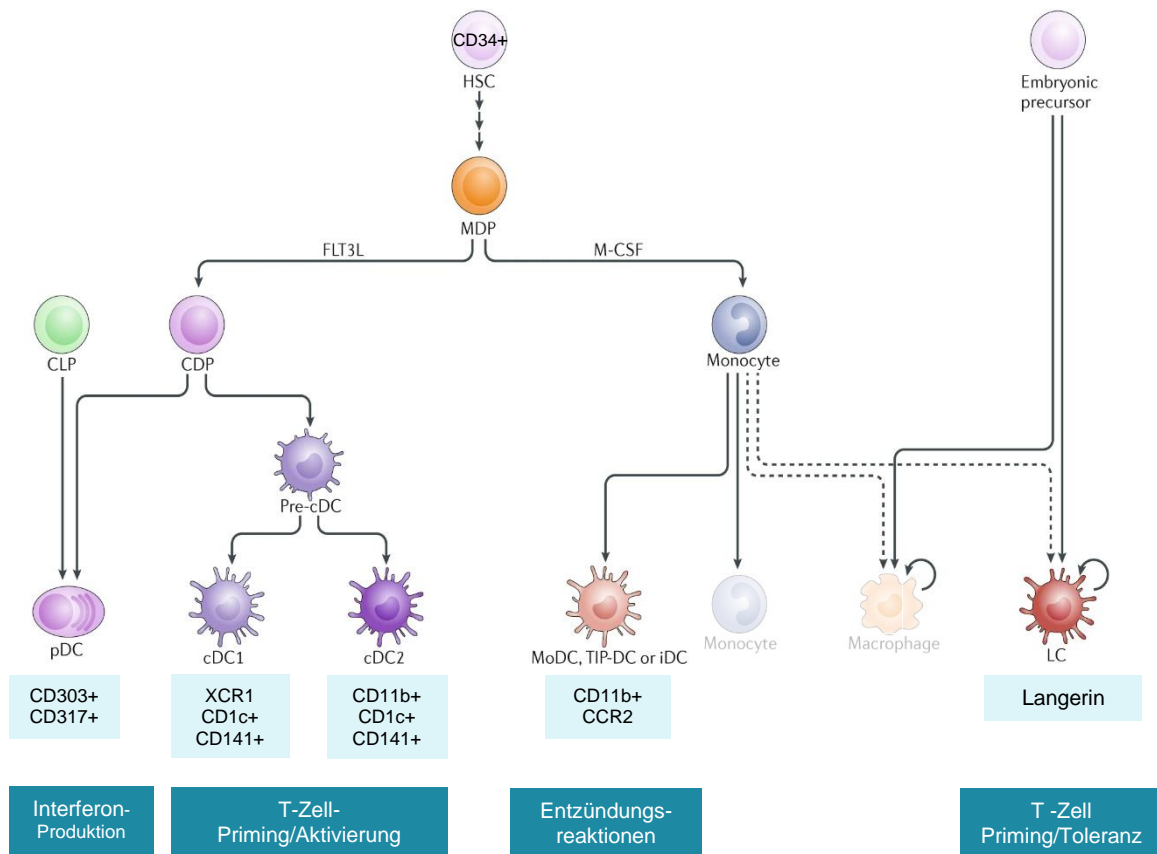


Abbildung 3: Differenzierung verschiedener DC-Subpopulationen aus einer CD34+ hämatopoetischen Stammzelle.

Unter jeder Population sind die charakteristischen Oberflächenmarker (CD-Moleküle und Chemokinrezeptoren (XCR/CCR)) sowie die jeweils dominierenden Hauptfunktionen vermerkt. Der kreisförmige Pfeil markiert die Fähigkeit zur Selbsterneuerung für Zellen der embryonalen Stammzelllinie. Nicht dargestellt sind folliculäre DC, da sie keiner hämatopoetischen Vorläuferzelle entstammen. gemeinsame CD-Vorläuferzelle (common DC precursor, CDP); gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor, CLP); FMS-ähnlicher Tyrosinkinase-3-Ligand (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, FLT3L); Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF); plasmazytoide DC (pDC); konventionelle DC (conventional DC, cDC); von Monozyten abgeleitete dendritische Zelle (MoDC); inflammatorische DC (iDC); TNF/Stickstoffmonoxid (NO) produzierende DC (TIP-DC). Modifiziert nach Eisenbarth [51].

2.4.2.1 Funktionelle Unterschiede der DC-Subpopulationen

Der Großteil des Wissens über die verschiedenen Subtypen von DC wurde durch Studien an Mäusen erlangt [52]: epidermale Langerhans-Zellen (Langerhans cell, LC) stellen eine DC-Untergruppe dar, die als erstes beschrieben und lange Zeit fälschlicherweise den Nervenzellen zugeordnet wurde [53]. Paul Langerhans entdeckte diesen Zelltyp in der menschlichen Haut bereits 1868 während seines Medizinstudiums [54, 55]. Seitdem wurde intensiv an diesem

speziellen Zelltyp geforscht. Die Ergebnisse dieser Studien trugen maßgeblich zum heutigen Wissenstand über Funktionen und Eigenschaften der DC bei [53]. LC entstammen aus einer embryonalen Stammzelle, tragen den Oberflächenrezeptor Langerin (s. Abbildung 3) und sind überwiegend in der Haut lokalisiert [51]. In der Epidermis fungieren sie als Wächter des Immunsystems, da an dieser Schnittstelle zwischen Innen- und Außenwelt meist der erste Kontakt mit Antigenen zustande kommt [53]. Interstitielle DC kommen in Organen wie Herz, Lunge oder Leber vor. Inflammatorische DC (iDC) werden während Entzündungsreaktionen aktiv. Außerdem wurden verschiedene Subtypen von DC in lymphatischem Gewebe beschrieben [48, 49].

2.4.2.2 Unterschiede zwischen murinen und humanen Subpopulationen

DC werden in Mäusen mithilfe von CD11c und MHCII charakterisiert [51, 56]. Humane DC zeigen Unterschiede in der Ausprägung ihrer Oberflächenstrukturen im Vergleich zu Mäusen. Dies erschwerte die Zuordnung und Charakterisierung der verschiedenen DC-Subtypen beider Spezies. Mittlerweile konnten murine funktionelle und phänotypische Pendant für einen Großteil der folgend dargestellten humanen DC-Subpopulationen ausgemacht werden [24]. Humane DC lassen sich auf Genebene gut von Monozyten abgrenzen. Außerdem können sie in transkriptional und funktional unterschiedliche Subtypen eingeteilt werden: zwei Klassen von konventionellen DC (conventional DC, cDC) entstammen einer gemeinsamen CD-Vorläuferzelle (common DC precursor, CDP) und benötigen den Transkriptionsfaktor FMS-ähnlicher Tyrosinkinase-3-Ligand (FMS-like tyrosine kinase 3 ligand, FLT3L) (s. Abbildung 3) [51]. Sie können über CD1c- und CD141-Oberflächenexpression charakterisiert werden und entsprechen den murinen cDC [24, 25]. cDC stellen den klassischen Typ einer APC dar und tragen CD11c-Moleküle auf ihrer Zelloberfläche [57]. Sie können in die Untergruppen cDC1 und cDC2 unterteilt werden [24, 25]. cDC unterscheiden sich von pDC [51]. Plasmazytoide DC (pDC) entspringen entweder aus der Linie der cDC oder aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle (common lymphoid progenitor, CLP) [51]. Sie tragen Moleküle wie CD303 oder CD317 (s. Abbildung 3) und können mit murinen pDC gleichgesetzt werden [24, 25, 51]. Außerdem machen sie nur einen kleinen Teil der DC-Population aus. Im Mausmodell unterscheiden sich pDC von den „klassischen DC“ dadurch, dass sie weniger DC-typische CD-Moleküle wie zum Beispiel CD11c ausbilden und im unreifen Zustand der Morphologie Antikörper-produzierender Plasmazellen ähneln [58]. Humane pDC werden hingegen als CD11c-negative Zellen beschrieben [57]. Unter dem Einfluss von IL-3 und CD40-Liganden differenzieren pDC zu reifen DC mit der Fähigkeit zur T-Zell-Stimulation [25, 59, 60]. Sie sind vor allem an der antiviralen Immunantwort beteiligt, indem sie große Mengen an Typ-I Interferonen wie IFN- α und IFN- β sezernieren [61]. Als weitere Subtypen von DC seien die von

Monozyten abgeleiteten DC (MoDC) erwähnt, die im Gewebe sowie Lymphknoten vorkommen und zur Differenzierung den Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) benötigen. Sie stellen eine heterogene Gruppe mit vielerlei Funktionen dar, zu der unter anderem iDC und TNF/Stickstoffmonoxid (NO) produzierende DC (TIP-DC) gezählt werden (s. Abbildung 3) [51].

2.5 Reifung, Migration und damit verbundene Funktionen von DC

Reifende, aktivierte DC präsentieren Antigen-MHC-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche und verlassen anschließend den Ort der Antigenaufnahme (s. Abbildung 4). Sie emigrieren in lymphatisches Gewebe, um dort mit T-Zellen zu interagieren [21]. Im Rahmen des Reifungsprozesses durchlaufen DC verschiedene Funktionsstadien.

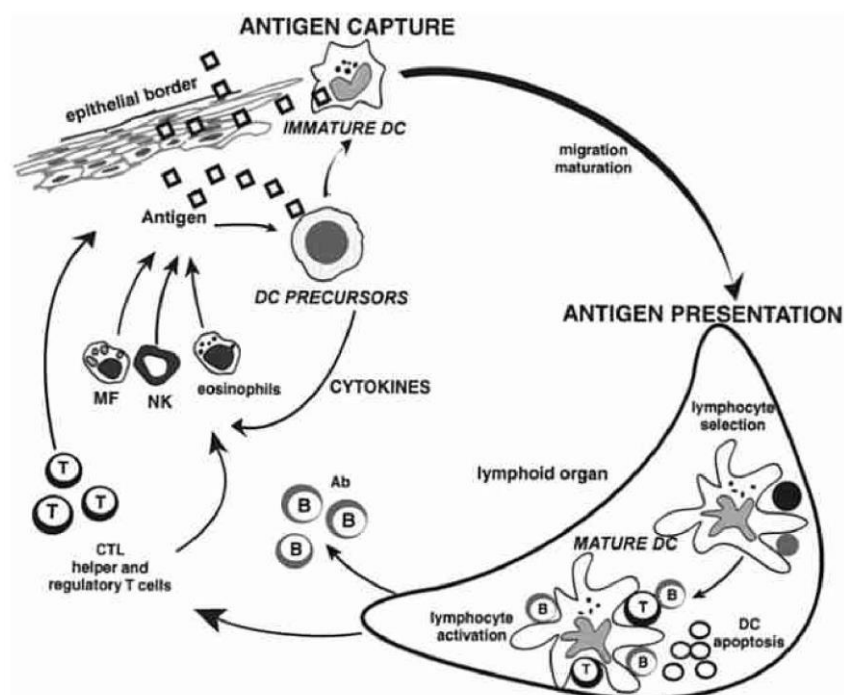


Abbildung 4: Lebenszyklus dendritischer Zellen.

Als unreife Vorläuferzellen werden DC durch Antigenaufnahme im peripheren Gewebe aktiviert. Mit Aktivierung der DC beginnt ihr Reifungsprozess zu professionellen APC. Durch Zytokinproduktion sind sie in der Lage andere Immunzellen (eosinophile Granulozyten, Makrophagen (MF) und NK) direkt zu stimulieren. Aktivierte/reifende DC emigrieren in lymphatische Organe und präsentieren dort anderen Immunzellen ihre MHC-gebundenen Antigene. Ausgereifte DC bewirken eine Aktivierung und Differenzierung von T- und B-Zellen, welche durch ihre jeweiligen Eigenschaften an einer adaptiven Immunantwort beteiligt sind. Nach Immunzellkontakt gehen DC vermutlich in Apoptose [21].

Zu Beginn erfüllen DC Aufgaben des angeborenen Immunsystems. Im peripheren Gewebe liegt ihre Hauptaufgabe in der Antigenaufnahme [62]. Durch verschiedene Arten von Endozytose suchen sie ihre Umgebung nach Pathogenen ab. DC können auch Antigene aufnehmen, die bei Gewebeschädigung zum Beispiel im Rahmen von Entzündungen freigesetzt werden. Dafür müssen sie an den Ort des Geschehens gelockt werden. Dies geschieht durch Chemotaxis. Entzündungsherde schütten inflammatorische Chemokine aus, welche von unreifen DC mittels inflammatorischer Chemokinrezeptoren detektiert werden (zum Beispiel CCR1, CCR2, CCR5, CCR6 und CXCR1 [63–65]). Durch Gefahrensignale (s. Kapitel 2.4) (ob spontan oder bei Gewebeschaden) wird die Reifung induziert. Im Laufe des Reifungsprozesses verlieren DC weitestgehend ihre Fähigkeiten zur Antigenaufnahme [29, 62]. MHC-II sowie kostimulatorische Oberflächenmarker (CD40 [66], CD80 und CD86 [29, 67]) werden hochreguliert und vermehrt Zytokine produziert [68, 69]. Dies dient der Interaktion mit anderen Immunzellen (s. Kapitel 2.6 und 2.7). Aktivierte DC verändern ihr Rezeptorprofil zugunsten von Chemokinrezeptoren wie CXCR4 und CCR7 [65, 70], was ihnen ermöglicht ihr Migrationsverhalten selbst zu regulieren [71]. Anschließend wandern sie weiter in lymphatische Organe. Die Migration wird ebenfalls durch pathogenabgeleitete PAMP wie zum Beispiel LPS [62, 72] und DAMP wie die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α [73, 74] initiiert. Zusätzlich sezernieren DC im Laufe ihres Reifungsprozesses selbst IL-10 [75]. Außerdem spielen konstitutive Chemokine aus lymphatischen Organen wie zum Beispiel CCL19 und CCL21 eine Rolle [76]. Es herrscht die allgemeine Annahme, dass DC Lymphknoten über die afferenten Lymphbahnen erreichen und aus dem Blut über das Gefäßsystem in die Milz gelangen [77]. DC wandern weiter in die T-Zell-Zonen von lymphatischen Organen [71]. Im Rahmen der adaptiven Immunantwort findet im lymphatischen Gewebe eine DC-vermittelte Interaktion mit T-Zellen statt [48, 68]. Dabei führen DC, abhängig von ihrem Reifungsgrad und der Interaktion von Oberflächenproteinen der DC beziehungsweise der T-Zellen bei Kontakt, zu einer T-Zell-Toleranzentwicklung gegenüber dem präsentierten Antigen (s. Kapitel 2.7.1.) oder lösen im hochdifferenzierten Stadium eine spezifische Immunantwort aus [21, 27].

2.6 Natürliche Killerzellen

Natürliche Killerzellen stellen eine separate Gruppe der Lymphozyten dar und sind vor allem an der antiviralen und antitumoralen Immunantwort beteiligt [11]. Anders als zytotoxische T-Zellen (s. Kapitel 2.7) benötigen sie dafür keinen Antigenkontakt. Mithilfe ihrer Oberflächenrezeptoren erkennen sie entartete oder virusinfizierte Zellen: Immunglobulinrezeptoren (FcR) auf der NK Zelloberfläche, detektieren Antikörper-gebundene Strukturen und vermitteln Zytotoxizität in der interagierenden Zelle [10]. Zudem tragen NK

MHC-I-Rezeptoren. Exprimiert die kontaktierende Zelle kein, zu wenig oder abnormale MHC-I-Moleküle erkennt die NK diese Zelle als körperfremd oder entartet. Dies führt zur NK-vermittelten Ausschüttung von lytischen Molekülen wie Perforin oder Granzymen [11]. Außerdem sind spezialisierte APC wie DC mithilfe ihrer produzierten Zytokine IL-12 und IL-18 dazu fähig die zytotoxische Wirkung von NK zu verstärken [78].

2.7 T-Zellen

An der zellvermittelten adaptiven Immunantwort sind T-Zellen maßgeblich beteiligt. Aufgrund differentiell exprimierter CD-Moleküle können sie in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden. CD8⁺ T-Zellen binden antigenbeladene MHC-I-Moleküle, während CD4⁺ T-Zellen an MHC-II-Moleküle binden [14]. Die Interaktion mit MHC führt zur Aktivierung der T-Zellen mit unterschiedlicher Effektorfunktion. Aktivierte CD8-tragende Zellen werden als zytotoxische T-Zellen oder T-Killerzellen (cytotoxic t lymphocyte, CTL) bezeichnet. CTL besitzen die Fähigkeit, Pathogene über verschiedene Mechanismen abzutöten [79]. Die direkte Tötung von Zellen erfolgt durch die Sezernierung von lysierenden Enzymen wie Perforin. Indirekt induziert die Interaktion des T-Zell-ständigen Fas-Liganden mit dem Fas-Rezeptor einer interagierenden Zelle, ein Apoptosesignal [80]. T-Helferzellen (T_H-Zellen) sind aktivierte CD4⁺ Zellen. Die Namensgebung verrät ihre Funktion. Sie steuern die zelluläre Immunantwort und fungieren als Koaktivatoren für CD8⁺ T- und B-Zellen [10, 81]. .

2.7.1 T-Zell-Reifung

Um eine T-Zell-vermittelte Selbstreaktivität zu verhindern, werden dysfunktionale T-Zellen vom Körper aussortiert: reagiert eine T-Zelle auf MHC gebundene körpereigene Strukturen (Autoantigene) während der Priming-Phase im Thymus zu stark, wird bei dieser Zelle die Apoptose eingeleitet (zentrale Toleranz) [82, 83]. Wird bei APC Kontakt nur das Antigen ohne kostimulatorische Signale präsentiert, geht die T-Zelle in Anergie (periphere Toleranz). Das bedeutet, dass die Zelle zwar nicht abstirbt, jedoch bei erneutem Antigenkontakt nicht aktiv wird. Der zugrundeliegende Mechanismus der T-Zell Anergie konnte in Studien mithilfe von Antikörperblockade der kostimulatorischen Moleküle der Glykoprotein B7-Familie (CD80/CD86) beziehungsweise B7-negativen Zelllinien nachgewiesen werden [84, 85]. Ein spezialisierter CD4⁺ Zellsubtyp, die regulatorische T-Zelle (T_{reg}-Zelle), reift unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors Foxp3 bereits im Thymus aus [86]. In peripheren lymphatischen Organen können T_{reg}-Zellen unter dem Einfluss des transformierenden Wachstumsfaktors (transforming growth factor, TGF) β aus Vorläuferstufen entstehen [87]. T_{reg}-Zellen sind in der

Lage, Immunantworten anderer T-Zelluntergruppen durch die Produktion immunsuppressiver Zytokine wie IL-10 und TGF β zu unterbinden. Diese Eigenschaften (IL-10-Produktion) machen sich auch einige Tumorzellen zunutze, um einem Angriff durch das Immunsystem zu entgehen [88]. Außerdem inhibieren T_{reg}-Zellen die Fähigkeit von APC, T-Zellen zu stimulieren. Durch direkte Bindung von zytotoxischem T-Lymphozyten-assoziierten Antigen 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CTLA4), einem inhibitorischen Rezeptor, an APC unterbinden sie die Antigenpräsentation an T-Effektorzellen [89].

2.7.2 T-Zell Stimulation durch DC

Reife DC können antigenspezifische T-Zellen aktivieren, was zu deren Proliferation und Differenzierung führt. T-Zellen erkennen MHC-gebundene Antigenfragmente über den T-Zell-Antigen-Rezeptor Komplex. Dieser setzt sich aus dem T-Zell Rezeptor (t cell receptor, TCR) und CD3 zusammen [90]. Außerdem braucht es zusätzliche kostimulatorische Signale, die sowohl von DC als auch von T-Zellen ausgebildet werden [91]. Dazu zählen insbesondere die bereits erwähnten Oberflächenaktivierungsmarker CD80 und CD86, die von aktivierten DC exprimiert werden. Das wesentlichste kostimulatorische Molekül der T-Zellen ist CD28 [92]. Der Kontakt von CD80/CD86 mit CD28 führt zur T-Zell Aktivierung, während eine Interaktion von CD80/CD86 mit CTLA4 die Aktivierung verhindert [92]. Beim CTLA4-Signalpfad kommt es durch reverses Signaling zur verminderten Stimulation von APC. So kann eine überschießende Immunantwort unterbunden werden [93, 94]. Zusätzlich exprimieren T-Zellen auf ihrer Oberfläche programmiertes Zelltod-Protein (programmed cell death protein, PD)-1-Rezeptoren [95], die bei Interaktion mit den PD-1/PD-2-Liganden (PDL) tolerogener DC eine Hemmung der Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zelle bewirken. Der PD-1/PDL-Signalpfad fördert die immunologische Selbsttoleranz und reduziert die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, indem es den TCR/CD28 vermittelten Signalpfad hemmt [96, 97].

2.7.3 T-Zellsubpopulationen und ihre Interaktionen mit DC

Aktivierte CTL verlassen die lymphatischen Organe. Im Gewebe lösen sie bei Kontakt mit Zellen deren Zelltod aus, wenn sie den gleichen MHC-I-Antigen-Komplex aufweisen wie die APC beziehungsweise DC tragen, die sie zuvor stimuliert haben [81]. Außerdem sind sie in der Lage, nach Aktivierung durch TCR-Interaktionen, Zytokine wie TNF- α oder INF- γ zu produzieren [98].

CD4⁺ T-Zellen differenzieren nach DC Kontakt weiter aus. Bereits 1986 erwähnte Tim Mosmann die ersten beiden T_H-Zell-Subtypen. Neben den ursprünglich beschriebenen T_H1- und T_H2-Zellen [99], wurde mittlerweile eine Vielzahl an weiteren T_H-Zell-Subpopulationen

entdeckt, die sich in ihrer Funktionsweise und ihrem Zytokinprofil unterscheiden [100]. Welchen Differenzierungsweg die CD4⁺ T-Zelle einschlägt, hängt maßgeblich von proliferierenden Signalen der APC beziehungsweise DC ab (s. Kapitel 2.7.2.1 - 2.7.2.3).

2.7.3.1 T_H1- und T_H2-Zellen

Aktiviert DC-produziertes IL-12, was eine Polarisierung der T-Zellen in Richtung T_H1-Zellen induziert [101]. T_H1-Zellen produzieren vornehmlich IFN- γ und TNF- α , was eine eher zellulär vermittelte Immunantwort durch die Aktivierung von Phagozyten hervorruft [14]. Durch Interaktionen mit dem kostimulatorischen Signal CD40 auf DC mit CD40-Liganden (CD40L) auf T_H1-Zellen wird eine IL-2 Produktion vermittelt. Zudem reguliert eine CD40/CD40L-Interaktion die Überlebensdauer der DC. [66, 99]. Zusätzlich sind T_H1-Zellen in der Lage, durch die Ausschüttung von IL-12 CTL zu aktivieren, welche eine entscheidende Rolle bei Virusinfektionen und Tumorerkrankungen spielen [6, 102]. Bei Anwesenheit von autokrin sezerniertem IL-4 polarisieren CD4⁺ T-Zellen zu T_H2-Zellen, welche vor allem an der humoralen Immunabwehr beteiligt sind [103]. Ihre Zytokine IL-4, IL-5, IL-13 und IL-25 induzieren die Produktion von Antikörpern durch ausdifferenzierte B-Zellen [14]. Außerdem werden T_H2-Zellen mit der Ätiologie von Allergien in Verbindung gebracht. Eine T_H2-Zell vermittelte Produktion von IL-4 und IL-13 induziert einen Switch der Antikörperproduktion in Richtung des Antikörpertyps IgE und induziert die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten [104]. Durch autokrine Zytokinproduktion beeinflussen sich T_H-Zellsubtypen gegenseitig. Das von T_H1-Klonen sezernierte IFN- γ hemmt die Proliferation von T_H2-Zellen [105], wohingegen das T_H2-produzierte IL-10, was im Allgemeinen als immunsuppressives Zytokin bekannt ist, die Entstehung von T_H1-Zellen inhibiert [106].

2.7.3.2 T_H17-Zellen

IL-23 gehört zur IL-12 Zytokinfamilie und wird ebenfalls von aktivierten DC sezerniert. Es verfügt über zwei Untereinheiten (p19 und p40), während p40 die gemeinsame Untereinheit von IL-12 und IL-23 darstellt [107]. IL-23 führt zur Polarisation naiver CD4⁺ T_H-Zellen zu T_H17-Zellen, welche vor allem IL-17 und IL-22 produzieren [108]. Im Immunsystem spielen sie eine Rolle bei der Bekämpfung von Bakterien und Pilzen [107]. Eine Dysregulation, die zu verstärkter Differenzierung (autoreaktiver) T_H17-Zellen führt, wird mit der Entstehung von Autoimmunerkrankungen assoziiert [109].

2.8 Nanopartikel

Die Entwicklung von geeigneten Arzneimitteltherapien stößt immer wieder an ihre Grenzen: sie werden unter anderem durch zu starke Nebenwirkungen, Arzneimittelinteraktionen und eine unzureichende Wirkweise herkömmlicher Medikamente limitiert. Das Forschungsgebiet der Nanotechnologie liefert vielversprechende Möglichkeiten in Form von Behandlungsalternativen sowie neuen Therapiekonzepten und Methoden zur bildgebenden Diagnostik [1, 110].

Als Nanopartikel werden kleinste Partikel mit einer Größe im Nanometerbereich bezeichnet. Gemäß der Arbeitsgruppe Nanomedizin der BfArM kommen in der Nanomedizin Nanopartikel mit einer Größe von < 100 nm zum Einsatz. Für die genauen Größenverhältnisse liegt allerdings keine einheitliche Definition vor. In der Literatur werden Nanopartikel im Kontext als Arzneimittelträger auch mit einer Größe von bis zu 1000 nm angegeben [110, 111]. Für die Herstellung von Nanopartikeln werden lipidbasierte, polymere oder anorganische Trägermaterialien verwendet [1]. Nanopartikel eignen sich optimal als Transportvehikel, um bioaktive Moleküle in den Körper einzubringen. Da ihre physikalisch-chemischen Eigenschaften für entsprechende Anforderungen modifiziert werden können, gewinnen sie in immun-interventionellen Therapien sowie in der personalisierten Medizin immer mehr an Bedeutung [1, 2, 112].

2.8.1 Lipidnanopartikel

Am häufigsten untersucht und klinisch zugelassen sind Nanopartikel auf Lipidbasis (Liposomen und Lipid-Nanopartikel) [6]. Liposomen zählen zu den am besten erforschtesten Nanovakzinen, die Antigene sowie Adjuvantien (Cargo) gleichzeitig transportieren können (s. Kapitel 2.9). Sie sind nicht toxisch und vermitteln eine gesteigerte Aufnahme durch APC. Dennoch interagieren sie mit Bestandteilen im Blutserum, was die Entwicklung stabilerer Lipid-Nanopartikel auf den Markt brachte, die zudem durch eine noch bessere Aufnahme in Immunzellen charakterisiert wurden [2]. Zusätzlich eignen sich kationische Lipid-Nanopartikel besonders zum Transport von Nukleinsäuren, da sie in wässriger Umgebung kationische Mizellen ausbilden, die anionische Nukleinsäure-Moleküle enkapsulieren können [1]. Aufgrund erfolgreicher Studienergebnisse wurden in Deutschland bereits einige lipidbasierte Nanopartikel zur Therapie schwerwiegender Erkrankungen zugelassen. Beispielweise reduziert die Verpackung von Doxorubicin in Liposomen (Handelsname Myocet®) dessen kardiotoxische Wirkung bei der Therapie des metastasierten Mammakarzinoms [113]. Gleiches gilt für die liposomale Formulierung von Daunorubicin (Handelsname DaunoXome®) bei der Therapie des Karposi-Sarkoms [114]. Im Jahr 2018 wurde Onpattro® (Wirkstoff

Patisiran), ein small interfering RNA (siRNA) enthaltender Lipidnanopartikel, zugelassen [115, 116]. Die intravenöse Medikation mit Patisiran wird zur Therapie bei hereditärer Transthyretin-vermittelter (hATTR) Amyloidose eingesetzt, indem es die Produktion fehlerhafter Proteine auf Genebene unterbindet.

2.9 Nanovakzine

Impfungen werden im Allgemeinen mit der Prävention gegen Infektionskrankheiten in Verbindung gebracht. In der Regel werden sie intramuskulär, subkutan oder nasal appliziert [117]. Die Verabreichung eines Erregers in Form eines Lebend- oder Totimpfstoffes (Antigen) führt zur Aktivierung von APC und regt das Immunsystem an, pathogen-spezifische Antikörper zu produzieren. Dies hat zum Ziel, den Körper langfristig vor einer Erkrankung zu schützen, ohne diese selbst durchleben zu müssen [118]. Konventionelle Impfungen bergen jedoch gewisse Risiken: bei Lebendimpfstoffen kann es zur Reversion des Erregers zum Wildtyp kommen. So kam es in der Vergangenheit bei der Polio-Schluckimpfung vereinzelt zur Ausbildung einer Impfpoliomyelitis [119]. Totimpfstoffe sind in der Regel weniger wirksam. Außerdem ist eine suffiziente Wirksamkeit von Protein-Untereinheit-Impfstoffen (Subunit-Impfstoffen) nur in Kombination mit Adjuvantien möglich [118].

Die Nachteile einer konventionellen Vakzinierung sollen mit nanobasierten Arzneimittelträgern überwunden werden, die Erreger-spezifische Antigene (DNA, mRNA oder Proteine) übertragen. Nackte Nukleinsäuren werden vom Körper abgebaut und können selbst kaum Zielzellen transfizieren [120]. Nanopartikel schützen Nukleinsäuren vor verfrühtem Abbau [6]. Nanobasierte Impfstoffe können durch ihre zahlreichen Modifikationsoptionen einerseits spezifische Immunzellen adressieren und andererseits in ihrer immunmodulatorisch vermittelnden Wirkung verstärkt werden [118]. Nicht zuletzt ist die Herstellung von nanopartikulären Formulierungen in der Regel wenig zeitaufwändig. Im Vergleich dazu erfordern konventionelle Vakzine die zeitintensive Züchtung lebender Pathogene, während die für nanobasierte Vakzine benötigten Proteine oder Nukleinsäure-Produkte schneller produziert und somit zügiger an mutierte Virusvarianten angepasst werden können [117]. Als Beispiel sei hier der erfolgreiche Einsatz der nanobasierten mRNA-Impfstoffe Comirnaty® und Spikevax® der Pharmaunternehmen BioNTech/Pfizer und Moderna genannt, die im Rahmen der Coronapandemie zum Einsatz kamen [3, 4].

Die Idee, Impfungen neben der Prophylaxe auch als therapeutisches Mittel bei Tumorerkrankungen einzusetzen, reicht bis ins 19. Jahrhundert zurück [121, 122]. Im Laufe der Jahre wurde erkannt, dass T-Zellen maßgeblich an der Antitumor-Antwort beteiligt sind, für deren Aktivierung stimulierte DC eine entscheidende Rolle spielen. Seit nun mehr als

zwanzig Jahren werden deshalb DC-aktivierende Impfstoffe erforscht [122]. In diesem Zusammenhang steht die Entwicklung von nanobasierten Tumorstoffen [2]. In der Tumorstoff-Therapie ist das Ziel, eine T-Zell Antwort durch den kombinierten Einsatz von Tumor-Antigen und Adjuvans (Cargo) zu induzieren [122]. Für die Herstellung von Tumorstoffen werden unter anderem Nanopartikel mit Nucleinsäuren (mRNA oder pDNA) komplexiert, die für tumorassoziierte Antigene (TAA) kodieren [118]. Die kombinierte Vakzinierung von TAA und Adjuvantien (s. Kapitel 2.9.1.2) soll eine tumorspezifische Immunantwort induzieren [6]. Dazu lieferte die LipoMERIT-Studie mit einer lipidbasierten mRNA-Impfung gegen das maligne Melanom bereits vielversprechende Ergebnisse *in vivo* [7]. In der laufenden Studie wurde Patienten mit malignem Melanom das Tumorstoff FixVac (BNT111) intravenös verabreicht, das für vier verschiedene Melanom-spezifische Tumorantigene kodiert. Die Studienergebnisse zeigten eine gute Verträglichkeit unter der alleinigen Behandlung mit FixVac. Außerdem konnte durch FixVac alleine oder als Kombinationstherapie mit Checkpoint-Inhibitoren ein dauerhaftes Ansprechen in Form von ausreichender T-Zellantwort erreicht werden.

2.9.1 Modifikation von Nanovakzinen

Generell können die physikalisch-chemischen Eigenschaften von Nanopartikeln modifiziert werden, um die Transfektion von APC mit Antigen und/oder Adjuvans zu verbessern und die Immunogenität des Impfstoffes zu erhöhen. Für eine erfolgreiche Transfektion werden meist Hilfsproteine wie Cholesterin und Polyethylenglycol (PEGylierung) verwendet [123].

2.9.1.1 APC-Adressierung durch Nanovakzine

Nanopartikel können spezifische Immunzelltypen adressieren. Dies kann auf unterschiedlichen Wegen geschehen: (I) Passive Adressierung durch die phagozytierenden Eigenschaften von DC. (II) Aktive Adressierung durch Konjugation von DC-spezifischen Liganden an die Nanopartikeloberfläche (zum Beispiel C-Typ-Lektin-Rezeptoren oder Fc-Rezeptoren) [124, 125].

In der Forschung sind die Entdeckung und Konstruktion neuer effizienterer Adressierungsmoleküle von Bedeutung. So untersuchte die Arbeitsgruppe Grabbe/Bros der Universitätsmedizin Mainz beispielsweise die Abschirmeigenschaften eines Polysaccharid-Nanopartikels, dessen Oberfläche Dextran aufgelagert wurde (DEXylierung) mit konventionell verwendeten PEGylierten Nanopartikeln. Die Studienergebnisse zeigten, dass DEXylierte Nanopartikel sowohl passive Adressierungs- als auch Adjuvansfunktionen für DC besitzen,

während PEGylierte Nanopartikel eine eher ungerichtete Immunzelladressierung bewirken [112].

2.9.1.2 Adjuvantien für Nanovakzine

Die immunstimulierenden Eigenschaften von Nanopartikeln können durch Kombination mit Adjuvantien noch weiter verstärkt werden [2]. Außerdem machen Adjuvantien, die von PRR erkannt werden, eine suffiziente Stimulation von APC erst möglich, da die Präsentation eines Antigen ohne Gefahrensignal (Adjuvans) T-Zell Toleranz induziert (s. Kapitel 2.7.1) [126]. Deshalb sollten Tumorstoffe mit Adjuvantien kombiniert werden, da die vom Tumor sezernierten TAA ohne Adjuvans nicht vom Körper als pathogen erkannt werden. Geeignete Adjuvans-Funktionen können von stimulatorisch wirkenden Nukleinsäuren oder Nanopartikeln vermittelt werden [6, 126]. Außerdem können Nanopartikel zusätzlich mit Adjuvantien konjugiert werden. Dafür eignen sich unter anderem (spezifische) Liganden für TLR7 und TLR8 [117]. Die Herstellung und Erprobung synthetischer Substanzen die sowohl für das immunogene Antigen als auch für Adjuvantien kodieren, ist Gegenstand aktueller Forschung [6].

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Autoklav	Systec VX-150	Systec GmbH, Linden
Binokular-Mikroskop	Olympus CH-2	Olympus Europa SE & Co.KG., Hamburg
Dispenser	RepeatOne Dispenser	Starlab International GmbH, Hamburg
Durchflusszytometer (FACS-Gerät)	Attune® Nxt	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Flockeneisbereiter	flake-line	Wessamat Eismaschinenfabrik GmbH, Kaiserslautern
Inkubatoren	Inkubator Avantgarde.Line CB150	Binder GmbH, Tuttlingen
Kühlagerraum	4 °C- Lagerraum	Viessmann, Allendorf
Kühlschränke	MediLine Premium No Frost Kombi	Liebherr-International AG, Bulle, CHE
Gefrierschränke	Panasonic ultra-low freezer MediLine	Panasonic Corporation, Kadoma, JP Liebherr-International AG, Bulle, CHE
Kühlzentrifuge	Megafuge 40 R TX 1000 (Rotor 75003607) Centrifuge 5424R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA Eppendorf AG, Hamburg
Laborabzug	Airflow Controller	Waldner Holding GmbH, Wangen
Mechanischer Summenzähler	-	Baumer Ltd., Swindon, UK
Mikrowelle	Severin MW 800	Severin Elektrogeräte GmbH, Sundern

Multipipette	50-300µl Finnpipette®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Neubauer Zählkammer	Neubauer Improved Bright line, Depth 0,100 mm, 0,0025 mm ²	Paul Marienfeld GmbH & Co.KG., Lauda-Königshofen
Pipetten	0,5-10 µl Finnpipette™ Digital 1-10 µl Finnpipette™ Digital 20-200 µl Finnpipette™ Digital 1-10 µl Proline® 5-50 µl Proline® 50-200 µl Proline® 200-1000 µl Proline® 0-2,5 µl Pipette Research® 0,5-10 µl Pipette Research® 20-200 µl ErgoONE® 100-1000 µl Pipette Research®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA Satorius AG, Göttingen Eppendorf AG, Hamburg Starlab International GmbH, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus ®	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000c	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Sterilwerkbank	LaminAir HB2448	Heareus Instruments GmbH, Hanau
Szintillationszähler (β-Counter)	Wallac 1450 MicoBeta® Trilux	Wallac OY, Turku, FI
Tischzentrifugen	Sigma 1-14 Galaxy Mini Star	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA VWR International GmbH, Darmstadt
Vakuuiergerät	-	Audion Elektro Verpackungsmaschinen GmbH, Kleve
Vortexer	REAX 2000 Vortex-Schüttler	Heidolph Instruments

	Vortex Genie 2TM	GmbH & Co.KG., Schwabach VWR International GmbH, Darmstadt
Wasserbad	GFL 1012	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zellernter	Harvester 96®	Tomtec Inc, Hamden, CT, USA

3.1.2 Laborutensilien

Tabelle 2: Verwendete Laborutensilien

Laborutensil	Bezeichnung	Hersteller
FACS-Ständer	Nalgene Reagenzglasgestell	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Präparierbesteck	Schere, Pinzette	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Reaktionsgefäß-Ständer	-	Laborbestand

3.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Bezeichnung	Hersteller
Aluminiumfolie	-	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aufreinigungssäule	LS-Column	Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach
Bakteriologische Petrischale	94 mm, Höhe 16 mm	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen
Dispenserspitzen	5ml Eppendorf Combitips advanced	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalhandschuhe S	Vasco ® Nitril blue	B/Braun, Melsungen
Einmalkanülen	0,45 x 13 mm Microlance TM 0,9 x 40 mm Microlance TM	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

FACS-Röhrchen	Falcon® 5ml Rundbodenröhrchen	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
PCR-Tubes	0,2 ml PCR-Gefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen	TipOne ® (10 µl, 200 µl, 1000 µl) 10 µl, 100 µl, 1000 µl	Starlab International GmbH, Hamburg Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße	0,5 ml 1,5 ml, 2 ml	Roth, Karlsruhe Sarstedt AG, Numbrecht Eppendorf AG, Hamburg
Röhrchen	15 ml Falcon, 50 ml Falcon	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Serologische Pipetten	5 ml, 10 ml, 25 ml	Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, AUS
Spritze	Injekt®-F Luer Solo 1 mL BD Discardit™ II 20 mL	B.Braun Melsungen AG, Melsungen Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturplatten	Cellstar ® 12 well cell culture plate, sterile with lid Cellstar ® 96 well cell culture plate, sterile with lid	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellsieb	EasyStrainer™ 40 µm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

3.1.4 Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Organismus	Vertreiber
Knochenmark-abgeleitete Dendritische Zellen (BMDC)	<i>M. musculus</i>	Laborinterne Gewinnung

3.1.5 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
2-Propanol ROTIPURAN® ≥99,8 %, p.a., ACS, ISO	Roth, Karlsruhe
3% Essigsäure mit Methylenblau	Stemcell Technologies, Vancouver, CAN
radioaktives ³ H-Thymidin (³ HTdR)	Amersham Biosciences GmbH, Freiburg
AbC™ Total Antibody Compensation Bead Kit	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Ampuwa Aqua dest. (H ₂ O)	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg
Attune® 1X Focusing Fluid	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Attune® Wash Solution	Thermo Fischer Scientific Inc. Waltham, MA, USA
Ethanol, vergällt 70%	Laborbestand
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Lipopolysaccharid (LPS)	Calbiochem, Darmstadt
Ovalbumin (OVA)	Calbiochem, Darmstadt
Terralin Liquid	Schülke und Mayr GmbH, Norderstedt
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
β- Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe

3.1.6 Lösungen und Puffer

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer

Puffer	Zusammensetzung
Dubbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
FACS-Fix	PBS 0,7 % Paraformaldehyd
FACS-Puffer	PBS 2 % FCS 2 mM EDTA
Gey'sches Lyse Reagenz	100 µM EDTA 10 mM KHCO ₃

	155 mM NH ₄ Cl Aqua dest. pH 7.4 (steril filtriert)
--	--

3.1.7 Medien und Supplemente

Tabelle 7: Verwendete Medien und Supplemente

Medien	Zusammensetzung/Hersteller
BMDC-Medium	IMDM-Medium 5 % FCS 10 ng/ml GM-CSF 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % β-Mercaptoethanol 1 % L-Glutamin
Fötiales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
L-Glutamin	Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA
Rekombinanter muriner Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (rmGM-CSF)	Laborinterne Herstellung
Test-Medium	IMDM-Medium 5 % FCS 1 % Pen/Strep 1 % β-Mercaptoethanol 1 % L-Glutamin
Waschmedium	D-PBS 5% FCS

3.1.8 Transfektionsreagenzien und Nukleinsäure

Tabelle 8: Verwendete Transfektionsreagenzien und Nukleinsäure

Transfektionsreagenz	Hersteller/-ort
AdiFectin™	InvivoGen, San Diego, CA, USA
DOTAP	Roth, Karlsruhe

jetOPTIMUS®	Polyplus, Illkirch, Frankreich
OVA- messenger RNA (mRNA)	TriLink Biotechnologies, San Diego, CA, USA
Plasmid DNA (pDNA): Vektor pGL3-Basic	Promega, Madison, WI, USA

3.1.9 Antikörper

Tabelle 9: Verwendete Anti-Maus-Antikörper

Antikörper	Fluorophor	Klon	Menge/Probe	Hersteller/-ort
CD11c	APC- eFluor®780	N418	1 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CD40	PE	3/23	0,5 µl	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
CD80	PerCP- eFluor™710	16-10A1	0,5 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
CD86	FITC	GL-1	0,5 µl	BioLegend, San Diego, CA, USA
FcgRII/III (rat a-ms; 1:1000)	-	2.4G2	25 µl	Laborbestand
MHCII	eFluor®450	M5/114.15.2	0,5 µl	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.1.10 Färbungsreagenzien und Blockierungssubstanzen

Tabelle 10: Verwendete Färbungsreagenzien und Blockierungssubstanzen

Bezeichnung	Funktion	Fluorophor	Hersteller/-ort
Fixable Viability Dye (FVD) 506	Markierung toter Zellen	eFluor™506	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA

3.1.11 CBA-Reagenzien

Tabelle 11: Verwendete Reagenzien für die CBA-Analyse

Zytokin/Bezeichnung	Menge/Probe	Hersteller/-ort
Mouse IFN- γ Capture Bead A4	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IFN- γ PE Detection Reagent	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-6 Capture Bead B4	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-6 PE Detection Reagent	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-10 Capture Bead C4	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-10 PE Detection Reagent	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-12 Capture Bead D7	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-12 PE Detection Reagent	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-23 p19/p40 Capture Bead D7	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse IL-23 p19/p40 PE Detection Reagent	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
Mouse TNF- α Capture Bead C8	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA

Mouse TNF- α PE Detection Reagent	0,2 μ l	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
--	-------------	--

3.1.12 Kits

Tabelle 12: Verwendete Kits

Kits	Hersteller/-ort
BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse/Rat Soluble Protein Master Buffer Kit	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
CD8+ T Cell Isolation Kit mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Label IT [®] Cy [™] 5 Labeling Kit	Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA

3.1.13 Software und elektronische Medien

Tabelle 13: Verwendete Software und elektronische Medien

Software	Firma
Attune [®] NxT Flow Cytometer Software	Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA
FCAP-Array [™]	Soft Flow, Pécs, Ungarn
Microsoft Office 2021	Microsoft Corp, Redmond, WA, USA

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen

3.2.1.1 Gewinnung von Knochenmarkszellen aus Mäusen

Zu Beginn wird eine zervikale Dislokation an dem Versuchstier vorgenommen. Anschließend erfolgt die sterile Entnahme des Beckens, der Femuren und Tibien. Die Knochen werden vorsichtig mithilfe eines flusenfreien Tuches von Haut- und Muskelschicht befreit. Es folgt die Reinigung mittels Waschmedium, Desinfektion mit 70%igem Ethanol und die Überführung in frisches Testmedium. Bei den Unterschenkelknochen werden die Enden mit einer Schere entfernt. Für die Gewinnung von Knochenmarkszellen wird der Markraum mithilfe einer Kanüle (0,45 x 13 mm) mit BMDC-Medium gespült, bis die Knochen weiß erscheinen. Die gewonnene Zellsuspension wird durch ein Zell-Sieb (Porenweite 40 µm) gegeben, um eine Einzelzell-Suspension zu erhalten. Im Anschluss werden die Zellen bei 300xg, 4°C, 10 min zentrifugiert und danach der Überstand dekantiert. Es folgt die Zugabe von 1ml Gey'sche Lyse Reagenz zum Aufbrechen der Erythrozytenmembran. Die Lyse endet nach einer Minute mit der Zugabe von 1 ml Test-Medium. Im Anschluss wird erneut eine Zentrifugation durchgeführt (300xg, 4°C, 10 min) und danach der Überstand dekantiert. Ein weißes Zellpellet am Boden des Reagenzglases weist auf eine erfolgreiche Lyse der Erythrozyten hin. Schließlich wird 5 bis 10 ml BMDC-Medium hinzugefügt und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer ermittelt (s. Kapitel 3.2.1.2).

3.2.1.2 Bestimmung der Zellkonzentration mittels einer Neubauer-Zählkammer

Um die genaue Zellzahl der Zellsuspension ermitteln zu können, ist es wichtig, zuvor abgestorbene Zellen anzufärben. Diese werden für die Ermittlung der Zellkonzentration nicht mitgezählt. Hierfür werden 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypanblau in einer 96-Well Platte gemischt. Da die Membran toter Zellen permeabel ist, dringt der Farbstoff in das Cytosol ein und färbt diese Zellen blau. So können abgestorbene von lebenden Zellen abgegrenzt werden. Es werden 10 µl der vorbehandelten Zellsuspension auf die Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Zellen werden in je 4x4 Quadraten ausgezählt. Anschließend wird die Zellzahl pro Volumen berechnet und die gewünschte Zellkonzentration für die Weiterverarbeitung unter Zugabe von BMDC- (für BMDC-Kulturen) oder Test-Medium (für Milzkulturen) eingestellt (s.u.).

Berechnung der Zellzahl pro ml:

Anzahl der gezählten Zellen (Z) × Verdünnungsfaktor × Konstanter Faktor =Zellzahl/ml

$$Z \times 10 \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Berechnung der gewünschten Zellkonzentration:

$$c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$$

c₁: errechnete Zellzahl pro ml

c₂: gewünschte Zellzahl pro ml

V₁: gesuchtes Volumen

V₂: gewünschtes Endvolumen

Berechnung des gewünschten Endvolumens für die gewünschte Zellkonzentration:

$$V_1 = c_2 \times V_2 : c_1$$

3.2.1.3 Kultivierung von BMDC

Nach der Präparation (s. Kapitel 3.2.1.1) und Auszählung (s. Kapitel 3.2.1.2.) der Knochenmarkszellen wird die Zellsuspension mit BMDC-Medium auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Das Medium enthält den murinen Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, GM-CSF). Hierbei handelt es sich um ein körpereigenes Zytokin, welches die Ausreifung und Differenzierung hämatopoetischer Vorläuferzellen bewirkt [127]. Für die BMDC-Kultur wird die Zellsuspension mit BMDC-Medium 1:10 auf 2×10^5 Zellen/ml verdünnt. Je 1 ml davon wird in jeden Napf einer 12-Well Platte gegeben. Außerdem werden je 10 ml der Suspension in Petrischalen (10 cm Durchmesser) überführt. Die Ansätze im 12-Well-Format werden später für Fluorescence-activated cell scanning (FACS)-Assays sowie nachfolgende DC/T-Zell-Kokulturen verwendet, diejenigen im 10 cm-Schalenformat dienen der späteren Cytometric Bead Array (CBA)-Analyse. Die Kulturen werden sieben bis neun Tage bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Am Tag drei und Tag sechs wird die Zellsuspension mit frischem BMDC-Medium gefüttert (s. Tabelle 14).

Tabelle 14: Fütterung der BMDC-Kulturen

	Tag der Kultivierung	Menge BMDC-Medium
12-Well Platte	3	+ 700 µl
12-Well Platte	6	- 900 µl + 1000 µl
Petrischale	3	+ 5 ml
Petrischale	6	+ 5 ml

Zwischen Tag sechs und Tag neun erfolgt die Weiterbehandlung und Zugabe der Transfektionskomplexe (s. Kapitel 3.2.2).

3.2.1.4 Gewinnung und Aufbereitung von Milzzellen aus Mäusen

Nach zervikaler Dislokation wird die Milz entnommen. Zur Vorbereitung wird ein 40 µm Zellsieb auf ein 50 ml Falcon gesetzt. Die Milz wird zusammen mit FACS-Puffer in das Sieb gegeben und mittels des Stempels einer 1 ml Spritze durch die Poren gedrückt. Danach werden die Zellen für 10 min bei 4 °C und 300xg zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Es folgt die Erythrozytenlyse mittels 1 ml Gey'sche Lyse Reagenz, eine erneute Zentrifugation und eine Zugabe von 5-10 ml Test-Medium zum Zellsediment. Eine genaue Beschreibung dieser einzelnen Arbeitsschritte befindet sich in Kapitel 3.2.1.1 zur Aufbereitung von BMDC. Anschließend werden die Zellen mit Hilfe der Neubauer Zählkammer ausgezählt und mit Test-Medium auf 4×10^6 Zellen/ml für die FACS-Analyse eingestellt (s. Kapitel 3.2.1.2). Die Milzzellen werden direkt am Tag der Gewinnung weiterbehandelt (s. Kapitel 3.2.1.5. und 3.2.2.2).

3.2.1.5 Isolierung von CD8+ T-Zellen

Um CD8+ T-Zellen isolieren zu können, wird die Milz einer OT-I-Maus entnommen. Bei OT-I handelt es sich um einen transgenen Mausstamm, dessen CD8+ T-Zellen einen OVA spezifischen T- Zell- Rezeptor aufweisen [128]. Die Zellen werden, wie oben erwähnt, isoliert und aufbereitet. Es entfällt jedoch die Lyse der Erythrozyten, da diese in einem späteren Arbeitsschritt beim Durchlauf durch eine LS-Säule ausgewaschen werden. Zum Auszählen wird deshalb mit Methylenbau versetzte 3%ige Essigsäure verwendet. Die Säure lysiert die Erythrozyten für das Auszählen, während Methylenblau die Kerne der restlichen Zellen anfärbt. Danach folgt die immunmagnetische Zellseparation (magnetic cell separation, MACS).

Das Prinzip der MACS basiert auf einer magnetischen Trennung von verschiedenen Zellpopulationen. Dafür wird die entsprechende Zellsuspension mit antikörper-konjugierten paramagnetischen Nanopartikeln inkubiert, wobei der Antikörper spezifisch entweder an einen für die Zielzell-Population spezifischen Rezeptor (positive Selektion) oder aber an Rezeptoren aller unerwünschter Zelltypen in der Zellmischung (negative Selektion) bindet. Die Zellsuspension wird durch eine LS-Säule geleitet, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Dabei verbleiben die Nanopartikel/Antikörper-markierten Zellen aufgrund der magnetischen Anziehung in der Säule, während die unmarkierten Zellen ungehindert hindurchfließen und aufgefangen werden können.

Für die Positivselektion von CD8⁺ OT-I T-Zellen wird 10 µl eines Cocktails aus CD8⁺ T-Zell-Antikörper und Micro Beads plus 90 µl FACS-Puffer pro 10⁷ Zellen gemäß Herstellerprotokoll der Firma Miltenyi Biotec GmbH hinzugegeben. Die Zellsuspension wird danach 10 min bei 4 °C im Kühlschrank inkubiert. In der Zwischenzeit wird eine LS-Säule vorbereitet. Dafür werden 3 ml FACS-Puffer auf die Säule gegeben (Äquilibrierungsschritt). Danach wird die Zellsuspension auf die LS-Säule gegeben. Anschließend wird mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen, um alle CD8-negativen Zellen zu entfernen. Es werden 5 ml FACS-Puffer zugegeben und die LS-Säule aus dem Magnetfeld genommen. Die markierten Zellen werden eluiert, indem die Zellsuspension mit Hilfe eines Stempels aus der Säule herausgedrückt und in einem 50 ml Falcon aufgefangen wird. Es wird erneut 10 min bei 4 °C und 300xg zentrifugiert. Anschließend wird 2 ml Testmedium zum Resuspendieren hinzugegeben. Die Zellen werden unter dem Mikroskop ausgezählt und für das Ansetzen der Kokulturen (s. Kapitel 3.2.2.5) auf 5x10⁵ Zellen/ml eingestellt.

3.2.2 Zellkultur-assoziierte Methoden

3.2.2.1 Fluoreszenz Markierung der Nukleinsäure

Um eine durch Nanopartikel vermittelte Nukleinsäure-Bindung beziehungsweise Aufnahme durch BMDC in der FACS- Messung nachweisen zu können, wird plasmid DNA (pDNA) oder mRNA zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 5 (Cy5) markiert. Dafür wird das Labeling Kit Label IT® CyTM5 von Mirus Bio LLC gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

Zu Beginn wird der Gehalt der Nukleinsäure im Spektralphotometer ermittelt und mittels D- PBS auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingestellt. Für die Markierung werden anschließend die in Tabelle 15 aufgelisteten Reagenzien in einem Eppendorf Gefäß zusammengeführt. Es ist zu beachten, dass *Label IT*® zuletzt hinzugegeben werden muss.

Tabelle 15: Reagenzien für die Fluoreszenzmarkierung der Nukleinsäure

Reagenz	Volumen in μl	Gesamtvolumen in μl
H ₂ O	35 μl	-
10X Labeling Buffer A	5 μl	-
Nukleinsäure (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	5 μl	-
Label IT®	5 μl	-
-	-	50 μl

Der Reaktionsansatz wird für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit folgt die Fällung der markierten Nukleinsäure. Hierfür wird der Reaktionsansatz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und jeweils 1 ml absolutes Ethanol sowie 100 μl Natrium-Acetat (pH 5,3) hinzugegeben und der Fällungsansatz gevortext. Die Lösung wird für 20-30 min bei -80°C abgekühlt und danach für 10 min mit 11000xg bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nun sollte ein blaues Pellet am Boden des Gefäßes sichtbar sein. Der Überstand wird dekantiert. Es wird 1 ml 70% Ethanol hinzugegeben und erneut zentrifugiert (5-10 min, 11000xg, RT). Da das Pellet nun leicht ablösbar ist, wird der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Schließlich werden 20 μl H₂O hinzugefügt und resuspendiert bis sich das Pellet komplett aufgelöst hat. Nun wird der Nukleinsäure-Gehalt mit dem Spektralphotometer ermittelt. Die markierte Nukleinsäure kann anschließend für die Komplexierung mit den Nanopartikeln verwendet werden.

3.2.2.2 Komplexierung der Nukleinsäure mit Nanopartikeln

Es werden drei verschiedene liposomale Strukturen zur Bildung nanopartikulärer Transfektionskomplexe verwendet: AdiFectin™, DOTAP und jetOPTIMUS®. Die Vorgehensweise richtet sich nach dem jeweiligen Protokoll des Herstellers. Im Folgenden werden für diese Formulierungen die Bezeichnungen Transfektionsreagenzien und Nanopartikel verwendet.

Für die FACS-Analyse wird pro Ansatz und Nanopartikel ein Gesamtansatz mit 2 μg pDNA-Mix hergestellt. Hierfür wird Cy5-markierte Nukleinsäure mit unmarkierter pDNA im Verhältnis 1:6 vermischt und durch Zugabe von H₂O auf ein Volumen von 10 μl aufgefüllt.

Für den CBA werden 1 μg unmarkiertes pDNA-Material pro Ansatz und Nanopartikel verwendet. Die Koppelung der pDNA mit den Nanopartikeln erfolgt durch elektrostatische Bindung an die positiv geladenen Carrierstrukturen.

AdiFectin-Ansätze

Um AdiFectin verwenden zu können, muss dieses zuerst solubilisiert werden. Um eine Lösung von 1 mg/ml zu erhalten, wird 50 µl von 100% Ethanol zum Pulver gegeben und solange gevortext, bis sich der Stoff vollständig in der Flüssigkeit gelöst hat. Abschließend wird 450 µl H₂O hinzugegeben.

Zur Herstellung eines 200 µl Gesamtansatzes wird zunächst 12 µl AdiFectin zusammen mit 168 µl Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) in einem Eppendorf Gefäß vermischt. Die Lösung wird 1-2 sec gevortext und 5 - 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird 10 µl (= 2 µg pDNA) des Nucleinsäure-Mixes in einem sterilen Eppendorfgefäß vorgelegt und die vorbereitete AdiFectin-Lösung zur pDNA gegeben. Die Suspension wird gevortext und erneut für 10-20 min inkubiert.

jetOPTIMUS-Ansätze

Zur Herstellung eines 200 µl Gesamtansatzes jetOPTIMUS mit 2 µg DNA-Mix wird zunächst 180 µl jetOPTIMUS Puffer mit 10 µl (= 2 µg pDNA) des Nucleinsäure-Mixes vermischt und danach 10 sec gevortext. Anschließend wird 3 µl jetOPTIMUS zur Lösung hinzugegeben und erneut 1 sec gevortext. Die Suspension wird für 10 min bei RT inkubiert.

DOTAP-Ansätze

Zur Herstellung eines 100 µl Gesamtansatzes DOTAP mit 2 µg DNA-Mix werden zunächst zwei sterile Eppendorf Gefäße vorbereitet. In das erste Gefäß wird 40 µl IMDM mit 10 µl (= 2 µg pDNA) des Nucleinsäure-Mixes vermischt und ca. 2 sec gevortext. Im zweiten Reaktionsgefäß werden 12,8 µl DOTAP zusammen mit 37,2 µl IMDM vorgelegt. Die Nucleinsäure-Suspension wird nun zur DOTAP-Lösung gegeben. Zum Vermischen darf die Flüssigkeit nur vorsichtig resuspendiert werden. Anschließend wird 10-15 min bei RT inkubiert.

3.2.2.3 Stimulierungsansätze für die FACS-Analyse

Nach Komplexierung der Nucleinsäure mit den Nanopartikeln erfolgt die Behandlung der Zellkulturen. Die Zugabe der Nanopartikel zu den BMDC-Kulturen (2x10⁵ Zellen/ml) erfolgt in Dosis-Kinetik nach Schema in Tabelle 16-18.

Tabelle 16: AdiFectin Ansatz für die FACS-Analyse

Ansatznummer	3	4	5	6	7	8
pDNA Konzentration/Well	25 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng	1000 ng
Volumen/Well	2,5 µl	5 µl	10 µl	25 µl	50 µl	100 µl

Tabelle 17: jetOptimus Ansatz für die FACS-Analyse

Ansatznummer	9	10	11	12	13	14
pDNA Konzentration/Well	25 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng	1000 ng
Volumen/Well	2,5 µl	5 µl	10 µl	25 µl	50 µl	100 µl

Tabelle 18: DOTAP Ansatz für die FACS-Analyse

Ansatznummer	15	16	17	18	19	20
pDNA Konzentration/Well	25 ng	50 ng	100 ng	250 ng	500 ng	1000 ng
Volumen/Well	1,25 µl	2,5 µl	5 µl	12,5 µl	25 µl	50 µl

Außerdem werden mit LPS-stimulierte (100 ng/ml) Ansätze für Einzelfärbungen zur Kontrolle und ein Ansatz für die unbehandelte und ungefärbte Probe vorbereitet. Hinzu kommt ein Ansatz zur Positivkontrolle, in den nur das Cy5-markierte pDNA-Material (166,7 ng) gegeben wird und eine Negativkontrolle ohne jegliche Zusätze.

Tabelle 19: Milzzellen-Ansätze für die FACS-Analyse

Ansätze	pDNA-Konzentration/Well
unbehandelt	-
Cy5 pDNA	250 ng
AdiFectin	-
AdiFectin + Cy5 pDNA	250 ng
DOTAP	-
DOTAP + Cy5 pDNA	250 ng

Hinzu kommen Ansätze für die Einzelfärbungen (Cy5-pDNA, FVD sowie Antikörper) und eine ungefärbte Probe.

Die Kulturen müssen anschließend über Nacht bei 37 °C und 10% CO₂ im Brutschrank inkubieren. Danach können sie für die FACS-Analyse verwendet werden (s. Kapitel 3.2.3.1).

3.2.2.4 Stimulierungsansätze für den CBA

In der CBA-Analyse soll die Zytokinfreisetzung nach Inkubation der BMDC durch die nanopartikulären Formulierungen mit nachfolgender T-Zell Aktivierung gemessen werden.

Dafür werden die BMDC-Kulturen (2x10⁵ Zellen/ml) an Tag sieben bis neun mit den gleichen pDNA-enthaltenden Nanopartikeln inkubiert, wie sie für die FACS-Analyse verwendet werden (s. Kapitel 3.2.2.2). Für diese Kulturen wird hier nur unmarkierte pDNA in geringerer Konzentration eingesetzt. Zusätzlich wird ein Ansatz für die Negativkontrolle aufgenommen, der keine Nanopartikel enthält. Aufgrund der erhöhten Sterblichkeit der Zellen unter der Behandlung mit jetOPTIMUS (s. Kapitel 4.2), wurde dieses Transfektionsreagenz nicht für die Generierung von Proben für Zytokinmessungen verwendet. Für die Analyse der Zytokinfreisetzung der BMDC werden die Zellen aus den Petrischalen geerntet. Die BMDC werden in ein 50 ml - Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wird zentrifugiert und der Überstand dekantiert (300xg, RT, 8 min). Danach wird mit BMDC-Medium bis zu einem Endvolumen von 1 ml aufgefüllt. Es folgt das Auszählen der Zellzahl mithilfe der Neubauer-Zählkammer und das Einstellen der Suspensionslösungen auf 10⁶ Zellen/ml. Eine ausführliche Beschreibung zur Vorgehensweise befindet sich in Kapitel 3.2.1.2. Die Suspension wird in eine 96-Well Platte (100 µl/Well) überführt und gemäß dem Schema in Tabelle 20 und 21 für die BMDC-Kultur behandelt. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Am darauffolgenden Tag werden die Zellsuspensionen in den 96-Well Platten zentrifugiert (300xg, 4 °C, 5-10 min). Die Zytokine befinden sich nun im Überstand in Suspension. Hiervon werden je 60 µl vorsichtig mit einer Multipette aufgenommen und in eine neue 96-Well Platte überführt. Die Suspensionslösungen werden bei - 20 °C bis zur CBA-Analyse eingefroren aufbewahrt.

Tabelle 20: AdiFectin Ansatz für den CBA

Probenname	1	2	3	4	5	6
pDNA Konzentration/Well	2,5 ng	5 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
Volumen/Well	0,25 µl	0,5 µl	1 µl	2,5 µl	5 µl	10 µl

Tabelle 21: DOTAP Ansatz für den CBA

Probenname	7	8	9	10	11	12
pDNA Konzentration/Well	2,5 ng	5 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
Volumen/Well	0,25 µl	0,5 µl	1 µl	2,5 µl	5 µl	10 µl

Die Kultivierung und Behandlung der Kokulturen mit CD8+ T-Zellen für den CBA kann dem Kapitel 3.2.2.5 entnommen werden. Die CBA-Analyse aller vorbereiteten Ansätze wird in Kapitel 3.2.3.2 beschrieben.

3.2.2.5 Kokultivierung mit OT-I

Für die Kokulturen mit OT-I werden die BMDC-Kulturen (2×10^5 Zellen/ml) im 12-Well-Format nach dem Schema in Tabelle 22 behandelt. Bei Ovalbumin (OVA) handelt es sich um ein Modell-Antigen, welches zur Aktivierung OVA responsiver T-Zellen verwendet wird [129]. Die Ansätze mit der Kombination OVA und LPS dienen zur Positiv- und eine unbehandelte Probe zur Negativkontrolle. Die Nanopartikel werden, wie in Kapitel 3.2.2.2 erwähnt, vorbereitet. Dieses Mal wird jedoch mRNA als Erbmaterial verwendet. Hinzu kommt ein Ansatz mit OT-I Zellen ohne jegliche Zusätze. Erwähnenswert ist, dass für die Positivkontrolle LPS (100ng/ml) erst nach drei Stunden Inkubation zum OVA-Ansatz gegeben wird. Die Kulturen werden über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert.

Tabelle 22: Ansätze für den CBA der OT-I Kokultur

Ansätze	Volumen/Well
unbehandelt	-
OVA	5µg/ml
OVA + LPS	100 ng/ml
OVA – mRNA	1 µg/ml
AdiFectin + OVA-mRNA	entsprechend 1 µg/ml OVA-mRNA
DOTAP + mRNA	entsprechend 1 µg/ml OVA-mRNA

Am nächsten Tag werden die Zellen geerntet und jede Probe in ein 15-ml Falcon überführt. Die BMCD werden zentrifugiert (300xg, RT, 8 min), der Überstand dekantiert und das Zellsediment in 0,5 ml Testmedium aufgenommen. Die Zellen werden mithilfe der Neubauer-Zählkammer ausgezählt (s. Kapitel 3.2.1.2) und durch Zugabe von Test-Medium auf

10^5 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wird je 200 μ l der Zellsuspension in Triplikatsansätzen in eine 96-Wellplatte überführt, sodass sich jeweils die ersten drei Wells der Platten belegt werden. In den übrigen Wells wird je 100 μ l Test-Medium vorgelegt, um im Anschluss eine sequenzielle 1:2-Verdünnungsreihe ansetzen zu können.

Dafür werden mit einer Multipipette jeweils 100 μ l des ersten Triplikats in das darauffolgende Triplikats überführt, resuspendiert und dieser Vorgang sequenziell für alle Verdünnungsstufen wiederholt.

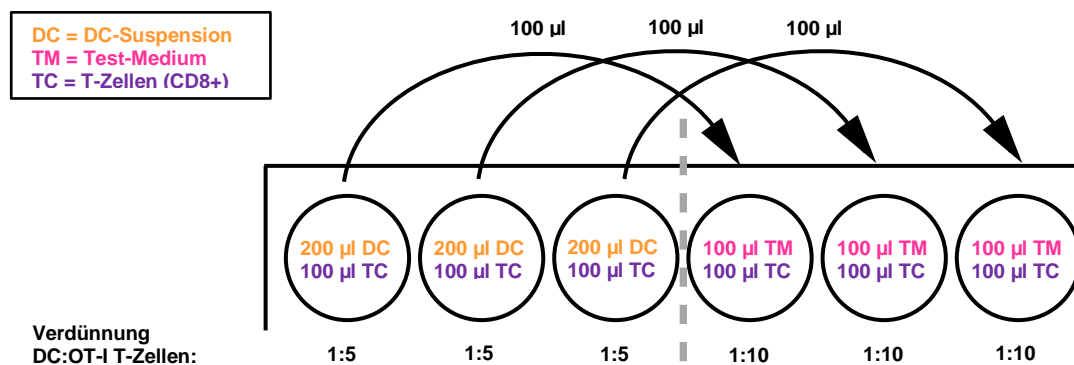


Abbildung 5: Ausschnitt einer 96-Well Platte für die Ansätze der Kokultur.

Dargestellt ist beispielhaft die Verdünnungsreihe der Kokultur mit OT-I Zellen. Es werden je 100 μ l aus den ersten Triplikaten entnommen und in die, mit 100 μ l BMDC-Medium vorbereiteten, Wells überführt. Der Verdünnungsschritt wird noch viermal wiederholt, sodass am Ende sechs verschiedene BMDC- Suspensionen mit einem Endvolumen von je 100 μ l entstehen. Die Zugabe von 100 μ l CD8+ T- Zellen pro Well erfolgt in einem zweiten Schritt.

Nach der positiven Isolierung der CD8+ T-Zellen aus Maus-Milzzellen (s. Kapitel 3.2.1.4), wird die T-Zellkonzentration auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Davon werden je 100 μ l zu den zuvor verdünnten Ansätzen der vorbehandelten BMDC-Kulturen gegeben. Außerdem wird ein zusätzliches Triplikate, welches nur OT-I Zellen enthält angelegt. Anschließend werden die Kokulturen für zwei bis drei Tage bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Danach werden Aliquote der Überstände für die CBA-Analyse (s. Kapitel 3.2.3.2) abgenommen und bei -20°C eingefroren sowie 3H-Thymidin für den Proliferationsassay (s. Kapitel 3.2.3.3) zugegeben.

3.2.3 Mikroskopie

3.2.3.1 Fluorescence-activated cell scanning (FACS) - Analyse

Mithilfe der Durchflusszytometrie können Partikel oder Zellen gezählt und anhand ihrer physikalischen und molekularen Eigenschaften in einem Flüssigkeitsstrahl analysiert werden. Bei der FACS-Analyse geschieht dies in Form von Fluoreszenzfarbstoffen, die an Antikörper gekoppelt sind. Diese können an Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Strukturen binden und diese markieren. Die markierten Zellen werden in einem dünnen Flüssigkeitsstrom mit Laserlicht mit geeigneter Wellenlänge bestrahlt. Das dabei entstehende Streulicht ist abhängig von Größe und Granulierung der Zelle und ermöglicht somit die Differenzierung zwischen verschiedenen Zelltypen. Außerdem werden die gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe durch den Laser angeregt. Dabei werden die Elektronen auf ein höheres Energieniveau gehoben und fallen nach der Belichtung auf ihr Grundniveau zurück. Als Folge wird Energie in Form von Photonen frei. Dabei entstehen je nach Fluorochrom Lichtsignale in unterschiedlichen Wellenlängen, die vom Messgerät in elektronische Signale umgewandelt und als Messdaten gespeichert werden. Diese werden als mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) oder prozentualer Anteil angegeben. Der MFI-Wert ist ein Maß für die Menge an Fluoreszenzfarbstoff, der pro Partikel und Oberflächenmarker gebunden wird. Er ist proportional zur Menge an gebundenem Antikörper. Dadurch gelingt eine quantitative Analyse der Expressionsmarker. In dieser Arbeit wurde das Durchflusszytometer Attune Nxt der Firma Thermo Fisher verwendet.

Für die FACS-Analyse müssen die Kulturansätze zuerst gefärbt werden. Eine ausführliche Beschreibung zur Behandlung der zu analysierenden Ansätze findet sich in Kapitel 3.2.2.2. Die FACS-Färbung der BMDC-Kulturen erfolgt zwischen Tag sieben und neun. Die Milzzellen werden bereits am zweiten Tag gefärbt. Hierfür werden die Zellen geerntet und je Ansatz in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Ansätze werden mit 1 ml D-PBS pro Röhrchen gewaschen und zentrifugiert (300xg, 5-10 min, 4°C). Danach wird der Überstand dekantiert. Damit die Zellen nicht unspezifisch über den konstanten Fc-Anteil durch die fluoreszenzmarkierten Antikörper angefärbt werden, muss vor der Färbung 2.4G2 (25 µl/Röhrchen, 1:100- Verdünnung) zugegeben werden. Hierbei handelt es sich um einen blockierenden Antikörper, welcher die Besetzung von Fc-Rezeptoren (FcYRII und FcYRIII) verhindert. Die Suspensionen werden anschließend gevortext und für 10-15 min bei 4 °C inkubiert. In der Zwischenzeit wird ein Mastermix für die Nanopartikel hergestellt. Dieser besteht aus dem in Tabelle 23 und 24 aufgeführten Fluoreszenz-Antikörperspektrum gemischt mit 25 µl FACS-Puffer pro Ansatz. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden pro FACS-Röhrchen 25 µl des Mastermixes zugegeben. Für die Antikörpermengen der Einzelfärbungen s. Tabelle 23 und 24.

Die Ansätze werden gevortext und für 20-45 min bei 4°C im Dunkeln gelagert. Danach wird erneut mit 2 ml D-PBS/Röhrchen gewaschen, zentrifugiert (300xg, 5-10 min, 4 °C) und anschließend der Überstand dekantiert. Die Ansätze der Einzelfärbungen sowie die Negativkontrolle sind nun fertig. Sie werden mit je 1 ml Fix-FACS fixiert, gevortext und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Die übrigen Ansätze werden nach dem letzten Waschen mit FVD (Fixable Viability Dye) - eFluor 506 gemäß Hersteller Protokoll von Thermo Fisher Scientific behandelt. FVD ist ein Fluoreszenz-Farbstoff, welcher zum Anfärben toter Zellen benutzt wird, da er die löchrige Membran dieser Zellen überwinden kann und Amine zytoplasmatischer Proteine bindet. Bevor die Substanz eingesetzt werden kann, wird eine 1:1000 Verdünnung mit D-PBS angesetzt. Davon wird je 500 µl/Röhrchen zugegeben. Anschließend müssen die Ansätze ca. 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubieren. Danach wird mit je 1-2 ml FACS- Puffer/Röhrchen gewaschen, zentrifugiert (300xg, 4 °C, 5-10 min) und der Überstand dekantiert. Es folgt die Fixierung mit je 1 ml Fix-FACS/Röhrchen. Die fertigen Ansätze werden zusammen mit den Einzelfärbungen und der Negativkontrolle bei 4 °C bis zur FACS-Messung maximal vier Wochen aufbewahrt.

Tabelle 23: Kontrollansätze und Einzelfärbungen für die FACS-Analyse der BMDC

Ansatznummer	Stimulanz/Fluoreszenzfarbstoff	Volumen/Probe
21	unbehandelt + unstained	-
22	pDNA/Cy5	Volumen entsprechend 166,7 ng
23	CD11c/APC – eFI780	1 µl
24	CD40/PE	0,5 µl
25	CD80 – PerCP/eFI710	0,5 µl
26	CD86 – FITC	0,5 µl
27	MHCII – eFI450	0,5 µl
28	FVD – eFI506	0,5 µl

Tabelle 24: Kontrollansätze und Einzelfärbungen für die FACS-Analyse der Milzzellen

Ansatznummer	Stimulanz/Fluoreszenzfarbstoff	Volumen/Probe
25	unbehandelt + unstained	-
26	FVD – eFl780	0,5 µl
27	pDNA/Cy5	Volumen entsprechend 250 ng
28	CD19 – SB702	0,25 µl
29	CD3 – eFl506	0,5 µl
30	NK1.1 – PE	0,2 µl
31	CD11c – eF450	0,5 µl
32	CD11b – SB600	0,125 µl
33	Ly6G – PE-eFL610	0,25 µl
34	CD86 – FITC	0,5 µl

3.2.3.2 Cytometric Bead Array (CBA) - Analyse

Der Cytometric Bead Array ermöglicht es, lösliche Proteine wie zum Beispiel Zytokine zu markieren. Dies geschieht nach dem Prinzip der „Sandwich-Technik“ mithilfe sogenannter (capture) Beads. Jedes Bead ist mit einem Zytokin-spezifischen Antikörper ausgestattet. Nach Bindung an den jeweiligen Botenstoff werden die entsprechenden Beads durch Detektionsantikörper, die das Fluorochrom Phycoerythrin (PE) gebunden haben, markiert. Die Zytokine können somit anschließend mithilfe der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Das CBA Kit von BD Biosciences ermöglicht so eine proportionale Quantifizierung von Zytokinen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Zytokine gemessen: TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 p19/p40. Bei DC/T-Zell-Kokulturanalysen wurden die Zytokine TNF- α und IF- γ analysiert.

Vor der Durchführung des CBA werden die zuvor vorbereiteten 96-Well-Platten der BMDC-Kulturen (s. Kapitel 3.2.2.4) sowie die Aliquote der Kokulturen (s. Kapitel 3.2.2.5) bei RT aufgetaut. FACS-Röhrchen werden vorbereitet und beschriftet.

Zuerst wird eine Verdünnungsreihe für den Antikörper-Standard-Mix hergestellt. Hierfür wird in elf 0,5 ml Eppendorfgefäße je 25 µl Waschmedium gegeben. Anschließend wird aus dem 50X Grundstock (GS) (10.000 pg/ml) 25 µl Flüssigkeit entnommen und in das erste Eppendorfgefäß, in dem sich Waschmedium befindet, überführt, um eine 1:2 Verdünnung herzustellen. Diese Verdünnungsreihe wird so fortgeführt, dass am Ende im letzten Gefäß ein 1:1024 Mischverhältnis entstanden ist. Das letzte Eppendorfgefäß dient als Negativkontrolle. Die jeweiligen Zytokinkonzentrationen der Verdünnungsreihe können Abbildung 6 entnommen werden.

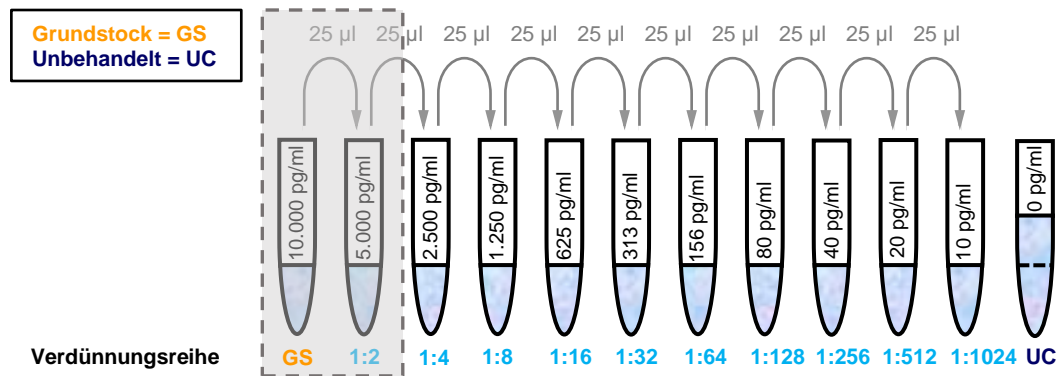


Abbildung 6: Standard-Verdünnungsreihe für den CBA.

Dargestellt ist die Verdünnungsreihe des Standardmixes mit den entsprechenden Zytokinkonzentrationen für jede Verdünnungsstufe in jedem Eppendorfgefäß. Hierfür wird in elf 0,5 ml Eppendorfgefäße je 25 µl Waschmedium vorgelegt. Danach wird eine serielle Verdünnungsreihe von 1:2 hergestellt, indem aus dem Grundstock (GS) mit der höchsten Konzentration (10.000 pg/ml) 25 µl entnommen und in das erste vorbereitete Eppendorfgefäß überführt werden. Die Endkonzentration im vorletzten Gefäß beträgt 10 pg/ml. Das letzte Eppendorfgefäß enthält als unbehandelte Probe (untreated control, UC) nur Waschmedium und dient als Negativkontrolle.

Nun folgt die Herstellung eines Mastermixes für die Zugabe der Beads. Die Suspension wird in einem Eppendorf vorgelegt und muss im Dunkeln erfolgen. Pro CBA-Ansatz aus den 96 - Well Platten für die BMDC- sowie Kokulturen (s. Kapitel 3.2.2.4 und Kapitel 3.2.2.5) wird 10 µl Waschmedium mit je 0,2 µl der jeweiligen Beads - Suspension vermischt und anschließend gevortext. Je 10 µl des Mastermixes wird in alle FACS-Röhrchen vorgelegt. Danach wird in die ersten zwölf Röhrchen je 10 µl der Reihe nach aus der Verdünnungsreihe des Antikörper-Standard - Mixes gegeben. Ab Röhrchen Nummer dreizehn werden je 10 µl des CBA-Ansatzes pro FACS-Röhrchen zugegeben. Anschließend folgt die Inkubation für eine Stunde im Dunkeln bei RT.

In der Zwischenzeit wird ein Mastermix für die Zugabe der Detektions-Antikörper angesetzt. Die Vorgehensweise gleicht der Herstellung des Mastermixes für die Beads. Statt der Beads-Suspension wird hier je 0,2 µl der Antikörperlösung zugegeben.

Nach dem Ende der Inkubationszeit wird je 10 µl vom Antikörperansatz in alle FACS-Röhrchen gegeben und erneut eine Stunde im Dunkeln bei RT inkubiert.

Ist die zweite Inkubationsrunde beendet, wird mit je 1 ml Waschmedium pro Röhrchen gewaschen und für 5 min bei 300xg, 4 °C und RT zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und erneut 100 µl Waschmedium in jedes FACS-Röhrchen gegeben. Anschließend erfolgt die FACS-Messung am Attune Nxt und die Auswertung mittels FCAP Array.

3.2.3.3 Proliferationsassay

Mithilfe dieser Analyse soll untersucht werden, ob mit funktionalisierten Nanopartikeln präinkubierte BMDC antigenspezifische T-Zellen zur Proliferation bringen können. Hierfür wird radioaktives ^3H -Thymidin ($^3\text{HTdR}$) verwendet. Es wird während der Zellteilung in die DNA-Stränge der sich teilenden T-Zellen eingebaut.

Nach zwei bis drei Tagen Kokultur wird je 0,25 μCi $^3\text{HTdR}$ pro Well zu gegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen werden die Platten bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur Messung gelagert. Die Zelllysate werden mithilfe eines Zellerntegeräts auf eine Membran übertragen und diese dann in der Mikrowelle getrocknet. Danach wird die Membran zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einer Plastikfolie eingeschweißt. In der Szintillationsflüssigkeit sind Substanzen enthalten, die durch radioaktive Strahlung angeregt werden Lichtblitze zu emittieren. Dadurch kann die schwache β -Strahlung, die von $^3\text{HTdR}$ ausgeht, in Form von Impulsen als Anzahl pro Minute (counts per minute, cpm) mithilfe eines β -Counters gemessen werden.

4 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht, in welchem Ausmaß BMDC durch die nanopartikulären Formulierungen AdiFectin, jetOPTIMUS und DOTAP adressiert und aktiviert werden können. Hierfür wurden die Viabilität von BMDC, die Bindung Cy5-markierter Nukleinsäure und die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern im FACS gemessen. Im Nachgang wurde außerdem eine BMDC-vermittelte T-Zellstimulation über die Messung der T-Zell-Proliferation und BMDC/T-Zell-Kokultur Zytokinkonzentration mittels CBA untersucht. Zusätzlich wurde in weiteren Experimenten mit Maus-Milzzellen evaluiert, inwieweit eine Adressierung und Aktivierung splenischer Immunzelltypen durch die Nanopartikel AdiFectin und DOTAP erfolgt. Die Zell-Viabilität, Carrier-Bindung und Zell-Aktivierung wurden hierfür ebenfalls in der FACS-Messung ermittelt. Die Gating-Strategien für die FACS-Analyse sind den Abbildungen A1-A4 im Anhang zu entnehmen.

4.1 Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die Viabilität unterschiedlicher Immunzelltypen

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Experimente aufgeführt, die untersucht haben, wie sich eine Behandlung mit den Nanopartikeln AdiFectin und DOTAP auf die Viabilität verschiedener Immunzelltypen auswirkt. Dafür wurden Milzzellen aus Mäusen mit einer Kombination aus Cy5-markierter pDNA (250 ng) konjugierten und unkonjugierten Nanopartikeln behandelt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die FACS-Analyse. Für den Viabilitätsnachweis wurde in der FACS-Färbung FVD-eFI506 verwendet. Die separaten Ansätze mit Proben aus „leeren“ sowie konjugierten Nanopartikeln diente der Analyse, welche Auswirkungen eine Kombination der Nanopartikel mit Nukleinsäure auf die Viabilität hat. Auf Ansätze mit jetOPTIMUS wurde nach Feststellung der erhöhten Sterblichkeit der Zellen vor allem in hohen Dosen verzichtet (s. Kapitel 4.4).

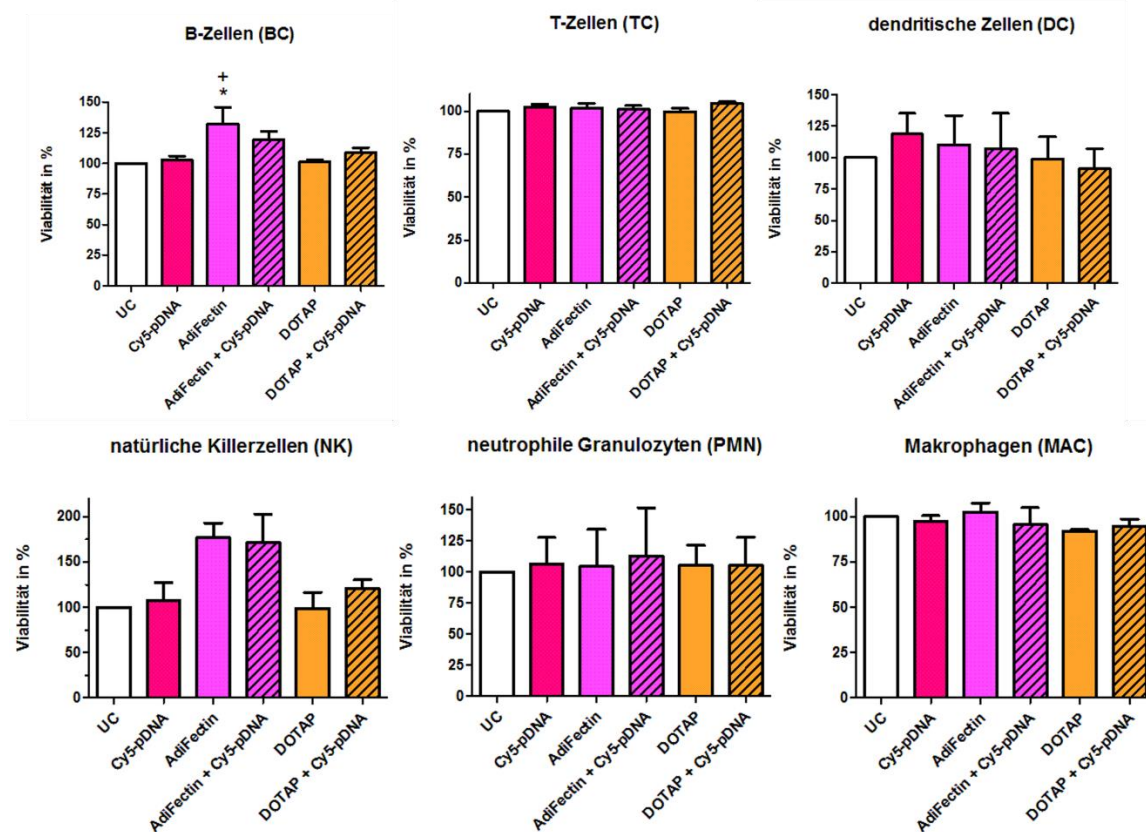


Abbildung 7: Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die Viabilität unterschiedlicher Immunzelltypen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Viabilität in % \pm Standardfehler nach Behandlung der Milzzellen mit Cy5-markierter pDNA konjugierten (250 ng) und unkonjugierten Nanopartikeln aus $n=4$ für AdiFectin und DOTAP. In jedem Experiment wurde auf die Viabilität in der jeweils unbehandelten Probe (untreated control, UC) normiert. Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *UC, ⁺AdiFectin. */⁺ $p < 0,05$.

In Abbildung 7 ist der Effekt der unkonjugierten und konjugierten nanopartikulären Formulierungen auf die Viabilität folgender Immunzellen dargestellt: B-Zellen (b cell, BC), natürliche Killerzellen (natural killer cell, NK), dendritische Zellen (dendritic cell, DC), T-Zellen (t cell, TC), neutrophile Granulozyten (polymorphonuclear leukocyte, PMN) und Makrophagen (macrophage, MAC).

Für BC konnte eine signifikant höhere Viabilität bei der Behandlung mit unkonjugiertem AdiFectin im Vergleich zu UC nachgewiesen werden. In der reinen AdiFectin Probe wurden mehr lebende Zellen gemessen, als dies im DOTAP Ansatz der Fall war.

Bei der Darstellung der NK deutet sich eine Zunahme der Viabilität nach Behandlung mit konjugiertem sowie unkonjugiertem AdiFectin an. Hierfür ließen sich jedoch keine signifikanten Werte ermitteln. Die restlichen Ansätze lieferten keine statistisch relevanten Ergebnisse.

4.2 Bindung von Nanopartikeln an verschiedene Immunzelltypen

Nachdem analysiert wurde, welche unterschiedlichen Immunzellen durch Nanopartikel angesprochen werden, wurde in einem weiteren Experiment untersucht, inwieweit diese Transfektionsreagenzien an diese angesprochenen Immunzellen binden. Dafür wurden Maus-Milzzellen mit unkonjugiertem AdiFectin und DOTAP sowie in Kombination mit je 250 ng Cy5-markierter pDNA behandelt. Die Ansätze wurden über Nacht inkubiert und am nächsten Tag die MFI-Werte im FACS gemessen.

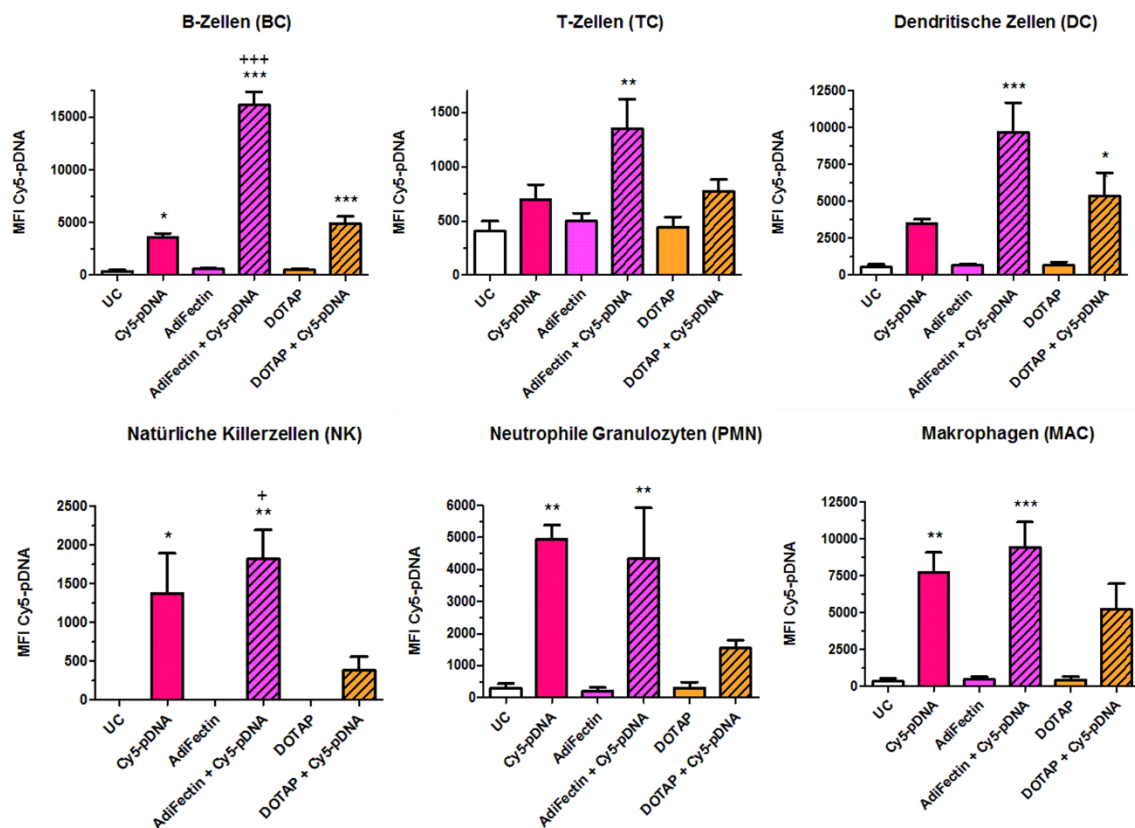


Abbildung 8: Bindung von Nanopartikeln an unterschiedliche Immunzelltypen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der MFI ± Standardfehler verschiedener Immunzelltypen für Cy5 nach Behandlung mit reiner Cy5-pDNA sowie (un)konjugiertem AdiFectin und DOTAP aus n=4 (Für NK gilt n=3). Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *UC, +AdiFectin. */+p<0,05; **p<0,01; ***/+++p<0,001.

In Abbildung 8 ist die Bindung von Cy5-markierter, nanopartikulär-komplexierter pDNA an verschiedene splenische Immunzelltypen dargestellt.

Für BC ließen sich signifikant höhere MFI-Werte im Vergleich zu UC darstellen. Die Proben mit Nukleinsäure konjugierten Nanopartikeln (AdiFectin und DOTAP) sowie die reine Cy5-pDNA Probe zeigten eine vermehrte Bindung von pDNA. Die Messwerte aus den Ansätzen mit den Nanopartikeln lagen im Bereich höherer Signifikanzniveaus als die der reinen Cy5-pDNA Proben. Bei Betrachtung des Diagramms für BC fallen die höchsten MFI-Werte in den Proben für die AdiFectin Konjugate auf. Beim Vergleich dieser Probe mit den DOTAP Ansätzen in Kombination mit Nukleinsäure lieferte die statistische Analyse signifikante Unterschiede.

Der Darstellung der TC ist zu entnehmen, dass eine Behandlung der Zellen mit pDNA komplexiertem AdiFectin in Bezug auf UC signifikant höhere MFI-Werte erzeugt.

In Ansätzen mit konjugierten Nanopartikeln zeigten DC eine verstärkte Bindung der markierten Nukleinsäure im Vergleich zu UC. Die Ergebnisse bei einer Komplexierung mit AdiFectin lieferten höhere Signifikanzniveaus als diese mit DOTAP.

Bei den NK waren die Ergebnisse der Vergleichs-Analyse von Cy5-pDNA/AdiFectin-Komplexen mit DOTAP + Cy5-pDNA statistisch signifikant.

Für NK, PMN und MAC fand die meisten Bindung in den Ansätzen mit reiner Cy5-pDNA sowie wie in Kombination mit AdiFectin statt. Die Signifikanzniveaus unterschieden sich für die Messwerte je nach Zelltyp. Die höchste Stufe erreichte die Kombination von AdiFectin mit pDNA bei der Behandlung von MAC. Ein Konjugat mit DOTAP war hingegen in keiner der drei Immunzelltypen statistisch signifikant.

In Zusammenschau aller Messergebnisse fällt auf, dass es eine vermehrte Bindung von pDNA in den konjugierten Ansätzen mit AdiFectin im Vergleich zu konjugiertem DOTAP zu geben scheint. Statistisch belegbar war dies in den Analysen der Proben für BC und NK, wobei die Ergebnisse der Untersuchungen für BC die höchsten Signifikanzstufen erreichten.

4.3 Expression des Oberflächen-Aktivierungsmarkers CD86 für verschiedene Immunzelltypen

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche präsentiert, die die Expression des Oberflächen-Aktivierungsmarkers CD86 nach Behandlung verschiedener Immunzelltypen mit den Transfektionsreagenzien (AdiFectin und DOTAP) untersucht haben. Im Rahmen dieser Experimente wurden Milzzellen von Mäusen nach gleichem Schema, wie in den Versuchen für die Bindungskapazität behandelt. Nach Isolation der Zellen folgte die Zugabe der reinen

Nanopartikel AdiFectin und DOTAP sowie als Konjugate mit je 250 ng Cy5-markierter pDNA. Anschließend wurden die Kulturen über Nacht inkubiert und am nächsten Tag die MFI-Werte in der FACS-Analyse gemessen.

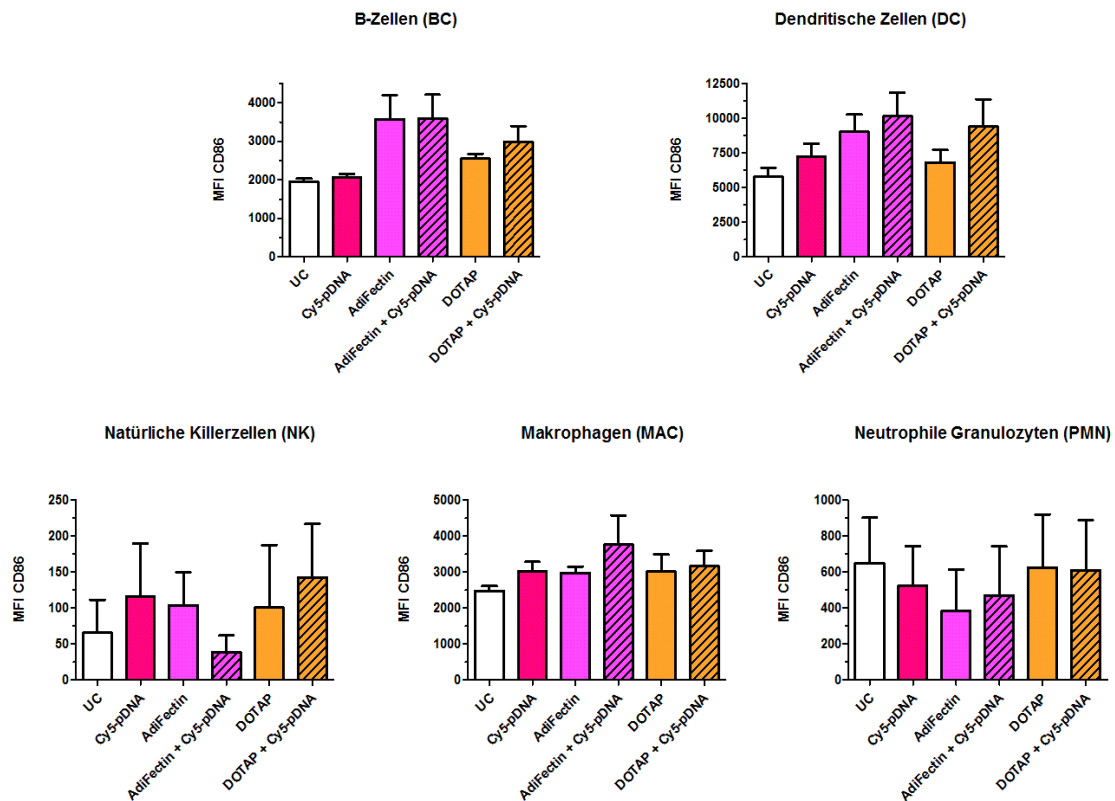


Abbildung 9: Expression des Oberflächen-Aktivierungsmarkers CD86 für verschiedene Immunzelltypen.

Dargestellt sind die Mittelwerte der MFI \pm Standardfehler verschiedener Immunzelltypen für den Oberflächen-Aktivierungsmarker CD86 nach Behandlung mit Cy5-pDNA allein sowie (un)konjugiertem AdiFectin und DOTAP aus $n=4$. Eine statistische Analyse wurde in Bezug auf UC durchgeführt. Außerdem wurden die Messwerte der Proben für unkonjugierte und konjugierte Nanopartikel vergleichend analysiert. Die Signifikanzen mit den exakten p-Werten wurden mit One-Way-ANOVA und dem Tukey-Test ermittelt.

In Abbildung 9 ist die Ausbildung des Oberflächen-Aktivierungsmarkers CD86 für verschiedene Immunzelltypen dargestellt, nachdem sie mit Nanopartikeln allein oder mit pDNA komplexierten Nanopartikeln behandelt wurden.

In allen Versuchsansätzen ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Expression von CD86 im Vergleich zu UC messen. Die statistische Vergleichs-Analyse der

verschiedenen Nanopartikel-Ansätze untereinander ergab ebenfalls keine relevanten Ergebnisse.

Im Folgenden wird beschrieben, was bei der Betrachtung der Diagramme auffällig, jedoch nicht statistisch belegbar war.

BC reagierten auf eine Behandlung mit unkonjugiertem sowie komplexiertem AdiFectin mit einer gleichstarken Präsentation von CD86. Die ermittelten MFI-Werte waren im Vergleich mit den anderen Proben für BC am höchsten. Ebenso deutete sich eine Aktivierung der Zellen durch Zugabe des Nanopartikels DOTAP in Kombination mit pDNA an.

Bei Betrachtung der MFI-Werte für DC ließ sich Ähnliches, wie bei den Versuchen für die BC, beobachten. Jedoch schien die Komplexierung der Nanopartikel eine vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers zur Folge zu haben, als eine Behandlung mit „leeren“ Transfektionsreagenzien. Zudem waren die MFI-Werte der Ergebnisse für DC im Vergleich zu den restlichen Immunzelltypen am größten.

4.4 Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die BMDC-Viabilität

Im Folgenden wird gezeigt, welchen Einfluss pDNA-konjugierte Nanopartikel auf die Viabilität von BMDC haben. Hierfür wurden BMDC-Kulturen mit den pDNA-komplexierten Formulierungen in aufsteigenden Konzentrationen über Nacht inkubiert. Für den Viabilitätsnachweis wurde in der FACS-Färbung FVD-eFl506 verwendet und anschließend im FACS gemessen. Für AdiFectin und DOTAP wurden sieben Ansätze analysiert. Zum besseren Vergleich wurde ein zusätzlicher Nanopartikel jetOPTIMUS zum Versuchprotokoll hinzugefügt. Da sich aber bereits in den ersten Versuchen mit jetOPTIMUS eine erhöhte Sterblichkeit der Zellen bei hohen pDNA-Mengen zeigte, wurde die Versuchsreihe nach drei Durchgängen beendet. Die unbehandelte Probe (untreated control, UC) diente als Negativ- und ein mit LPS behandelter Ansatz als Positiv-Kontrolle (s. Kapitel 3.2.2.3).

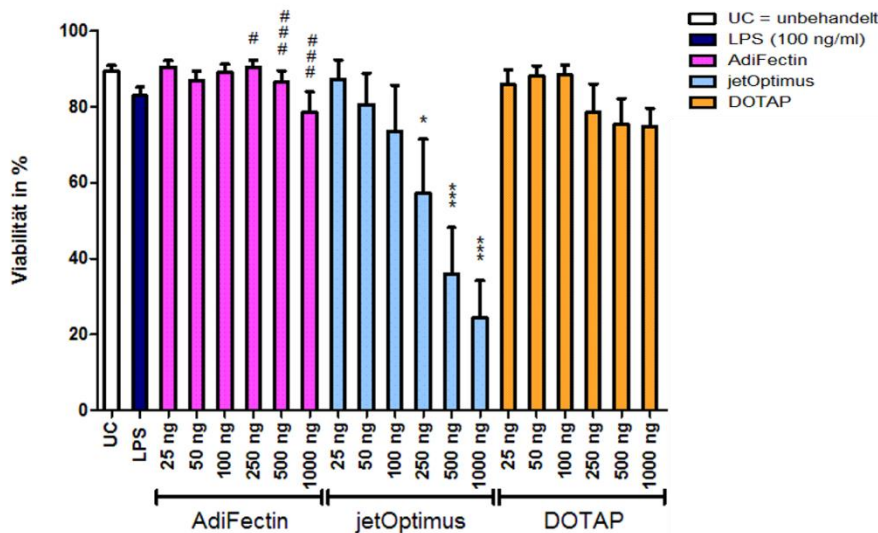


Abbildung 10: Einflüsse der verschiedenen Transfektionsansätze auf die BMDC-Viabilität.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Viabilität in % \pm Standardfehler bei steigender pDNA und Nanopartikel Menge aus $n=7$ für AdiFectin sowie DOTAP und $n=3$ für jetOPTIMUS. Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *UC, #AdiFectin. */# $p<0,05$; ***/### $p<0,001$.

In Abbildung 10 ist der Effekt der konjugierten Nanopartikel auf die Viabilität der BMDC dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Viabilität bei jetOPTIMUS mit pDNA-Mengen über 100 ng (250 – 1000 ng) im Vergleich zu UC. Die höchsten Signifikanzstufen erreichten die Messwerte der jeweils letzten beiden Ansätze. Der gleiche Effekt ließ sich ebenfalls in Bezug auf die Proben mit AdiFectin als Konjugat mit 250 – 1000 ng pDNA nachweisen. Auch hier wurden im Vergleich zu den jetOPTIMUS Ansätzen mit äquivalenten pDNA-Mengen eine höhere Anzahl an viablen Zellen gemessen.

Eine Behandlung der Kulturen mit den Nanopartikeln AdiFectin und DOTAP führte prozentual in etwa zu einer gleichen Anzahl an lebenden BMDC.

4.5 Bindung von Nanopartikeln an die BMDC

Unterschiedliche Nanopartikel adressieren BMDC auf verschiedene Wege. Um festzustellen, ob die getesteten Transfektionsreagenzien ihre gewünschte Zielzelle erreichen und daraufhin auch gebunden werden, wurden BMDC-Kulturen mit pDNA konjugierten nanopartikelären Transfektionskomplexen behandelt und über Nacht inkubiert. Die pDNA wurde mit dem Fluorochrom Cy5 markiert und anschließend die MFI-Werte im FACS gemessen. UC diente als Negativ- und ein mit LPS behandelter Ansatz als Positiv-Kontrolle (s. Kapitel 3.2.2.3).

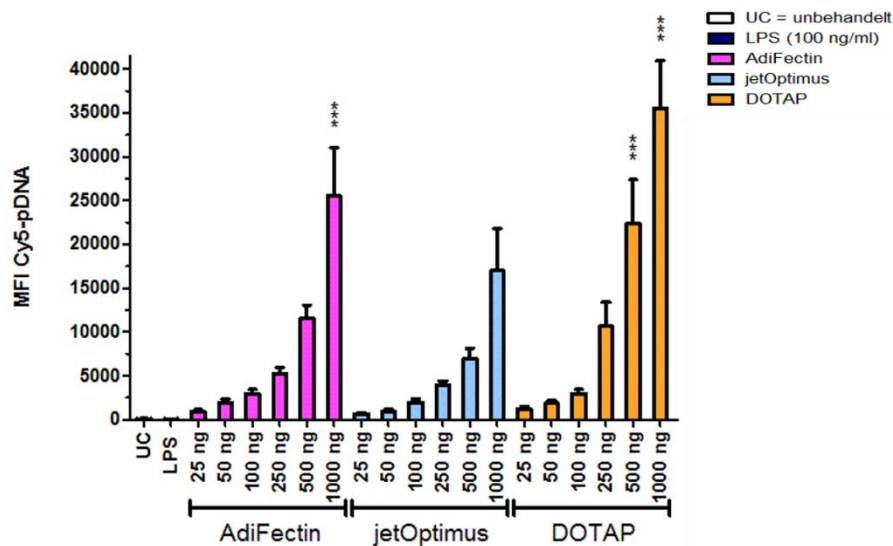


Abbildung 11: Bindung von Nanopartikeln an die BMDC.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) \pm Standardfehler für Cy5 bei steigender pDNA und Nanopartikel Menge aus $n=7$ für AdiFectin sowie DOTAP und $n=3$ für jetOPTIMUS. Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *UC. *** $p<0,001$.

In Abbildung 11 ist die Bindung der pDNA-komplexierten Nanopartikel an BMDC in Form von MFI-Werten dargestellt. Rein deskriptiv lässt sich für alle Ansätze eine zur pDNA-Menge proportional zunehmende pDNA-Bindung feststellen. Die MFI-Werte der AdiFectin Proben mit der höchsten pDNA-Menge (1000 ng) zeigen eine statistisch signifikante Bindung der pDNA gegenüber UC. In den mit DOTAP behandelten Ansätzen (500 ng und 1000 ng) lässt sich ebenso ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu UC darstellen.

4.6 Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern für die BMDC

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente dargestellt, die die Auswirkungen von Nanopartikeln auf die Expression von Aktivierungs-Oberflächenmarkern der BMDC zeigen. Insbesondere wurde hier die konzentrationsabhängige Expression der Marker CD40, CD80, CD86 und MHC II untersucht. Hierfür wurden die BMDC-Kulturen über Nacht mit den Reagenzien inkubiert und anschließend Antikörper in der FACS-Färbung zugegeben, um die entsprechenden Marker in der FACS-Analyse zu detektieren. UC diente als Negativ- und ein mit LPS behandelter Ansatz als Positiv-Kontrolle (s. Kapitel 3.2.2.3).

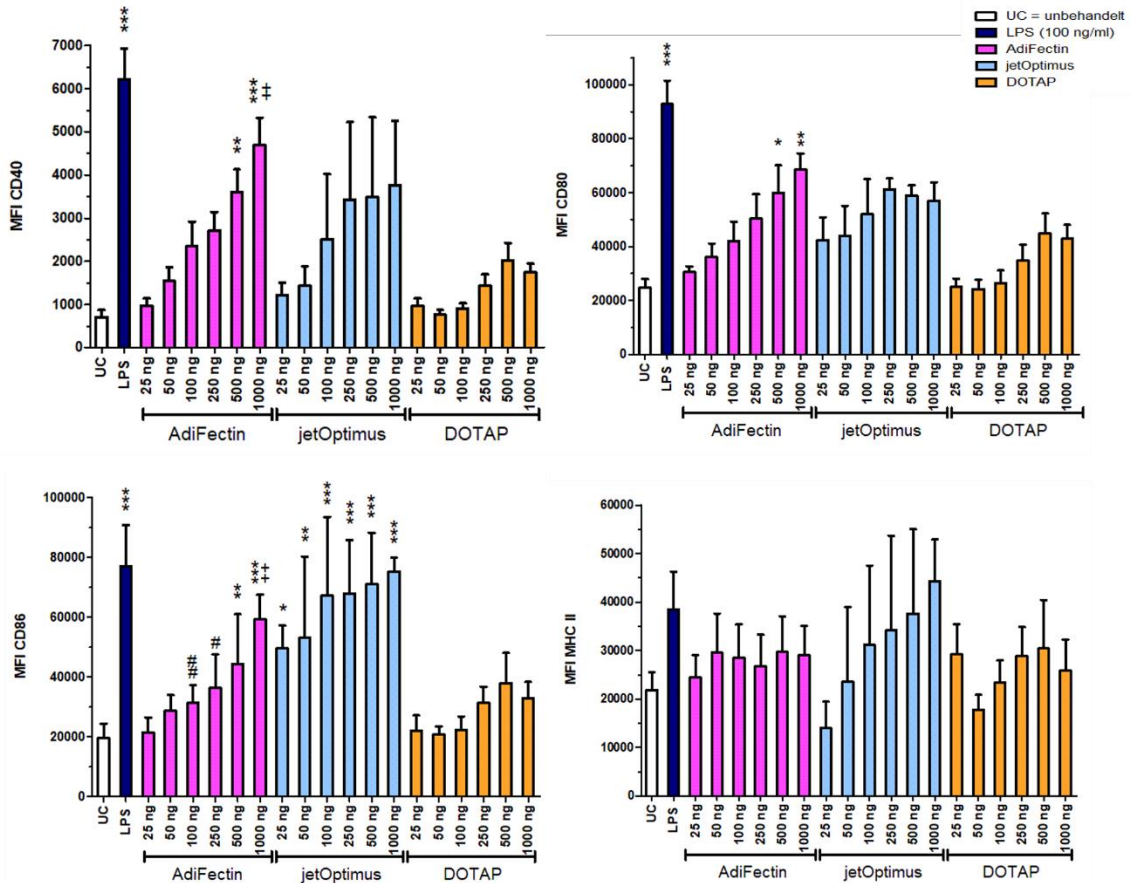


Abbildung 12: Expression von Oberflächen-Aktivierungsmarkern für die BMDC.

Dargestellt sind die Mittelwerte der MFI \pm Standardfehler für die gezeigten Oberflächen-Aktivierungsmarker (n=3-7). Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *UC, #jetOPTIMUS, +DOTAP. */#+p<0,05; **/##/+++p<0,01; ***p<0,001.

In Abbildung 12 ist die Expression der Oberflächen-Aktivierungsmarker nach Stimulierung mit LPS und den Transfektionsreagenzien dargestellt. Die MFI-Werte für LPS gegenüber UC zeigten, außer bei MHC II, höchst signifikant erhöhte Werte.

Eine Behandlung mit Adifectin in den beiden höchsten pDNA Konzentrationen (500 ng und 1000 ng) lieferte gegenüber UC für die Expression von CD40 signifikant erhöhte MFI-Werte. Für die anderen beiden Nanopartikel konnte keine signifikante Erhöhung gegenüber UC dargestellt werden. Eine vermehrte Zunahme der CD40-Expression bei AdiFectin im Vergleich zu DOTAP war bei maximaler pDNA Konzentration zu beobachten.

Die MFI-Werte für CD80 zeigten für LPS sowie die Konjugate aus AdiFectin mit 500 beziehungsweise 1000 ng pDNA in Bezug auf UC eine statistisch signifikante Erhöhung. Höchste Signifikanzniveaus erreichte die Stimulation mit LPS. Beim Vergleich von AdiFectin

mit den beiden anderen untersuchten Nanopartikeln konnte keine signifikante Aufregulation nachgewiesen werden.

Die meisten statistisch nachweisbaren Unterschiede waren für den Marker CD86 messbar. Bei Betrachtung der Messwerte zeigte sich eine statistische Signifikanz bei der Expression unter Behandlung mit AdiFectin als Konjugat mit den beiden höchsten pDNA Konzentrationen im Vergleich zu UC. Die MFI-Werte für jetOPTIMUS waren gegenüber UC in jeder Probe statistisch relevant erhöht. Ab einer pDNA-Menge von 100 ng erreichten sie die höchsten Signifikanzniveaus. Beim Vergleich von AdiFectin mit den beiden anderen Nanopartikeln fiel auf, dass jetOPTIMUS in Kombination mit 100 und 250 ng pDNA eine höhere Expressionsrate des Oberflächenmarkers ausbildete. Dem gegenüber steht eine Behandlung von AdiFectin in Konjugation mit 1000 ng, welche im Vergleich mit DOTAP in äquivalenten Mengen signifikant höhere MFI-Werte lieferte.

Für MHC II ergab sich in keiner der dargestellten Gruppen eine signifikant erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers.

4.7 Zytokinproduktion aktivierter BMDC

Um die Zytokinproduktion von aktivierten BMDC zu untersuchen, wurden die Kulturen mit den Nanopartikeln AdiFectin und DOTAP in Kombination aus aufsteigenden Nukleinsäure Mengen behandelt. Verwendet wurde Cy5-markierte pDNA. Die Ansätze wurden über Nacht inkubiert und die Überstände am nächsten Tag mit Hilfe des CBA analysiert (s. Kapitel 3.2.2.4 und 3.2.3.2).

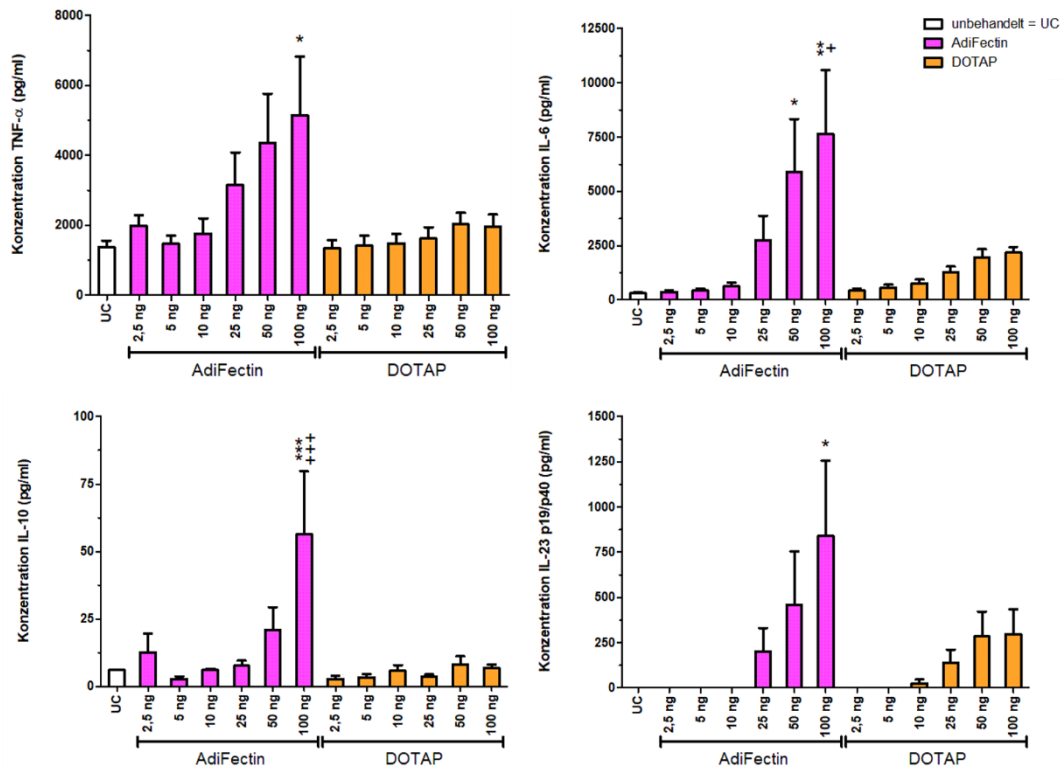


Abbildung 13: Zytokinproduktion aktivierter BMDC nach Behandlung mit verschiedenen Nanopartikeln.

Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen (pg/ml) \pm Standardfehler verschiedener Zytokine für die BMDC-Kulturen bei steigender pDNA und Nanopartikel Menge aus $n=6$ für AdiFectin und DOTAP. Für die Analyse von TNF- α entsprach die Anzahl der Versuchsreihen $n=5$. Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *UC, +AdiFectin. */ $p<0,05$; ** $p<0,01$; ***/+ $p<0,001$.

In Abbildung 13 sind die mittleren Konzentrationen (pg/ml) der produzierten Zytokine von aktivierten BMDC nach Stimulierung mit den nanopartikulären Verbindungen AdiFectin und DOTAP dargestellt. Die Behandlung der Ansätze erfolgte in Dosiskinetik mit Cy5 markierter pDNA. Folgende Zytokine wurden gemessen: TNF- α , IL-6, IL-10 und IL-23 p19/p40.

Für TNF- α ließ sich eine statistische Signifikanz im Vergleich zu UC ermitteln. Bei der AdiFectin-Gruppe führte eine Konjugation des nanopartikulären Transfektionskomplexes mit 100 ng pDNA zur vermehrten Zytokinausschüttung. Rein deskriptiv ist eine vermehrte TNF- α Produktion bei höheren pDNA-Mengen in den AdiFectin Proben gegenüber DOTAP festzustellen. Die Ergebnisse der statistischen Analysen erbrachten jedoch keine relevanten Unterschiede.

Statistisch relevante Messwerte ließen sich auch für IL-6 darstellen. Hier zeigten die Ansätze nach einer Behandlung mit AdiFectin in den beiden höchsten pDNA-Mengen in Bezug auf UC eine vermehrte Zytokinproduktion. Für die pDNA-Menge von 100 ng war dies sogar eine Signifikanzstufe höher. Auch hier lässt sich rein optisch in den Proben der AdiFectin-Gruppe mit höherer pDNA-Konzentration eine vermehrte Zytokinproduktion im Vergleich zu DOTAP ablesen. Statistisch signifikant waren die Messwerte in maximaler Nukleinsäure-Dosierung.

Für IL-10 zeigte sich eine hoch signifikante Ausschüttung bei AdiFectin mit der höchsten pDNA-Konzentration verglichen mit UC. Selbes gilt für den Vergleich beider Nanopartikel äquivalenter pDNA-Menge. Eine Behandlung der Kulturen mit AdiFectin in Verbindung mit 100 ng Nukleinsäure bewirkte eine stärkere Zytokinproduktion als bei DOTAP.

Statistisch signifikante Unterschiede in den Zytokinkonzentrationen für IL-23 p19/p40 konnten nur für die Ansätze mit AdiFectin und 100 ng pDNA in Bezug auf UC erhoben werden. Dabei ist anzumerken, dass lediglich für Proben mit höheren Nukleinsäure Dosierungen Messwerte ermittelt werden konnten. Zusätzlich differierten diese wenigen Ergebnisse interexperimentell sehr stark, sodass auch im Falle einer Normierung diese Messwerte nur bedingt verwertbar sind. Die Rohdaten können in Tabelle A1 im Anhang eingesehen werden.

Allgemein lässt sich in Zusammenschau aller Messergebnisse dieser Versuchsreihen eine durchschnittlich vermehrte Konzentration der Zytokine nach Behandlung der BMDC-Kulturen mit AdiFectin im Vergleich zu DOTAP feststellen, was vor allem bei höheren Nukleinsäure-Dosierungen statistisch belegbar war.

Die Messwerte der CBA-Analyse für IL-12 ergaben zu wenige Messdaten und sind somit nicht analysierbar. Sie werden hier nicht aufgeführt. Die Rohdaten können der Tabelle A2 im Anhang entnommen werden.

4.8 Proliferation von T-Zellen

In Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, welche Auswirkungen eine Behandlung von BMDC mit unterschiedlichen Nanopartikeln auf die Proliferation von CD8+ T-Zellen hat. Dafür wurden BMDC-Kulturen mit den Kombinationen aus 1 µg OVA-mRNA und den Nanopartikeln AdiFectin beziehungsweise DOTAP behandelt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Kokultivierung mit CD8+ T-Zellen aus Milzzellen von OT-I Mäusen. Nach drei Tagen Inkubation wurde radioaktives Thymidin hinzugefügt, um anschließend die Impulse der β -Strahlung von proliferierten T-Zellen mithilfe eines β -Counters messen zu können (s. Kapitel 3.2.2.5 und 3.2.3.3).

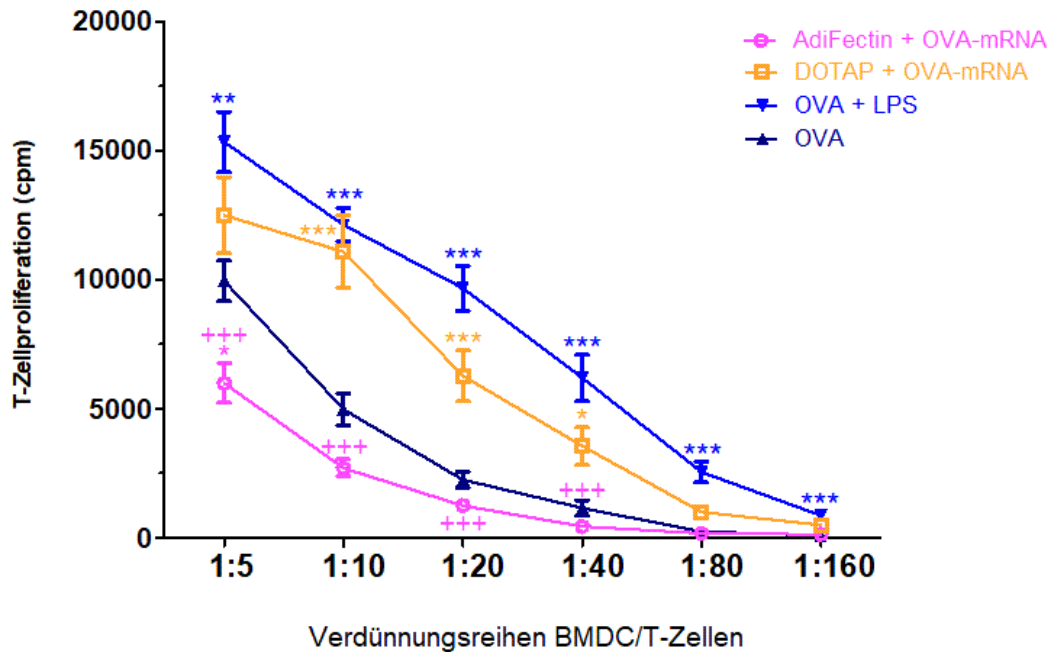


Abbildung 14: T-Zellproliferation nach Kokultivierung mit unterschiedlich behandelten BMDC.

Für die Kultur Ansätze wurden BMDC mit Konjugaten aus AdiFectin beziehungsweise DOTAP und OVA-mRNA zusammen mit CD8⁺ T-Zellen kokultiviert. Dargestellt ist die T-Zellproliferation der unterschiedlichen Verdünnungsreihen aus zwei Triplikatansätzen (n=6) der Kokulturen in Form von Mittelwerten der Impulse pro Minute (counts per minute, cpm) ± Standardfehler. Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *OVA, +AdiFectin. *<0,05; **p<0,01; ***/+***p<0,001. Nicht dargestellt sind die Messergebnisse für OT-I: 18,67 ± 5,033; UC: 63,74 ± 15,51; OVA- mRNA: 48,78 ± 16,44.

In Abbildung 14 ist die T-Zellproliferation aus den Kokulturansätzen für sechs Verdünnungsreihen dargestellt. Für den Ansatz der Kokulturen wurden zuvor mit Nanopartikeln behandelte BMDC sowie CD8⁺ T-Zell-Kulturen verwendet.

Rein deskriptiv sinkt die Proliferationsrate in allen Ansätzen proportional mit zunehmender Verdünnung.

In allen Ansätzen mit OVA und LPS wurden signifikant höhere Impulse pro Minute (cpm) im Vergleich zur OVA Probe gemessen. Die höchsten Signifikanzniveaus lieferten die Ansätze mit den Mischverhältnissen 1:10 bis 1:160.

Die Ansätze mit DOTAP als Konjugat mit OVA-mRNA zeigten für die Verdünnungsreihen 1:10 bis 1:40 höhere Werte als eine reine Behandlung mit OVA. Die Ergebnisse der

Verdünnungsstufen 1:10 und 1:20 lieferten höhere Signifikanzniveaus als der Ansatz im Verhältnis 1:40.

Eine Stimulation mit der Kombination aus AdiFectin und OVA-mRNA zeigte nur in der ersten Verdünnungsstufe statistisch relevante Ergebnisse.

Auffallend sind die Messergebnisse beim Vergleich der Ansätze mit den beiden OVA-mRNA konjugierten Nanopartikeln. Die Proliferationsrate der T-Zellen war bei einer Behandlung mit AdiFectin stets deutlich niedriger als mit DOTAP. Statistisch belegbar war dies auf höchstem Signifikanzniveau für alle Verdünnungsreihen außer bei den vorletzten und letzten Verdünnungsstufen.

Nicht dargestellt sind die Ergebnisse der Proben mit OVA-mRNA. In der Vergleichs-Analyse der Messwerte mit denen aus den OVA Ansätzen proliferierten die T-Zellen in den Verdünnungsreihen 1:5 und 1:10 weniger stark. Der ermittelte p-Wert dieser Messergebnisse lag bei $<0,001$.

4.9 Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen

Um die, durch stimulierte BMDC-vermittelte, Zytokinproduktion von aktivierten T-Zellen zu untersuchen, wurden CBA-Analysen durchgeführt. Hierfür wurden die BMDC-Kulturen mit einer Kombination aus Nanopartikel (AdiFectin oder DOTAP) und 100 ngCy5-markierte OVA-mRNA über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Kokultivierung mit CD8⁺ T-Zellen aus Milzzellen von OT-I Mäusen. Nach drei Tagen Inkubation wurden die Überstände im CBA analysiert (s. Kapitel 3.2.3.2). Auf Ansätze mit jetOPTIMUS wurde nach Feststellung der erhöhten Sterblichkeit der Zellen vor allem in hohen Dosen verzichtet (s. Kapitel 4.4).

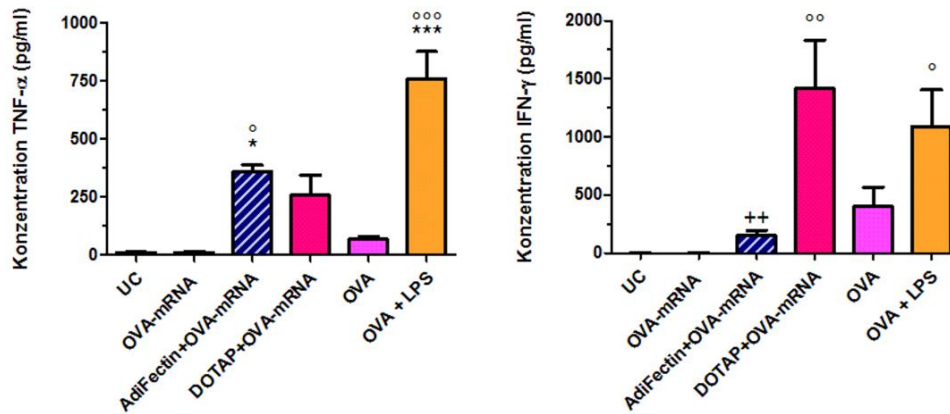


Abbildung 15: Zytokinproduktion aktivierter T-Zellen nach Kokultivierung mit unterschiedlich behandelten BMDC.

Für die Kultur Ansätze wurden BMDC mit Konjugaten aus AdiFectin beziehungsweise DOTAP und OVA-mRNA zusammen mit CD8+ T-Zellen kokultiviert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen (pg/ml) \pm Standardfehler der Zytokine TNF- α und IFN- γ für CD8+ T-Zellen aus je zwei Triplikationsansätzen (n=4). Statistisch signifikante Unterschiede (one-Way-ANOVA und post-hoc Tukey-Test): versus *OVA, °OVA-mRNA, +AdiFectin. */°p<0,05; **/°°p<0,01; ***/°°°p<0,001.

In Abbildung 15 sind die mittleren Konzentrationen (pg/ml) der produzierten Zytokine (TNF- α beziehungsweise IFN- γ) der Kokulturansätze dargestellt. Für die Kulturen wurden BMDC zuvor mit Konjugaten aus AdiFectin beziehungsweise DOTAP und OVA-mRNA behandelt und anschließend zusammen mit CD8+ T-Zellen kokultiviert.

Beim Vergleich der Messwerte für TNF- α mit der OVA-Probe konnten für die Ansätze mit AdiFectin und OVA-mRNA sowie für die Ansätze mit OVA und LPS erhöhte Konzentrationen dargestellt werden. Eine Stimulation mit OVA und LPS lieferte dabei Ergebnisse auf dem höchsten Signifikanzniveau. Der gleiche Effekt konnte bei der Vergleichs-Analyse derselben Proben mit dem OVA-mRNA Ansatz dargestellt werden. Hierbei lag das erreichte Signifikanzniveau für OVA in Kombination mit LPS ebenfalls zwei Stufen höher als bei dem Konjugat mit AdiFectin und OVA-mRNA. Nach einer Behandlung der Ansätze mit dem jeweiligen Nanopartikeln gab es keine statistisch relevanten Unterschiede in Bezug auf die gemessenen Zytokinkonzentrationen.

Für IFN- γ ergaben sich keine signifikanten Konzentrationserhöhungen im Vergleich zur OVA-Probe. Rein deskriptiv lassen sich Unterschiede in den Proben mit DOTAP in Kombination mit OVA-mRNA sowie in der mit LPS und OVA stimulierten Probe darstellen. Beim Vergleich der CBA-Proben mit dem OVA-mRNA Ansatz waren zwei Behandlungsmethoden signifikant auffällig. Eine vermehrte Zytokinproduktion war sowohl im DOTAP Ansatz als auch nach gemeinsamer Stimulation mit OVA und LPS messbar. Ein höheres Signifikanzniveau erreichte

jedoch die Probe mit dem eben erwähnten Transfektionsreagenz DOTAP. Bei der Messwertanalyse der Ansätze mit den Nanopartikeln ließen sich statistisch relevante Unterschiede erheben. So führte eine Behandlung der Kokulturen mit dem DOTAP-Konjugat, im Gegensatz zur AdiFectin-Probe, zu deutlich höheren Messwerten.

5 Diskussion

Modifizierbare Nanopartikel stellen vielversprechende neuartige Arzneimittel dar, die vor allem bei immun-stimulatorischen Therapien zum Einsatz kommen sollen. Zukünftig könnten sie in Form von Tumorstoffen für die Transfektion von DC mit Nucleinsäuren in Form von TAA bei immun-interventionellen Behandlungen eine tragende Rolle spielen. Wie eingangs erwähnt, liegt der Hauptfokus in der antitumorale Immuntherapie aktuell auf der Induktion einer suffizienten T-Zell-Antwort. Dabei nehmen DC eine Schlüsselfunktion ein, weshalb sie auch Gegenstand dieser Dissertationsarbeit sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der nanobasierte TLR7-Ligand AdiFectin mit zwei bekannten lipidbasierten Nanopartikeln im Hinblick auf die Fähigkeit zur Adressierung und Aktivierung von DC sowie zur DC-induzierten T-Zell-Antwort verglichen: DOTAP wurde bereits in vielen Studien zur erfolgreichen Transfektion von pDNA verwendet [2]. jetOPTIMUS wurde als kationischer Nanopartikel bereits in vielen Studien ebenfalls zum Transport von Nucleinsäuren eingesetzt. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Kontext des aktuellen Kenntnisstandes der Literatur beschrieben und diskutiert.

5.1 Darstellung der Studienergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur

Nanovakzine sollten drei grundlegende Eigenschaften aufweisen: (I.) Transport von geeigneten Antigenen, die eine immunmodulatorische Wirkung erzielen; (II.) suffiziente Aktivierung von Immunzellen des angeborenen Immunsystems durch intrinsische Adjuvansaktivität oder co-delivery eines Stimulus; (III.) Adressierung von APC durch den Nanopartikel selbst [2]. Neue Arzneimittelprodukte, so auch Nanopartikel, sollten im Hinblick auf den späteren *in vivo*-Einsatz am Menschen initial in präklinischen Studien stets auf die Grundvoraussetzungen der Biokompatibilität und Non-Toxizität *in vitro* sowie *in vivo* untersucht werden. All diese Eigenschaften wurden im Rahmen dieser Arbeit an AdiFectin im Vergleich mit DOTAP und jetOPTIMUS getestet.

Die zu Beginn durchgeführte Viabilitätsanalyse verschiedener Immunzelltypen (BC, TC, DC, NK, PMN, MAC) aus murinen Milzzellen konnte zeigen, dass AdiFectin und DOTAP in den verwendeten Konzentrationen nicht toxisch sind.

Für den Nachweis einer Interaktion der untersuchten Nanopartikel mit verschiedenen splenischen Immunzelltypen wurde die mit den Agenzien zu komplexierende pDNA mit dem Fluorochrom Cy5 markiert und die Zell-Proben anschließend im FACS analysiert. Nach einer Behandlung mit konjugiertem AdiFectin war die Cy5-Intensität für alle Immunzelltypen

signifikant erhöht. Daraus lässt sich schließen, dass eine Interaktion mit diesem Nanopartikel stattgefunden haben muss und AdiFectin somit in der Lage war an alle untersuchten Immunzellen zu binden. Statistisch gesehen war AdiFectin hinsichtlich einer Adressierung und Bindung an BC und NK DOTAP überlegen.

Die Analyse des Aktivierungsmarkers CD86 für BC, DC, NK, PMN und MAC lieferte keine statistisch verwertbaren Ergebnisse. Außerdem war die Frequenz der gemessenen primären DC in allen Versuchen mit murinen Milzzellen nicht sehr groß. Vermutlich ist dies auf die physiologische Zusammensetzung der splenischen Immunzellpopulation zurückzuführen, in der DC nur etwa 1% der Gesamtpopulation ausmachen [130]. Da der Hauptfokus dieser Arbeit auf der Transfektion und Aktivierung von DC liegt, wurden weitere Experimente für aussagekräftigere Ergebnisse mit BMDC-Kulturen durchgeführt.

Zum besseren Vergleich wurde jetOPTIMUS als zusätzlicher Nanopartikel für weitere Versuche hinzugefügt. Die Ergebnisse der Viabilitätsanalyse zeigten, dass pDNA-konjugiertes AdiFectin und DOTAP ebenfalls in ungefähr gleichem Maße für BMDC nicht zytotoxisch sind, wie es bei der Analyse der Milz-DC der Fall war. Durch eine Behandlung der BMDC-Kulturen mit jetOPTIMUS in höheren pDNA-Konzentrationen (250-1000 ng) konnten durchschnittlich nur noch 1/3 an viabler DC-Population im Vergleich zu niedrigeren pDNA-Dosierungen gemessen werden. Dies führte zum Beschluss, keine weiteren Experimente mit jetOPTIMUS durchzuführen.

Die Ergebnisse der FACS-Analyse zeigten in allen Ansätzen eine pDNA-konzentrationsabhängige Fluoreszenzzunahme für Cy5. Signifikante Ergebnisse konnten in den höheren pDNA-Konzentrationen (500-1000 ng) für AdiFectin und DOTAP erzielt werden. Daraus lässt sich schließen, dass beide Nanopartikel mit den BMDC interagiert haben.

Wie bereits im Kapitel der Literaturdiskussion erwähnt, müssen Nanopartikel von DC endozytiert werden, um das transportierte Substrat für die Antigenpräsentation auf MHC-Molekülen im Zellinneren freizusetzen. Die alleinige Untersuchung der MFI-Werte der pDNA ist für den endgültigen Nachweis einer intrazellulären Lage der transportierten Nukleinsäure und einer damit verbundenen Stimulierung von BMDC jedoch nicht ausreichend. Ein direkter Nachweis einer intrazellulären Lage der Nukleinsäure kann nur mit Hilfe einer konfokalen Laser-Rastermikroskopie (confocal laser scanning microscopy, CLSM) erbracht werden. Neu entwickelte Nanopartikel sollten möglichst viel transportiertes Substrat in die Zielzellen transfizieren, deshalb sollte in weiteren Versuchen die Transfektionseffizienz für AdiFectin analysiert werden. Dafür könnte AdiFectin mit Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)-mRNA komplexiert werden. Im Anschluss daran kann die Frequenz der EGFP-positiven BMDC gemessen werden, um zu evaluieren wieviel Prozent der verwendeten Nukleinsäure tatsächlich transfiziert wurde [131].

Als funktionalen Nachweis für eine DC-Aktivierung wurde die Expression von Aktivierungsmarkern und Zytokinen gemessen. Nach einer Behandlung mit AdiFectin in den beiden höchsten pDNA-Dosen (500-1000 ng) konnte die Expression aller Oberflächenmarker (bis auf MHC-II) statistisch signifikant nachgewiesen werden. DOTAP hingegen wirkte in allen Ansätzen am wenigsten stimulierend. CD86 stellt den wichtigsten Marker für eine DC-Aktivierung dar, da er für eine erfolgreiche Interaktion mit T-Zellen essenziell ist [132]. In den Versuchsreihen für diesen Oberflächenmarker waren die MFI-Werte für AdiFectin und jetOPTIMUS in fast allen Ansätzen signifikant erhöht. Rein statistisch gesehen stellte jetOPTIMUS hier den potentesten Aktivator dar. Diese Ergebnisse sind jedoch nur bedingt aussagekräftig, da für jetOPTIMUS eine sehr kleine Anzahl an Versuchsreihen (n=2) durchgeführt wurde und AdiFectin in allen zuvor durchgeführten Experimenten im Falle von Toxizität, DC-Interaktion und den Aktivierungsmarkern CD40 und CD80 diesem Nanopartikel überlegen war. Weitere Experimente mit mehr Versuchsreihen sind nötig, um diesen Effekt zu überprüfen.

Neben der Expression von Oberflächen-Aktivierungsmarkern schütten aktivierte DC auch Zytokine aus, die ebenfalls gemessen wurden. Aufgrund der festgestellten toxischen Wirkung von jetOPTIMUS auf BMDC wurde ab dieser Versuchsreihe auf den Einsatz dieses Nanopartikels verzichtet. In den höchsten pDNA-Konzentrationen vermittelte AdiFectin eine BMDC-Stimulation, die durch eine vermehrte Produktion aller untersuchten Zytokine messbar war. Außerdem führte eine Behandlung mit der höchsten Konzentration an pDNA/AdiFectin-Komplexen zu statistisch signifikant höheren Konzentrationen an IL-6 und IL-10 im Vergleich zu einer Behandlung mit DOTAP. Die Ergebnisse für IL-10 waren jedoch nur vereinzelt messbar und differierten zudem interexperimentell sehr stark. Die IL-12-Produktion kann aufgrund fehlender Befunde nicht bewertet werden. Eine vermehrte Produktion des inhibierend wirkenden IL-10, könnte ein Hinweis auf eine fehlende IL-12 Ausschüttung sein. Autokrin sezerniertes IL-10 vermittelt eine hemmende Wirkung auf DC, indem es die Ausschüttung von IL-12 negativ beeinflusst [133]. Zudem unterliegt die DC-vermittelte Zytokin-Ausschüttung einer gewissen Kinetik. Eine zu große Menge an IL-10 könnte die nachgeschaltete IL-12-Produktion der DC verhindern [75]. Weitere Versuchsreihen sind nötig, um den Effekt der untersuchten Nanopartikel auf die Produktion der gemessenen Zytokine besser beurteilen und vergleichen zu können. Zudem ist trotz des funktionellen Nachweises einer DC-Adressierung und -Aktivierung durch AdiFectin kein direkter Beweis dafür erbracht, dass der Nanopartikel tatsächlich internalisiert wurde. AdiFectin könnte DC auch TLR-unabhängig durch Interaktionen mit DC-Oberflächenrezeptoren aktiviert haben. Diese Eigenschaften konnten unter anderem bei Adressierungsmolekülen von pegylierten Poly(milch-co-glykolsäure) (pegylated poly(lactic-co-glycolic acid, (PLGA)) Nanopartikeln beobachtet werden [134]. Eine Bindung an oder der Einbau in die DC-Oberfläche wäre ebenfalls mit einer MFI-Wert-Erhöhung

in der FACS-Messung vereinbar. Eine Versuchsreihe bei 37°C und 4°C mit anschließender FACS-Analyse der fluoreszierenden Nukleinsäure könnte Klarheit verschaffen [135]. Bei 4°C ist der Stoffwechsel von Zellen so stark verlangsamt, dass keine Zellwandstrukturänderungen für die Endozytose mehr möglich sind. Eine Abnahme der MFI-Werte bei 4°C-inkubierten BMDC-Kulturen, die zuvor mit AdiFectin behandelt wurden, könnte darauf schließen lassen, dass der Nanopartikel bei 37°C internalisiert wurde.

Eben dargestellte Ergebnisse zeigen, dass durch AdiFectin eine Aktivierung von DC induziert werden kann. Im Vergleich zu DOTAP gelang sogar eine stärkere Stimulation. Für den zukünftigen *in vivo*-Einsatz bei Menschen muss geklärt werden, ob AdiFectin als TLR7-Agonist die gleichen Effekte wie im Mausmodell hervorruft. Dafür könnten Tests an humanen peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) durchgeführt werden, die aus CD14+ Monozyten generiert werden können [48]. Eine Behandlung dieser Zell-Kulturen mit AdiFectin/Nukleinsäure-Komplexen könnte Klarheit verschaffen. Zudem bietet die Tatsache, dass TLR in Immunzellen von aller Art Säugetieren hoch konserviert exprimiert werden [27], die Möglichkeit die gewonnen Studienergebnisse auf den Menschen zu übertragen. Dafür ist wichtig zu bedenken, dass TLR7 sowie TLR8 beim Menschen gemeinsam durch ssRNA stimuliert werden können [136], wobei TLR8 in Mäusen vermutlich nicht funktionsfähig ist [34, 35]. Ein TLR7-Ligand könnte im Menschen somit auch eine Aktivierung von TLR8 bewirken, was in der Summe andere Effekte als beim Mausmodell zur Folge haben könnte. Weitere Studien mit humanen „TLR8-knockout-Zelllinien“ wären denkbar, um diesen Effekt zu überprüfen. Dafür könnten TLR8-negative Zellen auf Genebene mit Hilfe der CRISPR/Cas9-Methode entwickelt werden [137]. Eine weitere Möglichkeit wäre die Analyse von humanen Zelllinien, die zuvor mit einem TLR8-Antagonisten [138] behandelt wurden. Mithilfe dieser Experimente könnte untersucht werden, ob AdiFectin den TLR7-Signalpfad tatsächlich spezifisch aktiviert. Außerdem ist zu beachten, dass AdiFectin als TLR7-Ligand neben DC auch weitere Immunzelltypen ansprechen kann. Durch die Modifikation mit DC-spezifischen Molekülen zum Beispiel mit Antikörpern für C-Typ-Lektin-Rezeptoren wie DEC-205 [139] oder Clec9A [140] könnte AdiFectin gezielt für die Adressierung von DC eingesetzt werden, um eine effiziente T-Zell-Antwort hervorzurufen. Studien haben zudem gezeigt, dass spezifische TLR-Liganden verschiedene Untergruppen von humanen DC adressieren. Das Ansprechen verschiedener DC-Subpopulationen und die Expression unterschiedlicher Zytokinprofile muss bei der Entwicklung von spezifischen TLR-Liganden zur Immunintervention für den Einsatz am Menschen berücksichtigt werden. TLR7 wird vermehrt von pDC exprimiert und eine selektive Aktivierung führt unter anderem zur vermehrten Produktion von Typ-I-IFN. Dieser Mechanismus wird zum Beispiel durch den TLR7-Agonisten Imiquimod (Handelsname Aldara®) vermittelt, welches sich bereits seit Jahrzehnten zur topischen Behandlung von aktinischen Keratosen und Condyloma

accuminata in der klinischen Anwendung befindet [39, 42]. Im Unterschied dazu induziert die gezielte Ligandierung von TLR8 eine Ausschüttung von TNF- α und IL-12 durch mDC [141], wie am Beispiel von VTX-2337, einem synthetischen TLR8-Liganden, zu beobachten war [142]. Dieser wurde *in vivo* zur Behandlung solider Tumoren sowie Lymphomen getestet. Neben AdiFectin befinden sich noch einige weitere TLR7-Liganden in der Erprobung. Vor allem der Wirkstoff Imiquimod (TLR7-Agonist) wird hinsichtlich der Behandlung weiterer Tumorerkrankungen umfangreich untersucht. Eine Phase-II-Studie zur intravesikalen Therapie des Harnblasenkarzinoms mittels Imiquimod wurde von den meisten Probanden gut vertragen und zeigte keinerlei Toxizität [143]. Außerdem konnte die Produktion diverser proinflammatorischer Zytokine gemessen werden, die auch unter der etablierten intravesikalen Bacillus-Calmette-Guérin (BCG)-Therapie eine entscheidende Rolle spielen. Die Kombination aus Imiquimod und Albumin-gebundenem Paclitaxel (nab-Paclitaxel) konnte in einer kleinen Gruppe von Patienten mit thorakal metastasiertem Mamma-Karzinom den Tumorprogress für kurze Zeit aufhalten [144]. Das niedermolekulare Imidazochinolin 852A, ein potenterer Imiquimod-Abkömmling, wurde bereits für die systemische Therapie solider Tumoren *in vivo* am Menschen getestet [145]. Die Studienergebnisse lassen eine Einstufung von 852A in der untersuchten Dosis als sicheres mögliches Tumorthapeutikum zu. Als letztes Beispiel für einen TLR7-Agonisten sei DSR-6434 genannt, welches ein neuartiges Arzneimittel in der Kombinationstherapie des kolorektalen Karzinoms darstellen könnte [43]. Im murinen Tumormodell konnte die Effektivität der Strahlentherapie verbessert und eine Metastasierung in die Lunge minimiert werden.

AdiFectin stellt eine Kombination aus TLR7-Agonisten und Nanopartikel dar, der sich aktuell noch in der Erprobungsphase befindet. Einige Nanopartikel sind bereits für den klinischen Einsatz zugelassen, die vor allem die Bioverfügbarkeit erhöhen und unerwünschte Nebenwirkungen herkömmlicher Medikamente minimieren sollen. Dazu zählen die bereits erwähnten nanobasierten Enkapsulierungen von Doxorubicin (Handelsname Myocet®) [113], Daunorubicin (Handelsname DaunoXome®) [114] und Patisiran (Handelsname Onpattro®) ein Repräsentant der vergleichsweise neuen Wirkstoffgruppe der RNA-Interferenz (RNAi)-Therapeutika [115, 116].

Nanobasierte Vakzine (Nanovakzine) werden mit der Idee entwickelt, in der Immuntherapie eine DC-vermittelte T-Zell Aktivierung zu induzieren. Nach Beurteilung der Toxizität und Aktivierungseigenschaften der BMDC durch AdiFectin wurde deshalb in weiteren Experimenten die Fähigkeit zur DC-vermittelten T-Zell-Proliferation und -Stimulation überprüft. Dies wurde in einer Versuchsreihe untersucht, in der mit OVA-mRNA konjugierte Nanopartikel transfizierte BMDC anschließend mit OT-I Zellen kokultiviert wurden. Überraschenderweise war AdiFectin nicht in der Lage, eine suffiziente Proliferation von CD8⁺ T-Zellen zu induzieren. Die Studienergebnisse zeigten sogar geringere Werte im Vergleich zu den OVA-Kontroll-

Ansätzen. Im Vergleich zu eben dargestellten Ergebnissen der T-Zell-Proliferation für AdiFectin stellte DOTAP in allen Verdünnungsreihen dieser Versuchsreihe den überlegenen Nanopartikel dar. Die Analyse der Zytokine aktivierter T-Zellen ergab ebenfalls mäßigere Ergebnisse als erhofft: zwar war AdiFectin in der Lage eine höhere TNF- α -Produktion zu induzieren als DOTAP, jedoch ergab die Analyse der IFN- γ -Konzentration keine signifikanten Werte für AdiFectin. Diese Ergebnisse sind umso überraschender, da bei *in vivo*-Studien an tumortragenden Mäusen die Verabreichung von AdiFectin eine massive IFN- γ -Ausschüttung induzierte sowie Tumorregression resultierte. DOTAP hingegen brachte eine massive Zytokinausschüttung hervor, die sogar die Messergebnisse in der Probe mit OVA und LPS überstieg. Ein Erklärungsansatz für die unterschiedlichen Studienergebnisse für AdiFectin zwischen dieser Dissertationsarbeit und den Untersuchungen der Herstellerfirma InvivoGen könnte sein, dass AdiFectin vermehrt mit CD4+ T-Zellen interagiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden jedoch nur die Stimulierungseigenschaften nanopartikelaktivierter DC auf CD8+ T-Zellen untersucht. Eine CD4+-vermittelte IFN- γ -Ausschüttung wäre also durchaus denkbar und sollte in weiteren Experimenten mit BMDC/CD4+ T-Zell-Kokulturen untersucht werden. Ebenso wäre möglich, dass AdiFectin keinerlei T-Zellantwort induziert und die verstärkte IFN- γ -Ausschüttung durch eine anderen Immunzellpopulation vermittelt wird. So ist beispielsweise eine spezialisierte Untergruppe von NK nach Interaktionen mit aktivierten DC ebenfalls zur IFN- γ -Produktion fähig [146].

Neben AdiFectin sind zahlreiche Nanopartikel mit und ohne TLR-Stimulierungseigenschaften Gegenstand aktueller Forschung. Beispielsweise zeigte die Oberflächen-Modifikation von Polyethylenglykol-Polymilchsäure Nanopartikeln mit TLR7/8a-Liganden im Vergleich zur alleinigen Verabreichung von TLR7/8a-Agonisten eine verstärkte Antwort von Typ-I IFN *in vivo* [147]. Zudem führte die Kombinationstherapie aus PD-L1-Antagonisten und besagtem modifizierten Nanopartikeln zum verringertem Tumorwachstum und verlängertem Überleben im murinen Modell des Adenokarzinoms des Colons. In einer präklinischen Studie erzielten Komplexe aus synthetisch hergestelltem (DOPE) Liposom mit mRNA eine Transfektionseffizienz von fast 60% in der höchsten verwendeten Dosierung [131]. Die wohl vielversprechendsten Ergebnisse im Forschungsbereich der Nanovakzine lieferte nach aktuellem Kenntnisstand vermutlich die bereits erwähnte LipoMERIT-Studie [7]. Die lipidbasierte mRNA-Impfung (FixVac) überträgt ein TAA gegen das maligne Melanom. *In vivo* zeigte FixVac bei den Studienpatienten eine gute Verträglichkeit unter der alleinigen Behandlung und erreichte als Kombinationstherapie mit Checkpoint (PD-1)-Inhibitoren ein dauerhaftes Therapie-Ansprechen in Form einer suffizienten T-Zellantwort.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass pDNA komplexiertes AdiFectin zur passiven Adressierung und Aktivierung von DC in der Lage ist. Dies konnte mithilfe der gemessenen Oberflächen-Aktivierungsmarker sowie der produzierten Zytokinkonzentrationen evaluiert werden, welche in den meisten Fällen höhere Ergebnisse als im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Nanopartikeln generierten. Ein sicherer Nachweis für die intrazelluläre Lage (Transfektion) der komplexierten Nukleinsäure wäre jedoch nur mithilfe einer CLSM möglich. Trotz vielversprechender Aktivierungseigenschaften von AdiFectin blieb wider Erwarten eine DC-vermittelte T-Zell-Proliferation/-Aktivierung durch eine Behandlung mit dem eben genannten Nanopartikel weitestgehend aus. Eine Ursache dafür könnten hemmende Signalwege durch die Interaktion mit PDL und PD-1 sein, die eine Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellen hemmen [96, 97]. Dieser Mechanismus könnte dadurch zustande kommen, dass AdiFectin möglicherweise zur Aufregulation hemmender Moleküle wie zum Beispiel PDL auf der DC-Oberfläche führt. Letztendlich könnte durch Kontakt des DC-ständigen PDL zum Beispiel mit dem T-Zell-exprimierten PD-1-Rezeptor eine T-Zell-Proliferation sowie -Stimulation inhibiert werden. Um einen kausalen Zusammenhang zum PDL/PD-1-Signalweg herzustellen, müssten weitere Experimente durchgeführt werden. Eine Versuchsreihe mit „endogenem“ Knockout der hemmenden Oberflächenmarker (zum Beispiel PD-L1 oder PD-L2 für BMDC) in Form einer siRNA-Gabe zu BMDC/T-Zell-Kokulturen stellt eine mögliche Alternative dar. Weitere unbekannte inhibierende Faktoren der DC könnten mittels Gensequenzierung analysiert werden. Dass die zusätzliche Gabe von Inhibitoren des PDL/PD-1-Sigalpfades die antitumorale Wirksamkeit neu entwickelter Nanovakzine verbessern kann, wurde in Studien bereits vermutet und beobachtet [7, 144, 147].

6 Zusammenfassung

Aufgrund ihrer Antigen-präsentierenden Eigenschaften und Fähigkeiten zur nachgeschalteten Stimulation von T-Zellen stehen dendritische Zellen (DC) aktuell im Fokus der Entwicklung moderner Immuntherapien. Nanovakzine ermöglichen eine zelltyp-spezifische Anlieferung von Antigenen in Kombination mit Adjuvantien. Lipidnanopartikel eignen sich aufgrund ihrer physikalisch-chemischen modifizierbaren Eigenschaften besonders zum Transport von Nukleinsäuren, die in Form von tumorassoziierten Antigenen (TAA)-kodierender mRNA oder Plasmid-DNA (pDNA) bei Tumorstoffen eingesetzt werden könnten. Erste *in vivo*-Studien zur Behandlung des malignen Melanoms mithilfe eines mRNA-basierten Nanovakzins scheinen erfolgsversprechend. Nukleinsäure-basierte Immuntherapien könnten in Zukunft als Kombinationstherapie zusammen mit konventionellen Chemotherapeutika eingesetzt werden.

In diesem Zusammenhang wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit der neu entwickelte nanobasierte TLR7-Agonist AdiFectin im Vergleich zu zwei bekannten Nanopartikeln beziehungsweise Transfektionsreagenzien (DOTAP und jetOPTIMUS) als potenzielles Nano-Trägersystem untersucht. Die *in vitro*-Versuche mit murinen Milzzellen sowie BMDC-Kulturen lieferten keine toxischen Eigenschaften für AdiFectin. jetOPTIMUS zeigte in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte. AdiFectin adressierte passiv insbesondere splenische B-Zellen sowie natürliche Killerzellen und Knochenmark-abgeleitete dendritische Zellen (bone marrow derived dendritic cell, BMDC). Im Falle von BMDC resultierte dies in einer suffizienten Aktivierung von DC, wie anhand der Expression von Aktivierungsmarkern in FACS-Analysen gezeigt wurde. AdiFectin wurde initial als Nano-Carrier mit TLR-agonistischer Funktion designt, deshalb kamen in dieser Arbeit keine weiteren Adjuvantien zum Einsatz. Vielmehr wurde neben der Analyse der Nanopartikel-Bindung und -Aufnahme auch das Aktivierungsniveau der untersuchten Immunzelltypen (B-Zellen, T-Zellen, natürliche Killerzellen, neutrophile Granulozyten, Makrophagen) insbesondere von DC getestet. CD86 gilt als Kardinals-Oberflächenmarker für eine effiziente T-Zell-Stimulation und wurde im Fall von AdiFectin gegenüber einer Behandlung mit DOTAP vermehrt exprimiert. Ebenso konnte eine deutliche Aktivierung von DC durch Messung der Zytokinproduktion mittels CBA-Analyse dargestellt werden. Alle gemessenen Zytokine (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-12, IL-23 p19/p40) zeigten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle in den höchsten Adifectin-Konzentrationen statistisch signifikant erhöhte Werte. Eine signifikant vermehrte Produktion der gemessenen DC-Zytokinkonzentrationen für IL-6 und IL-10 war nach einer Behandlung mit AdiFectin gegenüber DOTAP ebenfalls signifikant. Trotz guter Aktivierungseigenschaften gelang im Vergleich zu DOTAP keine suffiziente Proliferation von T-Zellen durch AdiFectin. Die T-Zell vermittelte Zytokinproduktion war im Vergleich zur Kontrollkondition ebenfalls weniger stark als erhofft. Die DOTAP-vermittelten Messwerte für eine T-Zell-assoziierte IFN- γ -Produktion

lieferten höhere Konzentrationen als nach der Behandlung mit AdiFectin. Diese Erkenntnisse widersprechen den Ergebnissen aus *in vivo*-Studien der Firma InvivoGen im Tumormausmodell. Im Rahmen der durchgeführten Experimente konnte eine massive IFN- γ -Produktion mit daraus resultierender Abnahme des Tumorwachstums nach einer Behandlung mit AdiFectin induziert werden. Dabei ist anzumerken, dass die Ergebnisse aus *in vitro*-Studien häufig nicht mit Erkenntnissen aus *in vivo*-Experimenten identisch sind.

In der Zusammenschau aller Ergebnisse erfüllt AdiFectin nicht in Gänze alle geforderten Eigenschaften (Zell-Adressierung, T-Zell-Stimulation, Aktivierung von Immunzellen), um als potentes Nanovakzin eingesetzt zu werden: zwar war AdiFectin in der Lage als Nano-Carrier zu fungieren sowie DC zu aktivieren, doch verfügt AdiFectin als TLR7-Ligand nur über Eigenschaften zur passiven Adressierung von DC. Eine Modifikation mit DC-spezifischen Adressierungsmolekülen könnte Abhilfe schaffen. Zudem konnte die Ursache der ungenügenden T-Zellantwort nicht identifiziert werden. Zur Klärung der Kausalität bedarf es weiterer Experimente, die bekannte (zum Beispiel PDL) sowie unbekannte inhibierende DC-ständige Oberflächen-Proteine miteinschließen, die eine DC-vermittelte T-Zell-Proliferation/Stimulation inhibieren können.

7 Literaturverzeichnis

1. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2021;20:101–24. doi:10.1038/s41573-020-0090-8.
2. Sahdev P, Ochyl LJ, Moon JJ. Biomaterials for nanoparticle vaccine delivery systems. *Pharm Res.* 2014;31:2563–82. doi:10.1007/s11095-014-1419-y.
3. Lamb YN. BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine: First Approval. *Drugs.* 2021;81:495–501. doi:10.1007/s40265-021-01480-7.
4. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, Diemert D, Spector SA, Rouphael N, Creech CB, McGettigan J, Khetan S, Segall N, Solis J, Brosz A, Fierro C, Schwartz H, Neuzil K, Corey L, Gilbert P, Janes H, Follmann D, Marovich M, Mascola J, Polakowski L, Ledgerwood J, Graham BS, Bennett H, Pajon R, Knightly C, Leav B, Deng W, Zhou H, Han S, Ivarsson M, Miller J, Zaks T. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine. *N Engl J Med.* 2021;384:403–16. doi:10.1056/NEJMoa2035389.
5. Morse MA, Gwin WR, Mitchell DA. Vaccine Therapies for Cancer: Then and Now. *Targ Oncol.* 2021;16:121–52. doi:10.1007/s11523-020-00788-w.
6. Hager S, Fittler FJ, Wagner E, Bros M. Nucleic Acid-Based Approaches for Tumor Therapy. *Cells.* 2020;9:2061. doi:10.3390/cells9092061.
7. Sahin U, Oehm P, Derhovanessian E, Jabulowsky RA, Vormehr M, Gold M, Maurus D, Schwarck-Kokarakis D, Kuhn AN, Omokoko T, Kranz LM, Diken M, Kreiter S, Haas H, Attig S, Rae R, Cuk K, Kemmer-Brück A, Breitkreuz A, Tolliver C, Caspar J, Quinkhardt J, Hebich L, Stein M, Hohberger A, Vogler I, Liebig I, Renken S, Sikorski J, Leierer M, Müller V, Mitzel-Rink H, Miederer M, Huber C, Grabbe S, Utikal J, Pinter A, Kaufmann R, Hassel JC, Loquai C, Türeci Ö. An RNA vaccine drives immunity in checkpoint-inhibitor-treated melanoma. *Nature.* 2020;585:107–12. doi:10.1038/s41586-020-2537-9.
8. InvivoGen. AdiFectin™ (CL347) [Internet]. 2016. [zitiert am 07/07/22]. URL: <https://www.invivogen.com/adifectin>.
9. Bixenmann L, Stickdorn J, Nuhn L. Amphiphilic poly(esteracetal)s as dual pH- and enzyme-responsive micellar immunodrug delivery systems. *Polym. Chem.* 2020;11:2441–56. doi:10.1039/C9PY01716J.
10. Parkin J, Cohen B. An overview of the immune system. *The Lancet.* 2001;357:1777–89. doi:10.1016/S0140-6736(00)04904-7.
11. Campbell KS, Hasegawa J. Natural killer cell biology: an update and future directions. *J Allergy Clin Immunol.* 2013;132:536–44. doi:10.1016/j.jaci.2013.07.006.
12. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res.* 2011;343:227–35. doi:10.1007/s00441-010-1034-0.
13. Pouw RB, Ricklin D. Tipping the balance: intricate roles of the complement system in disease and therapy. *Semin Immunopathol.* 2021;43:757–71. doi:10.1007/s00281-021-00892-7.
14. Kamradt T, Ferrari-Kühne K. Das adaptive Immunsystem. [Adaptive immunity]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2011;136:1678–83. doi:10.1055/s-0031-1281577.
15. Borghesi L, Milcarek C. From B Cell to Plasma Cell: Regulation of V(D)J Recombination and Antibody Secretion. *Immunol Res.* 2006;36:27–32. doi:10.1385/IR:36:1:27.
16. COOPER MD, PETERSON RD, GOOD RA. Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken. *Nature.* 1965;205:143–6. doi:10.1038/205143a0.

17. COOPER MD, Raymond DA, PETERSON RD, South MA, GOOD RA. The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *J Exp Med.* 1966;123:75–102. doi:10.1084/jem.123.1.75.
18. Tosi MF. Innate immune responses to infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2005;116:241-9; quiz 250. doi:10.1016/j.jaci.2005.05.036.
19. Constantino J, Gomes C, Falcão A, Neves BM, Cruz MT. Dendritic cell-based immunotherapy: a basic review and recent advances. *Immunol Res.* 2017;65:798–810. doi:10.1007/s12026-017-8931-1.
20. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med.* 1973;137:1142–62. doi:10.1084/jem.137.5.1142.
21. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:767–811. doi:10.1146/annurev.immunol.18.1.767.
22. Voll R, Lamprecht P, Warnatz K, Schulze-Koops H, Peter H, Pichler W. Adaptive Immunität [E-Book]. In: Blum HE, Müller-Wieland D, Hrsg. *Klinische Pathophysiologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2020. doi:10.1055/b000000121.
23. Marshall JS, Warrington R, Watson W, Kim HL. An introduction to immunology and immunopathology. *Allergy Asthma Clin Immunol.* 2018;14:49. doi:10.1186/s13223-018-0278-1.
24. Heidkamp GF, Sander J, Lehmann CHK, Heger L, Eissing N, Baranska A, Lühr JJ, Hoffmann A, Reimer KC, Lux A, Söder S, Hartmann A, Zenk J, Ulas T, McGovern N, Alexiou C, Spriewald B, Mackensen A, Schuler G, Schauf B, Forster A, Repp R, Fasching PA, Purbojo A, Cesnjevar R, Ullrich E, Ginhoux F, Schlitzer A, Nimmerjahn F, Schultze JL, Dudziak D. Human lymphoid organ dendritic cell identity is predominantly dictated by ontogeny, not tissue microenvironment. *Sci Immunol* 2016. doi:10.1126/sciimmunol.aai7677.
25. Collin M, Bigley V. Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology.* 2018;154:3–20. doi:10.1111/imm.12888.
26. Roh JS, Sohn DH. Damage-Associated Molecular Patterns in Inflammatory Diseases. *Immune Network.* 2018;18:e27. doi:10.4110/in.2018.18.e27.
27. Hemmi H, Akira S. TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chem Immunol Allergy.* 2005;86:120–35. doi:10.1159/000086657.
28. Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282:2085–8. doi:10.1126/science.282.5396.2085.
29. Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology.* 2007;56:183–91. doi:10.2332/allergolint.R-06-139.
30. Dinarello CA. Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol.* 2007;37 Suppl 1:S34-45. doi:10.1002/eji.200737772.
31. Gordon S. Pattern Recognition Receptors. *Cell.* 2002;111:927–30. doi:10.1016/S0092-8674(02)01201-1.
32. Pandey S, Kawai T, Akira S. Microbial sensing by Toll-like receptors and intracellular nucleic acid sensors. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;7:a016246. doi:10.1101/cshperspect.a016246.

33. Varshney D, Qiu SY, Graf TP, McHugh KJ. Employing Drug Delivery Strategies to Overcome Challenges Using TLR7/8 Agonists for Cancer Immunotherapy. *AAPS J*. 2021;23:90. doi:10.1208/s12248-021-00620-x.
34. Jurk M, Heil F, Vollmer J, Schetter C, Krieg AM, Wagner H, Lipford G, Bauer S. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol*. 2002;3:499. doi:10.1038/ni0602-499.
35. Hemmi H, Kaisho T, Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7/MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol*. 2002;3:196–200. doi:10.1038/ni758.
36. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, Saulnier V, Merck E, Tancredi S, Guillet C, Brière F, Vlach J, Lebecque S, Trinchieri G, Bates EEM. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 2005;174:2942–50. doi:10.4049/jimmunol.174.5.2942.
37. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194:863–9. doi:10.1084/jem.194.6.863.
38. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004;303:1529–31. doi:10.1126/science.1093616.
39. Drobits B, Holcman M, Amberg N, Swiecki M, Grundtner R, Hammer M, Colonna M, Sibilica M. Imiquimod clears tumors in mice independent of adaptive immunity by converting pDCs into tumor-killing effector cells. *J Clin Invest*. 2012;122:575–85. doi:10.1172/JCI61034.
40. Hellman P, Eriksson H. Early activation markers of human peripheral dendritic cells. *Hum Immunol*. 2007;68:324–33. doi:10.1016/j.humimm.2007.01.018.
41. Karikó K, Ni H, Capodici J, Lamphier M, Weissman D. mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J Biol Chem*. 2004;279:12542–50. doi:10.1074/jbc.M310175200.
42. European Medicines Agency. Aldara | European Medicines Agency [Internet]. 2021. [zitiert am 12/07/22]. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/aldara>.
43. Adlard AL, Dovedi SJ, Telfer BA, Koga-Yamakawa E, Pollard C, Honeychurch J, Illidge TM, Murata M, Robinson DT, Jewsbury PJ, Wilkinson RW, Stratford IJ. A novel systemically administered Toll-like receptor 7 agonist potentiates the effect of ionizing radiation in murine solid tumor models. *International Journal of Cancer*. 2014;135:820–9. doi:10.1002/ijc.28711.
44. InvivoGen. TLR7/8 Ligands [Internet]. 2016. [zitiert am 06/07/22]. URL: <https://www.invivogen.com/tlr78-ligands>.
45. Karin M, Liu Z, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 1997;9:240–6. doi:10.1016/S0955-0674(97)80068-3.
46. Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Unresponsiveness of MyD88-Deficient Mice to Endotoxin. *Immunity*. 1999;11:115–22. doi:10.1016/S1074-7613(00)80086-2.
47. Ullah MO, Sweet MJ, Mansell A, Kellie S, Kobe B. TRIF-dependent TLR signaling, its functions in host defense and inflammation, and its potential as a therapeutic target. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;100:27–45. doi:10.1189/jlb.2RI115-531R.
48. Stockwin LH, McGonagle D, Martin IG, Blair GE. Dendritic cells: immunological sentinels with a central role in health and disease. *Immunology and cell biology*. 2000;78:91–102. doi:10.1046/j.1440-1711.2000.00888.x.

49. Segura E, Amigorena S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends in Immunology*. 2013;34:440–5. doi:10.1016/j.it.2013.06.001.
50. Feng M, Zhou S, Yu Y, Su Q, Li X, Lin W. Regulation of the Migration of Distinct Dendritic Cell Subsets. *Front. Cell Dev. Biol.* 2021;9:635221. doi:10.3389/fcell.2021.635221.
51. Eisenbarth SC. Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function. *Nat Rev Immunol.* 2019;19:89–103. doi:10.1038/s41577-018-0088-1.
52. Shortman K, Liu Y-J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:151–61. doi:10.1038/nri746.
53. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS.* 2003;111:725–40. doi:10.1034/j.1600-0463.2003.11107805.x.
54. Langerhans P. Ueber die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv f. pathol. Anat.* 1868;44:325–37. doi:10.1007/BF01959006.
55. Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological reviews.* 2010;234:120–41. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x.
56. Guilliams M, Ginhoux F, Jakubzick C, Naik SH, Onai N, Schraml BU, Segura E, Tussiwand R, Yona S. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat Rev Immunol.* 2014;14:571–8. doi:10.1038/nri3712.
57. O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM. Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology.* 1994;82:487–93.
58. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563–604. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074950.
59. Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol.* 2000;1:305–10. doi:10.1038/79747.
60. Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997;185:1101–11. doi:10.1084/jem.185.6.1101.
61. Jego G, Palucka A, Blanck J-P, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Plasma Cell Differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity.* 2003;19:225–34. doi:10.1016/S1074-7613(03)00208-5.
62. Granucci F, Ferrero E, Foti M, Aggujaro D, Vettoretto K, Ricciardi-Castagnoli P. Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes and Infection.* 1999;1:1079–84. doi:10.1016/S1286-4579(99)00209-9.
63. Vanbervliet B, Homey B, Durand I, Massacrier C, Aït-Yahia S, Bouteiller Od, Vicari A, Caux C. Sequential involvement of CCR2 and CCR6 ligands for immature dendritic cell recruitment: possible role at inflamed epithelial surfaces. *Eur J Immunol.* 2002;32:231–42. doi:10.1002/1521-4141(200201)32:1<231::AID-IMMU231>3.0.CO;2-8.
64. Stumbles PA, Strickland DH, Pimm CL, Proksch SF, Marsh AM, McWilliam AS, Bosco A, Tobagus I, Thomas JA, Napoli S, Proudfoot AE, Wells TN, Holt PG. Regulation of dendritic cell recruitment into resting and inflamed airway epithelium: use of alternative chemokine receptors as a function of inducing stimulus. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 2001;167:228–34. doi:10.4049/jimmunol.167.1.228.

65. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 1998;28:2760–9. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199809)28:09<2760::AID-IMMU2760>3.0.CO;2-N.
66. McLellan AD, Sorg RV, Williams LA, Hart DN. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40: CD40 ligand-dependent pathway. *Eur J Immunol.* 1996;26:1204–10. doi:10.1002/eji.1830260603.
67. Baravalle G, Park H, McSweeney M, Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Ishido S, Shin J-S. Ubiquitination of CD86 is a key mechanism in regulating antigen presentation by dendritic cells. *The Journal of Immunology.* 2011;187:2966–73. doi:10.4049/jimmunol.1101643.
68. Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, Inaba K, Steinman RM. 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.* 1989;169:1169–78. doi:10.1084/jem.169.3.1169.
69. Puré E, Inaba K, Crowley MT, Tardelli L, Witmer-Pack MD, Ruberti G, Fathman G, Steinman RM. Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J Exp Med.* 1990;172:1459–69. doi:10.1084/jem.172.5.1459.
70. Kabashima K, Shiraishi N, Sugita K, Mori T, Onoue A, Kobayashi M, Sakabe J, Yoshiki R, Tamamura H, Fujii N, Inaba K, Tokura Y. CXCL12-CXCR4 engagement is required for migration of cutaneous dendritic cells. *The American Journal of Pathology.* 2007;171:1249–57. doi:10.2353/ajpath.2007.070225.
71. Sallusto F, Palermo B, Lenig D, Miettinen M, Matikainen S, Julkunen I, Forster R, Burgstahler R, Lipp M, Lanzavecchia A. Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol.* 1999;29:1617–25. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199905)29:05<1617::AID-IMMU1617>3.0.CO;2-3.
72. Smedt T de, Pajak B, Muraille E, Lespagnard L, Heinen E, Baetselier P de, Urbain J, Leo O, Moser M. Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *J Exp Med.* 1996;184:1413–24. doi:10.1084/jem.184.4.1413.
73. Cumberbatch M, Kimber I. Dermal tumour necrosis factor-alpha induces dendritic cell migration to draining lymph nodes, and possibly provides one stimulus for Langerhans' cell migration. *Immunology.* 1992;75:257–63.
74. Stoitzner P, Zanella M, Ortner U, Lukas M, Tagwerker A, Janke K, Lutz MB, Schuler G, Echtenacher B, Ryffel B, Koch F, Romani N. Migration of Langerhans cells and dermal dendritic cells in skin organ cultures: augmentation by TNF- α and IL-1 β . *J Leukoc Biol.* 1999;66:462–70. doi:10.1002/jlb.66.3.462.
75. Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A, Sallusto F. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 2000;1:311–6. doi:10.1038/79758.
76. Marsland BJ, Bättig P, Bauer M, Ruedl C, Lässig U, Beerli RR, Dietmeier K, Ivanova L, Pfister T, Vogt L, Nakano H, Nembrini C, Saudan P, Kopf M, Bachmann MF. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity.* 2005;22:493–505. doi:10.1016/j.immuni.2005.02.010.
77. Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sánchez S. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:293–316. doi:10.1146/annurev.immunol.26.021607.090254.
78. Yu Y, Hagihara M, Ando K, Gansuud B, Matsuzawa H, Tsuchiya T, Ueda Y, Inoue H, Hotta T, Kato S. Enhancement of human cord blood CD34+ cell-derived NK cell

- cytotoxicity by dendritic cells. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). 2001;166:1590–600. doi:10.4049/jimmunol.166.3.1590.
79. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:595–602. doi:10.1038/nri1413.
80. Lowin B, Hahne M, Mattmann C, Tschopp J. Cytolytic T-cell cytotoxicity is mediated through perforin and Fas lytic pathways. *Nature*. 1994;370:650–2. doi:10.1038/370650a0.
81. Zhang N, Bevan MJ. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*. 2011;35:161–8. doi:10.1016/j.immuni.2011.07.010.
82. Xing Y, Hogquist KA. T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4:a006957. doi:10.1101/cshperspect.a006957.
83. Liblau RS, Tisch R, Shokat K, Yang X, Dumont N, Goodnow CC, McDevitt HO. Intravenous injection of soluble antigen induces thymic and peripheral T-cells apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1996;93:3031–6. doi:10.1073/pnas.93.7.3031.
84. Chen C, Nabavi N. In vitro induction of T cell anergy by blocking B7 and early T cell costimulatory molecule ETC-1/B7-2. *Immunity*. 1994;1:147–54. doi:10.1016/1074-7613(94)90108-2.
85. Gimmi CD, Freeman GJ, Gribben JG, Gray G, Nadler LM. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1993;90:6586–90. doi:10.1073/pnas.90.14.6586.
86. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol*. 2003;4:330–6. doi:10.1038/ni904.
87. Horwitz DA, Zheng SG, Gray JD. Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)CD4(+) CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends in Immunology*. 2008;29:429–35. doi:10.1016/j.it.2008.06.005.
88. Sato T, Terai M, Tamura Y, Alexeev V, Mastrangelo MJ, Selvan SR. Interleukin 10 in the tumor microenvironment: a target for anticancer immunotherapy. *Immunol Res*. 2011;51:170–82. doi:10.1007/s12026-011-8262-6.
89. Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, Nomura T, Sakaguchi S. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science*. 2008;322:271–5. doi:10.1126/science.1160062.
90. Alarcón B, Swamy M, van Santen HM, Schamel WWA. T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity. *EMBO reports*. 2006;7:490–5. doi:10.1038/sj.embor.7400682.
91. Chen L, Flies DB. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat Rev Immunol*. 2013;13:227–42. doi:10.1038/nri3405.
92. Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation. *J Exp Med*. 1995;182:459–65. doi:10.1084/jem.182.2.459.
93. Tivol EA, Borriello F, Schweitzer A, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity*. 1995;3:541–7. doi:10.1016/1074-7613(95)90125-6.
94. Ise W, Kohyama M, Nutsch KM, Lee HM, Suri A, Unanue ER, Murphy TL, Murphy KM. CTLA-4 suppresses the pathogenicity of self antigen-specific T cells by cell-intrinsic and cell-extrinsic mechanisms. *Nat Immunol*. 2010;11:129–35. doi:10.1038/ni.1835.

95. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *The EMBO Journal*. 1992;11:3887–95. doi:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05481.x.
96. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, Bowman MR, Carreno BM, Collins M, Wood CR, Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192:1027–34. doi:10.1084/jem.192.7.1027.
97. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Bousiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH, Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001;2:261–8. doi:10.1038/85330.
98. Denton AE, Russ BE, Doherty PC, Rao S, Turner SJ. Differentiation-dependent functional and epigenetic landscapes for cytokine genes in virus-specific CD8+ T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108:15306–11. doi:10.1073/pnas.1112520108.
99. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1986;136:2348–57.
100. Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, Koski G, Disis ML, Czerniecki BJ, Kodumudi K. Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. *Front. Immunol*. 2021;12:669474. doi:10.3389/fimmu.2021.669474.
101. Giermasz AS, Urban JA, Nakamura Y, Watchmaker P, Cumberland RL, Gooding W, Kalinski P. Type-1 polarized dendritic cells primed for high IL-12 production show enhanced activity as cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother*. 2009;58:1329–36. doi:10.1007/s00262-008-0648-5.
102. Huang S, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, Vilcek J, Zinkernagel RM, Aguet M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*. 1993;259:1742–5. doi:10.1126/science.8456301.
103. Noben-Trauth N, Hu-Li J, Paul WE. IL-4 secreted from individual naive CD4+ T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation. *Eur J Immunol*. 2002;32:1428. doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1428::AID-IMMU1428>3.0.CO;2-0.
104. Poulsen LK, Hummelshoj L. Triggers of IgE class switching and allergy development. *Annals of Medicine*. 2007;39:440–56. doi:10.1080/07853890701449354.
105. Gajewski TF, Fitch FW. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. I. IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clones. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1988;140:4245–52.
106. Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. 1991;146:3444–51.
107. Schinocca C, Rizzo C, Fasano S, Grasso G, La Barbera L, Ciccia F, Guggino G. Role of the IL-23/IL-17 Pathway in Rheumatic Diseases: An Overview. *Front. Immunol*. 2021;12:637829. doi:10.3389/fimmu.2021.637829.
108. Liang SC, Tan X-Y, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med*. 2006;203:2271–9. doi:10.1084/jem.20061308.

109. Burkett PR, Meyer zu Horste G, Kuchroo VK. Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity. *J Clin Invest*. 2015;125:2211–9. doi:10.1172/JCI78085.
110. Dhiman N, Awasthi R, Sharma B, Kharkwal H, Kulkarni GT. Lipid Nanoparticles as Carriers for Bioactive Delivery. *Front Chem*. 2021;9:580118. doi:10.3389/fchem.2021.580118.
111. Jong WH de, Borm PJA. Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. *Int J Nanomedicine*. 2008;3:133–49. doi:10.2147/ijn.s596.
112. Bamberger D, Hobernik D, Konhäuser M, Bros M, Wich PR. Surface Modification of Polysaccharide-Based Nanoparticles with PEG and Dextran and the Effects on Immune Cell Binding and Stimulatory Characteristics. *Molecular Pharmaceutics*. 2017;14:4403–16. doi:10.1021/acs.molpharmaceut.7b00507.
113. Harris L, Batist G, Belt R, Rovira D, Navari R, Azarnia N, Welles L, Winer E. Liposome-encapsulated doxorubicin compared with conventional doxorubicin in a randomized multicenter trial as first-line therapy of metastatic breast carcinoma. *Cancer*. 2002;94:25–36. doi:10.1002/cncr.10201.
114. Rosenthal E, Poizot-Martin I, Saint-Marc T, Spano J-P, Cacoub P, Group, the DNX Study. Phase IV Study of Liposomal Daunorubicin (DaunoXome) in AIDS-Related Kaposi Sarcoma. *American Journal of Clinical Oncology*. 2002;25:57. doi:aspx.
115. Adams D, Gonzalez-Duarte A, O’Riordan WD, Yang C-C, Ueda M, Kristen AV, Tournev I, Schmidt HH, Coelho T, Berk JL, Lin K-P, Vita G, Attarian S, Planté-Bordeneuve V, Mezei MM, Campistol JM, Buades J, Brannagan TH, Kim BJ, Oh J, Parman Y, Sekijima Y, Hawkins PN, Solomon SD, Polydefkis M, Dyck PJ, Gandhi PJ, Goyal S, Chen J, Strahs AL, Nochur SV, Sweetser MT, Garg PP, Vaishnav AK, Gollob JA, Suhr OB. Patisiran, an RNAi Therapeutic, for Hereditary Transthyretin Amyloidosis. *N Engl J Med*. 2018;379:11–21. doi:10.1056/NEJMoa1716153.
116. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, Paul-Ehrlich-Institut. Bulletin zur Arzneimittelsicherheit. Informationen aus BfArM und PEI [Internet]. 2020. [zitiert am 24/05/22]. URL: https://www.bfarm.de/SharedDocs/Downloads/DE/Arzneimittel/Pharmakovigilanz/Bulletin/2020/4-2020.pdf?__blob=publicationFile.
117. Vasilakos JP, Tomai MA. The use of Toll-like receptor 7/8 agonists as vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines*. 2013;12:809–19. doi:10.1586/14760584.2013.811208.
118. Das A, Ali N. Nanovaccine: an emerging strategy. *Expert review of vaccines*. 2021;20:1273–90. doi:10.1080/14760584.2021.1984890.
119. Robert Koch-Institut. Epidemiologisches Bulletin 12/99 [Internet]. 1999. [zitiert am 23/05/22]. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/1999/Ausgabenlinks/12_99.pdf?__blob=publicationFile.
120. Tam P, Monck M, Lee D, Ludkovski O, Leng EC, Clow K, Stark H, Scherrer P, Graham RW, Cullis PR. Stabilized plasmid-lipid particles for systemic gene therapy. *Gene Ther*. 2000;7:1867–74. doi:10.1038/sj.gt.3301308.
121. Wiemann B, Starnes CO. Coley’s toxins, tumor necrosis factor and cancer research: A historical perspective. *Pharmacology & Therapeutics*. 1994;64:529–64. doi:10.1016/0163-7258(94)90023-X.
122. Dörrie J, Schaft N, Schuler G, Schuler-Thurner B. Therapeutic Cancer Vaccination with Ex Vivo RNA-Transfected Dendritic Cells-An Update. *Pharmaceutics*. 2020;12:92. doi:10.3390/pharmaceutics12020092.
123. Hosseini ES, Nikkhah M, Hosseinkhani S. Cholesterol-rich lipid-mediated nanoparticles boost of transfection efficiency, utilized for gene editing by CRISPR-Cas9. *Int J Nanomedicine*. 2019;14:4353–66. doi:10.2147/IJN.S199104.

124. Joshi MD, Unger WJ, Storm G, van Kooyk Y, Mastrobattista E. Targeting tumor antigens to dendritic cells using particulate carriers. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2012;161:25–37. doi:10.1016/j.jconrel.2012.05.010.
125. Li Q, Guo Z. Recent Advances in Toll Like Receptor-Targeting Glycoconjugate Vaccines. *Molecules*. 2018;23:1583. doi:10.3390/molecules23071583.
126. Paston SJ, Brentville VA, Symonds P, Durrant LG. Cancer Vaccines, Adjuvants, and Delivery Systems. *Front. Immunol*. 2021;12:627932. doi:10.3389/fimmu.2021.627932.
127. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992;176:1693–702. doi:10.1084/jem.176.6.1693.
128. Kelly JM, Sterry SJ, Cose S, Turner SJ, Fecondo J, Rodda S, Fink PJ, Carbone FR. Identification of conserved T cell receptor CDR3 residues contacting known exposed peptide side chains from a major histocompatibility complex class I-bound determinant. *Eur J Immunol*. 1993;23:3318–26. doi:10.1002/eji.1830231239.
129. Hirosue S, Kourtis IC, van der Vlies AJ, Hubbell JA, Swartz MA. Antigen delivery to dendritic cells by poly(propylene sulfide) nanoparticles with disulfide conjugated peptides: Cross-presentation and T cell activation. *Vaccine*. 2010;28:7897–906. doi:10.1016/j.vaccine.2010.09.077.
130. Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med*. 1974;139:380–97. doi:10.1084/jem.139.2.380.
131. Michel T, Luft D, Abraham M-K, Reinhardt S, Salinas Medina ML, Kurz J, Schaller M, Avci-Adali M, Schlensak C, Peter K, Wendel HP, Wang X, Krajewski S. Cationic Nanoliposomes Meet mRNA: Efficient Delivery of Modified mRNA Using Hemocompatible and Stable Vectors for Therapeutic Applications. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. 2017;8:459–68. doi:10.1016/j.omtn.2017.07.013.
132. Borriello F, Sethna MP, Boyd SD, Schweitzer A, Tivol EA, Jacoby D, Strom TB, Simpson EM, Freeman GJ, Sharpe AH. B7-1 and B7-2 Have Overlapping, Critical Roles in Immunoglobulin Class Switching and Germinal Center Formation. *Immunity*. 1997;6:303–13. doi:10.1016/S1074-7613(00)80333-7.
133. Demangel C, Bertolino P, Britton WJ. Autocrine IL-10 impairs dendritic cell (DC)-derived immune responses to mycobacterial infection by suppressing DC trafficking to draining lymph nodes and local IL-12 production. *Eur J Immunol*. 2002;32:994–1002. doi:10.1002/1521-4141(200204)32:4<994::AID-IMMU994>3.0.CO;2-6.
134. Cruz LJ, Rosalia RA, Kleinovink JW, Rueda F, Löwik CWGM, Ossendorp F. Targeting nanoparticles to CD40, DEC-205 or CD11c molecules on dendritic cells for efficient CD8(+) T cell response: a comparative study. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. 2014;192:209–18. doi:10.1016/j.jconrel.2014.07.040.
135. Rescigno M, Urbano M, Rimoldi M, Valzasina B, Rotta G, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Toll-like receptor 4 is not required for the full maturation of dendritic cells or for the degradation of Gram-negative bacteria. *Eur J Immunol*. 2002;32:2800–6. doi:10.1002/1521-4141(2002010)32:10<2800::AID-IMMU2800>3.0.CO;2-5.
136. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004;303:1526–9. doi:10.1126/science.1093620.
137. Vierbuchen T, Bang C, Rosigkeit H, Schmitz RA, Heine H. The Human-Associated Archaeon *Methanosphaera stadtmanae* Is Recognized through Its RNA and Induces

- TLR8-Dependent NLRP3 Inflammasome Activation. *Front. Immunol.* 2017;8:1535. doi:10.3389/fimmu.2017.01535.
138. Padilla-Salinas R, Anderson R, Sakaniwa K, Zhang S, Nordeen P, Lu C, Shimizu T, Yin H. Discovery of Novel Small Molecule Dual Inhibitors Targeting Toll-Like Receptors 7 and 8. *Journal of Medicinal Chemistry.* 2019;62:10221–44. doi:10.1021/acs.jmedchem.9b01201.
139. Bühler J, Gietzen S, Reuter A, Kappel C, Fischer K, Decker S, Schäffel D, Koynov K, Bros M, Tubbe I, Grabbe S, Schmidt M. Selective uptake of cylindrical poly(2-oxazoline) brush-antiDEC205 antibody-OVA antigen conjugates into DEC-positive dendritic cells and subsequent T-cell activation. *Chemistry – A European Journal.* 2014;20:12405–10. doi:10.1002/chem.201403942.
140. Huang J, Zhou J, Ghinnagow R, Seki T, Iketani S, Soulard D, Paczkowski P, Tsuji Y, MacKay S, Cruz LJ, Trottein F, Tsuji M. Targeted Co-delivery of Tumor Antigen and α -Galactosylceramide to CD141+ Dendritic Cells Induces a Potent Tumor Antigen-Specific Human CD8+ T Cell Response in Human Immune System Mice. *Front. Immunol.* 2020;11:2043. doi:10.3389/fimmu.2020.02043.
141. Gorden KB, Gorski KS, Gibson SJ, Kedl RM, Kieper WC, Qiu X, Tomai MA, Alkan SS, Vasilakos JP. Synthetic TLR agonists reveal functional differences between human TLR7 and TLR8. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950).* 2005;174:1259–68. doi:10.4049/jimmunol.174.3.1259.
142. Northfelt DW, Ramanathan RK, Cohen PA, Hoff DD von, Weiss GJ, Dietsch GN, Manjarrez KL, Randall TD, Hershberg RM. A phase I dose-finding study of the novel Toll-like receptor 8 agonist VTX-2337 in adult subjects with advanced solid tumors or lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20:3683–91. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-0392.
143. Donin NM, Chamie K, Lenis AT, Pantuck AJ, Reddy M, Kivlin D, Holldack J, Pozzi R, Hakim G, Karsh LI, Lamm DL, Belkoff LH, Beldegrun AS, Holden S, Shore N. A phase 2 study of TMX-101, intravesical imiquimod, for the treatment of carcinoma in situ bladder cancer. *Urol Oncol.* 2017;35:39.e1-39.e7. doi:10.1016/j.urolonc.2016.09.006.
144. Salazar LG, Lu H, Reichow JL, Childs JS, Coveler AL, Higgins DM, Waisman J, Allison KH, Dang Y, Disis ML. Topical Imiquimod Plus Nab-paclitaxel for Breast Cancer Cutaneous Metastases: A Phase 2 Clinical Trial. *JAMA Oncol.* 2017;3:969–73. doi:10.1001/jamaoncol.2016.6007.
145. Dudek AZ, Yunis C, Harrison LI, Kumar S, Hawkinson R, Cooley S, Vasilakos JP, Gorski KS, Miller JS. First in human phase I trial of 852A, a novel systemic toll-like receptor 7 agonist, to activate innate immune responses in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13:7119–25. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1443.
146. Vitale M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Romagnani C, Thiel A, Moretta L, Moretta A. The small subset of CD56brightCD16- natural killer cells is selectively responsible for both cell proliferation and interferon-gamma production upon interaction with dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2004;34:1715–22. doi:10.1002/eji.200425100.
147. Smith AAA, Gale EC, Roth GA, Maikawa CL, Correa S, Yu AC, Appel EA. Nanoparticles Presenting Potent TLR7/8 Agonists Enhance Anti-PD-L1 Immunotherapy in Cancer Treatment. *Biomacromolecules.* 2020;21:3704–12. doi:10.1021/acs.biomac.0c00812.

8 Anhang

Gating-Strategien für die FACS-Analyse

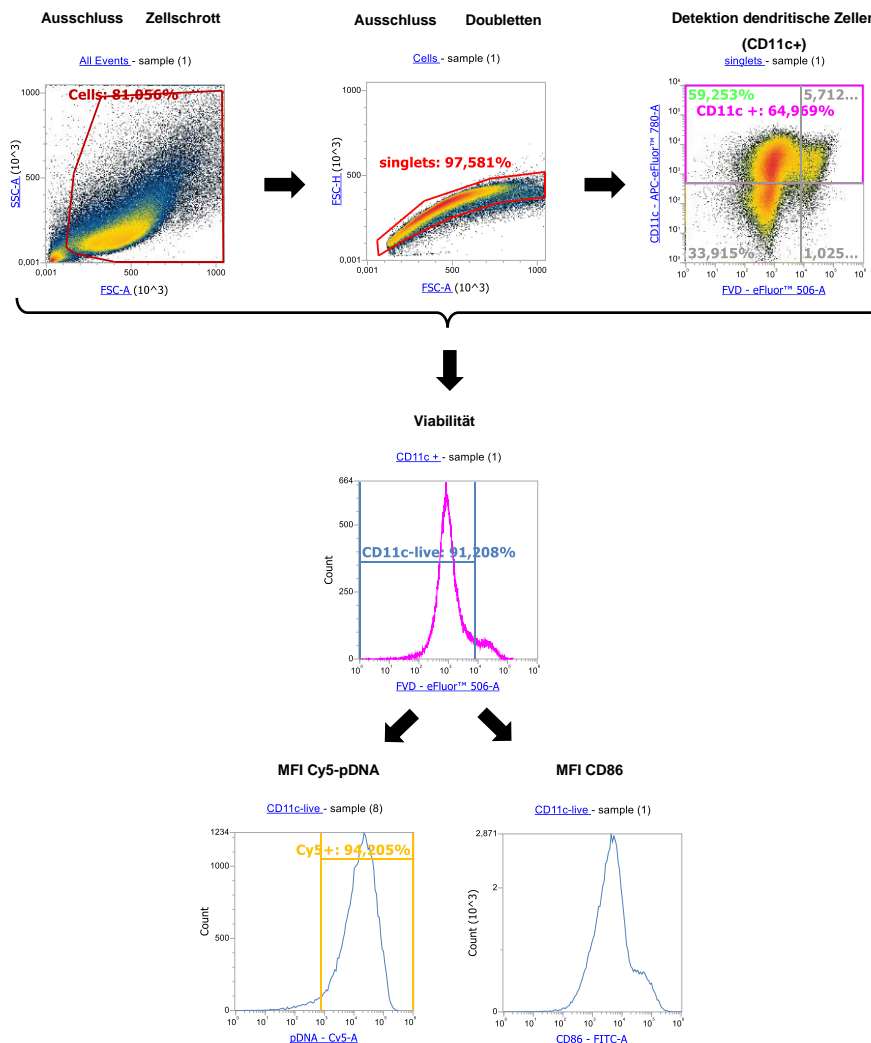


Abbildung A1: Gating-Strategie für die BMDC-Kulturen.

Beispielhaft dargestellt sind die jeweiligen Plots der unbehandelten Probe (sample 1). Als erster Schritt erfolgt der Ausschluss von Zellschrott, indem ein Gate um alle gemessenen Zellen gelegt wird (cells). Danach werden die Einzelzellen in einem neuen Plot gegatet (singlets). Dies stellt den Ausschluss von Doubletten dar. Anschließend werden in einem neuen density Plot die dendritischen Zellen (CD11c+) dargestellt, welche zuvor durch das Fluorochrom APC-eFluor780 angefärbt wurden. Über diese Population wird ein Gate (CD11c+) gelegt und diese in einem Histogramm dargestellt. Mithilfe des Farbstoffes FVD-eFluor506 können dann lebende von toten Zellen mithilfe eines Histogramm Gates (CD11c-live) abgegrenzt werden. Diese Messwerte werden in % angegeben. Auf Grundlage dieses Grafen können die MFI-Werte für die Cy5-pDNA und die Aktivierungsmarker dargestellt werden. Als Beispiel ist hier der Aktivierungsmarker CD86 aufgeführt. Das Gating für die Cy5-pDNA ist beispielhaft an der mit 1000 ng AdiFectin behandelten Probe (sample 8) gezeigt. Die Messwerte können im Reiter „results“ der Attune® NxT Flow Cytometer Software eingesehen werden.

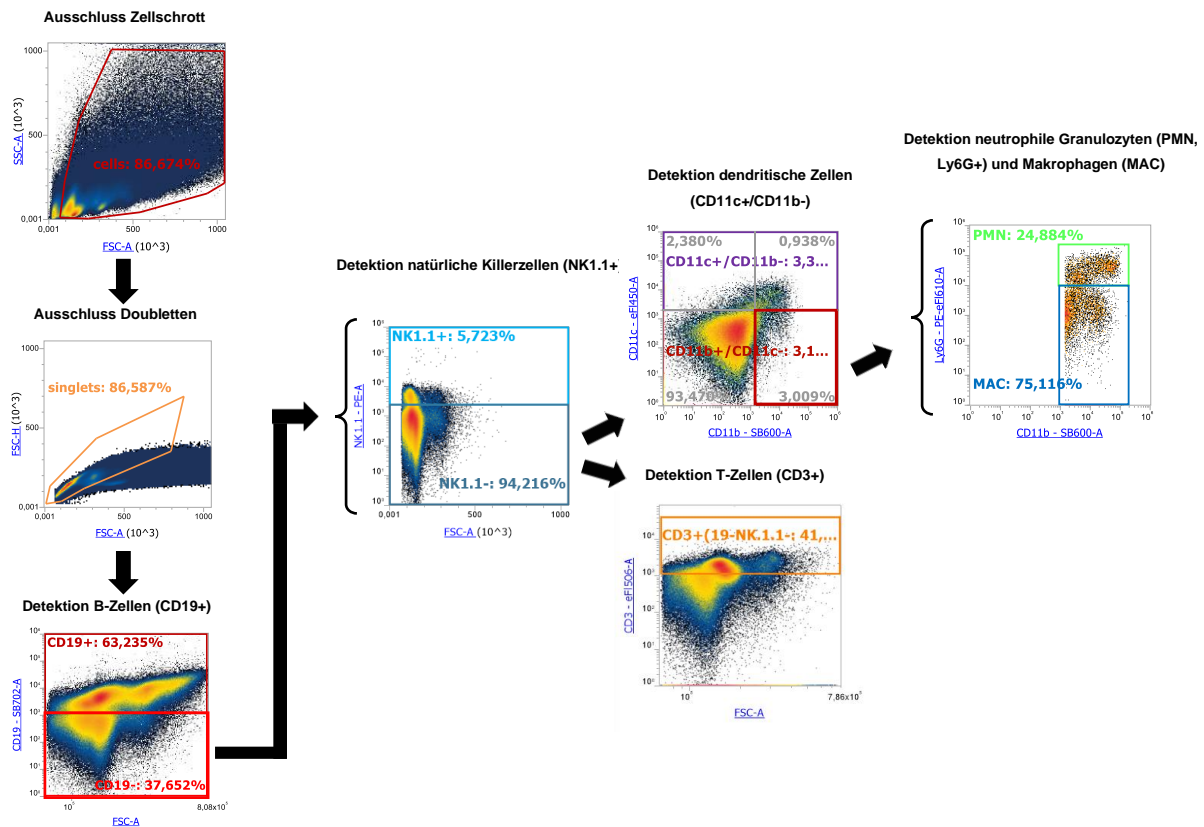


Abbildung A2: Gating-Strategie für die Detektion von Immunzellen aus Milzzellen.

Beispielhaft dargestellt sind die jeweiligen Plots der unbehandelten Probe. Als erster Schritt erfolgt der Ausschluss von Zellschrott, indem ein Gate um alle gemessenen Zellen gelegt wird (cells). Danach werden die Einzelzellen in einem neuen Plot gegatet (singlets). Dies stellt den Ausschluss von Doubletten dar. Anschließend folgt die Detektion von B-Zellen. Dies geschieht durch Gating aller CD19+ - Zellen, welche mit dem Farbstoff SB702 angefärbt wurden. Alle CD19 – -Zellen werden in einem neuen Plot auf NK1.1+ - und NK1.1 – -Zellen aufgeteilt. Die NK.1-1+ -Zellen repräsentieren die natürlichen Killerzellen, welche mithilfe des Farbstoffes PE detektiert werden können. Die NK1.1 – - Zellen werden in zwei verschiedenen Plots dargestellt. In einem Plot folgt die Darstellung T-Zellen (CD3+) mithilfe des Fluorochorms eF1506. Im anderen Plot sind dendritische Zellen (CD11c+/CD11b –) aufgeführt. Sie lassen sich durch Anfärbung mit eF1450 darstellen. Anschließend erfolgt die Unterteilung der CD11c– /CD11b – -Zellen in einem neuen Plot in neutrophile Granulozyten (Ly6G+), welche sich mit eF1610 anfärben lassen und den Ly6G – Makrophagen.

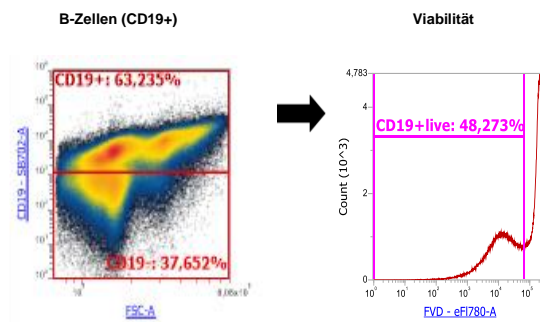


Abbildung A3: Gating-Strategie für die Viabilität der Immunzellen aus Milzzellen

Abgebildet ist die grafische Darstellung der unbehandelten Probe am Beispiel der B-Zellen. Nachdem die Detektion der verschiedenen Immunzelltypen durchgeführt wurde (s. Abb. A2), erfolgt die Darstellung der Viabilität der Zellen. Hierfür wird die FVD-eFl780 gefärbte Zellpopulation in einem Histogramm dargestellt und mithilfe eines Histogramm Gates von den lebenden Zellen abgegrenzt. Die Viabilität wird dann in Prozent angegeben. Das Gating wird für jeden Immunzelltyp einzeln durchgeführt. Die Messwerte können im Reiter „results“ der Attune® NxT Flow Cytometer Software eingesehen werden.

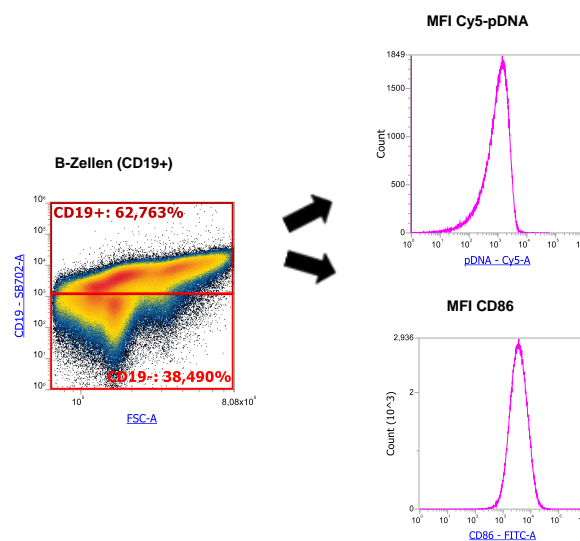


Abbildung A4: Gating-Strategie für MFI-Werte der Cy5-pDNA und Aktivierungsmarker.

Abgebildet ist die grafische Darstellung der mit Adifectin behandelten Probe am Beispiel der B-Zellen. Nachdem die Detektion der verschiedenen Immunzelltypen durchgeführt wurde (s. Abb. A2), erfolgt die Darstellung der MFI-Werte für die Cy5-pDNA und der Aktivierungsmarker. Als Beispiel für die Aktivierungsmarker ist hier CD86 aufgeführt. Mithilfe der einzelnen Farbstoffe in der FACS-Färbung können die, für jeden Marker spezifischen, MFI-Werte für jeden Immunzelltyp in einem Histogramm dargestellt werden. Die Messwerte können im Reiter „results“ der Attune® NxT Flow Cytometer Software eingesehen werden.

Overlays aus der FACS-Analyse der BMDC-Kulturen

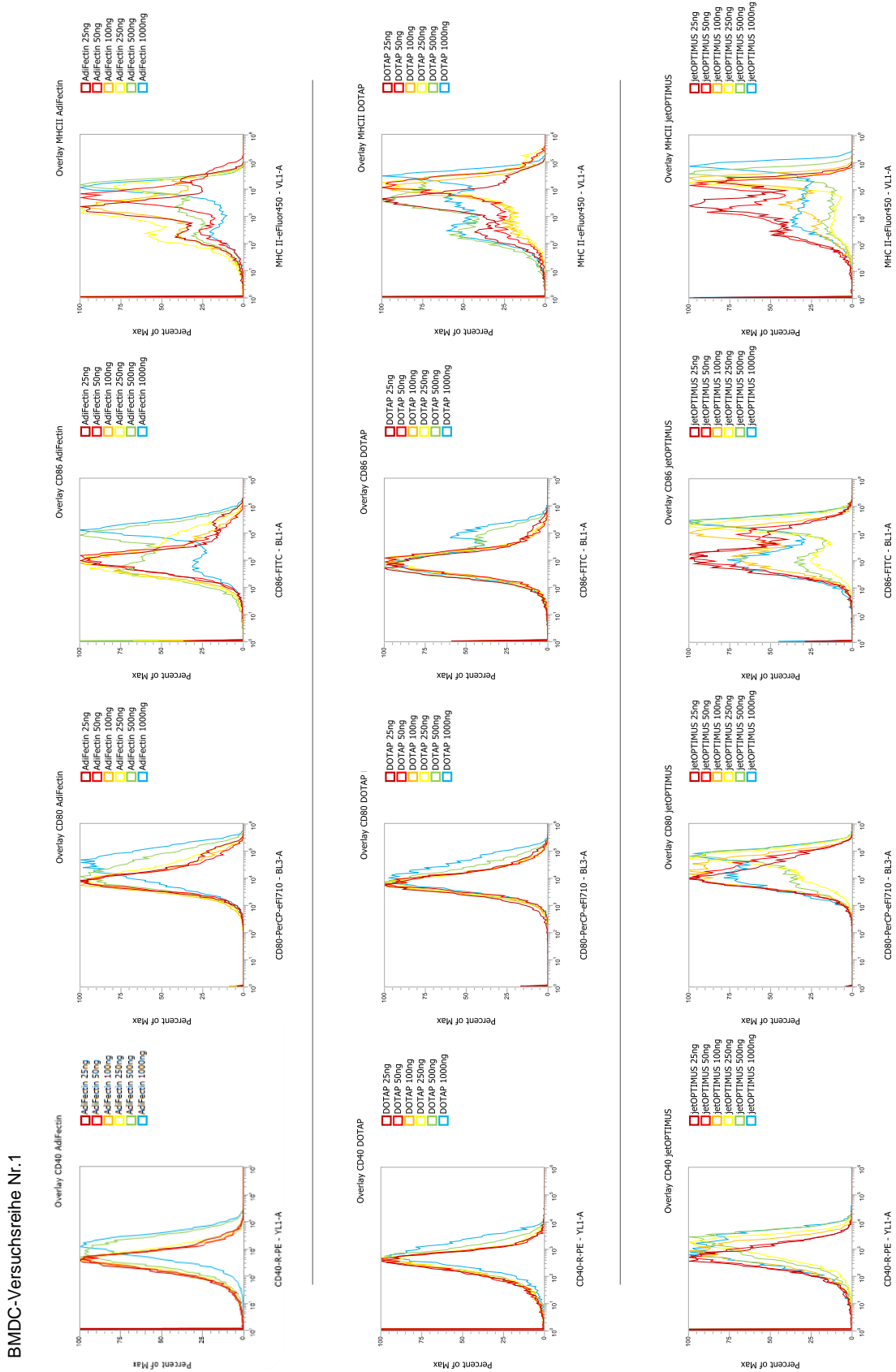


Abbildung A5: Overlay-Darstellung der MFI-Werte für die Oberflächenaktivierungsmarker bei steigender pDNA-Konzentration der untersuchten Nanopartikel. Versuchsreihe Nr.1

BMDC-Versuchsreihe Nr.2

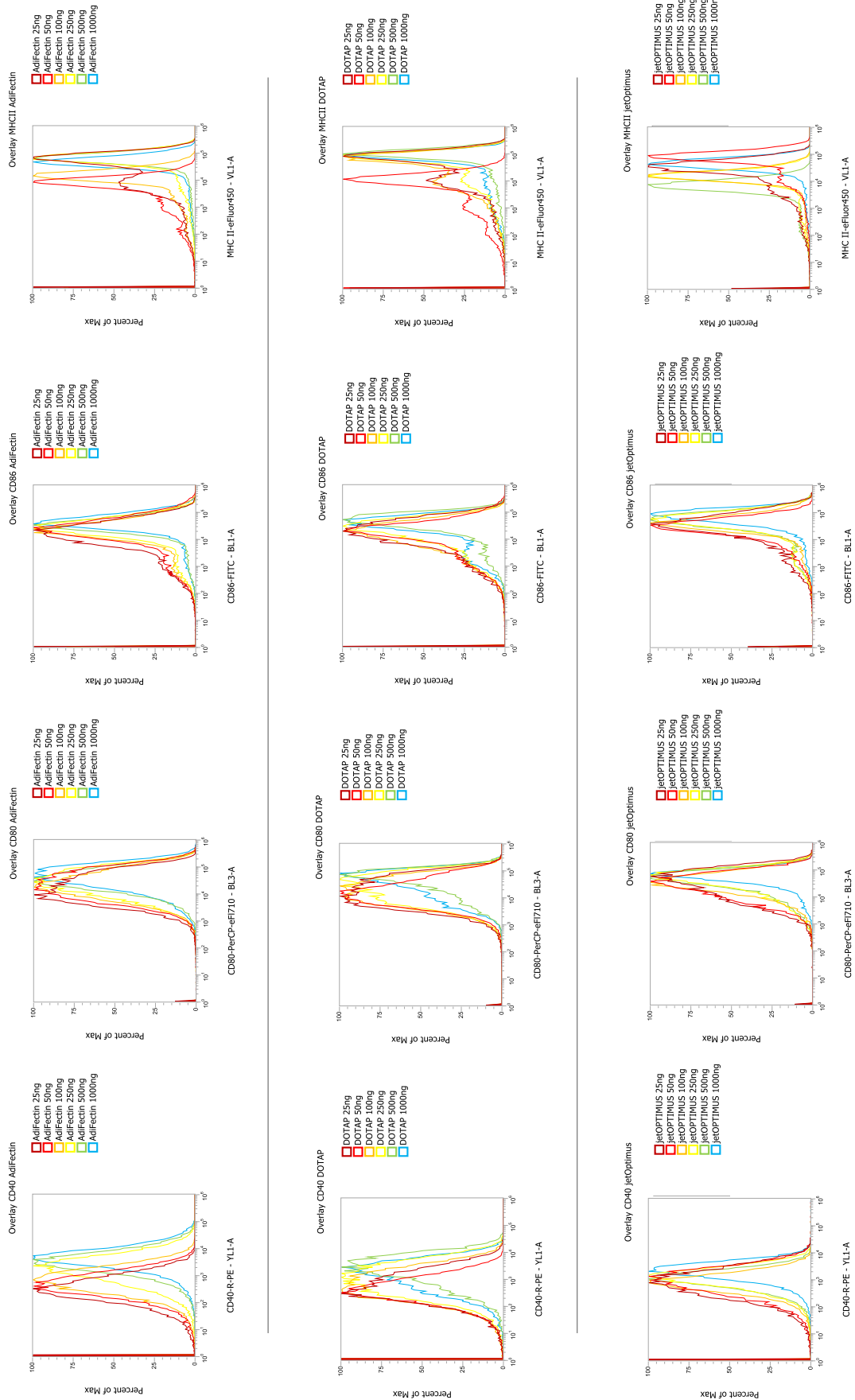


Abbildung A6: Overlay-Darstellung der MFI-Werte für die Oberflächenaktivierungsmarker bei steigender pDNA-Konzentration der untersuchten Nanopartikel. Versuchsreihe Nr.2

BMDC-Versuchsreihe Nr.3

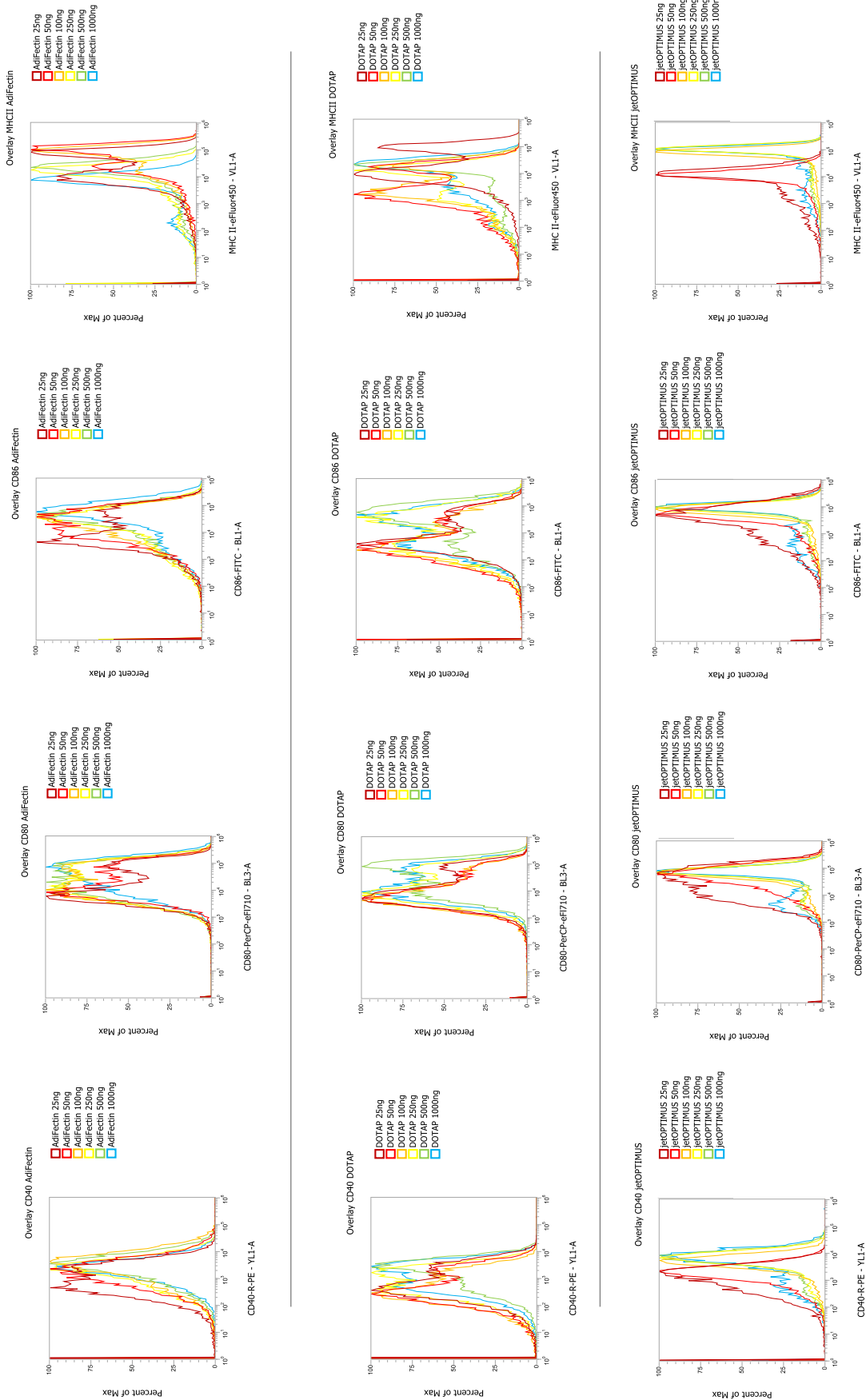


Abbildung A7: Overlay-Darstellung der MFI-Werte für die Oberflächenaktivierungsmarker bei steigender pDNA-Konzentration der untersuchten Nanopartikel. Versuchsreihe Nr.3

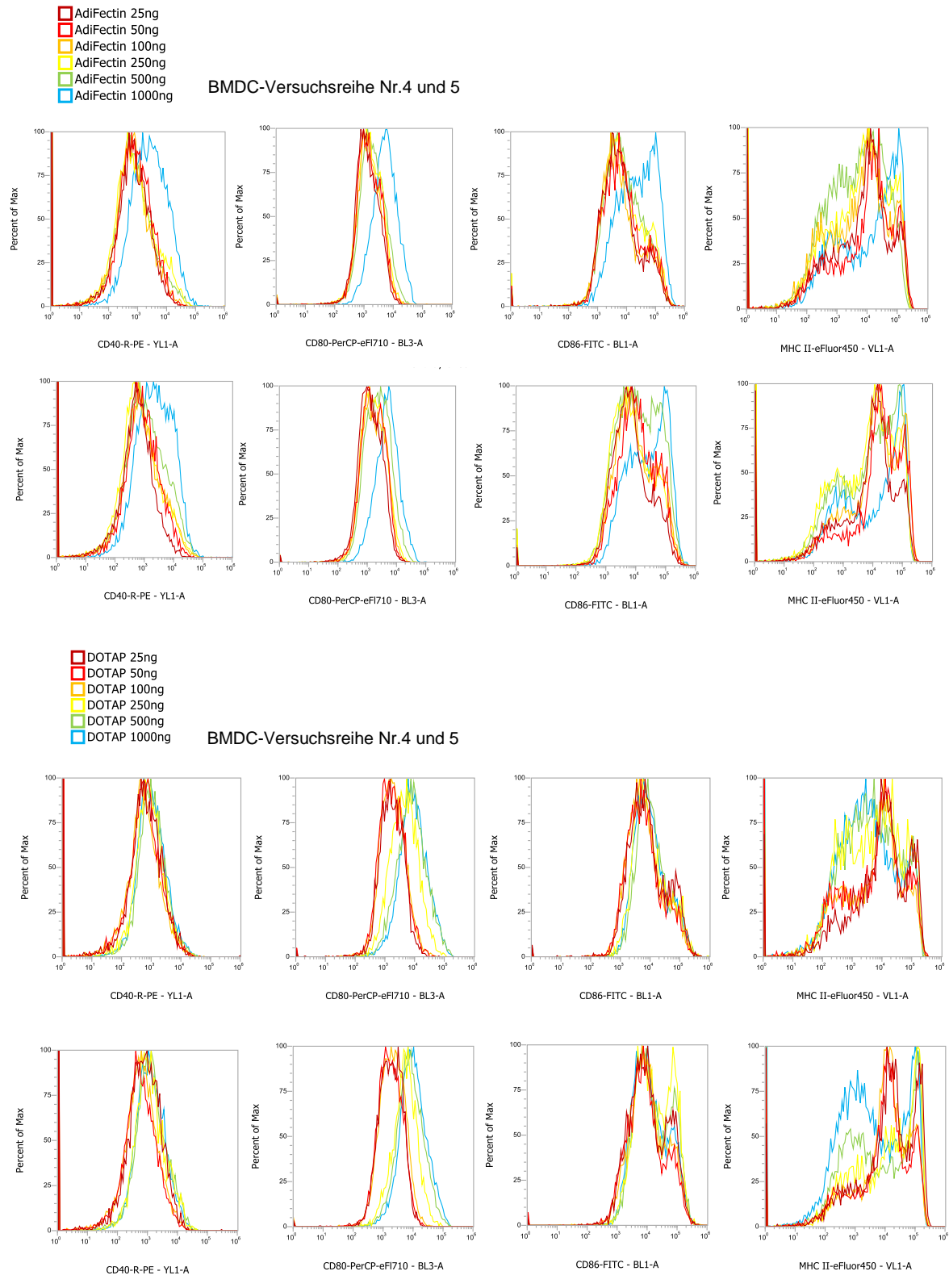
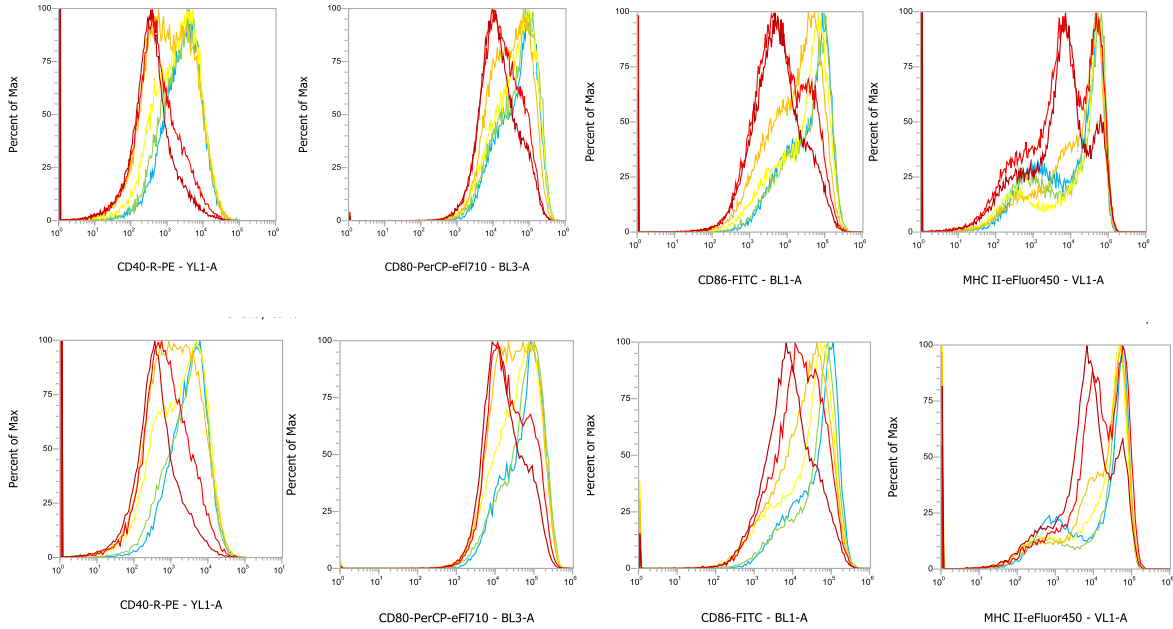


Abbildung A8: Overlay-Darstellung der MFI-Werte für die Oberflächenaktivierungsmarker bei steigender pDNA-Konzentration der untersuchten Nanopartikel. Versuchsreihe Nr.4 und 5

- AdiFectin 25ng
- AdiFectin 50ng
- AdiFectin 100ng
- AdiFectin 250ng
- AdiFectin 500ng
- AdiFectin 1000ng

BMDC-Versuchsreihe Nr.6 und 7



- DOTAP 25ng
- DOTAP 50ng
- DOTAP 100ng
- DOTAP 250ng
- DOTAP 500ng
- DOTAP 1000ng

BMDC-Versuchsreihe Nr.6 und 7

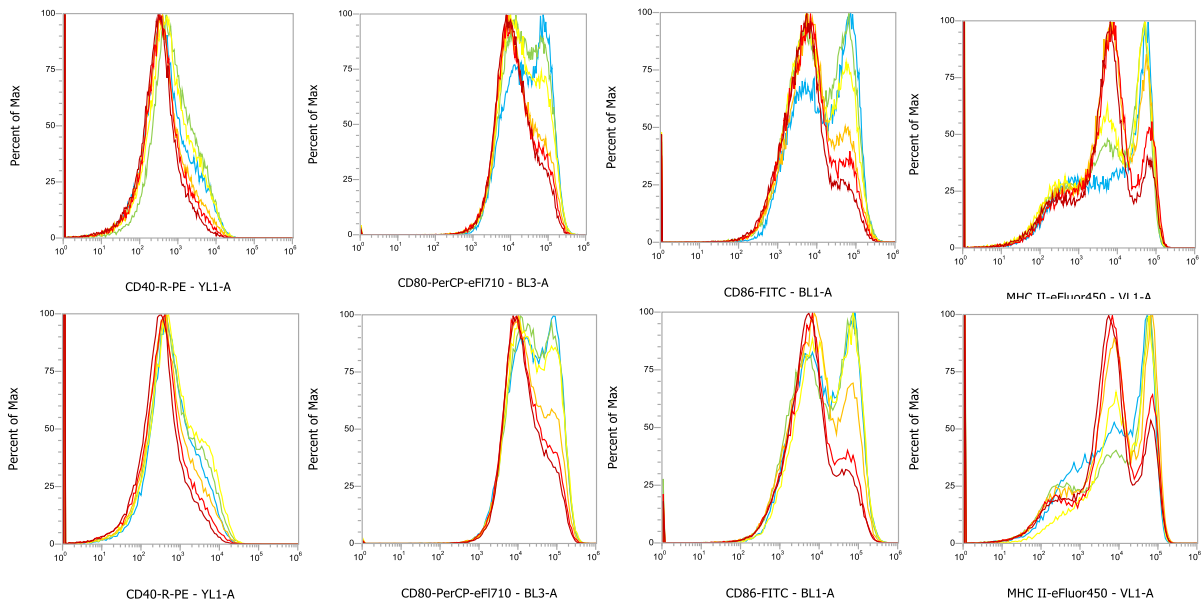


Abbildung A8: Overlay-Darstellung der MFI-Werte für die Oberflächenaktivierungsmarker bei steigender pDNA-Konzentration der untersuchten Nanopartikel. Versuchsreihe Nr.6 und 7

Rohdaten der CBA-Messungen der BMCD-Kulturen

Tabelle A1: Rohdaten der CBA-Messungen der BMDC-Kulturen für IL-23 p19/p40

	Unbehandelte Kontrolle		AdiFectin					
pDNA-Konzentration	0 ng		2,5 ng	5 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
Konzentration IL- 23 p19/p23 (pg/ml)	0,00		0,00	0,00	0,00	3,61	0,00	845.33
	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00		0,00	0,00	0,00	609.89	1206.07	2175.19
	0,00		0,00	0,00	0,00	602.99	1553.96	2008.32
DOTAP								
pDNA-Konzentration	2,5 ng	5 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng		
Konzentration IL- 23 p19/p23 (pg/ml)	0,00	0,00	139,66	492,00	879,47	932,07		
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	20,32		
	0,00	0,00	0,00	43,23	36,01	121,61		
	0,00	0,00	0,00	32,48	43,60	61,50		
	0,00	0,00	0,00	134,55	356,20	352,71		
	0,00	0,00	0,00	125,07	388,88	297,68		

Tabelle A2: Rohdaten der CBA-Messungen der BMDC-Kulturen für IL-12

	Unbehandelte Kontrolle		AdiFectin					
pDNA-Konzentration	0 ng		2,5 ng	5 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng
Konzentration IL-12 (pg/ml)	0,00		5,30	0,00	0,00	3,61	4,18	9,03
	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00		4,53	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	0,00		0,00	0,00	3,72	0,00	0,00	3,45
	4,96		3,56	0,00	0,00	0,00	7,68	11,15
	0,00		0,00	0,00	0,00	0,00	9,03	10,10
DOTAP								
DNA-Konzentration	2,5 ng	5 ng	10 ng	25 ng	50 ng	100 ng		
Konzentration IL-12 (pg/ml)	0,00	0,00	3,41	0,00	0,00	0,00		
	0,00	0,00	0,00	0,00	5,08	0,00		
	0,00	0,00	4,96	0,00	0,00	3,36		
	0,00	0,00	3,78	0,00	0,00	4,33		
	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		
	0,00	6,02	8,04	0,00	0,00	0,00		

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei all denjenigen bedanken, die mich während meines gesamten Studiums und vor allem bei der Durchführung meiner Dissertationsarbeit stets unterstützt und motiviert haben.

Ein besonderer Dank gebührt [REDACTED] für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit, der sich neben seinen zahlreichen Projekten ebenfalls Zeit für meine Einarbeitung in die Methodik nahm. Für die stets hilfreichen Anregungen und konstruktive Kritik während der Erstellung meiner Arbeit möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Zusätzlich bedanke ich mich bei [REDACTED], der mir ebenfalls die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit an der Hautklinik der Universitätsmedizin Mainz anzufertigen. Des Weiteren gilt mein Dank [REDACTED] für die hilfsbereite und wissenschaftliche Betreuung durch die Erstellung des Zweitgutachtens.

Außerdem möchte ich mich beim [REDACTED] der Universitätsmedizin Mainz bedanken. Während meiner Zeit im Labor habe ich mich jederzeit willkommen und freundlich aufgenommen gefühlt. Ein besonderer Dank gilt hier vor allem denjenigen Labormitarbeitern, die mir mit viel Geduld und Verständnis den Umgang mit diversen Laborgeräten und Auswertungsprogrammen beigebracht haben.

Abschließend möchte ich mich bei [REDACTED] [REDACTED], ganz herzlich bedanken. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite und haben mich stets ermutigt meine Ziele zu verfolgen. Damit haben sie zum erfolgreichen Abschluss meines Studiums und auch dieser Dissertationsarbeit beigetragen. Vielen Dank für die mühevollen Geduld und das liebevolle Verständnis bei der Anfertigung meiner Arbeit.

10 Tabellarischer Lebenslauf

