



Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie  
und Hygiene

**DC-SIGN als Zielstruktur zur Verbesserung von Vakzinierungen**

Theresa Förg

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der  
Technischen Universität München zur Erlangung des  
akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E.J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. D. Busch
2. Univ.-Prof. Dr. U. Protzer

Die Dissertation wurde am 21. November 2013 bei der Technischen  
Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am  
22.10.2014 angenommen.

# I INHALTSVERZEICHNIS

<b>I Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>II Abkürzungen</b> .....	<b>3</b>
<b>III Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1 Das Immunsystem: Ein Zusammenspiel zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr .....	9
1.2 Dendritische Zellen .....	10
1.3 Rezeptoren Dendritischer Zellen .....	16
1.4 Das C-Typ Lektin DC-SIGN .....	18
1.5 Generierung einer transgenen hSIGN Maus .....	25
1.6 C-Typ Lektine: Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Vakzine.....	27
1.7 Ziele der Arbeit.....	30
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>32</b>
2.1 Materialien .....	32
2.1.1 Ausstattung.....	32
2.1.2 Chemikalien.....	32
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	34
2.1.4 Kits.....	35
2.1.5 PCR-Primer .....	35
2.1.6 Oligonukleotide .....	35
2.1.7 Antikörper für die FACS-Analyse.....	35
2.1.8 Proteine und Enzyme .....	36
2.1.9 Peptide.....	37
2.2 Methoden.....	37
2.2.1 Zellbiologie.....	37
2.2.1.1 Medium für Zellkulturen mit Dendritischen Zellen .....	37
2.2.1.2 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkskulturen	37
2.2.1.3 Einfrieren von Dendritischen Zellen .....	38
2.2.2 Mäuse .....	38
2.2.3 Molekularbiologie.....	39
2.2.3.1 Puffer und Lösungen.....	39
2.2.3.2 Isolation genomischer Maus-DNS aus Gewebeproben .....	40
2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese .....	41
2.2.3.4 PCR.....	41
2.2.4 Immunologie .....	41
2.2.4.1 Durchflusszytometrie (FACS).....	41
2.2.4.2 FACS-Analyse von Oberflächenmolekülen.....	42
2.2.4.3 Protokolle für Experimente mit T-Zellen .....	43
2.2.4.4 <i>In vitro</i> Ko-Kulturen.....	45
2.2.4.5 <i>In vivo</i> Experimente.....	46
2.2.4.6 Verwendete Vakzine .....	48
2.2.5 Statistik .....	48
<b>3 Ergebnisse</b> .....	<b>49</b>
3.1 Phänotypische Analyse von Dendritischen Zellen.....	49
3.2 Analyse von T-Zell Proliferation mittels CFSE Markierung .....	53
3.3 T-Zell Proliferationsanalyse mittels Thymidin Inkorporation .....	58

3.4	Das Humane DC-SIGN als Zielstruktur von Vakzinen <i>in vivo</i> : Analyse von T-Zell Antworten im hSIGN Mausmodell .....	64
3.5	Funktionelle Analyse der zytotoxischen Aktivität nach Vakzinierung .....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>73</b>
4.1	Zielrezeptoren für die Entwicklung neuer Impfstoffe.....	74
4.2	Zielstruktur DC-SIGN: Induktion von potenten T-Zell Antworten .....	76
4.2.1	<i>Targeting</i> von DC-SIGN <i>in vitro</i> .....	76
4.2.2	<i>Targeting</i> von DC-SIGN <i>in vivo</i> .....	79
4.3	Die Wahl von Antikörpern und Adjuvanzen bei der Neuentwicklung von Impfstoffen .....	82
4.3.1	Die Wahl des richtigen Antikörpers.....	83
4.3.2	Impfstoffe und ihre Adjuvanzen .....	85
4.4	Ausblick: DC-SIGN – Therapeutische Einsatzmöglichkeiten und Chancen in der Medizin .....	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>94</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b> .....	<b>96</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>98</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>112</b>

## II ABKÜRZUNGEN

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC(s)	Antigen presenting cell(s), Antigen-präsentierende Zelle(n)
BAC	Bacterial artificial chromosome
BDCA-2	Blood dendritic cell antigen 2
BSA	Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDC(s)	Conventional dendritic cell(s), konventionelle Dendritische Zelle(n)
cDNA	Complementary DNA, komplementäre DNS
CFSE	5-(6)-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester
CLEC-1	C-type lectin-like receptor 1
CLP(s)	Common lymphoid progenitor(s), gemeinsame lymphoide Vorläuferzelle(n)
CLR(s)	C-type lectin receptor(s), C-Typ Lektin(e)
CMP(s)	Common myeloid progenitor(s), gemeinsame myeloische Vorläuferzelle(n)
CMV	Zytomegalie Virus
CpG	Cytosin-Guanosin Oligonukleotid
cpm	Counts per minute, Zählimpulse pro Minute
CRD(s)	Carbohydrate recognition domain(s), Erkennungsregion(en) für Kohlenhydratstrukturen
CTL(s)	Cytotoxic T-cell(s), zytotoxische T-Zelle(n)
d	Day, Tag
DC-SIGN	Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin
DC-SIGNR	DC-SIGN-related gene
DC(s)	Dendritic cell(s), Dendritische Zelle(n)

DCIR	Dendritic cell immunoreceptor
Dectin-1/-2	DC-associated C-type lectin 1 oder 2
DLEC	Dendritic cell lectin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA, DNS	Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleotid Tri-Phosphat(e)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Restriction Endonuclease isolated from E.coli, Restriktionsendonuclease isoliert aus E.coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	Ethidiummonoazid
engl.	Englisch
ERK(s)	Extracellular signal-regulated protein kinase(s)
FACS	Fluorescence activated cell sorting
Fc	Fragment crystallisable
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FLT3(-L)	FMS-like tyrosine kinase 3(-Ligand)
g	Gramm
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	Aqua double-distilled, doppelt destilliertes Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>PCR</sub>	Aqua ad injectabilia, Wasser für Injektionszwecke
HCV	Hepatitis C Virus
HIV	Human Immunodeficiency Virus
hSIGN	Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenös
ICAM	Intercellular adhesion molecule, interzelluläres Adhäsionsmolekül
iDC(s)	Immature dendritic cell(s), unreife Dendritische Zellen
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Isotyp:OVA AK	Isotyp zu $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörper
ITAM	Immunoreceptor tyrosine-based activation motif
kb	Kilobase
kDA	Kilodalton
KLH	Keyhole limpet hemocyanin
L	Liter
L-SIGN	Liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing non-integrin
LARG	Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor, Makrophagen koloniestimulierender Faktor
ManLAM	Mannose capped lipoarabinomannan
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMR/MR	(Macrophage) mannose receptor, (Makrophagen) Mannose Rezeptor
moDC(s)	Monocyte-derived dendritic cell(s), von Monozyten abstammende Dendritische Zelle(n)
MPL	Monophosphoryl Lipid A
NaCl	Natriumchlorid
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor-kappaB, Kernfaktor KappaB
ng	Nanogramm

NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
NLR(s)	Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptor(s)
OTI Zellen	OVA Peptid Klasse I spezifische T-Zellen
OTII Zellen	OVA Peptid Klasse II spezifische T-Zellen
p38	Mitogen-activated protein kinase
PAMP(s)	Pathogen-associated molecular pattern(s), mit den Pathogenen assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate-buffered saline, phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
pDC(s)	Plasmacytoid dendritic cell(s), plasmazytoide Dendritische Zelle(n)
PDCA	Dendritic cells expressing plasmacytoid marker
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pMol	Pikomol
PRR(s)	Pattern-recognition receptor(s), Mustererkennungsrezeptor(en)
RLH(s)	Retinoid-acid-inducible gene like helicase(s)
RNA, RNS	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	Rotations per minute, Umdrehungen pro Minute
s.	Siehe
Salp15	Ixodes scapularis salivary protein
SDS	Sodium dodecyl sulfat
SIGNR	SIGN-related
sog.	Sogenannte
SP-A	Surfactantprotein A
SP-D	Surfactantprotein D
TCR	T-cell receptor, T-Zell Rezeptor
TGF	Transforming Growth Factor, transformierender Wachstumsfaktor
T <sub>H</sub> cell(s)	T helper cell(s), T-Helferzelle(n)

---

TLR	Toll-like receptor, Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor necrosis factor, Tumornekrosefaktor
T <sub>reg(s)</sub>	Regulatory T-cell(s), regulatorische T-Zelle(n)
TREM(s)	Triggering receptor(s) expressed on myeloid cells
TRP-2	Tyrosinase-related protein 2, B16 Melanom Antigen
V	Volt
WT	Wildtyp Maus
$\alpha$	Anti
$\alpha$ hDC-SIGN:OVA AK	Anti-human-DC-SIGN Antikörper gekoppelt an OVA Protein
$\mu$ Ci	Mikrocurie
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter



### III ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Immunregulation durch DCs.....	14
Abbildung 2: Unterschiedliche Subpopulationen von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen....	15
Abbildung 3: Rezeptortypen auf DCs .....	17
Abbildung 4: Überblick über die wichtigsten Typ I und Typ II CLRs.....	19
Abbildung 5: Aufbau und Struktur von DC-SIGN .....	20
Abbildung 6: Die räumliche Konformation der CRD von DC-SIGN .....	21
Abbildung 7: DC-SIGN Signaltransduktionswege verschiedener Pathogene .....	22
Abbildung 8: Schematischer Überblick über die Struktur der murinen und humanen SIGN-Moleküle.....	26
Abbildung 9: Struktur des transgenen hSIGN Mauskonstrukts .....	27
Abbildung 10: Zeitschema zum <i>Targeting</i> von DC-SIGN <i>in vivo</i> .....	47
Abbildung 11: FACS Analyse der unstimulierten DCs am Kulturtag acht .....	50
Abbildung 12: FACS Analyse der stimulierten DCs am Kulturtag acht .....	51
Abbildung 13: Expression von DC-SIGN in transgenen hSIGN Mäusen .....	52
Abbildung 14: OTI T-Zell Proliferation bei spezifischem Beladen der DCs mit Antikörpern oder Protein .....	56
Abbildung 15: OTI und OTII T-Zell Proliferation bei gezieltem Beladen der DCs mit Antikörpern .....	57
Abbildung 16: OTI T-Zell Proliferation bei <i>Targeting</i> von DC-SIGN <i>in vitro</i> .....	60
Abbildung 17: OTII T-Zell Proliferation bei <i>Targeting</i> von DC-SIGN <i>in vitro</i> .....	62
Abbildung 18: Proliferation transferierter CD45.1 <sup>+</sup> x OTI Zellen <i>in vivo</i> .....	66
Abbildung 19: Proliferation transferierter CD45.1 <sup>+</sup> x OTII Zellen <i>in vivo</i> .....	67
Abbildung 20: Verringerung der CFSE <sup>low</sup> Fraktion in der Milz.....	69
Abbildung 21: Verringerung der CFSE <sup>low</sup> Fraktion in den inguinalen Lymphknoten .....	71

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das Immunsystem: Ein Zusammenspiel zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr

Das Immunsystem ist ein komplex aufgebautes System des menschlichen Organismus, dessen Hauptaufgabe darin besteht, den Körper vor infektiösen Erregern zu schützen und gleichzeitig eine immunologische Balance aufrecht zu halten. Diese komplexe Aufgabe gelingt nur durch die Zusammenarbeit der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr, welche eine untrennbare Einheit bilden (Janeway, 2001). Die Hauptfunktion der angeborenen Abwehr ist es, Pathogene oder Zeichen von Gewebsuntergang und Entzündung aufzuspüren und mit Hilfe ihrer Effektoren eine Immunantwort zu initiieren. Zu den zellulären Effektoren des angeborenen Immunsystems gehören Phagozyten und natürliche Killer Zellen (NK Zellen). Die humoralen Mediatoren stellen unter anderem Komplementfaktoren oder Akute-Phase-Proteine dar (Hof and Dörries, 2005). Die phagozytierenden Zellen der angeborenen Abwehr verfügen über eine Reihe an Oberflächenrezeptoren, die körperfremde Substanzen erkennen können, ohne dass der Organismus zuvor mit diesen Molekülen in Verbindung gekommen sein muss. Die unspezifische Immunabwehr ist in der Lage eine Infektion schnell zu kontrollieren, besitzt jedoch nicht die Fähigkeit, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden. Nur durch die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses aber kann der Organismus eine lang anhaltende Immunität gegen Infektionserreger aufbauen. Im Laufe der evolutionären Entwicklung kam ein zweiter wichtiger Teil des Immunsystems hinzu: Die erworbene, Antigen-spezifische Immunabwehr. Die Effektoren dieser adaptiven Immunabwehr sind hauptsächlich T- und B-Lymphozyten. Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APCs) verfügen über eine große Oberfläche, sogenannte *major histocompatibility complex* (MHC) Moleküle und viele andere kostimulatorische Moleküle. Über diese Moleküle können Antigene an naive T-Lymphozyten präsentiert und diese so aktiviert werden. Im Verlauf der Immunantwort kommt es zur klonalen Proliferation von Antigen-spezifischen T-Zellen (Liu and Janeway, 1992). Die entstehenden T-Zell Effektoren können über den Blutstrom in infizierte oder entzündete Gewebe einwandern und übernehmen als CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>1-, CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>2- und CD8<sup>+</sup> T-Zellen multiple immunregulatorische Aufgaben. Naive B-Lymphozyten können im Gegensatz zu naiven T-Lymphozyten auch Anti-

gene in Lösung erkennen, binden und in das Zellinnere aufnehmen. Nach der proteolytischen Spaltung werden die Antigene auf MHCII Molekülen an der Oberfläche der B-Zelle präsentiert. Erkennt eine aktivierte Antigen-spezifische  $CD4^+$  T-Zelle auf der Oberfläche eines B-Lymphozyten ein ihr bereits bekanntes Antigen, produziert die  $CD4^+$  T-Zelle verschiedene Zytokine und regt die B-Zelle hierdurch zur weiteren Differenzierung in eine Antikörper produzierende Plasmazelle an. Sowohl B- als auch T-Zellen können sich zu langlebigen Gedächtniszellen entwickeln, die bei einem erneuten Kontakt mit dem für sie spezifischen Antigen zu einer beschleunigten spezifischen Abwehr befähigt sind und schnell proliferieren (Hof and Dörries, 2005). Die Entwicklung dieser Gedächtniszellen bildet die Grundlage für die Funktion und Neuentwicklung von Impfstoffen (Kalia et al., 2006; Pulendran and Ahmed, 2006).

Auch wenn er sich über die genauen Mechanismen noch nicht im Klaren war, gelang dem englischen Arzt Edward Jenner bereits 1796 mit der ersten erfolgreichen Impfung gegen Pockenviren eine weitreichende Entdeckung, welche die zentrale Rolle des Immunsystems in der Weiterentwicklung neuer medizinischer Therapiemöglichkeiten zeigt (s. Übersichtsarbeit von Kaufmann, 2007). Bis heute gehören Impfungen zu den wirkungsvollsten Maßnahmen für einen andauernden Schutz gegen Infektionen und deren Ausbreitung in der Bevölkerung. Nur so konnten Erkrankungen wie die Poliomyelitis oder die Infektion mit *Haemophilus influenzae* (Typ b) auf ein Minimum reduziert werden (Robert Koch Institut, 2007).

## 1.2 Dendritische Zellen

Der kanadische Immunologe Ralph Marvin Steinman wurde im Oktober 2011 vom Nobelpreiskomitee in Stockholm zum Preisträger für Medizin 2011 erklärt. Trotz seines Todes drei Tage vor der Auszeichnung, entschied sich das Komitee, am Preis für Steinman festzuhalten und ihn für sein Lebenswerk und die jahrzehntelange Forschung an Dendritischen Zellen (DCs) zu ehren (Kupferschmidt, 2011). Bereits 1973 entdeckte Steinman die DC, erntete jedoch erst in den 1990er Jahren zunehmend Anerkennung für seine Entdeckung und revolutionierte nachhaltig die Ansichten über das Immunsystem und seine Funktionsweise (Albrecht, 2011). Da den Wissenschaftlern immer mehr bewusst wurde, welche große Bedeutung diesen Zellen zugeschrieben werden muss, wurden in den letzten Jahrzehnten

größte Anstrengungen betrieben, um die Differenzierungs- und Abstammungswege, Phänotypen, Aufgaben und Besonderheiten der DCs aufzuklären.

DCs differenzieren sich aus Knochenmarksstammzellen und wandern als Vorläufer DCs in das periphere Blut ein. Dort machen sie nur einen geringen Prozentsatz der Zellen aus, sodass ihre Isolierung und Kultivierung lange Zeit ein großes Hindernis für die Forschung an diesen Zellen darstellte. Inzwischen können DCs jedoch in großen Mengen durch Kultivierung mit verschiedenen Zytokinen aus humanen Blutmonozyten, menschlichem Nabelschnurblut oder Knochenmark, sowie aus Knochenmark oder Blut von Mäusen gewonnen werden (Inaba et al., 1992; Reid et al., 1992; Santiago-Schwarz et al., 1992; Inaba et al., 1993; Peters et al., 1996). Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass DCs rein myeloiden Ursprungs sind. Inaba et al. konnten bereits früh zeigen, dass Granulozyten, Monozyten und DCs mit Hilfe des Granulozyten Makrophagen koloniestimulierenden Faktors (GM-CSF) aus murinen Knochenmarksvorläuferzellen generiert werden können (Inaba et al., 1992; Inaba et al., 1993). Kulturen humaner CD34<sup>+</sup> Knochenmarksläuferzellen entwickelten sich zu CD1a<sup>-</sup> Monozyten, Granulozytenvorläuferzellen oder zu einer bipotenten Vorläuferzellpopulation, die sich wiederum in Kultur mit GM-CSF zu DCs oder zusammen mit dem Makrophagen koloniestimulierenden Faktor (M-CSF) zu Monozyten weiterentwickelte (s. Übersichtsarbeit von Shortman and Caux, 1997). Beweisend für eine myeloide Abstammung muriner DCs waren jedoch verschiedene Studien, in denen schon kurze Zeit nach der Transplantation muriner myeloider Vorläuferzellen (CMPs) in bestrahlte Empfängermäuse plasmazytoide DCs (pDCs) und konventionelle DCs (cDCs) in der Milz und im Thymus der Mäuse nachzuweisen waren (Traver et al., 2000; Manz et al., 2001a; Wu et al., 2001). Inzwischen liegen aber ausreichend viele Belege dafür vor, dass neben myeloiden auch lymphoide Vorläuferzellen für DCs existieren. DCs und verschiedene lymphoide Zellen verfügen über gemeinsame Oberflächenmarker wie CD8 (als  $\alpha\alpha$  Homodimer), CD2, BP-1 und CD25, was Vremec et al. bereits früh mutmaßen ließ, dass eine gemeinsame lymphoide Vorläuferzellen vorliegen könnte (Vremec et al., 1992). Außerdem sind lymphoide Vorläuferzellen (CLPs) aus murinem Knochenmark sowohl *in vitro* als auch *in vivo* in der Lage, sich zu DCs zu entwickeln (Manz et al., 2001b; Wu et al., 2001).

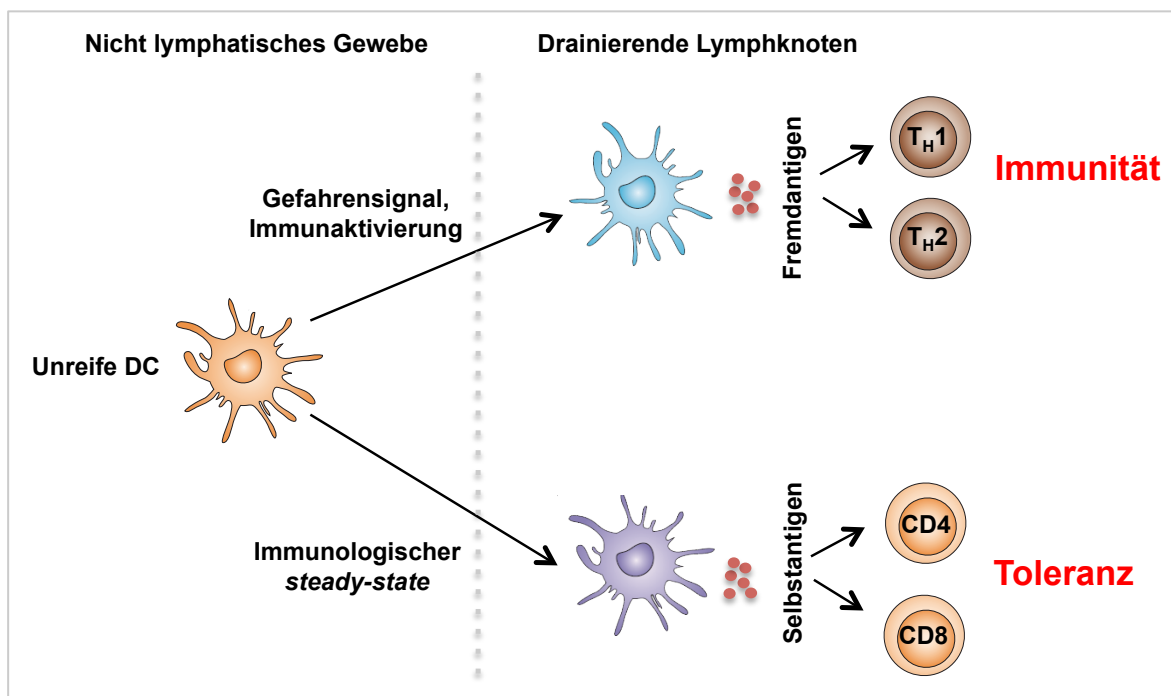
Um die multiplen Aufgaben im Immunsystem zu erfüllen, entwickelten sich unterschiedliche Untergruppen von DCs. In der Maus werden die DCs in zwei große Hauptgruppen eingeteilt: Zum einen in die Gruppe der pDCs ( $CD11c^+ B220^+ CD45RA^+ PDCA1^+$ ), die auch als Typ-1 Interferon produzierende Zellen bekannt sind und zum anderen in die Gruppe der cDCs ( $CD11c^+ B220^- CD45RA^- PDCA1^-$ ) (s. Übersichtsarbeit von Shortman and Liu, 2002). Es konnte bereits gezeigt werden, dass murine DCs, die von lymphoiden Vorläuferzellen abstammen, große Mengen an IL-12 produzieren und weniger Phagozytose als DCs myeloider Abstammung betreiben (Pulendran et al., 1997; Leenen et al., 1998). Es konnte jedoch sowohl für DCs lymphoider als auch myeloider Abstammung in der Maus *in vivo* gleichermaßen eine effektive  $CD4^+$  T-Zell Aktivierung nachgewiesen werden (Maldonado-López et al., 1999).

Darüberhinaus scheint der FLT3-Ligand (FLT3-L) eine wichtige Rolle bei der Differenzierung muriner Knochenmarksvorläuferzellen zu DCs zu spielen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass FLT3-L Injektionen zu einer deutlichen Vermehrung von DCs myeloider und lymphoider Herkunft in mehreren Organen der Maus führten, wohingegen GM-CSF in erster Linie eine Vermehrung der DCs abstammend von myeloiden Vorläuferzellen auslöste (Shurin et al., 1997; Lyman and Jacobsen, 1998; Pulendran et al., 1999). Inwiefern es bei der Maus eine Verknüpfung zwischen der Entwicklung von Langerhans Zellen, den Langerin exprimierenden DCs der Haut und DCs lymphoider und myeloider Abstammung gibt, ist noch nicht bis ins Detail erforscht. Verschiedene Studien konnten jedoch zeigen, dass die Entwicklung von Langerhans Zellen in der Maus abhängig ist von der Anwesenheit von TGF-beta 1 (Borkowski et al., 1996). Im Menschen wurden die Subgruppen von DCs bislang nicht so ausführlich untersucht wie im murinen Organismus, sie lassen sich aber ebenfalls in die beiden Hauptgruppen cDCs ( $CD11c^+ CD123^{low} BDCA-2^-$ ) und pDCs ( $CD11c^- CD123^{high} BDCA-2^+$ ) einteilen (Ito et al., 2005). Die Entwicklung humaner DCs nimmt ihren Ausgang bei  $CD34^+$  Vorläuferzellen im Knochenmark. Myeloide  $CD34^+$  Vorläuferzellen differenzieren sich im Blut zu  $CD14^+ CD11c^+ CD1^-$  oder  $CD14^- CD11c^+ CD1^+$  Vorläuferzellen. Die  $CD14^+ CD11c^+ CD1^-$  Population reift unter Einfluss von IL-4 und GM-CSF zu interstitiellen DCs heran, während GM-CSF, IL-4 und TGF-beta die  $CD14^- CD11^+ CD1^+$  Population zur Differenzierung zu Langerhans Zellen anregen (Romani et al., 1994; Ito et al., 1999). TGF-beta scheint also sowohl bei der Maus als auch beim Menschen

ein wichtiger Faktor für das Heranreifen von Langerhans Zellen zu sein (Borkowski et al., 1996; Strobl et al., 1997). Lymphoide  $CD34^+$  Vorläuferzellen entwickeln sich im peripheren Blut zu  $CD14^- CD11^- CD4^{hi} IL-3R\alpha^+$  Zellen, die nur unter dem Einfluss von IL-3 überleben können und sich bei Anwesenheit von CD40-Liganden zu reifen humanen pDCs weiter entwickeln (Grouard et al., 1997; Banchereau et al., 2000). Möglicherweise stellen sie das Pendant für murine DCs lymphoider Abstammung dar (Banchereau et al., 2000; Shortman and Liu, 2002). Die Injektion von FLT3-L erhöht ähnlich wie im Organismus der Maus die Anzahl nachweisbarer DCs im menschlichen Blut (Maraskovsky et al., 2000).

Auch wenn über die genauen Abstammungswege der DCs noch keine allgemeine Einigkeit herrscht und sich die Subpopulationen in ihren Oberflächenmarkern, Lokalisationen und Migrationseigenschaften unterscheiden, haben DCs eine gemeinsame Eigenschaft: Es handelt sich um APCs, die an der Schnittstelle zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem wirken (s. Übersichtsarbeiten von Steinman, 1991; Banchereau and Steinman, 1998). Sie sind in der Lage Antigene aufzunehmen, in ihrem Zellinneren zu prozessieren und sie dann mit Hilfe von MHC Molekülen an ihrer Oberfläche zu präsentieren. DCs durchlaufen während ihrer Entwicklung verschiedene Phasen, in denen sich Migrationseigenschaften, Reifegrad, Expression von Oberflächenmolekülen und Sekretion von Botenstoffen verändern. Sind keine inflammatorischen Signale vorhanden, wie es im immunologischen Gleichgewichtszustand (sog. *steady-state*) der Fall ist, verbleiben DCs in einem unreifen, gering aktivierten Zustand (iDCs) und exprimieren nur wenige MHCII und kostimulierende Moleküle auf ihrer Oberfläche. Als iDCs besiedeln sie den gesamten Körper, internalisieren und präsentieren kontinuierlich körpereigene Antigene und können so T-Zell Reaktionen gegen Selbstantigene regulieren und die Aktivität des Immunsystems kontrollieren (s. Übersichtsarbeit von Geijtenbeek et al., 2004). Außerdem können iDCs die Generierung regulatorischer T-Zellen ( $T_{regs}$ ) vorantreiben. Diese beiden Mechanismen sind wichtig, um der Entstehung von Autoimmunprozessen entgegen zu wirken und eine Immunbalance aufrechtzuerhalten. Bei mikrobieller Infektion, Zelluntergang oder Entzündung (sog. Gefahrensignale (*danger signals*)), werden DCs über den Blutstrom in die betroffenen inflammatorischen Gewebe verteilt, nehmen dort Fremd- oder Selbstantigene auf und wandern anschließend in sekundäre lymphatische Organe, meist Lymphknoten (LKs), ein. Als nun reife DCs exprimieren sie zusätzliche kostimula-

torische Oberflächenmoleküle, erhöhen die Dichte an MHCII Molekülen und produzieren proinflammatorische Zytokine und Chemokine. Nur so können Antigenfragmente effizient an naive T-Zellen präsentiert und die Proliferation von Antigen-spezifischen T-Helferzellen ( $T_H$  Zellen) initiiert werden (Banchereau and Steinman, 1998). Die  $T_H$  Zellen steuern im weiteren Verlauf die Aktivität verschiedener anderer Immuneffektoren wie Antigen-spezifischer  $CD8^+$  zytotoxischer T-Zellen (CTLs), B-Zellen, Makrophagen, Eosinophiler und NK Zellen. **Abbildung 1** zeigt einen schematischen Überblick über die Immunregulation durch DCs.

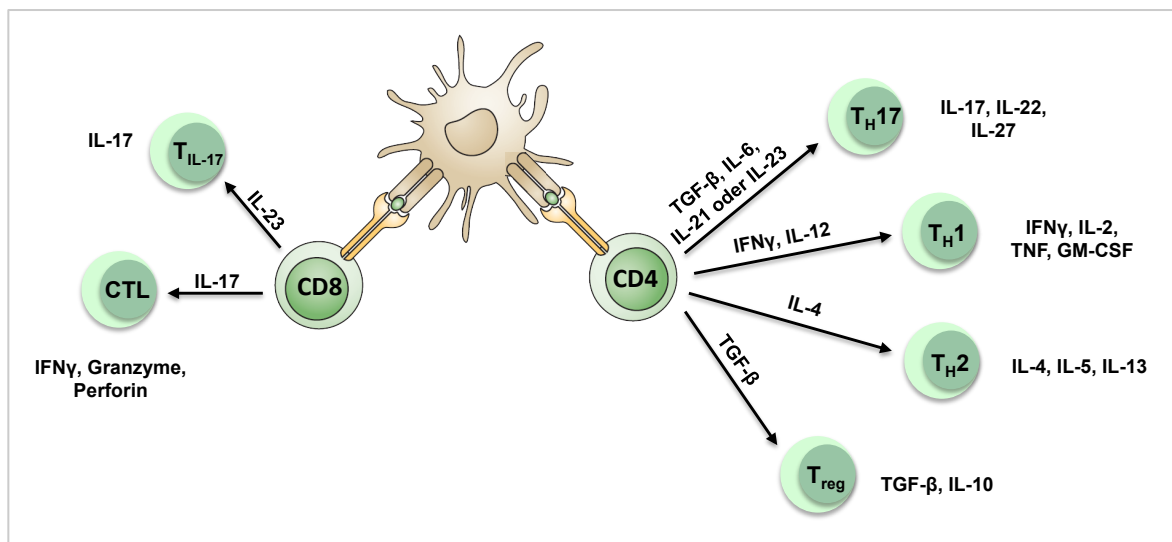


**Abbildung 1: Immunregulation durch DCs**

Ohne inflammatorische Signale verbleiben DCs im immunologischen Gleichgewichtszustand (*steady-state*) und sorgen für die Aufrechterhaltung der peripheren T-Zell Toleranz. Bei mikrobieller Infektion, Zelluntergang oder Entzündung (Gefahrensignale) werden die DCs aktiviert und wandern vermehrt in sekundäre Lymphorgane ein, wo sie Antigene an naive T-Zellen präsentieren und die Generierung einer Immunantwort initiieren. **Abbildung 1** modifiziert nach Shortman and Liu, 2002. Abkürzungen: CD, cluster of differentiation; DC, Dendritische Zelle;  $T_H$ , T-Helferzelle.

Welche Effektor T-Zellen heranreifen, hängt von drei Dingen ab: Dem T-Zell Rezeptor, der MHC Klasse und den Zytokinen. Naive  $CD4^+$  T-Zellen binden über ihren T-Zell Rezeptor MHCII Moleküle, naive  $CD8^+$  T-Zellen hingegen binden MHC I Moleküle. In Anwesenheit von IL-2 und IL-12 entwickeln sich naive T-Zellen hauptsächlich zu  $IFN\gamma$ -produzierenden  $CD4^+$   $T_H1$ -Zellen und CTLs (Murphy et al., 1994; Sparwasser et al., 2000).  $T_H1$ -Zellen sind maßgeblich an der Aktivierung von Phagozytoseprozessen intrazellulärer Pathogene beteiligt (Maldonado-López

et al., 1999; Pulendran et al., 1999; Napolitani et al., 2005).  $CD4^+$   $T_H17$ -Zellen und IL-17 produzierende  $CD8^+$  T-Zellen reifen unter dem Einfluss von TGF- $\beta$  und proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-21 und IL-23 (He et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). IL-4, das von spezifischen DCs und Basophilen sezerniert wird, führt zur Entstehung von  $CD4^+$   $T_H2$ -Zellen (Sokol et al., 2008).  $T_H2$ -Zellen produzieren IL-4, IL-5 und IL-13 und können so effizient Parasiten bekämpfen (Seder et al., 1992). Sie beeinflussen aber auch  $T_H1$ -induzierte Immunantworten und führen zu allergischen Erkrankungen wie Asthma bronchiale (s. Übersichtsarbeiten von Luster and Tager, 2004; Kaufmann, 2007; Steinman and Banchereau, 2007; Stephani, 2008; Koyasu and Moro, 2011). **Abbildung 2** veranschaulicht die Entwicklung unterschiedlicher Subpopulationen von T-Zellen.



**Abbildung 2: Unterschiedliche Subpopulationen von  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen**

Naive  $CD4^+$  T-Zellen entwickeln sich zu T<sub>regs</sub>, T<sub>H1</sub>, T<sub>H2</sub>- oder T<sub>H17</sub>-Zellen. Naive  $CD8^+$  T-Zellen werden zu CTLs und IL-17 produzierenden Zellen. **Abbildung 2** modifiziert nach Luster and Tager, 2004; Kaufmann, 2007; Stephani, 2008.

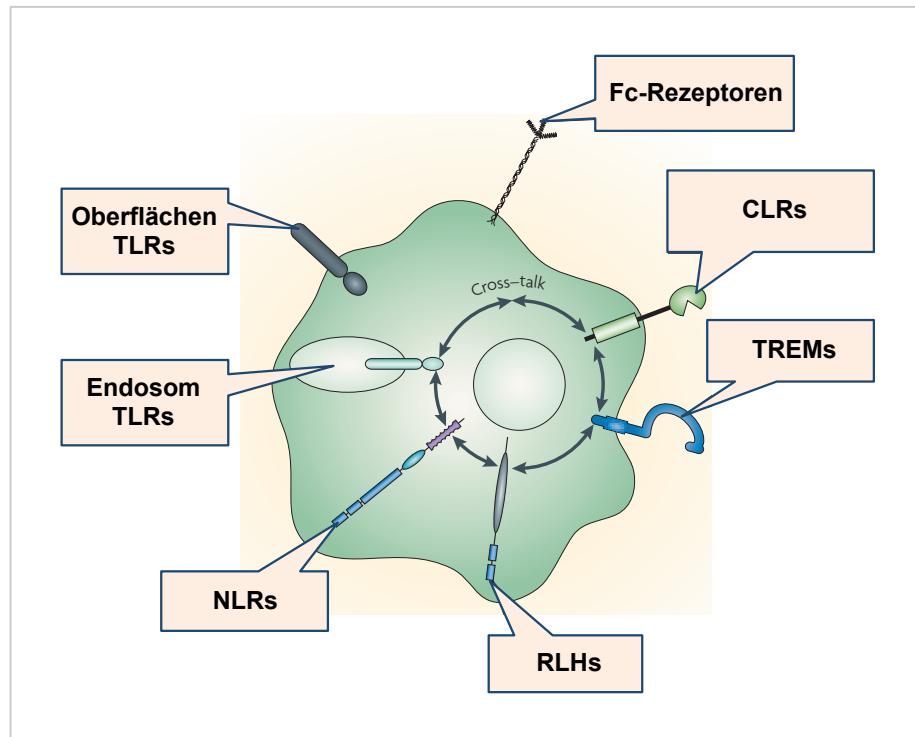
Abkürzungen: CD, cluster of differentiation; CTL, zytotoxische T-Zelle; GM-CSF, Granulozyten Makrophagen koloniestimulierender Faktor; IFN, Interferon; IL, Interleukin; TGF, transformierender Wachstumsfaktor; T<sub>H</sub>, T-Helferzelle; TNF, Tumornekrosefaktor; T<sub>reg</sub>, regulatorische T-Zelle.



## 1.3 Rezeptoren Dendritischer Zellen

Für die Unterscheidung zwischen Pathogenen und Selbstantigenen verfügen DCs auf ihrer Oberfläche über eine Bandbreite an Rezeptoren, die den DCs ermöglichen, Antigene zu erkennen, diese in ihr Zellinneres aufzunehmen und verschiedene Signaltransduktionswege zu aktivieren. So können entweder effektive Immunantworten gegen die Pathogene generiert oder die immunologische Aktivität gedrosselt werden. Diejenigen Rezeptoren, die zur Erkennung von Pathogenen wichtig sind, werden als Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) bezeichnet. Die PRRs erkennen mit den Pathogenen assoziierte molekulare Muster (PAMPs), welche charakteristische Erregerbestandteile darstellen und für das Überleben von Pathogenen essentiell sind. Es handelt sich hierbei insbesondere um Bestandteile der Zellwand oder Ribonukleinsäuren, wobei die meisten Pathogene über mehrere verschiedene PAMPs verfügen und somit auch gleichzeitig von unterschiedlichen PRRs erkannt werden können (s. Übersichtsarbeit von Janeway and Medzhitov, 2002). Die beiden größten Rezeptorgruppen stellen die Toll-like Rezeptoren (TLRs) und die C-Typ Lektine (CLRs) dar. Außerdem verfügen DCs über NOD-like Rezeptoren (NLRs), RIG-like Helikasen (RLHs), *Triggering receptors expressed on myeloid cells* (TREM) und Fc-Rezeptoren (s. Übersichtsarbeit von Guy, 2007). Aus **Abbildung 3** werden die verschiedenen Rezeptortypen von DCs ersichtlich.

Die am besten erforschte und charakterisierte Gruppe ist die Familie der TLRs. Aktuell sind zehn Subtypen beim Menschen und 12 in der Maus bekannt, wobei diese entweder auf der Zelloberfläche (TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10-13) oder auf der Membran von Endosomen (TLR 3, 7, 8, 9) im Zellinneren vorkommen. TLRs sind in der Zell- oder Endosomenmembran verankert und erkennen spezifische Pathogenkomponenten wie Lipoproteine, Lipopolysaccharide (LPS), Flagellin oder bakterielle Desoxyribonukleinsäure (DNS), aber auch endogene Proteine wie Hitzeschock Proteine, die bei Schädigung von Gewebe freigesetzt werden. Die TLRs geben nach der Bindung Informationen über ihre Liganden mit Hilfe von Signalkaskaden in das Zellinnere der DCs weiter und lösen Prozesse aus, die zur Reifung der DCs führen, die Produktion von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen vorantreiben und auf diese Weise die T-Zell Aktivierung ermöglichen (s. Übersichtsarbeiten von Figdor et al., 2002; Janeway and Medzhitov, 2002).



**Abbildung 3: Rezeptortypen auf DCs**

TREMs, NLRs, RLHs und TLRs erkennen spezifische PAMPs und führen über verschiedene Signaltransduktionswege zur Aktivierung von DCs. CLRs und Fc-Rezeptoren hingegen sind speziell für die Antigenaufnahme in die DCs wichtig. **Abbildung 3** modifiziert nach Guy, 2007 und Stephani, 2008.

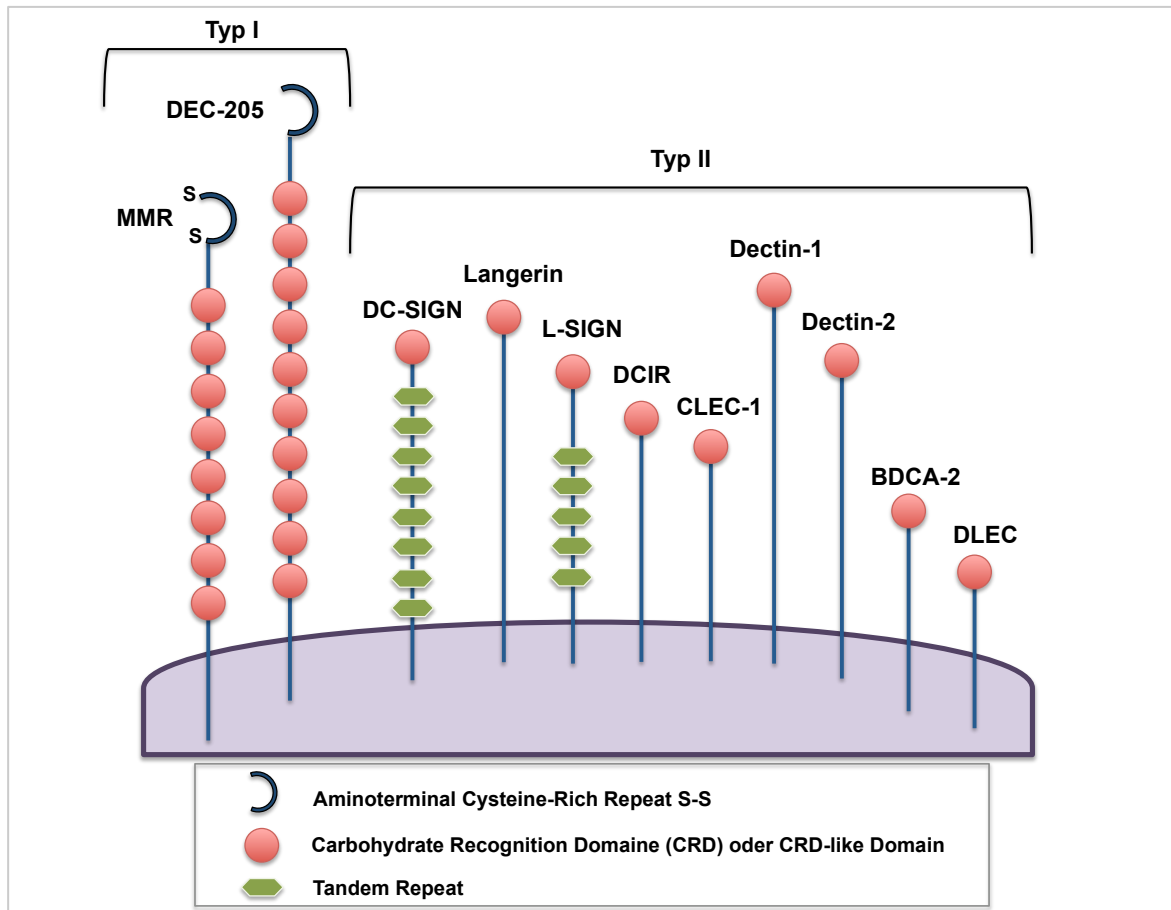
Abkürzungen: CLRs, C-type Lektine; Fc, Fragment crystallisable; NLRs, NOD-like Rezeptoren; RLHs, RIG-like Helikasen; TLRs, Toll-like Rezeptoren; TREMs, Triggering receptors expressed on myeloid cells.

Eine zweite große Gruppe bilden die CLRs. Diese Familie besteht aus 17 verschiedenen Rezeptoren, die als Transmembranproteine oder in löslicher Form vorkommen. Zu den löslichen Formen zählt man unter anderem das Mannosebindende Lektin (MBL), welches im Blutplasma zu finden ist und die Surfactantproteine A und D (SP-A oder SP-D), die von Epithelzellen in der Lunge produziert werden (Kawasaki et al., 1983; Wintergerst et al., 1989). Die membrangebundenen CLRs werden hauptsächlich auf iDCs exprimiert, kommen aber auch auf anderen APCs wie Makrophagen vor und sind selten auf DCs aus dem Blut oder auf Langerhans Zellen zu finden. Die CLRs setzen sich aus einem zytoplasmatischen und einem extrazellulären Anteil zusammen, die über eine transmembranöse Region verbunden sind. Der zytoplasmatische Anteil besteht je nach CLR aus unterschiedlichen Elementen, die für die Signalübertragung und Antigenaufnahme wichtig sind. Der extrazelluläre Anteil enthält eine spezielle Erkennungsregion für komplexe Zuckermoleküle, die Erkennungsregion für Kohlenhydratstrukturen

(CRD), die über zwei Kalziumbindestellen verfügt, welche essentiell für die Binde-funktion und die strukturelle Integrität der CLRs sind (Drickamer, 1999). Die Ami-nosäuresequenz der CRD hat wesentlichen Einfluss darauf, ob das jeweilige Lek-tin bevorzugt mannose-, fukose- oder galaktosereiche Zuckermoleküle bindet. Nur unter Mithilfe von Kalziumionen können die CLRs spezifische Kohlenhydratstrukturu-ren auf der Oberfläche von Pathogen erkennen und die Erreger zum lysosomalen Abbau und darauf folgender Antigenpräsentation in die DCs aufnehmen. Da über 50% der menschlichen Proteine glykosyliert sind, ist es nicht verwunderlich, dass CLRs auch Zuckerverbindungen auf Selbstantigenen erkennen und auf diese Weise Toleranzbildung, Signaltransduktion, Zelladhäsion und Zellmigration vermit-teln (s. Übersichtsarbeiten von Figdor et al., 2002; van Kooyk and Geijtenbeek, 2003; Geijtenbeek et al., 2004). Die verschiedenen CLRs unterscheiden sich ge-ringfügig in ihrem molekularen Aufbau und werden daher in Typ I und Typ II CLRs unterteilt. Typ I CLRs können über mehrere CRDs verfügen und ihr N-Terminus ist außerhalb des Zytoplasmas gelegen. Zu dieser Untergruppe gehören der Makro-phagen Mannose Rezeptor (MMR, CD206) und DEC-205 (CD205). Alle anderen CLRs gehören zum Typ II. Diese besitzen nur eine CRD und ihr N-Terminus zeigt in das Zytoplasma (s. Übersichtsarbeit von Figdor et al., 2002). **Abbildung 4** gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau der wichtigsten Typ I und Typ II CLRs.

## 1.4 Das C-Typ Lektin DC-SIGN

Curtis et al. beschrieben 1992 ein *Human immunodeficiency virus(HIV)-1 envelo-pe glycoprotein gp120 binding C-type lectin*, das sie aus der menschlichen Plazenta isoliert hatten (Curtis et al., 1992). Als eine niederländische Forschungsgruppe im Jahr 2002 eine ausführliche Beschreibung zu DC-SIGN publizierte, wurde das Protein von 1992 als ein spezifischer Rezeptor für DCs wiederentdeckt. Der Name *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin* wur-de von den Wissenschaftlern zum einen aufgrund seiner spezifischen Expression auf DCs und zum anderen wegen seiner hohen Bindungsaffinität zum interzellulären Adhäsionsmolekül (ICAM)-3 gewählt (Geijtenbeek et al., 2000c). DC-SIGN ist ein 44kDA großer Rezeptor, der zur Gruppe II der Transmembranproteine gehört.



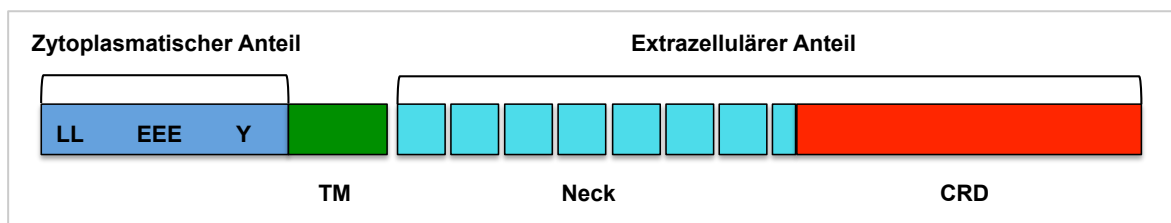
**Abbildung 4: Überblick über die wichtigsten Typ I und Typ II CLR**

Die Typ I Lektine MMR und DEC-205 verfügen über ein *Aminoterminale Cysteine-Rich Repeat* (S-S) und acht bis zehn CRDs. Die Typ II Lektine haben nur eine CRD, die sich am Carboxylende ihres extrazellulären Anteils befindet. Während die Anzahl der *Tandem Repeats* im extrazellulären Anteil von DC-SIGN immer konstant ist, variiert diese bei L-SIGN zwischen vier und zehn. **Abbildung 4** modifiziert nach Figdor et al., 2002.

Abkürzungen: BDCA-2, Blood DC Antigen-2; CLEC-1, C-type lectin-like receptor 1; CRD, Erkennungsregion für Kohlenhydratstrukturen; DCIR, dendritic cell immunoreceptor; DC-SIGN, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin; Dectin-1/-2, DC-associated C-type lectin 1 oder 2; DLEC, dendritic cell lectin; L-SIGN, liver/lymph node-specific ICAM-3-grabbing non-integrin; MMR, Makrophagen Mannose Rezeptor.

Die Gensequenz von DC-SIGN ist auf Chromosom 19p13 lokalisiert, wo sie zusammen mit Genen, die auch für L-SIGN und CD23 kodieren, eine Einheit von 105kb bildet (Soilleux et al., 2000). DC-SIGN wird in erster Linie von DCs exprimiert, ist aber in geringen Mengen auch auf Makrophagen und einer kleinen Gruppe von pDCs im Blut zu finden (Geijtenbeek et al., 2000c; Engering et al., 2002b; Soilleux et al., 2002). DC-SIGN<sup>+</sup> DCs können in der Haut, in der Schleimhaut, in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt, in der Cervix, in der Plazenta und in Lymphknoten nachgewiesen werden. DC-SIGN wird jedoch nicht auf dermalen Langerhans Zellen exprimiert (Koppel et al., 2005). Außerdem konnten zwei DC-SIGN<sup>+</sup> Vorläuferpopulationen im peripheren Blut identifiziert werden, die sich in

ihrer CD14 Expression unterscheiden (Geijtenbeek et al., 2000a). Die Struktur von DC-SIGN bilden ein zytoplasmatischer und ein extrazellulärer Anteil, die über eine transmembranöse Region verbunden sind. Der zytoplasmatische Anteil enthält wichtige Elemente für die Signalübertragung (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM/Y)) und Antigenaufnahme (*di-leucine motif* (LL) und *tri-acidic cluster* (EEE)). Der extrazelluläre Anteil besteht aus einer tetrameren CRD. Diese wird durch eine alpha-helikale Aminosäuresequenz bestehend aus sieben kompletten und einem inkompletten *Tandem Repeat*, der so genannten *Neck Region* stabilisiert (s. **Abbildung 5**). Die *Neck Region* wird außerdem für die Oligomerisierung des Rezeptors benötigt, welche die spezifische Erkennung von Kohlenhydraten ermöglicht (s. Übersichtsarbeit von van Kooyk and Geijtenbeek, 2003).



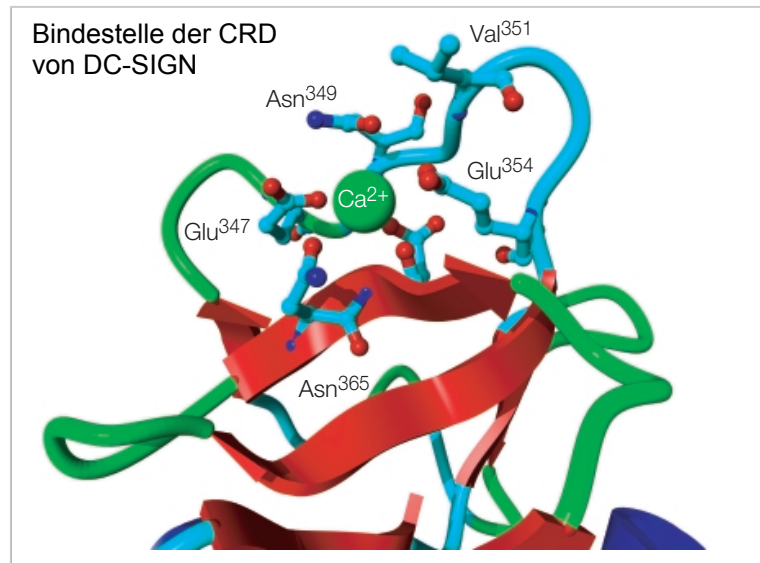
**Abbildung 5: Aufbau und Struktur von DC-SIGN**

Der extrazelluläre Anteil besteht aus der CRD und der *Neck Region*. Die transmembranöse Region teilt den extrazellulären vom intrazellulären Bereich ab, welcher aus verschiedenen Bausteinen für die Antigenaufnahme und Signalübertragung besteht. **Abbildung 5** modifiziert nach van Kooyk and Geijtenbeek, 2003.

Abkürzungen: CRD, Erkennungsregion für Kohlenhydratstrukturen; EEE, tri-acidic cluster; ITAM/Y, incomplete immunoreceptor tyrosine-based activation motif; LL, di-leucine motifs.

Der kugelförmige molekulare Aufbau der CRD Region, welcher aus **Abbildung 6** hervorgeht, wird aus 12  $\beta$ -Faltblattstrukturen, zwei  $\alpha$ -Helices und drei Disulfidbrücken gebildet und verfügt über zwei Kalziumbindestellen, welche für die räumliche Konformation der CRD und Bindung der Zuckerverbindungen essentiell sind (s. Übersichtsarbeit von van Kooyk and Geijtenbeek, 2003). Nur mit Hilfe von Kalziumionen kann die CRD Region eine selektive Bindung mit verschiedenen Oligosacchariden eingehen (Mitchell et al., 2001).

DC-SIGN ist insbesondere in cholesterin- und glycosphingolipidreichen Membranmikrodomänen (sog. *lipid rafts*) zu finden (Caparrós et al., 2006). Soll Antigen über DC-SIGN in die DC aufgenommen werden, sind für die Endozytose verschiedene Membranbestandteile wie Cholesterin, GTPasen wie Dynamine und sogenannte *clathrin-coated pits* nötig (Cambi et al., 2009).

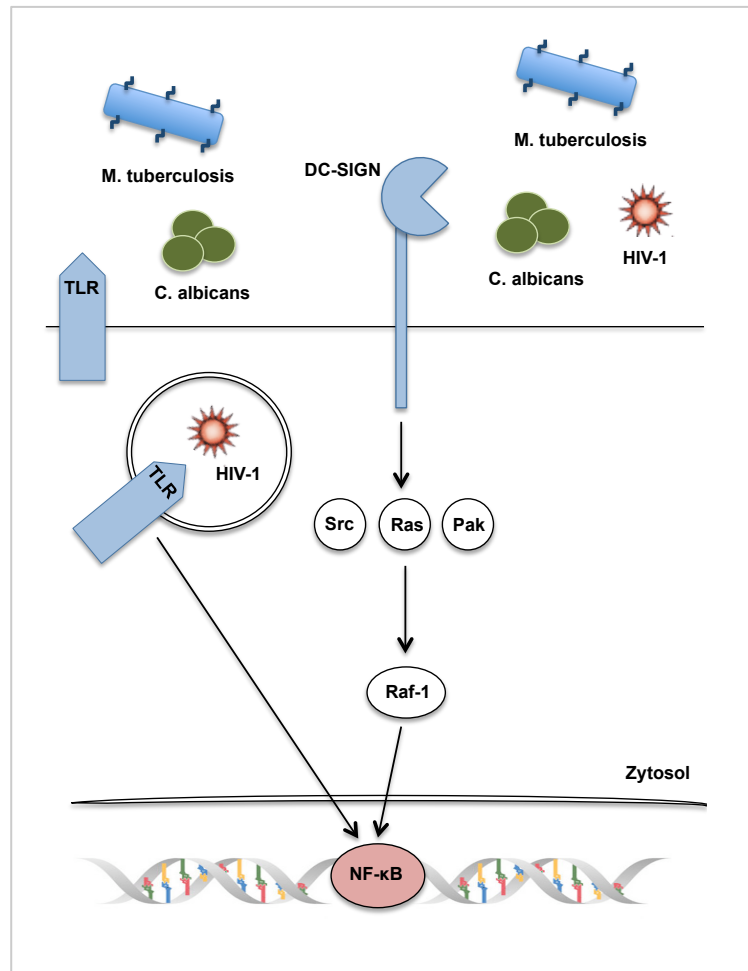


**Abbildung 6: Die räumliche Konformation der CRD von DC-SIGN**

Die CRD von DC-SIGN ist kugelförmig und wird aus 12  $\beta$ -Faltblattstrukturen, zwei  $\alpha$ -Helices und drei Disulfidbrücken gebildet. Die beiden Kalziumbindestellen sind für die räumliche Konformation und Kohlenhydratbindung essentiell. **Abbildung 6** modifiziert nach van Kooyk and Geijtenbeek, 2003.

Abkürzungen: CRD, Erkennungsregion für Kohlenhydratstrukturen; DC-SIGN, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin.

Nach der Endozytose werden die DC-SIGN-Liganden-Komplexe im späten Endosom und Lysosom voneinander getrennt, der Ligand entsprechend weiterverarbeitet, während DC-SIGN durch Rezeptorrecycling erneut zur Zelloberfläche transportiert wird (Engering et al., 2002a). Im Zellinneren werden abhängig vom jeweils gebundenen Pathogen verschiedene Signalwege aktiviert. Die Signaltransduktion von DC-SIGN geht meist mit einer Aktivierung der Serin/Threonin Kinase Raf-1 und dem Transkriptionsfaktor Kernfaktor KappaB (NF- $\kappa$ B) einher (den Dunnen et al., 2009). Die NF- $\kappa$ B Familie besteht aus mehreren Untereinheiten, wobei der Prototyp aus einem Heterodimer zwischen p65 und p50 gebildet wird und p65 die transkriptionell aktive Untereinheit darstellt. Grundlegend für das Verständnis der DC-SIGN Signalübertragungsmechanismen ist, dass DC-SIGN selbst p65 nicht aktiviert, sondern dessen Aktivität nur verändern kann, wenn p65 zuvor bereits von einem anderen Rezeptor, z.B. aus der TLR Familie aktiviert wurde (Gringhuis et al., 2007). **Abbildung 7** zeigt schematisch die Signaltransduktionswege verschiedener Pathogene, die von DC-SIGN gebunden werden.



**Abbildung 7: DC-SIGN Signaltransduktionswege verschiedener Pathogene**

Die Aktivierung von Ras führt über die Src und Pak Kinasen zur Phosphorylierung von Raf-1. Raf-1 kann dann p65 phosphorylieren und im weiteren Verlauf dessen Acetylierung initiieren, welche für die Aktivität von p65 essentiell ist. **Abbildung 7** modifiziert nach Dunnen et al., 2009.

Abkürzungen: *C. albicans*, *Candida albicans*; DC-SIGN, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin; HIV-1, Human Immunodeficiency Virus 1; *M. tuberculosis*, *Mycobacterium tuberculosis*; NF-κB, Kernfaktor kappaB; TLR, Toll-like Rezeptor.

Einem anderen Schema der Signalverarbeitung folgt der DC-SIGN Ligand Salp15, ein Protein, das im Speichel von *Ixodes scapularis* vorkommt (Anguita et al., 2002). Salp15 führt über die Bindung an DC-SIGN zwar zu einer Aktivierung von Raf-1, im weiteren Verlauf werden jedoch nicht p65 und NF-κB rekrutiert, sondern *Mitogen-activated protein kinase* Kinasen (MEK Kinasen) aktiviert. Raf-1 scheint demnach eine zentrale Rolle in der DC-SIGN Signalkaskade zu spielen. Die nachgelagerten Effektoren, welche die TLR Signaltransduktionswege und die Zytokinantworten beeinflussen, unterscheiden sich jedoch (den Dunnen et al., 2009). Caparrós et al. konnten zeigen, dass durch αDC-SIGN Antikörper *extracellular signal-regulated protein kinases* (ERKs) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) aktiviert werden, jedoch weder eine Reifung der DCs noch eine Aktivierung der Mito-

*gen-activated protein kinase* p38 ausgelöst wird (Caparrós et al., 2006). Die Bindung von HIV und DC-SIGN hingegen führt durch den Faktor LARG zu einer gesteigerten Aktivität der RhoA-GTPase, fördert die Bildung von Transfektionssynapsen zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und HIV und erhöht die Virusreplikation. Außerdem gibt es Hinweise dafür, dass HIV gebunden an DC-SIGN die Signaltransduktionswege von TLR4 beeinflusst (Hodges et al., 2007). Viele Pathogene bewirken als Liganden von DC-SIGN die Bildung T<sub>H</sub>1-supprimierender Zytokine und die Generierung einer T<sub>H</sub>2-Antwort. Zudem ist die Expression von DC-SIGN stark abhängig von der Anwesenheit verschiedener T<sub>H</sub>2-Zytokine wie IL-4 (Relloso et al., 2002). Dies führt zur Annahme, dass die Expression von DC-SIGN zum einen die Entstehung eines T<sub>H</sub>2-Milieus positiv beeinflusst und zum anderen Erreger die Funktion von DC-SIGN geschickt ausnützen. So kann die Erkennung durch das Immunsystem gezielt umgangen und die T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Balance insofern verändert werden, dass die Erreger überleben können. Außerdem bildet das T<sub>H</sub>2-Milieu optimale Bedingungen für die Etablierung chronischer Infektionen.

Analysen bezüglich der Antigenpräsentation konnten zeigen, dass Liganden von DC-SIGN auf MHC I und MHC II Molekülen präsentiert werden (Tacken et al., 2005). DC-SIGN bindet eine Reihe von körpereigenen Strukturen und spielt eine wichtige Rolle als Adhäsionsrezeptor. Seine Namensgebung entstand durch die hohe Affinität zu ICAM-3, einem Adhäsionsmolekül, das auf T-Zellen exprimiert wird, die vorübergehende Bindung zwischen T-Zellen und DCs fördert und somit die Generierung primärer Immunantworten steuert. Darüberhinaus geht DC-SIGN Bindungen mit ICAM-2 (CD102) ein. Dieses Molekül wird auf Endothelzellen exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei der transendothelialen Migration. So wird es DC-SIGN<sup>+</sup> Zellen ermöglicht, schnell auf inflammatorische Signale zu reagieren und durch das Gefäßendothel hindurch in das umgebende Gewebe einzuwandern (Geijtenbeek et al., 2000c). Die Bindung zwischen DC-SIGN und den Neutrophilenproteinen MAC-1 und CEACAM1 ist bedingt durch deren hohe Lewis<sup>x</sup> Konzentration. Dies führt nicht nur zur Reifung der DCs, sondern auch zur Generierung potenter T-Zell Antworten und beeinflusst möglicherweise sogar das Apoptoseverhalten und die Zytokinproduktion von Neutrophilen (van Gisbergen et al., 2005).

DC-SIGN erfüllt als PRR eine wichtige Funktion bei der Erkennung von zahlreichen Pathogenen und Fremdanitigenen. Es stellt einen bedeutenden Rezeptor für



verschiedene Viren wie Ebola-, Zytomegalie- (CMV), Dengue-, Marburg- und Coronaviren, sowie für das Hepatitis C Virus (HCV) und HIV dar. Hier erkennt DC-SIGN insbesondere Glykoproteine der Virushülle. HIV und HCV werden nach der Bindung an DC-SIGN in nicht-lysosomale Zellorganellen transportiert, sind dort vor dem Verdau geschützt und können so der Immunabwehr entkommen. DC-SIGN fungiert aber auch als Rezeptor für viele Bakterien. Es bindet Lewis Antigene oder mannosylierte Proteine von *Helicobacter pylori* oder gewissen Stämmen von *Klebsiella pneumoniae* (Appelmek et al., 2003; Bergman et al., 2004). Das *Mycobakterium tuberculosis* verdankt seine Affinität zu DC-SIGN dem *Mannose capped lipoarabinomannan* (ManLAM) und kann durch die Bindung dem intrazellulären Verdau entkommen und eine immunsuppressive IL-10 Antwort induzieren (Geijtenbeek et al., 2003). Der Hefepilz *Candida albicans* wird über N-Mannan von DC-SIGN gebunden (Cambi et al., 2003; Cambi et al., 2008). Die fukosylierten GalNac-beta(1-4)-GlcNac Sequenzen, sowie die Pseudo-Lewis<sup>Y</sup> oder Lewis<sup>X</sup> Antigene der Eier und Zerkarien von *Schistosoma mansoni* sind weitere Liganden von DC-SIGN. Außerdem werden die Lipophosphoglykane der amastigoten Formen von *Leishmania pifanoi* und die hohen Mannosekonzentrationen auf der Oberfläche von *Leptospira interrogans* von DC-SIGN erkannt (van Die et al., 2003; Meyer et al., 2005; Gaudart et al., 2008).

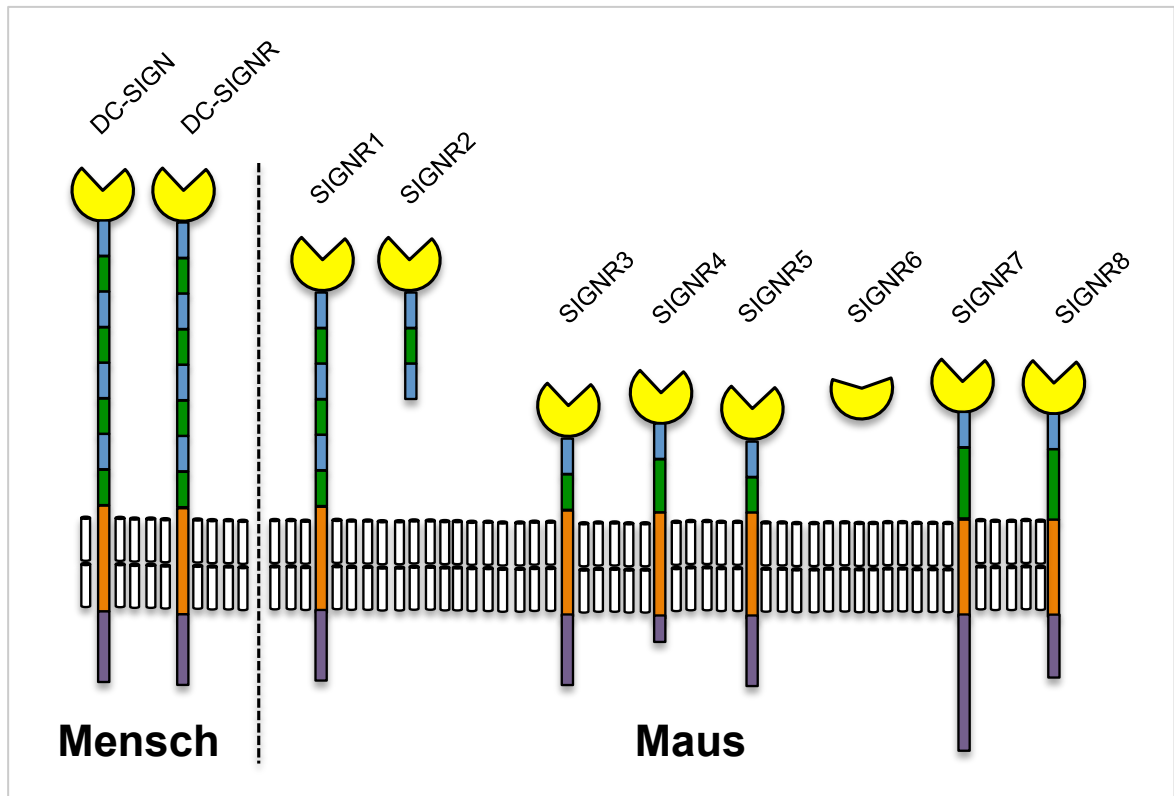
Für DC-SIGN existiert ein homologes Lektin mit der Bezeichnung L-SIGN, *DC-SIGN-related gene* (DC-SIGNR) oder CD209L (Soilleux et al., 2000; Bashirova et al., 2001). Es wird vermutet, dass die Entstehung von DC-SIGN und L-SIGN auf eine Genduplikation zurückzuführen ist, da sie in etwa 77% ihrer Aminosäuresequenzen übereinstimmen. Der wichtigste Unterschied der beiden SIGN-Moleküle liegt im extrazellulären Anteil der Rezeptoren. Während die *Neck Region* bei L-SIGN zwischen vier und zehn *Tandem Repeats* aufweisen kann, bleibt die Länge bei DC-SIGN konstant (Bashirova et al., 2001; Khoo et al., 2008). Des Weiteren kommt es durch den Austausch der Aminosäuren Val<sub>351</sub> in der Sequenz von DC-SIGN gegen Ser<sub>363</sub> in der von L-SIGN zu einem Verlust der Wechselwirkungen zwischen van-der-Waals-Kräften und der 2OH-Gruppe des Zuckers Fukose. Dies erklärt auch, warum L-SIGN keine Affinität zu Lewis<sup>X</sup> Antigenen aufweist, da diese Moleküle reich an Fukose sind (Van Liempt et al., 2004). L-SIGN bevorzugt jedoch genau wie DC-SIGN komplexe Zuckermoleküle mit hohen Konzentrationen an Mannose. L-SIGN bindet ICAM-3, HIV, HCV, Corona-, Ebola- und Dengueviren,

sowie Mykobakterien. Während DC-SIGN *Leishmania pifanoi* bindet, besitzt L-SIGN eine Affinität zu *Leishmania infantum*, dem Erreger der viszeralen Leishmaniose. L-SIGN stellt aber keinen Rezeptor für die Neutrophilen Molekülen MAC1 und CEACAM1 dar (Tassaneetrithep et al., 2003; van Gisbergen et al., 2005). Während DC-SIGN nur auf DCs exprimiert wird, ist L-SIGN auf Endothelzellen in der Leber, Plazenta, im Endometrium, Darm und in lymphatischen Organen zu finden. Die sinusoidalen Endothelzellen der Leber stellen eine Gruppe spezialisierter Endothelzellen dar, die MHCII und eine Reihe an kostimulatorischen Molekülen exprimieren und T-Zell Toleranz induzieren können (Limmer et al., 2000).

## 1.5 Generierung einer transgenen hSIGN Maus

In der Maus konnten bisher acht homologe Rezeptoren der SIGN-Familie identifiziert werden: mDC-SIGN (mSIGNR5), mSIGNR1 bis -R4 und mSIGNR6 bis -R8. Alle befinden sich auf benachbarten Genorten auf Chromosom acht. Die Neck Region der murinen SIGN-Moleküle ist kürzer als bei den humanen Formen, es gibt jedoch eine vergleichbar spezifische CRD. mSIGNR2 liegt als einziger Rezeptor in der löslichen Form vor, da diesem eine transmembranöse Region fehlt. Alle anderen sind Typ II Transmembranrezeptoren. Bei mSIGNR6 handelt es sich um ein Pseudogen (Koppel et al., 2005; Powlesland et al., 2006). **Abbildung 8** gibt einen Überblick über die SIGN-Moleküle bei Mensch und Maus und deren Struktur.

Das am intensivsten erforschte Protein ist mSIGNR1 (mCD209b), das auf Makrophagen in der Milz, in Lymphknoten und im Peritoneum, sowie auf sinusoidalen Endothelzellen in der Leber gefunden wurde und demnach am meisten Ähnlichkeiten mit L-SIGN aufweist. mDC-SIGN hingegen konnte als einziger Rezeptor auf DCs nachgewiesen werden und wird in hohen Konzentration in Milz, Lunge und Knochenmark exprimiert. Außerdem kommt er auf B-Zellen und Vorläuferzellen von pDCs vor und zeigt seiner Expression zufolge größte Ähnlichkeiten mit DC-SIGN (Caminschi et al., 2001; Geijtenbeek et al., 2002a; Koppel et al., 2005).



**Abbildung 8: Schematischer Überblick über die Struktur der murinen und humanen SIGN-Moleküle**

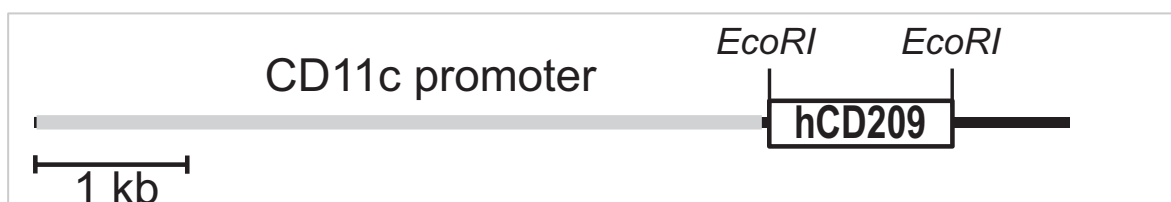
In der Maus existieren acht homologe Rezeptoren für DC-SIGN. mSIGNR2 liegt in löslicher Form vor, mSIGNR6 ist ein Pseudogen. Alle Anderen sind Transmembranproteine. Die Mitglieder der SIGN-Familie verfügen bis auf mSIGNR6 über eine spezifische CRD (im Bild gelb unterlegt) und eine Neck Region, die jedoch bei den Rezeptoren der Maus kürzer ist als bei den SIGN-Molekülen im Menschen. Schematische **Abbildung 8** modifiziert nach Koppel et al., 2005 und Powlesland et al., 2006.

Abkürzungen: DC-SIGN, Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin; DC-SIGNR, DC-SIGN-related gene; SIGNR, SIGN-related.

Über die Expression der übrigen homologen Moleküle ist bisher wenig bekannt. Obwohl es insgesamt acht SIGN-Moleküle in der Maus gibt, wurden bisher nur mSIGNR1, mSIGNR3 und mDC-SIGN auf professionellen APCs gefunden (Geijtenbeek et al., 2002a; Koppel et al., 2005).

Die Bindungseigenschaften der murinen SIGN-Moleküle wurden von Powlesland et al. sehr genau untersucht. mSIGNR1, -R3 und -R7 binden insbesondere Fucose und mit geringerer Affinität Mannose. mSIGNR5 und -R8 zeigen hingegen eine sehr hohe Affinität zu Mannose und ähneln daher L-SIGN. mSIGNR3 bindet bevorzugt komplexe Zuckermoleküle mit hohen Konzentrationen an Mannose und fukosehaltigen Oligosacchariden. Somit scheint mSIGNR3 das murine Homolog zu sein, das DC-SIGN bezüglich der Ligandenspezifität am meisten ähnelt (Powlesland et al., 2006).

*In vitro* konnte bereits gezeigt werden, dass durch spezifisches Beladen mit Antigen von DC-SIGN spezifische T-Zell Antworten induziert werden können. Diese Ergebnisse machen DC-SIGN somit zu einem vielversprechenden Rezeptor für die Entwicklung und Erprobung neuer Impfstoffe, welche auf *Targeting* Strategien basieren. Da sich die SIGN-Moleküle in der Maus aber bezüglich ihrer Expressionsmuster und Erkennung glykosylierter Zucker deutlich von DC-SIGN unterscheiden, konnte man die Maus lange Zeit nicht als Modelorganismus für *in vivo* Versuche verwenden. Vor einigen Jahren gelang es Schäfer et al., eine konventionelle transgene hSIGN Maus zu generieren. Humane komplementäre DNS (cDNA) von DC-SIGN wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease *EcoRI* unter Kontrolle des CD11c Promoters gebracht und so eine genspezifische Expression von DC-SIGN ermöglicht (Schaefer et al., 2008). **Abbildung 9** zeigt dieses transgene hSIGN Mauskonstrukt. Da CD11c als Hauptmarker von DCs bekannt ist, konnte gewährleistet werden, dass DC-SIGN in transgenen hSIGN Mäusen eine spezifische Expression nur auf DCs zeigt. Seither können im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nun auch *in vivo* die Funktionen von DC-SIGN untersucht werden.



**Abbildung 9: Struktur des transgenen hSIGN Mauskonstrukts**

Humane DC-SIGN cDNA (hCD209) wurde mit Hilfe von *EcoRI* unter Kontrolle des CD11c Promoters gebracht. Die neue Maus erhielt die Bezeichnung hSIGN (Schaefer et al., 2008).  
Abkürzung: CD, cluster of differentiation; hCD209, humanes CD209 (DC-SIGN); *EcoRI*, restriction endonuclease isolated from *E.coli*.

## 1.6 C-Typ Lektine: Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Vakzine

Die Tatsache, dass DCs zu den wichtigsten Regulatoren des Immunsystems gehören und seit geraumer Zeit schnell und einfach große Mengen von DCs aus *in vitro* Kulturen gewonnen werden können, führte dazu, dass sich die Forschung zunehmend mit dem Potential dieser Zellen auseinandersetzte und sich ihre Fähigkeiten für die Erprobung neuer und effektiverer Impfstoffe zu Nutze machte. Daher werden neue Immuntherapieverfahren, die auf DCs basieren, insbesondere

gegen Krebserkrankungen und schwerwiegende Infektionen eingesetzt. Die erste klinische Studie zu Vakzinierungen basierend auf DCs wurde 1996 veröffentlicht. Aktuell zählt die amerikanische Studiendatenbank bereits 479 Therapiestudien mit DCs (clinicaltrials.gov). Mitte 2010 erhielten die ersten Tumorstoffe basierend auf DCs ihre Zulassung von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA (Albrecht, 2011). Zurzeit bestehen Vakzine basierend auf DCs hauptsächlich aus *ex vivo* generierten Antigen beladenen DCs. Hierfür werden CD34<sup>+</sup> Vorläuferzellen oder Monozyten aus dem Blut der Patienten isoliert, mit verschiedenen Zytokinen inkubiert und mit dem gewünschten Antigen beladen. Anschließend werden sie zurück in den Patienten injiziert, um dort Antigen-spezifische T- und B-Zell Antworten zu generieren. Bisher wurden nur Patienten in die Studien mit einbezogen, die an einem schweren Tumorleiden mit schlechter Prognose erkrankt waren, sodass lediglich eine geringe Anzahl von Patienten zur Verfügung stand. Es zeigte sich aber, dass diese Methode sicher ist und von den Patienten ohne nennenswerte Nebenwirkungen gut toleriert wurde. Außerdem kann die Reifung, der Aktivierungszustand und die Anzahl der injizierten DCs genau kontrolliert werden. Das Prozedere ist jedoch sehr teuer, arbeitsaufwendig und nur einem geringen Prozentsatz von Patienten zugänglich. Zudem können ausschließlich Subtypen an DCs verwendet werden, die aus dem Blut isoliert werden können. Hinzu kommt, dass nur etwa zwei Prozent der injizierten DCs letztlich in die drainierenden Lymphknoten einwandern, um dort T-Zellen zu aktivieren (s. Übersichtsarbeit von Tacke et al., 2007).

Seit geraumer Zeit arbeitet man an einer zweiten Strategie, bei der eine Antigenaufnahme in die DCs gezielt und über an Rezeptor bindende Antikörper oder glykosylierte Moleküle angestrebt wird (s. Übersichtsarbeit von Tacke et al., 2007). Die hierfür generierten Antikörper oder Moleküle sind an Antigene gekoppelt und binden spezifisch an den jeweils gewünschten Zielrezeptor (Bonifaz et al., 2004; Singh et al., 2009; Unger et al., 2012). Bereits Mitte der 1980er Jahre wurde bekannt, dass T-Zell Antworten durch die Erkennung von Antigen über Fc-Rezeptoren auf APCs verstärkt werden können (Celis and Chang, 1984). Dies führte zu der Annahme, dass spezifisches Beladen von Oberflächenrezeptoren der APCs mit an Antikörper gekoppeltem Antigen, kurz *Targeting*, T-Zell vermittelte Immunantworten verstärken könnte. Zunächst kamen bispezifische Antikörper gegen Oberflächenmoleküle verschiedener APCs zum Einsatz (Snider and Segal,

1987; Snider et al., 1990). Mit der Identifizierung von für DCs spezifischen Rezeptoren rückte auch die Entwicklung von für DCs spezifischen Vakzinen in den Vordergrund. Viele Rezeptoren, die heute in neuen Vakzinierungsstudien verwendet werden, gehören zur Familie der CLR. Da die CLR an immunregulatorischen Prozessen wie Antigenaufnahme, Fortbewegung von DCs im Gewebe oder an der Interaktion zwischen T-Zellen und DCs beteiligt sind, wurden sie als Zielstrukturen für die Entwicklung neuer Impfstoffe zunehmend interessant (s. Übersichtsarbeit von Figdor et al., 2002). Durch die vergleichsweise einfache Produktion großer Mengen an Antikörpern ist das *Targeting* kostengünstiger und kann einem größeren Patientenkollektiv zur Verfügung gestellt werden. Außerdem kann der Vorgang im natürlichen Milieu der DCs ablaufen und die Antikörper erreichen sämtliche Subtypen an DCs in multiplen Organen. Dennoch ist die Effizienz der Methode von vielen Faktoren abhängig. Hierzu zählen z.B. das Expressionsmuster und die biologischen Eigenschaften des Zielrezeptors, der Aktivierungs- und Reifezustand der betroffenen DCs oder die Antigenverarbeitung im Zellapparat der DCs. Die Rezeptoren DEC-205, MR und DC-SIGN sind häufige Zielmoleküle experimenteller Studien. Sie spielen allesamt eine wichtige Rolle bei der Antigenaufnahme in die DCs und sind daher vielversprechende Kandidaten hinsichtlich erfolgreicher Immunisierungen (Bonifaz et al., 2002; Engering et al., 2002a; Cambi et al., 2003; Ludwig et al., 2004; Dudziak et al., 2007). So führte die Verwendung von Antikörper-Antigen-Komplexen, die sich spezifisch gegen den MR richteten, zu einer verstärkten Antigenaufnahme und Antigenpräsentation auf MHC I und MHC II Molekülen humaner DCs (Ramakrishna et al., 2004; He et al., 2007). Mäuse, die transgen für den menschlichen MR sind, wurden ebenfalls mit für den MR spezifischen Antikörpern behandelt, was zu einer deutlichen humoralen Immunantwort führte, die durch Zugabe des Adjuvans Cytosin-Guanosin Oligonukleotid (CpG)-DNA zusätzlich gesteigert werden konnte (He et al., 2007). Eine spezifische Aufnahme des Modelantigens Ovalbumin über DEC-205 Antikörper unter Zugabe des Antikörpers  $\alpha$ CD40 als Aktivierungsadjuvans führte zu starker Proliferation von OVA spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen *in vivo* (Bonifaz et al., 2004). Mahnke et al. konnten in einem B16 Melanom Mausmodell zeigen, dass die Versuchstiere durch die Injektion von  $\alpha$ DEC-205 Antikörpern, die an das Melanom Antigen *tyrosinase related protein 2* (TRP-2) gekoppelt worden waren, vor einem Wachstum des B16 Melanoms geschützt wurden. Außerdem konnten etwa 70% der Mäuse vom B16

Melanom geheilt werden, nachdem die Tiere mit  $\alpha$ DEC-205 Antikörpern gekoppelt an die Melanom Antigene TRP-2 und gp100 vakziniert worden waren (Mahnke et al., 2005).

Der spezifischste Rezeptor für DCs im Menschen ist seinem Expressionsmuster zufolge DC-SIGN. Dies hat den großen Vorteil, dass die verwendeten Antigene nur mit geringer Wahrscheinlichkeit auch von anderen Zellen aufgenommen werden und so unerwünschte Nebeneffekte und eine geringere Effizienz der Impfstoffe minimiert werden können. Bis zur Einführung eines transgenen hSIGN Mausmodells durch Schäfer et al. im Jahr 2008 war es nicht möglich, aussagekräftige *in vivo* und *in vitro* Experimente mit DC-SIGN als Zielmolekül für Vakzinierungen durchzuführen. Inzwischen konnte in einer Kooperation mit dem Labor von Carl Figdor gezeigt werden, dass DCs aus hSIGN Knochenmarkskulturen nach Inkubation mit  $\alpha$ Neck-DC-SIGN:OVA Antikörpern und frisch isolierten OTI und OTII Zellen in der Lage sind, eine starke Proliferation der OVA spezifischen T-Zellen auszulösen (Tacken et al., 2011). Hesse et al. gelang kürzlich durch die Vakzinierung von hSIGN Mäusen mit  $\alpha$ DC-SIGN:OVA Antikörpern die Induktion starker Antigen-spezifischer T-Zell Antworten *in vivo*, welche die Mäuse zusätzlich vor einer Infektion mit OVA exprimierenden *Listeria monocytogenes* schützte (Hesse et al., 2013).

## 1.7 Ziele der Arbeit

Die spezifische Aufnahme von Antigen mit Hilfe von Antikörper-Antigen-Komplexen wird zunehmend als ein vielversprechendes Vorgehen im Bereich der Vakzinentwicklung betrachtet. Sie stellt eine überlegene Alternative zur zellbasierten Methode dar, die aufwendig, kostenintensiv und zuletzt auch sehr artifiziell ist. Basierend auf den bereits publizierten und bekannten Forschungsergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen werden in dieser Arbeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die immunologischen Auswirkungen von Vakzinen analysiert, welche auf DC-SIGN spezifischen Antikörpern basieren. DC-SIGN stellt aufgrund seiner multiplen Funktionen im menschlichen Organismus und als ein spezifischer Rezeptor für DCs einen interessanten Kandidaten zur Entwicklung und Erprobung von neuen Impfstoffen dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit werden insbesondere die Eigenschaften von DCs aus Knochenmarkskulturen von WT und transgenen hSIGN Mäusen verglichen und die Qualität der GM-CSF Kulturen mit und ohne Aktivierungsstimuli beschrieben. Bis zur Einführung eines transgenen hSIGN Mausmodells durch Schäfer et al. konnten die Analysen nur mit humanen DCs *in vitro* durchgeführt werden und es existierte aufgrund mangelnder Präsenz von DC-SIGN in der Maus kein Modelorganismus. Mit der Etablierung der hSIGN Maus konnten die Analysen zum einen auf Versuche mit hSIGN transgenen DCs *in vitro* ausgeweitet werden. Zum anderen wurden *in vivo* Versuche in der Maus selbst möglich. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wird daher ein Schwerpunkt auf der Erprobung von DC-SIGN spezifischen Vakzinen in Ko-Kulturen mit T-Zellen und DCs aus hSIGN Mäusen liegen. Es werden unterschiedliche *in vitro* Daten zum Proliferationsverhalten von OVA spezifischen OTI und OTII T-Zellen in Ko-Kultur mit WT und hSIGN DCs präsentiert werden. Eine große Rolle soll die Verwendung von auf  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern basierenden Vakzinen und die Analyse der daraus resultierenden OVA spezifischen T-Zell Proliferation spielen. Dabei wird der Vergleich zwischen Kulturen mit WT und hSIGN DCs immer im Zentrum der Betrachtungen stehen. Außerdem soll dargestellt werden, wie stark die Antikörperkonzentrationen verringert werden können, um dennoch weiterhin eine potente T-Zell Proliferation auslösen zu können. Zusätzlich wird diese Arbeit zeigen, inwiefern eine Prästimulation der DCs mit verschiedenen Aktivierungsadjuvanzien wie LPS oder  $\alpha$ CD40 Antikörpern Einfluss auf die Antigenpräsentationsfähigkeit der DCs hat. Der dritte Teil der vorliegenden Arbeit wird sich hauptsächlich mit *in vivo* Versuche zum *Targeting* von DC-SIGN beschäftigen. Da es bisher nicht möglich war, die Auswirkungen von auf  $\alpha$ DC-SIGN:OVA Antikörpern basierenden Vakzinen in der Maus zu analysieren, soll die Charakterisierung der Immunantwort in der Maus genauere Aufschlüsse darüber bieten, wie  $\alpha$ DC-SIGN Vakzine die adaptive Immunantwort modulieren können.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Ausstattung

CO <sub>2</sub> -Inkubator	Binder
Elektrische Pipettierhilfe Filler 3000	Roth
FACS Calibur	Becton Dickinson
Gefrierschrank -20°C	Thermo Fisher Scientific
Gefrierschrank -80°C	Thermo Fisher Scientific
Gefriertruhe -150°C	Sanyo
Glaswaren	Roth
Kühlschrank 4°C	Kirsch
Mehrkanalpipetten	Thermo Fisher Scientific, Waltham Biorad, Hercules
Neubauer Zellzählkammer	Roth
Plastikwaren	Falcon, Greiner, Sarstedt, BD
Szintillationszähler	Wallac (1450 Micro Beta Trilux)
Vortexgerät Vortex Genie 1	Roth
Waage EMB500-1	Roth
Wasserbad WNB14	Roth
Zentrifuge, Multifuge3	Haereus

#### 2.1.2 Chemikalien

1 kb Ladepuffer GeneRuler TM	Fermentas
10 x Buffer A	Fisher Scientific
<sup>3</sup> H Thymidin	Hartmann Analytic

5-(6)-Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidyl Ester (CFSE)	Invitrogen
Agarose	Roth
Ammoniumchlorid	Sigma
Chloroform	Sigma
D-Glucose	Roth
Desoxyribonukleotid Tri-Phosphate (dNTPs), Roti-Mix <sup>®</sup> für Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Ethanol 70% und 100%	Ratiopharm/Pharmacy KR
Ethidiumbromid	Roth
Ethidiummonoazid (EMA)	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Roth
Glycerol	Roth
Heparin 25.000 I.E./5 ml	Ratiopharm
Ionomycin	Invitrogen
Isopropanol	Sigma
L-Glutamin 200 mM	Fisher Scientific
LPS	Sigma
Magnesiumchlorid	Biochrom
Methanol	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Invitrogen
Orange G	Merck
Paraformaldehyd	Ratiopharm/Pharmacy KRI
PBS, endotoxinfrei	Pharmazie KRI
Penicillin/Streptomycin 100 x	Sigma
Phenol	Roth

Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Biochrom
Potasium Hydrogencarbonat	Biochrom
Propidiumiodid	Biochrom
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
RPMI 1640 Medium	Sigma
Sodium dodecyl sulfat (SDS)	Sigma
Tris	Roth
Trypanblau Lösung (0,4 %)	Sigma
Trypsin/EDTA Lösung	Biochrom
$\beta$ -Mercaptoethanol 50mM	Roth

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

96-Vertiefungsplatte, V- und U-Boden	Greiner
Ependorfröhrchen (1 ml und 1,5 ml)	Sarstedt
FACS Röhrchen	Corning Costar
Falconröhrchen (15 ml und 50 ml)	Greiner
Filtermembran für Zell-Harvester	Perkin Elmer
Insulinspritzen	BD
Magnetsäulen	Milteny
Parafilm	Pechiney Plastic Packing
Petrischalen	Sarstedt (DC Kultur)
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	Sarstedt ungestopft, Roth gestopft
Spritzen, Nadeln	BD
Zellkulturschalen (6-, 12- und 96-Vertiefungen)	BD Falcon
Zellsiebe (70 $\mu$ m und 100 $\mu$ m)	BD Falcon

### 2.1.4 Kits

Dynal Mouse CD4 negative isolation kit      Invitrogen

Dynal Mouse CD8 negative isolation kit      Invitrogen

### 2.1.5 PCR-Primer

Gen	5' - 3' - Sequenz	Firma
DC-SIGN	- CGGGATCCGAGTGGGGTGACATGAGTGACT - - ACGCGTCGACAAAAGGGGGTGAAGTTCTGCTACG -	Eurofins MWG Operon
OTI	-AAGGTGGAGAGAGACAAAGGATTC- -TTGAGAGCTGTCTCC-	Eurofins MWG Operon
OTII	-GCTGCTGCACAGACCTACT- -CAGCTCACCTAACACGAGGA- -AAAGGGAGAAAAAGCTCTCC- -ACACAGCAGGTTCTGGGTTC-	Eurofins MWG Operon
Rag +/-	-AGACACAACGGCTTGCAACACAGTGCC- -GAGAAAGTCCTTCTGCCAGGTGGAATGAG- -TGCGAGGCCAGA-	Eurofins MWG Operon

### 2.1.6 Oligonukleotide

CpG	5' - 3' - Sequenz	Firma
1668 (Typ B)	-TCCATGACGTTCTGATGCT-	Eurofins MWG Operon

### 2.1.7 Antikörper für die FACS-Analyse

Antigen	Spezies	Isotyp	Konjugat	Verdünnungsfaktor	Firma
CD4	Maus	Ratte, IgG <sub>2b,k</sub>	APC	1:200	eBiosciences
CD4	Maus	Ratte, IgG <sub>2a,k</sub>	FITC	1:100	eBiosciences
CD4	Maus	Ratte, IgG <sub>2b,k</sub>	PE	1:200	eBiosciences

CD8 $\alpha$	Maus	Ratte, IgG <sub>2a,k</sub>	APC	1:200	eBiosciences
CD8 $\alpha$	Maus	Ratte, IgG <sub>2a,k</sub>	FITC	1:200	eBiosciences
CD8 $\alpha$	Maus	Ratte, IgG <sub>2a,k</sub>	PE	1:200	eBiosciences
CD11c (Integrin $\alpha$ -Kette)	Maus	Armenischer Hamster IgG <sub>1,<math>\lambda</math></sub>	APC	1:200	eBiosciences
CD11c (Integrin $\alpha_x$ -Kette)	Maus	Armenischer Hamster IgG <sub>1,<math>\lambda</math></sub>	PE	1:300	eBiosciences
CD86	Maus	Ratte, IgG <sub>2a,k</sub>	PE	1:200	eBiosciences
CD209 ( $\alpha$ hDC- SIGN)	Mensch	Maus, IgG <sub>2b</sub>	R-PE	1:200	R+D
I-A/I-E (MHC-II)	Maus	Ratte, IgG <sub>2a,k</sub>	FITC	1:1000	BD Bioscience
CD45.1	Maus	Maus, IgG <sub>2a,k</sub>	APC	1:200	eBiosciences
CD45.1	Maus	Ratte, IgG <sub>2a,k</sub>	PE	1:200	eBiosciences
V $\beta$ -chain tg OTI/II 5.1 5.2 T-cell Receptor	Maus	Maus, IgG <sub>1,k</sub>	PE	1:100	BD Bioscience

## 2.1.8 Proteine und Enzyme

Fetales Kälberserum (FCS)	Hyclone
GM-CSF	Eigenproduktion
Kollagenase	qb Perbio
Ovalbumin (Reinheitsgrad V)	Sigma
Platinum Taq DNA Polymerase	Invitrogen
Proteinkinase K	Invitrogen

## 2.1.9 Peptide

Name	Aminosäuresequenz	Firma
SIINFEKL OTI Peptid OVA <sub>257-264</sub>	Ser-Ile-Ile-Asn-Phe-Glu-Lys-Leu	Biosyntan
OTII Peptid OVA <sub>323-339</sub>	Ile-Se-Gln-Ala-Val-His-Ala-Ala-His- Ala-Glu-Ile-Asn-Glu-Ala-Gly-Arg	Biosyntan

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellbiologie

#### 2.2.1.1 Medium für Zellkulturen mit Dendritischen Zellen

500 ml	RPMI 1640
50 ml	Hitze inaktiviertes FCS
500 µl	2-Mercaptoethanol (50 mM)
5 ml	Penicillin/Streptomycin (100 U/ml)
5 ml	Glutamin (200 mM)

#### 2.2.1.2 Gewinnung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkskulturen

DCs lassen sich in großer Zahl aus Vorläuferzellen des murinen Knochenmarks generieren. Hierfür wurden die entsprechenden Mäuse getötet, die Oberschenkelknochen (*Femur*) und Unterschenkelknochen (*Tibia*) abgetrennt, gründlich von Muskel- und Sehnenmaterial gesäubert und mit 70% Ethanol desinfiziert. Alle folgenden Schritte wurden ausschließlich unter der Sterilbank durchgeführt. Nach der Desinfektion wurden die Knochen mit PBS gewaschen und mit Hilfe einer Schere an beiden Enden eröffnet. Das Knochenmark wurde mit einer 1 x PBS gefüllten Kanülenspritze aus dem Knochen gespült, mit einem Spritzenstempel durch ein 100 µm Zellsieb gepresst und mit PBS in ein 50 ml Falcon überführt. Nach siebenminütigem Zentrifugieren bei 1300 rpm wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet für 1 min in 1 ml Erythrozyten-Lysepuffer aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden 10 ml PBS zur Suspension hinzugefügt und diese für 7 min bei 1300 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach erneut abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium resuspendiert, um die Zellen in Trypanblauverdünnung mit Hilfe einer Neubauer Zellzählkammer zu zählen. Anschließend wurden zwei bis vier Millionen Zellen in 10 ml Kulturmedium aufge-

nommen, zusammen mit 50  $\mu$ l GM-CSF auf eine Petrischale gegeben und bei 37°C im Brutschrank bebrütet. Um ein Anheften der Zellen an der Oberfläche der Zellkulturschale und somit deren verstärkte Aktivierung zu verhindern, wurden anstatt gängiger Zellkulturschalen normale Petrischalen verwendet. Nach zwei Tagen wurden zu jeder Platte 10 ml Kulturmedium hinzugegeben. Am Tag vier nach Präparation des Knochenmarks wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, indem von jeder Platte 10 ml Suspension entnommen wurden. Diese wurden 7 min bei 1300 rpm zentrifugiert, das Pellet zusammen mit 50  $\mu$ l GM-CSF in 10 ml frischem Medium aufgenommen und auf die entsprechenden Petrischalen zurück pipettiert. Dieser Vorgang wurde am Tag sechs wiederholt. Am Kulturtag sieben wurden die Zellen gründlich von den Petrischalen abgespült und erneut mit Hilfe der Neubauer Zellzählkammer gezählt. Die Menge an DCs betrug nach siebentägiger Kultivierung zwischen fünf und zehn Millionen Zellen pro Platte. Um den Aktivierungsstatus der DCs und damit ihre unbedenkliche Verwendbarkeit zu prüfen, wurden die Zellen mit Hilfe einer FACS Analyse auf die Aktivierungsmarker und Kostimulationsmoleküle CD86 und MHCII getestet.

### **2.2.1.3 Einfrieren von Dendritischen Zellen**

Da in den Kulturen immer eine große Menge an DCs geerntet werden konnte, wurde ein Teil der DCs eingefroren. Hierfür wurden zwischen  $4 \times 10^6$  und  $6 \times 10^6$  Zellen am Kulturtag fünf resuspendiert in 500  $\mu$ l sterilem FCS und weiteren 500  $\mu$ l bestehend aus 20% DMSO und 80% FCS in speziellen Kälte beständigen Röhrchen eingefroren. Zu beachten war hierbei, dass die Zellen schrittweise zunächst für einen Tag bei -80°C und ab dem zweiten Tag bei -150°C eingefroren wurden.

### **2.2.2 Mäuse**

Die transgenen hSIGN Mäuse wurden in der eigenen Laborgruppe generiert und etabliert und waren zum Beginn dieser Forschungsarbeit bereits in einigen vorausgehenden Experimenten eingesetzt worden (Schaefer et al., 2008; Singh et al., 2009). Die OVA<sub>257-264</sub> Peptid spezifischen transgenen CD8<sup>+</sup> T-Zellrezeptor C57BL/6 OTI Mäuse, die OVA<sub>323-339</sub> CD4<sup>+</sup> Peptid spezifischen transgenen T-Zellrezeptor C57BL/6 OTII Mäuse, sowie die Rag1<sup>-/-</sup> und C57BL/6 WT Mäuse

wurden von den Charles River Laboratorien bezogen, in die eigenen Mäusezuchten aufgenommen und erfolgreich in vielen Generationen vermehrt. Die Linien Rag1<sup>-/-</sup> x OTI, Rag1<sup>-/-</sup> x OTI x CD45.1 und OTII x CD45.1 stammten aus eigener Kreuzung und Zucht. Die Mäuse befanden sich im Tierstall des TWINCORE, Zentrum für experimentelle und klinische Infektionsforschung in Hannover. Erhaltungszuchten wurden im Tierstall des Helmholtz Forschungszentrums in Braunschweig gehalten. Hier wurden die keim- und infektionsfreie Zucht und Haltung regelmäßig kontrolliert. Die Mäuse waren zu Versuchsbeginn zwischen acht und zwölf Wochen alt, gehörten sowohl dem weiblichen als auch dem männlichen Geschlecht an und waren zuvor nach standardisierten Methoden via PCR genotypisiert worden. Alle Tierversuche waren bereits im Voraus in den zuständigen Behörden angemeldet und genehmigt worden und wurden nur nach gültigen Tierversuchsrichtlinien durchgeführt.

## 2.2.3 Molekularbiologie

### 2.2.3.1 Puffer und Lösungen

#### Mix für Proteinverdau (*Kill Juice*)

50 mM Tris-HCL, pH 8,0  
100 mM NaCl  
25 mM EDTA  
0,9 % SDS

#### Phenol/Chloroform:

Phenol (Tris gepuffert), pH 8,0  
Chloroform  
Isoamyl Alkohol  
Ratio 25:24:1

#### TAE (50 x TAE):

242 g Tris  
500 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>  
100 ml Na<sub>2</sub>EDTA (0,5 M, pH 8,0)  
0,9 % SDS  
am Ende mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 L auffüllen

#### 10 x Orange G Puffer für Agarosegele:

50 mg Orange G  
500 µl Tris (1M)



15 ml Glycerol  
35 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>

**Erythrozytenlysepuffer:**

8,29 g Ammoniumchlorid  
1 g Potassium Hydrogencarbonat  
37,2 mg EDTA  
800 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> (pH 7,2 – 7,4)  
am Ende mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> auf 1 L auffüllen

**FACS Puffer:**

1% BSA in 1 x PBS

**FACS Färbepuffer:**

2% FCS in 1 x PBS

**2.2.3.2 Isolation genomischer Maus-DNS aus Gewebeproben**

Zur Isolation von genomischer Maus-DNS wurde die Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode gewählt. Ein bis zwei Millimeter lange Schwanzbiopsien wurden mit einer sterilen Schere von den Mäusen entnommen und anschließend mit 5 µl Proteinkinase K gelöst in 500 µl Proteinverdaumix im Thermoschüttler bei 55°C über Nacht zum Verdau inkubiert. Am Folgetag wurde die lösliche Phase der Proben nach kurzer Zentrifugation in 500 µl Phenol/Chloroform aufgenommen und für 25 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die obere wässrige Phase, welche die DNS enthält, wurde vorsichtig mit der Pipette aufgesaugt, in ein neues Eppendorfröhrchen gefüllt und zur DNS Ausfällung mit 1 ml 100% Ethanol versetzt. Anschließend wurden die Proben erneut für 25 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die DNS Pellets mit 300 µl 70% Ethanol gewaschen. Anschließend folgte der letzte zehnminütige Zentrifugationsschritt bei 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zunächst mindestens 30 min luftgetrocknet und abschließend zur Aufbewahrung in circa 50 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

### 2.2.3.3 Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von verschiedenen großen DNS-Fragmenten. Die Gele enthielten 1% Agarose und 0,01% Ethidiumbromid. Als Größenstandard wurden 5 µl eines 1 kb Ladepuffers verwendet. Je nach Fragmentgröße und Fragmentlänge waren unterschiedliche Laufzeiten und eine Standardstromstärke von 70 Volt nötig.

### 2.2.3.4 PCR

#### PCR Ansatz für 25 µl:

0,5 µl	10 mM dNTPs
0,5 µl	10 µM Primermix (5' und 3' Primersequenzen 10 pMol)
1,0 µl	Taq Polymerase
2,5 µl	10 x Puffer
19,5 µl	H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>
50 ng	DNS gelöst in 1 µl

Der Ablauf einer PCR folgte diesem Protokoll:

(1) 94°C	5 min
(2) 94°C	1 min
(3) 58°C	1 min
(4) 72°C	1,5 min
(5) 72°C	10 min
(6) 16°C	∞

Die Zyklen (2) bis (4) wurden in der Regel 30 bis 35 Mal wiederholt. Je nach Primerkombination und DNS-Fragmentlänge waren jedoch Änderungen der *Annealing*-Temperatur und der Extensionszeit notwendig.

## 2.2.4 Immunologie

### 2.2.4.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie können neben der Größe einer Zelle auch präzise Aussagen zur Granulierung und Präsenz von Oberflächenmarkern und intrazellulär produzierten Stoffen gemacht werden. Die Markierung der extra- und intrazellu-

lären Antigene erfolgt durch Antikörper, an die Fluoreszenzmoleküle gekoppelt sind und welche mit den anzufärbenden Zellen inkubiert werden. Während der FACS Messung passieren die Zellen in einem laminären Probenstrom einen oder mehrere Laser und können so aufgrund ihrer individuellen Lichtstreuung und Fluoreszenz analysiert werden. Die gestreute und reflektierte Strahlung des Lasers, sowie das von den Fluoreszenzfarbstoffen emittierte Licht bestimmter Wellenlängen, ermöglichen eine Analyse der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, FSC), der Granularität (Seitwärtsstreulicht, SSC) und der an der Zelloberfläche markierten Strukturen im Vergleich zu anderen gefärbten und ungefärbten Zellen. Die verwendeten Antikörper sind entweder direkt mit Fluorochromen, wie z.B. Fluorescein-5-isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC) gekoppelt oder an einen Fluorochrom markierten Sekundärantikörper gebunden. Auf einer Zelle könnten theoretisch gleichzeitig so viele Antigene bestimmt werden wie Fluoreszenzkanäle vorhanden sind.

#### **2.2.4.2 FACS-Analyse von Oberflächenmolekülen**

Die zu färbenden Zellen wurden aus Organen präpariert bzw. direkt aus der Kultur entnommen und bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen/Vertiefung in eine 96-Vertiefungs-V-Bodenplatte auf Eis transferiert. Bei Milz- und Blutproben musste zunächst eine Erythrozytenlyse durchgeführt werden. Die Zellen wurden zentrifugiert (1300 rpm, 3 min), der Überstand vorsichtig abgeschüttet und die verbleibenden Zellpellets zweimal mit je 150  $\mu$ l FACS Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 1300 rpm, 3 min). Um die Fc-Rezeptoren an der Oberfläche der Zellen zu blockieren und so eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern, wurden 50  $\mu$ l Fc-Block-Lösung ( $\alpha$ CD16/-CD32 gelöst in FACS-Puffer) aufgetragen und die 96-Vertiefungsplatte für 15 min auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden die Färbelösungen mit den verschiedenen Antikörpern vorbereitet. Nach 15 min wurden die Zellen erneut zentrifugiert (1300 rpm, 3 min), anschließend die Antikörper Mischungen aufgetragen und die Platte für 20 min im Dunkeln auf Eis gelagert. Darauf folgten zwei Waschschritten mit je 150  $\mu$ l FACS Puffer. Die Zellpellets wurden in 150  $\mu$ l FACS Puffer angereichert mit dem Lebend-Tod-Farbstoff Propidiumiodid (PI, 2  $\mu$ g/ml) resuspendiert und in FACS Röhren überführt. Die gefärbten Proben wurden am FACS Calibur eingelesen und die Daten mit Hilfe der Software FlowJo ausgewertet.

### 2.2.4.3 Protokolle für Experimente mit T-Zellen

#### 2.2.4.3.1 Isolation und CFSE Färbung von OTI und OTII T-Zellen

T-Zell Rezeptor (TCR) transgene OTI oder OTII Mäuse wurden getötet und deren Milz, sowie inguinale und axilläre Lymphknoten zur T-Zell Isolation präpariert. Zur Erstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Organe mit einem Spritzenstempel durch 100 µm Zellsiebe gepresst und anschließend mit sterilem Puffer (Puffer 1 (Bestandteil des *Dynal Mouse CD4/8 negative isolation kit*): steriles PBS, 2% FCS) nachgespült. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt und jeder Zentrifugationsschritt dauerte 7 min bei 1300 rpm. Nach Zentrifugation der erstellten Suspension wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 5 ml sterilem Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf 20 ml mit Puffer 1 aufgefüllt, um eine Zählung der Zellen in einer 1:10 Verdünnung mit Trypanblau und unter Zuhilfenahme einer Neubauer Zählkammer durchzuführen. Die restliche Zellsuspension wurde abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgesaugt, das Pellet in 10 ml Puffer 1 resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Dieser Schritt diente dem Waschen der Zellen. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 0,1 ml Puffer 1 pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert und noch bestehende Bindegewebsreste vorsichtig mit einer Pipette entfernt. Nach Zugabe von 7,5 µl Antikörper-Mix (jeweils entweder für OTI und OTII) pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die Suspension gründlich gemischt und bei 4°C für 20 min inkubiert. Mit weiteren 2 ml Puffer 1 pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die Zellsuspension verdünnt, zentrifugiert und das Pellet nach Absaugen des Überstandes in 0,8 ml Puffer 1 pro  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Für die negative Depletion wurden 75 µl pro  $1 \times 10^7$  Zellen der zuvor gewaschenen Magnetkügelchen (*engl. Magnet Beads*, ebenfalls Bestandteil des *Dynal Mouse CD4/8 negative isolation kit*) hinzugegeben und die Zell-Magnet-Lösung anschließend für 15 min bei Raumtemperatur auf der Drehvorrichtung (*engl. Rotator*) inkubiert. Danach wurde die Lösung mit Hilfe einer großen Pipette vorsichtig resuspendiert und erneut 1 ml Puffer 1 pro  $1 \times 10^7$  Zellen untergemischt. Für die magnetische Trennung waren einzelne 5 ml Suspensionen in 15 ml Falconröhrchen zu erstellen, die dann für mindestens 2 min im Magnet verweilen. Der Überstand, der nun die isolierten CD8<sup>+</sup> OTI bzw. CD4<sup>+</sup> OTII Zellen enthielt, wurde vorsichtig in ein neues 50 ml Falconröhrchen pipettiert und in einer 1:5 Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Die Zellen

wurden auf  $0,5 \times 10^6$ /ml bis  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt, in ein 15 ml Falconröhrchen überführt, auf 5 ml Gesamtvolumen mit Puffer 1 aufgefüllt und erneut abzentrifugiert. Danach war ein Einstellen der Zellen mit vollständigem RPMI Medium auf  $2 \times 10^5$ /ml nötig, um mit der CFSE Färbung fortfahren zu können. Wichtig war, dass eine kleine Menge der Zellsuspension sowohl vor als auch nach der T-Zell Isolation für eine Qualitäts- und Reinheitskontrolle via FACS abgenommen wurde (CD8 bzw. CD4 und  $\beta$ -chain 5.1.5.2). Die restliche Zellsuspension wurde erneut abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das verbleibende Zellpellet in 1 ml pro  $1 \times 10^7$  Zellen vorgewärmtem, sterilem PBS resuspendiert. Für die folgende CFSE Markierung wurde 1 ml von einem  $1,6 \mu\text{M}$  CFSE-Stock pro  $1 \times 10^7$  Zellen hinzugegeben. Die Suspension wurde anschließend für 9 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert und gelegentlich vorsichtig geschüttelt. Nach genau 9 min wurde die Zellsuspension aus dem Wasserbad genommen, mit Puffer 1 auf etwa 20 ml aufgefüllt und zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes musste das Zellpellet in 5 ml Puffer 1 resuspendiert und die Zellen in einer 1:5 Verdünnung mit Trypanblau in der Neubauer Zählkammer gezählt werden. Anschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation und für die weitere Verwendung eine Einstellung der Zellen auf  $2 \times 10^5$ /ml mit sterilem RPMI Medium. Bei dieser Färbemethode war zu beachten, dass etwa ein Drittel der Ausgangszellen durch das wiederholte Zentrifugieren verloren geht und daher zu Beginn genügend Zellen eingesetzt werden mussten. Nach der CFSE Färbung wurde erneut eine kleine Menge vom Gesamtvolumen abgenommen, um die Qualität der CFSE Färbung mittels FACS zu kontrollieren.

#### 2.2.4.3.2 Proliferationsanalyse mittels $^3\text{H}$ Thymidin Inkorporation

Bei der Proliferationsanalyse mittels  $^3\text{H}$  Thymidin Inkorporation handelt es sich um eine Methode, bei dem radioaktiv markiertes Thymidin verwendet wird und die Durchführung daher nur unter speziellen Bedingungen und Sicherheitsvorkehrungen im Radioaktivlabor stattfinden kann. Radioaktiv markiertes Thymidin lagert sich bei jedem Zellteilungszyklus in die DNS der Zellen ein und ist somit ein sehr gut geeignetes Reagenz, um Proliferationszyklen von Zellen nachzuweisen. Je größer die Proliferationsrate, desto größer wird der Anteil an messbarer Radioaktivität. Die Ko-Kulturen aus DCs und T-Zellen wurden nach drei Tagen Bebrütung für weitere 16 Stunden mit  $^3\text{H}$  Thymidin bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Am darauf folgenden

Tag wurde die Zellkultur mit Hilfe eines Zell-Harvesters ausgewertet. Hierbei wurden die Zellen mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dd}}$  aus den 96-Vertiefungsplatten gelöst, wobei die Zellfragmente und die radioaktiv markierte DNS an einer speziellen Glasfaser-Filtermembran hafteten, da nur Partikel kleiner als  $1,5 \mu\text{m}$  die Membran passieren konnten. Die Glasfaser-Filtermembranen wurden anschließend getrocknet und über Nacht die Menge an Radioaktivität (Zählimpulse pro Minute, cpm) mit Hilfe eines Szintillationszählers gemessen.

#### **2.2.4.4 *In vitro* Ko-Kulturen**

##### 2.2.4.4.1 Protokoll 1

DCs von hSIGN und WT Mäusen wurden am Kulturtag sieben geerntet, gezählt (1:2 Verdünnung mit Trypanblau für Lebend-Tod-Färbung), zentrifugiert (7 min, 1300 rpm) und in frischem RPMI Medium auf eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen verteilt ( $1 \times 10^4$  DCs pro Vertiefung). Anschließend wurden die Toll-Like Rezeptor Liganden LPS ( $2 \mu\text{g/ml}$ ) oder CpG ( $20 \mu\text{M}$ ) zu den DCs hinzugegeben. Zusätzlich wurden der Zellkultur verschiedene Konzentrationen an  $\alpha\text{hDC-SIGN:OVA}$  Antikörpern, Isotyp:OVA Antikörpern, OVA Protein (endotoxinfrei, Reinheitsgrad V), OVA<sub>257-264</sub> Peptid ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) oder OVA<sub>323-339</sub> Peptid ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) beigemischt und anschließend bei  $37^\circ\text{C}$  über Nacht bebrütet. Am Folgetag wurden die Zellkulturen vorsichtig zentrifugiert, in frisches RPMI Medium aufgenommen, mit zuvor isolierten und CFSE markierten oder unmarkierten  $\text{CD4}^+$  OTII bzw.  $\text{CD8}^+$  OTI Zellen ( $2 \times 10^4$  Zellen pro Vertiefung) inkubiert und für fünf Tage bei  $37^\circ\text{C}$  bebrütet. Am sechsten Tag erfolgte die Analyse und Auswertung der Zellproliferation mittels FACS.

##### 2.2.4.4.2 Protokoll 2

DCs von hSIGN und WT Mäusen wurden am Kulturtag sieben geerntet, gezählt (1:2 Verdünnung mit Trypanblau), zentrifugiert (7 min, 1300 rpm) und in frischem RPMI Medium auf eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen verteilt ( $1 \times 10^4$  DCs pro Vertiefung). Anschließend wurden die DCs zunächst mit  $\alpha\text{CD40}$  Antikörpern ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) inkubiert. Zusätzlich wurden der Zellkultur verschiedene Konzentrationen von entweder  $\alpha\text{hDC-SIGN:OVA}$  Antikörpern, Isotyp:OVA Antikörpern, OVA Protein (Endotoxinfrei, Reinheitsgrad V), OVA<sub>257-264</sub> Peptid ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) oder OVA<sub>323-339</sub>

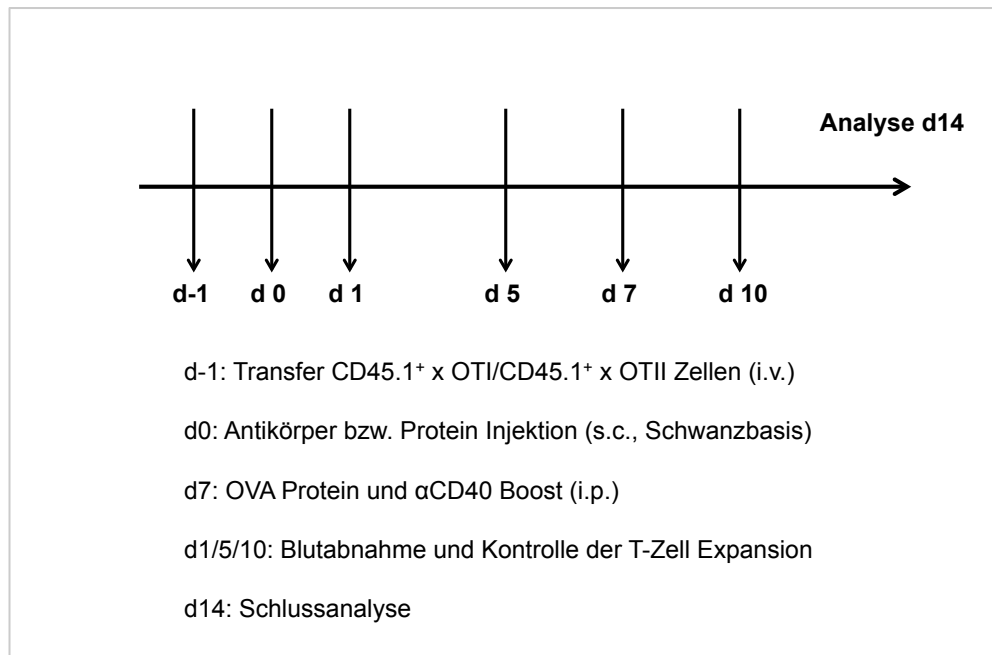
Peptid (1 µg/ml) beigemischt und die Zellkultur anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellkulturen vorsichtig abzentrifugiert, in frisches RPMI Medium aufgenommen, mit zuvor isolierten CD4<sup>+</sup> OTII bzw. CD8<sup>+</sup> OTI Zellen (2x10<sup>4</sup> Zellen pro Vertiefung) inkubiert und für drei Tage bei 37°C bebrütet. Am vierten Tag wurde der Zellkultur <sup>3</sup>H Thymidin (1 µCi pro Vertiefung) beigegeben und die Zellkultur für weitere 16 Stunden bei 37°C bebrütet. Anschließend wurde eine Analyse nach dem Thymidin Protokoll vorgenommen (s. 2.2.4.3.2 Proliferationsanalyse mittels <sup>3</sup>H Thymidin Inkorporation).

### 2.2.4.5 *In vivo* Experimente

#### 2.2.4.5.1 *Targeting* von DC-SIGN *in vivo*

Für alle *in vivo* Experimente wurden männliche und weibliche hSIGN und WT Mäuse etwa gleichen Alters verwendet. Zunächst wurden frisch isolierte CD45.1<sup>+</sup> x OTI oder CD45.1<sup>+</sup> x OTII Zellen aus Milz und Lymphknoten mit sterilem PBS auf 1x10<sup>6</sup>/ml eingestellt und anschließend ein Volumen von 200 µl (entspricht 2x10<sup>5</sup> Zellen CD45.1<sup>+</sup> x OTI oder CD45.1<sup>+</sup> x OTII) in die Schwanzvene von WT und hSIGN Mäusen injiziert (Tag -1). Am nächsten Tag (Tag 0) wurden die Mäuse s.c. mit je 5 µg pro Maus αhDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein (Endotoxinfrei, Reinheitsgrad V) vakziniert und erhielten alle zusätzlich αCD40 Antikörper (50 µg pro Maus). Am Tag sieben bekamen die Mäuse eine zusätzliche Injektion i.p. mit OVA Protein (50 µg pro Maus) und αCD40 Antikörpern (50 µg pro Maus). An den Versuchstagen eins, fünf und zehn wurde den Mäusen Blut abgenommen und mit Hilfe einer FACS-Färbung (CD8 bzw. CD4 und β-chain 5.1.5.2) die Expansion der transferierten T-Zellen überprüft. Am Tag 14 wurden die Tiere getötet und deren Milz und inguinale Lymphknoten entnommen. Zur Erstellung von Einzelzellsuspensionen wurden die Organe mit einem Spritzenstempel durch 100 µm Zellsiebe gepresst und anschließend mit sterilem Puffer (steriles PBS, 2% FCS) nachgespült. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt und jeder Zentrifugationsschritt dauerte sieben Minuten bei 1300 rpm. Nach Zentrifugation der erstellten Suspension wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 5 ml sterilem Erythrozytenlysepuffer resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in frisches steriles RPMI Medium aufgenommen. Danach folgte eine Analyse der Zellzahlen

via FACS. Die Zeitachse für die *in vivo* Versuche ist im Überblick in **Abbildung 10** dargestellt.



**Abbildung 10: Zeitschema zum Targeting von DC-SIGN *in vivo***

Abkürzungen: α, anti; CD, cluster of differentiation; d, Tag; i.v., intravenös; i.p., intraperitoneal; OVA, Ovalbumin; s.c., subkutan.

#### 2.2.4.5.2 *In vivo* Zytotoxizitätsprotokoll (*in vivo* killing assay)

Frisch isolierte CD45.1<sup>+</sup> x OTI Zellen aus Milz und inguinalen Lymphknoten wurden mit sterilem PBS auf  $1 \times 10^6$ /ml eingestellt und anschließend ein Volumen von 200  $\mu$ l (entspricht  $2 \times 10^5$  Zellen) in die Schwanzvene von WT und hSIGN Mäusen injiziert (Tag -1). Am nächsten Tag (Tag 0) wurden die Mäuse s.c. mit je 5  $\mu$ g pro Maus entweder von αhDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein (Endotoxinfrei, Reinheitsgrad V) vakziniert und erhielten alle zusätzlich αCD40 Antikörper (50  $\mu$ g pro Maus). Eine Gruppe erhielt anstatt Antikörper oder Protein lediglich PBS. Am Tag sieben wurden mehrere männliche und weibliche WT Mäuse unterschiedlichen Alters getötet, deren Milz und Lymphknoten entnommen und diese dann mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein Zellsieb gedrückt. Nach Zentrifugation der Zellsuspension (7 min bei 1300 rpm) wurde der Überstand abgeschüttet und die Zellen für 5 min bei Raumtemperatur mit Erythrozytenlysepuffer (5 ml pro 15 ml Zellsuspension) inkubiert. Zur Beendigung der Erythrozytenlyse wurden 10 ml PBS hinzugefügt, die Zellen zentrifugiert, mit endotoxinfreiem PBS gewaschen und auf  $2 \times 10^7$ /ml eingestellt. Die Zellen wurden anschließend in zwei Fraktionen



mit je gleichen Zellzahlen aufgeteilt und für 10 min bei 37°C mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen von CFSE gefärbt. Die eine Fraktion erhielt 10 µM (CFSE<sup>high</sup>), die andere 1 µM CFSE (CFSE<sup>low</sup>). Danach wurden zu beiden Fraktionen vorgekühltes RPMI Medium und 10% FCS hinzugefügt, beide Fraktionen für 5 min auf Eis gelagert, zweimal gewaschen und je in 1 ml RPMI und 10% FCS resuspendiert. Die CFSE<sup>low</sup> Fraktion wurde zusätzlich bei 37°C für 60 min mit 1 µM SIINFEKEL Peptid inkubiert (OTI spezifisches OVA Peptid), während die CFSE<sup>high</sup> Fraktion im Wasserbad bei 37°C verweilte. Die CFSE<sup>low</sup> Zellen wurden nach 60 min zweimal gewaschen, beide Fraktionen gezählt und die Zellen auf 1x10<sup>8</sup>/ml mit sterilem PBS eingestellt. Die beiden Fraktionen CFSE<sup>low</sup> und CFSE<sup>high</sup> wurden in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Schließlich wurden 200 µl von dieser 1:1 Zellsuspension in die Schwanzvenen der immunisierten und nicht immunisierten Mäuse injiziert. Idealerweise sollten pro Maus 30 bis 40 Millionen Zellen pro 200 µl injiziert werden. Nach 18 Stunden erfolgte die Analyse. Hierfür wurden die Mäuse getötet und die Verringerung der CFSE<sup>low</sup> Fraktion in der Milz und den inguinalen Lymphknoten mittels FACS gemessen und ausgewertet.

#### 2.2.4.6 Verwendete Vakzine

Vakzinname	Konzentration	gelöst in
αCD40 Antikörper	11,87 mg/ml	PBS (steril)
αhDC-SIGN:OVA Antikörper	2,75 mg/ml	PBS (steril)
Isotyp:OVA Antikörper	1,54 mg/ml	PBS (steril)
OVA Protein (Endotoxinfrei, Reinheitsgrad V, Stocklösung)	50 mg/ml	RPMI Medium (steril)

#### 2.2.5 Statistik

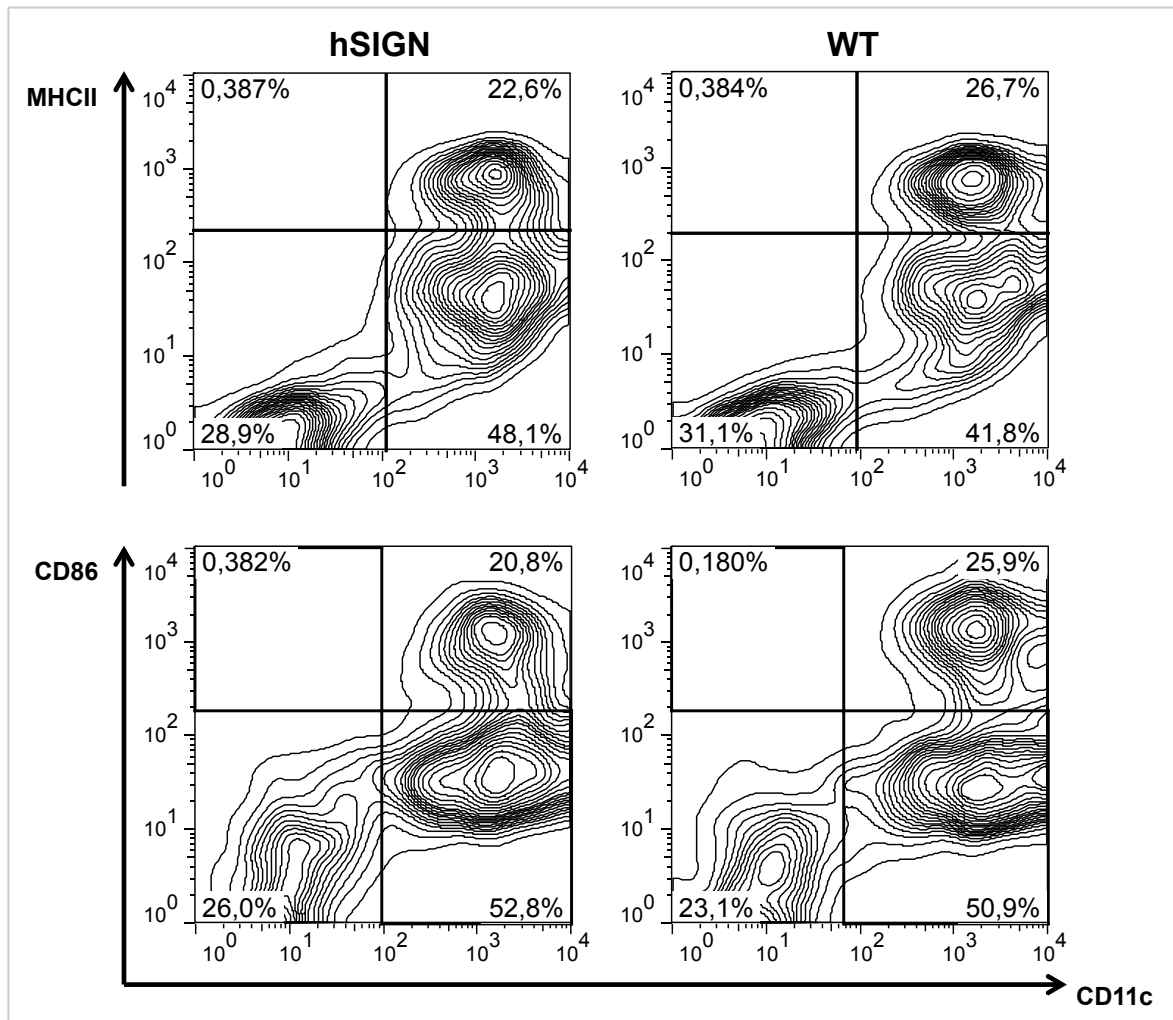
Aufgrund der kleinen Gruppengröße in den Versuchsreihen wurden keine statistischen Test berechnet. Daher erfolgte die Auswertung deskriptiv. Hierfür wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen mit Hilfe von Microsoft®Excel 2010 berechnet. Die Software FlowJo (Tree Star, Ashland, Oregon, USA) diente zur Auswertung der FACS Daten und Erstellung der FACS Graphen. Die Graphiken für den Ergebnisteil wurden mit GraphPad Prism Software Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) erstellt.

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Phänotypische Analyse von Dendritischen Zellen

Die DC Kulturen wurden nach den von Lutz et al. publizierten Empfehlungen angesetzt (Lutz et al., 1999). Die ausreichend gereiften DCs konnten nach sieben Tagen in GM-CSF Kultur geerntet werden. Um zum einen die Eignung der DCs für Ko-Kulturen zu testen und zum anderen mögliche Unterschiede im Verhalten zwischen DCs von WT und hSIGN Mäusen zu untersuchen, wurde jede Kultur mit Hilfe einer FACS Färbung auf die Aktivierungsmarker MHCII und CD86 getestet. Exemplarisch für alle angesetzten GM-CSF Kulturen wurde eine FACS Analyse zur Veranschaulichung der Ergebnisse für diese Arbeit gewählt. Hierbei zeigte sich kein Unterschied im Aktivierungszustand zwischen DCs von WT und hSIGN Mäusen. In beiden Gruppen war die Expression der Aktivierungsmarker MHCII und CD86 nach achttägiger Zellkultur gering. Unter den CD11c<sup>+</sup> Zellen der hSIGN Kultur exprimierten 23% MHCII<sup>high</sup> und 21% CD86. Bei den WT DCs lagen die Werte für MHCII<sup>high</sup> bei 27% und für CD86 bei 26% (s. **Abbildung 11**).

Um festzustellen, ob DCs von WT und hSIGN Mäusen auf Stimulation mit verschiedenen Reagenzien gleichermaßen reagieren, wurden die DCs der WT und hSIGN GM-CSF Knochenmarkskulturen am siebten Kulturtag entweder mit LPS oder CpG<sub>1668</sub> inkubiert. Die Überprüfung des Aktivierungszustandes mittels MHCII Expression am folgenden Tag nach 24-stündiger Inkubation durch FACS Analyse ergab keine wesentlichen Unterschiede zwischen WT und hSIGN DCs. Transgene hSIGN DCs zeigten bei beiden Reagenzien eine Hochregulierung von MHCII auf etwa 60%. Bei WT DCs lag die MHCII Expression etwas höher und belief sich auf 77% für LPS und 69% für CpG<sub>1668</sub> (s. **Abbildung 12**).



**Abbildung 11: FACS Analyse der unstimulierten DCs am Kulturtag acht**

DCs wurden nach achttägiger Knochenmarkskultur mit GM-CSF auf ihre Expression von CD86 und MHCII untersucht. Die Histogramme veranschaulichen die Expression von CD86 und MHCII auf lebenden CD11c exprimierenden Zellen (DCs) von hSIGN Mäusen (linke Spalte) und WT Mäusen (rechte Spalte). **Abbildung 11** zeigt exemplarisch eine FACS Färbung, wie sie identisch bei jeder GM-CSF Kultur nach acht Tagen durchgeführt wurde.

Abkürzungen: CD, cluster of differentiation; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; MHC, major histocompatibility complex; WT, Wildtyp Maus.

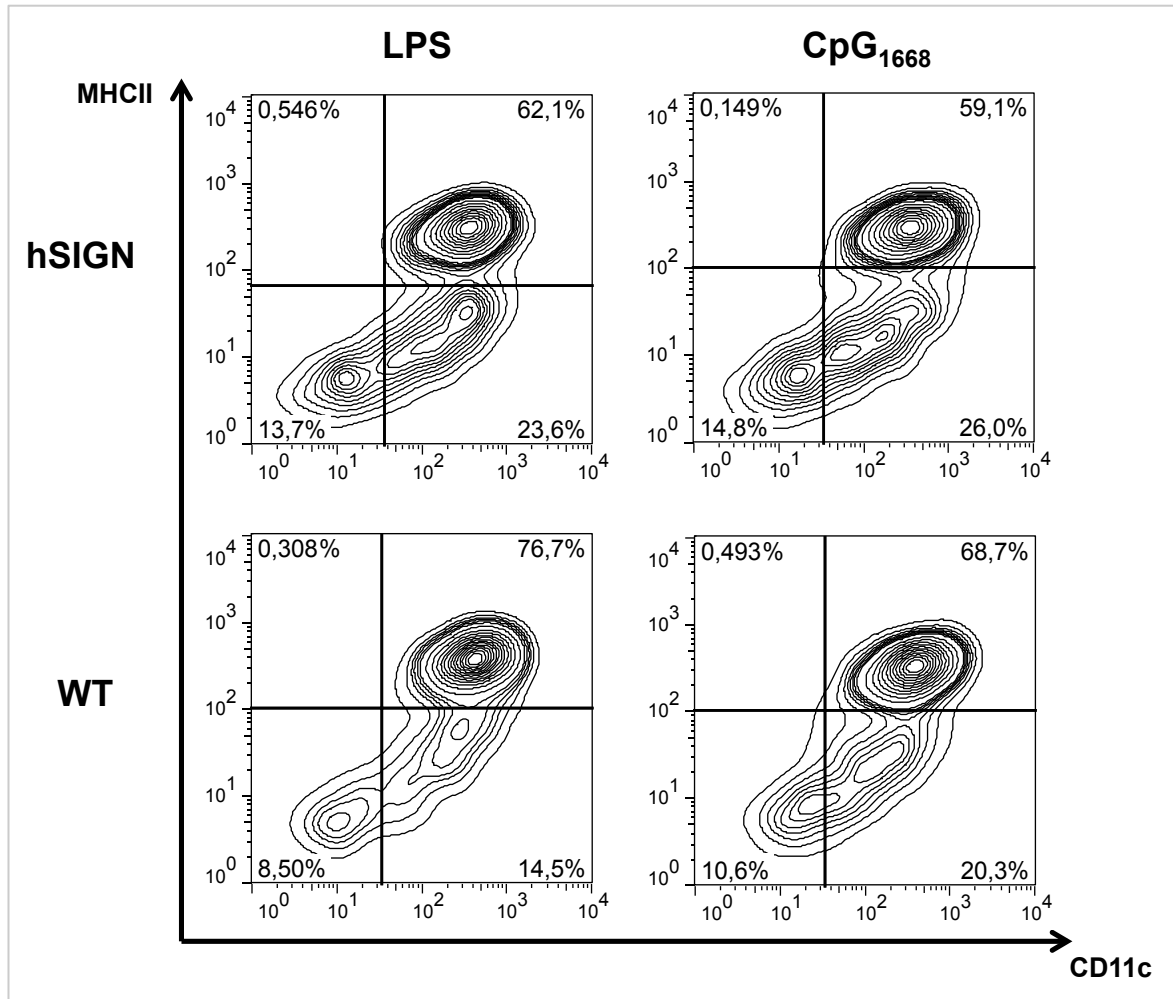
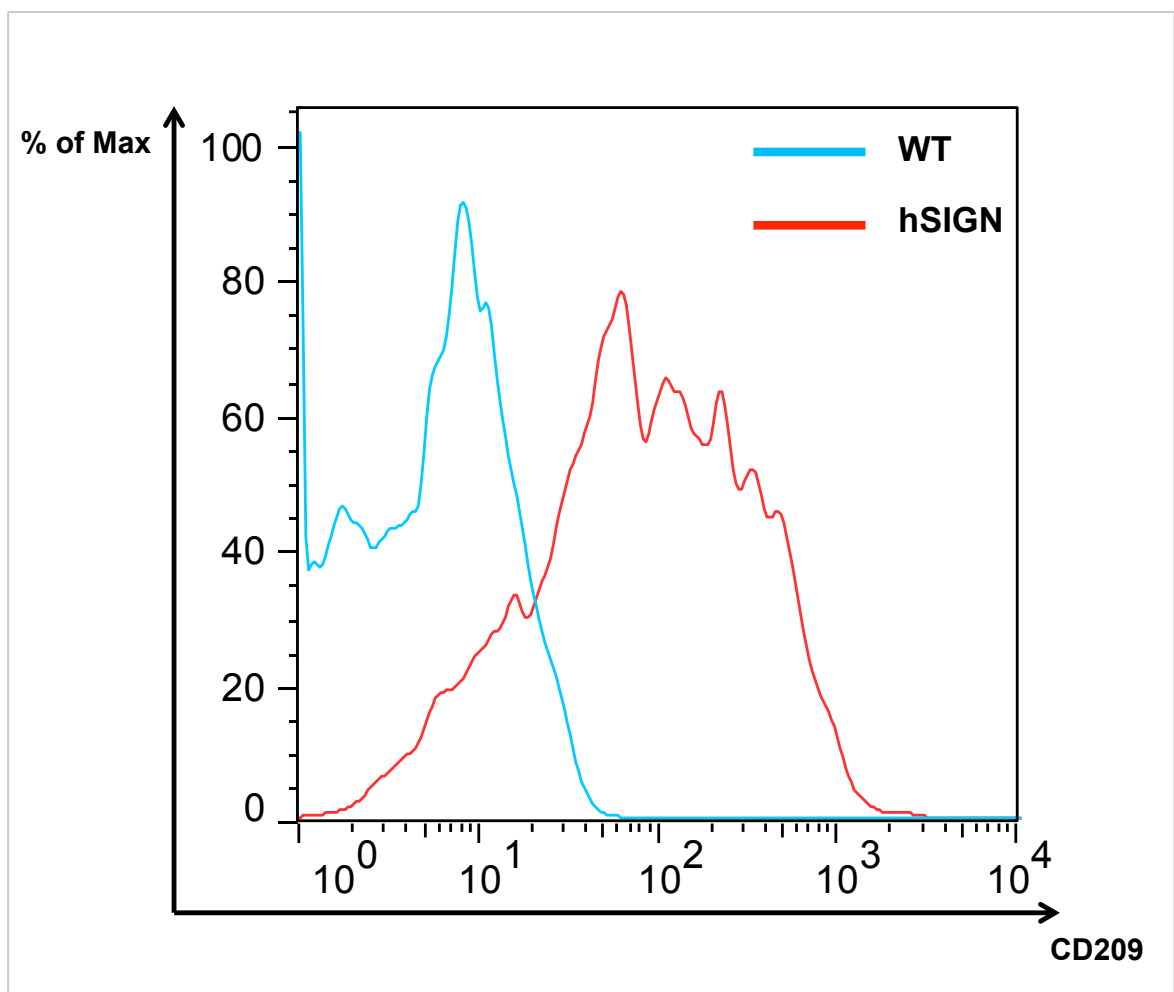


Abbildung 12: FACS Analyse der stimulierten DCs am Kulturtag acht

Nach siebentägiger GM-CSF Kultur wurden die DCs für 24 Stunden mit LPS oder CpG<sub>1668</sub> inkubiert. Die Histogramme veranschaulichen die Expression von MHCII auf lebenden CD11c exprimierenden Zellen (DCs) von hSIGN Mäusen (obere Zeile) und WT Mäusen (untere Zeile) nach Inkubation mit LPS (linke Spalte) oder CpG<sub>1668</sub> (rechte Spalte). **Abbildung 12** zeigt exemplarisch das Ergebnis, welches in drei weiteren identisch aufgebauten und unabhängig voneinander durchgeführten Zellkulturen und FACS Färbungen bestätigt werden konnte.

Abkürzungen: CD, cluster of differentiation; CpG<sub>1668</sub>, Cytosin-Guanosin Oligonukleotid; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; LPS, Lipopolysaccharid; MHC, major histocompatibility complex; WT, Wildtyp Maus.

Da es sich bei den DCs von hSIGN Mäusen um Zellen aus transgenen Tieren handelt, musste die zuverlässige und ausreichende Expression des humanen DC-SIGN auf CD11c<sup>+</sup> Zellen getestet werden. Laut vorausgegangener Forschungsarbeiten exprimieren 60% bis 70% der CD11c<sup>+</sup> Zellen nach achttägiger GM-CSF Knochenmarkskultur humanes DC-SIGN (CD209) (Schaefer et al., 2008). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Nach siebentägiger Kultur wurden die DCs aus hSIGN GM-CSF Kulturen auf ihre Expression von DC-SIGN in einer FACS Färbung getestet. Hierbei zeigte sich, dass etwa 70% der CD11c<sup>+</sup> Zellen der transgenen Mäuse humanes DC-SIGN exprimierten (s. **Abbildung 13**).



**Abbildung 13: Expression von DC-SIGN in transgenen hSIGN Mäusen**

DCs wurden nach siebentägiger Zellkultur mit GM-CSF auf ihre Expression von CD209 (humanes DC-SIGN) untersucht. Die Histogramme zeigen die Expression von CD209 (humanes DC-SIGN) auf lebenden CD11c exprimierenden Zellen (DCs) von hSIGN Mäusen (rot) und WT Mäusen (blau). **Abbildung 13** veranschaulicht exemplarisch das Ergebnis, welches in drei weiteren identisch aufgebauten und unabhängig voneinander durchgeführten Zellkulturen und FACS Färbungen bestätigt werden konnte.

Abkürzungen: CD, cluster of differentiation; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; WT, Wildtyp Maus.

### 3.2 Analyse von T-Zell Proliferation mittels CFSE Markierung

In verschiedenen Publikationen konnte bereits gezeigt werden, dass spezifisches Beladen von C-Typ Lektinen mit Antigen über Antikörper (*engl. Targeting*) die Antigenaufnahme in die DCs verstärkt. Über das Beladen von DEC-205 und dem MR konnte beispielsweise eine Präsentation von Antigenen auf MHCI und MHCII Molekülen beobachtet werden, was wiederum zu einer verstärkten und effizienteren Antigenpräsentation an T-Zellen führte (Apostolopoulos et al., 2000a; Apostolopoulos et al., 2000b; Steinman, 2000). Außerdem war in einigen Veröffentlichungen deutlich geworden, dass die Zugabe von Reagenzien, die zur Reifung von DCs führen, die Antigenpräsentation an T-Zellen noch effizienter macht (Sparwasser et al., 2000; de Vries et al., 2003; Loré et al., 2003; Bonifaz et al., 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse war es naheliegend, dass auch spezifisches *Targeting* von DC-SIGN die Antigenpräsentation an naive T-Zellen verstärken würde. In den folgenden Versuchsreihen wurden OVA Peptid (entweder Klasse I oder Klasse II) spezifische T-Zellen verwendet, da bekannt ist, dass OVA Peptide auf MHC Molekülen der DCs präsentiert werden können und dort durch die transgenen T-Zellen erkannt werden (Bonifaz et al., 2002). Um die Auswirkungen des spezifischen Beladens von DC-SIGN auf hSIGN DCs im Hinblick auf eine T-Zell Proliferation zeigen zu können, wurden WT oder hSIGN DCs mit OTI T-Zellen inkubiert. Um die DCs zur Reifung anzuregen, waren diese zuvor mit CpG<sub>1668</sub> oder LPS inkubiert worden. Außerdem wurden den Zellkulturen entweder  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörper, Isotyp:OVA Antikörper oder reines OVA Protein hinzugefügt. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die DCs mit frisch isolierten und CFSE markierten OTI T-Zellen in Ko-Kultur gesetzt. Die Auswertung am sechsten Tag nach Beginn der Ko-Kultur ergab, dass das spezifische Beladen von DC-SIGN mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern eine deutliche OTI Proliferation in Ko-Kultur mit hSIGN DCs hervorrief (s. **Abbildung 14**). Bei 0,1  $\mu$ g/ml und 1,0  $\mu$ g/ml des  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpers belief sich die Proliferation auf nahezu 100%. Dieses Ergebnis war sowohl bei Prästimulation der DCs durch CpG<sub>1668</sub> als auch durch LPS gleichermaßen festzustellen. Die WT DCs zeigten in den Proben mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern sowohl für die Ko-Kultur mit LPS als auch mit CpG<sub>1668</sub> mit

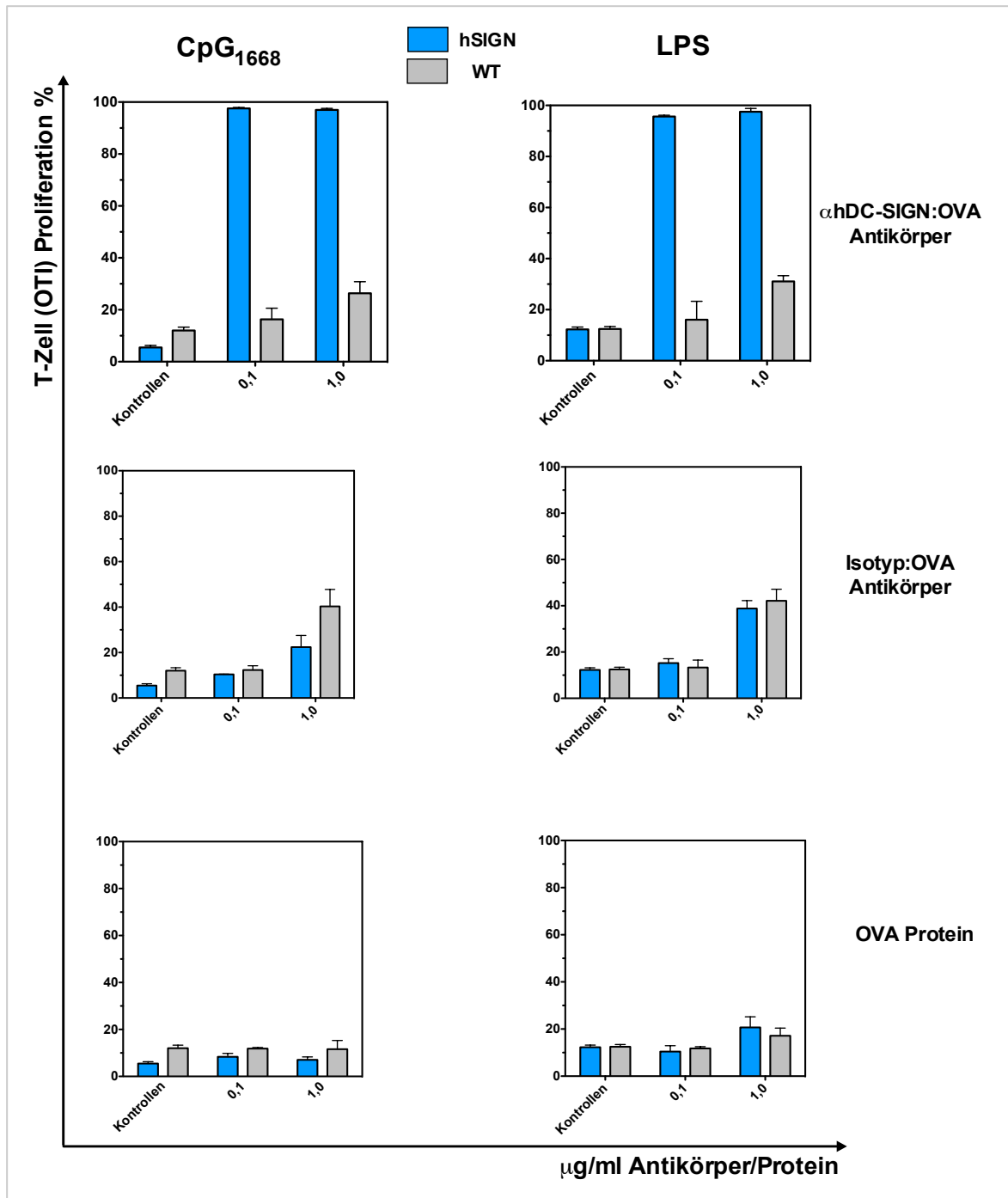
im Durchschnitt zwischen 20% und 30% eine geringere OTI Proliferation (s. **Abbildung 14**).

In Proben, welche mit Isotyp:OVA Antikörpern und OVA Protein inkubiert wurden, konnten keine Unterschiede im Proliferationsausmaß der OTI T-Zellen zwischen Ko-Kulturen mit WT und hSIGN DCs festgestellt werden. Außerdem war auch hier ersichtlich, dass es nicht relevant war, ob die Prästimulation mit LPS oder CpG<sub>1668</sub> erfolgte, da in beiden Gruppen gleiche Proliferationswerte erzielt werden konnten. Die T-Zell Proliferation blieb in den Proben, die mit Isotyp:OVA Antikörpern inkubiert worden waren, geringer und lag für 0,1 µg/ml bei maximal 15%, für 1,0 µg/ml bei maximal 40%. In den Proben mit OVA Protein proliferierten die OTI Zellen in noch geringerem Ausmaß und erreichten eine Proliferation von 10% bei 0,1 µg/ml und maximal 20% bei 1,0 µg/ml (s. **Abbildung 14**).

In einem weiteren Experiment wurde die Auswirkung des Beladens der DCs mit Antikörpern auf die T-Zell Proliferation sowohl für CD8<sup>+</sup> OTI als auch für CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen untersucht. Nach siebentägiger GM-CSF Kultur wurden WT oder hSIGN DCs mit LPS und zusätzlich entweder mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern oder Isotyp:OVA Antikörpern für 24 Stunden inkubiert. Am Folgetag wurden die DCs mit frisch isolierten und CFSE markierten OTI oder OTII T-Zellen in Ko-Kultur gesetzt. Die Analyse am Tag sechs nach Beginn der Ko-Kultur ergab für das Beladen der hSIGN DCs mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern, dass die OTI Proliferation bereits bei 0,1 µg/ml Antikörpern nahezu 100% betrug und diese durch eine Antikörpertitration in 0,25 µg/ml Schritten bis zu 1,0 µg/ml nicht mehr steigerbar war (s. **Abbildung 15, A**). Des Weiteren war ersichtlich, dass die OTII Proliferation in hSIGN Ko-Kulturen zwar geringer als die OTI Proliferation ausfiel, bei 0,1 µg/ml jedoch auch bei 57% lag und sich bei einer αhDC-SIGN:OVA Antikörperkonzentration von 1,0 µg/ml bis auf 77% erhöhte (s. **Abbildung 15, B**). Die Proliferation der OTI Zellen war bei einer Inkubation der WT DCs mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern deutlich geringer. Es zeigte sich, dass die OTI Proliferation durch die Erhöhung der Antikörperkonzentration zunahm, bei 1,0 µg/ml eingesetzten Antikörpern aber maximal eine Proliferation von 29% erreicht werden konnte (s. **Abbildung 15, A**). Für die OTII Zellen wurde bei der Inkubation der WT DCs mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern eine maximale Proliferation von 49% erreicht (s. **Abbildung 15, B**). Das Beladen der DCs mit Isotyp:OVA Antikörpern zeigte keine Un-

terschiede in der T-Zell Proliferation zwischen WT und hSIGN Ko-Kulturen. Die Proliferation der OTI und OTII T-Zellen nahm bei Erhöhung der Antikörperkonzentrationen gleichermaßen zu und steigerte sich in allen Ko-Kulturen auf maximal 60% (s. **Abbildung 15, A und B**).

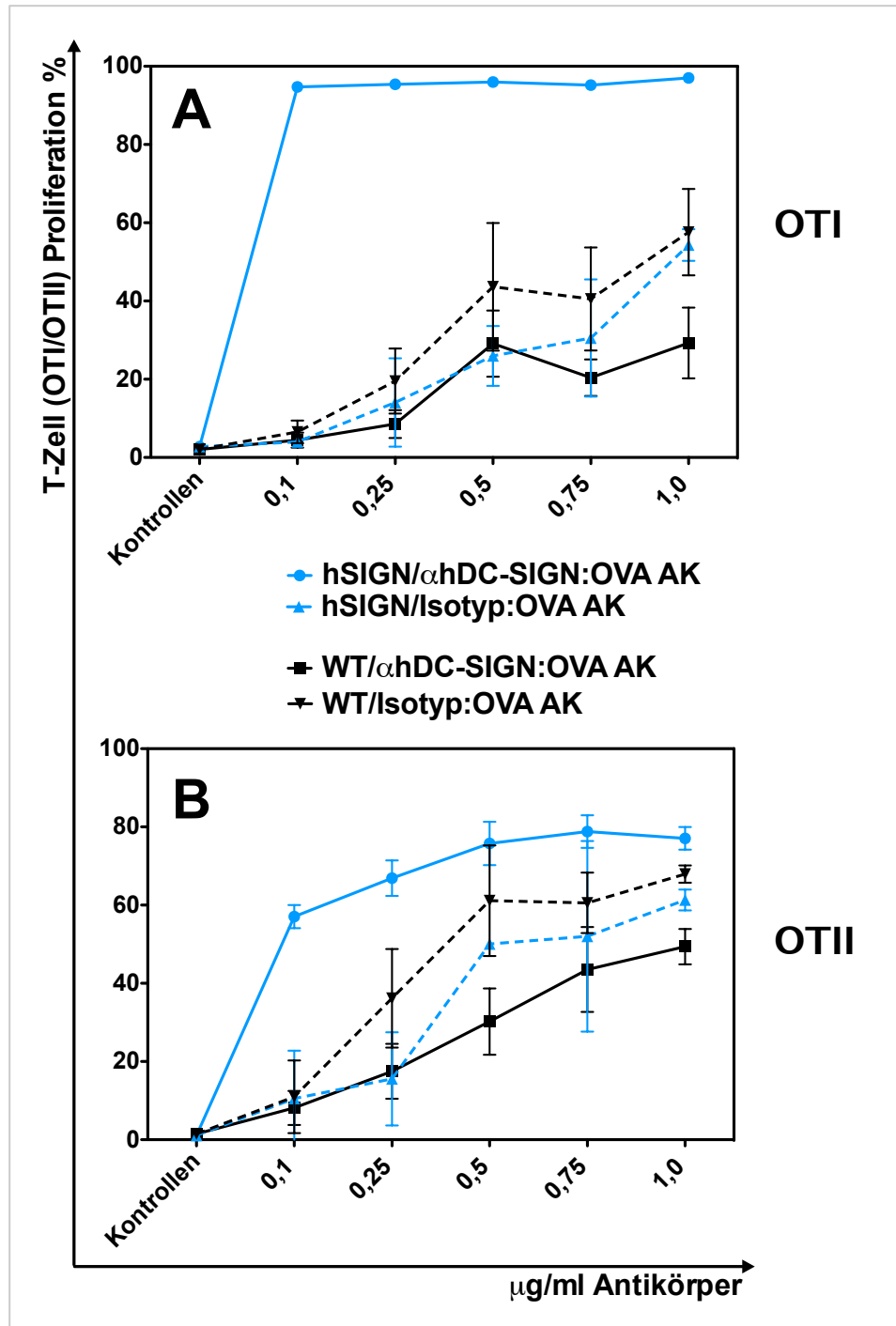




**Abbildung 14: OTI T-Zell Proliferation bei spezifischem Beladen der DCs mit Antikörpern oder Protein**

WT (graue Balken) oder hSIGN (blaue Balken) DCs wurden nach siebentägiger GM-CSF Kultur für 24 Stunden mit CpG<sub>1668</sub> (linke Spalte) oder LPS (rechte Spalte) und zusätzlich entweder mit OVA Protein (untere Zeile), Isotyp:OVA AKs (mittlere Zeile) oder αhDC-SIGN:OVA AKs (obere Zeile) inkubiert. Die Kontrollen erhielten nur LPS bzw. CpG<sub>1668</sub>. Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturen für fünf Tage mit CFSE markierten OTI T-Zellen inkubiert. Dargestellt ist die Proliferation der CFSE markierten OTI Zellen (Y-Achse) in Bezug zur Antikörper- oder Proteinkonzentration (X-Achse) bei Auswertung am Tag sechs nach Beginn der Ko-Kultur. Die verschiedenen Ansätze wurden als Triplets gemessen. Gezeigt sind repräsentativ n=3 mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus einem von zwei identisch aufgebauten und unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Abkürzungen: CpG<sub>1668</sub>, Cytosin-Guanosin Oligonukleotid; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; LPS, Lipopolysaccharid; OTI, OVA Peptid Klasse I spezifische T-Zellen; OVA, Ovalbumin; WT, Wildtyp Maus.



**Abbildung 15: OTI und OTII T-Zell Proliferation bei gezieltem Beladen der DCs mit Antikörpern**

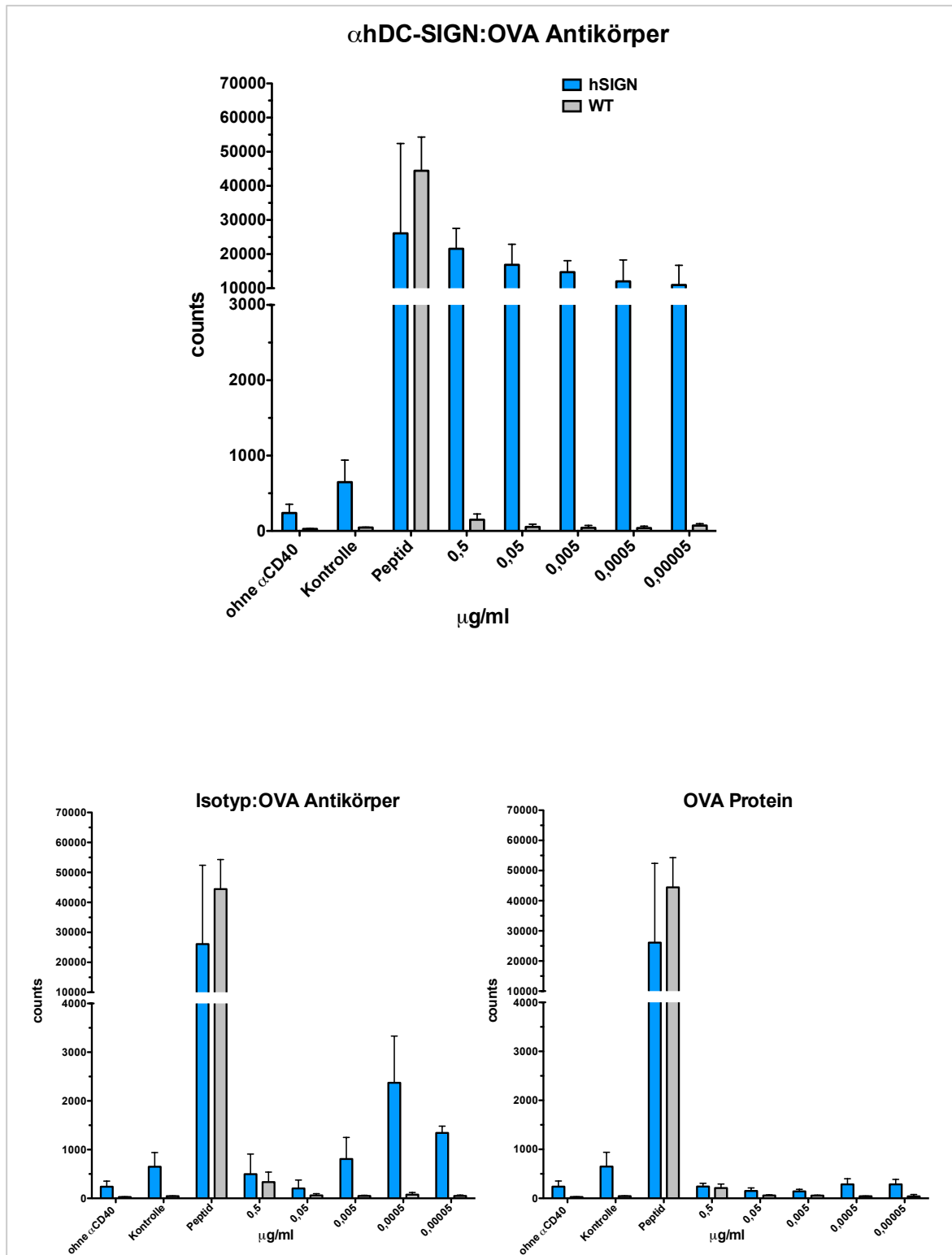
WT (schwarze Linien) oder hSIGN (blaue Linien) DCs wurden nach siebentägiger GM-CSF Kultur für 24 Stunden mit LPS und zusätzlich mit Isotyp:OVA AKs (gestrichelte Linien) oder  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA AKs (durchgezogene Linien) inkubiert. Die Kontrollen erhielten nur LPS. Nach 24 Stunden wurden die Zellkulturen für fünf Tage mit CFSE markierten A)  $CD8^+$  OTI T-Zellen oder B)  $CD4^+$  OTII T-Zellen inkubiert. Dargestellt ist die Proliferationsrate der CFSE markierten OTI bzw. OTII Zellen (Y-Achse) in Bezug zur Antikörperkonzentration (X-Achse) bei Auswertung am Tag sechs nach Beginn der Ko-Kultur. Die verschiedenen Ansätze wurden als Triplets gemessen. Gezeigt sind  $n=3$  mit Mittelwerten und Standardabweichungen aus einem durchgeführten Experiment.

Abkürzungen: AK, Antikörper; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; OTI/II, OVA Peptid Klasse I/II spezifische T-Zellen; WT, Wildtyp Maus.

### 3.3 T-Zell Proliferationsanalyse mittels Thymidin Inkorporation

Da die OTI T-Zell Proliferation bei 0,1 µg/ml αhDC-SIGN:OVA Antikörpern bei nahezu 100% lag, war es im weiteren Verlauf interessant, wie viel niedriger die Antikörperkonzentration gewählt werden kann, um weiterhin den ausgeprägten Proliferations-effekt der T-Zellen auslösen zu können. Außerdem war es aufgrund einer möglichen späteren klinischen Relevanz der Ergebnisse von größtem Interesse, die Antikörperkonzentrationen bereits *in vitro* auf ein Minimum zu reduzieren. Da sich für Proliferationsexperimente mit Ko-Kulturen im großem Maße die <sup>3</sup>H Thymidin Inkorporation eignet, wurden die Zellen in den folgenden Experimenten nicht mehr mit CFSE gefärbt, sondern mit radioaktivem <sup>3</sup>H Thymidin markiert. Nach siebentägiger GM-CSF Kultur wurden WT oder hSIGN DCs mit αCD40 Antikörpern und zusätzlich mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern, Isotyp:OVA Antikörpern oder OVA Protein inkubiert. Am Folgetag wurden die DCs mit frisch isolierten OTI oder OTII T-Zellen in Ko-Kultur gesetzt. Nach drei Tagen wurde der Ko-Kultur <sup>3</sup>H Thymidin beigegeben. Die Analyse nach 16-stündiger Inkubation mit <sup>3</sup>H Thymidin bestätigte die Ergebnisse vorausgegangener Experimenten und führte erneut zu ausgeprägter OTI Proliferation und weniger stark ausgeprägter OTII Proliferation (s. **Abbildungen 16 und 17**). Die Inkubation der hSIGN DCs mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern führte bei niedrigsten Antikörperkonzentrationen noch zu starker Proliferation der OTI T-Zellen, während in Ko-Kulturen mit WT DCs kaum OTI Proliferation nachzuweisen war (s. **Abbildung 16**). Die Proliferation der OTI T-Zellen bei Inkubation der DCs mit Isotyp:OVA Antikörpern war erneut gering. Die OTI T-Zellen in Ko-Kultur mit hSIGN DCs beladen mit Isotyp:OVA Antikörpern zeigten eine leicht gesteigerte Proliferation im Vergleich zu den Ko-Kulturen der WT DCs. In Ko-Kulturen mit OVA Protein war die OTI Proliferation sowohl mit WT als auch mit hSIGN DCs sehr niedrig (s. **Abbildung 16**). Dass die Zugabe von Reagenzien, die zur Reifung von DCs führen, die Antigenpräsentation an T-Zellen überhaupt erst ermöglicht, wurde in dieser Versuchsreihe besonders deutlich. Die Proben, die zwar mit Antikörpern oder Protein versehen wurden, jedoch keine αCD40 Antikörper erhielten, zeigten sowohl in Kultur mit WT als auch mit hSIGN DCs kaum T-Zell Proliferation (s. **Abbildung 16**). Der Effekt der verstärkten T-Zell Proliferation bei Beladen der hSIGN DCs mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern in Ko-

Kultur mit OTII T-Zellen konnte nicht in dem Ausmaß wie bei den OTI Zellen beobachtet werden. Bei  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Konzentrationen von 0,5 und 0,05  $\mu$ g/ml konnte die OTII T-Zell Proliferation in Ko-Kulturen mit hSIGN DCs im Vergleich zum WT noch gesteigert werden, war aber bereits niedriger als bei gleichen Bedingungen in den OTI Ko-Kulturen mit hSIGN DCs. Ab Antikörperkonzentrationen von 0,005  $\mu$ g/ml und niedriger war kein Unterschied mehr zwischen hSIGN und WT Ko-Kulturen bezüglich der OTII Proliferation ersichtlich (s. **Abbildung 17**). Die Kulturen, welche mit Isotyp:OVA Antikörpern oder OVA Protein angereichert worden waren, zeigten ähnliche Ergebnisse wie bereits zuvor die OTI Kulturen. Die OTII Proliferation war in Kulturen mit 0,5  $\mu$ g/ml Isotyp:OVA Antikörpern sowohl für hSIGN als auch für WT DCs erhöht, alle anderen Ko-Kulturen zeigten insgesamt eine gering ausgeprägte Zellvermehrung. Bei reinem OVA Protein blieb in allen Ko-Kulturen die Proliferation gleichermaßen auf sehr niedrigem Niveau (s. **Abbildung 17**). Auch in den Ko-Kulturen mit OTII T-Zellen wurde die Notwendigkeit einer Prästimulation der DCs mit  $\alpha$ CD40 Antikörpern ersichtlich. Ganz ähnlich wie schon bei den Versuchen mit OTI T-Zellen fand sowohl in Ko-Kultur mit WT als auch mit hSIGN DCs kaum T-Zell Proliferation statt, insofern keine  $\alpha$ CD40 Antikörper verwendet wurden (s. **Abbildung 17**).



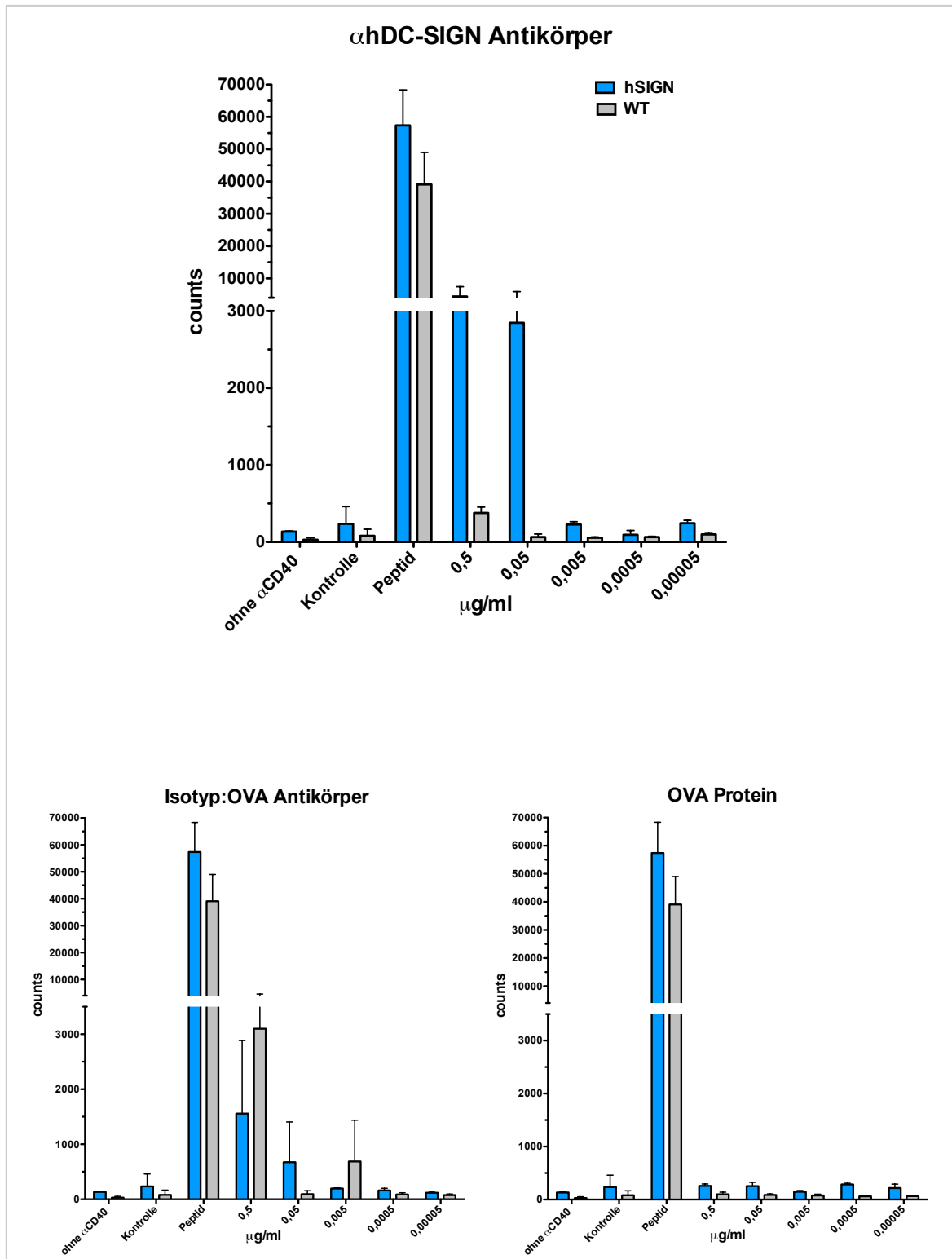
Kontrollen: DCs und T-Zellen in Ko-Kultur, nur Medium, ohne αCD40 AKs, ohne AKs oder Protein  
 Ohne αCD40: DCs und T-Zellen in Ko-Kultur, ohne αCD40 AKs, mit AKs oder Protein  
 Peptid: SIINFEKL OTI Peptid (OVA<sub>257-264</sub>)

**Abbildung 16: OTI T-Zell Proliferation bei Targeting von DC-SIGN *in vitro***

WT (graue Balken) oder hSIGN (blaue Balken) DCs wurden nach siebentägiger GM-CSF Kultur für 24 Stunden mit αCD40 AKs und zusätzlich entweder mit OVA Protein, Isotyp:OVA AKs oder αhDC-SIGN:OVA AKs inkubiert. Am Folgetag wurden CD8<sup>+</sup> OTI T-Zellen hinzugegeben. Nach drei Tagen erfolgte eine radioaktive Markierung mit <sup>3</sup>H Thymidin und nach weiteren 16 Stunden eine

Auswertung mittels eines Szintillationszählers. Dargestellt ist die Proliferation der  $^3\text{H}$  Thymidin markierten OTI Zellen in Counts (Y-Achse) in Bezug zur Antikörper- oder Proteinkonzentration (X-Achse) bei Auswertung am Tag fünf nach Beginn der Ko-Kultur. Die verschiedenen Ansätze wurden als Triplets gemessen. Gezeigt sind repräsentativ  $n=3$  Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem von zwei identisch aufgebauten und unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Abkürzungen: AK, Antikörper; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; OVA, Ovalbumin; WT, Wildtyp Maus.



Kontrollen: DCs und T-Zellen in Ko-Kultur, nur Medium, ohne αCD40 AKs, ohne AKs oder Protein Stimulus  
 Ohne αCD40: DCs und T-Zellen in Ko-Kultur, ohne αCD40 AKs, mit AKs oder Protein Stimulus  
 Peptid: OTII Peptid (OVA<sub>323-339</sub>)

**Abbildung 17: OTII T-Zell Proliferation bei Targeting von DC-SIGN *in vitro***

WT (graue Balken) oder hSIGN (blaue Balken) DCs wurden nach siebentägiger GM-CSF Kultur für 24 Stunden mit αCD40 AKs und zusätzlich entweder mit OVA Protein, Isotyp:OVA AKs oder αhDC-SIGN:OVA AKs inkubiert. Am Folgetag wurden CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen hinzugegeben. Nach drei Tagen erfolgte eine radioaktive Markierung mit <sup>3</sup>H Thymidin und nach weiteren 16 Stunden

eine Auswertung mittels eines Szintillationszählers. Dargestellt ist die Proliferation der  $^3\text{H}$  Thymidin markierten OTII Zellen in Counts (Y-Achse) in Bezug zur Antikörper- oder Proteinkonzentration (X-Achse) bei Auswertung am Tag fünf nach Beginn der Ko-Kultur. Die verschiedenen Ansätze wurden als Triplets gemessen. Gezeigt sind repräsentativ  $n=3$  Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem von zwei identisch aufgebauten und unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten.

Abkürzungen: AK, Antikörper; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; OVA, Ovalbumin; WT, Wildtyp Maus.



### 3.4 Das Humane DC-SIGN als Zielstruktur von Vakzinen *in vivo*: Analyse von T-Zell Antworten im hSIGN Mausmodell

Forscher an der Rockefeller Universität und an der Mount Sinai School of Medicine in New York konnte bereits 2004 zeigen, dass das Beladen des Rezeptors DEC-205 mit spezifischem Antigen *in vivo* nicht nur zu einer Reifung von DCs führt, sondern auch die MHC Präsentation verstärkt und somit in erhöhtem Maße CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert (Bonifaz et al., 2002; Bonifaz et al., 2004). Basierend auf dieser Grundlage und den zuvor beschriebenen *in vitro* Daten dieser Arbeit war zu erwarten, dass der Effekt der verstärkten T-Zell Aktivierung auch bei spezifischem *Targeting* von DC-SIGN *in vivo* eintreten würde. Um dies festzustellen, wurde eine *in vivo* Versuchsreihe begonnen, die sich in der Methodik eng an die Arbeiten von Bonifaz et al. anlehnte (Bonifaz et al., 2004).

Hierfür wurden CD45.1<sup>+</sup> x OTI oder CD45.1<sup>+</sup> x OTII T-Zellen in die Versuchstiere injiziert, die Tiere zusätzlich mit  $\alpha$ CD40 Antikörpern und entweder  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein vakziniert und im Verlauf die Expansion der transferierten CD45.1<sup>+</sup> x OTI oder CD45.1<sup>+</sup> x OTII T-Zellen mit Hilfe von Blutanalysen verfolgt. Die CD45.1<sup>+</sup> x OTI oder CD45.1<sup>+</sup> x OTII T-Zellen eignen sich für *in vivo* Versuche dieser Art im Besonderen, da sie in späteren Organanalysen durch ihren zusätzlichen Marker von tiereigenen T-Zellen unterschieden werden können. Hierbei zeigte sich für CD45.1<sup>+</sup> x OTI T-Zellen in hSIGN Mäusen, die mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern immunisiert worden waren, eine starke Proliferation, die sich von Tag eins auf Tag fünf deutlich erhöhte und Spitzenwerte von bis zu 60% erreichte. Trotz einer zusätzlichen Stimulation mit  $\alpha$ CD40 Antikörpern und OVA Protein (*engl. Boost*) am Tag sieben, konnte die Proliferation der CD45.1<sup>+</sup> x OTI T-Zellen bis zum zehnten Tag nicht weiter gesteigert werden und die Anzahl der CD45.1<sup>+</sup> x OTI Zellen nahm wieder bis auf unter 20% ab (s. **Abbildung 18**). In den Kontrollgruppen der WT Mäuse, denen OVA Protein oder  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörper injiziert worden waren, erhöhte sich die CD45.1<sup>+</sup> x OTI T-Zell Proliferation ebenfalls. Die Gruppe mit OVA Protein erreichte jedoch nur eine Zellvermehrung bis zu 30% und auch die Proliferation in WT Mäusen mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern blieb bei unter 20%. Bis zum Tag zehn verringerte sich in allen Kontrollgruppen die T-Zell Proliferation auf unter 20% und auch hier schien der *Boost*

am Tag sieben wirkungslos zu bleiben (s. **Abbildung 18**). Wildtyp Mäuse, denen lediglich PBS injiziert wurde, zeigten keine CD45.1<sup>+</sup> x OTI T-Zell Proliferation zwischen Tag eins und zehn.

In transgenen hSIGN Mäusen konnte durch spezifisches Beladen von DC-SIGN die Proliferation der CD45.1<sup>+</sup> x OTII T-Zellen bis Tag fünf nur minimal gesteigert werden und blieb mit maximal 2,7% deutlich unter den Spitzenwerten, die *in vivo* von den OTI Zellen erreicht worden waren. Außerdem unterschied sich die Proliferation der CD45.1<sup>+</sup> x OTII T-Zellen in den Kontrollgruppen der WT Mäuse mit OVA Protein und  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern nur geringfügig von den Werten der hSIGN Mäuse. Auch hier zeigte der *Boost* am Tag sieben keine Wirkung und in allen Gruppen verringerte sich die T-Zell Anzahl bis Tag zehn auf Werte unter 1%. Bei WT Mäusen, denen PBS injiziert worden war, konnte keine CD45.1<sup>+</sup> x OTII T-Zell Proliferation festgestellt werden (s. **Abbildung 19**).

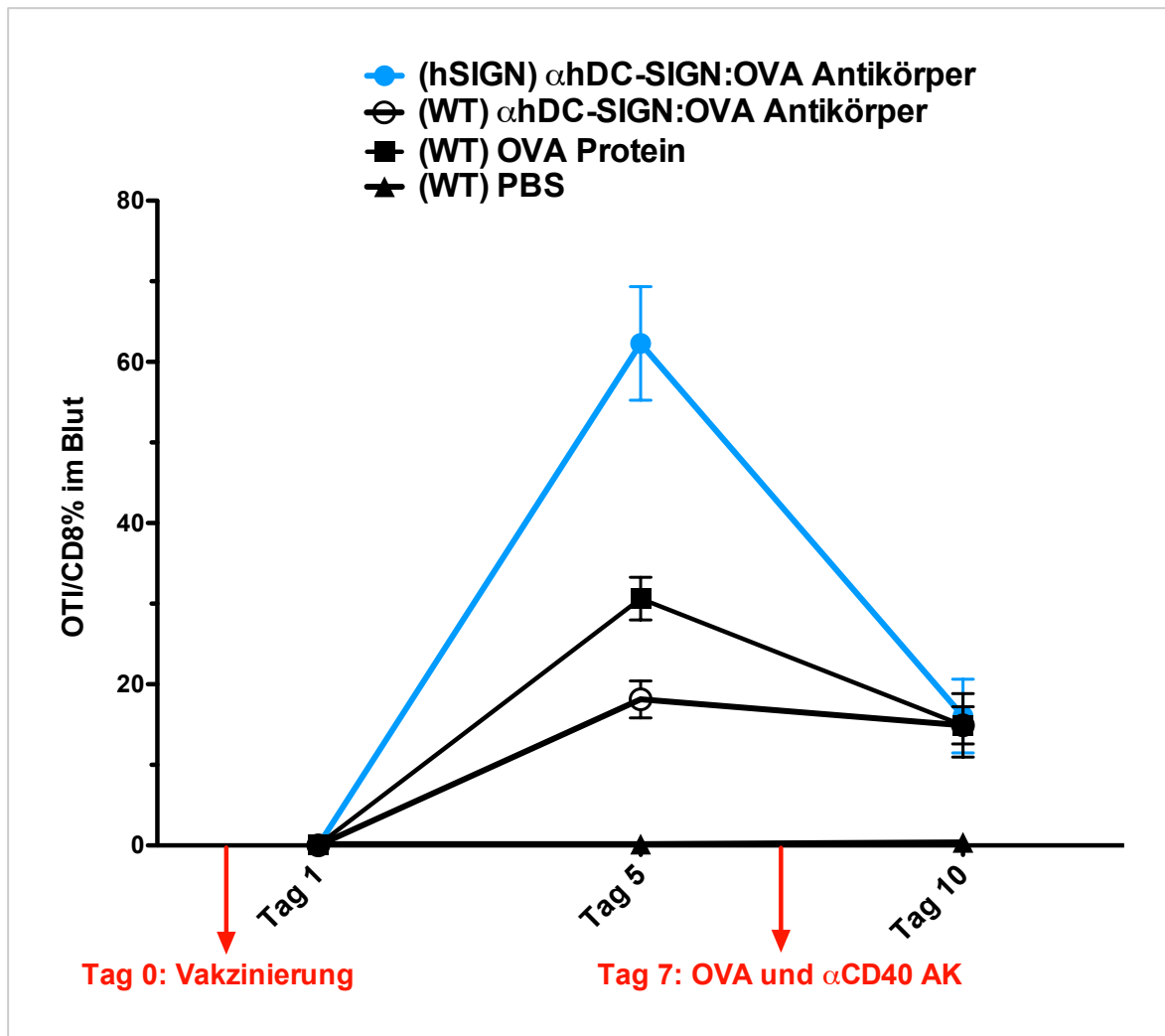


Abbildung 18: Proliferation transferierter CD45.1<sup>+</sup> x OTI Zellen *in vivo*

Es wurden CD45.1<sup>+</sup> x OTI aus den Lymphknoten von CD45.1<sup>+</sup> x OTI Mäusen isoliert und die Zellen i.v. in hSIGN und WT Mäuse injiziert. Am Tag 0 wurden die Mäuse s.c. mit αhDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein vakziniert und erhielten alle zusätzlich αCD40 Antikörper. Eine Gruppe erhielt nur PBS. Am Tag sieben wurde eine Injektion i.p. mit OVA Protein und αCD40 Antikörpern durchgeführt. An den Tagen eins, fünf und zehn wurde den Mäusen Blut entnommen und die Zellen mit FACS Antikörpern für CD8 und CD45.1. gefärbt. Die Graphik zeigt die Entwicklung der Proliferation der CD45.1<sup>+</sup> x OTI Zellen im Blut (Y-Achse) über zehn Tage (X-Achse). Gezeigt sind repräsentativ Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem von zwei identisch aufgebauten und unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die hSIGN Gruppe bestand aus vier Mäusen, die WT Gruppen zu je aus zwei Mäusen.

Abkürzungen: AK, Antikörper; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; OVA, Ovalbumin; PBS, Phosphate-buffered saline; WT, Wildtyp Maus.

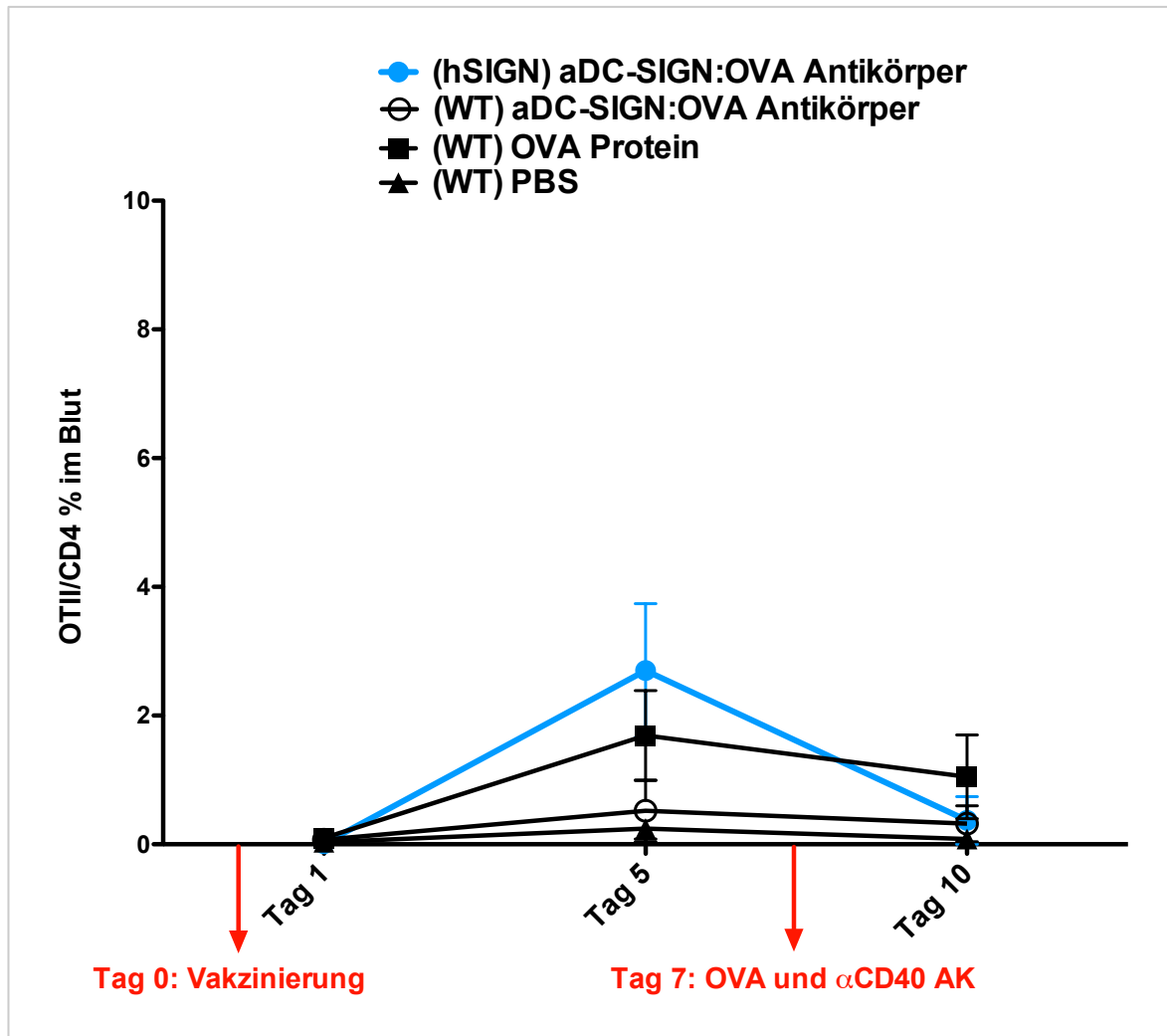


Abbildung 19: Proliferation transferierter  $CD45.1^+$  x OTII Zellen *in vivo*

Es wurden  $CD45.1^+$  x OTII aus den Lymphknoten von  $CD45.1^+$  x OTII Mäusen isoliert und die Zellen i.v. in hSIGN und WT Mäuse injiziert. Am Tag 0 wurden die Mäuse s.c. mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein vakzinert und erhielten alle zusätzlich  $\alpha$ CD40 Antikörper. Eine Gruppe erhielt nur PBS. Am Tag sieben wurde eine Injektion i.p. mit OVA Protein und  $\alpha$ CD40 Antikörpern durchgeführt. An den Tagen eins, fünf und zehn wurde den Mäusen Blut entnommen und die Zellen mit FACS Antikörpern für CD4 und CD45.1. gefärbt. Die Graphik zeigt die Entwicklung der Proliferation der  $CD45.1^+$  x OTII Zellen im Blut (Y-Achse) über zehn Tage (X-Achse). Gezeigt sind repräsentativ Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem von zwei identisch aufgebauten und unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. Die hSIGN Gruppe bestand aus vier Mäusen, die WT Gruppen zu je aus zwei Mäusen.  
Abkürzungen: AK, Antikörper; hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; OVA, Ovalbumin; PBS, Phosphate-buffered saline; WT, Wildtyp Maus.

### 3.5 Funktionelle Analyse der zytotoxischen Aktivität nach Vakzinierung

Um zu überprüfen, ob die proliferierten CD8<sup>+</sup> OTI Zellen *in vivo* über eine zytotoxische Funktion verfügen, sollten in einem weiteren Experiment die Auswirkungen von spezifischem DC-SIGN *Targeting* im Zytotoxizitätsprotokoll untersucht werden. Hierfür wurden erneut CD45.1<sup>+</sup> x OTI T-Zellen in die Versuchstiere injiziert und die Tiere zusätzlich mit  $\alpha$ CD40 Antikörpern und entweder  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein vakziniert. Sieben Tage nach Vakzinierung wurden CFSE markierte WT Zellen in die vakzinierten Versuchstiere injiziert. Diese Zellen waren zuvor entweder zusätzlich mit SIINFEKL Peptid inkubiert worden (CFSE<sup>low</sup>) oder nur CFSE markiert (CFSE<sup>high</sup>). Die finale Analyse erfolgte am Tag acht und 18h nach Injektion der CFSE markierten WT Zellen. Sowohl in der Milz, als auch in den inguinalen Lymphknoten aller Versuchstiere zeigte sich eine Verringerung der CFSE<sup>low</sup> Fraktion, die am stärksten in den hSIGN Mäusen ausgeprägt war, welche zuvor mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern immunisiert worden waren. Hier verringerte sich die CFSE<sup>low</sup> Fraktion auf 6,4% in der Milz und 6,0% in den inguinalen Lymphknoten. In den WT Mäusen mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern lagen die Werte bei 15,1% in der Milz und 7,8% in den inguinalen Lymphknoten. WT Mäuse, die mit OVA Protein vakziniert worden waren, zeigten eine Reduktion der CFSE<sup>low</sup> Zellen auf 24% in der Milz und 9,1% in den inguinalen Lymphknoten (s. **Abbildungen 20 und 21**). In den **Abbildungen 20 und 21** sind in Abschnitt A jeweils Auszüge aus den originalen FACS Graphen zu sehen, Abschnitt B zeigt jeweils die graphische Auswertung.

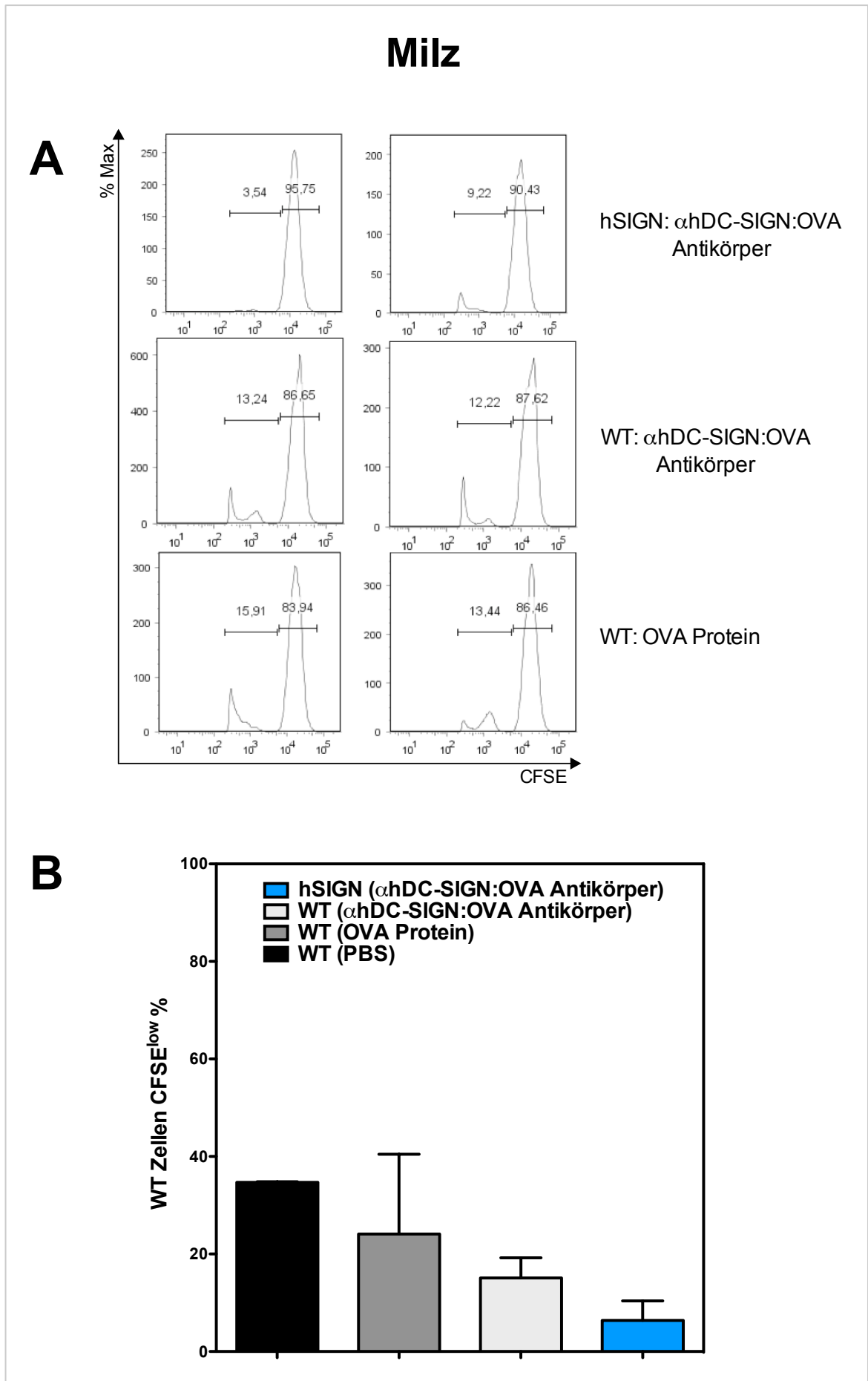


Abbildung 20: Verringerung der CFSE<sup>low</sup> Fraktion in der Milz

Es wurden CD45.1<sup>+</sup> x OTI aus den Lymphknoten von CD45.1<sup>+</sup> x OTI Mäusen isoliert und diese Zellen i.v. in hSIGN Mäuse (blaue Balken) und WT Mäuse (schwarze und graue Balken) injiziert. Am Tag 0 wurden die Mäuse s.c. mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein vakziniert und erhielten alle zusätzlich  $\alpha$ CD40 Antikörper. Die WT Kontrollen erhielten PBS. Am Tag sieben wurde allen Versuchstieren eine Mischung aus  $2 \times 10^7$  CFSE markierten gen-identischen Zellen isoliert aus Lymphknoten und Milz von WT Mäusen injiziert. Diese Zellen waren zuvor entweder zusätzlich mit SIINFEKL Peptid inkubiert (CFSE<sup>low</sup>) oder nur CFSE markiert (CFSE<sup>high</sup>) worden. 18 Stunden nach der Injektion wurde die Beseitigung der CFSE<sup>low</sup> Zellen mittels FACS als Parameter für die zytotoxische Aktivität der transferierten CD45.1<sup>+</sup> x OTI Zellen gemessen. Die FACS Histogramme zeigen den Anteil der CFSE positiven Zellen unter den lebenden Zellen in der Milz (Y-Achse, s. **Abbildung 20, A**). Die graphische Auswertung stellt Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem durchgeführten Experiment dar (s. **Abbildung 20, B**). Pro Gruppe wurden zwei Mäuse eingesetzt.

Abkürzungen: hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; OVA, Ovalbumin; PBS, Phosphate-buffered saline; WT, Wildtyp Maus.

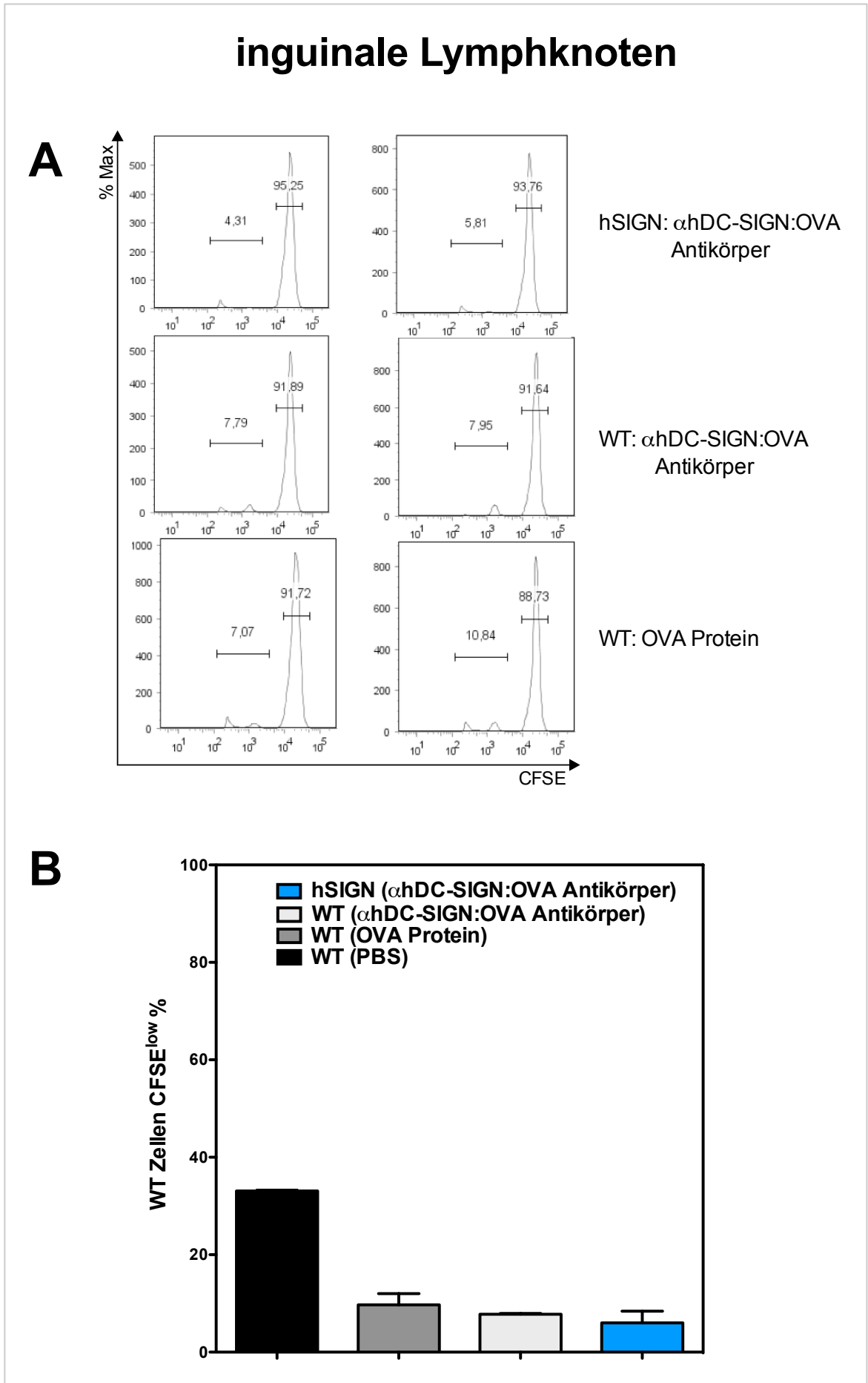


Abbildung 21: Verringerung der CFSE<sup>low</sup> Fraktion in den inguinalen Lymphknoten



Es wurden CD45.1<sup>+</sup> x OTI aus den Lymphknoten von CD45.1<sup>+</sup> x OTI Mäusen isoliert und diese Zellen i.v. in hSIGN Mäuse (blaue Balken) und WT Mäuse (schwarze und graue Balken) injiziert. Am Tag 0 wurden die Mäuse s.c. mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern oder OVA Protein vakziniert und erhielten alle zusätzlich  $\alpha$ CD40 Antikörper. Die WT Kontrollen erhielten PBS. Am Tag sieben wurde allen Versuchstieren eine Mischung aus  $20 \times 10^6$  CFSE markierten gen-identischen Zellen isoliert aus Lymphknoten und Milz von WT Mäusen injiziert. Diese Zellen waren zuvor entweder zusätzlich mit SIINFEKL Peptid inkubiert (CFSE<sup>low</sup>) oder nur CFSE markiert (CFSE<sup>high</sup>) worden. 18 Stunden nach der Injektion wurde die Beseitigung der CFSE<sup>low</sup> Zellen mittels FACS als Parameter für die zytotoxische Aktivität der transferierten CD45.1<sup>+</sup> x OTI Zellen gemessen. Die FACS Histogramme zeigen den Anteil der CFSE positiven Zellen unter den lebenden Zellen in den inguinalen Lymphknoten (Y-Achse, s. **Abbildung 21, A**). Die graphische Auswertung stellt Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem durchgeführten Experiment dar (s. **Abbildung 21, B**). Pro Gruppe wurden zwei Mäuse eingesetzt.

Abkürzungen: hSIGN, Bezeichnung für transgene DC-SIGN Mauslinie; OVA, Ovalbumin; PBS, Phosphate-buffered saline; WT, Wildtyp Maus.

## 4 DISKUSSION

DCs spielen eine zentrale Rolle bei der Initiierung von adaptiven Immunantworten, da sie kontinuierlich Antigene aufnehmen und diese an T-Zellen präsentieren. So kontrollieren sie die Aktivität von B- und T-Lymphozyten, den Mediatoren des adaptiven Immunsystems. Im letzten Jahrzehnt wurde das Potential von Immuntherapeutika basierend auf *ex vivo* generierten DCs in vielen klinischen Studien untersucht. Jedoch blieb der erhoffte Erfolg bisher aus. Dies ist zum einen darauf zurückzuführen, dass die *ex vivo* Methoden nur einem limitierten Patientenkollektiv zugänglich sind, nämlich Patienten, die an einem schweren Tumorleiden mit schlechter Prognose erkrankt sind. Zum anderen müssen die Impfstoffe teuer und aufwendig für jeden Patienten individuell hergestellt werden. Eine Alternative bilden neue Impfstoffe, bei denen durch spezifisches Beladen Antigene direkt über verschiedene Rezeptoren in die DCs aufgenommen werden können. Dies hat einerseits den Vorteil, dass der immunologische Prozess im natürlichen Umfeld der DCs ablaufen kann und die Antikörper über das Blut- und Lymphsystem verschiedene Untergruppen an DCs in unterschiedlichen Organen und Geweben des Organismus erreichen. Andererseits können Antikörper einfacher, kostengünstiger und in größeren Mengen als *ex vivo* generierte DCs produziert werden und so einem breiteren Patientenkollektiv zur Verfügung gestellt werden. Die Mehrzahl an Rezeptoren, die im *Targeting* Verwendung finden, gehört zur Familie der CLR. Da sie sowohl im Menschen als auch im Modellorganismus Maus speziell auf professionellen APCs exprimiert werden, scheinen sie sich besonders gut für neue Vakzinierungsstrategien zu eignen (s. Übersichtsarbeit von Tacke et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit wurde in erster Linie die Rolle des Lektins DC-SIGN untersucht. Es existieren zwar murine Homologe, diese unterscheiden sich jedoch in Funktion und Expressionsmustern deutlich vom humanen DC-SIGN Molekül (Koppel et al., 2005; Powlesland et al., 2006). Somit konnte die Maus bislang nicht als Modellorganismus für die Analyse der Funktion von DC-SIGN dienen. Schäfer et al. gelang die Generierung eines konventionellen transgenen Mausmodells (hSIGN), bei dem das humane DC-SIGN unter dem CD11c Promoter exprimiert wird und somit auch in der Maus spezifisch nur auf DCs zu finden ist (Schäfer et al., 2008). Dadurch war es in der vorliegenden Arbeit möglich, nicht nur *in vitro*

Studien mit DCs aus der Maus durchzuführen, sondern die Funktionen von DC-SIGN auch *in vivo* zu analysieren.

#### 4.1 Zielrezeptoren für die Entwicklung neuer Impfstoffe

Aktuelle Forschungsergebnisse verdeutlichen zunehmend, dass der Typ einer Immunantwort davon abhängt, welche Untergruppe von DCs die Immunantwort initiiert (Dudziak et al., 2007; Tacke and Figdor, 2011). Um über neue Impfstrategien die Art der Immunantwort kontrollieren und beeinflussen zu können, muss daher bekannt sein, welche DCs im Einzelnen von den Antikörpern erreicht werden und über welche Eigenschaften die spezifischen DC Untergruppen verfügen. Die Wahl desjenigen Rezeptors, der zum *Targeting* verwendet wird, beeinflusst im weiteren Verlauf auch ganz evident die DC Subpopulation, die durch den Antikörperimpfstoff erreicht wird (Tacke and Figdor, 2011). cDCs sind professionelle APCs, für die bereits überzeugende Daten für *Targeting* Studien in der Maus präsentiert wurden (Dudziak et al., 2007). cDCs exprimieren eine Reihe an CLR, zu denen neben DC-SIGN auch DEC-205 und der MR gehören (Tacke and Figdor, 2011). DEC-205 wurde in der vorliegenden Arbeit bereits mehrmals erwähnt und gehört zu den am besten erforschten Rezeptoren für *Targeting* Strategien der CLR Familie. Der größte Nachteil an DEC-205 liegt in seiner unspezifischen Expression, da dieses Lektin im menschlichen Organismus nicht nur auf DCs, sondern auch auf Monozyten, B-Zellen, NK Zellen und T-Zellen zu finden ist (Witmer-Pack et al., 1995; Guo et al., 2000; Kato et al., 2006). In der Maus findet sich DEC-205 jedoch in erster Linie auf DCs in lymphatischen Organen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass durch Antikörper vermitteltes Beladen von Antigen auf DEC-205 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* überzeugende Ergebnisse in Mausstudien präsentiert werden konnten. Es werden bereits erste klinische Studien mit  $\alpha$ DEC-205 Antikörpern durchgeführt, die beispielsweise an das HIV Protein p24 gekoppelt sind ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Für die Entwicklungen von neuen humanen Impfstoffen ist jedoch nicht das Expressionsprofil in der Maus entscheidend, sondern die Situation im Menschen. Aufgrund der unspezifischen Expression ist zu erwarten, dass die Ergebnisse der *Targeting* Strategien mit DEC-205 in der Maus im menschlichen Organismus nicht

überzeugend genug reproduziert werden können und  $\alpha$ DEC-205 Antikörper unspezifisch und ineffizient das Immunsystem aktivieren (Kato et al., 2006; Aarntzen et al., 2008; Hesse et al., 2013). Dies könnte nicht zuletzt mit gefährlichen Nebenwirkungen für die Patienten verbunden sein oder große Mengen an Antikörpern nötig machen. DC-SIGN ist zwar auch vorwiegend in lymphatischen Organen zu finden ist, zeigt jedoch im Menschen ein spezifisches Expressionsprofil nur auf DCs, sodass DC-SIGN ein besserer Zielrezeptor für die Entwicklung neuer Impfstoffe darstellt und DEC-205 als Rezeptor überlegen ist (Geijtenbeek et al., 2000c; Soilleux et al., 2002; Hesse et al., 2013).

Als ein weiteres wichtiges CLR ist der MR zu nennen. Der MR ist in der Maus speziell auf Makrophagen und Endothelzellen in der Leber und im lymphatischen Gewebe exprimiert (Linehan et al., 1999). Außerdem ist er oft auf DC-SIGN<sup>+</sup> DCs zu finden. Interessanterweise wird der MR nur auf *in vitro* generierten DCs der Maus exprimiert, nicht aber *in vivo* (McKenzie et al., 2007). Beim Menschen konnte der MR auf verschiedenen Zelltypen der Haut, in venösen Sinusoiden der Milz und der Leber, auf T-Zellen und DCs nachgewiesen werden (Engering et al., 1997; Wollenberg et al., 2002; Martinez-Pomares et al., 2005). Spezifisches Beladen des MR mit Antigen wurde unter anderem von Ramakrishna et al. in einem Melanom Modell erprobt. *Targeting* des MR mit Hilfe von humanen  $\alpha$ MR Antikörpern, die an ein Melanomantigen gekoppelt wurden, führte zur Aktivierung Tumorantigen-spezifischer CTLs und CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen (Ramakrishna et al., 2004). Eine andere Arbeitsgruppe erprobte das *Targeting* am *Bacterial artificial chromosome* (BAC) Mausmodell, wobei der BAC die Sequenz des humanen MR trug. Die Daten aus diesen Experimenten zeigen, dass das Beladen mit Antigen über den humanen MR potente humorale und zelluläre Immunantworten auslöst und gleichzeitig die Mäuse vor Tumorstadium schützt (He et al., 2007; Tacke and Figdor, 2011). Einige klinische Studien testen momentan die Wirkung des *Targeting* bei Patienten mit Brust-, Kolorektal-, Pankreas-, Ovarial- und Blasenkarzinomen. Hierbei werden  $\alpha$ MR Antikörper mit der  $\beta$ -Untereinheit des Tumormarkers Gondotropin fusioniert ([www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)). Ähnlich wie auch bei DEC-205 scheint DC-SIGN dem MR als Zielrezeptor für spezielle Vakzinierungsstrategien überlegen zu sein. Durch das variable Expressionsmuster des MR können die Auswirkungen des *Targeting* nicht eindeutig auf durch DCs induzierte Mechanismen zurückgeführt werden. Zudem muss mit unerwünschten Nebenwirkungen

durch unspezifische Bindung von Antikörpern auf vielen anderen Immunzellen gerechnet werden. Dies könnte bei einer i.v. Applikation im Menschen beispielsweise zu überschießenden und unerwarteten Immunreaktionen führen. Außerdem ist zu beachten, dass der MR und DC-SIGN eine gemeinsame Bindungsvorliebe für mannosylierte Glykoproteine haben. Da DC-SIGN und der MR zudem oftmals auf den gleichen Immunzellen ko-exprimiert sind, könnten die Ergebnisse vieler Studien zum *Targeting* des MR mit Hilfe mannosylierter Strukturen in Wirklichkeit vielleicht sogar auf Effekte von DC-SIGN zurückgeführt werden (Keler et al., 2004; Aarnoudse et al., 2008).

## 4.2 Zielstruktur DC-SIGN: Induktion von potenten T-Zell Antworten

### 4.2.1 *Targeting* von DC-SIGN *in vitro*

Das Lektin DC-SIGN ist, wie in dieser Arbeit schon mehrmals dargelegt wurde, ein vielversprechender Kandidat für die Entwicklung und Erprobung neuer Impfstoffe. DC-SIGN zeigt im Gegensatz zu vielen anderen CLRs ein auf DCs beschränktes Expressionsmuster und ist insbesondere auf APCs in den immunologisch aktiven lymphatischen Organen und auf Schleimhautoberflächen zu finden (Geijtenbeek et al., 2000c; Soilleux et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte mit *in vitro* Experimenten zum *Targeting* von DC-SIGN gezeigt werden, dass durch die Inkubation von DC-SIGN<sup>+</sup> DCs mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern sowohl eine Proliferation der CD8<sup>+</sup> OTI T-Zellen als auch der CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen induziert wird. Hierbei war der Effekt für die Proliferation der CD8<sup>+</sup> OTI Zellen ausgeprägter als für die CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen (s. **Abbildungen 14 bis 17**). Eine starke OTI T-Zell Proliferation resultierte aus der Verwendung geringster Konzentrationen an  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern. Die Ko-Kultur mit DC-SIGN<sup>+</sup> DCs führte bei Antikörperkonzentrationen im Nanogrammbereich zu einer 20fach höheren OTI T-Zell Proliferation als eine alleinige Verwendung gleicher Konzentrationen an reinem OVA Protein oder an Isotyp:OVA Antikörpern. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass noch weit aus geringere Konzentrationen des  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpers verwendet werden könnten und die starke Proliferation der OTI T-Zellen dennoch erhalten bliebe. Dies zeigt, dass das *Targeting* von DC-SIGN *in vitro* eine sehr effektive Möglich-

keit darstellt, spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu aktivieren und DC-SIGN<sup>+</sup> DCs über wirkungsvolle Mechanismen zur Verstärkung der Kreuzpräsentation verfügen. Außerdem wird deutlich, dass bereits geringste Antikörperkonzentrationen ausreichend sind, um eine vielfach höhere T-Zell Proliferation auszulösen, was beispielsweise erst aus der Verwendung erheblich größerer Mengen an löslichem Protein resultierte. Zusätzlich geht aus den *in vitro* Daten hervor, dass die Expression von DC-SIGN auf murinen DCs deren Fähigkeit zur Antigenverarbeitung und -präsentation nicht beeinflusst. Die Proliferation von OTI und OTII Zellen als Antwort auf die Inkubation von WT und hSIGN DCs mit reinem OVA Protein fiel in beiden Gruppen vergleichbar aus (s. **Abbildungen 14 bis 17**).

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten *in vitro* Daten stellen Vorversuche zur einer erst kürzlich publizierten Arbeit von Hesse et al. dar, welche die hier beschriebenen *in vitro* Daten bekräftigt. Auch hier konnte in verschiedenen *in vitro* Experimenten mit hSIGN<sup>+</sup> und WT DCs gezeigt werden, dass durch die Verwendung von  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern sowohl OTI als auch OTII T-Zellen stärker zur Proliferation angeregt werden, als bei Verwendung vergleichbarer Konzentrationen an reinem OVA Protein oder an Isotyp:OVA Antikörpern. Außerdem zeigten Hesse et al., dass nur die  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörper messbare Proliferation von T-Zellen auslösen, welche direkt an OVA Protein gekoppelt sind, wohingegen vergleichbare Konzentrationen an reinem  $\alpha$ hDC-SIGN Antikörper und löslichem OVA Protein gemeinsam keinen Effekt auf die T-Zell Proliferation haben. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Bindung an DC-SIGN per se die Fähigkeit der DCs zur Antigenpräsentation verstärkt (Hesse et al., 2013).

Die starke Induktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen über DC-SIGN spezifische Antikörper *in vitro* ist ein erster Schritt dahingehend, DCs zur Aktivierung von T<sub>H</sub>1-Zellen und CTLs anzuregen, welche dann in der Lage sind, als Effektorzellen Tumoren und schwerwiegende Infektionen wie HIV, Malaria oder Tuberkulose zu bekämpfen (Speiser and Romero, 2010; Tacke and Figdor, 2011; Trumpheller et al., 2012). Bestimmte Untergruppen von DCs können neben Selbstantigenen auch Fremdan-tigene auf MHC I Molekülen präsentieren, ein Prozess, der als Kreuzpräsentation bezeichnet wird und für die Aktivierung von CTLs notwendig ist. Normalerweise dient die Präsentation auf MHC I Molekülen insbesondere der von endogenen Antigenen. Die genauen molekularen Mechanismen der Kreuzpräsentation sind bis-

her noch nicht vollständig aufgeklärt. Die ursprüngliche Annahme, dass Fremdan-tigene im Proteasom prozessiert werden, von dort in das Endoplasmatische Reti-kulum gelangen und an MHC I Moleküle gebunden werden, scheint nicht komplett zuzutreffen. So wurde kürzlich demonstriert, dass dem sogenannten *early endo-some* eine zentrale Rolle zuteil wird, da es über eine Reihe an Peptidtransporter verfügt und Peptide ohne Hilfe des Endoplasmatischen Retikulums an MHC I Mo-leküle gebunden werden können (Heath et al., 2004; Burgdorf et al., 2008; Saveanu et al., 2009; Tacken et al., 2011).

Auch wenn die genauen Mechanismen der Kreuzpräsentation noch nicht bekannt sind, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass DC-SIGN<sup>+</sup> DCs im Ge-gensatz zu normalen WT DCs durch das *Targeting* von DC-SIGN ihre Mechanis-men zur Kreuzpräsentation aktivieren können und so Antigen an naive CD8<sup>+</sup> OTI T-Zellen präsentiert wird, wodurch diese zur Proliferation angeregt werden. Wäh-rend in den *in vitro* Experimenten die Proliferation von OTI T-Zellen erheblich an-stieg, zeigte die Proliferation der OTII T-Zellen geringere Werte, insbesondere bei niedrigeren Antikörperkonzentrationen in Ko-Kultur mit DC-SIGN<sup>+</sup> DCs unter Zu-gabe von  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern. Hesse et al. verwendeten nur Antikörper-konzentrationen bis 0,005  $\mu$ g/ml und konnten bereits ab 0,01  $\mu$ g/ml keine Unter-schiede mehr in der Proliferation von OTI und OTII T-Zellen zwischen Ko-Kulturen mit WT oder DC-SIGN<sup>+</sup> DCs herausarbeiten. Beide Gruppen zeigten eine ver-stärkte Proliferation von OTI und OTII T-Zellen in Ko-Kultur mit DC-SIGN<sup>+</sup> belade-nen DCs im Gegensatz zu WT DCs. Dass der Effekt bei OTI T-Zellen jedoch aus-geprägter ist, wurde nicht ersichtlich (Hesse et al., 2013). Die **Abbildungen 16 und 17** zeigen aber, dass im Gegensatz zu WT DCs bei Antikörperkonzentratio-nen kleiner 0,005  $\mu$ g/ml immer noch eine deutlich stärkere OTI Proliferation in Ko-Kultur mit DC-SIGN<sup>+</sup> DCs (beladen mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA AKs) induziert werden konnte, wohingegen sich die Anzahl proliferierter OTII T-Zellen in Ko-Kultur mit DC-SIGN<sup>+</sup> DCs bei Antikörperkonzentrationen kleiner 0,005  $\mu$ g/ml kaum mehr von der in Ko-Kultur mit WT DCs unterschied.

Andere *in vitro* Studien bekräftigen die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse. Humanisierte  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper wurden mit dem Modellantigen *keyhole limpet hemocyanin* (KLH) fusioniert und führten nach Inkubation mit humanen, von Mo-nozyten abstammenden DCs (moDCs) oder Lymphozyten, die aus humanem Blut

isoliert wurden, zu einer potenten Antigenpräsentation an naive T-Zellen und zu deren Proliferation (Tacke et al., 2005). Singh et al. wählten anstatt Antikörper Zuckerliganden von DC-SIGN und fusionierten diese mit dem Modellantigen OVA. Auch dies führte zu einer erhöhten Antigenpräsentation an naive OVA Peptid spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zu einer verstärkten Proliferation besonders der CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Singh et al., 2009). Unger et al. verwendeten in ihren Experimenten Vakzine auf Basis glykosylierter Liposomen, die ebenfalls zu einer verstärkten Antigenpräsentation DC-SIGN<sup>+</sup> DCs führten (Unger et al., 2012). Die beschriebenen Daten anderer Arbeitsgruppen und die dargelegten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit machen deutlich, dass transgene DCs aus hSIGN Mäusen in gleichem Maße wie humane DC-SIGN<sup>+</sup> DCs zur Antigenpräsentation und Aktivierung naiver T-Zellen in der Lage sind, wenn Antigen über DC-SIGN in die Zelle aufgenommen wird (Singh et al., 2009; Tacke et al., 2011; Hesse et al., 2013).

Dass auch das spezifische *Targeting* anderer CLRs DCs zur Kreuzpräsentation befähigt, demonstrierten beispielsweise Bonifaz et al., die in ihren *in vitro* Studien mit dem Endozytoserezeptor DEC-205 zeigen konnten, dass mit Hilfe von  $\alpha$ DEC-205:OVA Antikörpern in erster Linie die Aktivierung und Proliferation von CD8<sup>+</sup> OTI T-Zellen verstärkt wird und CD4<sup>+</sup> OTII T-Zellen eine weniger ausgeprägte Proliferation zeigen (Bonifaz et al., 2002). Nichtsdestotrotz birgt das *Targeting* von DC-SIGN ein größeres Potential und vielversprechendere Ansätze für eine spätere Therapie im Menschen, da DEC-205 im humanen Organismus nicht spezifisch auf DCs exprimiert wird.

#### 4.2.2 *Targeting* von DC-SIGN *in vivo*

In den *in vivo* Experimenten der vorliegenden Arbeit bestätigten sich die zuvor gewonnenen Befunde der *in vitro* Untersuchungen. Im hSIGN Mausmodell löste die Vakzinierung mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA in Kombination mit  $\alpha$ CD40 Antikörpern eine starke Proliferation transferierter CD8<sup>+</sup> OTI Zellen aus, wohingegen CD4<sup>+</sup> OTII Zellen deutlich weniger proliferierten (s. **Abbildungen 18 und 19**). Allerdings ist zu bedenken, dass die Expansion der T-Zellen nur an den Versuchstagen eins, fünf und zehn untersucht wurde, es liegen jedoch keinerlei Informationen darüber vor, wie sich die T-Zell Proliferation zwischen Tag fünf und Tag zehn entwickelte, da es den Tieren nicht zumutbar war, eine erneute Blutabnahme an Tag sieben



durchzuführen. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich auch *in vivo* durch spezifisches Beladen von DC-SIGN mit Antikörper-Antigen-Komplexen eine starke CD8<sup>+</sup> T-Zell Aktivierung auslösen lässt, wohingegen *Targeting* von DC-SIGN *in vivo* für die Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen keinen potenten Stimulus darstellt. Hesse et al. untersuchten zusätzlich die Auswirkungen der Vakzinierung mit und ohne  $\alpha$ CD40 Antikörper. Hier zeigte sich, dass Vakzine bestehend aus  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA und  $\alpha$ CD40 Antikörpern sowohl eine stärkere Proliferation der OTI als auch der OTII Zellen auslösten, wobei die Zahl der proliferierten OTI T-Zellen signifikant höher lag. Die alleinige Verwendung von  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern führte zu einer Expansion der CD4<sup>+</sup> OTII Zellen, wohingegen CD8<sup>+</sup> OTI Zellen kaum proliferierten (Hesse et al., 2013).

In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe des Zytotoxizitätsprotokolls gezeigt werden, dass die generierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen über eine potente zytotoxische Funktion verfügen (s. **Abbildungen 20 und 21**). Da sich die Arbeitsgruppe am klassischen Protokoll orientierte, erfolgte die Analyse am achten Tag. Der Unterschied der CFSE<sup>low</sup> Verringerung zwischen vakzinieren hSIGN und WT Mäusen hätte aber, wie die Daten von Hesse et al. zeigen, deutlicher dargestellt werden können, wenn die abschließenden Analysen zu einem früheren Zeitpunkt stattgefunden hätten. Aus den zuvor im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten *in vivo* Experimenten war ersichtlich geworden, dass die Zellzahlen der CD8<sup>+</sup> OTI Zellen bereits am Tag fünf ihr Maximum erreicht hatten. Hesse et al. führten die Analysen im Zytotoxizitätsmodell sechs Tage nach der Immunisierung mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA und  $\alpha$ CD40 Antikörpern durch und konnten in hSIGN Mäusen, jedoch nicht in WT Mäusen, eine starke CTL Antwort beobachten, die sich in einer massiven Abnahme der CFSE<sup>low</sup> Fraktion äußerte (Hesse et al., 2013). Nichtsdestotrotz konnten auch in der vorliegenden Arbeit schon erste überzeugende Daten präsentiert werden, die aufzeigen, dass durch das *Targeting* von DC-SIGN *in vivo* wirksame CTL Antworten generiert werden können.

Ähnliche Ergebnisse zum *Targeting* von DC-SIGN *in vivo* demonstrieren auch andere Publikationen. Kretz-Rommel et al. zeigten in einem speziellen humanisierten Mausmodell, dass DC-SIGN *Targeting in vivo* potente T-Zell Antworten induziert.  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper des AZN-D1 Klons wurden an Tetanustoxid Peptide oder an das Modellantigen KLH gekoppelt und aktivierten humane, Antigen-spezifische T-

Zellen. Zudem führten  $\alpha$ DC-SIGN:KLH Antikörper in einem Lymphommodell der Maus zur Hemmung des Tumorwachstums (Kretz-Rommel et al., 2007). Auch wenn mit Hilfe dieses Mausmodells überzeugende Daten vorgestellt werden konnten, birgt das in der vorliegenden Arbeit verwendete hSIGN Modell im Gegensatz zum artifiziellen Mausmodell von Kretz-Rommel und Kollegen viele Vorteile. Das humane DC-SIGN wird im hSIGN Modell spezifisch nur auf CD11c<sup>+</sup> Zellen exprimiert und der verwendete Antikörper aus dem AZN-D1 Klon bindet auch spezifisch nur das humane DC-SIGN und keine murinen Homologe (unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe). Durch die Verwendung der hSIGN Maus in Kombination mit einem spezifischen Antikörper können daher unerwünschte Nebenwirkungen und unspezifisches *Targeting*, beispielsweise über Fc-Rezeptoren, auf ein Minimum reduziert werden.

Die Methodik für die *in vivo* Experimente dieser Arbeit lehnte sich eng an die Arbeiten von Bonifaz et al. an, die das spezifische Beladen mit Antigenen von DEC-205 untersuchten. Diese Arbeitsgruppe demonstrierte in einer Versuchsreihe zum *Targeting* von DEC-205, dass sich IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-2<sup>+</sup> OTI Zellen nach Vakzinierung mit  $\alpha$ DEC-205:OVA und  $\alpha$ CD40 Antikörpern in großen Mengen nachweisen lassen und die OTI Zellen zudem über eine zytotoxische Funktion verfügen, wenn zuvor eine Aktivierung der DCs mit  $\alpha$ CD40 Antikörpern stattfand (Bonifaz et al., 2002). Die Forscher um Mahnke et al. konnten zeigen, dass die Fusion der Melanomantigene gp100 und *tyrosinase-related protein 2* (TRP-2) mit einem  $\alpha$ DEC-205 Antikörper dazu führte, dass bei 70% der an Melanom erkrankten Mäuse eine Regression des Tumors erreicht werden konnte (Mahnke et al., 2005). Auch wenn diese Studien vielversprechende Ergebnisse darlegen, muss bedacht werden, dass das *Targeting* von DEC-205 aufgrund seines unspezifischen Expressionsmusters zu unerwünschten Nebenwirkungen und zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen kann. DC-SIGN hingegen zeigt durch seine exklusive Expression auf DCs einen deutlichen Vorteil gegenüber DEC-205. Diana Dudziak et al. konnten durch das spezifische Beladen von DEC-205 zeigen, dass nur CD8<sup>+</sup> DEC-205<sup>+</sup> DCs zur Kreuzpräsentation fähig sind und diese zudem über große Konzentrationen an MHC I Molekülen verfügen. CD4<sup>+</sup> DCs hingegen exprimieren den Rezeptor DCIR2 (33D1), sind reich an MHC II Molekülen und spezifisches *Targeting* von 33D1 induzierte potente CD4<sup>+</sup> Antworten (Dudziak et al., 2007). Da DEC-205 generell nicht auf CD4<sup>+</sup> DCs exprimiert wird, können bei *in vivo Targeting* Studien mit

DEC-205 keine Aussagen darüber getroffen werden, ob tatsächlich ausschließlich CD8<sup>+</sup> DCs Kreuzpräsentation betreiben, oder ob CD4<sup>+</sup> DC nicht auch über entsprechende Mechanismen verfügen. Außerdem kann nicht beurteilt werden, ob letztendlich der Zielrezeptor selbst oder die Untergruppe der DCs für eine Kreuzpräsentation ausschlaggebend sind. Der bisherige Forschungskonsens vertritt die Ansicht, dass allein CD8<sup>+</sup> DCs zur Kreuzpräsentation befähigt sind. Die Frage ist jedoch, ob nicht vielmehr der für das *Targeting* verwendete Rezeptor entscheidend dafür ist, dass die DC Antigene kreuzpräsentieren kann. DC-SIGN wird sowohl auf CD4<sup>+</sup> DCs als auch auf CD8<sup>+</sup> DCs exprimiert. Das in dieser Arbeit vorgestellte und verwendete hSIGN Mausmodell eignet sich daher explizit dafür, die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation verschiedener DC Unterklassen zu untersuchen. Wichtig ist hierbei, dass für diese Versuche nur DCs aus murinen Milzen verwendet werden können, da DCs aus GM-CSF Knochenmarkskulturen weder CD4 noch CD8 exprimieren (Vremec et al., 2000; O'Keeffe et al., 2002; Wu and Liu, 2007). In zukünftigen Experimenten könnte man Mäuse *in vivo* zunächst mit spezifischen  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern und einem Stimulanz, beispielsweise mit  $\alpha$ CD40 Antikörpern, vakzinieren. Anschließend könnten DCs aus den Milzen der Mäuse isoliert, nach verschiedenen Oberflächenmolekülen sortiert und dann mit naiven CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in Kultur gebracht werden. So könnte gezeigt werden, dass die Expression von DC-SIGN die DCs zur Kreuzpräsentation von Fremdartigen befähigt und nicht die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Untergruppe entscheidend ist.

### **4.3 Die Wahl von Antikörpern und Adjuvanzen bei der Neuentwicklung von Impfstoffen**

Nach wie vor sind die entscheidenden Faktoren für die Effektivität und die Art der induzierten Immunantwort beim spezifischen Beladen von DCs ungeklärt. Es herrscht Uneinigkeit darüber, ob hauptsächlich die Untergruppe der Ziel DCs, der Zielrezeptor oder der Ligand selbst ausschlaggebend für die induzierte Immunantwort sind. Neue Erkenntnisse legen nahe, dass zusätzlich auch die Wahl des Epitops am Zielrezeptor, an das der Antikörper-Antigen Komplex bindet, entscheidend dafür sein kann, welcher Teil des Immunsystems im Folgenden aktiviert wird (Tacke et al., 2011). Des Weiteren wird zunehmend deutlich, dass Stimuli, die

zur Reifung der DCs führen (*engl. maturation adjuvants*), unabdingbar für die Generierung einer Immunantwort sind und der Aktivierungszustand der DCs auf den Typ der ausgelösten Immunantwort Einfluss nimmt.

### 4.3.1 Die Wahl des richtigen Antikörpers

Obwohl DC-SIGN bereits in einer Vielzahl an Studien untersucht wurde, ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt, was nach der Bindung eines Liganden im Zellinneren der DCs mit dem Rezeptor-Liganden-Komplex passiert. Für DC-SIGN existieren aktuell insbesondere Antikörper, die an die extrazellulär gelegene CRD binden. Diese und auch Zuckerliganden werden nach der Clathrin-abhängigen Endozytose in lysosomale Kompartimente transportiert. Interessanterweise verbleiben Antikörper, die an die *Neck Region* von DC-SIGN binden oder Zuckermoleküle des HCV nach der Clathrin-unabhängigen Endozytose für längere Zeit im sogenannten *early endosome* (Ludwig et al., 2004; Tacke et al., 2011). Neuere Erkenntnisse legen darüberhinaus nahe, dass  $\alpha$ CRD und  $\alpha$ Neck Antikörper unterschiedliche Transkriptionsmechanismen im Zellinneren aktivieren. Auch scheint eine Blockierung der CRD mehr Einfluss auf die Funktion der DCs zu haben, als eine vorübergehende Blockierung der *Neck Region* (Tacke et al., 2011). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Identifizierung neuer Rezeptordomänen von DC-SIGN dahingehend sinnvoll wäre, solche Domänen ausfindig zu machen, die wenig Einfluss auf die Fähigkeit der DC zur Antigen- und Pathogenerkennung haben, sondern speziell die T-Zell Aktivierung und Proliferation von DC-SIGN<sup>+</sup> DCs modulieren können.

Tacke et al. konnten kürzlich zeigen, dass  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper nach der Endozytose für längere Zeit im Zellinneren an DC-SIGN gebunden blieben, kein Rezeptorrecycling stattfand und somit auch keine wesentliche Akkumulation von Antikörpern möglich war. Außerdem führte die Bindung von  $\alpha$ DC-SIGN Antikörpern zur Verminderung der DC-SIGN Expression auf der DC Oberfläche, ein Effekt, der bei der Bindung von Kohlenhydratliganden ausblieb (Tacke et al., 2012). Es ist jedoch fraglich, ob diese Ergebnisse auch auf andere Antikörpertypen übertragen werden können. Möglicherweise treffen die von Tacke et al. dargestellten Eigenschaften nur allein auf den von ihnen verwendeten Subtyp zu. Laut Tacke et al. wären Antikörper folglich nicht die am besten geeigneten Strukturen für den Anti-

gentransport, da durch die abnehmende Dichte an DC-SIGN-Molekülen auf der Oberfläche keine Anreicherung von Antikörper-Antigen-Komplexen im Zellinneren möglich wäre.

Als Alternative verwendeten Cruz et al. bereits Nano- und Mikropartikel, die auf ihrer Oberfläche  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper trugen und mit größeren Mengen an löslichem Antigen beladen wurden. Für die Aufnahme der Partikel in die DC war folglich nur eine geringe Anzahl an DC-SIGN Rezeptoren notwendig. Gleichzeitig konnte aber dennoch eine große Menge an Antigen in das Zellinnere aufgenommen werden, woraus effektive Antigen-spezifische T-Zell Antworten resultierten (Cruz et al., 2010). Es sollte geprüft werden, ob möglicherweise Vakzine, die sich aus unterschiedlichen Antikörperkomponenten zusammensetzen, den klassischen Antigen-Antikörper-Komplexen überlegen sein könnten. Hierfür könnte eine Kombination von Nanopartikeln und Antigen-Antikörper-Komplexen in Betracht gezogen werden.

Neben der Rezeptordomäne, die vom verwendeten Antikörper gebunden wird, kann auch der Aufbau des Antikörpers eine Variationsmöglichkeit darstellen. Birkholz et al. verwendeten beispielsweise in einer Studie zum *Targeting* von DEC-205 anstelle von kompletten Antikörpern sogenannte *single-chain fragments variable* (scFv). Da sie günstig produziert werden können, Gewebe leichter penetrieren und zudem keine Fc-Rezeptoren binden, bieten sie eine Reihe an Vorteilen, die man sich bei der Entwicklung von neuen auf Antikörper-Antigen-Komplexen basierenden Impfstoffen zu Nutze machen könnte (Birkholz et al., 2010). Vakzine aus  $\alpha$ DEC-205 scFv Antikörpern fusioniert mit dem Melanom Modellantigen gp100 lösten in der Maus bereits Antigen-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell Antworten aus und führten zu einer Reduktion des Tumolvolumens um 66% (Johnson et al., 2008). Die Arbeitsgruppe um Birkholz fusionierte  $\alpha$ DEC-205 scFv Antikörper mit dem Tumorantigen MAGE-A3, welches in Hoden-, Lungen-, Brust- und Plattenepithelkarzinomen, sowie auch in malignen Melanomen zu finden ist. Dies führte zu einer 100fach stärkeren Präsentation des Modellantigens auf MHCII Molekülen und aktivierte Antigen-spezifische T-Zellen (Birkholz et al., 2010). Auch für DC-SIGN existieren  $\alpha$ DC-SIGN scFv Antikörper, die jedoch bisher noch wenig erprobt wurden (Tacken et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper aus dem bereits zuvor beschriebenen AZN-D1 Klon verwendet

(Geijtenbeek et al., 2000c). Hierbei handelt es sich um Antikörper, die spezifisch die CRD Region von DC-SIGN binden. Der entscheidende Vorteil ist, dass diese Antikörper spezifisch nur das humane DC-SIGN Molekül binden, jedoch keine Affinität zu den murinen Homologen zeigen. Zusammen mit dem humanisierten hSIGN Mausmodell bietet sich somit ein hervorragendes Modell zur Untersuchung von DC-SIGN im Vergleich zu gewöhnlichen WT Mäusen, mit dem bereits überzeugende Daten zum *Targeting* von humanem DC-SIGN mit Hilfe dieses  $\alpha$ CRD-Antikörpers AZN-D1 generiert werden konnten. Inwiefern andere, gegen DC-SIGN gerichtete Antikörper zu Selbigem in der Lage sind, muss in zukünftigen Experimenten getestet werden. Außerdem sollte darüber nachgedacht werden, zukünftig auch andere  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper, beispielsweise scFv Antikörper zusammen mit dem hSIGN Modell einzusetzen, um deren Effektivität zu untersuchen.

### 4.3.2 Impfstoffe und ihre Adjuvanzien

Die Autoren verschiedener *Targeting* Studien mit Mäusen und auf DC basierenden Therapiestudien im Menschen sind sich darüber einig, dass die Aktivierung und Reifung von DCs wichtige Voraussetzungen für den Erfolg der auf DC basierenden Vakzine sind. Unreife DCs induzieren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Toleranz und führen zur Generierung von T<sub>regs</sub> (Dhodapkar et al., 2001; Bonifaz et al., 2002; Mahnke et al., 2003; Aarntzen et al., 2008; Tacke and Figdor, 2011). In der Entwicklung neuer Impfstrategien liegt der Schwerpunkt auf Krankheiten, die nach momentanem Wissensstand nur schwer zu therapieren sind und zu deren Bekämpfung effektive CTL Antworten und ein immunologisches Gedächtnis generiert werden müssen (Birkholz et al., 2010; Speiser and Romero, 2010; Tacke and Figdor, 2011). Die meisten gängigen Impfstoffe enthalten Adjuvanzien, welche die Antigen-spezifischen Immunantworten verstärken, indem sie beispielsweise das Ausmaß oder die Dauer der Immunantwort beeinflussen oder DCs aktivieren. Momentan ist nur eine geringe Anzahl an Adjuvanzien zur Herstellung von humanen Impfstoffen verfügbar. Am häufigsten werden momentan Aluminium Salze (Alum) als Zusatzstoffe verwendet, eine große Anzahl an anderen Adjuvanzien befindet sich jedoch bereits in Entwicklung und klinischer Erprobung (O'Hagan et al., 2001; Kool et al., 2008a; Kool et al., 2008b; Dubensky and Reed, 2010; Speiser and Romero, 2010; Tacke and Figdor, 2011). Mit den aktuell verbreiteten

Zusatzstoffen für Impfungen wird das Immunsystem aber hauptsächlich zur Generierung einer  $T_H2$ -Antwort angeregt. Daher müssen neue, auf Antikörper-Antigen-Komplexen basierende Impfstoffe mit Adjuvanzen versehen werden, die in erster Linie zur Proliferation von  $T_H1$ -Zellen und CTLs führen (Speiser and Romero, 2010; Tacken and Figdor, 2011). Außerdem sollten therapeutische Vakzine in der Lage sein, Mechanismen, die Erreger und Tumoren zur Evasion des Immunsystems entwickelt haben effizient zu umgehen (Dubensky and Reed, 2010).

Die gängigsten Adjuvanzen für das *Targeting* von DCs sind Antikörper gegen CD40 oder PRR Liganden, da sie DCs suffizient aktivieren und deren Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von Antigen an  $CD8^+$  T-Zellen verstärken (Bonifaz et al., 2002). CD40 ist ein Mitglied der TNF-Familie und wird von DCs, B-Zellen, Makrophagen, Monozyten und vielen anderen Zellen exprimiert (Quezada et al., 2004; Tacken et al., 2007). Außerdem ist CD40 auch auf soliden Tumoren und Non-Hodgkin Lymphomen zu finden. Die Anwesenheit von  $\alpha$ CD40 Antikörpern erhöht die Dichte an kostimulatorischen Molekülen, führt zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, verlängert die Antigenpräsentation auf MHC Molekülen und letztlich sogar das Überleben der DCs (Quezada et al., 2004). Außerdem scheint es so, als könnten DCs CTL Antworten nur nach vorheriger Reifung generieren, anderenfalls induzieren sie Immuntoleranz (Hawiger et al., 2001; Bonifaz et al., 2002).

Da  $\alpha$ CD40 Antikörper bisher in vielen Versuchen zum *Targeting* von DCs verwendet wurden, setzte man diese Antikörper auch in der vorliegenden Arbeit als Adjuvanzen der Vakzine ein. Hierbei wurde ersichtlich, dass in Proben, die zwar mit Antikörpern oder Protein versehen wurden, jedoch keine  $\alpha$ CD40 Antikörper erhielten, sowohl in Kultur mit WT als auch mit DC-SIGN<sup>+</sup> DCs kaum T-Zell Proliferation messbar war (s. **Abbildungen 17 und 18**). Hesse et al. konnten zeigen, dass bei *in vitro* Experimenten zum *Targeting* von DC-SIGN die Zugabe von  $\alpha$ CD40 Antikörpern nur die Proliferation von OTI T-Zellen, die mit DC-SIGN<sup>+</sup> DCs und  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern inkubiert worden waren, verstärkte. Die Proliferation von OTII T-Zellen hingegen wurde nur unwesentlich durch die Hinzugabe von  $\alpha$ CD40 Antikörpern gesteigert. Außerdem verstärkte die Anwesenheit von  $\alpha$ CD40 Antikörpern signifikant die Menge an  $IFN_\gamma$  produzierenden OTI Zellen, wohingegen die Anzahl  $IFN_\gamma$  produzierender OTII Zellen bei Zugabe von  $\alpha$ CD40 Antikörpern in

Kombination mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern unbeeinflusst blieb (Hesse et al., 2013). In den *in vivo* Experimenten dieser Arbeit wurden grundsätzlich in allen Versuchen  $\alpha$ CD40 Antikörper eingesetzt, da die Literatur sowohl in Mausstudien als auch in humanen Therapiestudien mit Antikörpervakzinen für DCs ausreichend überzeugende Hinweise dafür bietet, dass die Prästimulation der DCs unverzichtbar für die Induktion einer potenten Immunantwort ist (Dhodapkar et al., 2001; de Vries et al., 2003; Tacke and Figdor, 2011). Hesse et al. weisen sogar daraufhin, dass ohne Adjuvanz *in vivo* keinerlei Kreuzpräsentation stattfindet und  $CD4^+$  T-Zellen mit einem Phänotyp ähnlich dem von  $T_{regs}$  nachgewiesen werden können (Hesse et al., 2013).

Antikörper wie  $\alpha$ CD40 sind relativ teure Adjuvanzen. Deshalb wird auch über die Verwendung alternativer Adjuvanzen nachgedacht. TLR Liganden beispielsweise sind potente Stimulanzen der Immunabwehr, indem sie Immunzellen direkt aktivieren, die Zytokinproduktion induzieren und DCs zur Reifung anregen (Watts et al., 2010). In aktuellen klinischen Studien finden beim *Targeting* von DEC-205 oder vom MR TLR Liganden wie Poly-ICLC (TLR3-Ligand) und Resiquimod (R848, TLR7-/8-Ligand) Verwendung. In der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass beide in Kombination mit spezifischen Antikörpervakzinen potente  $T_H1$ -Antworten induzieren können (Tacke and Figdor, 2011). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden in einigen *in vitro* Versuchen zunächst LPS und CpG als TLR Stimulanzen verwendet, um die DCs zur Reifung anzuregen (s. **Abbildungen 12, 14 und 15**). Hierbei wurde zum einen ersichtlich, dass hSIGN und WT DCs gleichermaßen auf die Anwesenheit von LPS oder CpG in der Zellkultur reagieren, da eine ähnlich starke Hochregulation von MHCII Molekülen messbar war. Zum anderen zeigte sich, dass es nicht relevant war, ob die DCs für die Ko-Kultur mit T-Zellen zuvor mit LPS oder CpG inkubiert wurden, da die Proliferation der T-Zellen vergleichbar ausfiel. In den weiteren *in vitro* Experimenten wurden aus verschiedenen Gründen anstatt LPS oder CpG  $\alpha$ CD40 Antikörper zur Reifung der DCs verwendet (s. **Abbildungen 16 und 17**). Viele CLRs aktivieren Signaltransduktionswege, die zur Produktion spezifischer Zytokine führen oder aber Signaltransduktionswege der TLRs beeinflussen. Die Signaltransduktionswege der TLRs wiederum beeinflussen die Funktion der DCs auf vielfache Weise und können die T-Zell Proliferation in eine bestimmte Richtung lenken (Watts et al., 2010). Durch das Zusammenspiel der komplexen



Signalverarbeitungsmechanismen von TLRs und CLRAs im Zellinneren könnten bei der Verwendung von Adjuvantien, welche die TLRs stimulieren, die Auswirkungen des DC *Targeting* nicht eindeutig zugeordnet werden. Dies könnte die Aufklärung der genauen Mechanismen erschweren. Außerdem zeigten verschiedene Forschungsarbeiten, dass die Signaltransduktionswege von CD40 ausreichend für eine potente DC Aktivierung und Immunaktivierung sind (Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Im Gegensatz dazu stehen Publikationen, die beschreiben, dass eine Kombination aus verschiedenen Adjuvantien die zelluläre Immunantwort um ein Vielfaches potenzieren kann (Sparwasser et al., 1998; Maxwell et al., 2002; Quezada et al., 2004). Aktuell ist nur das LPS Derivat Monophosphoryl Lipid A (MPL<sup>®</sup>) als TLR Ligand für humane Impfstoffe zugelassen. MPL<sup>®</sup> stellt ein potentes Stimulanz für T-Zell Antworten und die Produktion von Antikörpern dar und wurde bisher sehr erfolgreich in Impfstudien eingesetzt (Dubensky and Reed, 2010). Aufgrund dieses Erfolges ist momentan bereits ein weiterer TLR4 Agonist in Erprobung (Baldwin et al., 2009). Allerdings werden in Zukunft noch viele Untersuchungen notwendig sein, um die genauen Wirkmechanismen der neuen Adjuvantien aufzuklären, gefährliche Nebenwirkungen vor der Erprobung im Menschen auszuschließen und eine kostengünstige Produktion in großen Mengen zu ermöglichen (Dubensky and Reed, 2010).

#### **4.4 Ausblick: DC-SIGN – Therapeutische Einsatzmöglichkeiten und Chancen in der Medizin**

Weltweit erweisen sich Impfungen nach wie vor als eine sehr effektive Präventionsmaßnahme gegenüber schweren Infektionskrankheiten. Trotzdem stellen Infektionskrankheiten immer noch eine große Herausforderung für die Gesundheitsversorgung dar und fordern jährlich nicht nur Millionen von Todesopfern, sondern sind eine Belastung für Wirtschaft, Forschung und Medizin. Laut WHO starben im Jahr 2009 knapp 800.000 Menschen an Malaria, fast 1,5 Millionen an Tuberkulose und 1,8 Millionen Menschen an der Infektion mit HIV und den Folgen von AIDS (WHO, 2011). Hinzu kommt, dass in den Industrieländern die Zahl an nosokomialen Infektionen stets ansteigt und gerade in großen Versorgungszentren multiresistente Keime zunehmend ein sehr ernstzunehmendes Problem darstellen.

Durch die Verwendung von spezifischen Antikörpervakzinen für den MR, DEC-205 oder DC-SIGN gelang es bereits mehreren Arbeitsgruppen, Mäuse gegenüber Tumorwachstum oder Infektionskrankheiten zu schützen oder den Schweregrad der Erkrankung zu reduzieren (Bonifaz et al., 2004; He et al., 2007; Schaefer et al., 2008; Hesse et al., 2013). Ziel weiterführender Studien ist es nun, die gewonnenen Ergebnisse auf den menschlichen Organismus zu übertragen und die Möglichkeiten des Rezeptor *Targeting* für die Therapie im Menschen auszunutzen. Bisherige Impfstoffe führen zur Bildung von Antikörpern, die extrazelluläre Pathogene erkennen und neutralisieren können. Jedoch sind gerade intrazelluläre Erreger die Verursacher der oben beschriebenen schweren Infektionskrankheiten und gängige Impfstrategien blieben im Kampf gegen diese bisher erfolglos (Seder and Hill, 2000). Eine neue Therapieoption zur Bekämpfung intrazellulärer Pathogene könnte daher das spezifische *Targeting* von CLRn wie DC-SIGN sein.

Eines der größten Ziele der Medizin im 21. Jahrhundert ist die Entwicklung eines effektiven Impfstoffes gegen HIV und die Heilung von AIDS. Im Jahr 2009 waren weltweit 33 Millionen mit HIV infiziert und bisher existieren keine kurativen Therapiemöglichkeiten (WHO, 2011). Die Bindung von HIV und DC-SIGN fördert die Bildung von Transfektionssynapsen zwischen CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen und HIV und erhöht zudem die Virusreplikation. Zudem stellt eine besondere Eigenschaft des HIV die Entwicklung von Impfstoffen und Medikamenten vor ein großes Problem: Durch die fehlerhafte Replikation der Virus DNS verändert das HIV ständig seine Struktur, sodass in jedem Patient mehrere Mutanten nebeneinander existieren. Da Antikörper gegen DC-SIGN die Bindung zwischen dem HIV Oberflächenmolekül gp120 und DC-SIGN verhindern, könnte hier ein möglicher Angriffspunkt für spezifische  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper sein (Geijtenbeek et al., 2000b). Wichtig ist hierbei jedoch, dass DC-SIGN wichtige physiologische Aufgaben bei der Interaktion zwischen DCs und T-Zellen übernimmt und diese Funktionen deshalb nicht komplett blockiert werden dürfen. Da DC-SIGN über mehrere Bindungsdomänen für HIV verfügt, könnte es jedoch möglich sein, die DC-SIGN-HIV Bindung zu blockieren, ohne wichtige physiologische Funktionen von DC-SIGN zu beeinträchtigen (Geijtenbeek et al., 2002b). Gleichzeitig könnten, wie von Geijtenbeek et al. bereits erprobt,  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper an HIV Oberflächenmoleküle gebunden werden, um so nicht nur die Bindung von HIV an DCs zu blockieren, sondern gleichzeitig eine Immunantwort gegen HIV zu initiieren. Requena et al. demonstrierten

bereits 2008, dass  $\alpha$ CRD-DC-SIGN Antikörper aus menschlicher Muttermilch oder humanem Plasma die Infektion von  $CD4^+$  T-Zellen durch HIV Viren verringern können (Requena et al., 2008). In den allermeisten Fällen findet die HIV Infektion von Kindern HIV positiver Mütter über die Muttermilch statt, wohingegen auch ohne eine antivirale Therapie während der Schwangerschaft etwa 90% der Kinder von einer Infektion *in utero* geschützt sind (Marlin et al., 2009). Dies führt zur Überlegung, ob eine Vakzinierung HIV positiver Mütter mit  $\alpha$ CRD-DC-SIGN Antikörpern die Kinder vor einer HIV Infektion über die Muttermilch schützen könnte. DC-SIGN wird auf Plazentazotten und Makropagen der Uterusschleimhaut exprimiert. Die fetalen DC-SIGN<sup>+</sup> Zellen werden nur durch eine dünne Schicht, dem Trophoblasten, von den mütterlichen DC-SIGN<sup>+</sup> Zellen der Uterusschleimhaut und mütterlichen Blutzellen getrennt. Da der Trophoblast während der Schwangerschaft häufig spontan oder als Folge eines Amnioninfektionssyndrom oder auch bei Drogenabusus einreißen kann, ist in diesen Fällen die Barriere zwischen fetalen und maternalen Zellen aufgehoben. Folglich könnten HIV infizierte Zellen der Mutter zu einer *in utero* Infektion des Feten führen (Soilleux et al., 2001). Auch hier ergäbe sich ein möglicher Angriffspunkt für neue auf  $\alpha$ DC-SIGN Antikörpern basierenden Vakzinen.

Neben HIV stellt auch HCV eine große Belastung für die Medizin dar. Weltweit sind etwa 170 Millionen Menschen an Hepatitis C erkrankt und bisher fehlen kurative Therapiemaßnahmen oder präventive Impfstoffe, wie sie beispielsweise bereits für das Hepatitis A und B Virus verfügbar sind (WHO, 2011). Außerdem tragen die infizierten Patienten eine sehr hohes Risiko für die Entstehung einer Leberzirrhose und folglich eines Leberkarzinoms. Der hohe Prozentsatz an Patienten mit chronischer HCV Infektion ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass das HCV erfolgreich Mechanismen entwickelt hat, die es ihm erlauben, dem Immunsystem zu entkommen. DC-SIGN und sein Homolog L-SIGN binden Hüllproteine von HCV und sind ausschlaggebend für die Aufnahme von HCV in DCs und sinusoidale Endothelzellen der Leber. Dies hat zur Folge, dass die Viren dem intrazellulären Verdau entkommen können, die immunstimulatorischen Eigenschaften von DCs gehemmt werden und ein Wechsel von einer protektiven  $T_H1$ -Antwort zu einer nicht protektiven  $T_H2$ -Antwort stattfindet (Ludwig et al., 2004; Steinman and Banchereau, 2007). Da Antikörper gegen DC-SIGN und L-SIGN die Aufnahme von HCV Partikeln in DCs spezifisch blockieren, ist davon auszugehen,

dass diese beiden C-Typ Lektine die Hauptrezeptoren für HCV darstellen (Ludwig et al., 2004). Auch wenn noch viele Nachforschungen nötig sein werden, um die Funktionen von L-SIGN und hDC-SIGN hinsichtlich ihrer Rolle bei der HCV Infektion aufzuklären, scheinen die humanen SIGN-Moleküle potentielle Kandidaten für neue Therapiestrategien im Kampf gegen HCV zu sein. Antikörper gegen DC-SIGN oder L-SIGN könnten, wie bereits von Ludwig et al. gezeigt, beispielsweise die Aufnahme von Viruspartikeln in die Zelle verhindern. Außerdem könnte über die Generierung von HCV-Hüllenantigen-Antikörper-Komplexe nachgedacht werden, die intrazellulär in lysosomale Kompartemente transportiert werden, prozessiert und als Antigenfragmente an naive T-Zellen präsentiert werden. Somit könnten die immunsupprimierenden Eigenschaften des HCV möglicherweise umgangen werden und über die Antikörper neue Angriffspunkte gegen HCV geschaffen werden.

Neben schweren Virusinfektionen bereiten nosokomiale Infektionen zunehmend Probleme. *Candida albicans* (*C. albicans*) ist der Hauptverursacher von nosokomialen Pilzinfektionen und Mukosiden immunsupprimierter Patienten nach Transplantation, bei Chemotherapie oder schweren Infektionskrankheiten wie AIDS. *C. albicans* dringt insbesondere über Haut und Schleimhäute in den Wirt ein (Cambi et al., 2003). Die Zellwand von *C. albicans* besteht in erster Linie aus Glykanen, die im Besonderen von DC-SIGN und dem MR gebunden werden, was dann wiederum die Aufnahme von *C. albicans* in humane DCs ermöglicht. Cambi et al. konnten zeigen, dass die Struktur der Pilzglykane ganz spezifisch von CLR auf humanen DCs erkannt wird und direkten Einfluss auf die Produktion proinflammatorischer Zytokine und die Art der Immunantwort hat (Cambi et al., 2008). Diese Erkenntnis trägt zur Überlegung bei, dass Zellwandglykane als Bestandteile therapeutischer DC-SIGN oder MR Antikörper Vakzine gezielt Immunzellen und Immunmechanismen aktivieren könnten, die für die Eliminierung der Pilze nötig sind, wozu der Organismus bei Immunsuppression jedoch nicht mehr in der Lage ist.

DCs werden in vielen Tumoren von Mensch und Maus gefunden. Tumoren exprimieren beispielsweise Interleukine, welche die Funktionen von DCs eindämmen oder diese zur Aktivierung von  $T_{\text{regs}}$  anregen. So können Tumore die Immunabwehr unterdrücken und ungestört an Größe und Volumen zunehmen. Inwiefern

DCs selbst in der Lage dazu sind, tumorizide CTLs zu aktivieren und gleichzeitig Granzyme und Perforine zu produzieren, die humane Tumore schädigen können, ist bisher noch nicht genau erforscht (Stary et al., 2007). Daher wurden in den letzten Jahrzehnten viele Studien etabliert, um die Entwicklung von Impfstoffen zur Therapie von Tumoren voranzutreiben. In einigen klinischen Studien wurde die Verwendung von *ex vivo* generierten, mit Tumorantigen beladenen DCs erprobt, die Ergebnisse blieben bisher jedoch unbefriedigend (Tacken and Figdor, 2011). Daher ergeben sich auch in der Anti-Tumor-Therapie Chancen für das spezifische *Targeting* von CLRn wie DC-SIGN. Tumore exprimieren auf ihrer Oberfläche eine Vielzahl von Tumor-spezifischen Antigenen. Diese könnten, gekoppelt an DC-SIGN spezifische Antikörper zur Initiierung einer potenten Anti-Tumor-Immunantwort verwendet werden und Tumorantigene für eine große Anzahl an DCs zugänglich machen. Die Aktivierung von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen und die Durchbrechung des lokalen immunsuppressiven Milieus des Tumors wäre ein erster Schritt in Richtung einer möglicherweise erfolgreichen Tumorbekämpfung (Aarntzen et al., 2008).

DCs spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Immunabwehr, sondern tragen maßgeblich zum Erhalt der Immunbalance bei. Sind diese Mechanismen gestört, kann es zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten und allergischen Krankheitsbildern wie beispielsweise Asthma, Typ-1 Diabetes, Psoriasis, rheumatischer Arthritis, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen oder Multipler Sklerose kommen (Steinman and Banchereau, 2007). DC-SIGN wird auf DCs der Haut und der Schleimhäute exprimiert, wo sich ein bedeutender Anteil der oben genannten Krankheitsbilder manifestiert. In der vorliegenden Arbeit wurde anhand verschiedener Publikationen bereits mehrfach aufgezeigt, dass spezifisches *Targeting* von DC-SIGN in Abwesenheit von Reifestimulanzien zur Induktion von Toleranz führt. DC-SIGN<sup>+</sup> iDCs könnten beispielsweise T<sub>regs</sub> aktivieren oder verschiedene supprimierende Zytokine produzieren, die wiederum die autoreaktiven Mechanismen eindämmen. Dies könnte sich bei der Bekämpfung von Autoimmunkrankheiten und Allergien, aber auch bei der Prävention von Transplantatabstoßungen zu Nutze gemacht werden. Da DC-SIGN auch auf DCs in der Zervix und Plazenta zu finden ist, liegt die Überlegung nahe, dass DC-SIGN zudem eine Rolle bei der Immunsuppression in der Plazenta und bei der Initiierung von Aborten spielt. Außerdem stellt die Expression von DC-SIGN einen frühen Marker für die

Implantation des Embryos dar (Brebuda et al., 2006). Durch die Expression von HLA-G auf der Plazenta und Sezernierung verschiedener immunsuppressiver Substanzen ist der Fötus normalerweise vor Angriffen durch das mütterliche Immunsystem geschützt (Hunt et al., 2007). Bei Aborten scheint dieses System jedoch gestört zu sein. Inwiefern DC-SIGN eine Rolle bei der Etablierung der maternal-fetalen Immuntoleranz spielt und seine Funktion sogar für therapeutische Zwecke beispielsweise bei multiplen Aborten eingesetzt werden kann, muss vor der Entwicklung von neuen Therapeutika in weiteren Untersuchungen aufgeklärt werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Dendritische Zellen spielen nach aktuellem Wissenstand eine Schlüsselrolle bei der Initiierung von Immunantworten. Als Wächter des Immunsystems suchen sie ihre Umgebung kontinuierlich nach neuen Antigenen ab. Hierfür sind sie mit Rezeptoren auf ihrer Oberfläche ausgestattet, zu denen zum Beispiel die Familie der C-Typ Lektine gehört. Diese können mit Hilfe ihrer Erkennungsregion für Kohlenhydrate Zuckermoleküle verschiedener Selbst- und Fremdartigen erkennen, diese in ihr Zellinneres aufnehmen und als Antigenfragmente auf ihrer Oberfläche präsentieren. Außerdem werden durch die Bindung von Antigenen im Zellinneren der Dendritischen Zellen verschiedene Signalkaskaden aktiviert, die dann wiederum dazu führen, dass die Dendritischen Zellen zu den Lymphknoten wandern, kostimulatorische Moleküle exprimieren und immunaktivierende Zytokine produzieren. All diese Eigenschaften tragen dazu bei, dass Antigen-spezifische T-Zell Antworten generiert und Dendritische Zellen zunehmend für neue Impfstrategien interessant werden. Impfungen gehören zu den ältesten und immer noch effektivsten Methoden, um Infektionskrankheiten vorzubeugen. Für die Bekämpfung von intrazellulären Erregern und Behandlung anderer Krankheiten wie Krebs oder schweren Infektionen mit Hilfe von starken zellulären Immunantworten, fehlen jedoch nachwievor überzeugende Therapiemöglichkeiten. Das *Targeting* von Antigen über spezifische Antikörper, die Oberflächenrezeptoren auf Dendritischen Zellen binden, stellt ein vielversprechendes und erfolgreiches Vorgehen dar, nicht zuletzt, weil auf diese Weise potente Antigen-spezifische, zytotoxische T-Zell Antworten induziert werden können. *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN) ist ein C-Typ Lektin, das im Menschen nur auf Dendritischen Zellen und gewissen Makrophagen exprimiert wird und zudem multiple Aufgabe als Antigenrezeptor erfüllt. Daher stellt es einen idealen Kandidaten für die Erprobung von neuen Vakzinen dar. Erste *in vitro* und *in vivo* Daten deuteten daraufhin hin, dass durch die Kopplung von Antigen an  $\alpha$ DC-SIGN Antikörper die Antigenpräsentation um ein Vielfaches gesteigert werden kann. Bei gleichzeitiger Aktivierung der Dendritischen Zellen konnten verstärkt Antigen-spezifische Immunantworten generiert werden. Im Modellorganismus Maus existieren zwar acht DC-SIGN Homologe, diese weisen jedoch im Vergleich zu DC-SIGN unterschiedliche

Ligandenspezifitäten, Funktionsmotive und Expressionsmuster auf. Aus diesem Grund wurde ein konventionelles transgenes Mausmodell für DC-SIGN mit dem Namen hSIGN eingeführt, bei dem das humane DC-SIGN unter dem murinen CD11c Promoter exprimiert wird. So wurde es möglich, die Auswirkungen des spezifischen *Targeting* von DC-SIGN mit murinen Dendritischen Zellen *in vitro* und im Mausorganismus selbst *in vivo* zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit wurden Antikörper gegen das humane DC-SIGN gekoppelt an das Modellprotein Ovalbumin (OVA) verwendet ( $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörper). Die  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörper sind gegen die Erkennungsregion für Kohlenhydrate von DC-SIGN gerichtete Antikörper und entstammen dem AZN-D1 Klon. Die *in vitro* Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mit DC-SIGN als Zielrezeptor und nach Vorstimulation der Dendritischen Zellen CD4<sup>+</sup> OTII und CD8<sup>+</sup> OTI OVA spezifische T-Zell Antworten generiert werden können. Bereits bei geringsten Konzentrationen an  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern im Nanogrammbereich induzierten DC-SIGN<sup>+</sup> DCs eine 20fach höhere OTI T-Zell Proliferation als im Vergleich zu alleiniger Verwendung gleicher Konzentrationen an reinem OVA Protein oder an Isotyp:OVA Antikörpern. Die Proliferation von OTII T-Zellen stieg jedoch nur um das 3–5fache an. Diese Ergebnisse konnten bei *in vivo* Versuchen bestätigt werden. Im hSIGN Mausmodell löste die Vakzinierung mit  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA Antikörpern und  $\alpha$ CD40 Antikörpern eine starke Proliferation transferierter OVA Peptid spezifischer CD8<sup>+</sup> OTI Zellen aus, die zudem über eine potente zytotoxische Funktion verfügten. Auch hier war für die CD4<sup>+</sup> OTII Zellen eine viel geringere Proliferation messbar. Die *in vitro* und *in vivo* Daten dieser Arbeiten verdeutlichen also, dass mit Hilfe von spezifischen  $\alpha$ DC-SIGN Antikörpervakzinen eine potente Kreuzpräsentation ausgelöst werden kann und speziell die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen induziert wird. Das spezifische *Targeting* stellt somit eine vielversprechende Therapieoption für neue zukünftige Impfstrategien dar.



## 6 SUMMARY

Dendritic cells are the sentinels of the immune system and continuously sample their environment for antigens. Therefore, they are equipped with different surface receptors like members of the family of the C-type lectins. With their carbohydrate recognition domain they can recognize different endogenous and exogenous antigens, internalize and present them as antigen fragments on their cell surface. In addition to that, binding and internalization of antigens trigger different signaling pathways leading migration to lymph nodes, expression of co-stimulatory molecules and secretion of immune stimulatory cytokines. Then, dendritic cells are able to initiate an antigen specific immune response, making them an interesting target for vaccination strategies. Vaccination is one of the oldest and still most effective methods to prevent infectious diseases. Yet, eradication of intracellular pathogens and other diseases like cancer or strong infections remains a medical challenge. Thus, targeting antigens to dendritic cells via specific antibodies against surface receptors represents a successful approach to induce strong cytotoxic immune responses. Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin (DC-SIGN) is a C-type lectin receptor with a highly restricted expression on dendritic cells and certain macrophages in humans and has several functions as antigen uptake receptor. It therefore represents an ideal candidate for dendritic cell targeting. First *in vitro* and *in vivo* data demonstrated that specific antigen targeting via  $\alpha$ DC-SIGN antibodies strongly enhances antigen presentation. Simultaneously, it led to activation of dendritic cells and boosted antigen specific immune responses. In mice, eight DC-SIGN homologues were identified so far, but they show different function, expression pattern and ligand specificity than the human DC-SIGN. For this reason a conventional transgenic mouse model using the human DC-SIGN cDNA under control of the murine CD11c promoter was introduced and named hSIGN. This allowed analysing the follow-ups of antigen targeting of the human DC-SIGN with murine dendritic cells *in vitro* and within the mouse organism *in vivo*. In this study  $\alpha$ DC-SIGN antibodies coupled to the model protein Ovalbumin (OVA) were used ( $\alpha$ hDC-SIGN:OVA antibodies). The  $\alpha$ DC-SIGN antibodies originate from the previously described  $\alpha$ DC-SIGN antibody clone AZN-D1 that specifically recognizes the carbohydrate recognition domain of DC-SIGN. This work demonstrates that  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA antibodies enhance antigen presenta-

tion to and proliferation of OVA peptide specific CD8<sup>+</sup> OTI and CD4<sup>+</sup> OTII cells *in vitro*. Lowest antibody concentrations induced 20 times higher OTI cell proliferation than comparable amounts of OVA protein or isotype control. OTII cells instead only showed a 3–5 times higher proliferation. These results could be also confirmed by *in vivo* studies. Vaccination of hSIGN mice with  $\alpha$ hDC-SIGN:OVA antibodies together with the maturation signal  $\alpha$ CD40 induced strong proliferation of transferred OVA peptide specific CD8<sup>+</sup> OTI cells. Furthermore these cells showed cytotoxic properties. Again transferred OTII cells showed only low proliferation. Thus, the *in vitro* and *in vivo* studies of this work demonstrate that targeting DC-SIGN results in potent cross presentation and the induction of cytotoxic T-cells. Therefore, specific antibody targeting holds great promise for future vaccination strategies.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

Aarnoudse CA, Bax M, Sánchez-Hernández M, García-Vallejo JJ, van Kooyk Y, (2008). **Glycan modification of the tumor antigen gp100 targets DC-SIGN to enhance dendritic cell induced antigen presentation to T cells.** International journal of cancer Journal international du cancer 122:839-846

Aarntzen EHJG, Figdor CG, Adema GJ, Punt CJA, de Vries IJM, (2008). **Dendritic cell vaccination and immune monitoring.** Cancer immunology, immunotherapy : CII 57:1559-1568

Albrecht H, (2011). **Kommandeure der Selbstverteidigung.** Zeit Online - Gesundheit. Stand: 06.10.2011. <http://www.zeit.de/2011/41/Nobelpreis-Medizin>

Anguita J, Ramamoorthi N, Hovius JWR, Das S, Thomas V, Persinski R, Conze D, Askenase PW, Rincón M, Kantor FS, Fikrig E, (2002). **Salp15, an ixodes scapularis salivary protein, inhibits CD4(+) T cell activation.** Immunity 16:849-859

Apostolopoulos V, Barnes N, Pietersz GA, McKenzie IF, (2000a). **Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses.** Vaccine 18:3174-3184

Apostolopoulos V, Pietersz GA, Gordon S, Martinez-Pomares L, McKenzie IF, (2000b). **Aldehyde-mannan antigen complexes target the MHC class I antigen-presentation pathway.** European journal of immunology 30:1714-1723

Appelmelk BJ, van Die I, van Vliet SJ, Vandenbroucke-Grauls CMJE, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y, (2003). **Cutting edge: carbohydrate profiling identifies new pathogens that interact with dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin on dendritic cells.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 170:1635-1639

Baldwin SL, Shaverdian N, Goto Y, Duthie MS, Raman VS, Evers T, Mompoin F, Vedvick TS, Bertholet S, Coler RN, Reed SG, (2009). **Enhanced humoral and Type 1 cellular immune responses with Fluzone adjuvanted with a synthetic TLR4 agonist formulated in an emulsion.** Vaccine 27:5956-5963

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K, (2000). **Immunobiology of dendritic cells.** Annual review of immunology 18:767-811

Banchereau J, Steinman RM, (1998). **Dendritic cells and the control of immunity.** Nature 392:245-252

Bashirova AA, Geijtenbeek TB, van Duijnhoven GC, van Vliet SJ, Eilering JB, Martin MP, Wu L, Martin TD, Viebig N, Knolle PA, KewalRamani VN, van Kooyk Y, Carrington M, (2001). **A dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin (DC-SIGN)-related protein is highly expressed on human liver sinusoidal endothelial cells and promotes HIV-1 infection.** The Journal of experimental medicine 193:671-678

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR, (1998). **Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling.** Nature 393:478-480

Bergman MP, Engering A, Smits HH, van Vliet SJ, van Bodegraven AA, Wirth H-P, Kapsenberg ML, Vandenbroucke-Grauls CMJE, van Kooyk Y, Appelmek BJ, (2004). **Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN.** The Journal of experimental medicine 200:979-990

Birkholz K, Schwenkert M, Kellner C, Gross S, Fey G, Schuler-Thurner B, Schuler G, Schaft N, Dörrie J, (2010). **Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation.** Blood 116:2277-2285

Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM, (2002). **Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance.** The Journal of experimental medicine 196:1627-1638

Bonifaz LC, Bonnyay DP, Charalambous A, Darguste DI, Fujii S-I, Soares H, Brimnes MK, Moltedo B, Moran TM, Steinman RM, (2004). **In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination.** The Journal of experimental medicine 199:815-824

Borkowski TA, Letterio JJ, Farr AG, Udey MC, (1996). **A role for endogenous transforming growth factor beta 1 in Langerhans cell biology: the skin of transforming growth factor beta 1 null mice is devoid of epidermal Langerhans cells.** The Journal of experimental medicine 184:2417-2422

Breburda EE, Dambaeva SV, Slukvin II, Golos TG, (2006). **Selective distribution and pregnancy-specific expression of DC-SIGN at the maternal-fetal interface in the rhesus macaque: DC-SIGN is a putative marker of the recognition of pregnancy.** Placenta 27:11-21

Burgdorf S, Schölz C, Kautz A, Tampé R, Kurts C, (2008). **Spatial and mechanistic separation of cross-presentation and endogenous antigen presentation.** Nature immunology 9:558-566

Cambi A, Beeren I, Joosten B, Franssen JA, Figdor CG, (2009). **The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism.** European journal of immunology 39:1923-1928

Cambi A, Gijzen K, de Vries IJM, Torensma R, Joosten B, Adema GJ, Netea MG, Kullberg B-J, Romani L, Figdor CG, (2003). **The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for Candida albicans on dendritic cells.** European journal of immunology 33:532-538

Cambi A, Netea MG, Mora-Montes HM, Gow NAR, Hato SV, Lowman DW, Kullberg B-J, Torensma R, Williams DL, Figdor CG, (2008). **Dendritic cell interaction with Candida albicans critically depends on N-linked mannan.** The Journal of biological chemistry 283:20590-20599

Caminschi I, Lucas KM, O'Keeffe MA, Hochrein H, Laâbi Y, Brodnicki TC, Lew AM, Shortman K, Wright MD, (2001). **Molecular cloning of a C-type lectin superfamily protein differentially expressed by CD8alpha(-) splenic dendritic cells.** *Molecular immunology* 38:365-373

Caparrós E, Munoz P, Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Rodríguez-Fernández JL, Mellado M, Sancho J, Zubiaur M, Corbí AL, (2006). **DC-SIGN ligation on dendritic cells results in ERK and PI3K activation and modulates cytokine production.** *Blood* 107:3950-3958

Celis E, Chang TW, (1984). **Antibodies to hepatitis B surface antigen potentiate the response of human T lymphocyte clones to the same antigen.** *Science (New York, NY)* 224:297-299

Cruz LJ, Tacke PJ, Fokkink R, Joosten B, Stuart MC, Albericio F, Torensma R, Figdor CG, (2010). **Targeted PLGA nano- but not microparticles specifically deliver antigen to human dendritic cells via DC-SIGN in vitro.** *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 144:118-126

Curtis BM, Scharnowske S, Watson AJ, (1992). **Sequence and expression of a membrane-associated C-type lectin that exhibits CD4-independent binding of human immunodeficiency virus envelope glycoprotein gp120.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:8356-8360

de Vries IJM, Lesterhuis WJ, Scharenborg NM, Engelen LPH, Ruiter DJ, Gerritsen M-JP, Croockewit S, Britten CM, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG, Punt CJA, (2003). **Maturation of dendritic cells is a prerequisite for inducing immune responses in advanced melanoma patients.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 9:5091-5100

den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TBH, (2009). **Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses.** *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 58:1149-1157

Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N, (2001). **Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells.** *The Journal of experimental medicine* 193:233-238

Drickamer K, (1999). **C-type lectin-like domains.** *Current opinion in structural biology* 9:585-590

Dubensky TW, Reed SG, (2010). **Adjuvants for cancer vaccines.** *Seminars in immunology* 22:155-161

Dudziak D, Kamphorst AO, Heidkamp GF, Buchholz VR, Trumpfheller C, Yamazaki S, Cheong C, Liu K, Lee H-W, Park CG, Steinman RM, Nussenzweig MC, (2007). **Differential antigen processing by dendritic cell subsets in vivo.** *Science (New York, NY)* 315:107-111

Engering A, Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Wijers M, van Liempt E, Demaurex N, Lanzavecchia A, Fransen J, Figdor CG, Piguet V, van Kooyk Y, (2002a). **The**

**dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 168:2118-2126

Engering A, Van Vliet SJ, Geijtenbeek TBH, Van Kooyk Y, (2002b). **Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes.** Blood 100:1780-1786

Engering AJ, Cella M, Fluitsma D, Brockhaus M, Hoefsmit EC, Lanzavecchia A, Pieters J, (1997). **The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells.** European journal of immunology 27:2417-2425

Figdor CG, van Kooyk Y, Adema GJ, (2002). **C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells.** Nature reviews Immunology 2:77-84

Gaudart N, Ekpo P, Pattanapanyasat K, van Kooyk Y, Engering A, (2008). **Leptospira interrogans is recognized through DC-SIGN and induces maturation and cytokine production by human dendritic cells.** FEMS immunology and medical microbiology 53:359-367

Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Grabovsky V, Alon R, Figdor CG, van Kooyk Y, (2000a). **DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking.** Nature immunology 1:353-357

Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Middel J, Cornelissen IL, Nottet HS, KewalRamani VN, Littman DR, Figdor CG, van Kooyk Y, (2000b). **DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells.** Cell 100:587-597

Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet SJ, van Duijnhoven GC, Adema GJ, van Kooyk Y, Figdor CG, (2000c). **Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses.** Cell 100:575-585

Geijtenbeek TBH, Groot PC, Nolte MA, van Vliet SJ, Gangaram-Panday ST, van Duijnhoven GCF, Kraal G, van Oosterhout AJM, van Kooyk Y, (2002a). **Marginal zone macrophages express a murine homologue of DC-SIGN that captures blood-borne antigens in vivo.** Blood 100:2908-2916

Geijtenbeek TBH, van Duijnhoven GCF, van Vliet SJ, Krieger E, Vriend G, Figdor CG, van Kooyk Y, (2002b). **Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1.** The Journal of biological chemistry 277:11314-11320

Geijtenbeek TBH, van Vliet SJ, Engering A, 't Hart BA, van Kooyk Y, (2004). **Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells.** Annual review of immunology 22:33-54

Geijtenbeek TBH, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandebroucke-Grauls CMJE, Appelmek B, Van Kooyk Y, (2003). **Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function.** The Journal of experimental medicine 197:7-17

Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH, (2007). **C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB.** *Immunity* 26:605-616

Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ, (1997). **The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.** *The Journal of experimental medicine* 185:1101-1111

Guo M, Gong S, Maric S, Misulovin Z, Pack M, Mahnke K, Nussenzweig MC, Steinman RM, (2000). **A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells.** *Human immunology* 61:729-738

Guy B, (2007). **The perfect mix: recent progress in adjuvant research.** *Nature reviews Microbiology* 5:505-517

Hawiger D, Inaba K, Dorsett Y, Guo M, Mahnke K, Rivera M, Ravetch JV, Steinman RM, Nussenzweig MC, (2001). **Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo.** *The Journal of experimental medicine* 194:769-779

He D, Wu L, Kim HK, Li H, Elmets CA, Xu H, (2006). **CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 177:6852-6858

He L-Z, Crocker A, Lee J, Mendoza-Ramirez J, Wang X-T, Vitale LA, O'Neill T, Petromilli C, Zhang H-F, Lopez J, Rohrer D, Keler T, Clynes R, (2007). **Antigenic targeting of the human mannose receptor induces tumor immunity.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178:6259-6267

Heath WR, Belz GT, Behrens GMN, Smith CM, Forehan SP, Parish IA, Davey GM, Wilson NS, Carbone FR, Villadangos JA, (2004). **Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens.** *Immunological reviews* 199:9-26

Hesse C, Ginter W, Förg T, Mayer CT, Baru AM, Arnold-Schrauf C, Unger WWJ, Kalay H, van Kooyk Y, Berod L, Sparwasser T, (2013). **In vivo targeting of human DC-SIGN drastically enhances CD8(+) T-cell-mediated protective immunity.** *European journal of immunology* 43:2543-2553

Hodges A, Sharrocks K, Edelmann M, Baban D, Moris A, Schwartz O, Drakesmith H, Davies K, Kessler B, McMichael A, Simmons A, (2007). **Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication.** *Nature immunology* 8:569-577

Hof H, Dörries R, **Immunologie.** In: "Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie", Bob, A. and Bob, K. (Hrsg.), Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005, 3. Auflage, 52-131

Hunt JS, Morales PJ, Pace JL, Fazleabas AT, Langat DK, (2007). **A commentary on gestational programming and functions of HLA-G in pregnancy.** Placenta 28 Suppl A:S57-63

Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM, (1993). **Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90:3038-3042

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM, (1992). **Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.** The Journal of experimental medicine 176:1693-1702

Institut RK, (2007). **Schutzimpfungen – 20 Einwände und Antworten des Robert Koch-Instituts und des Paul-Ehrlich-Instituts.** Stand: 28.09.2013. [http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/Bedeutung/Schutzimpfungen\\_20\\_Einwaende.html](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Impfen/Bedeutung/Schutzimpfungen_20_Einwaende.html)

Ito T, Inaba M, Inaba K, Toki J, Sogo S, Iguchi T, Adachi Y, Yamaguchi K, Amakawa R, Valladeau J, Saeland S, Fukuhara S, Ikehara S, (1999). **A CD1a+/CD11c+ subset of human blood dendritic cells is a direct precursor of Langerhans cells.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 163:1409-1419

Ito T, Liu Y-J, Kadowaki N, (2005). **Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets.** International journal of hematology 81:188-196

Janeway CA, (2001). **How the immune system works to protect the host from infection: a personal view.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 98:7461-7468

Janeway CA, Medzhitov R, (2002). **Innate immune recognition.** Annual review of immunology 20:197-216

Johnson TS, Mahnke K, Storn V, Schönfeld K, Ring S, Nettelbeck DM, Haisma HJ, Le Gall F, Kontermann RE, Enk AH, (2008). **Inhibition of melanoma growth by targeting of antigen to dendritic cells via an anti-DEC-205 single-chain fragment variable molecule.** Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 14:8169-8177

Kalia V, Sarkar S, Gourley TS, Rouse BT, Ahmed R, (2006). **Differentiation of memory B and T cells.** Current opinion in immunology 18:255-264

Kato M, McDonald KJ, Khan S, Ross IL, Vuckovic S, Chen K, Munster D, MacDonald KPA, Hart DNJ, (2006). **Expression of human DEC-205 (CD205) multilectin receptor on leukocytes.** International immunology 18:857-869

Kaufmann SHE, (2007). **The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines.** Nature reviews Microbiology 5:491-504



- Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I, (1983). **Isolation and characterization of a mannan-binding protein from human serum.** Journal of biochemistry 94:937-947
- Keler T, Ramakrishna V, Fanger MW, (2004). **Mannose receptor-targeted vaccines.** Expert opinion on biological therapy 4:1953-1962
- Khoo U-S, Chan KYK, Chan VSF, Lin CLS, (2008). **DC-SIGN and L-SIGN: the SIGNS for infection.** Journal of molecular medicine (Berlin, Germany) 86:861-874
- Kool M, Pétrilli V, De Smedt T, Rolaz A, Hammad H, van Nimwegen M, Bergen IM, Castillo R, Lambrecht BN, Tschopp J, (2008a). **Cutting edge: alum adjuvant stimulates inflammatory dendritic cells through activation of the NALP3 inflammasome.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 181:3755-3759
- Kool M, Soullié T, van Nimwegen M, Willart MAM, Muskens F, Jung S, Hoogsteden HC, Hammad H, Lambrecht BN, (2008b). **Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells.** The Journal of experimental medicine 205:869-882
- Koppel EA, van Gisbergen KPJM, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y, (2005). **Distinct functions of DC-SIGN and its homologues L-SIGN (DC-SIGNR) and mSIGNR1 in pathogen recognition and immune regulation.** Cellular microbiology 7:157-165
- Koyasu S, Moro K, (2011). **Type 2 innate immune responses and the natural helper cell.** Immunology 132:475-481
- Kretz-Rommel A, Qin F, Dakappagari N, Torensma R, Faas S, Wu D, Bowdish KS, (2007). **In vivo targeting of antigens to human dendritic cells through DC-SIGN elicits stimulatory immune responses and inhibits tumor growth in grafted mouse models.** Journal of immunotherapy (Hagerstown, Md : 1997) 30:715-726
- Kupferschmidt K, (2011). **Ehrung für einen Toten.** Zeit Online - Gesundheit. Stand: 03.10.2011. <http://www.zeit.de/wissen/gesundheit/2011-10/nobelpreis-medizin-steinman>
- Leenen PJ, Radosević K, Voerman JS, Salomon B, van Rooijen N, Klatzmann D, van Ewijk W, (1998). **Heterogeneity of mouse spleen dendritic cells: in vivo phagocytic activity, expression of macrophage markers, and subpopulation turnover.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 160:2166-2173
- Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, Momburg F, Arnold B, Knolle PA, (2000). **Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance.** Nature medicine 6:1348-1354
- Linehan SA, Martínez-Pomares L, Stahl PD, Gordon S, (1999). **Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells.** The Journal of experimental medicine 189:1961-1972

Liu Y, Janeway CA, (1992). **Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 89:3845-3849

Loré K, Betts MR, Brenchley JM, Kuruppu J, Khojasteh S, Perfetto S, Roederer M, Seder RA, Koup RA, (2003). **Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 171:4320-4328

Ludwig IS, Lekkerkerker AN, Depla E, Bosman F, Musters RJP, Depraetere S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH, (2004). **Hepatitis C virus targets DC-SIGN and L-SIGN to escape lysosomal degradation.** Journal of virology 78:8322-8332

Luster AD, Tager AM, (2004). **T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way.** Nature reviews Immunology 4:711-724

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N, Schuler G, (1999). **An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow.** Journal of immunological methods 223:77-92

Lyman SD, Jacobsen SE, (1998). **c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities.** Blood 91:1101-1134

Mahnke K, Qian Y, Fondel S, Brueck J, Becker C, Enk AH, (2005). **Targeting of antigens to activated dendritic cells in vivo cures metastatic melanoma in mice.** Cancer research 65:7007-7012

Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH, (2003). **Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells.** Blood 101:4862-4869

Maldonado-López R, De Smedt T, Michel P, Godfroid J, Pajak B, Heirman C, Thielemans K, Leo O, Urbain J, Moser M, (1999). **CD8alpha+ and CD8alpha- subclasses of dendritic cells direct the development of distinct T helper cells in vivo.** The Journal of experimental medicine 189:587-592

Manz MG, Traver D, Akashi K, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL, (2001a). **Dendritic cell development from common myeloid progenitors.** Annals of the New York Academy of Sciences 938:167-173; discussion 173-164

Manz MG, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K, (2001b). **Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors.** Blood 97:3333-3341

Maraskovsky E, Daro E, Roux E, Teepe M, Maliszewski CR, Hoek J, Caron D, Lebsack ME, McKenna HJ, (2000). **In vivo generation of human dendritic cell subsets by Flt3 ligand.** Blood 96:878-884

Marlin R, Nugeyre M-T, de Truchis C, Berkane N, Gervaise A, Barré-Sinoussi F, Menu E, (2009). **Antigen-presenting cells represent targets for R5 HIV-1 infection in the first trimester pregnancy uterine mucosa.** PloS one 4:e5971

Martinez-Pomares L, Hanitsch LG, Stillion R, Keshav S, Gordon S, (2005). **Expression of mannose receptor and ligands for its cysteine-rich domain in venous sinuses of human spleen.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 85:1238-1249

Maxwell JR, Ruby C, Kerkvliet NI, Vella AT, (2002). **Contrasting the roles of costimulation and the natural adjuvant lipopolysaccharide during the induction of T cell immunity.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 168:4372-4381

McKenzie EJ, Taylor PR, Stillion RJ, Lucas AD, Harris J, Gordon S, Martinez-Pomares L, (2007). **Mannose receptor expression and function define a new population of murine dendritic cells.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 178:4975-4983

Meyer S, van Liempt E, Imberty A, van Kooyk Y, Geyer H, Geyer R, van Die I, (2005). **DC-SIGN mediates binding of dendritic cells to authentic pseudo-LewisY glycolipids of Schistosoma mansoni cercariae, the first parasite-specific ligand of DC-SIGN.** *The Journal of biological chemistry* 280:37349-37359

Mitchell DA, Fadden AJ, Drickamer K, (2001). **A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands.** *The Journal of biological chemistry* 276:28939-28945

Murphy EE, Terres G, Macatonia SE, Hsieh CS, Mattson J, Lanier L, Wysocka M, Trinchieri G, Murphy K, O'Garra A, (1994). **B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation.** *The Journal of experimental medicine* 180:223-231

Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A, (2005). **Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells.** *Nature immunology* 6:769-776

O'Hagan DT, MacKichan ML, Singh M, (2001). **Recent developments in adjuvants for vaccines against infectious diseases.** *Biomolecular engineering* 18:69-85

O'Keeffe M, Hochrein H, Vremec D, Pooley J, Evans R, Woulfe S, Shortman K, (2002). **Effects of administration of progenipoietin 1, Flt-3 ligand, granulocyte colony-stimulating factor, and pegylated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on dendritic cell subsets in mice.** *Blood* 99:2122-2130

Peters JH, Gieseler R, Thiele B, Steinbach F, (1996). **Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants.** *Immunology today* 17:273-278

Powlesland AS, Ward EM, Sadhu SK, Guo Y, Taylor ME, Drickamer K, (2006). **Widely divergent biochemical properties of the complete set of mouse DC-SIGN-related proteins.** *The Journal of biological chemistry* 281:20440-20449

Pulendran B, Ahmed R, (2006). **Translating innate immunity into immunological memory: implications for vaccine development.** Cell 124:849-863

Pulendran B, Lingappa J, Kennedy MK, Smith J, Teepe M, Rudensky A, Maliszewski CR, Maraskovsky E, (1997). **Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 159:2222-2231

Pulendran B, Smith JL, Caspary G, Brasel K, Pettit D, Maraskovsky E, Maliszewski CR, (1999). **Distinct dendritic cell subsets differentially regulate the class of immune response in vivo.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96:1036-1041

Quezada SA, Jarvinen LZ, Lind EF, Noelle RJ, (2004). **CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity.** Annual review of immunology 22:307-328

Ramakrishna V, Trembl JF, Vitale L, Connolly JE, O'Neill T, Smith PA, Jones CL, He L-Z, Goldstein J, Wallace PK, Keler T, Endres MJ, (2004). **Mannose receptor targeting of tumor antigen pmel17 to human dendritic cells directs anti-melanoma T cell responses via multiple HLA molecules.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 172:2845-2852

Reid CD, Stackpoole A, Meager A, Tikerpae J, (1992). **Interactions of tumor necrosis factor with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and other cytokines in the regulation of dendritic cell growth in vitro from early bipotent CD34+ progenitors in human bone marrow.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 149:2681-2688

Relloso M, Puig-Kröger A, Pello OM, Rodríguez-Fernández JL, de la Rosa G, Longo N, Navarro J, Muñoz-Fernández MA, Sánchez-Mateos P, Corbí AL, (2002). **DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 168:2634-2643

Requena M, Bouhlal H, Nasreddine N, Saidi H, Gody J-C, Aubry S, Grésenguet G, Kazatchkine MD, Sekaly R-P, Bélec L, Hocini H, (2008). **Inhibition of HIV-1 transmission in trans from dendritic cells to CD4+ T lymphocytes by natural antibodies to the CRD domain of DC-SIGN purified from breast milk and intravenous immunoglobulins.** Immunology 123:508-518

Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G, (1994). **Proliferating dendritic cell progenitors in human blood.** The Journal of experimental medicine 180:83-93

Santiago-Schwarz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE, (1992). **TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages.** Journal of leukocyte biology 52:274-281

Saveanu L, Carroll O, Weimershaus M, Guermonprez P, Firat E, Lindo V, Greer F, Davoust J, Kratzer R, Keller SR, Niedermann G, van Endert P, (2009). **IRAP identifies an endosomal compartment required for MHC class I cross-presentation.** Science (New York, NY) 325:213-217

Schaefer M, Reiling N, Fessler C, Stephani J, Taniuchi I, Hatam F, Yildirim AO, Fehrenbach H, Walter K, Ruland J, Wagner H, Ehlers S, Sparwasser T, (2008). **Decreased pathology and prolonged survival of human DC-SIGN transgenic mice during mycobacterial infection.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 180:6836-6845

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Ofringa R, Melief CJ, (1998). **T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions.** Nature 393:480-483

Seder RA, Hill AV, (2000). **Vaccines against intracellular infections requiring cellular immunity.** Nature 406:793-798

Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B, (1992). **The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice.** The Journal of experimental medicine 176:1091-1098

Shortman K, Caux C, (1997). **Dendritic cell development: multiple pathways to nature's adjuvants.** Stem cells (Dayton, Ohio) 15:409-419

Shortman K, Liu Y-J, (2002). **Mouse and human dendritic cell subtypes.** Nature reviews Immunology 2:151-161

Shurin MR, Pandharipande PP, Zorina TD, Haluszczak C, Subbotin VM, Hunter O, Brumfield A, Storkus WJ, Maraskovsky E, Lotze MT, (1997). **FLT3 ligand induces the generation of functionally active dendritic cells in mice.** Cellular immunology 179:174-184

Singh SK, Stephani J, Schaefer M, Kalay H, García-Vallejo JJ, den Haan J, Saeland E, Sparwasser T, van Kooyk Y, (2009). **Targeting glycan modified OVA to murine DC-SIGN transgenic dendritic cells enhances MHC class I and II presentation.** Molecular immunology 47:164-174

Snider DP, Kaubisch A, Segal DM, (1990). **Enhanced antigen immunogenicity induced by bispecific antibodies.** The Journal of experimental medicine 171:1957-1963

Snider DP, Segal DM, (1987). **Targeted antigen presentation using crosslinked antibody heteroaggregates.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 139:1609-1616

Soilleux EJ, Barten R, Trowsdale J, (2000). **DC-SIGN; a related gene, DC-SIGNR; and CD23 form a cluster on 19p13.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 165:2937-2942

Soilleux EJ, Morris LS, Lee B, Pöhlmann S, Trowsdale J, Doms RW, Coleman N, (2001). **Placental expression of DC-SIGN may mediate intrauterine vertical transmission of HIV.** The Journal of pathology 195:586-592

Soilleux EJ, Morris LS, Leslie G, Chehimi J, Luo Q, Levroney E, Trowsdale J, Montaner LJ, Doms RW, Weissman D, Coleman N, Lee B, (2002). **Constitutive and induced expression of DC-SIGN on dendritic cell and macrophage subpopulations in situ and in vitro.** Journal of leukocyte biology 71:445-457

Sokol CL, Barton GM, Farr AG, Medzhitov R, (2008). **A mechanism for the initiation of allergen-induced T helper type 2 responses.** Nature immunology 9:310-318

Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, Wagner H, (1998). **Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells.** European journal of immunology 28:2045-2054

Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H, (2000). **Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins.** European journal of immunology 30:3591-3597

Speiser DE, Romero P, (2010). **Molecularly defined vaccines for cancer immunotherapy, and protective T cell immunity.** Seminars in immunology 22:144-154

Stary G, Bangert C, Tauber M, Strohal R, Kopp T, Stingl G, (2007). **Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells.** The Journal of experimental medicine 204:1441-1451

Steinman RM, (1991). **The dendritic cell system and its role in immunogenicity.** Annual review of immunology 9:271-296

Steinman RM, (2000). **DC-SIGN: a guide to some mysteries of dendritic cells.** Cell 100:491-494

Steinman RM, Banchereau J, (2007). **Taking dendritic cells into medicine.** Nature 449:419-426

Stephani J, (2008). **Dendritic cell-based immunotherapy – implications for novel vaccines from transgenic hSIGN and HUT9 mice.** Technische Universität München

Strobl H, Bello-Fernandez C, Riedl E, Pickl WF, Majdic O, Lyman SD, Knapp W, (1997). **flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions.** Blood 90:1425-1434

Tacke PJ, de Vries IJM, Gijzen K, Joosten B, Wu D, Rother RP, Faas SJ, Punt CJA, Torensma R, Adema GJ, Figdor CG, (2005). **Effective induction of naive**

**and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody.** Blood 106:1278-1285

Tacke PJ, de Vries IJM, Torensma R, Figdor CG, (2007). **Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting.** Nature reviews Immunology 7:790-802

Tacke PJ, Figdor CG, (2011). **Targeted antigen delivery and activation of dendritic cells in vivo: steps towards cost effective vaccines.** Seminars in immunology 23:12-20

Tacke PJ, Ginter W, Berod L, Cruz LJ, Joosten B, Sparwasser T, Figdor CG, Cambi A, (2011). **Targeting DC-SIGN via its neck region leads to prolonged antigen residence in early endosomes, delayed lysosomal degradation, and cross-presentation.** Blood 118:4111-4119

Tacke PJ, Ter Huurne M, Torensma R, Figdor CG, (2012). **Antibodies and carbohydrate ligands binding to DC-SIGN differentially modulate receptor trafficking.** European journal of immunology 42:1989-1998

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA, (2003). **DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells.** The Journal of experimental medicine 197:823-829

Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL, (2000). **Development of CD8 $\alpha$ -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor.** Science (New York, NY) 290:2152-2154

Trumfheller C, Longhi MP, Caskey M, Idoyaga J, Bozzacco L, Keler T, Schlesinger SJ, Steinman RM, (2012). **Dendritic cell-targeted protein vaccines: a novel approach to induce T-cell immunity.** Journal of internal medicine 271:183-192

Unger WWJ, van Beelen AJ, Bruijns SC, Joshi M, Fehres CM, van Bloois L, Verstege MI, Ambrosini M, Kalay H, Nazmi K, Bolscher JG, Hooijberg E, de Gruij TD, Storm G, van Kooyk Y, (2012). **Glycan-modified liposomes boost CD4 $^{+}$  and CD8 $^{+}$  T-cell responses by targeting DC-SIGN on dendritic cells.** Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society 160:88-95

van Die I, van Vliet SJ, Nyame AK, Cummings RD, Bank CMC, Appelmelk B, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y, (2003). **The dendritic cell-specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for Schistosoma mansoni egg antigens and recognizes the glycan antigen Lewis x.** Glycobiology 13:471-478

van Gisbergen KPJM, Ludwig IS, Geijtenbeek TBH, van Kooyk Y, (2005). **Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils.** FEBS letters 579:6159-6168

van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH, (2003). **DC-SIGN: escape mechanism for pathogens.** Nature reviews Immunology 3:697-709

- Van Liempt E, Imberty A, Bank CMC, Van Vliet SJ, Van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH, Van Die I, (2004). **Molecular basis of the differences in binding properties of the highly related C-type lectins DC-SIGN and L-SIGN to Lewis X trisaccharide and Schistosoma mansoni egg antigens.** The Journal of biological chemistry 279:33161-33167
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B, (2006). **TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.** Immunity 24:179-189
- Vremec D, Pooley J, Hochrein H, Wu L, Shortman K, (2000). **CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen.** Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950) 164:2978-2986
- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K, (1992). **The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells.** The Journal of experimental medicine 176:47-58
- Watts C, West MA, Zaru R, (2010). **TLR signalling regulated antigen presentation in dendritic cells.** Current opinion in immunology 22:124-130
- WHO, (2011). **World Health Statistics 2011.**
- Wintergerst E, Manz-Keinke H, Plattner H, Schlepper-Schäfer J, (1989). **The interaction of a lung surfactant protein (SP-A) with macrophages is mannose dependent.** European journal of cell biology 50:291-298
- Witmer-Pack MD, Swiggard WJ, Mirza A, Inaba K, Steinman RM, (1995). **Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues.** Cellular immunology 163:157-162
- Wollenberg A, Mommaas M, Oppel T, Schottdorf E-M, Günther S, Moderer M, (2002). **Expression and function of the mannose receptor CD206 on epidermal dendritic cells in inflammatory skin diseases.** The Journal of investigative dermatology 118:327-334
- Wu L, D'Amico A, Hochrein H, O'Keeffe M, Shortman K, Lucas K, (2001). **Development of thymic and splenic dendritic cell populations from different hemopoietic precursors.** Blood 98:3376-3382
- Wu L, Liu Y-J, (2007). **Development of dendritic-cell lineages.** Immunity 26:741-750



## 8 DANKSAGUNG

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Dirk Busch, der sich nach dem Wechsel von Prof. Dr. med. Tim Sparwasser an die Medizinische Hochschule Hannover sogleich bereit erklärt hat, meine Betreuung an der TU München zu übernehmen. Ein großer Dank geht an meinen Betreuer Univ.-Prof. Dr. Tim Sparwasser, der mir ermöglicht hat, meine Dissertation in seinem Labor zu erstellen. Die kritische Betrachtung meiner Ergebnisse und die weiterführenden Diskussionen waren eine ständige Motivation für meine Forschungstätigkeit und unerlässlich für den Erfolg meiner Arbeit.

Danken möchte ich meiner ganzen Laborgruppe für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre, allen voran Christian Mayer und Martina Thiele, die mich von Anfang an im Labor bei allen Versuchen unterstützen und meine vielen Fragen geduldig beantworteten. Danke auch an Christian für die Hilfe bei der Korrektur meiner Arbeit. Ein großes Dankeschön geht an Stephanie Dippel, die mir im Umgang mit den Mäusen und der PCR viele hilfreiche Tipps gab. Für die hilfreichen Gedanken zu meiner Arbeit und die geduldige Korrektur möchte ich Wiebke Ginter und Christina Hesse danken. Danke sagen möchte ich außerdem den beiden Sekretärinnen Janika Quindt und Carmen Bäuerle, die sich immer schnell um meine Anliegen kümmerten und die bürokratischen Hürden vereinfachten.

Danken will ich weiterhin zwei ehemaligen Mitarbeitern des TWINCORE Instituts in Hannover, Dr. Bastian Höchst und Dr. Christiane Meller, die mich stets unterstützten und mich in meiner Arbeit ermutigten. Danke für die vielen schönen Gespräche und die Anregungen zur Korrektur meiner Doktorarbeit. Danke Christiane und Rupert, dass ich in Euch so gute Freunde gefunden habe!

Ein besonderer Dank gilt auch Hermine Wenzlaff, die mir in technischen Fragen rund um Word und Endnote zur Seite stand und mich immer erfolgreich motiviert hat.

Ohne die stetige ideelle und finanzielle Förderung meiner Familie wären mein Studium und die Verwirklichung meiner Pläne nicht möglich gewesen. Danke, dass ihr mich immer unterstützt habt und ich in allen Situationen auf eine liebevolle

und verständnisvolle Familie hoffen kann. Ich möchte diese Arbeit meinen Eltern widmen.

Niko, danke, dass du immer für mich da bist und mir in den letzten sieben Jahren mit Liebe, Nähe, Verständnis und Motivation in allen Lebenslagen zur Seite gestanden hast.

Zum Schluss geht ein Dank an all diejenigen, die mir in den letzten Jahren sehr nahe standen und deren Freundschaft ich schätze. Melanie Sappl, Maresa Demmel, Julia Anna Kuck, Martina Heimpel, Anja Stundl, Béatrice Bieber, Lisa Gross, Clemens Haudum, Florian Liebl, Harry Roßberger und Andreas Schindler.