

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Abteilung für Molekulare Innere Medizin
Leiter der Abteilung: Prof. Dr. Harald Wajant

Entwicklung CD40/DC-stimulierender rekombinanter Proteine mit Tumorantigen-restringierter Aktivität

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von
Corinna Andrea Strohm
aus Heilbronn

Würzburg, April 2013

Referent: Univ.-Prof. Dr. Harald Wajant

Korreferent: Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2013

Die Promovendin ist Zahnärztin.

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die zentrale Rolle dendritischer Zellen bei der Immunabwehr	1
1.2	Immuntherapie von Tumoren	2
1.2.1	Rituximab.....	3
1.2.2	Maligne Lymphome.....	4
1.3	Mögliche Anwendungen von scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteinen in der Tumorthherapie	5
1.4	CD40 und sein Ligand als Ansatzpunkt in der Tumorimmuntherapie	7
1.5	Ziel der Arbeit.....	9
2	Material	10
2.1	Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien	10
2.2	Antikörper	12
2.3	Zellen.....	13
2.3.1	Prokaryotische Zellen	13
2.3.2	Eukaryotische Zellen.....	13
2.4	Plasmide und Fusionsproteine	14
2.5	Verbrauchsmaterial und Geräte	14
2.6	Lösungen und Puffer	16
2.7	Kommerzielle Kits.....	18
3	Methoden.....	19
3.1	Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien	19
3.1.1	Kultivierung adhärenter Zelllinien und Suspensionszelllinien.....	19
3.2	Isolierung, Kultivierung und Stimulation primärer Zellen.....	19
3.2.1	PBMC-Aufreinigung (Fikoll) zur MACS-Separation von Monozyten.....	19
3.2.2	Herstellung dendritischer Zellen.....	20
3.3	FACS-Analyse	20
3.4	Kokulturen	21

3.5	Bestimmung der IL-12 Produktion mittels ELISA.....	22
3.6	Klonierung rekombinanter Fusionsproteine	23
3.6.1	Transformation kompetenter Zellen	23
3.6.2	Isolierung von DNA aus E. coli.....	23
3.7	Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine	24
3.7.1	Expression durch transiente Transfektanten.....	24
3.7.2	Expression durch stabile Transfektanten	24
3.7.3	Aufreinigung durch Affinitätschromatographie	25
3.8	Western Blot.....	25
3.8.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	25
3.8.2	Elektrotransfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran.....	26
3.8.3	Immundetektion	27
3.8.4	Qualitative Analyse durch Silberfärbung	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Präparation und Reifungskontrolle von iDCs	28
4.2	FAP-abhängige Aktivierung von iDCs	30
4.3	Herstellung und Reinigung eines scFv-CD40L-Fusionsproteins welches CD20-abhängig iDCs aktiviert	32
4.4	CD20-Expression von BJAB- und Jurkat-Zellen	35
4.5	CD20-abhängige Aktivierung von unreifen dendritischen Zellen	35
4.6	Inhibition der CD20-restringierten iDC-Stimulation durch das Fusionsprotein anti-CD20-Flag-CD40L mit Rituximab (anti-CD20) als kompetitivem Antikörper	36
4.7	Tumorantigen-restringierte Aktivierung dendritischer Zellen als allgemein anwendbares Prinzip	39
5	Diskussion.....	44
6	Zusammenfassung	48
7	Literaturverzeichnis.....	50

8 Anhang 54

8.1 DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine..... 54

8.2 Abkürzungsverzeichnis..... 56

9 Danksagung

10 Lebenslauf

1 Einleitung

1.1 Die zentrale Rolle dendritischer Zellen bei der Immunabwehr

Um sich vor Krankheiten zu schützen und Krankheitserreger wirksam abzuwehren, besitzt der Körper das Immunsystem. Die Funktion dieses lebenswichtigen Systems basiert auf einer Reihe von Abläufen: zunächst erfolgt die immunologische Erkennung, das heißt das Vorhandensein einer Infektion muss von Leukozyten des angeborenen Immunsystems und von Lymphozyten des adaptiven Immunsystems erkannt werden (Janeway & Medzhitov, 2002). Eine besondere Rolle nehmen hierbei dendritische Zellen ein (Kushwah & Hu, 2011). Werden Pathogene wie zum Beispiel Bakterien oder ihre Toxine erkannt, müssen diese bekämpft und wenn möglich abgewehrt werden. Dabei muss sich das Immunsystem auch selbst regulieren und eine erfolgte Immunantwort wieder beenden können (Immunregulation). Findet keine adäquate Immunregulation statt, zum Beispiel bei einer Dysregulation der Aktivierung dendritischer Zellen, kann der Körper durch Allergien und Autoimmunerkrankungen Schaden nehmen (Gommerman & Summers deLuca, 2011). Eine besondere Funktion des adaptiven Immunsystems ist nach erfolgreicher Abwehr der Krankheitserreger die Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mit schützender Immunität. Wie bereits angedeutet spielen dendritische Zellen (DC, Dendritic Cell) eine zentrale Rolle bei der Immunantwort (Banchereau & Steinman, 1998). DCs sind besonders spezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC, Antigen Presenting Cell), das heißt spezialisierte phagozytierende Zellen, die Krankheitserreger aufnehmen und deren Antigene an T-Lymphozyten präsentieren können (Banchereau & Steinman, 1998). Mit dieser Funktion sind sie für eine effektive Eliminierung von Pathogenen und Tumoren durch das adaptive Immunsystem zuständig (Gommerman & Summers deLuca, 2011). Die Besonderheit ist dabei, dass DCs mit der Antigenpräsentation naive T-Lymphozyten direkt zu aktivieren vermögen und damit eine adaptive Immunantwort auslösen. Dies ist anderen APCs wie Makrophagen und B-Zellen nicht direkt möglich (Ouaaz et al., 2002). B-Zellen zum Beispiel werden ohne Hilfe von bereits aktivierten T-Helfer-Zellen

durch viele Antigene nicht selbst aktiviert. Das bedeutet, dass die Stimulation von naiven T-Lymphozyten durch dendritische Zellen bei allen Immunantworten essentiell ist (Banchereau & Steinman, 1998).

1.2 Immuntherapie von Tumoren

Tumore können sich auf vielfältige Weise einer Immunantwort oder Immunüberwachung entziehen. Die Beziehung zwischen Immunsystem und Tumor ist dabei komplex: Wie Schreiber et. al. 2011 beschreibt, kommt es zunächst zu einer Eliminierungsphase, bei der das Immunsystem Tumorzellen erkennt und bekämpft. War die Zerstörung des Tumors unvollständig, ist es ihm in der anschließenden Gleichgewichtsphase möglich, sich unter dem Selektionsdruck des Immunsystems durch Mutationen zu verändern. So entstehen Tumorzellvarianten, die einer Eliminierung durch das Immunsystem besser widerstehen, indem sie beispielsweise gewisse Oberflächenmoleküle nicht mehr exprimieren, über die das Immunsystem sie ursprünglich angreifen konnte. Schließlich kommt es zur Entkommensphase: durch ausreichend viele Mutationen hat sich der Tumor der Achtsamkeit des Immunsystems entzogen und kann nun ungehindert wachsen (Schreiber et al., 2011).

Um diesem fatalen Mechanismus entgegenzuwirken wäre es wünschenswert, zur Bekämpfung einer Tumorerkrankung eine Immunantwort zu induzieren oder Medikamente zu entwickeln, die zwischen Tumorzellen und gesunden Körperzellen unterscheiden können, so wie dies bei der selektiven Toxizität durch Antibiotika der Fall ist. Antibiotika sind toxisch für in den Körper eingedrungene Mikroorganismen, nicht jedoch für den Wirt, da sie Strukturen anvisieren, die bei menschlichen Zellen nicht vorkommen. Tumore entstehen jedoch durch progressives, sowie auch aggressives Wachstum entarteter Körperzellen, die eine selektive Bekämpfung unmöglich erscheinen lassen. Zu den gängigen Therapieverfahren von Tumorleiden gehören bislang die möglichst vollständige chirurgische Resektion, medikamentöse Tumortherapien (zum Beispiel Chemotherapie) und die Radiotherapie.

Es gibt jedoch Strukturen auf Tumorzellen, wie zum Beispiel bestimmte Membranrezeptoren, die Tumorzellen von anderen Körperzellen bzw. von der großen Mehrzahl anderer Körperzellen unterscheiden (Weiner et al., 2012). Dies ermöglicht eine gezielte Krebstherapie, das heißt die Entwicklung von Reagenzien, die gezielt gegen Tumorzellen gerichtet sind, da die Merkmale, gegen die sie sich richten, auf Körperzellen kaum oder nicht vorhanden sind. Die Krebsimmuntherapie stellt eine Form der gezielten Krebstherapie dar. Da das Immunsystem einen zentralen Einfluss auf die Bekämpfung, aber auch Entstehung von Tumorerkrankungen sowie auf ihren Verlauf hat, wird mit zahlreichen Ansätzen direkt oder indirekt versucht, über das Immunsystem selbst in das Tumorgeschehen einzugreifen. Dies gelingt zum Beispiel durch Stimulation von Immunzellen oder durch Auslösen einer Immunantwort aufgrund der Opsonierung (Markierung) von Tumorzellen mit monoklonalen Antikörpern (Weiner et al., 2012). Die Aktivität des Immunsystems stellt einen nicht zu vernachlässigenden Faktor für die Prognose eines Tumorleidens dar (Schreiber et al., 2011). Darum werden Strategien entworfen, welche die Fähigkeit des Immunsystems Tumorzellen zu zerstören verstärken.

In der Tat schwächen die derzeitigen Tumortherapien die Funktionen des Immunsystems enorm. Denn eine Radiochemotherapie zerstört neben Tumorgewebe auch gesundes Körpergewebe sowie vor allem die Zellen des Immunsystems. Deshalb ist es wichtig, im Bereich der Krebsimmuntherapie Alternativen bzw. unterstützende immunstimulatorische Maßnahmen für eine Tumorbehandlung zu finden.

1.2.1 Rituximab

Durch Entwicklung Tumorantigen-spezifischer monoklonaler Antikörper gelang mit Einführung von Rituximab im November 1997 der Durchbruch der gezielten Krebstherapie (Borker & Choudhary, 2011). Rituximab (anti-CD20) ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der an membranständiges CD20 von B-Lymphozyten bindet (Abdulla et al., 2012). Durch Bindung an CD20 bewirkt Rituximab eine schnelle Depletion von B-Zellen (Borker & Choudhary, 2011). Dies beruht dabei auf der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC, Anti-

body-Dependent Cellular Cytotoxicity), der komplementabhängigen Zytotoxizität (CDC, Complement-Dependent Cytotoxicity) sowie Apoptoseinduktion (Bremer et al., 2008). CD20 eignet sich hervorragend als Ziel einer Tumormimmuntherapie mit monoklonalen Antikörpern, da es ausschließlich auf B-Zellen und dort in hoher Zahl exprimiert wird (Amoroso et al., 2011). Es wird in der Krebsimmuntherapie erfolgreich gegen maligne CD20-positive Lymphome eingesetzt, aber auch bei rheumatoider Arthritis, wenn eine anti-Tumornekrosefaktor (anti-TNF)-Therapie nicht anspricht, sowie bei anderen B-Zell abhängigen Autoimmunerkrankungen (Borker & Choudhary, 2011).

1.2.2 Maligne Lymphome

Maligne Lymphome sind bösartige Erkrankungen des lymphatischen Systems. Befallen werden unter anderem Lymphknoten, Tonsillen und das Knochenmark. Aus historischen Gründen werden maligne Lymphome in Non-Hodgkin-Lymphome (NHL) und Hodgkin-Lymphome (Hodgkin's disease) eingeteilt. Sie können aus B-Zellen oder T-Zellen hervorgehen.

Das NHL repräsentiert zwei bis vier Prozent aller bösartigen Erkrankungen (Amoroso et al., 2011). Es handelt sich um eine heterogene Gruppe maligner Lymphome, die nicht dem Hodgkin-Lymphom angehören. Zu 90 % geht ein NHL von B-Lymphozyten aus, zu 10 % von T-Lymphozyten (Trümper & Pfreundschuh, 1996). Die Pathogenese ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Es kann als angeborener Gendefekt (Wiskott-Aldrich-Syndrom) auftreten und einige Risikofaktoren können ein Auftreten begünstigen, zum Beispiel Strahlenexposition, Autoimmunerkrankungen (Sjögren-Syndrom) oder Infektionen mit HIV. Außerdem spielen pathogenetisch auch onkogene Bakterien und Viren eine Rolle, beispielsweise *Helicobacter pylori* oder das Epstein-Barr-Virus (Amoroso et al., 2011).

Die Inzidenz von Hodgkin-Lymphomen ist etwas geringer als bei Non-Hodgkin-Lymphomen. Die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms ist noch ungeklärt, jedoch ist ein vermehrtes Auftreten der Erkrankung nach Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus zu beobachten (Kanakry et al., 2013) sowie bei Immunsuppression zum Beispiel nach Organtransplantation. Charakteristisch für das Hodgkin-

Lymphom sind die bizarr aussehenden Sternberg-Reed-Riesenzellen im histologischen Bild, die von malignen monoklonal wachsenden B-Zellen ausgehen. Diese machen jedoch nur eine kleine Anzahl der Zellen des Hodgkin-Lymphoms aus. Der Großteil des Tumors geht bemerkenswerterweise von meist polyklonalen B- und T-Zellen aus, die vermutlich reaktiv die Sternberg-Reed-Zellen umgeben. Auch scheinen Sternberg-Reed-Zellen mit den sie umgebenden T-Zellen zu interagieren (Küppers, 2012).

1.3 Mögliche Anwendungen von scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteinen in der Tumortherapie

Wie bereits erwähnt, verwenden neue Therapieansätze in der Onkologie Antikörper, die Tumor- oder Tumorstroma-spezifisch exprimierte Antigene erkennen. Anstelle natürlicher Antikörper kommen hierbei in klinischen und präklinischen Studien vermehrt antigenbindende Einzelkettenfragmente (scFv, single-chain variable Fragment) zum Einsatz (Ahmad et al., 2012). Diese Antikörperfragmente bestehen aus variablen Domänen der schweren und leichten Antikörperkette und können über einen Peptidlinker zu einem einzelnen Proteinen kombiniert werden (Accardi & Di Bonito, 2010; Shuptrine et al., 2012). Die antitumorale Wirkung erzielen Antikörper und scFvs durch Neutralisation von Antigenen oder agonistische Aktivierung von Rezeptoren. Eine besonders wichtige Funktion von Antikörpern ist die Opsonierung. Dabei wird nach Bindung an zellständige Antigene das Immunsystem zur Zerstörung der erkannten Zellen zum Beispiel mittels ADCC angeregt. Um die therapeutische Wirkung von Antikörpern oder scFvs zu erhöhen, werden diese oft auch mit Radio- und Chemotherapeutika oder pflanzlichen bzw. bakteriellen Toxinen als Wirkstoffkomponente chemisch konjugiert (Pastan et al., 2006; Alley et al., 2010). Als Alternative dazu können Proteine als Wirkstoffkomponenten eingesetzt werden, die apoptose- und immunstimulatorische Eigenschaften besitzen (Gerspach et al., 2009; Weiner et al., 2012).

Von großem Interesse bezüglich einer möglichen Tumor-therapeutischen Verwendung sind die apoptoseinduzierenden TNF-Todesrezeptoren Fas,

TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Rezeptor (TRAILR) 1 und 2 (Gerspach et al., 2009) und die immunstimulatorischen TNF-Rezeptoren (TNFR) CD40, OX40, CD27, Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein (GITR) und 41BB (Wyzgol et al., 2009), sowie ihre Liganden. Zum Beispiel wurden bifunktionelle Fusionsproteine aus CD3-spezifischen scFvs mit apoptoseinduzierendem Fas-Ligand als Wirkstoffkomponente generiert, die selektiv autoreaktive T-Zellen bei rheumatoider Arthritis bekämpfen konnten (Baeuerle & Reinhardt, 2009; Bremer et al., 2011). Ein mögliches Problem besteht allerdings in der systemischen Wirksamkeit von TNF-Liganden durch die ubiquitäre Expression von TNF-Rezeptoren im Körper (Wajant et al., 2011). Die damit bei systemischer Aktivierung verbundenen Nebenwirkungen wie Autoimmunerkrankungen oder Immunschwäche sind bestimmend für das therapeutisch nutzbare Fenster dieser Wirkstoffe. In dieser Hinsicht ist die Entwicklung von Prodrug-Ansätzen in diesem Bereich besonders interessant (Wajant et al., 2011). Eine solche Prodrug ist ein inaktiver Stoff, der erst im Tumor selbst durch Tumor-spezifische Gegebenheiten (beispielsweise niedriger pH-Wert, Hypoxie oder Tumor-assoziierte Enzyme) aktiviert wird und lokal seine therapeutische antitumorale Wirkung entfaltet.

Einige TNF-Liganden, die in ihrer natürlichen membranständigen Form stark rezeptoraktivierend wirken, sind als lösliche Trimere nur schwach aktiv (Müller et al., 2008). In dieser Beziehung wurde gezeigt, dass scFv-Fusionsproteine mit löslichen TNF-Liganden nach Bindung des scFv-spezifischen Antigens stark aktivierend auf die TNF-Rezeptoren wirken (Bremer et al., 2009; Wyzgol et al., 2009). Durch Verwendung von scFvs, die membranständige Tumorantigene erkennen, wird eine selektive Aktivierung bestimmter TNF-Rezeptoren im Bereich des Tumors erzielt. Da die Antigen-spezifität des scFv-Teils die Aktivität der scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteine auf antigenpositive Zellen begrenzt, können auf diese Weise Nebenwirkungen durch systemische TNF-Ligand-Wirkungen verhindert werden (Wajant et al., 2005). Diese scFv-TNF-Ligand-Fusionsproteine sind also mit einer Prodrug zu vergleichen, da deren Wirkung durch die Bindung an ein Tumor-assoziiertes Antigen erfolgt. Nach diesem Prinzip wurden schon Fusionsproteine entwickelt, die die apoptose-

induzierenden TNF-Rezeptoren CD95 und TRAILR2 Tumor-selektiv aktivieren (Wajant et al., 2001; Samel et al., 2003), sowie auch immunstimulatorische TNF-Rezeptoren wie 41BB, CD40 und GITR (Wyzgol et al., 2009).

1.4 CD40 und sein Ligand als Ansatzpunkt in der Tumorimmuntherapie

Ein immunstimulatorischer TNF-Rezeptor, auf den aktuell auch viele Tumorimmuntherapie-Ansätze abzielen, ist CD40 (Melief, 2008). CD40 (TNFRSF5) ist ein typisches Mitglied der TNF-Rezeptorfamilie und für die Aktivierung von dendritischen Zellen von zentraler Bedeutung. Es handelt sich dabei um einen 50 kDa großen Typ 1-Transmembranrezeptor (Armitage, 1994), der als Rezeptorkomplex vorgeformt in der Plasmamembran vorliegt (Bodmer et al., 2002) und neben DCs auch auf B-Zellen, Monozyten und epithelialen sowie endothelialen Zellen exprimiert wird (Ma & Clark, 2009). Charakteristisch für TNF-Rezeptoren sind die extrazellulären konservierten zwei bis sechs cysteinreichen Domänen (CRD, Cysteine-Rich Domain). CD40 besitzt vier CRDs (Gardnerova et al., 2000). Über die sogenannte PLAD (Pre-Ligand Assembly Domain) wird die Bildung inaktiver homotrimerer Rezeptorkomplexe vermittelt. Nach Bindung des korrespondierenden Liganden werden durch Reorganisation der vorgeformten TNF-Rezeptorkomplexe intrazelluläre Signalwege aktiviert. Intrazellulär besitzt die carboxyterminale Domäne von CD40 Bindungsstellen für die zytoplasmatischen Adaptermoleküle Janus Kinase 3 (JAK3) sowie für die TNF-Rezeptor assoziierten Faktoren 1, 2, 3 und 6. Interaktionen mit diesen Molekülen führen zur Induktion unterschiedlicher Signalwege: unter anderem kommt es zur Aktivierung von NFκB (Nuclear Factor Kappa B), p38-mitogenaktivierter Proteinkinase (p38 MAPK), c-Jun-NH₂-Kinase, Janus-Kinasen/Signal-Transducern sowie von Transkriptionsaktivatoren und Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) (Vonderheide, 2007).

TNF-Rezeptoren lassen sich in Todesrezeptoren und Nicht-Todesrezeptoren unterscheiden (Locksley et al., 2001). Die Nicht-Todesrezeptoren tragen keine Todesdomäne und haben vor allem regulatorische Funktionen im Immunsystem inne. Die CD40-Aktivierung induziert bei dendritischen Zellen zum Beispiel Ver-

änderungen, die ihre Funktionsfähigkeit als antigenpräsentierende Zellen effektiv steigern, wie die Hochregulation von MHC Klasse II Proteinen und anderen kostimulatorischen Molekülen (Caux et al., 1994). Zudem zeigen DCs eine vermehrte Expression von CD40 nach Antigenkontakt (Ouaaz et al., 2002). Auch bei der Kostimulation von B-Zellen spielt CD40 eine essentielle Rolle. Die Hauptfunktion, die über die CD40-Signalgebung geregelt wird, ist die Produktion von Zytokinen (Ma & Clark, 2009). So bewirkt die Bindung des CD40-Liganden (CD40L, CD154, TNFSF5) an CD40 eine extrem hohe Interleukin-12 (IL-12) Produktion durch DCs und die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle (Cella et al., 1996). Diese Effekte erzielen eine effektive Stimulation von T-Zellen, die somit eine Immunantwort auslösen können (Banchereau et al., 1994; O'Garra & Arai, 2000).

Wie bereits erwähnt, bindet CD40L spezifisch an CD40 auf DCs. Der CD40-Ligand ist ein etwa 39 kDa großes integrales Typ II-Membranprotein (Gordon, 1995), das vor allem auf aktivierten T-Lymphozyten und Thrombozyten exprimiert wird (Armitage et al., 1992; van Kooten & Banchereau, 2000). Es besitzt eine TNF-Homologie Domäne (THD) und gehört somit zur Familie der TNF-Liganden (Bodmer et al., 2002). Diese Domäne ist für die Rezeptorbindung zuständig und verantwortlich für die Ausbildung von homotrimeren Ligandmolekülen. Die Wechselwirkung von CD40 mit seinem Liganden CD40L ist essentiell für den Isotypwechsel sowie die Ausbildung von Keimzentren in lymphatischen Geweben. Dies wird zum Beispiel bei Patienten mit dem Hyper-IgM-Syndrom deutlich, einer Immunschwächeerkrankung, welche aufgrund eines X-chromosomalen Gendefektes des CD40-Liganden auftritt (van Kooten & Banchereau, 2000). Aktivierten T-Zellen dieser Patienten fehlt CD40L, weshalb sie infolgedessen keine B-Zellen aktivieren können. Da auf diese Weise durch den gestörten Isotypwechsel außer IgM keine Immunglobuline anderer Isotypen gebildet werden (Banchereau et al., 1994), sind diese Patienten hochanfällig für Infektionen verschiedenster Mikroorganismen.

Da das CD40-CD40L-System dendritischer Zellen eine zentrale Rolle auch bei Tumor-spezifischen Immunantworten spielt (Steinman & Banchereau, 2007; Dhodapkar et al., 2008), liegt es für die Krebsimmuntherapieforschung nahe,

immunstimulatorisch über CD40 und CD40L auf die Funktion dendritischer Zellen einzuwirken (Kornbluth et al., 2012; Sachamitr & Fairchild, 2012). Bei einer therapeutischen Aktivierung von CD40 kommen zum Beispiel agonistische Antikörper oder oligomerisierter CD40L zum Einsatz (Kornbluth et al., 2012). Ein grundlegendes Problem ist hierbei, dass es durch systemische CD40-Aktivierung zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen kann (Sahler et al., 2012), wie unter anderem Fieber oder einem Zytokinsturm, eine potentiell lebensgefährliche Entgleisung des Immunsystems, die ein multiples Organversagen zur Folge haben kann.

1.5 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es CD40-stimulierende Fusionsproteine zu entwickeln, die auf möglichst selektive Weise dendritische Zellen im Bereich des Tumors bzw. Tumor-lokalisiert aktivieren. Hierzu sollten Fusionsproteine hergestellt und evaluiert werden, die zum einen durch CD40L als scFv eine CD40-stimulierende Domäne besitzen, zum anderen durch ein Tumorantigen-spezifisches scFv über eine Tumorantigen-bindende Domäne verfügen. Mithilfe solch bifunktionaler Fusionsproteine sollte eine Tumor-restringierte Aktivierung von dendritischen Zellen erreicht werden. Eine solche Aktivierung soll die Differenzierung dendritischer Zellen zu hoch effektiven Antigen-präsentierenden Zellen bewirken, was messbar ist an der Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle und der verstärkten Produktion von IL-12.

2 Material

2.1 Chemikalien, Reagenzien, Zellkulturmedien

Chemikalie, Reagenz	Hersteller
2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure) (ABTS)	Roche, Mannheim
ABTS Puffer	Roche, Mannheim
Acrylamid (30 %)	Carl Roth, Karlsruhe
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Deisenhofen
Ampicillin	Carl Roth, Karlsruhe
Anti-FLAG mAK M2-Agarose	Sigma, Deisenhofen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe
Dulbecco's PBS (Phosphate Buffered Saline)	PAA, Pasching, Österreich
EDTA-Solution pH 8.0 (0,5 M)	AppliChem, Darmstadt
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
FACSFlow™	BD Biosciences, Heidelberg
Fikoll-Lösung Lymphocyte Separation Medium LSM 1077	PAA, Pasching, Österreich
FLAG-Peptid	Sigma, Deisenhofen
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, Österreich

Chemikalie, Reagenz	Hersteller
Glycerol	Carl Roth, Karlsruhe
GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IL-4 (Interleukin-4)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Isopropanol (2-Propanol)	Sigma, Deisenhofen
Milchpulver	Applichem, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Deisenhofen
Natriumazid	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin (100 x) (Pen/Strep)	PAA, Pasching, Österreich
Prestained Protein Marker (Broad Range)	New England Biolabs, Frankfurt
Proteinstandard Flag-TNF(mut60)	AG Wajant
RPMI 1640-Medium	PAA, Pasching, Österreich
Standard recombinant human IL-12/ IL-23 p40	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Tris	Carl Roth, Karlsruhe
Trypsin/EDTA Lösung (10 x)	PAA, Pasching, Österreich
TWEEN-20	Carl Roth, Karlsruhe

2.2 Antikörper

Antikörper	Spezies	Hersteller
Anti-Human B7-2/CD86-PE (PE: Phycoerythrin)	Maus IgG ₁	R&D Systems Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-Human CD14-MicroBeads	Maus IgG _{2a}	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Anti-Human CD14-PE	Maus IgG _{2a}	BD Pharmingen™, Heidelberg
Anti-Human CD20-PE	Mouse IgG _{2a}	Immuno Tools, Friesoythe
Anti-Human CD83-PE	Maus IgG ₁	R&D Systems Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-Human IL-12/IL-23 p40	Maus	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-mouse IRDye 800CW, polyklonal	Maus IgG Paraprotein	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Biotinylated anti-human IL-12/IL-23 p40	Ziege	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Isotype Control PE	Maus IgG ₁	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Monoclonal ANTI-FLAG® M2	Maus IgG ₁	Sigma, Deisenhofen
Rituximab (anti-CD20) MabThera® 100 mg	Maus/Human IgG ₁	Roche, Hertfordshire
SGN70h	IgG ₁	Laborvorrat, rekombinante Herstellung nach Sequenz aus Patent US 2006/0083736 A1
Streptavidin-HRP (Horseradish Peroxidase, Meerrettichperoxidase)	Bindet Biotin	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

2.3 Zellen

2.3.1 Prokaryotische Zellen

Zur Klonierung wurden NEB 5-alpha Competent E. coli (High Efficiency) von New England BioLabs, Frankfurt verwendet.

2.3.2 Eukaryotische Zellen

Die verwendeten humanen Tumorzelllinien waren in der Arbeitsgruppe Wajant vorhanden. HEK293-Zellen und B16-Zellen sind adhärent wachsend. BJAB, Daudi, Jeko-1, Jurkat A3 sowie Mino sind Suspensionszelllinien.

B16	murine Melanomzellen
B16-FAP	murine Melanomzellen, die FAP (Fibroblast Activation Protein) stabil exprimieren.
BJAB	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom)
Daudi	B-Zelllinie (Burkitt-Lymphom)
HEK293	Humane, embryonale Nierenzelllinie
Jeko-1	B-Zelllinie (Mantelzelllymphom)
Jurkat A3 (RIP +/-)	T-Zelllinie (akute lymphatische Leukämie, ALL)
Mino	B-Zelllinie (Mantelzelllymphom)

Dendritische Zellen wurden nach einwöchiger Behandlung mit IL-4 und GM-CSF aus Monozyten erhalten, die zuvor aus humanem Blut isoliert wurden (siehe Kapitel 3.2). Blut gesunder Spender wurde in Form von sogenannten „Zapfen“ aus dem Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Universitätsklinikum Würzburg (Oberdürrbacher Str. 6, 97080 Würzburg) bezogen.

2.4 Plasmide und Fusionsproteine

Das Fusionsprotein anti-CD20-Flag-CD40L wurde in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin Würzburg mithilfe kompetenter E. coli kloniert und eigens in HEK293-Zellen produziert. Das Plasmid zur Klonierung von anti-CD20-Flag-CD40L wurde von der Arbeitsgruppe Wajant zur Verfügung gestellt. Die Fusionsproteine sc40-Flag-CD40L, Fc-Flag-CD40L und Flag-TNF(mut60) waren in der Arbeitsgruppe Wajant vorhanden bzw. wurden von den Mitarbeitern der Abteilung für Molekulare Innere Medizin Würzburg kloniert und produziert. Die Gensequenzen der verwendeten Fusionsproteine werden im Anhang aufgeführt.

2.5 Verbrauchsmaterial und Geräte

Material zur Kultivierung der Zellen (Kryoröhrchen, Plastikpipetten, Polypropylenröhrchen (15 ml, 50 ml), Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen) sowie ELISA-Platten wurden von der Firma Greiner aus Frickenhausen bezogen.

Begasungsbrutschrank Heraeus Cell Safe	Heraeus, Hanau
Blockheizer	Peqlab, Erlangen
Blotting-Papier 195 g/m ²	A. Hartenstein, Würzburg
Chromatographiesäule	BioRad, München
Dialyseschläuche (Visking Typ 20/30, 14 kDa Ausschlußgrenze)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Durchflusszytometer FACSCalibur™	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometrie Röhrchen	Falcon, Heidelberg
Elektroporator Equibio Easyject Plus	Peqlab, Erlangen
Eppendorf Reaktionsgefäß (Eppi) 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht

Gellaufkammern SDS-PAGE	Peqlab, Erlangen
Heraeus Megafuge 1.OR Centrifuge	Thermo Scientific, Rockford, USA
LI-COR Odyssey® Infrared Imager	LI-COR Biosciences, Lincoln, USA
Luminometer/ELISA-Reader Lucy 2	Anthos Labtec, Krefeld
MACS LS Columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Nass-Blotkammer	Peqlab, Erlangen
Neubauer-Zählkammer 0,1 mm Tiefe; 0,0025 m ²	Marienfeld Germany
Nitrozellulose-Membran, 0,2 µm Porengröße	Whatman, Dassel
Pipetus ®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plastikpasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg / Versbach
Rotana 460R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
Sterilfilter (0,2 µm)	Sarstedt, Nümbrecht
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zellschaber	SPL Life Sciences Inc., Pocheon-Si, Korea

2.6 Lösungen und Puffer

Die benötigten Chemikalien wurden in vollentsalztem Wasser gelöst und nach Bedarf steril filtriert.

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
4 x Probenpuffer	10 % Glycerin 0,1 M Tris pH 8,0 1 % SDS 0,1 M DTT (Dithiothreitol) Bromphenolblau
Assay Diluent	PBS 10 % FCS
Blotpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20 % (v/v) Methanol pH 8,3
Laufpuffer	50 mM Tris 380 mM Glycin 4 mM SDS pH 8,3
LB-Medium (Lysogeny Broth-Medium, Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien)	Pro 1 Liter: 10 g Pepton, 5 g Hefeextrakt, 10 g NaCl

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
MACS-Puffer	PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
PBS	20 mM Natriumphosphat (Na_3PO_4) 0,7 % NaCl pH 7,2
PBS-T	PBS 0,05 % TWEEN-20
PBS-T-Milch	PBS 0,05 % TWEEN-20 5 % Magermilch
Reagent Diluent	PBS 1 % BSA
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris 0,015 M SDS pH 6,8 durch HCl

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
SOC-Medium (Super Optimal broth with Catabolite repression)	0,5 % Hefeextrakt 2 % Vegetable Peptone 20 mM Glucose 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 10 mM NaCl
TBS (Tris Buffered Saline)	0,02 M Tris 8 % NaCl pH 7,6
Trenngelbuffer	1,5 M Tris 0,015 M SDS pH 8,8 durch HCl

2.7 Kommerzielle Kits

DuoSet® ELISA Development System human IL-12/IL-23 p40	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt
Pierce® Silver Stain Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim

3 Methoden

3.1 Arbeiten mit eukaryotischen Zelllinien

3.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien und Suspensionszelllinien

Sämtliche Zelllinien wurden mit RPMI 1640-Medium, das 10 % FCS enthält, bei Standardbedingungen im Inkubator kultiviert. Das FCS wurde zuvor bei 56°C 30 min hitzeinaktiviert. Die adhärenenten HEK293-Zellen wurden vor dem Splitten auf Kontamination geprüft, unter dem Mikroskop kontrolliert und Morphologie und Dichte bzw. Konfluenz beurteilt. Durch kurze Inkubation in 10 % Trypsin bei 37°C konnten sie abgelöst und durch RPMI-Medium vom Boden der Zellkulturflasche abgespült werden. Da die verwendeten Plasmide unter unsterilen Bedingungen hergestellt wurden, sind die transfizierten HEK293-Zellen nach Elektroporation in Medium kultiviert worden, das mit Pen/Strep versetzt war. Suspensionszellen konnten direkt dem Medium entnommen werden. Primäre Zellen aus Spenderblut wurden in RPMI 1640-Medium + 10 % FCS mit Pen/Strep kultiviert.

3.2 Isolierung, Kultivierung und Stimulation primärer Zellen

3.2.1 PBMC-Aufreinigung (Fikoll) zur MACS-Separation von Monozyten

Das verwendete Blut konnte vom Institut für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Universitätsklinikum Würzburg (Oberdürrbacher Str. 6, 97080 Würzburg) in Form von „Zapfen“ bezogen werden. Diese enthielten circa 8 ml mit Zellen angereichertes Blut von gesunden Spendern, das mit einem Antikoagulans versetzt war. Zunächst wurden PBMCs (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) aus dem Spenderblut isoliert. Dazu wurde das Blut 1:1 mit PBS gemischt und langsam auf die in einem Falcon-Röhrchen vorgelegte Fikoll-Lösung geschichtet. Dann wurde 15 min lang bei 1800 rpm, Raumtemperatur (RT) und ausgeschaltener Bremse zentrifugiert. Hierbei wird die unterschiedli-

che Dichte der Blutbestandteile ausgenutzt (Dichtegradientenzentrifugation). Die Erythrozyten setzen sich unten ab und die PBMCs sammeln sich als sogenannter „Buffy Coat“ zwischen Fikoll-Lösung und Plasma. Der Leukozytensaum ließ sich mit einer Pasteurpipette abziehen und in ein neues Falcon-Röhrchen überführen. Dort wurden die PBMCs mit PBS + 2 mM EDTA resuspendiert und erneut abzentrifugiert (bei RT, 1300 rpm, 10 min mit Bremse). Im Anschluss erfolgten drei weitere Waschschriffe mit PBS. Anschließend wurde das Zellpellet in MACS-Puffer resuspendiert, und bei 4°C 20 min lang mit anti-CD14-MicroBeads inkubiert. Die CD14⁺-Monozyten wurden auf diese Weise magnetisch markiert, und konnten gemäß Herstellerangaben über eine magnetische Säule separiert werden.

3.2.2 Herstellung dendritischer Zellen

Nach der Elution der CD14⁺-Monozyten wurden diese bei 1200 rpm 4 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 14 ml RPMI 1640-Medium, das 10 % FCS, sowie Penicillin/Streptomycin enthielt, aufgenommen, auf zwei Zellkulturschalen verteilt und bei Standardbedingungen im Inkubator kultiviert. Um Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs, immature Dendritic Cells) zu differenzieren, wurden sie direkt nach Isolation und nach drei Tagen jeweils mit 50 ng/ml GM-CSF und 30 ng/ml IL-4 stimuliert. Nach sieben Tagen war die Differenzierung abgeschlossen, das heißt die iDCs konnten geerntet und verwendet werden. Da CD14 auf DCs (im Gegensatz zu Monozyten) nicht exprimiert wird, wurde jede Differenzierung zu DCs im „Fluorescence Activated Cell Sorter“ (FACS) auf CD14-Oberflächenexpression kontrolliert.

3.3 FACS-Analyse

Oberflächenmoleküle von Zellen konnten im FACS detektiert werden, indem sie zuvor mit einem spezifischen Fluorochrom-gekoppelten Antikörper markiert wurden. Das Fluorochrom war in diesen Fällen Phycoerythrin (PE). Die zu analysierenden Zellen wurden in 6- oder 12-Well-Flachbodenplatten ausgesät, sti-

muliert oder unbehandelt gelassen, und anschließend bei Standardbedingungen im Inkubator mindestens zwei Tage lang kultiviert. Am Tag der Messung wurden die Zellen mit einem unsterilen Schaber geerntet und in separate Eppis überführt. Nach Zentrifugation bei 1200 rpm, 4 min, wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und das Pellet in einer entsprechender Menge PBS resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend auf eine 96-Well-Rundbodenplatte aufgeteilt und 1:25 mit einem PE-markierten CD14-, CD20-, CD83- oder CD86-spezifischen Antikörper (AK) bzw. dem entsprechenden IgG₁-Isotypkontroll-AK versetzt. Nach Inkubation bei 4°C, 20 min, wurden die Zellen abzentrifugiert und 2 x mit PBS gewaschen, bevor sie in FACS-Röhrchen überführt wurden. Anschließend erfolgte die Messung im FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg).

3.4 Kokulturen

In einigen Experimenten wurden unreife DCs mit verschiedenen Tumorzelllinien unter sterilen Bedingungen kokultiviert und stimuliert. Hierzu wurden iDCs steril geerntet und abzentrifugiert, anschließend wurde mithilfe einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. B16-Zellen und B16-FAP-Zellen mussten trypsinisiert werden. Alle anderen verwendeten Tumorzelllinien (BJAB, Jurkat, Jeko-1, Mino und Daudi-Zellen) sind Suspensionszellen, sie ließen sich direkt aus der Zellkulturflasche entnehmen, abzentrifugieren und ebenfalls zählen. Die Kokulturen wurden in 96-Well-Flachbodenplatten mit einem Endvolumen von 200 µl/Well in Triplikaten angesetzt. Kokultur und Negativkontrollen wurden jeweils wie angegeben stimuliert, und mindestens 15 h lang unter Standardbedingungen inkubiert. Für den Versuchsansatz mit B16-Zellen wurden jeweils 40 000 iDCs/Well und 15 000 B16 bzw. B16-FAP/Well verwendet. Für die Kokulturen mit BJAB, Jurkat, Jeko-1, Mino und Daudi-Zellen wurden jeweils 30 000 Zellen/Well und 40 000 iDCs/Well verwendet. Parallel zu jeder angesetzten Kokultur wurden die jeweiligen iDCs zum Vergleich und zur Kontrolle mit CD40L gereift. Hierzu wurde ein Teil der iDCs mit 1 µg/ml Fc-Flag-CD40L stimuliert, der andere Teil unbehandelt gelassen. Nach 2-3 Tagen Inkubation bei Standardbe-

dingungen wurde mittels Durchflusszytometrie auf die Oberflächenmoleküle CD14, CD83 und CD86 hin detektiert, um Differenzierung und Reifung der generierten DCs zu überprüfen.

3.5 Bestimmung der IL-12 Produktion mittels ELISA

Wie im Abschnitt 3.4 beschrieben, wurden die iDCs mit den jeweiligen Tumorzelllinien in 96-Well-Flachbodenplatten kokultiviert und mindestens 15 h lang im Inkubator bei Standardbedingungen wie angegeben stimuliert. Das von den auf diese Weise zur Reifung gebrachten mDCs (mature Dendritic Cells) sezernierte IL-12 konnte anschließend im Überstand detektiert werden. Der Mediumüberstand wurde nach einem Zentrifugationsschritt abgenommen und ließ sich bei -20°C lagern oder sofort analysieren. Zur IL-12-Bestimmung des Überstands wurde das DuoSet ELISA Development System von R&D verwendet. Dazu wurde am Vortag die benötigte Menge an ELISA-Platten vorbereitet. Der Capture Antibody (anti-IL-12) wurde mit einer Konzentration von 4 µg/ml in PBS gelöst, mit 50 µl/Well auf die ELISA-Platte gebracht und über Nacht bei RT inkubiert („Coating“ der Platten). Am darauffolgenden Tag wurden die Platten nach dreimaligem Waschen mit PBS-T mit 200 µl/Well Reagent Diluent (1 % BSA in PBS) 1 h bei RT geblockt. Nach erneutem Waschen (3 x) wurden die Proben, der IL-12 Standard in drei Konzentrationen (0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2 ng/ml) sowie die Mediumkontrolle mit je 80 µl/Well aufgetragen und 2 h bei RT inkubiert. Es erfolgte der Waschschrift (3 x), dann wurde 50 µl/Well einer Lösung aus biotinyliertem IL-12 Antikörper (Detection Antibody) in Reagent Diluent (100 ng/ml) für 2 h bei RT aufgetragen. Eine Lösung von Streptavidin-HRP (1:200) wurde nach 3 x Waschen in 50 µl/Well für 20 min dazugegeben. Anschließend wurden die Platten erneut 3 x gewaschen und 100 µl/Well des HRP-Substrates ABTS (1 mg/ml Substrat in 16,7 mg/ml ABTS-Puffer gelöst) aufgetragen. Nach kurzer Inkubation erfolgte die Messung der eingetretenen Farbreaktion im ELISA-Reader bei 405 nm.

3.6 Klonierung rekombinanter Fusionsproteine

3.6.1 Transformation kompetenter Zellen

Die DNA für die Klonierung des Fusionsproteins anti-CD20-Flag-CD40L wurde in der Arbeitsgruppe Wajant zur Verfügung gestellt. Für die Transformation wurden 50 µl kompetente *E. coli*, die bei -80°C gelagert waren, aufgetaut und mit DNA (1 µl DNA, 5 µl Ligationsansatz) 30 min lang auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42°C für 45 Sekunden wurden die Zellen 2 min lang auf Eis gekühlt, anschließend in 250 µl SOC-Medium aufgenommen und im Wasserbad bei 37°C 60 min lang inkubiert. Als letztes wurde der Ansatz auf LB-Ampicillin-Agarplatten ausgestrichen und im Inkubator bei 37°C über Nacht inkubiert.

3.6.2 Isolierung von DNA aus *E. coli*

Zunächst wurde eine Kolonie auf der Agarplatte „gepickt“ und in einem sterilen Glaskolben in 30 ml 5 x LB-Medium mit 120 ml destilliertem Wasser und 150 µl Ampicillin (100 mg/ml) über Nacht kultiviert, bei 37°C auf dem Schüttler. Von den auf diese Weise vermehrten transformierten Zellen wurde am folgenden Tag auch eine Bakterien-Dauerkultur zur längerfristigen Lagerung angelegt, indem 800 µl Zellen mit 200 µl Glycerin in einem Eppi bei -80°C eingefroren wurden. Die restlichen Zellen wurden bei 5000 rpm 5 min lang abzentrifugiert. Es erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA nach Herstellerangaben mit dem PureYield™ Plasmid Midiprep System. Nach der Elution der gewonnenen DNA in Eppis wurde diese 1 min bei 14000 rpm zentrifugiert, um sie von letzten Verunreinigungen zu säubern, und in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß übertragen. Zum Schluss erfolgte die Konzentrationsbestimmung der DNA im Photometer. Die DNA konnte nun zur transienten Transfektion von HEK293-Zellen und damit zur Proteinsynthese verwendet werden.

3.7 Produktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine

3.7.1 Expression durch transiente Transfektanten

Für die transiente Transfektion durch Elektroporation zur Ligandenproduktion wurden adhärente HEK293-Zellen verwendet. Zusammen mit 40 µg der Plasmid-DNA wurden 16×10^6 Zellen mit 800 µl RPMI-Medium in Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 4 mm) gebracht und bei 250 V, 1800 µF und maximalem Widerstand im Elektroporator Equibio EasyjecT Plus elektroporiert. Durch diesen Vorgang wird die Zellmembran vorübergehend permeabel, so dass die DNA von den Zellen aufgenommen werden kann. Die HEK293-Zellen wurden anschließend in 20 ml RPMI 1640-Medium mit 2 % FCS und 1 x Pen/Strep bei Standardbedingungen im Inkubator stehen gelassen. Die HEK293-Zellen konnten das gewünschte Fusionsprotein nun produzieren und in den Zellüberstand abgeben. Der Überstand mit dem enthaltenen Protein wurde nach circa 5 Tagen abgenommen, bei 4600 rpm 10 min lang zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen, und bei 4°C bis zur Aufreinigung gesammelt. Die Proteinkonzentration im Überstand wurde durch Vergleich mit einem entsprechendem Proteinstandard durch Western Blot Analyse ermittelt.

3.7.2 Expression durch stabile Transfektanten

Zur Proteinproduktion wurden zudem stabile Transfektanten zur Verfügung gestellt. Diese hatten zuvor durch Elektroporation die entsprechende DNA erhalten und waren durch vierwöchige Geneticindisulfat-Behandlung selektioniert worden. Die stabilen Zellen wurden wie oben angegeben kultiviert, je nach Konfluenz 1:4 gesplittet und zur Proteinproduktion auf Medium mit 2 % FCS umgestellt. Zur langfristigen Lagerung der stabilen Transfektanten wurden diese in Einfriermedium (FCS mit 10 % DMSO) aufgenommen und in einem Kryoröhrchen bei -80°C verwahrt.

3.7.3 Aufreinigung durch Affinitätschromatographie

Die Aufreinigung des gewünschten Fusionsproteins erfolgte über einen im Protein eingebauten FLAG-Tag (eine bestimmte Aminosäuresequenz). Dazu wurde Anti-FLAG M2 Affinity Gel (Sigma-Aldrich) verwendet. Die Anti-FLAG-M2-Beads wurden zunächst zweimal mit TBS gewaschen und dann mit TBS auf die Chromatographiesäule gebracht. Laut Herstellerangabe hat 1 ml Anti-FLAG-M2-Agarose die Kapazität von 600 µg Protein zu binden. So ließ sich das Volumen des Protein-Überstands abschätzen. Dieser wurde zusammen mit 0,15 M NaCl auf die Säule gegeben, bei 4°C und einer Fließgeschwindigkeit von etwa 300 µl/min. Als der Überstand durch die Säule gelaufen war, wurde diese mit ein- bis zweifachem Säulenvolumen TBS gespült, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die gebundenen Flag-Fusionsproteine konnten nun durch Konkurrenz mit FLAG-Peptid eluiert werden. Die Elution erfolgte durch Zugabe von dreifachem Säulenvolumen FLAG-Peptid in TBS (100 µg/ml), mit einer Flussgeschwindigkeit von 90 µl/min. Um überschüssiges FLAG-Peptid zu entfernen, wurde die gewonnene Protein-Lösung zweimal gegen PBS bei 4°C dialysiert und anschließend steril filtriert. Zur Konzentrationsbestimmung des Fusionsproteins in den Eluatzen wurde ein Western Blot durchgeführt, in dem mithilfe eines Proteinstandards die Konzentration bestimmt wurde.

3.8 Western Blot

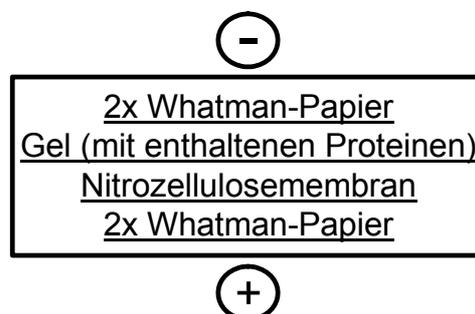
3.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur quantitativen Bestimmung wurden die Proteinproben des Fusionsproteins auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und elektrophoretisch der Größe nach aufgetrennt. Das Trenngel wurde aus einer Trenngellösung (375 mM Tris pH 8,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) mit 12 % Acrylamid hergestellt, deren Polymerisation durch Zusatz von 0,1 % Tetramethylethyldiamin (TEMED) in Gang gesetzt wurde. Während dieses Vorgangs wurde das Trenngel zur Glättung der Oberfläche mit 70 %igem Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation

wurde das Isopropanol sorgfältig mit Filterpapier wieder entfernt. Über das auspolymerisierte Trenngel wurde nun das Sammelgel (6 % Acrylamid in 125 mM Tris pH 6,8; 3,75 mM SDS; 0,1 % APS) geschichtet und der Kamm für die Probenaschen eingesetzt. Nach Auspolymerisation konnte das Gel mit den Proteinproben beladen werden. Diese wurden zuvor mit 4 x Probenpuffer (10 % Glycerin; 0,1 M Tris pH 8,0; 1 % SDS; 0,1 M DTT; Bromphenolblau) gemischt und bei 95°C 5 min im Heizblock denaturiert. Auf dasselbe Gel mit den Proteinproben wurde der Molekulargewichtsstandard Prestained Protein Marker (Broad Range), sowie ein zu diesem Zweck von der Arbeitsgruppe Wajant generierter und verwendeter Proteinstandard (Flag-TNF(mut60)) bekannter Konzentration mit 60 ng, 30 ng und 15 ng aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90-120 V in SDS-Laufpuffer (50 mM Tris; 380 mM Glycin; 4 mM SDS; pH 8,3) in Gellaufkammern der Firma Peqlab (Erlangen) für 1 h 45 min.

3.8.2 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrozellulosemembran

Nach der Elektrophorese wurden die im Gel enthaltenen negativgeladenen Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, die der Anode aufliegt. Dies wurde in einer vertikalen Nass-Blot-Kammer durchgeführt. Hierfür wurden Nitrozellulosemembran sowie Whatmanpapiere erst in Blotpuffer (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol; pH 8,3) getaucht, anschließend wie folgt in die Blotkammer gelegt:



Der Proteintransfer erfolgte in Blotpuffer bei 90 V, 400 mA bei RT für 2 h 30 min.

3.8.3 Immundetektion

Bei der Immundetektion werden die auf die Nitrozellulosemembran übertragenen Proteine sichtbar gemacht. Zunächst wurde die Membran in Blockpuffer (PBS-T + 5 % Milch) bei RT eine Stunde lang geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen. Dieser Schritt wurde, wie die folgenden, auf einem Schüttler durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 3 x je 15 min in PBS-T gewaschen, bevor sie mit dem Primär-AK (Anti-Flag-M2, 1:2000 in PBS-T und 0,025 % Natriumazid) über Nacht bei 4°C inkubiert wurde. Der Primär-AK konnte spezifisch den FLAG-Tag des nachzuweisenden Fusionsproteins binden. Am nächsten Tag wurde die Membran 3 x je 5 min in PBS-T gewaschen, und dann mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundär-AK (Anti-Mouse AK Licor 800, 1:10000 in PBS-T) 1 h bei RT inkubiert. Dieser wurde, im Gegensatz zum Primär-AK, der mehrmals verwendet wurde, danach verworfen. Schließlich folgte der Proteinnachweis und die quantitative Auswertung durch das LI-COR Odyssey®-System (LI-COR Biosciences, Lincoln, USA).

3.8.4 Qualitative Analyse durch Silberfärbung

Zur Überprüfung der Reinheit und zur weiteren quantitativen Analyse des aufgereinigten Fusionsproteins anti-CD20-Flag-CD40L wurde eine Silberfärbung durchgeführt. Diese Färbung zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus. Das Polyacrylamidgel wurde mit dem Protein in verschiedenen Konzentrationen, sowie Silbergelmarker (Thermo Scientific) beladen. Nach der Elektrophorese (120 V, 400 mA, 1 h 45 min) erfolgte die Anfärbung nach Herstellerangaben mit dem Pierce® Silver Stain Kit von Thermo Scientific.

4 Ergebnisse

4.1 Präparation und Reifungskontrolle von iDCs

Zur Herstellung dendritischer Zellen wurden, wie im Absatz 3.2.1 beschrieben, aus PBMCs von Spenderblut Monozyten isoliert. Die erfolgreiche Isolation bzw. Reinigung der Monozyten wurde regelmäßig mittels FACS-Analyse anhand der CD14-Expression kontrolliert. Dies ist in Abbildung 1 beispielhaft für alle durchgeführten Kontrollen gezeigt.

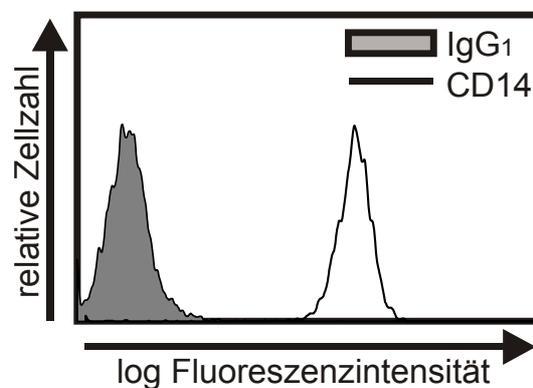


Abbildung 1: CD14⁺-Expression auf Monozyten

Die Expression von CD14 an der Oberfläche der aus Spenderblut isolierten Monozyten wurde im FACS mittels PE-konjugierter Antikörper gezeigt.

Durch Behandlung der Monozyten mit GM-CSF und IL-4 wurden diese zu iDCs differenziert (Li et al., 2012). DCs weisen im Gegensatz zu Monozyten keine CD14-Expression auf der Zelloberfläche mehr auf und können so leicht von undifferenzierten Monozyten oder Makrophagen unterschieden werden. Um die ausdifferenzierten iDCs qualitativ zu kontrollieren, wurden diese mittels Durchflusszytometrie auf das Vorhandensein des Oberflächenmoleküls CD14 überprüft, sowie hinsichtlich der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle von iDCs wie CD83 und CD86 (Abbildung 2). Im Gegensatz zu unreifen dendritischen Zellen zeigen reife dendritische Zellen eine verstärkte Expression vor allem von CD83 sowie von CD86 (Li et al., 2012). Dies wurde durch FACS-

Analysen der iDCs regelmäßig bestätigt, um die Qualität der in den Experimenten verwendeten iDCs zu kontrollieren (Abbildung 2). Hierzu wurden die isolierten iDCs unbehandelt gelassen, sowie drei bis vier Tage mit 500 ng/ml Fc-Flag-CD40L zu mDCs gereift. Mithilfe von FACS-Analysen wurden die unterschiedlichen Differenzierungsstadien von Monozyten zu iDCs bzw. mDCs verfolgt.

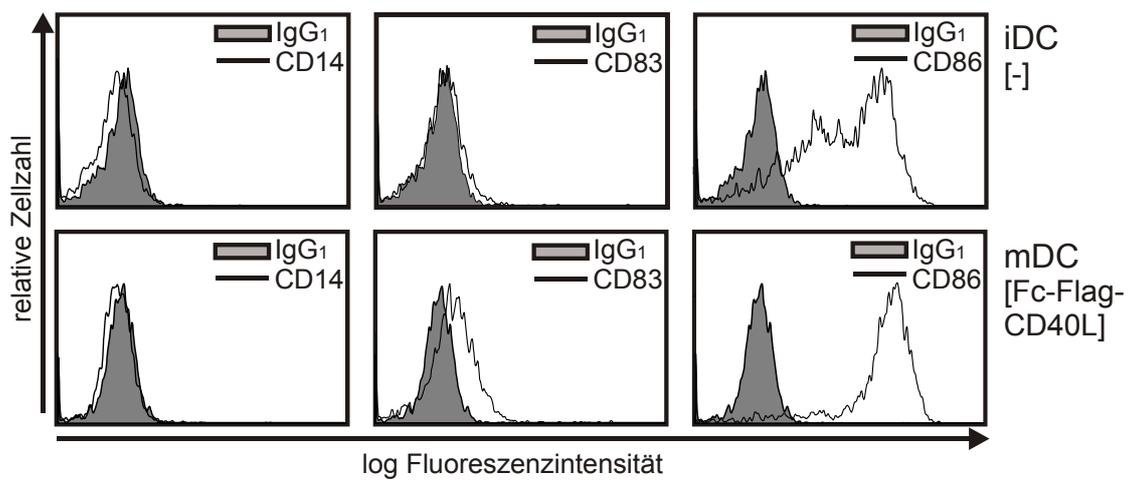


Abbildung 2: Qualitative Kontrolle der erfolgreichen Differenzierung von IL-4 bzw. GM-CSF-behandelten CD14⁺-Monozyten zu CD14⁻unreifen dendritischen Zellen

Unreife bzw. durch Fc-Flag-CD40L (500 ng/ml) gereifte DCs wurden mittels PE-markierter Antikörper in der FACS-Analyse auf die Oberflächenexpression von CD14, CD83 und CD86 hin untersucht. Charakteristisch für DCs ist hierbei, dass CD14 (im Gegensatz zu Monozyten) nicht mehr exprimiert wird und mDCs verstärkt CD83 und CD86 aufweisen. Dies wurde als Erfolgskriterium für die Differenzierung von iDCs aus Monozyten gewertet.

4.2 FAP-abhängige Aktivierung von iDCs

Wie anhand der FACS-Analyse gezeigt wurde, exprimieren dendritische Zellen CD40 auf Ihrer Zelloberfläche (Abbildung 3).

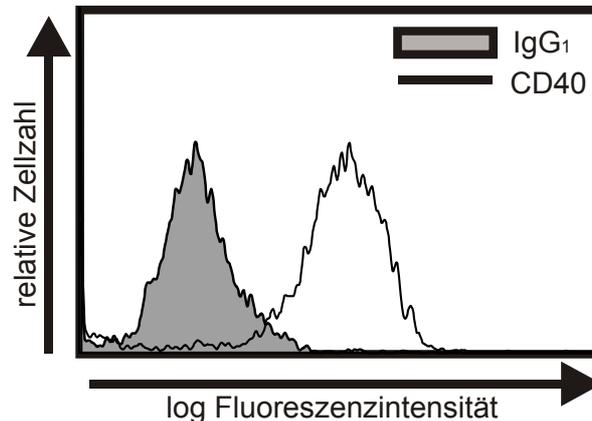


Abbildung 3: CD40-Expression von unreifen dendritischen Zellen

Mittels PE-konjugierter AK, die spezifisch an CD40 binden, wurde die Expression von Oberflächen-CD40 auf iDCs in der FACS-Analyse bestätigt.

Um die angestrebte Tumorantigen-abhängige CD40- bzw. DC-stimulierende Aktivität von scFv-CD40L-Fusionsproteinen zu bestimmen, wurden Experimente mit Kokulturen aus primären iDCs und Tumorantigen-positiven Tumorzellen durchgeführt. Um iDCs in lokaler Nähe eines Tumors aktivieren zu können, sollte das Fusionsprotein einerseits CD40 der iDCs binden und somit aktivieren, sowie zugleich bestimmte Antigene von Tumorzellen binden können. Als Modelltumorantigen diente zunächst das Tumorstroma-Antigen FAP. Unreife DCs wurden mit FAP-exprimierenden Transfektanten (B16-FAP-Zellen) bzw. mit FAP-negativen Kontrollzellen (B16-Zellen) kokultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen an sc40-Flag-CD40L behandelt. Dieses FAP-bindende CD40L-Fusionsprotein wurde bereits an anderer Stelle beschrieben (Wyzgol et al., 2009). Es bindet einerseits durch die sc40-Domäne spezifisch an das FAP-Molekül der B16-FAP-Zellen, und andererseits durch CD40L an CD40 der iDCs (Abbildung 4). Die Stimulation von CD40 durch Bindung des CD40L veranlasst iDCs zur Reifung und IL-12-Ausschüttung (Cella et al., 1996; Li et al., 2012).

Der Nachweis der Reifung der iDCs erfolgte durch Detektion von DC-produziertem IL-12 mittels ELISA.

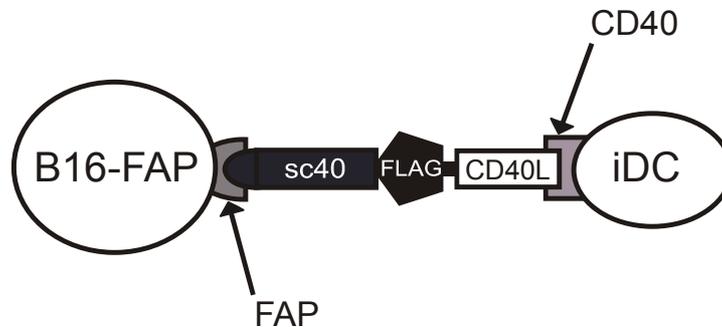


Abbildung 4: Modell der iDC-Stimulation durch sc40-Flag-CD40L

Die Stimulation durch sc40-Flag-CD40L erfolgte in der Kokultur aus FAP-exprimierenden B16-Zellen mit iDCs.

Die Stimulation von Kokulturen aus iDCs und B16-FAP-Zellen mit sc40-Flag-CD40L bewirkte eine stärkere CD40-Aktivierung als in Kokulturen aus iDCs und B16-Kontrollzellen. Dies war deutlich an der durch sc40-Flag-CD40L induzierten IL-12 Produktion der iDCs erkennbar (Abbildung 5). Die Menge an IL-12 war hier doppelt so hoch als bei der Kokultur von iDCs mit B16-Zellen, bei der keine Bindung von sc40-Flag-CD40L an FAP möglich war. Obgleich die iDCs auch FAP-unabhängig durch sc40-Flag-CD40L aktivierbar waren, war die iDC-Aktivierung in Anwesenheit von FAP stark erhöht. Zur Kontrolle wurden die iDCs auch mit Fc-Flag-CD40L aktiviert. Diese Behandlung zeigte sogar einen etwas geringeren Effekt als die FAP-unabhängige Aktivierung durch sc40-Flag-CD40L (Abbildung 5).

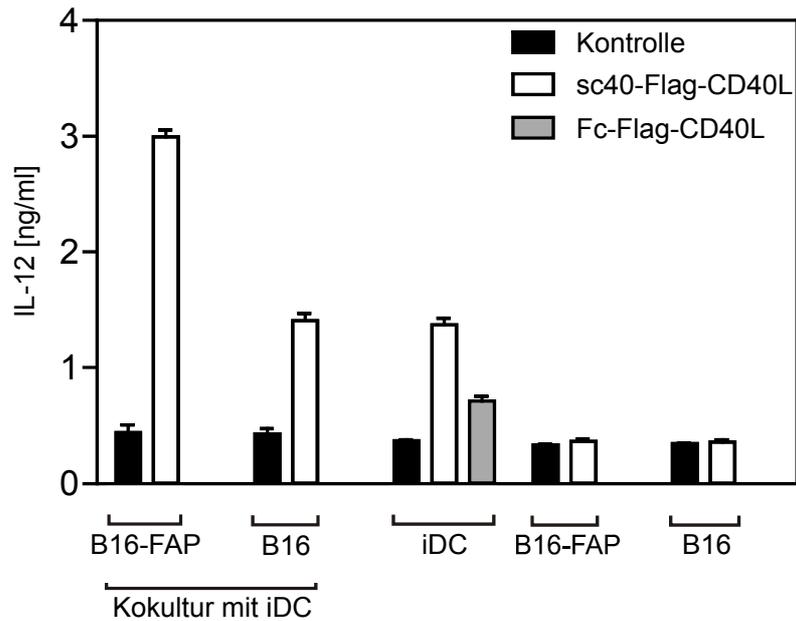


Abbildung 5: Tumorantigen- bzw. FAP-abhängige Stimulation von iDCs durch sc40-Flag-CD40L

Unreife DCs wurden alleine oder mit B16-FAP- bzw. B16-Zellen kokultiviert und mit 1000 ng/ml sc40-Flag-CD40L 15 h stimuliert, die Kontrollen blieben unbehandelt. Die Negativkontrollen (iDCs, B16-FAP, B16) wurden ebenfalls mit 1000 ng/ml sc40-Flag-CD40L stimuliert bzw. blieben unbehandelt. Die Kontrollreifung der iDCs erfolgte mittels 500 ng/ml Fc-Flag-CD40L. Die Konzentration der IL-12-Produktion der iDCs wurde mithilfe eines IL-12 ELISAs bestimmt.

Dieses Experiment zeigte, dass die Aktivierung von iDCs durch Stimulation mit einem selektiv an einen Tumormarker bindenden rekombinanten CD40L-Fusionsprotein grundsätzlich möglich ist. Es sollte nun in weiteren Experimenten verifiziert werden, dass auch andere scFv-CD40L-Fusionsproteine, die ein anderes Tumorantigen als das Modellantigen FAP erkennen, nach Antigenbindung eine erhöhte CD40- bzw. DC-stimulierende Wirkung besitzen.

4.3 Herstellung und Reinigung eines scFv-CD40L-Fusionsproteins welches CD20-abhängig iDCs aktiviert

Ein wichtiges Tumorantigen, welches in der Krebsimmuntherapie eine große Rolle als Ziel-Antigen spielt, ist CD20. CD20 wird an der Oberfläche von einem Teil maligner Lymphomzellen stark exprimiert (Borker & Choudhary, 2011). Rituximab ist ein monoklonaler anti-CD20-Antikörper und wird seit November

1997 in der gezielten Krebstherapie eingesetzt (Borker & Choudhary, 2011). Rituximab wirkt dabei hauptsächlich durch Induktion der CDC (Shuptrine et al., 2012). Der Gedanke war nun, ein Fusionsprotein herzustellen, welches einerseits CD20-positive Tumorzellen durch eine von Rituximab abgeleitete scFv-Domäne erkennt und andererseits CD40-exprimierende iDCs durch eine CD40L-Domäne binden kann. Zu diesem Zweck wurde ein Expressionsplasmid, das ein Fusionsprotein mit genau diesen Eigenschaften kodiert, in der Abteilung für Molekulare Innere Medizin (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Würzburg) hergestellt und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt: anti-CD20-Flag-CD40L. Nach Klonierung, DNA-Aufreinigung und Elektroporation des Expressionsplasmids in HEK293-Zellen wurde das rekombinante Protein in den Überstand dieser Zellen sekretiert. Nach der Reinigung des Fusionsproteins mittels Affinitätschromatographie an anti-Flag-Agarose erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration anhand von Western Blot-Analysen. Anschließend erfolgte die qualitative Analyse des gereinigten anti-CD20-Flag-CD40L in einem Silbergel (Abbildung 6). Durch diese sensitive Silberfärbung konnte gezeigt werden, dass das erhaltene Protein nach der Aufreinigung nicht degradiert vorlag und für die folgenden Experimente verwendet werden konnte.

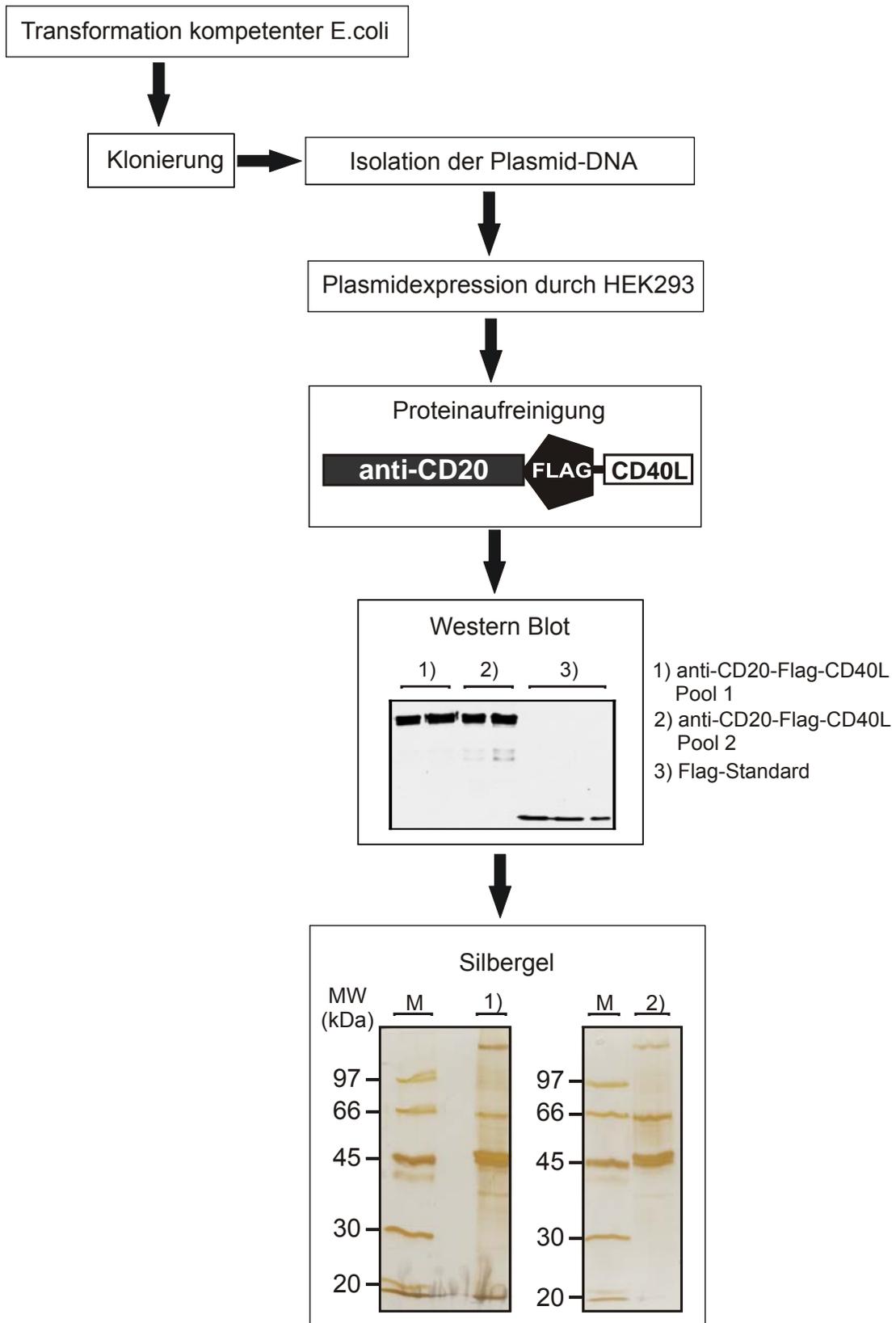


Abbildung 6: Schema der Herstellung und Aufreinigung des Fusionsproteins anti-CD20-Flag-CD40L

4.4 CD20-Expression von BJAB- und Jurkat-Zellen

Mittels Durchflusszytometrie wurden Tumorzelllinien ausgewählt, die CD20 exprimieren. BJAB-Zellen erwiesen sich als B-Zelllinie, welche CD20 deutlich an ihrer Oberfläche exprimiert (Abbildung 7 A). Wie in der FACS-Analyse gezeigt ist, bindet Rituximab, ein anti-CD20-Antikörper, erwartungsgemäß an CD20 der BJAB-Zellen. Das heißt auf BJAB-Zellen, die mit Rituximab vorbehandelt wurden, wurde die Bindung von PE-konjugierten anti-CD20-Antikörpern blockiert bzw. verhindert (Abbildung 7 B). Als eine Kontrolltumorzelllinie wurde die T-Zelllinie Jurkat ausgewählt. Wie in Abbildung 7 C) gezeigt ist, ist diese CD20-negativ und war somit als Negativkontrolle für die im Folgenden dargestellten Experimente gut geeignet.

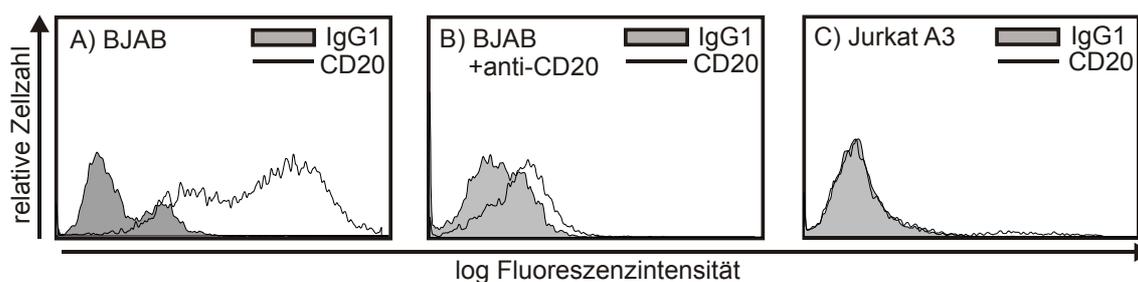


Abbildung 7: FACS-Analyse der CD20-Expression auf BJAB- und Jurkat-Zellen

Mittels PE-gelabelten, CD20-spezifischen Antikörpern wurden die Tumorzellen BJAB und Jurkat mittels FACS-Analyse auf ihre CD20-Expression untersucht. BJAB-Zellen exprimierten deutlich CD20 auf ihrer Oberfläche (A). Rituximab (anti-CD20) blockierte mit einer Konzentration von 10 µg/ml erfolgreich die Bindung von anti-CD20-PE auf BJAB-Zellen (B). Jurkat A3-Zellen fehlte CD20 auf der Zelloberfläche (C).

4.5 CD20-abhängige Aktivierung von unreifen dendritischen Zellen

Im Folgenden wurde untersucht, ob das Fusionsprotein anti-CD20-Flag-CD40L eine Tumorantigen-abhängige, daher CD20-abhängige iDC-Aktivierung hervorruft. Hierfür wurden primäre iDCs mit CD20⁺-Zellen (BJAB) bzw. CD20⁻-Zellen (Jurkat) kokultiviert und mit anti-CD20-Flag-CD40L für 18 h stimuliert. Die Reifung der iDCs wurde über die Messung der IL-12-Produktion mittels ELISA erfasst. Die Kokultur der iDCs mit BJAB-Zellen zeigte nach Behandlung mit anti-

CD20-Flag-CD40L eine starke iDC-Aktivierung (erkennbar an der IL-12-Produktion, Abbildung 8), wohingegen die vergleichbare Kokultur der iDCs mit den CD20⁻-Jurkat-Zellen keine nennenswerte IL-12-Produktion zeigte. Dies war ein erster Hinweis darauf, dass das Konstrukt anti-CD20-Flag-CD40L eine CD20-restringierte CD40-stimulierende Aktivität aufweist.

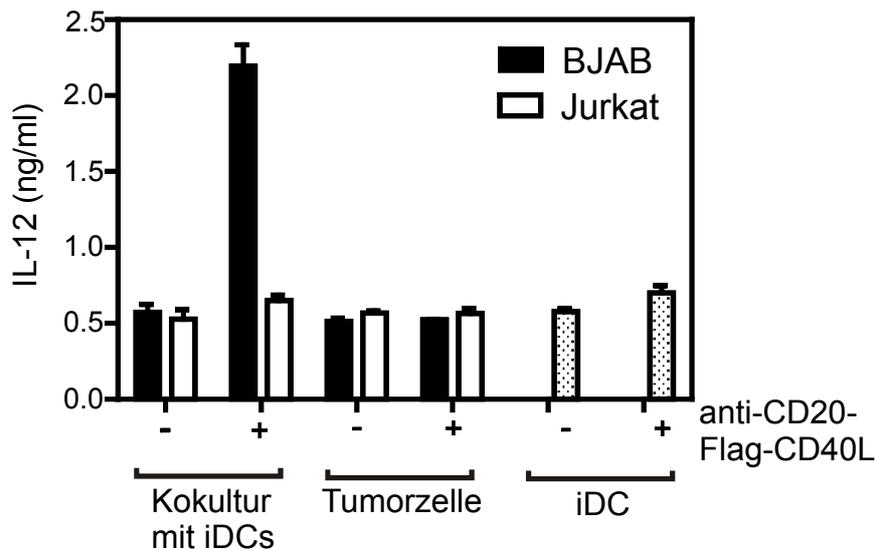


Abbildung 8: BJAB-abhängige Aktivierung von iDCs durch anti-CD20-Flag-CD40L

Unreife DCs desselben Spenders wurden mit jeweils CD20-positiven BJAB- bzw. CD20-negativen Jurkat-Zellen kokultiviert. Kokultur und Negativkontrollen wurden mit anti-CD20-Flag-CD40L (300 ng/ml) für 18 h stimuliert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der IL-12-Konzentration des Zellüberstands mit Hilfe eines IL-12 ELISAs.

4.6 Inhibition der CD20-restringierten iDC-Stimulation durch das Fusionsprotein anti-CD20-Flag-CD40L mit Rituximab (anti-CD20) als kompetitivem Antikörper

Anti-CD20-Flag-CD40L hatte in Anwesenheit von CD20⁺-BJABs, nicht aber von CD20⁻-Jurkat-Zellen eine starke iDC-Aktivierung induziert (Abbildung 9 A+B). Dies deutete auf eine verstärkte CD40-Aktivierung nach Bindung des Konstrukts an CD20 hin. Mithilfe eines weiteren experimentellen Ansatzes wurde diese Interpretation bestätigt. Hierzu wurde die Bindung von anti-CD20-Flag-CD40L an CD20 durch Einsatz von Rituximab (anti-CD20) auf BJAB-Zellen blockiert (Abbildung 9 C). Auf diese Weise sollte verifiziert werden, ob die Bindung

von anti-CD20-Flag-CD40L an Oberflächen-CD20 tatsächlich kausal für die verstärkte iDC-Aktivierung verantwortlich war.

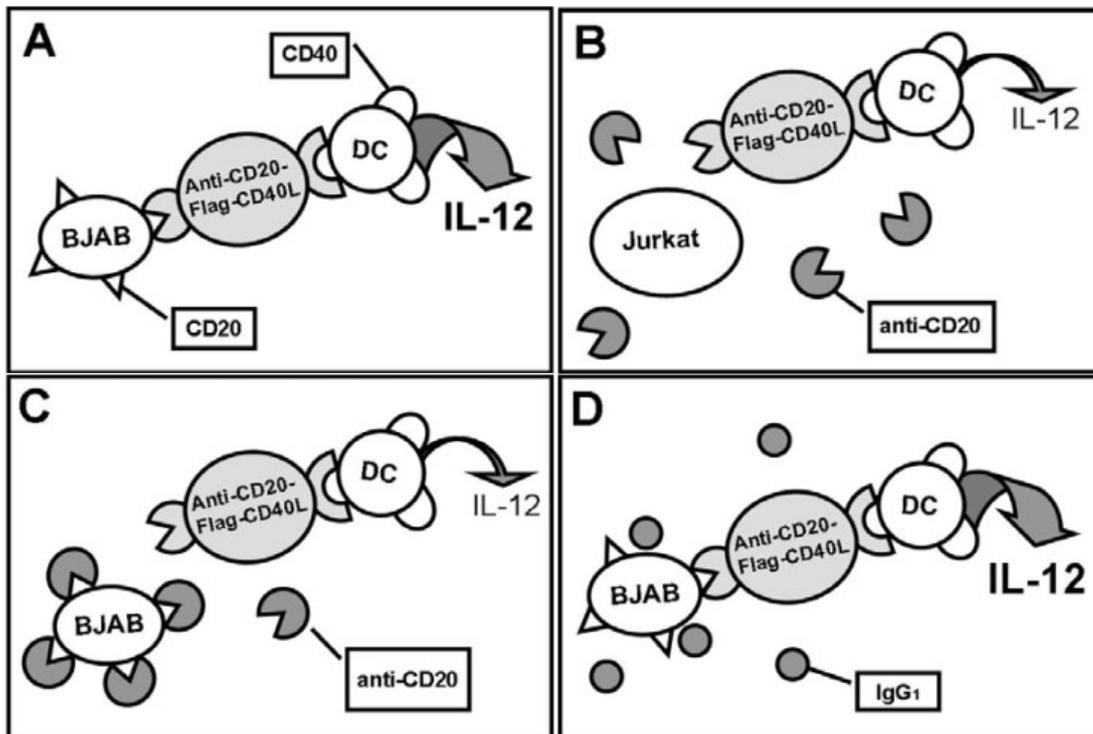


Abbildung 9: Modell der Tumorantigen-restringierten CD40-Stimulation dendritischer Zellen durch anti-CD20-Flag-CD40L

(A) Anti-CD20-Flag-CD40L induziert bei Anwesenheit von CD20⁺-BJAB-Zellen eine starke iDC-Aktivierung, erkennbar an der hohen IL-12-Produktion. In Kokultur mit CD20⁻-Jurkat-Zellen (B) und bei Inhibition durch Rituximab (anti-CD20) (C) induziert anti-CD20-Flag-CD40L bei iDCs eine antigenunabhängige CD40-Stimulation. Diese fällt mit einer viel geringeren IL-12-Produktion deutlich schwächer aus. Der Kontroll-IgG₁ (D) hingegen blockiert nicht CD20, auch hier bewirkt anti-CD20-Flag-CD40L eine CD20- bzw. antigenabhängige iDC-Aktivierung mit hoher IL-12-Produktion.

So wurde folgender Kokultur-Assay mit iDCs eines Spenders und BJAB- bzw. Jurkat-Zellen durchgeführt: Vor Stimulation mit anti-CD20-Flag-CD40L wurden die Zellen 1 h mit Rituximab vorinkubiert. In den mit Rituximab vorinkubierten Kokulturen mit CD20⁺-BJAB-Zellen war eine Stimulation von iDCs kaum noch möglich (Abbildung 10 A). Da Rituximab das Oberflächenmolekül CD20 der BJAB-Zellen für die Bindung durch die anti-CD20-Domäne von anti-CD20-Flag-CD40L blockierte, konnte letzteres nur noch an CD40 der iDCs binden (Abbildung 9 C). Die iDCs wurden in dieser Kokultur nur noch CD20-

bindungsunabhängig und damit deutlich schwächer stimuliert. Deshalb war die IL-12-Produktion hier vergleichbar mit der IL-12-Produktion der Kokulturen von iDCs mit Jurkat-Zellen (Abbildung 10 B) oder der IL-12-Produktion der Kontroll-iDCs, die in Abwesenheit weiterer Zellen mit anti-CD20-Flag-CD40L stimuliert wurden (Abbildung 10 A+B). Die CD20-selektive Aktivierung der iDCs konnte also durch Rituximab vollständig blockiert werden. Ohne Blockierung von Oberflächen-CD20 der BJAB-Zellen durch Rituximab wurde die IL-12-Produktion der iDCs in Kokultur mit BJAB-Zellen durch anti-CD20-Flag-CD40L etwa fünfmal stärker induziert (Abbildung 10 A). Dies deutete auf eine starke CD20-abhängige Aktivierung der iDCs durch anti-CD20-Flag-CD40L hin. Wie in Abbildung 10 B) auch zu erkennen ist, fand in Kokultur mit Jurkat durch Stimulation mit anti-CD20-Flag-CD40L erwartungsgemäß weder eine Tumorantigen-selektive Aktivierung von iDCs statt, noch nahm der AK Rituximab Einfluss darauf (siehe auch Abbildung 9 B). Als Negativkontrolle zu Rituximab wurde ein Kontroll-IgG₁-Antikörper verwendet, mit dem die Zellen vor Stimulation mit anti-CD20-Flag-CD40L ebenfalls 1 h vorinkubiert wurden. Dieser sollte im Gegensatz zu Rituximab nicht an Oberflächen-CD20 binden können und somit die Bindungsstelle des Konstrukts anti-CD20-Flag-CD40L auf BJAB-Zellen nicht blockieren (Abbildung 9 D). Wie vermutet wurde darum trotz Vorinkubation des Kontroll-IgG₁ in der Kokultur mit BJAB-Zellen durch anti-CD20-Flag-CD40L eine Tumorantigen-abhängige iDC-Aktivierung induziert, sichtbar an der starken IL-12-Produktion (Abbildung 10 A). Diese war mit der IL-12-Produktion der stimulierten Kokultur iDC + BJAB ohne vorinkubierte Antikörper vergleichbar (Abbildung 10 A). Mit der selektiven Inhibition des Fusionsproteins anti-CD20-Flag-CD40L durch Rituximab als kompetitivem AK konnte gezeigt werden, dass das Konstrukt für die Tumorantigen-restringierte Stimulation der iDCs verantwortlich war. Dieses Ergebnis konnte in mehreren unabhängigen Versuchen reproduziert werden.

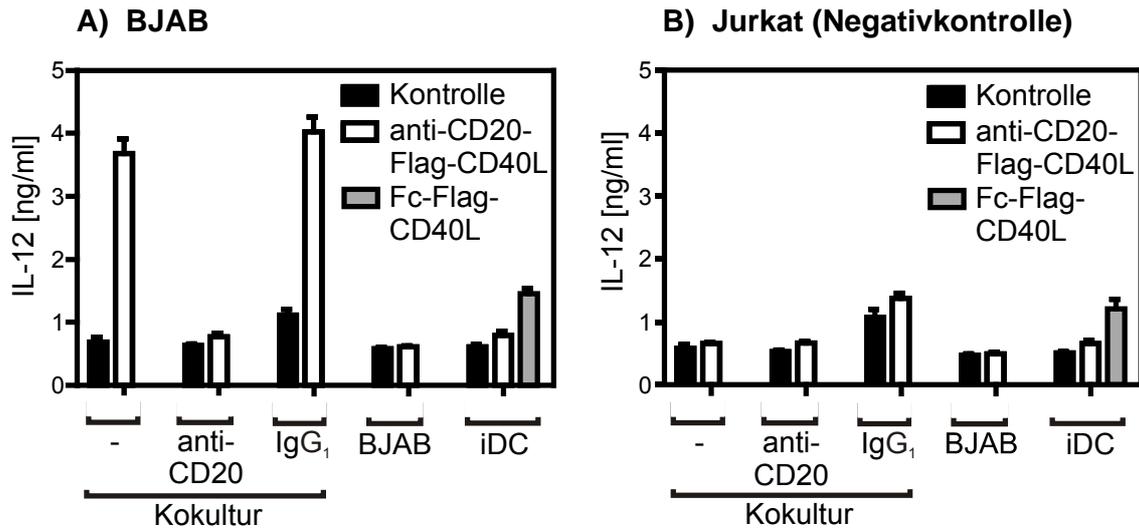
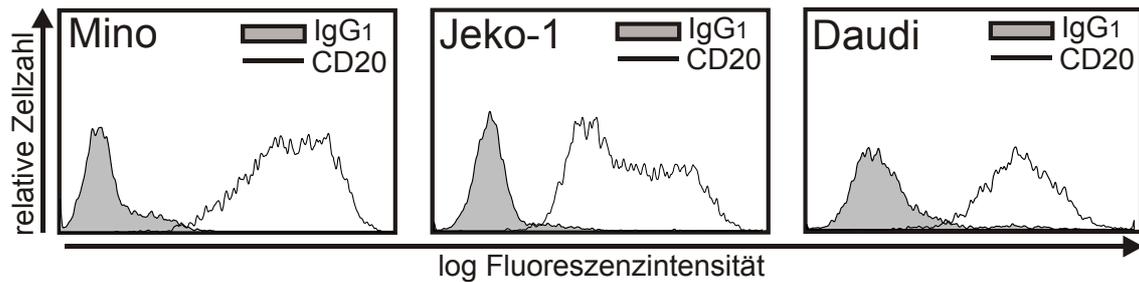


Abbildung 10: Einfluss von Rituximab (anti-CD20) als kompetitiver AK auf die CD20-abhängige iDC-aktivierende Wirkung von anti-CD20-Flag-CD40L

Die Kokultur iDC mit BJAB- bzw. Jurkat-Zellen wurde 1 h lang mit Rituximab (anti-CD20) mit 20 µg/ml bzw. einem Kontroll-IgG₁-Antikörper (10 µg/ml) vorinkubiert, anschließend mit anti-CD20-Flag-CD40L (300 ng/ml) 18 h stimuliert. Danach erfolgte die Bestimmung der IL-12-Konzentration des Zellüberstands anhand eines IL-12 ELISAs. Die CD20-abhängige Reifung der iDCs in Kokultur mit CD20⁺-BJAB-Zellen ließ sich durch Rituximab blockieren, in der Kokultur mit CD20⁻-Jurkat-Zellen hatte dies hingegen keinen Einfluss.

4.7 Tumorantigen-restringierte Aktivierung dendritischer Zellen als allgemein anwendbares Prinzip

Die Funktionsfähigkeit des Konstrukts anti-CD20-Flag-CD40L war in Kokulturen von iDCs mit BJAB-Zellen mehrfach geprüft worden. In den folgenden Experimenten sollte weiterhin getestet werden, ob die Tumorantigen-restringierte Aktivierung von iDCs mittels Bindung von anti-CD20-Flag-CD40L an CD20 auch mit anderen Tumorzellen funktioniert. Dazu wurden verschiedene B-Zell-Lymphom-Zelllinien bezüglich der CD20-Expression mittels FACS analysiert und schließlich die CD20⁺-B-Zelllinien Mino, Jeko-1, und Daudi für die weiteren Studien verwendet (Abbildung 11).

**Abbildung 11: CD20⁺-Tumorzelllinien**

Die Tumorzelllinien Mino, Jeko-1 und Daudi wurden mit PE-konjugierten Antikörpern, die CD20 erkennen, sowie mit dem entsprechenden Isotypkontroll-AK inkubiert. Anschließend erfolgte die Detektion der exprimierten Moleküle auf der Zelloberfläche anhand Durchflusszytometrie.

Es zeigte sich, dass anti-CD20-Flag-CD40L auch mit anderen CD20⁺-Tumorzellen als BJAB den gewünschten CD20-abhängigen Reifungseffekt auf iDCs zeigt. Wie in Abbildung 12 gezeigt wird, wurden iDCs eines Spenders mit drei verschiedenen CD20⁺-Tumorzellen (BJAB, Jeko-1 und Mino) kokultiviert, sowie mit CD20⁻Jurkat-Zellen, die wiederum als Negativkontrolle dienen. Durch Zugabe von anti-CD20-Flag-CD40L war bei allen Kokulturen mit CD20⁺-Tumorzellen eine deutlich erhöhte iDC-stimulierende Aktivität zu sehen, die sich durch Rituximab blockieren ließ.

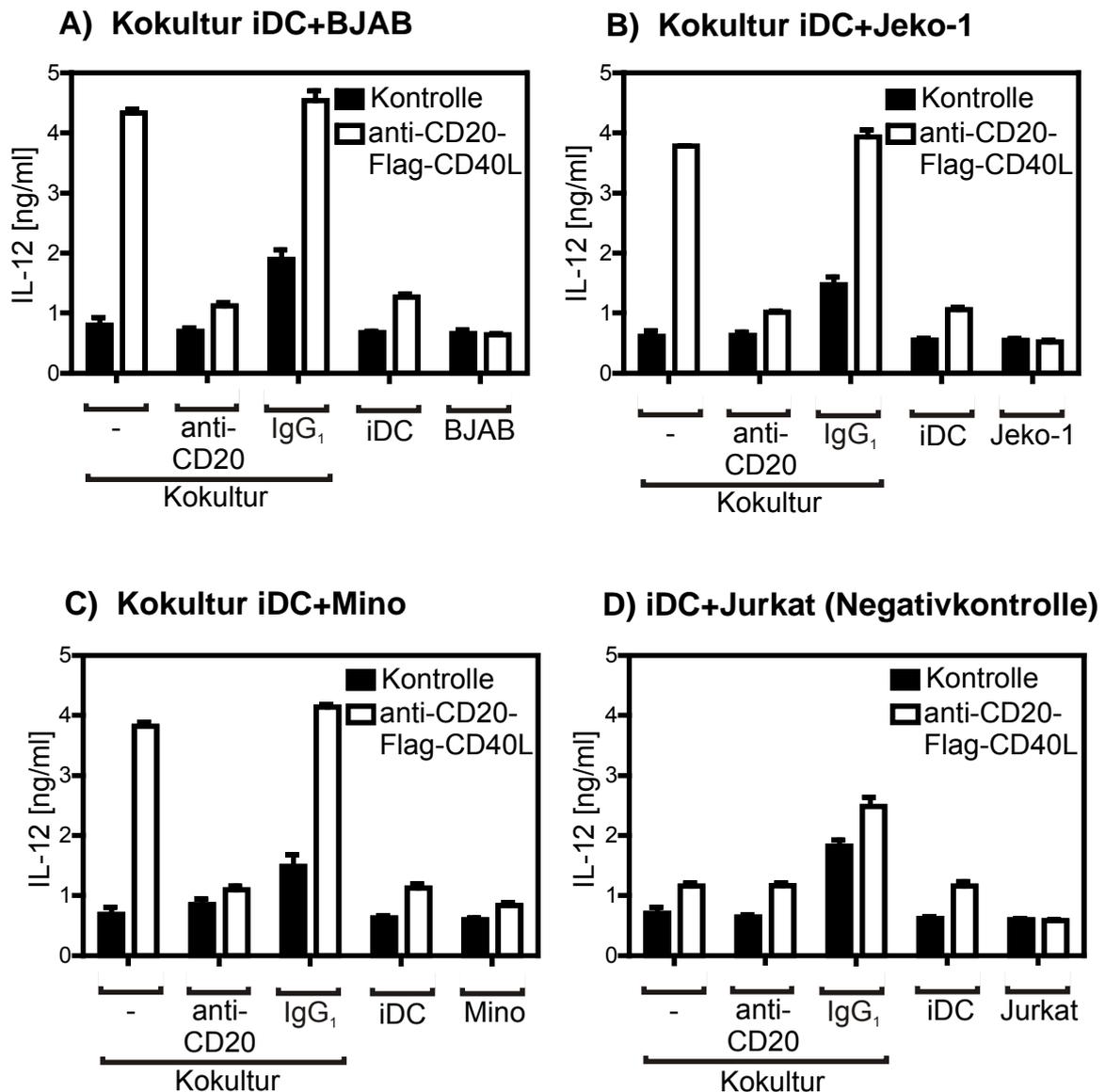


Abbildung 12: Kokulturen von iDCs desselben Spenders mit jeweils vier verschiedenen Tumorzelllinien

Die Kokultur iDC mit jeweiliger Tumorzelllinie wurde 1 h lang mit Rituximab (anti-CD20) mit 20 µg/ml bzw. einem Kontroll-IgG₁-Antikörper (10 µg/ml) vorinkubiert, anschließend mit anti-CD20-Flag-CD40L (300 ng/ml) 15 h stimuliert. Die Bestimmung der IL-12-Konzentration des Zellüberstands erfolgte anhand eines IL-12 ELISAs.

Das Prinzip der antigenselektiven iDC-Aktivierung mit anti-CD20-Flag-CD40L ließ sich nicht nur anhand verschiedener CD20⁺-Tumorzellen bestätigen, sondern war auch mit iDCs von verschiedenen Spendern reproduzierbar. Dies ist beispielhaft in Abbildung 13 gezeigt: es wurden iDCs, die von vier unabhängigen Spendern erhalten wurden, getestet. Diese iDCs wurden jeweils mit Daudi-

Zellen kokultiviert und wie angegeben stimuliert. Trotz individueller quantitativer Unterschiede war der Erfolg der Tumorantigen-spezifischen iDC-Aktivierung durch das Fusionsprotein anti-CD20-Flag-CD40L wieder in jedem Fall ersichtlich.

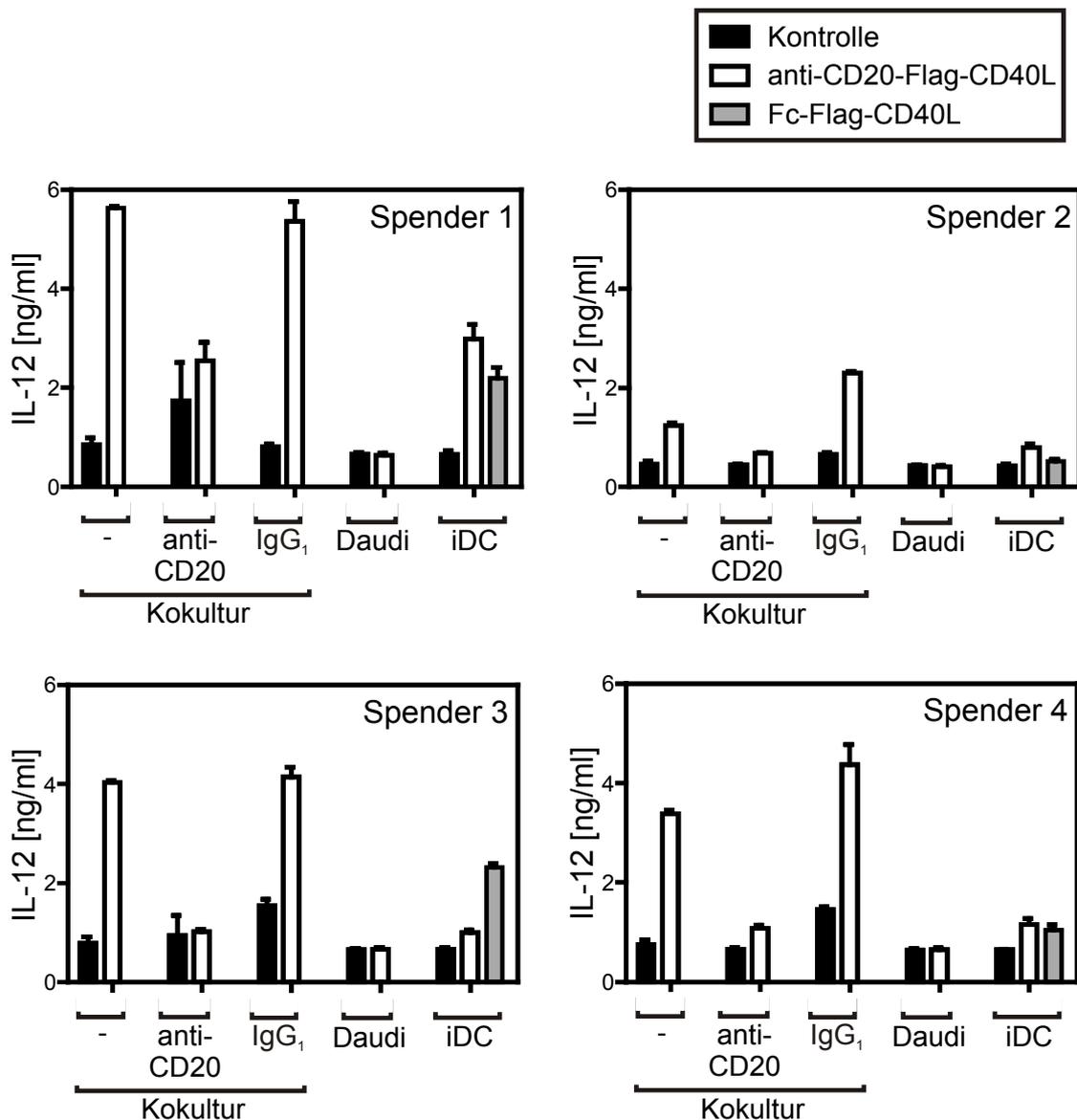


Abbildung 13: Kokulturen von iDCs vier verschiedener Spender mit der jeweils gleichen Tumorzelllinie

Die Kokulturen der iDCs mit Daudi-Zellen wurden 1 h lang mit Rituximab (anti-CD20) mit 20 µg/ml bzw. einem Kontroll-IgG₁-Antikörper (10 µg/ml) vorinkubiert, anschließend mit anti-CD20-Flag-CD40L (300 ng/ml) für mindestens 15 h stimuliert. Anschließend erfolgte die Detektion von IL-12 im Zellüberstand anhand eines IL-12 ELISAs.

Die gezeigten Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei der Tumorantigen-restringierten Stimulation von CD40 (bzw. von dendritischen Zellen) durch das Fusionsprotein anti-CD20-Flag-CD40L um ein allgemein anwendbares Prinzip handelt. Dies könnte in der Zukunft der TumortheraPIeforschung ein vielversprechender Ansatz sein, um durch systemische CD40-Stimulation verursachte, therapiebegrenzende Nebenwirkungen zu kontrollieren.

5 Diskussion

Dendritische Zellen werden bereits als Impfung zur Tumorbehandlung in der experimentellen Immuntherapie eingesetzt (Engleman, 2003; Grigoleit et al., 2007). Auch gibt es in der Tumortherapieforschung verschiedene Versuche das CD40L-CD40-System immunstimulatorisch zu nutzen (Khong et al., 2012). Mögliche Nebenwirkungen, die durch systemische CD40-Aktivierung aufgrund des vergleichsweise breiten Vorkommens von CD40 und seiner starken immunstimulatorischen Wirkung bedingt sind (Vonderheide, 2007), grenzen den Einsatz solcher Ansätze jedoch deutlich ein. CD40-Stimulierung bewirkt das Ausschütten proinflammatorischer Zytokine und Chemokine, was zu lebensgefährlichen entzündlichen Geschehen innerhalb des Gefäßsystems führen kann (Sahler et al., 2012). Um solche Nebenwirkungen durch Therapien mit anti-CD40-Antikörpern zu vermeiden, ist es unter anderem das Ziel, eine systemische CD40-Aktivierung zu vermeiden. Dies soll erreicht werden durch die Entwicklung von Prodrug-Ansätzen bzw. durch Wirkstoffe, die möglichst Tumorkompartiment CD40 stimulieren. Auf diese Weise sollen dendritische Zellen speziell in Tumorgewebe aktiviert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bifunktionelles scFv-Fusionsprotein entwickelt und untersucht, welches dendritische Zellen über CD40 Tumorantigen-restringiert aktiviert und somit als eine Art Prodrug wirkt. Dies wurde in Kokulturen von dendritischen Zellen mit antigenpositiven Tumorzellen evaluiert. Das Fusionsprotein sc40-Flag-CD40L erkennt mit seiner sc40-scFv-Domäne spezifisch das Tumorstroma-Antigen FAP (Wyzgol et al., 2009). In Kokulturen von dendritischen Zellen mit FAP-positiven Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass die FAP-vermittelte Bindung von sc40-Flag-CD40L an CD40 dendritische Zellen stärker aktivierte als bei FAP-unabhängiger Bindung an CD40 (siehe Abbildung 5, Kapitel 4.2). Schließlich wurde ein scFv-CD40L-Fusionsprotein untersucht, das über einen CD20-spezifischen scFv CD20-positive Tumorzellen erkennt: anti-CD20-Flag-CD40L. Hierbei wurde auch Rituximab verwendet, welches als monoklonaler anti-CD20-Antikörper in der Immuntherapie bei malignen Lymphomen und rheumatoider Arthritis zum Einsatz kommt (Borker &

Choudhary, 2011). In Kokulturen von iDCs mit CD20-positiven Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass die CD20-abhängige DC-Aktivierung durch anti-CD20-Flag-CD40L viel stärker ausgeprägt war, als die CD20-unabhängige. Dies zeigte sich an der IL-12-Produktion der DCs, welches eine Reifungskontrolle von dendritischen Zellen darstellt (Li et al., 2012). Trotz Tumorantigen-unabhängiger Aktivierung von dendritischen Zellen durch anti-CD20-Flag-CD40L und sc40-Flag-CD40L zeigte sich bei beiden Tumorantigenen FAP und CD20, dass die Tumorantigen-abhängige Stimulation durch die Konstrukte dagegen deutlich stärker ausfiel. Dies war jeweils sichtbar an der IL-12-Produktion. Jedoch war auch zu beobachten, dass die CD20-spezifische CD40-Stimulation eine deutlich stärkere IL-12-Produktion hervorrief als die FAP-spezifische. Letztere war etwa doppelt so hoch wie die FAP-unspezifische IL-12-Produktion (siehe Abbildung 5, Kapitel 4.2). Dahingegen war die IL-12-Produktion der CD20-abhängigen CD40-Aktivierung etwa drei- bis viermal so hoch wie die CD20-unabhängige (siehe Abbildung 13, Kapitel 4.7).

Es zeigte sich also, dass die Stärke der Tumorantigen-abhängigen Aktivierung dendritischer Zellen auch abhängig vom jeweiligen anvisierten Tumorantigen war. Dass dies mit CD20 einen besseren Effekt ergab als mit FAP, könnte an der verschiedenen stark ausgeprägten Expression dieser Moleküle liegen. B-Zellen exprimieren CD20 in hoher Zahl (Borker & Choudhary, 2011). Dies würde eine höhere Tumorantigen-restringierte Aktivität des Konstrukts anti-CD20-Flag-CD40L erklären.

Einschränkend für den Einsatz von anti-CD20-Flag-CD40L ist die nicht absolute Wirksamkeit des Fusionsproteins zu sehen: aufgrund der hohen Aktivität von löslichem CD40L zeigt sc40-Flag-CD40L auch FAP-unabhängig eine hohe CD40-stimulierende Aktivität (Wyzgol et al., 2009). Durch diese Tumorantigen-unabhängige CD40-Stimulation ist die Tumor-lokalisierte Wirkung der Fusionsproteine konzentrationsabhängig. Zunächst verläuft die Tumorantigen-vermittelte CD40-Aktivierung zwar deutlich stärker, jedoch werden mit steigender Konzentration des scFv-CD40L-Fusionsproteins dendritische Zellen zunehmend auch Tumorantigen-unabhängig aktiviert. In der Summe sollte die

Tumorantigen-abhängige CD40-Aktivierung jedoch das therapeutische Fenster für den klinischen Einsatz solcher Stoffe deutlich erweitern.

Tatsächlich zeigte die Tumorantigen-spezifische Bindung sowohl bei sc40-Flag-CD40L als auch bei anti-CD20-Flag-CD40L eine deutlich stärkere Rezeptoraktivierung von CD40. Die FAP spezifische Bindung von sc40-Flag-CD40L an CD40 verlagerte den ED₅₀-Wert des Fusionsproteins immerhin zu einer etwa 25-mal niedrigeren Konzentration (Wyzgol et al., 2009). Dies bedeutet, dass auf diesem Weg eine Tumor-lokalisierte DC-Aktivierung erzielt und damit indirekt eine verstärkte T-Zell-Aktivierung, das heißt eine Immunantwort lokal induziert werden kann (van Kooten & Banchereau, 2000; Quezada et al., 2004).

Das Konstrukt anti-CD20-Flag-CD40L ist dabei von besonderem Interesse. Zu der Tumorantigen-vermittelten Aktivierung dendritischer Zellen kommt es durch sein CD20-spezifisches scFv. Dieses bindet wie Rituximab (anti-CD20) an CD20 von malignen oder gesunden B-Zellen. Anti-CD20-Flag-CD40L stellt somit neben Rituximab einen weiteren Therapieansatz zur Behandlung maligner Lymphome dar. Dies ist besonders interessant, da viele Patienten, die mit Rituximab behandelt werden, eine Resistenzentwicklung zeigen (Amoroso et al., 2011).

Die Wirkung von Rituximab erklärt sich hauptsächlich durch Induktion der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität, komplementabhängiger Zytotoxizität und Induktion von Apoptose (Bremer et al., 2008). Tumorzellen scheinen sich jedoch diesen Mechanismen entziehen zu können, die Resistenzmechanismen sind allerdings komplex und nicht vollständig geklärt (Amoroso et al., 2011; Rezvani & Maloney, 2011). Versuche, um Rituximab-Resistenzen zu umgehen, beruhen zum einen auf einer Wirkungssteigerung von Rituximab (Rezvani & Maloney, 2011): zum Beispiel konnte seine zytotoxische Wirkung durch Verstärkung der CDC aufgrund einer Hochregulation der CD20-Expression erhöht werden (Shimizu et al., 2010). Zum anderen wurden neuartige monoklonale anti-CD20-Antikörper generiert, die beispielsweise an neue Epitope des CD20-Rezeptors binden können (Teeling et al., 2004; Rezvani & Maloney, 2011). Solch Rituximab-resistente Tumorzellen könnten möglicherweise auch mit einem Fusionsprotein wie anti-CD20-Flag-CD40L behandelt werden, welches

dendritische Zellen aktiviert. Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass die Tumorzellen CD20⁺ sind. Auf diese Weise könnten sich die Mechanismen einer Rituximab-Resistenz des Tumors umgehen lassen, was neue Möglichkeiten in der Behandlung Rituximab-resistenter, maligner Lymphome eröffnen würde.

Der mögliche Einsatz von anti-CD20-Flag-CD40L zur lokal im Tumorgewebe wirkenden Tumorbekämpfung bietet aus diesen Gründen eine fruchtbare Grundlage zur weitergehenden präklinischen Forschung. Eine Reduzierung systemischer Nebenwirkungen aufgrund der Tumor-lokalisierten Aktivierung dendritischer Zellen sowie die mögliche Option der Behandlung Rituximab-resistenter Lymphome durch anti-CD20-Flag-CD40L könnte eine zukunftsweisende Rolle in der Tumorummuntherapie spielen.

6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen sind spezielle Antigen-präsentierende Zellen und daher oft auch in die körpereigene Bekämpfung von Tumoren involviert. Über das CD40-CD40L-System stellen sie ein Ziel in der Tumorummuntherapieforschung dar. CD40-spezifische Antikörper, die an CD40 aller dendritischen Zellen sowie anderer CD40-exprimierenden Zellen binden, bewirken aufgrund der systemischen CD40-Aktivierung allerdings schwere Nebenwirkungen. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mit Hilfe von Tumor-spezifischen scFvs (antigenbindenden Einzelkettenfragmenten) Fusionsproteine zu generieren, die ausschließlich oder stark bevorzugt Tumor-lokalisiert dendritische Zellen aktivieren. In dieser Arbeit wurde anhand von Kokulturen von Tumorantigen-positiven Tumorzellen mit dendritischen Zellen gezeigt, dass dies möglich ist.

Werden dendritische Zellen durch Stimulation von CD40 aktiviert, induziert dies die Produktion von IL-12 sowie die Hochregulation kostimulatorischer Moleküle. Diese Veränderungen sind messbar und dienen der T-Zell-Aktivierung und damit der Auslösung einer Immunantwort. Zunächst wurde sc40-Flag-CD40L, ein bereits bekanntes Fusionsprotein, getestet. Dieses bindet über sc40 spezifisch an das Tumorstroma-Antigen FAP. Stimulation mit sc40-Flag-CD40L aktivierte CD40 von dendritischen Zellen bei Tumorantigen-vermittelter CD40-Bindung deutlich stärker als ohne Tumorantigen-vermittelte Bindung. Das daraufhin produzierte und untersuchte anti-CD20-Flag-CD40L erzielte sogar noch bessere Ergebnisse. Bei diesem Konstrukt erfolgte die Tumorantigen-abhängige Aktivierung von CD40 dendritischer Zellen über die Bindung an CD20, das auf malignen sowie gesunden B-Zellen exprimiert wird. Im Vergleich zur CD20-unabhängigen Aktivierung von CD40 durch anti-CD20-Flag-CD40L führte die CD20-restringierte CD40-Aktivierung mit anti-CD20-Flag-CD40L zu einer deutlich stärkeren Aktivierung der dendritischen Zellen.

Mit einem solchen Fusionsprotein ist nun grundsätzlich die Möglichkeit vorhanden, dendritische Zellen Tumorantigen-abhängig, das heißt im Tumorgewebe selbst verstärkt zu stimulieren. Die auf diese Weise aktivierten DCs können nun aufgrund der induzierten Veränderungen (IL-12-Produktion, Hochregulation ko-

stimulierender Moleküle) Tumor-lokalisiert eine lokale, auf den Tumor begrenzte Immunantwort auslösen. Auf diese Weise sollte es möglich werden, Nebenwirkungen einer systemischen CD40-Aktivierung zu vermeiden bzw. zu reduzieren. Vermutlich stellt der Einsatz von anti-CD20-Flag-CD40L zudem sogar eine Option zur Behandlung Rituximab-resistenter Lymphome dar. Diese überaus positiven Ergebnisse und die sich daraus ergebenden Möglichkeiten bieten eine vielversprechende Grundlage für die weitere Forschung auf diesem Gebiet der Tumorummuntherapie.

7 Literaturverzeichnis

Abdulla, N. E., M. J. Ninan, et al. (2012). Rituximab: current status as therapy for malignant and benign hematologic disorders. *BioDrugs* **26**(2): 71-82.

Accardi, L. and P. Di Bonito (2010). Antibodies in single-chain format against tumour-associated antigens: present and future applications. *Curr Med Chem* **17**(17): 1730-1755.

Ahmad, Z. A., S. K. Yeap, et al. (2012). scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol* **2012**: 980250.

Alley, S. C., N. M. Okeley, et al. (2010). Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer. *Curr Opin Chem Biol* **14**(4): 529-537.

Amoroso, A., S. Hafsi, et al. (2011). Understanding rituximab function and resistance: implications for tailored therapy. *Front Biosci* **16**: 770-782.

Armitage, R. J. (1994). Tumor necrosis factor receptor superfamily members and their ligands. *Curr Opin Immunol* **6**(3): 407-413.

Armitage, R. J., W. C. Fanslow, et al. (1992). Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* **357**(6373): 80-82.

Baeuerle, P. A. and C. Reinhardt (2009). Bispecific T-cell engaging antibodies for cancer therapy. *Cancer Res* **69**(12): 4941-4944.

Banchereau, J., F. Bazan, et al. (1994). The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* **12**: 881-922.

Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**(6673): 245-252.

Bodmer, J. L., P. Schneider, et al. (2002). The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends Biochem Sci* **27**(1): 19-26.

Borker, A. and N. Choudhary (2011). Rituximab. *Indian Pediatr* **48**(8): 627-632.

Bremer, E., W. H. Abdulahad, et al. (2011). Selective elimination of pathogenic synovial fluid T-cells from rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis by targeted activation of Fas-apoptotic signaling. *Immunol Lett* **138**(2): 161-168.

Bremer, E., M. de Bruyn, et al. (2009). Targeted cancer immunotherapy using ligands of the tumor necrosis factor super-family. *Curr Drug Targets* **10**(2): 94-103.

Bremer, E., B. ten Cate, et al. (2008). Superior activity of fusion protein scFvRit:sFasL over cotreatment with rituximab and Fas agonists. *Cancer Res* **68**(2): 597-604.

Caux, C., C. Massacrier, et al. (1994). Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med* **180**(4): 1263-1272.

Cella, M., D. Scheidegger, et al. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* **184**(2): 747-752.

Dhodapkar, M. V., K. M. Dhodapkar, et al. (2008). Interactions of tumor cells with dendritic cells: balancing immunity and tolerance. *Cell Death Differ* **15**(1): 39-50.

Engleman, E. G. (2003). Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Semin Oncol* **30**(3 Suppl 8): 23-29.

Gardnerova, M., R. Blaque, et al. (2000). The use of TNF family ligands and receptors and agents which modify their interaction as therapeutic agents. *Curr Drug Targets* **1**(4): 327-364.

Gerspach, J., H. Wajant, et al. (2009). Death ligands designed to kill: development and application of targeted cancer therapeutics based on proapoptotic TNF family ligands. *Results Probl Cell Differ* **49**: 241-273.

Gommerman, J. L. and L. Summers deLuca (2011). LTbetaR and CD40: working together in dendritic cells to optimize immune responses. *Immunol Rev* **244**(1): 85-98.

Gordon, J. (1995). CD40 and its ligand: central players in B lymphocyte survival, growth, and differentiation. *Blood Rev* **9**(1): 53-56.

Grigoleit, G. U., M. Kapp, et al. (2007). Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients: induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte responses even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor. *J Infect Dis* **196**(5): 699-704.

Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.

Kanakry, J. A., H. Li, et al. (2013). Plasma Epstein-Barr virus DNA predicts outcome in advanced Hodgkin lymphoma: correlative analysis from a large North American co-operative group trial. *Blood*.

Khong, A., D. J. Nelson, et al. (2012). The use of agonistic anti-CD40 therapy in treatments for cancer. *Int Rev Immunol* **31**(4): 246-266.

Kornbluth, R. S., M. Stempniak, et al. (2012). Design of CD40 agonists and their use in growing B cells for cancer immunotherapy. *Int Rev Immunol* **31**(4): 279-288.

Küppers, R. (2012). New insights in the biology of Hodgkin lymphoma. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* **2012**: 328-334.

- Kushwah, R. and J. Hu (2011). Role of dendritic cells in the induction of regulatory T cells. *Cell Biosci* **1**(1): 20.
- Li, D. Y., C. Gu, et al. (2012). Maturation induction of human peripheral blood mononuclear cell-derived dendritic cells. *Exp Ther Med* **4**(1): 131-134.
- Locksley, R. M., N. Killeen, et al. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* **104**(4): 487-501.
- Ma, D. Y. and E. A. Clark (2009). The role of CD40 and CD154/CD40L in dendritic cells. *Semin Immunol* **21**(5): 265-272.
- Melief, C. J. (2008). Cancer immunotherapy by dendritic cells. *Immunity* **29**(3): 372-383.
- Müller, N., A. Wyzgol, et al. (2008). Activity of soluble OX40 ligand is enhanced by oligomerization and cell surface immobilization. *FEBS J* **275**(9): 2296-2304.
- O'Garra, A. and N. Arai (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* **10**(12): 542-550.
- Ouaaz, F., J. Arron, et al. (2002). Dendritic cell development and survival require distinct NF-kappaB subunits. *Immunity* **16**(2): 257-270.
- Pastan, I., R. Hassan, et al. (2006). Immunotoxin therapy of cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(7): 559-565.
- Quezada, S. A., L. Z. Jarvinen, et al. (2004). CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* **22**: 307-328.
- Rezvani, A. R. and D. G. Maloney (2011). Rituximab resistance. *Best Pract Res Clin Haematol* **24**(2): 203-216.
- Sachamitr, P. and P. J. Fairchild (2012). Cross presentation of antigen by dendritic cells: mechanisms and implications for immunotherapy. *Expert Rev Clin Immunol* **8**(6): 547-555.
- Sahler, J., S. Spinelli, et al. (2012). CD40 ligand (CD154) involvement in platelet transfusion reactions. *Transfus Clin Biol* **19**(3): 98-103.
- Samel, D., D. Müller, et al. (2003). Generation of a FasL-based proapoptotic fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted Activation. *J Biol Chem* **278**(34): 32077-32082.
- Schreiber, R. D., L. J. Old, et al. (2011). Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**(6024): 1565-1570.

Shimizu, R., J. Kikuchi, et al. (2010). HDAC inhibitors augment cytotoxic activity of rituximab by upregulating CD20 expression on lymphoma cells. *Leukemia* **24**(10): 1760-1768.

Shuptrine, C. W., R. Surana, et al. (2012). Monoclonal antibodies for the treatment of cancer. *Semin Cancer Biol* **22**(1): 3-13.

Steinman, R. M. and J. Banchereau (2007). Taking dendritic cells into medicine. *Nature* **449**(7161): 419-426.

Teeling, J. L., R. R. French, et al. (2004). Characterization of new human CD20 monoclonal antibodies with potent cytolytic activity against non-Hodgkin lymphomas. *Blood* **104**(6): 1793-1800.

Trümper, L. and M. Pfreundschuh (1996). High-grade non-Hodgkin lymphoma: diagnosis and therapy. *Ther Umsch* **53**(2): 133-139.

van Kooten, C. and J. Banchereau (2000). CD40-CD40 ligand. *J Leukoc Biol* **67**(1): 2-17.

Vonderheide, R. H. (2007). Prospect of targeting the CD40 pathway for cancer therapy. *Clin Cancer Res* **13**(4): 1083-1088.

Wajant, H., J. Gerspach, et al. (2005). Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* **16**(1): 55-76.

Wajant, H., J. Gerspach, et al. (2011). Engineering death receptor ligands for cancer therapy. *Cancer Lett.*

Wajant, H., D. Moosmayer, et al. (2001). Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene* **20**(30): 4101-4106.

Weiner, L. M., J. C. Murray, et al. (2012). Antibody-based immunotherapy of cancer. *Cell* **148**(6): 1081-1084.

Wyzgol, A., N. Müller, et al. (2009). Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol* **183**(3): 1851-1861.

8 Anhang

8.1 DNA- und Aminosäuresequenzen der Fusionsproteine

Es ist die kodierende Nukleotidsequenz (NT) sowie translatierte Aminosäuresequenz (AS) der Fusionsproteine angegeben.

Anti-CD20-Flag-CD40L-pCR3:

Anti-CD20:	NT 1-852	AS 1-284
<u>Linker</u>	NT 475-516	AS 159-172
FLAG:	NT 859-882	AS 287-294
CD40L:	NT 889-1429	AS 297-443

```

1  atggagacagacacactcctgctatgggtactgctgctctgggtccaggtccactgg
1  M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G
61  gactatccatgatgatgtccagattatgctggggcccagccggccatggcccaggtacaa
21  D Y P Y D V P D Y A G A Q P A M A Q V Q
121  ctgcagcagcctggggctgagctggggaagcctggggcctcagtgaagatgtcctgcaag
41  L Q Q P G A E L V K P G A S V K M S C K
181  gcttctggctacacatttaccagttacaatatgcactgggtaaacagacacctggctcg
61  A S G Y T F T S Y N M H W V K Q T P G R
241  ggcctggaatggattggagctatattatcccggaaatggtgatacttctacaatcagaag
81  G L E W I G A I Y P G N G D T S Y N Q K
301  ttcaaaggcaaggccacattgactgcagacaaatcctccagcacagcctacatgcagctc
101  F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L
361  agcagcctgacatctgaggactctgcggtctattactgtgcaagatcgacttactacggc
121  S S L T S E D S A V Y Y C A R S T Y Y G
421  ggtgactgggtacttcaatgtctggggcgcagggaccacggtcaccgtctcttcaggagga
141  G D W Y F N V W G A G T T V T V S S G G
481  ggcggatccggcggaggcggaaagcgggtggcggaggctctcaaattgttctctcccagtct
161  G G S G G G G S G G G G S Q I V L S Q S
541  ccagcaatcctgtctgcatctccaggggagaaggtcacaatgacttgcagggccagctca
181  P A I L S A S P G E K V T M T C R A S S
601  agtgtaagttacatccactggttccagcagaagccaggatcctccccaaaccctggatt
201  S V S Y I H W F Q Q K P G S S P K P W I
661  tatgccacatccaacctggcttctggagtcctgttcgcttcagtggcagtggtctggg
221  Y A T S N L A S G V P V R F S G S G S G
721  acttcttactctctcacaatcagcagagtggaggctgaagatgctgccacttattactgc
241  T S Y S L T I S R V E A E D A A T Y Y C
781  cagcagtggtactagtaacccacccacgttcggaggggggaccaagctggaaatcaaactg
261  Q Q W T S N P P T F G G G T K L E I K R
841  gcggccgcggaagatccgattacaaagacgatgacgataaagaattcgggtgatcagaat
281  A A A E R S D Y K D D D D K E F G D Q N
901  cctcaaattgcggcacatgtcataagtgaggccagcagtaaaacaacatctgtgttacag
301  P Q I A A H V I S E A S S K T T S V L Q
961  tgggctgaaaaaggatactacacccatgagcaacaacttggtaacctggaaaatgggaaa
321  W A E K G Y Y T M S N N L V T L E N G K

```

1121 cagctgaccgttaaaaagacaaggactctattatatctatgcccagtcaccttctgttcc
 341 Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q V T F C S
 1181 aatcggaagcttcgagtcaggctccatttatagccagcctctgcctaaagtccccggg
 361 N R E A S S Q A P F I A S L C L K S P G
 1241 agattcgagagaatcttactcagagctgcaaataccacagttccgccaaccttgcggg
 381 R F E R I L L R A A N T H S S A K P C G
 1301 caacaatccattcacttgggaggagtatttgaattgcaaccaggtgcttcgggtgtttgtc
 401 Q Q S I H L G G V F E L Q P G A S V F V
 1361 aatgtgactgatccaagccaagtgagccatggcactggcttcacgtcctttggcttactc
 421 N V T D P S Q V S H G T G F T S F G L L
 1421 aaactctga
 441 K L -

pCR3-Fc-Flag-CD40L:

<u>Signalpeptid:</u>	NT 1-51	AS 1-17
Fc:	NT 52-729	AS 18-243
<u>Linker</u>	NT 736-807	AS 246-269
FLAG:	NT 814-837	AS 272-279
CD40L:	NT 844-1384	AS 282-428

1 atggctatcatctacctcatcctcctgttcaccgctgtgcggggacctcgacaaaactcac
 1 M A I I Y L I L L F T A V R G L D K T H
 61 acatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttctcttcccc
 21 T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P
 121 ccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtgggtg
 41 P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V
 181 gacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtg
 61 D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V
 241 cataatgccaagacaaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagc
 81 H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S
 301 gtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggctctcc
 101 V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S
 361 aacaaagccctcccagccccatcgagaaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga
 121 N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R
 421 gaaccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagc
 141 E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S
 481 ctgacctgcctgggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgaggaggaat
 161 L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N
 541 gggcagccggagaaactacaagaccacgcctcccgtgttgactccgacggctccttc
 181 G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F
 601 ttcctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctca
 201 F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S
 661 tgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtct
 221 C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S
 721 ccgggtaaaagatctccgcagccgcagccgaaaccgcagccgaaaccggaaccggaagga
 241 P G K R S P Q P Q P K P Q P K P E P E G
 781 tctctggagggtgctgttccaggggcccgatccgattacaagacgatgacgataaagaa
 261 S L E V L F Q G P G S D Y K D D D D K E
 841 ttcgggtgatcagaatcctcaaattgcgggcacatgtcataagtgaggccagcagtaaaaca
 281 F G D Q N P Q I A A H V I S E A S S K T
 901 acatctgtgttacagtgggctgaaaaaggatactacaccatgagcaacaacttggtaacc

301 T S V L Q W A E K G Y Y T M S N N L V T
 961 ctggaaaatgggaaacagctgaccgttaaaagacaaggactctattatatctatgcccaa
 321 L E N G K Q L T V K R Q G L Y Y I Y A Q
 1121 gtcaccttctgttccaatcggaagcttcgagtcgaagctccatttatagccagcctctgc
 341 V T F C S N R E A S S Q A P F I A S L C
 1181 ctaaagtcccccggtagattcgaagagaatcttactcagagctgcaaataccacagttcc
 361 L K S P G R F E R I L L R A A N T H S S
 1241 gccaaaccttgctgggcaacaatccattcacttgggaggagtatttgaattgcaaccaggt
 381 A K P C G Q Q S I H L G G V F E L Q P G
 1301 gcttcggtgtttgtcaatgtgactgatccaagccaagtgagccatggcactggcttcacg
 401 A S V F V N V T D P S Q V S H G T G F T
 1361 tcctttggcttactcaaactctga
 421 S F G L L K L -

sc40-Flag-CD40L:

<u>Signalpeptid:</u>	NT 1-57	AS 1-19
sc40:	NT 58-801	AS 20-267
FLAG:	NT 823-846	AS 275-282
CD40L:	NT 853-1393	AS 285-431

1 atggactggacctggcgctgttttgctgctcgccgtggctcctggggcccacagccag
 1 M D W T W R V F C L L A V A P G A H S Q
 61 gtacagctgggtgcagctctgggggagggcatggtagagcctggggggtcccttagactctcc
 21 V Q L V Q S G G G M V E P G G S L R L S
 121 tgtgcagcctctggattcactttcagtaatgcctggatgagctgggtccgccaggctcca
 41 C A A S G F T F S N A W M S W V R Q A P
 181 gggaaaggggctggagtggttggccgtataaaaagcaaagctgggtggggacagcagag
 61 G K G L E W V G R I K S K A G G G T A E
 241 tacgctgcacccgtgaaaggcagattcaccatctcaagagatgattcacaaaacacgctg
 81 Y A A P V K G R F T I S R D D S Q N T L
 301 tatctgcaaataaacagcctgaaaaccgacgacacagccgtgtattactgtaccacacat
 101 Y L Q M N S L K T D D T A V Y Y C T T H
 361 gtctacgggtgccccccggaactggggccagggatccctgggtcaccgtctcctcagcctcc
 121 V Y G A P R N W G Q G S L V T V S S A S
 421 accaagggcccaaagcttgaagaaggtgaattttcagaagcacgcgtacagctctgtgttg
 141 T K G P K L E E G E F S E A R V Q S V L
 481 actcagccgcctcagtgctgctgcgccccaggacagaaggtcaccatctcctgctctgga
 161 T Q P P S V S A A P G Q K V T I S C S G
 541 agcagctccaacattggaaataattatgtctcctggtagcttcaactcccaggaacagcc
 181 S S S N I G N N Y V S W Y V Q L P G T A
 601 cccaaactcctcatttatgacaataataagcgattctcaggagtctcctgaccgattctct
 201 P K L L I Y D N N K R F S G V P D R F S
 661 ggctccaagtctggcacgtcagccaccctgggcatcaccgggctccagactggggacgag
 221 G S K S G T S A T L G I T G L Q T G D E
 721 gccgattattactgctggagcatgggatggcagcctgctggaagcgggtattcggcggaggg
 241 A D Y Y C G A W D G S L R E A V F G G G
 781 accaaggtcaccgtcctaggtgctggccgcaggatccagatccgattacaagacgatgac
 261 T K V T V L G A A A G S R S D Y K D D D
 841 gataaagaattcgggtgatcagaatcctcaaattgctggcacatgtcataagtgaggccagc
 281 D K E F G D Q N P Q I A A H V I S E A S
 901 agtaaaaacaacatctgtgttacagtggtgctgaaaaggataactacacatgagcaacaac
 301 S K T T S V L Q W A E K G Y Y T M S N N

```

961 ttgtaaccctggaaaatgggaaacagctgaccggttaaagacaaggactctattatc
321 L V T L E N G K Q L T V K R Q G L Y Y I
1121 tatgccaagtcaccttctgttccaatcgggaagcttcgagtcagctccatttatagcc
341 Y A Q V T F C S N R E A S S Q A P F I A
1181 agcctctgcctaaagtcccccggtagattcgagagaatcttactcagagctgcaaatacc
361 S L C L K S P G R F E R I L L R A A N T
1241 cacagttccgccaaccttgcgggcaacaatccattcacttgggaggagtatttgaattg
381 H S S A K P C G Q Q S I H L G G V F E L
1301 caaccaggtgcttcggtgtttgtcaatgtgactgatccaagccaagtgagccatggcact
401 Q P G A S V F V N V T D P S Q V S H G T
1361 ggcttcacgtcctttggcttactcaaactctga
421 G F T S F G L L K L -

```

8.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µF	Mikrofarad
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
41BB	CD137, TNFRSF9
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ADCC	Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity, Antikörper-vermittelte zelluläre Toxizität
AK	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle, Antigen Presenting Cell
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäuresequenz
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	Cluster of Differentiation
CD27	TNFRSF7
CD40	TNFRSF5

CD40L	CD40 Ligand, CD154, TNFSF5
CD95	Fas, TNFRSF6
CDC	Complement-Dependent Cytotoxicity, komplementabhängige Zytotoxizität
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRD	Cysteine-Rich Domain, Cystein-reiche Domäne
DC	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
Eppi	Eppendorf Reaktionsgefäß
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FAP	Fibroblast Activation Protein
Fas	FS7-associated surface antigen
FCS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
GITR	Glucocorticoid-Induced TNFR-Related Protein, TNFRSF18
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
h	human
h	Stunde(n)
HCl	Chlorwasserstoff

HRP	Horseradish Peroxidase / Meerrettichperoxidase
iDC	immature Dendritic Cell, unreife Dendritische Zelle
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
LB	Lysogeny Broth, Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
mAK	monoklonaler Antikörper
M	molar (Mol/Liter)
m ²	Quadratmeter
mDC	mature Dendritic Cell, reife Dendritische Zelle
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
NT	Nukleotidsequenz
OX40	CD134, TNFRSF4

PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
sc	single chain
scFv	single chain variable fragment
SDS	Natriumlaurylsulfat
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression, Nährmedium zur Kultivierung von Bakterien
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF	Tumor Nekrose Faktor, TNFSF2
TNFRSF5	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, member 5, CD40
TNFSF5	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily member 5, CD40L
TRAILR	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand Receptor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
V	Volt

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zum Ersten bedanke ich mich recht herzlich bei Prof. Dr. Wajant für das vertrauensvolle Überlassen des Themas sowie für die Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Arbeit.

Bei Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies bedanke ich mich für die Übernahme des Korreferats.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie, Universitätsklinikum Würzburg, bedanke ich mich für die Bereitstellung der Zapfen.

Einen großen Dank möchte ich allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Molekulare Innere Medizin, Universitätsklinikum Würzburg, aussprechen, für die Hilfsbereitschaft und Betreuung bei der Einarbeitung in die Methoden bei freundschaftlicher Atmosphäre. Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. rer. nat. Daniela Siegmund bedanken. Mein besonderer Dank geht desweiteren an Viktoria Schäfer, Daniela Weisenberger, Dr. Isabell Lang, Alevtina Rosenthal und Dr. Hilka Rauert-Wunderlich. Es war eine schöne Zeit mit euch allen im Labor!

Ein herzlicher Dank gilt auch meinen fleißigen Korrekturlesern.

Ich bedanke mich jedoch besonders bei meinen Freunden und bei Mari, sowie vor allem von ganzem Herzen bei meinen Eltern Jutta und Wolf-Dieter Strohm, meinen lieben Großeltern und meiner Familie, dass ihr immer für mich da seid. Schön, dass es euch gibt!