

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Struktur-Funktionsanalyse des Chemokins XCL1

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Arthur Leonard Kroczek

aus Erlangen

Datum der Promotion: 05.03.2021

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Kroczek AL, Hartung E, Gurka S, Becker M, Reeg N, Mages HW, Voigt S, Freund C, and Kroczek RA, *Structure-Function Relationship of XCL1 Used for in vivo Targeting of Antigen Into XCRI(+) Dendritic Cells*. Front Immunol, 2018;9:2806.

Inhaltsverzeichnis

Vorwort	I
Inhaltsverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	IX
Zusammenfassung	X
Abstract	XII
1. Einleitung	1
1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren	1
1.2 Das Chemokin XCL1 und sein Rezeptor XCR1	3
1.3 Struktur des Chemokins XCL1	4
1.4 Dendritische Zellen – Modus der Antigenpräsentation auf MHC I und MCH II	5
1.5 Subtypen und Klassifikation Dendritischer Zellen	7
1.6 Impfstoffe und <i>targeting</i> von Antigen	9
1.7 Das virale Chemokin vXCL1	11
1.8 Ziele der Arbeit	13
2. Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien und Materialien	14
2.2 Tiere	14
2.3 Molekularbiologische Methoden	15
2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	15
2.3.2 Enzymatische Restriktion und Ligation	16
2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese	17
2.3.4 Transformation	17
2.3.5 DNA-Isolierung und spektralphotometrische Vermessung	17
2.3.6 DNA-Sequenzierung	17

2.3.7 Stabile Transfektion	18
2.3.8 Subklonierung	18
2.3.9 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	19
2.3.10 Aufreinigung der XCL1-Fusionsproteine	19
2.3.11 SDS-PAGE.....	20
2.4 Zellexperimentelle Methoden	21
2.4.1 Verwendete Reagenzien und Zelllinien	21
2.4.2 Zellkulturbedingungen	22
2.4.3 Zellzahlbestimmung	22
2.4.4 Trypsinisierung der B16-Flt3L Zellen	22
2.4.5 Präparation primärer Zellen	22
2.4.6 Anreicherung von Splenozyten im Dichtegradienten	23
2.4.7 Chemotaxis im Zweikammer- <i>transwell</i> -System.....	23
2.4.8 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1 ⁺ DZ	24
2.4.9 Induktion des Zelltodes von P3X Zellen und Splenozyten	24
2.5 Tierexperimentelle Methoden	24
2.5.1 Adoptiver Transfer	24
2.5.2 Zellproliferationsanalyse	25
2.5.3 Zytotoxizitätsversuch	25
2.5.4 Flt3-Ligand Behandlung	26
2.6 Durchflusszytometrie	26
2.6.1 Fluorophore	26
2.6.2 Monoklonale Antikörper	27
2.6.3 Färbung von Oberflächenantigenen	28
2.6.4 Differenzierung von Zelltodstadien	28
2.6.5 Durchflusszytometrische Analyse.....	29

3. Ergebnisse	30
3.1 Entwurf, Klonierung und Expression der XCL1-Fusionsproteine.....	30
3.1.1 Struktureller Aufbau der XCL1-Fusionsproteine.....	30
3.1.2 Klonierung der XCL1-Fusionsproteine.....	32
3.1.3 Proteinexpression und Analyse im ELISA.....	32
3.1.4 Aufreinigung der XCL1-Fusionsproteine und Mengenbestimmung	33
3.2 Bindungsverhalten der XCL1-Fusionsproteine.....	35
3.2.1 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1 ⁺ DZ	35
3.2.2 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1-defiziente kreuzpräsentierende DZ ...	40
3.2.3 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an SIRPα ⁺ DZ und andere Zellen des Immunsystems.....	42
3.3 Detektion von XCL1 mit den Antikörpern MTAC 311 und 16H6.....	44
3.4 Chemotaktische Eigenschaften der XCL1-Fusionsproteine	47
3.5 <i>In vivo targeting</i>	50
3.5.1 <i>In vivo targeting</i> von XCR1 ⁺ DZ – Induktion einer OT-I T-Zellproliferation nach adoptivem T-Zell Transfer	50
3.5.2 <i>In vivo targeting</i> von XCR1 ⁺ DZ – Induktion einer endogenen zytotoxischen T-Zellantwort	53
3.5.3 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an sterbende P3X Zellen und murine Milzzellen ..	55
4. Diskussion	61
4.1 Design und Expression der XCL1-Fusionsproteine.....	61
4.2 Die funktionelle Rolle des N-Terminus von XCL1	62
4.3 Die funktionelle Rolle des C-Terminus von XCL1	66
4.4 <i>In vivo</i> Funktion des N- und C-Terminus von XCL1 im Kontext des <i>targeting</i> von Antigen zu XCR1 ⁺ DZ.....	69
4.5 „Dekorierung“ sterbender Zellen mit den XCL1-Fusionsproteinen	73
4.6 Einfluss des vXCL1 C-Terminus auf die funktionellen Eigenschaften des Chemokins.....	75
4.7 Schlussfolgerung	77

5. Literaturverzeichnis.....	79
Eidesstattliche Versicherung.....	91
Lebenslauf.....	92
Publikationsliste	93
Danksagung.....	94

Abkürzungsverzeichnis

ACK	Ammoniumchlorid-Kaliumhydrogencarbonat
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäuren
ATAC	<i>activation induced, T-cell derived and chemokine-related molecule</i>
Batf3	<i>basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 3</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFSE	Carboxyfluoresceindiacetatsuccinimidylester
Clec9A	<i>C-type lectin domain family 9A</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
DAPI	4',6'-Diamidino-2-Phenylindol
DC	<i>dendritic cells</i>
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DN DZ	doppelt-negative Dendritische Zelle
DTT	Dithiothreitol
DZ	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Flt3	<i>Fms-related tyrosine kinase 3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
GAG	Glykosaminoglykane
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
HCV	Hepatitis C Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
ICOS	<i>inducible T-cell costimulator</i>

INF- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
LPS	Lipopolysaccharid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>
MACS	<i>magnetic activated cell sorting</i>
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MuHV8	<i>murid herpesvirus 8</i>
mXCL1	Mäuse-XCL1
OVA	Ovalbumin
PAA	<i>polyacrylamidacid</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD-1	<i>programmed cell-death 1</i>
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zellen
PS	Phosphatidylserine
RCMV	<i>rat cytomegalovirus</i>
RT	Raumtemperatur
rXCL1	Ratten-XCL1
SCM-1	<i>single C motif-1</i>
SSC	<i>side scatter</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SIRP α	<i>signal regulatory protein α</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TH1-Zellen	Typ-1-T-Helfer-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
UV	Ultraviolett
vXCL1	virales XCL1
WT	Wildtyp

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Tertiärstruktur von Chemokinen	2
Abb. 2: Modell der Chemokin-Rezeptor-Interaktion.....	3
Abb. 3: Tertiärstruktur des Chemokins XCL1	4
Abb. 4: Modus der Antigenpräsentation auf MHC I und MHC II.....	7
Abb. 5: <i>Targeting</i> von XCR1 ⁺ DZ.....	10
Abb. 6.: Vergleich der AS-Sequenzen von vXCL1, rXCL1 und mXCL1	11
Abb. 7: Standardvorgehen bei der durchflusszytometrischen Analyse.....	29
Abb. 8: Aufbau der XCL1-Fusionsproteine	31
Abb. 9: Vergleich der XCL1-Aminosäuresequenz der fünf XCL1-Fusionsproteine.....	31
Abb. 10: Analyse der Proteinproduktion durch Strep-tag [®] -ELISA und XCL1-ELISA	32
Abb. 11: Analyse und Vergleich der XCL1-Fusionsproteine in der 10 % SDS-PAGE	34
Abb. 12: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an CD8 ⁺ XCR1 ⁺ DZ	37
Abb. 13: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an CD8 ⁺ XCR1 ⁺ DZ.....	38
Abb. 14: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an CD8 ⁻ XCR1 ⁺ DZ.....	39
Abb. 15: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1-defiziente DZ.....	41
Abb. 16: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an SIRPα ⁺ DZ.....	43
Abb. 17: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an verschiedene Zellen des Immunsystems.....	44
Abb. 18: Färbung der XCL1-Fusionsproteine mit den Anti-XCL1 Antikörpern MTAC-311 und 16H6.....	45
Abb. 19: Chemotaktische Wirkung der XCL1-Fusionsproteine auf XCR1 ⁺ DZ.....	48
Abb. 20: Chemotaktische Wirkung der XCL1-Fusionsproteine auf XCR1 ⁺ DZ.....	49
Abb. 21: Proliferation von SIINFEKL-spezifischen CD8 ⁺ OT-I T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen XCL1-Fusionsproteinen	52
Abb. 22: Endogene zytotoxische T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit den XCL1-Fusionsproteinen	54
Abb. 23: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an P3X Myelomzellen	57
Abb. 24: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an primäre murine Milzzellen	59

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primersequenzen und Schmelztemperatur	15
Tab. 2: Verwendete Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden	21
Tab. 3: Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften	21
Tab. 4: Übersicht der verwendeten Fluorophore.....	26
Tab. 5: Übersicht der verwendeten monoklonalen Antikörper	27
Tab. 6: Berechnete Konzentration der XCL1-Fusionsproteine im Zellkulturüberstand.....	33
Tab. 7: Produzierte Proteinmengen und errechnete Ausbeuten pro Liter Zellkultur	34
Tab. 8: Evaluation der anti-XCL1 Antikörper MTAC-311 und 16H6	46

Zusammenfassung

Einleitung

Chemokine vermitteln die Interaktion von Immunzellen. Das Chemokin XCL1 wird von aktivierten CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen sezerniert und besitzt die für Chemokine typische Tertiärstruktur, bestehend aus einem N-Terminus, einem antiparallelen β -Faltblatt, einer α -Helix und einem freien C-Terminus von etwa 20 Aminosäuren. XCR1 ist der einzige Rezeptor von XCL1 und wird ausschließlich auf kreuzpräsentierenden Dendritischen Zellen (DZ) exprimiert. Die selektive Expression des Rezeptors wird genutzt, um mit Hilfe von XCL1 Antigen in kreuzpräsentierende DZ einzubringen und so eine zytotoxische Immunität zu erzeugen. Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfassende Struktur-Funktionsanalyse des Chemokins XCL1, sowie die Untersuchung seiner Strukturvarianten hinsichtlich ihrer Fähigkeit, *in vivo* Antigen in DZ einzubringen.

Methodik

Mit Ovalbumin (OVA) fusioniertes XCL1 wurde mit einer N-terminalen Deletionsvariante (Del-N7), zwei C-terminalen Deletionsvarianten (Del-C7, Del-C17), sowie einer XCL1-Variante verglichen, welche den C-Terminus einer homologen viralen XCL1-Sequenz (vCterm) aufwies. Die XCL1-Varianten wurden in Drosophila-Zellen exprimiert und *in vitro* hinsichtlich Rezeptorbindung, Chemotaxis und „Dekorierung“ toter Zellen untersucht. Des Weiteren wurden die XCL1-OVA Varianten auf ihre Fähigkeit zur Induktion einer Antigen-spezifischen CD8 T-Zell-Proliferation und -Zytotoxizität im Mausmodell untersucht.

Ergebnisse

Der N-Terminus von XCL1 ist entscheidend an der XCR1-Rezeptorbindung beteiligt. Der native C-Terminus hat keine Bedeutung für die Rezeptoraffinität. Die chemotaktische Wirkung der XCL1-OVA Varianten entsprach ihrer Bindungsstärke an XCR1. Die stark verminderte chemotaktische Wirkung von Del-N7 ließ sich durch Konzentrationserhöhung voll kompensieren. Dies zeigt, dass der N-Terminus von XCL1 eine entscheidende Rolle bei der Stabilisierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion hat, aber im Unterschied zu anderen Chemokinen nicht absolut notwendig ist für die Induktion der Chemotaxis. Die Bindung von XCL1 an tote oder nekrotische Zellen ist unabhängig vom N- und C-Terminus. Die XCL1-OVA Varianten wurden *in vivo* auf ihre Fähigkeit untersucht, spezifische T-Zell-Proliferation und -toxizität zu induzieren, was z.T. Rückschlüsse auf den Einfluss der XCL1-Domänen auf die

Antigenprozessierung und -präsentation erlaubte. Varianten mit vergleichbarer Rezeptorbindung konnten ähnlich effektiv Antigen in DZ einbringen und CD8⁺ T-Zellen aktivieren. Ein entscheidender Einfluss des C-Terminus auf die Antigenprozessierung und -präsentation konnte ausgeschlossen werden.

Schlussfolgerungen

Erstmalig wurde eine Struktur-Funktionsanalyse des Chemokins XCL1 mit natürlichen XCR1⁺ DZ *in vitro* durchgeführt. Insbesondere konnte die Bedeutung des N- und C-Terminus für die Funktion von XCL1 *in vivo* definiert werden. Somit können die inkonsistenten Ergebnisse bisheriger Studien über die funktionelle Bedeutung dieser Domänen von XCL1 neu bewertet werden. Die Studie leistet darüber hinaus einen Beitrag zur Entwicklung einer neuartigen therapeutischen Vakzine, bei der an XCL1 gekoppelte Antigene *in vivo* spezifisch in DZ eingebracht werden.

Abstract

Introduction

Chemokines facilitate the interaction of immune cells. The chemokine XCL1 is secreted by activated CD8⁺ T cells and NK cells. In terms of structure, XCL1 exhibits a typical short free N-terminus, three β -strands, an α -helix, and a free C-terminus of around 20 amino acids. XCR1, the only receptor for XCL1, is exclusively expressed on cross-presenting dendritic cells (DC). Because of this selective receptor expression, XCL1 is being used to target antigens into cross-presenting DC for induction of cytotoxic immunity. The present study was aimed to determine the structure-function relationship of XCL1 and the capacity of various structural variants to target protein cargo into DC *in vivo*.

Methods

XCL1 fused to ovalbumin was compared to an N-terminal deletion variant (Del-N7), two C-terminal deletion variants (Del-C7, Del-C17), and a variant in which the C-terminus was replaced by a homologous viral XCL1 sequence (vCterm). The XCL1 protein variants were expressed in *Drosophila* cells and analyzed *in vitro* for receptor binding, chemotaxis, and “decoration” of dead cells. Further, XCL1-OVA variants were tested for targeting of antigen into DC *in vivo* and thus for their capacity to induce CD8 T-cell proliferation and cytotoxicity.

Results

The N-terminus of XCL1 strongly contributes to XCR1 receptor binding, whereas the C-terminus is not involved. Chemotaxis data were fully congruent with binding studies. The reduced binding capacity and chemotaxis of Del-N7 could be fully compensated at higher concentrations. This result indicates that the N-terminus of XCL1 has a major role in stabilizing receptor binding but, differing from other chemokines, is not critical for induction of chemotaxis. Neither the N- nor the C-terminal region of XCL1 contributed to binding of XCL1 to dead or necrotic cells. The effect of the XCL1-OVA variants on induction of T-cell proliferation was tested in mice. Variants with comparable binding capacity were comparably effective in antigen targeting into DC. A major effect of the C-terminal region of XCL1 on antigen processing and presentation could be excluded.

Conclusion

This is the first structure-function analysis for XCL1 using natural XCR1⁺ cells for binding studies *in vitro* and functional studies *in vivo*. In particular, the contribution of the N- and C-terminus to the function of XCL1 *in vivo* could be determined. Former inconsistent results regarding the functional relevance of these XCL1 domains could be reevaluated. Moreover, this study contributes to the development of a new therapeutic vaccine employing XCL1 to target antigens into cross-presenting DC *in vivo*.

1. Einleitung

1.1 Chemokine und Chemokinrezeptoren

Die Bezeichnung Chemokin leitet sich vom Begriff chemotaktisches Zytokin ab und beschreibt 8-14 kDa große Proteine, die der interzellulären Kommunikation dienen und chemotaktisch auf lymphatische Zellen des Immunsystems wirken [1]. Chemokine können inflammatorische und/oder homöostatische Funktionen erfüllen. Inflammatorische Chemokine werden u.a. von Leukozyten auf einen Stimulus hin exprimiert, oft in Reaktion auf Entzündungsmediatoren, wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon- γ (INF- γ), mikrobielle Bestandteile oder Zellschädigung. Die inflammatorischen Chemokine lenken Immunzellen zum Entzündungsherd und tragen zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort bei [2], [3]. Homöostatische Chemokine werden kontinuierlich exprimiert und spielen eine wichtige Rolle bei der Organisation und Entwicklung lymphatischer Organe [4]. Die Einteilung der Chemokine in vier Familien erfolgt anhand der Anzahl und Position der N-terminalen Cysteine. Chemokine der CC-, CXC- und C3XC-Familie besitzen je vier konservierte Cysteine, die zwei Disulfidbrücken ausbilden [5]. Bei Chemokinen der CC-Familie liegen die beiden N-terminalen Cysteine direkt nebeneinander, während sie in der CXC- und C3XC-Familie von einer bzw. drei nicht-Cystein Aminosäuren getrennt werden. In der XC-Familie, zu der das in dieser Arbeit untersuchte Chemokin XCL1 gehört, fehlt das erste und das dritte Cystein, entsprechend ist nur eine Disulfidbrücke vorhanden [1]. *Nuclear magnetic resonance* (NMR) -Analysen und Röntgenkristallographie zeigten, dass die Tertiärstruktur aller Chemokine stark konserviert ist [3]. Die Tertiärstruktur setzt sich zusammen aus einem ungeordneten N-Terminus (6-10 Aminosäuren (AS)), gefolgt von einer langen N-Schleife, welche in einer 3_{10} -Helix endet, gefolgt von einem dreiblättrigen, antiparallelen β -Faltblatt sowie einer C-terminalen α -Helix und einem C-Terminus. Die Tertiärstruktur der Chemokine wird von Disulfidbrücken zwischen den Cysteinen stabilisiert [3].

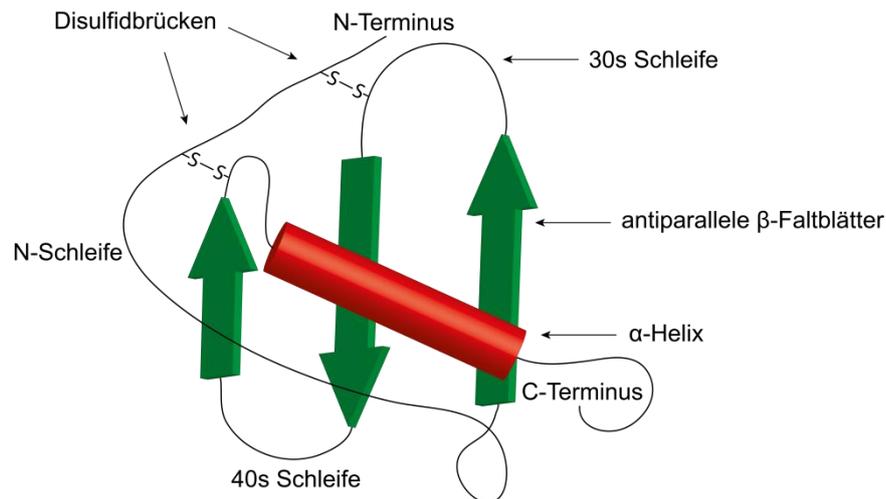


Abb. 1: Tertiärstruktur von Chemokinen

Alle Chemokine nehmen eine stark konservierte Tertiärstruktur ein: Auf einen ungeordneten N-Terminus folgt eine lange N-Schleife, die in einer 3_{10} Helix mündet, sowie ein antiparalleles, dreiblättriges β -Faltblatt (grün), eine C-terminale α -Helix (rot) und ein C-Terminus. Zwei Disulfidbrücken stabilisieren die Gesamtstruktur. In der XC-Chemokinfamilie ist im Unterschied zu den übrigen Chemokinfamilien nur eine Disulfidbrücke vorhanden.

Chemokine binden an Klasse A G-Protein-gekoppelte Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren. Es wurden bislang deutlich weniger Chemokinrezeptoren als Chemokine identifiziert, viele Chemokine binden an mehrere Rezeptoren, z.T. sind mehrere Chemokine Liganden desselben Rezeptors [3]. Die Rezeptoren werden entsprechend den Chemokinen in vier Familien eingeteilt und nach ihren Liganden benannt [6]. Der N-Terminus des Rezeptors sowie drei Schleifen (*extracellular loops*) ragen in den Extrazellulärraum, während der C-Terminus in das Zytoplasma gerichtet ist [3] (siehe Abb. 2).

Über die exakten Interaktionsmechanismen zwischen Chemokinen und ihren Rezeptoren ist bislang relativ wenig bekannt. Für verschiedene Chemokine konnte bereits gezeigt werden, dass der N-terminale Abschnitt des Chemokins entscheidend für Rezeptorbindung und die folgende Signaltransduktion ist. Allerdings scheinen auch Anteile der Kerndomänen (AS distal des N-Terminus) von Chemokinen an der Ligand-Rezeptor Interaktion beteiligt zu sein [3], [7]. Es besteht ein weitgehend hypothetisches, zweistufiges Modell der Chemokin-Rezeptor-Interaktion: Eine Kerndomäne des Chemokins bindet an eine extrazelluläre Schleife des Rezeptors. Dies führt zu einer Umpositionierung des Chemokins, sodass der N-Terminus im helikalen Bündel des Rezeptors bindet und eine Aktivierung sowie Signaltransduktion auslöst [3], [8], [9].

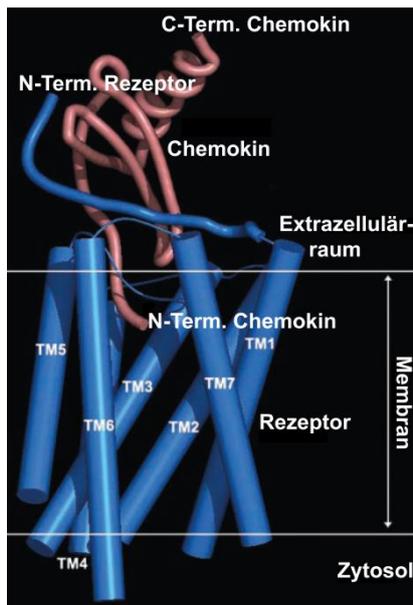


Abb. 2: Modell der Chemokin-Rezeptor-Interaktion

Einem hypothetischen Modell der Chemokin-Rezeptor-Interaktion zufolge binden die Kerndomänen des Chemokins (rot) an extrazelluläre Schleifen (nur der N-Terminus ist dargestellt) des Rezeptors (blau), was zu einer optimalen Positionierung und Bindung der N-terminalen Signaldomäne des Chemokins im helikalen Bündel des Rezeptors führt. Diese Abbildung ist entnommen aus Allen et al. [3] und sprachlich modifiziert.

Außer an spezifische Rezeptoren binden viele Chemokine auch an Glykosaminoglykane (GAG). GAG sind Kohlenhydrat-Strukturen, die auf allen Zellen des Organismus und in der Extrazellulären Matrix vorhanden sind. GAG sind sehr heterogen, weshalb die Spezifität der bindenden Chemokine stark variiert [3]. *In vivo* entstehen über die Bindung von Chemokinen an GAG Chemokin-Gradienten, welche eine zielgerichtete Migration der Zielzellen des Chemokins entlang des Gradienten ermöglichen [10], [11].

1.2 Das Chemokin XCL1 und sein Rezeptor XCR1

Das Chemokin XCL1 ist Vertreter der XC-Chemokin-Familie und wurde in verschiedenen Laboratorien gleichzeitig identifiziert und unterschiedlich bezeichnet, als ATAC (human) [12], SCM-1 (human) [13] und Lymphotactin (human und murin) [14], [15]. Im murinen Organismus ist XCL1 das einzig bekannte Chemokin der XC-Familie, während im Menschen neben XCL1 (SCM-1 α) auch XCL2 (SCM-1 β) identifiziert werden konnte, welches sich in zwei AS von XCL1 unterscheidet [16]. XCL1 wird aus einem 114 AS langen Vorläuferprotein durch Proteolyse zwischen den Aminosäuren Gly²¹ und Val²² synthetisiert, hat ein Molekulargewicht von ca. 10,3 kDa und wird von aktivierten NK-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, TH1-polarisierten CD4⁺ T-Zellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen sezerniert [17], [18].

XCR1 ist der einzige Rezeptor von XCL1 [13], der ursprünglich als „*orphan receptor*“ unter der Bezeichnung GPCR5 kloniert wurde [19]. Dorner *et al.* demonstrierten mittels quantitativer PCR und XCR1-defizienten LacZ-Reportermäusen, dass der Chemokin-Rezeptor XCR1 selektiv auf CD8⁺ konventionellen DZ und einem geringen Anteil CD8⁻ konventionellen DZ exprimiert wird

[20]. Bachem et al. konnten erstmals einen monoklonalen Antikörper (MARX10) gegen den murinen Rezeptor XCR1 generieren und die von Dorner *et al.* gewonnen Erkenntnisse über die hochspezifische Expression von XCR1 bestätigen und ergänzen [21]. Funktionell entscheidend ist, dass XCR1 ausschließlich auf Dendritischen Zellen (DZ) exprimiert wird, die zur Kreuzpräsentation von Antigen auf dem MHC I fähig sind [21] (siehe 1.4).

1.3 Struktur des Chemokins XCL1

Struktur- sowie Struktur-Funktionsanalysen, insbesondere des N- und C-Terminus, wurden in bisher publizierten Studien v.a. mit humanem XCL1 durchgeführt. Zwischen humanem und murinem XCL1 bestehen weitreichende Ähnlichkeiten: Die kodierende DNA ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert, das Expressionsmuster, sowie die strukturellen Eigenschaften von humanem und murinem XCL1 sind analog [14], [17]. Die AS-Sequenz von XCL1 ist stark konserviert, zwischen humanem und murinem XCL1 besteht eine Übereinstimmung von 73,8 % der Nukleinsäuren und 61,4 % der AS [12]. Dementsprechend ist anzunehmen, dass die strukturellen Erkenntnisse für humanes XCL1 im Wesentlichen auch für murines XCL1 gelten [14], [17]. Eine grundsätzliche strukturelle Besonderheit von XCL1 ist, dass XCL1, anders als alle anderen Chemokine, nur eine einzige Disulfidbrücke zwischen den Aminosäuren Cys³² und Cys⁶⁹ besitzt [17]. Ansonsten weist XCL1 die klassische Faltung eines Chemokins auf: Ein ungeordneter N-Terminus, gefolgt von einem dreiblättrigen β -Faltblatt und einer C-terminalen α -Helix [22].

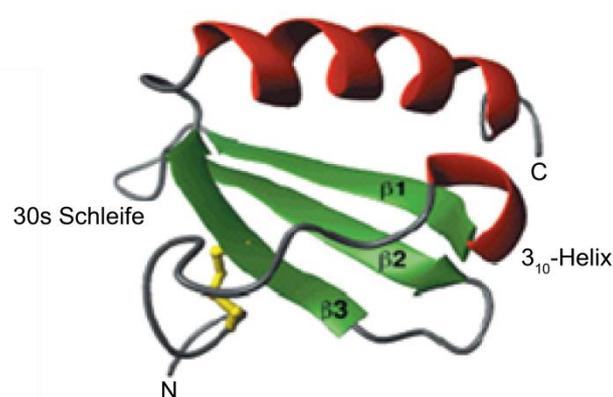


Abb. 3: Tertiärstruktur des Chemokins XCL1

Dargestellt ist die Tertiärstruktur von humanem XCL1. Einem ungeordneten N-Terminus folgt eine lange N-Schleife, eine 3_{10} -Helix (rot), ein dreiblättriges β -Faltblatt (grün), eine 30s Schleife, sowie eine C-Terminale Helix (rot) mit einem langen C-Terminus. Besonderheit des Chemokin XCL1 ist, dass lediglich eine Disulfidbrücke vorhanden ist (gelb). Diese Abbildung wurde entnommen aus Kuloglu et al. [22].

Die Funktion des N-Terminus (AS-Reste 1-9) [22] von XCL1 wurde in verschiedenen Studien analysiert, deren Ergebnisse nicht übereinstimmend waren [23], [24] (siehe 4.2). Grundsätzlich gilt der N-Terminus von Chemokinen als Schlüssel-Signaldomäne, des Weiteren spielt er eine Rolle bei der Rezeptorbindung [3]. Studien an verschiedenen Chemokinen zeigten, dass die Folgen einer Modifikation des N-Terminus bezüglich Rezeptorbindung und Signaltransduktion vielfältig sind [3], [2]. Bislang existierten keine publizierten Untersuchungen zur funktionellen Rolle des N-Terminus von XCL1 bei der Interaktion mit nativen, den Rezeptor XCR1 tragenden DZ.

Mit einer Länge von 93 AS ist XCL1 verglichen mit den am engsten verwandten Chemokinen ungewöhnlich lang [22]. Dazu trägt in erster Linie der C-Terminus (AS Reste 73-93) bei [22], [12]. Analysen zur Struktur-Funktionsbeziehung des C-Terminus von Chemokinen wurden bislang kaum durchgeführt, möglicherweise besitzt der C-Terminus eine stabilisierende Funktion auf die Tertiärstruktur mancher Chemokine oder spielt bei der Chemokin-Rezeptor-Interaktion eine Rolle [25]. Erkenntnisse zur Funktion des C-Terminus von XCL1 bisheriger Untersuchungen sind widersprüchlich [24], [23], [26] (siehe 4.3).

1.4 Dendritische Zellen – Modus der Antigenpräsentation auf MHC I und MHC II

Dendritische Zellen sind professionell Antigenpräsentierende Zellen (APZ) und Bestandteil des adaptiven Immunsystems [27]. DZ sind in fast allen Geweben vorhanden und in der Lage, Antigene in der Peripherie direkt aus dem Blut oder der Lymphe aufzunehmen und zu prozessieren [27]. Gegenüber anderen zur Antigenpräsentation fähigen Zellen, wie B-Zellen oder Makrophagen, sind es in erster Linie die DZ, welche zur Aktivierung, Differenzierung und klonalen Expansion naiver T-Zellen befähigt sind [28]. Wenn Signalstoffe von Pathogenen (z.B. Lipopolysaccharid, LPS), beschädigtem Gewebe (z.B. TNF- α) und/oder bestimmte Zyto- oder Chemokine freigesetzt werden, führt dies zur Aktivierung und Migration der DZ über die Lymphbahnen zu den sekundär lymphatischen Organen, d.h. in lokale Lymphknoten oder die Milz [29], [30]. Dort präsentieren maturierte DZ prozessierte Antigene auf ihrer Zelloberfläche im Kontext des *major histocompatibility complex* (MHC) naiven T-Zellen, die das Antigen mit ihrem T-Zell-Rezeptor erkennen. Gleichzeitig exprimieren die maturierten DZ verschiedene kostimulatorische Moleküle, die zur Aktivierung und Reifung der naiven T-Zellen beitragen [31]. Die T-Zellen maturieren zu Effektorzellen, teilen sich und rezirkulieren in die Blutbahn [28]. Je nach T-Zelltyp sind sie in der Lage, eine humorale, d.h. B-Zell-vermittelte

Immunantwort gegen das Antigen zu initiieren oder selbst zytotoxisch gegen infizierte Zellen vorzugehen.

Die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen durch DZ kann auf drei unterschiedlichen Wegen stattfinden und ist abhängig von Art und Ursprung des Antigens. Die Qualität der resultierenden Immunantwort ist wiederum abhängig vom Modus der Antigenpräsentation (siehe Abb. 4).

i) Bestandteile extrazellulär lokalisierter Bakterien, lösliches Antigen oder Viruspartikel können durch rezeptorvermittelte Endozytose, Phagozytose, Makro- oder Mikropinozytose in die DZ aufgenommen werden. In den endosomalen bzw. lysosomalen Kompartimenten wird das Antigen fragmentiert und anschließend auf MHC II Moleküle geladen, welche an die Zelloberfläche transloziert werden [32], [33]. Antigen-spezifische naive $CD4^+$ T-Zellen können diesen MHC II-Antigenkomplex mit ihrem T-Zellrezeptor erkennen. Durch Zusammenwirken mit verschiedenen kostimulatorischen Signalen findet eine Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen statt. Die $CD4^+$ T-Zellen tragen entscheidend zur Stimulation von B-Zellen bei, welche antigenspezifische Antikörper produzieren (humorale Immunantwort).

ii) Ist eine DZ selbst mit einem Virus infiziert, wird virales Protein im Rahmen der zelleigenen Proteinsynthese produziert. Alle endogen produzierten Proteine werden im Proteasom zerlegt, im endoplasmatischen Retikulum auf MHC I Moleküle geladen und im Kontext von MHC I auf der Zelloberfläche präsentiert [34], [33]. Auf diesem Weg werden virale Peptide an MHC I gebunden, auf der Zelloberfläche präsentiert und von naiven antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen erkannt. Aktiviert reifen sie zu zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen aus, welche infizierte Körperzellen abtöten, die das gleiche virale Peptid auf MHC I präsentieren. Der Mechanismus der Präsentation von zelleigenen Proteinen auf MHC I ist bei allen kernhaltigen Körperzellen vorhanden.

iii) Neben diesen, als „klassisch“ bezeichneten Wegen, existiert ein dritter Modus der Antigenpräsentation: DZ nehmen exogenes Antigen, z.B. in Form von Partikeln virusinfizierter, abgestorbener Zellen auf und präsentieren die Peptide nicht nur im Kontext von MHC II, sondern auch auf MHC I. Dieser Vorgang der Präsentation von exogenem Antigen auf MHC I wird als Kreuzpräsentation bezeichnet [35]. Die Kreuzpräsentation ermöglicht eine zytotoxische $CD8^+$ T-Zellantwort gegen intrazelluläre Bakterien oder Viren, ohne dass die kreuzpräsentierende DZ selbst vom Erreger infiziert ist. Auch bei der Bekämpfung von neoplastischen Zellen spielt die Kreuzpräsentation von Antigenen eine entscheidende Rolle [36]. Abgestorbene Tumorzellen werden phagozytiert, das Antigen prozessiert und auf MHC I präsentiert. Tumorzellen, die dasselbe Antigen regulär auf MHC I präsentieren, können von den

aktivierten $CD8^+$ T-Zellen eliminiert werden. Diese Art der Bekämpfung von Erregern und Tumoren ist von besonderer Bedeutung, da intrazelluläre Pathogene und viele Tumore der humoralen Immunantwort nicht zugänglich sind [37].

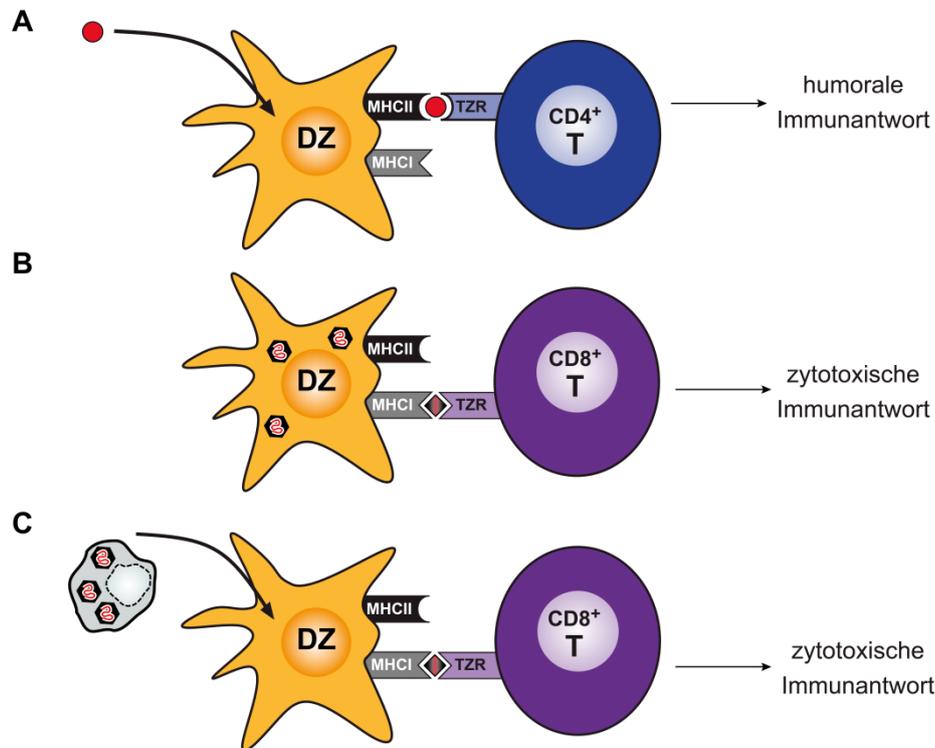


Abb. 4: Modus der Antigenpräsentation auf MHC I und MHC II

A) Exogenes Antigen wird von der DZ aufgenommen und auf MHC II präsentiert. $CD4^+$ T-Zellen erkennen das Antigen und stimulieren B-Zellen zur Antikörperproduktion (humorale Immunantwort). B) Endogene Antigene werden auf MHC I $CD8^+$ T-Zellen präsentiert. Werden von der Zelle produzierte Proteine, z.B. im Rahmen einer Infektion oder Mutation, als fremd erkannt, erfolgt eine Eliminierung durch zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen. C) Kreuzpräsentierende DZ können exogenes Antigen, z.B. Partikel absterbender Zellen aufnehmen und *via* MHC I den $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen präsentieren. Damit wird eine zytotoxische Immunantwort gegen das präsentierte (exogene) Antigen initiiert. (Grafiken dieser Abbildungen wurden freundlicherweise von Dr. Volker Henn zur Verfügung gestellt.)

1.5 Subtypen und Klassifikation Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen der Milz lassen sich in plasmazytoide (pDZ) und konventionelle DZ unterteilen. Plasmazytoide DZ zeichnen sich durch Sekretion großer Mengen Interferone, insbesondere im Rahmen einer viralen Infektion aus und sind dadurch an der Aktivierung des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt [28]. Die Fähigkeit der pDZ, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren ist begrenzt, weshalb sie im Kontext der Aktivierung von naiven T-Zellen nur eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen [38].

Die konventionellen DZ sind auf die Aufnahme und Präsentation von Antigen und die folgende Aktivierung von naiven T-Zellen spezialisiert. Konventionelle DZ der Maus lassen sich anhand der Expression von spezifischen Oberflächenmolekülen durchflusszytometrisch identifizieren. Das Integrin CD11c und eine sehr hohe Dichte von MHC II wird auf der Oberfläche der konventionellen DZ exprimiert [38], während spezifische Marker für T- und B-Zellen, pDZ, Makrophagen und Monozyten fehlen [39]. Die weitere Einteilung der konventionellen DZ der Milz erfolgte lange Zeit anhand der Oberflächenmarker CD4 und CD8. Neuere Erkenntnisse haben zu einer fortschrittlicheren, einheitlichen Klassifikation der konventionellen DZ in kreuzpräsentierende und nicht-kreuzpräsentierende DZ geführt:

Alle zur Kreuzpräsentation von Antigen fähigen DZ sind vom dem Transkriptionsfaktor Batf3 abhängig [39], [40], [41]. Gleichzeitig besteht zwischen Batf3-Abhängigkeit und der Expression des Rezeptors XCR1 auf der Zelloberfläche eine Korrelation [39]. Funktionelle Untersuchungen zeigten, dass sich die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation von Antigen, insbesondere von zell-assoziiertem Antigen, auf Batf3-abhängige XCR1⁺ DZ beschränkt [21], [42], [40], [43]. Aufgrund der perfekten Korrelation zwischen Batf3-Abhängigkeit, XCR1-Expression und der Fähigkeit zur Kreuzpräsentation wurde XCR1 als ein neuer (Linien-) Marker für kreuzpräsentierende DZ identifiziert [39]. XCR1 wird in der Milz auf ca. 70-90 % der CD8⁺ DZ und auf bis zu 8 % der CD4⁻ CD8⁻ doppelt-negativen (DN) DZ exprimiert. CD8⁺ XCR1⁻ DZ können Antigen nicht kreuzpräsentieren, sondern präsentieren Antigene „klassisch“ über MHC II den CD4⁺ T-Zellen [21], [39].

Für XCR1⁻ DZ konnte eine umfassende Korrelation mit dem Molekül CD172/SIRP α gezeigt werden. Dies ermöglicht die Einteilung von konventionellen DZ in XCR1⁺ kreuzpräsentierende DZ sowie SIRP α ⁺ nicht-kreuzpräsentierende DZ [39]. Auch in anderen Körperregionen (Lunge, Darm, Hautlymphknoten, mesenterische Lymphknoten) konnten entsprechende DZ identifiziert werden, sodass die XCR1-basierte Klassifikation von konventionellen DZ eine universelle Gültigkeit in der Maus besitzt [21], [39] [44], [45]. Im Menschen wurden CD141⁺ DZ als kreuzpräsentierende Zellen identifiziert. Allerdings ist bislang unklar, ob nur XCR1⁺ CD141⁺ DZ Antigen kreuzpräsentieren können, oder ob alle CD141⁺ DZ die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation besitzen [39].

Eine weitere Besonderheit der XCR1⁺ DZ ist eine hohe Effektivität bei der Aufnahme sterbender bzw. toter Zellen [46], [47], [48], [21], [49]. Sterbende und tote Zellen werden von DZ anhand verschiedener Oberflächenmoleküle identifiziert [50]. Beispielsweise werden Phosphatidylserine (PS) erkannt, welche im vitalen Zustand im Zellinneren verborgen sind und von sterbenden

Zellen nach außen gekehrt werden [51]. Der Kontakt XCR1^+ DZ zu sterbenden Zellen wird durch verschiedene Rezeptoren vermittelt. Beispielsweise bindet der häufig mit XCR1 co-exprimierte Rezeptor Clec9A Aktin-Filamente, die auf nekrotischen Zellen exprimiert werden. Die Bindung von Clec9A führt dazu, dass die sterbenden Zellen von den DZ aufgenommen und die Antigene dem Weg der Kreuzpräsentation zugeführt werden [52].

Auch das Chemokin XCL1 kann den Kontakt zwischen sterbenden oder toten Zellen und kreuzpräsentierenden XCR1^+ DZ vermitteln. XCL1 bindet an sterbende Zellen, was zu einer verstärkten Aufnahme der XCL1 „dekorierten“ Zellen durch XCR1^+ DZ führt [49]. Zellantigene der abgestorbenen Zellen werden auf MHC I präsentiert und eine antigenspezifische CD8^+ T-Zellantwort induziert. XCL1 stellt demnach ein Brückenmolekül zwischen sterbenden bzw. toten Zellen und phagozytierenden XCR1^+ DZ dar [49]. Da Infektionen und Tumore mit verstärktem Zelltod assoziiert sind, stellt die Kreuzpräsentation von Bestandteilen sterbender und toter Zellen einen entscheidenden Mechanismus des Immunsystems dar [53].

1.6 Impfstoffe und *targeting* von Antigen

Seit Jahrzehnten erfolgreich eingesetzte Impfstoffe imitieren i.d.R. eine natürliche Infektion, indem ein abgetötetes oder stark abgeschwächtes Pathogen appliziert wird. Die darauf eintretende, lang anhaltende Immunität des Organismus gegenüber dem Pathogen basiert in erster Linie auf der Produktion von neutralisierenden Antikörpern, die das Pathogen abfangen, bevor es sich im Körper ausbreitet und eine Krankheit auslösen kann [54], [55]. Allerdings ist dieser Abwehrmechanismus gegenüber bestimmten intrazellulären Erregern (z.B. HIV, HCV), Mycobakterien (z.B. Mycobakterium Tuberculosis), Parasiten (z.B. Plasmodium malariae) oder ähnlichen Erregern nicht wirksam, da sie nicht durch Antikörper eliminierbar oder nicht zugänglich sind [54]. Zur Bekämpfung dieser Art von Erregern ist die Induktion einer zytotoxischen CD8^+ T-Zell Reaktion, durch eine therapeutische (oder präventive) Immunisierung, ein vielversprechendes zukünftiges Konzept [55], [56].

Eine potente und antigenspezifische zytotoxische CD8^+ T-Zell Immunantwort kann, solange DZ nicht selbst infiziert sind, nur durch die Kreuzpräsentation von Antigen auf MHC I initiiert werden (siehe 1.4). Nachdem Versuche der *in vitro* Beladung von zuvor isolierten DZ mit Antigenen und deren anschließende Reinjektion in den Körper sich als aufwendig und wenig erfolgreich erwiesen haben, rückte die *in vivo* Beladung von DZ in den Fokus bei der Konzeption moderner Impfstoffe [53].

Zur *in vivo* Beladung wird ein Antigen künstlich an eine „Fähre“ gekoppelt, die den Kontakt zur rezeptortragenden DZ herstellen soll. Mit dem Komplex aus „Fähre“ und angekoppeltem Antigen werden die DZ beladen. Die „Fähre“ kann ein natürlicher Ligand eines Oberflächenmoleküls bzw. -rezeptors sein oder ein monoklonaler Antikörper. Dieses als *targeting* von Antigen bezeichnete Immunisierungs-Prinzip könnte außer gegen Infektionserreger auch zur Bekämpfung von Neoplasien mit stabilen Tumorantigenen eingesetzt werden, z.B. im Kontext der Therapie von Tumorresiduen nach Operation oder Chemotherapie [57].

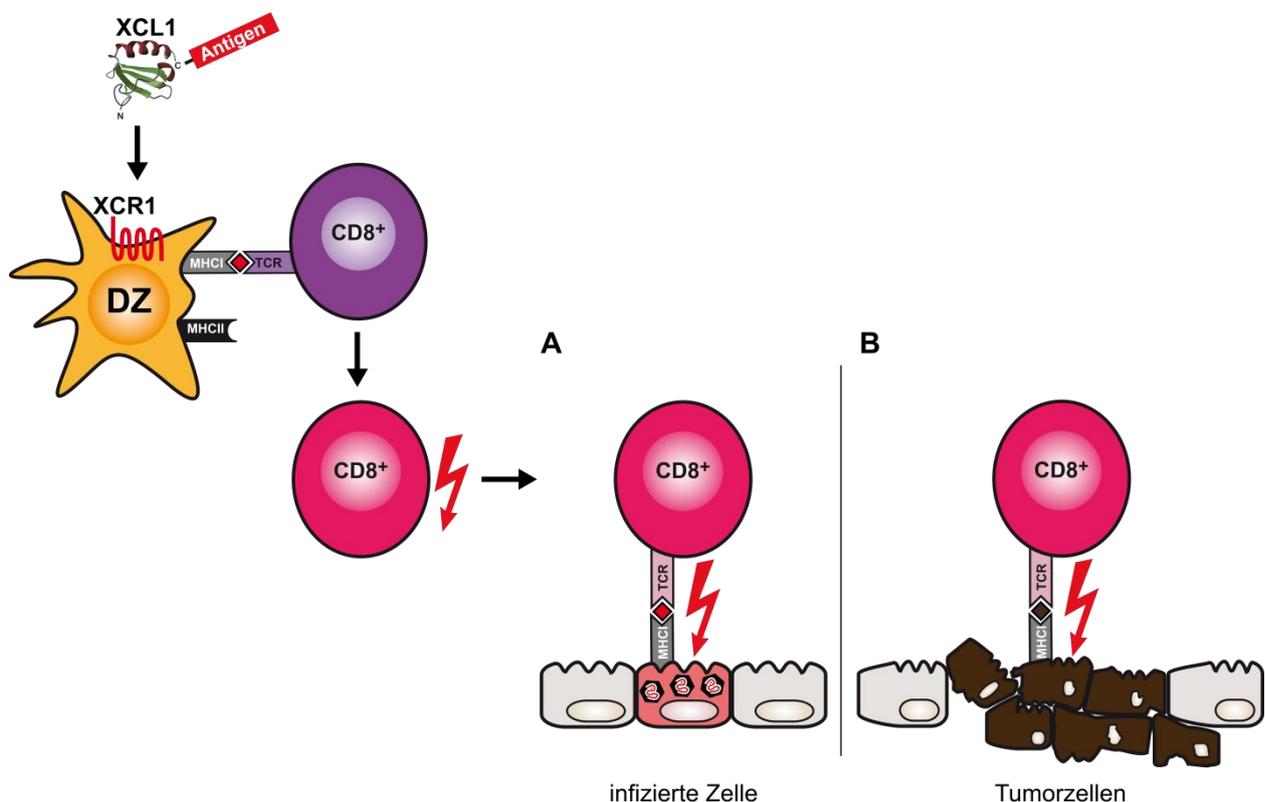


Abb. 5: Targeting von XCR1⁺ DZ

Ein Fusionsprotein aus XCL1 und daran gekoppeltem Antigen wird i.v. in den Körper injiziert. XCL1 bindet hochspezifisch an den Rezeptor XCR1 auf kreuzpräsentierenden XCR1⁺ DZ. Das gebundene Fusionsprotein wird internalisiert und prozessiert, die Antigenfragmente auf MHC I kreuzpräsentiert. Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellen erkennen das Antigen mit ihrem T-Zellrezeptor und werden aktiviert. Im Organismus wirken die CD8⁺ T-Zellen zytotoxisch auf alle Zellen, welche dasselbe Antigen auf MHC I präsentieren. Das Verfahren ist anwendbar gegen intrazelluläre Erreger (A) und Tumore mit stabilen Tumorantigenen (B).

Das Chemokin XCL1, das der einzige Ligand des exklusiv auf kreuzpräsentierenden DZ exprimierten Rezeptors XCR1 ist, oder ein gegen den Rezeptor XCR1 gerichteter Antikörper, stellt eine bislang einzigartige Möglichkeit dar, angekoppeltes Antigen hochselektiv in

kreuzpräsentierende DZ einzubringen und damit eine antigenspezifische, zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren [57].

In diversen *in vivo* Versuchen mit Mäusen ist das *targeting* von Antigen *via* XCL1 in XCR1⁺ DZ gelungen, es konnten bereits Tumore im Mausmodell erfolgreich bekämpft werden [57]. Nachdem XCL1 und XCR1⁺ DZ auch im Menschen identifiziert werden konnten, soll das vielversprechende Konzept der therapeutischen Vakzinierung *via* XCL1 zukünftig auf den Menschen übertragen werden [57].

1.7 Das virale Chemokin vXCL1

Neben physiologisch exprimierten Chemokinen existieren virale Chemokine, die von einem virusinfizierten Wirtsorganismus exprimiert werden und sich strukturell wie funktionell von den korrespondierenden Wild Typ (WT) Chemokinen unterscheiden.

CMV gehört zur Familie der Herpesviridae, befällt ein breites Spektrum an Spezies und führt i.d.R. zu einer lebenslang persistierenden Infektion [58]. Der Erfolg und die Persistenz des Virus sind u.a. damit zu erklären, dass CMV verschiedene Wege nutzt, einer Beseitigung durch das Immunsystem des Wirtes zu entgehen. Dazu gehört die Expression von viralen Chemokinen, welche mit dem Chemokin-System des Wirtes interferieren und zur Virusausbreitung beitragen [59]. In mit einem bestimmten CMV Stamm (*English RCMV, MuHV8*) infizierten Ratten konnte ein virales Chemokin der XC-Familie nachgewiesen werden. Das vXCL1 designierte Genprodukt weist große Homologien mit dem nativen XCL1 der Ratte (rXCL1), der Maus (mXCL1) und des Menschen auf. Während der N-Terminus und zentrale Abschnitte von vXCL1 weitgehend konserviert ist, weist der C-Terminus große Abweichungen auf [60].

vXCL1	IGIEVLHETICVSLRTORIPIQIKTYTIKEGAMRAVIFVTKRGLRICAD
rXCL1	VGTEVLQESICVSLRTORLPVQIKTYTIKEGAMRAVIFVTKRGLRICAD
mXCL1	VGTEVLEESSCVNLQTLQRLPVQIKTYIIWEGAMRAVIFVTKRGLKICAD
vXCL1	PDAGWTKAAITTLDKKNKKNKQKFNNTTVIPTQVPVSTNETTTVYG
rXCL1	PQAKWVKTAIKTVDGRASASKSKAET---IPTQAQRSASTAVTLTG
mXCL1	PEAKWVKAAIKTVDGRASRKNMAET---VPTGAQRSTSTAITLTG

Abb. 6.: Vergleich der AS-Sequenzen von vXCL1, rXCL1 und mXCL1

Die AS-Sequenz von vXCL1 weist große Homologien zu rXCL1 und mXCL1 auf. Eine Übereinstimmung von AS zwischen den allen drei Spezies ist grün hinterlegt, Übereinstimmung der AS zwischen zwei Spezies ist rot hinterlegt, findet sich keine Übereinstimmung ist die Sequenz weiß hinterlegt. Der C-Terminus des vXCL1 ist um 3 AS länger und unterscheidet sich insbesondere in der C-terminalen AS-Sequenz stark von rXCL1 und mXCL1.

Funktionelle Versuche von Geyer *et al.* [60] zeigten, dass vXCL1, genau wie natives rXCL1, an XCR1⁺ CD4⁻ DZ der Ratte bindet, welche äquivalent zu den kreuzpräsentierenden XCR1⁺ CD8⁺ DZ in Mäusen sind und höchstwahrscheinlich ebenfalls zur Kreuzpräsentation in der Lage sind [61], [62].

Des Weiteren wirkt vXCL1 selektiv chemotaktisch auf XCR1⁺ CD4⁻ DZ der Ratte [60]. Möglicherweise nutzt vXCL1 seine chemotaktischen Eigenschaften auf DZ, um die gegen das Virus gerichteten Mechanismen der Kreuzpräsentation oder die Interaktion der DZ mit CD8⁺ T-Zellen zu stören, oder die DZ selbst mit dem Virus zu infizieren [60]. In diesem Kontext stellt sich die besondere Frage nach der Funktion des C-Terminus von vXCL1, dessen AS-Sequenz sich stark von dem C-Terminus von rXCL1 unterscheidet.

1.8 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Struktur-Funktionsanalyse des murinen Chemokins XCL1. Um die funktionelle Bedeutung des N- und C-Terminus von XCL1 zu erforschen, wurden fünf verschiedene XCL1-Varianten rekombinant hergestellt: unverändertes XCL1 (WT-XCL1), eine am N-Terminus um sieben- (Del-N7) und zwei am C-Terminus um 7 (Del-C7) bzw. 17 (Del-C17) AS verkürzte XCL1-Varianten. Bei einer weiteren XCL1-Variante (vCterm) wurde der C-Terminus durch den C-Terminus eines viralen Ratten-XCL1 (vXCL1) Chemokins ersetzt. XCL1 wurde jeweils mit dem Protein OVA fusioniert, welches *in vivo* als Modellantigen genutzt wurde. Jedes XCL1-Fusionsprotein wies einen Strep-tag[®] auf, welcher zur Aufreinigung und Detektion der Proteine genutzt wurde.

In vitro wurde die Bindung und Spezifität der XCL1-Fusionsproteine an bzw. für den Rezeptor XCR1 tragende DZ untersucht. In einem *transwell*-System wurden die chemotaktischen Eigenschaften der XCL1-Fusionsproteine miteinander verglichen. Weiterhin wurde die Bindung der XCL1-Fusionsproteine an absterbende murine Milzzellen und P3X-Zellen getestet.

Im Mausmodell wurde die Bedeutung der XCL1-Struktur *in vivo* untersucht: Die XCL1-Fusionsproteine wurden Mäusen *i.v.* injiziert und im Verlauf die Proliferation spezifischer, gegen das OVA-Peptid SIINFEKL gerichteter T-Zellen gemessen. Die Bestimmung der T-Zellproliferation erlaubte Rückschlüsse auf die Beladung XCR1⁺ DZ mit dem Modellantigen OVA, sowie dessen Prozessierung und Präsentation des Peptids SIINFEKL auf MHC I.

Die Fragestellungen hatten einerseits Grundlagencharakter, andererseits erfolgten sie im Hinblick auf die Entwicklung einer neuartigen therapeutischen Vakzine.

Zusammenfassend wurden die fünf XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1, Del-N7, Del-C7, Del-C17 und vCterm hinsichtlich folgender Kriterien *in vitro* bzw. *in vivo* untersucht:

1. Rezeptorbindung und -spezifität
2. Chemotaxis
3. „Dekorierung“ toter Zellen
4. Aufnahme in XCR1⁺ DZ, Prozessierung und Präsentation von gekoppeltem Antigen auf MHC I (OT-I T-Zellproliferation und endogene zytotoxische T-Zell Antwort)

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Materialien

Verwendete Chemikalien waren von der Qualität p.A. und wurden von den Firmen Carl Roth GmbH (Karlsruhe), Merck Chemicals (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Steriles Plastikeinwegmaterial wurde von den Firmen Greiner GmbH (Frickenhausen), Nunc (Roskilde, Dänemark) oder Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.2 Tiere

Alle Mäuse stammten aus einer spezifiziert pathogenfreien Zucht und wurden kurzzeitig in einem konventionellen Tierstall des Robert Koch-Institutes gehalten. Das Alter der verwendeten Mäuse betrug 8-12 Wochen. Alle Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit dem Deutschen Tierschutzgesetz (BGBl. I S. 1206, 1313; 2006) und waren vom Landesamt für Gesundheit und Soziales genehmigt. Es wurden die aufgeführten Stämme verwendet:

C57BL/6, Substamm C57BL/6NCrl, Verwendung der Mäuse in Experimenten zur XCL1 Rezeptorbindung, Chemotaxis, XCL1 Bindung an tote Zellen, OT-I T-Zellproliferation (adoptiver Transfer) und endogenen Zytotoxizität, bezogen vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin).

B6.OT-I, deren CD8⁺ T-Zellen einen OVA-spezifischen transgenen T-Zellrezeptor tragen [63]; die Mäuse wurden mit B6.PL (B6 Thy1.1) Mäusen gekreuzt, um eine durchflusszytometrische Identifikation der Zellen über den Rezeptor CD90.1 zu ermöglichen; Verwendung der Mäuse zwecks Gewinnung OVA-spezifischer transgener T-Zellen für adoptiven Transfer, bezogen vom Bundesinstitut für Risikobewertung (Berlin).

B6.XCR1-LacZ, die DZ der Mäuse sind XCR1-defizient, unter Kontrolle des endogenen XCR1-Promotors wird die bakterielle β -Galaktosidase exprimiert; Verwendung der Mäuse in Kontrollexperimenten zur Rezeptorbindung und weiterführenden Experimenten zur Bindung von XCL1 an XCR1-defiziente DZ; hergestellt durch Deltagen, Inc., San Carlos, USA (unveröffentlicht); bezogen von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA).

2.3 Molekularbiologische Methoden

Die DNA-Plasmide der fünf XCL1-Fusionsproteine wurden mittels molekularbiologischer Methoden generiert. Die rekombinante DNA wurde zur Expression in eukaryote Zellen transfiziert und die Proteine aus den Zellüberständen aufgereinigt.

2.3.1 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die DNA der XCL1-Varianten Del-C7 und Del-C17 wurde mittels PCR hergestellt. Die Aminosäuresequenzen der verwendeten PCR-Primer P-Del-C7, P-Del-C17 und muATAC-OVAup wurden mit dem Software-Programm DNASTAR[®] Lasergene Core Suite (DNASTAR, Madison, USA) entworfen.

Mit dem Webtool Oligoanalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) und Primer Blast (NCBI) wurden die Primer hinsichtlich Schmelztemperatur, Dimerisierungscharakteristik und Spezifität überprüft. Die Primer wurden kommerziell synthetisiert (Eurofins MWG Operon, Huntsville, USA). Für die PCR wurden Gebrauchslösungen der Primer (10 pmol/μl) in H₂O hergestellt. Als DNA-Matrize wurden je 50 ng des Plasmids pRmHa-3 MT muATAC-OVA-Strep-His-tag (im Labor vorhanden) genutzt.

Tab. 1: Primersequenzen und Schmelztemperatur

Die Schnittstelle für den späteren Restriktionsverdau ist grün markiert, die DNA-Sequenz, die mit der Matrizen-DNA hybridisiert, rot markiert.

Bezeichnung	Sequenz	Schmelztemperatur
P-Del-C7 (Downstream 5'-3')	AATTTA ggatcc GCTGCCTCCGCCTCCGCTCCGCCTC CGCC GCTGGTGGACCTCTGG	55,4 °C
P-Del 17 (Downstream 5'-3')	AATTTA ggatcc GCTGCCTCCGCCTCCGCTCCGCCTC CGCC AGTTTCAGCCATGTTCTTTCTGG	55,6 °C
muATAC-OVAup (upstream 3'-5')	TTATTA gaattc GCCACCATGAGACTTC	56,1 °C

Die PCR wurde in einem Volumen von 50 μl mit der DNA-Polymerase Fusion Hot Start II, 5x HF Puffer und dNTPs (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) nach Standardmethoden durchgeführt. Nach initialer Denaturierung für 30 s bei 98 °C folgten 35 Zyklen (98 °C 10 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s) und 10 min bei 72 °C im 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific).

2.3.2 Enzymatische Restriktion und Ligation

Die DNA-Plasmide der fünf XCL1-Fusionsproteine wurden nach Standardmethoden durch Restriktionsverdau und Ligation generiert. Es wurden die vom Hersteller laut des Webtools Double Digest Finder (<http://66.155.211.155/nebecomm/DoubleDigestCalculator.asp>) angegebenen optimalen Puffer verwendet.

Im ersten Schritt wurde das Plasmid XCL1-OVA-TEV-Strep-tag im *Drosophila* Expressionsvektor pRmHa-3 MT [64] (bezogen von Filippo Oliveri und Klaus Karjaleinen) generiert. Dazu wurde das im Labor vorhandene Plasmid pRmHa-3 MT XCL1-OVA und das kommerziell bezogene Plasmid pEX-A-OVA-TEV-Strep-tag (Eurofins MWG Operon, Huntsville, USA) mit den Restriktionsenzymen EcoRV-HF und Sall-HF im Puffer 3 (New England Biolabs, Ipswich, USA) bei einem Volumen von 50 µl im Wasserbad bei 37 °C für 1 h bzw. 3 h verdaut. Nach Aufreinigung der Plasmidfragmente aus einem 1,5 % Agarose Gel wurde die Ligation der gewünschten DNA-Fragmente mit der Quick T4 DNA Ligase im Quick Ligation Puffer (New England Biolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt. Das generierte Plasmid pRmHa-3 MT XCL1-OVA-TEV-Strep-tag wurde zur Expression des WT-XCL1 Fusionsproteins genutzt und war zudem Grundlage für Generierung der Plasmide für die übrigen XCL1-Fusionsproteine.

Zwecks Generierung der Plasmide der übrigen XCL1-Fusionsproteine wurde der XCL1-Anteil des Plasmids pRmHa-3 MT XCL1-OVA-TEV-Strep-tag durch das N- oder C-terminal deletierte XCL1 mittels restriktionsenzymatischem Verdau und Ligation ersetzt. Die DNA-Sequenz der XCL1-Varianten Del-N7 und vCterm wurde mit dem Software-Programm DNASTAR[®] Lasergene Core Suite (DNASTAR) entworfen und kommerziell im Vektor pEX-A synthetisiert (Eurofins MWG Operon). Die DNA der XCL1-Varianten Del-C7 und Del-C17 wurde zuvor durch die Verwendung spezifischer Primer in der PCR generiert (siehe 2.3.1).

Das Plasmid pRmHa-3 MT XCL1-OVA-TEV-Strep-tag, die DNA von Del-C7, Del-C17, Del-N7 und vCterm wurden je mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI im Puffer 4 (New England Biolabs) für 1 h bzw. 2 h im Wasserbad bei 37 °C verdaut. Nach Aufreinigung der gewünschten Plasmidfragmente aus einem 1,5 % Agarose Gel wurde die Ligation mit der Quick T4 DNA Ligase im Quick Ligation Puffer (New England Biolabs) nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die DNA aller fünf Plasmide wurde auf ein 1,5 % Agarosegel aufgetragen, aufgereinigt, photometrisch vermessen und abschließend im Sequenzierlabor sequenziert, um sicherzustellen, dass die beabsichtigten Varianten der XCL1-OVA-TEV-Strep-tag Sequenz generiert wurden.

2.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurden in 1x DNA-Ladepuffer (0.025 % Bromphenolblau, 15 % Ficoll) aufgenommen und in 1,5 % oder 2 % Agarose Gel bei 55 V bei einer Laufzeit von 45 - 60 min im TAE Laufpuffer (2 M Tris/HCl, 50 mM EDTA, 17,5 % C₂H₄O₂, pH 8,0) aufgetrennt. Zur Sichtbarmachung der DNA Banden wurde GelGreen (Biotium, Hayward, USA) zugesetzt. Als Standard wurden DNA-Leitern mit Fragmentlängen von 100 bp und 500 bp (Invitrogen, Darmstadt) verwendet.

Die Auswertung erfolgte mit einem Transilluminator (Nippon Genetics Europe, Düren) bei 400 nm Wellenlänge. Zur Dokumentation wurden die Gele im UV-Transilluminator bei 312 nm (Herolab Laborgeräte, Wiesloch) fotografiert.

2.3.4 Transformation

Zur Vervielfachung der rekombinanten DNA wurden *E. Coli* XL10-Gold (Stratagene, La Jolla, USA) per Hitzeschock (60 s, 42 °C) nach Standardmethoden mit den Plasmiden transformiert [65]. Mit 500 µl SOC-Medium (Trypton, Hefeextrakt, 5 M NaCl, 1 M KCl, 1 M MgCl₂, 1 M MgSO₄, 1 M Glukose) versetzt wurden die Bakterien bei 160 Umdrehungen bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultivierung (14 h, 37 °C) und Selektion erfolgte auf LB-/Ampicillin-Agar Platten (1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl, 100 µg/ml Ampicillin, 1,5 % Agar).

2.3.5 DNA-Isolierung und spektralphotometrische Vermessung

Für die Isolierung von DNA aus Bakterien wurde das Qiagen Plasmid Mini Kit bzw. das Qiagen Plasmid Maxi Kit, zur Aufreinigung von DNA aus Agarosegel das QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande), jeweils nach Herstellerangaben verwendet.

Die aufgereinigte DNA wurden am NanoDrop ND-1000 Spektralphotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) vermessen (OD₂₈₀) und mit der Software ND-1000 V3.7.1. analysiert.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzen der Plasmide wurden durch DNA-Sequenzierung im Sequenzierlabor überprüft. Die Sequenzier-Reaktion wurde mit je 250 ng Plasmid-DNA in 5x Puffer (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung der Primer ADH und pRM sowie BigDye 3.1 (Thermo Fisher

Scientific) im 2720 Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Nach initialer Denaturierung für 2 min bei 96 °C folgten 25 Zyklen (96 °C 10 s, 55 °C 5 s, 60 °C 4 min).

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden in Form eines vierfarbigen Elektropherogramms bereitgestellt. Die Ergebnisse wurden mit dem Programm DNASTAR[®] Laser Gene 10 Core Suit (DNASTAR) bearbeitet und mit den ursprünglich definierten DNA-Sequenzen verglichen.

2.3.7 Stabile Transfektion

Die Transfektion wurde in Anlehnung an in der Literatur beschriebene Methoden durchgeführt [66]. Es wurden je 10×10^6 *Drosophila* Schneider (SL-3) Zellen [67] mit je 50 µg des jeweiligen XCL1-OVA-TEV-Strep-tag Plasmids und 3,5 µg des Selektionsplasmids phshs.PURO (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von M. McKeown, Salk Institute) in Elektroporationspuffer (65 mM Na₂HPO₄, 24 mM NaH₂PO₄, 5 mM KCl, 24 mM NaOOCCH₂CH₂COONa·6H₂O, 1 M HEPES pH 7.3, 10 mM MgCl₂) im Gene Pulser (Bio-Rad, Hercules, USA) bei 450 V (500 µF) ko-transfiziert. Nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml Insect-Xpress Medium (Lonza, Verviers, Belgien) + 3 % FCS aufgenommen, die Zellen auf 6-well Platten übertragen und bei 27 °C inkubiert.

2.3.8 Subklonierung

Je $1,3 \times 10^6$ Zellen in Insect-Xpress Medium (Lonza), 6 µg/ml Puromycin wurden 24 h nach der Transfektion durch limitierende Verdünnung subkloniert und gemeinsam mit untransfizierten SL-3 Zellen (*feeder* Zellen) in einer Konzentration von 5×10^4 Zellen/100 µl auf 96-well Platten aufgeteilt. Die Hälfte des Zellkulturmediums wurde alle 7 Tage gegen Insect-Xpress (Lonza), 3 % FCS, 10 µg/ml Puromycin ausgetauscht. Puromycin tötet die nicht mit dem Plasmid phshs.PURO ko-transfizierten SL-3 Zellen ab. Nach 30 Tagen wurden die Zellkulturplatten unter dem Mikroskop auf gewachsene Zellkolonien untersucht. Die am stärksten gewachsenen Klone wurden auf zwei Platten aufgeteilt und je eine auf Produktion des Fusionsproteins untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 1 mM CuSO₄ (MT-Promoter) induziert und der Zellkulturüberstand vier Tage später mittels *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) analysiert. Die Zellkulturen der besten Proteinproduzenten wurden expandiert und ab einem Volumen von > 200 ml im Minitron Schüttelinkubator (Infors HAT, Bottmingen, Schweiz) bei 100 rpm bei 27 °C inkubiert. Ab einem Kulturvolumen von 500-2000 ml und einer Dichte von 2×10^6 /ml wurde die Proteinproduktion mit 1 mM CuSO₄ für 4 Tage induziert.

2.3.9 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Die Selektion der verwendeten Zellklone erfolgte nach mikroskopischer Analyse des Wachstums und Quantifizierung des jeweiligen XCL1-Fusionsproteins im Zellkulturüberstand durch ELISA. Zur Detektion des Strep-tag[®] wurde ein direkter ELISA durchgeführt. Aus den Zellkultur-Überständen wurden mit PBS-Verdünnungsreihen von 1:4, 1:20, 1:100 und 1:500 hergestellt. Als Kontrolle wurde IL-2 XCL1 Strep-tag[®] (im Labor vorhanden) in einer Verdünnungsreihe von 10 µg/ml - 9,8 ng/ml eingesetzt. Die Proben wurden auf 96er-MaxiSorp-Mikrotiterplatten (Nunc) aufgetragen und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Waschen im ELISA-Washer (Tecan Group Ltd, Männedorf, Schweiz) mit PBS, 0,1 % Tween (Sigma-Aldrich) wurden die Platten mit Blockierungs-Puffer (PBS, 3 % BSA) für 2 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert, erneut gewaschen und anschließend 1 h mit dem gegen Strep-tag[®] gerichteten AK StrepMAB-Classic HRP (IBA, Göttingen) bei RT inkubiert. Die Entwicklung erfolgte für 20 min mit 100 µl TMB-Lösung (1 Tablette 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin gelöst in 0,1 M Na₂HPO₄, 0,05 M Zitronensäure, pH 5, 0,006 % H₂O₂) bei RT. Nach 8-15 min Entwicklungszeit wurde die Reaktion mit 100 µl 1 M H₂SO₄ abgestoppt. Die Vermessung der Platten erfolgte mit dem Mikroplattenlesegerät Infinite M200Pro (Tecan).

Zur Detektion von XCL1 wurde ein *Sandwich* ELISA durchgeführt. 96er-MaxiSorp-Mikrotiterplatten (Nunc) wurden mit dem Anti-XCL1 Primärantikörper 16H6 in einer Endkonzentration von 2 µg/ml bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Waschschritten erfolgte eine Inkubation für 2 h mit Blockade-Puffer (PBS, 1 % BSA) zur Verhinderung unspezifischer AK-Bindungen. Nach erneutem Waschen wurden die Zellkulturüberstände in Verdünnungsstufen (1:20, 1:100, 1:500 bzw. 1:4, 1:20, 1:100) aufgetragen. Als Standard-Kontrolle wurde kommerziell synthetisiertes XCL1 (Dictagene, Lausanne, Schweiz) in Verdünnungsstufen von 50 ng/ml - 49 pg/ml verwendet. Die Platten wurden für 2 h inkubiert und mehrmals gewaschen. Als Sekundärantikörper wurde MTAC-311-bio (1 µg/ml) eingesetzt und die Platten für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Entwicklung mit 100 µl Streptavidin-Peroxidase für 30 min bei RT. Die Reaktion wurde durch Hinzugabe von 100 µl 1 M H₂SO₄ Lösung gestoppt. Die Auswertung erfolgte mit dem Mikroplattenlesegerät Infinite M200Pro (Tecan).

2.3.10 Aufreinigung der XCL1-Fusionsproteine

Zur Entfernung von Partikeln und Zellbestandteilen wurden die Zellkulturüberstände zweifach zentrifugiert (15 min, 4 °C, 1000 g; 15 min, 4 °C, 14 000 g). Um mikrobielles Wachstum zu verhindern, wurde 0,02 % NaN₃ hinzugefügt. Nach Einstellung auf pH 7,3 mit 2 M Tris-HCl und

Präzipitation der Medium-Komponenten bei 4°C über Nacht, wurde der Zellkulturüberstand erneut zentrifugiert (30 min, 4° C, 10 000 g), 500 mM NaCl hinzugefügt und der Überstand sterilfiltriert. Zur Neutralisierung des im Medium enthaltenen Biotin wurde Avidin (IBA) verwendet (120 mg Avidin / mg kontaminierendem Biotin). Die Aufreinigung der XCL1-Fusionsproteine erfolgte nach Herstellerangaben mit einer 1 ml StrepTrap HP Säule (GE Healthcare, Freiburg). Die Umpufferung der gereinigten XCL1 Fusionsproteine auf PBS erfolgte mit einer PD-10 Sephadex G-25 Säule (GE Healthcare) nach Herstellerangaben. Nach erneuter Sterilfiltration wurde die Proteinkonzentration am Nanodrop ND-1000 Spektrometer (Thermo Scientific) und am Spektralphotometer 640 DU (Beckman Coulter, Brea, USA) bestimmt und Proteinaliquots bei -70 °C eingefroren. Der LPS Gehalt aller Produkte war < 0,5 EU/mg Protein.

2.3.11 SDS-PAGE

Die aufgereinigten XCL1-Fusionsproteine wurden jeweils mit 3-fach SDS Proben-Puffer (1 x: 50 mM Tris/HCL, pH 6,8, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 0,1 M DTT, H₂O, Bromphenolblau) versetzt und für 4 min bei 95 °C erhitzt, auf Eis abgekühlt und bei 12 000 g für 1 min zentrifugiert. Als Trenngel wurde ein 7,5 % Polyacrylamidacid (PAA) Gel (H₂O, 1,5 M Tris/HCL pH 8,8, Rotiphorese[®] Gel 30 (30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid) (Roth, Karlsruhe), 20 % SDS, 10 % APS, TEMED), als Sammelgel ein 4 % PAA Gel (H₂O, 0,5 M Tris/HCL pH 6,8, Rotiphorese[®] Gel 30 (30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid) (Roth), 20 % SDS, 10 % APS, TEMED) verwendet. Für das SDS-PAGE wurde ein XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die Proteine wurden im Sammelgel für 30 min bei 60 V, im Trenngel für 60 min bei 140 V aufgetrennt. Als Standard wurde die PageRuler™ Protein Leiter (ThermoFisher Scientific) mit einem Molekulargewicht von 10 kDa bis 170 kDa verwendet. Die SDS-Proteingele wurden mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Das Gel wurde für 60 min in einer Fixationslösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure, H₂O) fixiert. Nach mehreren Waschschrten wurden die Gele mit Coomassie-Brilliant-Blau Lösung (0,1 % Coomassie Brilliant Blue G250 (Serva, Heidelberg), 2 % Orthophosphorsäure, 10 % Ammoniumsulfat) gefärbt und über Nacht im Schüttler belassen. Mit einer Entfärbelösung (1 % Essigsäure, H₂O) wurde überschüssiger Coomassie Blau Farbstoff entfernt. Zur Analyse und Dokumentation wurden die Gele im UV-Transilluminator bei 312 nm (Herolab Laborgeräte) fotografiert.

2.4 Zellexperimentelle Methoden

2.4.1 Verwendete Reagenzien und Zelllinien

Tab. 2: Verwendete Puffer und Lösungen für zellbiologische Methoden

Das fötale Kälberserum (*fetal calf serum*, FCS) wurde vor Verwendung hitzeinaktiviert (45 min, 55 °C)

Bezeichnung	Zusammensetzung
ACK-Puffer	0,15 mM NH ₄ Cl, 10 mM KHCO ₃ , 0,1 mM Na ₂ EDTA, pH 7,2
FACS-PBS	PBS, 2,5 % FCS, 0,1 % NaN ₃
MACS-PBS	PBS, 0,5 % BSA (Fraktion V, Endotoxingehalt <1 EU/mg, PAA Laboratories, Cölbe)
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,8 mM KH ₂ PO ₄ , 10 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,3
R10F⁻	RPMI 1640 (Biochrom AG, Berlin), 10 % FCS (Biochrom AG), 2 mM Glutamin (Invitrogen)
R10F⁺	R10F ⁻ , 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)
R10F⁺/β-ME	R10F ⁺ , 50 µM β-Mercaptoethanol
Insect-Xpress-Medium	Insect-Xpress (Lonza), 3 % FCS, 3 % bzw. 6 % Puromycin (Thermo Fisher Scientific)

Tab. 3: Verwendete Zelllinien und deren Eigenschaften

Zelllinie	Eigenschaft	Medium	Referenz
B16-Flt3L	B16-Melanomzellen, sezernieren Flt3-Ligand	R10F ⁺ /β-ME, 1 mM Natrium-pyruvat, 1 mM nicht-essenzielle Aminosäuren	Mach et al, 2000 [68]
P3x63Ag8.65	Myelomzellen	R10F ⁺ /β-ME	ATCC: CRL-1580
Drosophila Schneider SL-3	Drosophila melanogaster, Insektenzellen	Insect-Xpress (Lonza)	Schneider, 1972 [67]

2.4.2 Zellkulturbedingungen

Für die Kultivierung der Zelllinien wurden Zellkulturplatten (6, 24, 48, 96-well), Zellkulturflaschen verschiedener Größe (25, 75 und 175 cm²) sowie Glaskolben (400 ml) verwendet. Die Kultivierung der SL-3 Insektenzellen erfolgte bei 27 °C unter Normalatmosphäre in Insect-Xpress w/L-Gln (Lonza), 3 % bzw. 6 % Puromycin (Merck).

Die Kultivierung der P3X Zelllinie erfolgte in R10F⁺/β-ME Medium in Begasungsbrutschränken, in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.4.3 Zellzahlbestimmung

Die Zählung primärer Zellen (murine Splenozyten) und der P3X-Zelllinie erfolgte mit dem Guava PCA (Guava Technologies, Hayward, USA). Die Zellen wurden in Viacount Reagenz (2,5 µg/ml LDS 751, 1 µg/ml Propidiumiodid, 5 mM EDTA, 0,05 % NaN₃, in PBS, pH 7,3) verdünnt, 3-5 min inkubiert und die Anzahl lebender, nukleärer Zellen durch die ViaCount Software (Guava Technologies, Hayward, USA) bestimmt.

Zur Zellzahlbestimmung der SL-3 Zellen wurden die Zellen 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauer Zählkammer unter dem Lichtmikroskop gezählt.

2.4.4 Trypsinisierung der B16-Flt3L Zellen

Zum Ablösen der B16-Flt3L Zelllinie wurde die Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und mit 5 ml PBS, 0,0025 % Trypsin bei 37 °C für 5 min inkubiert. Durch Hinzugabe von 10 ml R10F⁺/β-ME wurde die Reaktion gestoppt, die Zellen zentrifugiert (5 min, 380 g, 22 °C) und in Medium aufgenommen.

2.4.5 Präparation primärer Zellen

Nach Entnahme und Freipräparation von Fett und Bindegewebe wurden die Milzen zerkleinert und durch ein 70 µm Nylon-Zellsieb (BD Biosciences, Heidelberg) in PBS gedrückt. Nach Zentrifugation (8 min, 380 g, 4 °C) wurden die enthaltenen Erythrozyten durch einminütige Inkubation mit ACK-Puffer bei RT lysiert. Die Lyse wurde nach einer Minute durch Hinzugabe von PBS gestoppt und die Zellsuspension über ein 70 µm Nylon-Zellsieb gegeben. Die Zellen wurden zentrifugiert (8 min, 380 g, 4 °C) und in FACS-PBS aufgenommen.

2.4.6 Anreicherung von Splenozyten im Dichtegradienten

Zur DZ Anreicherung *in vivo* wurde C57BL/6 Mäusen Flt3L produzierende Tumore injiziert (siehe 2.5.4). Die Milzen dieser Tiere wurden fein zerkleinert, in RPMI 1640 mit 2 % FCS aufgenommen und mit 0,5 mg Collagenase D (Roche Applied Science, Mannheim) und 20 µg/ml DNase I (Roche Applied Science) zum Verdau bei 37°C im Schüttelbad für 25 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 mM EDTA gestoppt und das Gewebe durch ein 212 µm Metallsieb und anschließend durch ein 70 µm Nylonsieb gedrückt und zentrifugiert (8 min, 380 g, 4°C). Es wurden maximal 5×10^8 Zellen in 10 ml Nycodenz-Lösung (9,4 ml Nycoprep, 1,077 g/ml (Axis Shield, Oslo, Norwegen), 0,6 ml PBS 1,01, g/ml, (PAA Laboratories)) mit einer Dichte von 1,073 g/ml aufgenommen und in einem 50 ml Röhrchen mit weiteren 5 ml Nycodenz-Lösung überschichtet. Anschließend wurden darauf 4 ml kaltes R10F⁺-Medium aufgeschichtet und bei 1700 g für 10 min bei 4°C ungebremst zentrifugiert. Die Interphase wurde abpipettiert, zweifach mit MACS-PBS gewaschen und zentrifugiert (8 min, 360 g, 4°C). Das Zellpellet wurde in MACS-PBS aufgenommen.

2.4.7 Chemotaxis im Zweikammer-*transwell*-System

Zur funktionellen Testung der chemotaktischen Wirkung der XCL1 Fusionsproteine wurde ein Chemotaxisversuch in einem Zweikammer-*transwell*-System durchgeführt. Der Versuch beruht auf dem Prinzip eines Konzentrationsgradienten eines löslichen Chemokins zwischen zwei durch eine Membran mit definierter Porengröße getrennten Kammern. Den entsprechenden Chemokinrezeptor tragende Zellen migrieren entlang des Gradienten aus der oberen Kammer in die untere Kammer [69].

Es wurden 24-*well* Polycarbonat-Membran Einsätze (6,5 mm Durchmesser, 5 µm Porengröße; Corning Inc., Corning, USA) verwendet. Als Positivkontrolle für verschiedene Zelltypen wurde das Chemokin CCL21 (R&D Systems, Minneapolis, USA) in einer Konzentration von 500 ng/ml eingesetzt. Von den XCL1-Fusionsproteinen wurde eine Verdünnungsreihe von 1000 ng/ml - 1 ng/ml bzw. 10 000 ng/ml (berechnet auf den XCL1-Massenanteil) in Chemotaxis-Medium (RPMI 1640, 1 % BSA, 50 µM β-ME, 100 µg/ml Penicillin/Streptomycin) hergestellt. Von jeder Verdünnungsstufe wurden 600 µl in eine Vertiefung einer Zellkulturplatte gegeben. Als Negativkontrolle wurde Chemotaxis-Medium ohne darin gelöstes Chemokin verwendet. In 100 µl Chemotaxis Medium wurden 1×10^6 Zellen aufgenommen und in die obere Kammer der *transwell*-Einsätze gegeben.

Die *transwell*-Platten wurden für 1,5 h bzw. 2 h bei 37 °C im Begasungsbrutschrank (5 % CO₂) inkubiert. Die Unterseite der Membran wurde zweimal vorsichtig abgespült, um daran festhaftende, bereits durch die Membran getretene Zellen abzulösen. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen für 20 min mit Fc-Block (anti- μ CD16/32) und fluorophorgekoppelten monoklonalen Antikörpern inkubiert. Die Analyse erfolgte unter gleichen Bedingungen bzgl. der Messzeit und Flussgeschwindigkeit für alle Proben. Zur Berechnung der prozentualen Migration wurde der Quotient der Zahl der gewanderten und der eingesetzten Zellen gebildet (Prozentuale Migration = Anzahl gewanderter Zellen/Anzahl eingesetzter Zellen x 100).

2.4.8 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1⁺ DZ

Es wurden 25 x 10⁶ Splenozyten mit den XCL1-Fusionsproteinen für 25 min auf Eis mit verschiedenen Konzentrationen der XCL1-Fusionsproteine inkubiert und anschließend nach Standardmethoden gewaschen und gefärbt (siehe 2.6).

2.4.9 Induktion des Zelltodes von P3X Zellen und Splenozyten

Um die Bindung der XCL1-Fusionsproteine an sterbende Zellen zu untersuchen, wurden P3X Zellen bzw. Splenozyten in einer Dichte von 2 x 10⁶ Zellen/ml in R10F⁺/ β -ME aufgenommen und einem Hitzeschock von 52 °C für 15 min im Wasserbad unter Schütteln exponiert. Eine zweite Zellpopulation wurde nicht mit einem Hitzeschock behandelt. Die Zellen wurden danach über Nacht bei 37 °C im Begasungsbrutschrank (5 % CO₂) inkubiert. Eine Stunde vor Analyse wurden verschiedene Konzentrationen der XCL1-Fusionsproteine hinzugefügt, die Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert.

2.5 Tierexperimentelle Methoden

2.5.1 Adoptiver Transfer

CD8⁺ OT-I T-Zellen transgener Mäuse, deren TZR gegen das SIINFEKL Peptid von OVA gerichtet ist, wurden in syngene C57BL/6 Rezipienten Mäuse adoptiv transferiert. Dazu wurden zunächst Milzzellen aus B6.OT-I Mäusen isoliert und darin die Frequenz der OT-I T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (siehe 2.6.5). Vor adoptivem Transfer wurden die Milzzellen zur späteren Proliferationsanalyse mit dem intrazellulären Fluoreszenzfarbstoff

Carboxyfluorescein-diacetatsuccinimidylester (CFSE, Molecular Probes) markiert (siehe 2.5.2). Den Rezipienten-Mäusen wurden in PBS aufgenommene Milzzellen, die 1×10^6 transgene CD8⁺ OT-I T-Zellen enthielten, i.v. in die Schwanzvene injiziert. Die Mäuse wurden 18 h nach adoptivem Transfer mit den jeweiligen XCL1-Fusionsproteinen immunisiert. Die Analyse des CFSE-Signals der OT-I T-Zellen erfolgte 48 h später.

2.5.2 Zellproliferationsanalyse

Zur durchflusszytometrischen Analyse der Zellteilung wurden Zellen mit CFSE markiert. CFSE verliert nach intrazellulärer enzymatischer Modifikation die Membranpermeabilität. Bei jeder Zellteilung wird das intrazellulär gebundene CFSE zu gleichen Teilen an die Tochterzellen weitergegeben. Die Stärke des CFSE-Signals in der durchflusszytometrischen Analyse lässt die Unterscheidung von bis zu sieben Zellzyklen zu [70]. Für die Färbung der OT-I T-Zellen wurden 5×10^7 Zellen/ml mit 10 μ M, 5 μ M und 1 μ M CFSE in PBS, 0,1 % BSA suspendiert und für 15 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert.

2.5.3 Zytotoxizitätsversuch

Zur Überprüfung der These, dass die XCL1-Fusionsproteine eine zelluläre Immunantwort induzieren, wurden C57BL/6 Mäuse mit den angegebenen Mengen der XCL1-Fusionsproteine gemeinsam mit je 3 μ g LPS durch i.v. Injektion immunisiert. Mäuse, denen nur PBS injiziert wurde, dienten als Kontrolltiere. Sechs Tage später wurden 5×10^7 syngene Splenozyten *in vitro* in R10F⁺ Medium mit 10 μ M SIINFEKL Peptid (GenScript, Piscataway, USA) beladen (2 h, 5 % CO₂, 37 °C), mit 10 μ M CFSE markiert (CFSE^{hoch}) und als Zielzellen definiert. Eine gleiche Zahl Splenozyten wurde ohne SIINFEKL Peptid inkubiert und mit 1 μ M CFSE markiert (CFSE^{niedrig}), was eine Unterscheidung der Populationen ermöglichte. Die erfolgreiche Beladung der Zielzellen wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe des anti-SIINFEKL-H-2K^b-Antikörpers überprüft. Sowohl den mit XCL1-Fusionsprotein immunisierten Mäusen, als auch den Kontrollmäusen wurden je 10×10^6 CFSE^{hoch} und 10×10^6 CFSE^{niedrig} Zellen in 200 μ l PBS injiziert. Das CFSE Signal wurde 18 h später durchflusszytometrisch ausgewertet. Die endogene Zytotoxizität berechnete sich nach der Formel: Spezifische Lyse [%] = $100 - \left(\frac{\text{CFSE}^{\text{hoch}} \text{ immunisiert}}{\text{CFSE}^{\text{niedrig}} \text{ immunisiert}} \right) / \left(\frac{\text{CFSE}^{\text{hoch}} \text{ Kontrolle}}{\text{CFSE}^{\text{niedrig}} \text{ Kontrolle}} \right) \times 100$.

2.5.4 Flt3-Ligand Behandlung

Zur Anreicherung von DZ *in vivo* wurden 1×10^6 Zellen der Flt3-Ligand exprimierenden Zelllinie B16.Flt3-Ligand B6 C57BL/6 Mäusen subkutan injiziert. Nach 9 Tagen wurden die Mäuse getötet und die DZ nach Standardmethoden isoliert (siehe 2.4.6).

2.6 Durchflusszytometrie

2.6.1 Fluorophore

Die Anfärbung von zellspezifischen Oberflächenmolekülen erfolgte mit fluorophor-gekoppelten monoklonalen Antikörpern, die Analyse mit den Durchflusszytometern LSR II (BD Biosciences, Heidelberg) oder FACSAria II (BD Biosciences). Tab. 4 stellt die verwendeten Fluorophore und Detektionsfilter dar.

Tab. 4: Übersicht der verwendeten Fluorophore

Angabe der Wellenlänge der Laser zur Anregung der Fluorophore, sowie der zur Detektion im jeweiligen Durchflusszytometer (LSR II und FACSAria II) verwendeten Filter. BP = Bandpassfilter. Emissionsmaxima wurden zusammengestellt mit Daten von BD Biosciences und Molecular Probes.

Fluorophor	Anregungs- wellenlänge (nm)	Emissions- maximum nm)	BP Filter (LSR II)	BP Filter (FACSAria II)
FITC	488	525	530/30	530/30
PE	488	575	585/42	585/42
PE-Cy7	488	767	780/60	780/60
A647	633	665/667/660	670/14	620/20
A700	633	723	720/30	720/30
APC-Cy7	633	767	780/60	780/60
Pacific Blue/DAPI	405	451/460	440/40	450/40
Pacific Orange/DAPI	405	551/460	562/40	652/40

2.6.2 Monoklonale Antikörper

Die zur Anfärbung und Analyse von spezifischen Oberflächenmolekülen verwendeten fluorophor-gekoppelten monoklonalen AK sind in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5: Übersicht der verwendeten monoklonalen Antikörper

Die Angabe Hybridom steht für laboreigene Hybridome, aus deren Kulturüberstand die AK aufgereinigt wurden; ATCC: *American Type Culture Collection*; ECACC: *European Collection of Authenticated Cell Cultures*

Antigenspezifität	Klonbezeichnung	Quelle	Referenz/Hersteller
CD3	KT3	Hybridom	Tomonari <i>et al.</i> , 1988 [71]
CD4	GK 1.5	Hybridom	ATCC: TIB 207
CD4	YTS 191.1	Hybridom	ECACC: 87072282
CD8	53-6.72	Hybridom	ATCC: TIB 105
CD11c	N418	Hybridom	Metlay <i>et al.</i> , 1990 [72]
CD25	2E4	Hybridom	Ortega <i>et al.</i> , 1984 [73]
CD44	IM7.8.1	Hybridom	ATCC: TIB 235
CD45R (B220)	RA3-6B2	kommerziell	BioLegend
CD62L	MEL-14	Hybridom	Gallatin <i>et al.</i> , 1983 [74]
CD69	H1.2F3	kommerziell	BioLegend
CD90.1 (Thy-1.1)	OX-7	Hybridom	ECACC: 84112008
CD278 (ICOS)	MIC-280	Hybridom	Löhning <i>et al.</i> , 2003 [75]
CD 279 (PD-1)	J43	kommerziell	eBioscience
Ly6G/C	RB6-8C5	Hybridom	Hestdal <i>et al.</i> , 1991 [76]
MHC II	M5/114.15.2	Hybridom	ATCC: TIB 120
SIINFEKL-H-2K ^b	25-D1.16	Hybridom	Porgador <i>et al.</i> , 1997 [77]
Strep-tag [®]	StrepMAB-Classic	kommerziell	IBA
Strep-tag [®]	StrepMAB-Immo	kommerziell	IBA
Strep-tag [®]	StrepTactin [®]	kommerziell	IBA
V α 2-TCR	B20.1	kommerziell	eBioscience
V β 5-TCR	MR9-4	kommerziell	BD Biosciences
XCR1	MARX10	Hybridom	Bachem <i>et al.</i> , 2012 [21]
XCL1	MTAC-311	Hybridom	unveröffentlicht (Dr. C. Opitz)
XCL1	16H6	Hybridom	unveröffentlicht (S. Müller)

2.6.3 Färbung von Oberflächenantigenen

Die Färbung von Oberflächenantigenen zur durchflusszytometrischen Analyse wurde nach einem standardisierten Schema durchgeführt. Es wurden maximal $12,5 \times 10^6$ Zellen pro Vertiefung in einer 96-*well*-Rundbodenplatte für 5 min auf Eis mit 100 µg/ml Fc-Block (anti-muCD16/32) vorinkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen an Fc-Rezeptoren zu minimieren. Die Zellen wurden in FACS-PBS gemeinsam mit fluorophor-gekoppelten Antikörpern auf Eis für 20 min inkubiert und vor der Analyse mehrmals mit FACS-PBS gewaschen. Um tote Zellen zu detektieren, welche unspezifisch Antikörper binden, wurde kurz vor Analyse im Durchflusszytometer der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol; 0,33 µg/ml (Roche Applied Science)) der Zellsuspension zugesetzt. DAPI⁺ Zellen wurden in der Auswertung von der Analyse ausgeschlossen (siehe 2.6.5). Zur Detektion der XCL1-Fusionsproteine wurde u.a. das gegen den Strep-tag[®] gerichtete Sekundärreagenz StrepTactin[®]-PE eingesetzt. Die XCL1-Fusionsproteine wurden dazu auf Eis mit StrepTactin[®]-PE für 20 min vorinkubiert und dann ggf. gemeinsam mit weiteren Antikörpern verwendet.

2.6.4 Differenzierung von Zelltodstadien

Zur Differenzierung verschiedener Phasen des Zelltodes wurde eine Färbung mit Annexin V/DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) verwendet. Annexin V bindet kalziumabhängig an Phosphatidylserine (PS), welche unter physiologischen Bedingungen auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert sind [78]. Beim Zelltod werden PS auf die extrazelluläre Zellmembranseite transloziert und werden so für das Annexin V-Färbereagenz zugänglich. Frühapoptotische Zellen mit weitgehend intakter Zellmembran können als Annexin V⁺ DAPI identifiziert werden. Bei primärer Nekrose oder im fortgeschrittenen Apoptosestadium bzw. sekundärer Nekrose verlieren Zellen ihre Membranintegrität, sodass DAPI in die Zelle gelangt und sich die Zellen als Annexin V⁺ und DAPI⁺ darstellen. Da die Bindung von Annexin V an PS kalziumabhängig ist, wurden die Zellen nach regulärer Oberflächenfärbung in einem kalziumchloridhaltigen Annexin-Puffer (10 mM Hepes, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 % NaN₃) aufgenommen und für 15 min bei RT mit Annexin V-Cy5 (BD Pharmingen, San Diego, USA) inkubiert. Nach Waschschritten wurden die Zellen in Annexin-Puffer aufgenommen. DAPI wurde unmittelbar vor der Messung zu den Proben hinzugegeben.

2.6.5 Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrischen Daten wurden am LSR II (BD Biosciences) oder FACSAria II (BD Biosciences) mit der Software FACSDiva (BD Biosciences) aquiriert und mit der Software FlowJo (Treestar, Ashland, USA) analysiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Histogramm oder *dot plot*, wobei die Zahlen innerhalb der *gates* dem prozentualen Anteil der enthaltenen Zellen entsprechen. Das Vorgehen erfolgte standardisiert wie folgt: zuerst wurden Zellen anhand Größe und Granularität im Vorwärts- (*forward scatter*, FSC) und Seitwärtsscatter (*side scatter*, SSC) identifiziert und eingeschlossen, Zelltrümmer wurden ausgegrenzt. Anschließend erfolgte der Ausschluss von Zelldubletten in der Höhe (H; *height*) und Fläche (A; *area*) der Zellen im FSC und SSC. Tote Zellen wurden durch DAPI-Färbung und autofluoreszente Zellen im PacB- und PacO-Detektor ausgeschlossen.

Zudem wurden, um spezifisch DZ zu analysieren, T- und B-Zellen sowie Granulozyten anhand ihrer Expression von CD3, CD45R (B220) und Ly6G/C ausgeschlossen, andererseits wurden CD11c⁺ MHC II⁺ Zellen eingeschlossen. Zur Analyse von CD8⁺ OT-I T-Zellen wurden CD4⁺ und B220⁺ Zellen ausgeschlossen und CD8⁺ Thy1.1⁺ Zellen eingegrenzt. Das standardisierte Vorgehen zu Beginn jeder Datenanalyse wird repräsentativ in Abb. 7 dargestellt und wird in späteren Abbildungen nicht erneut gezeigt.

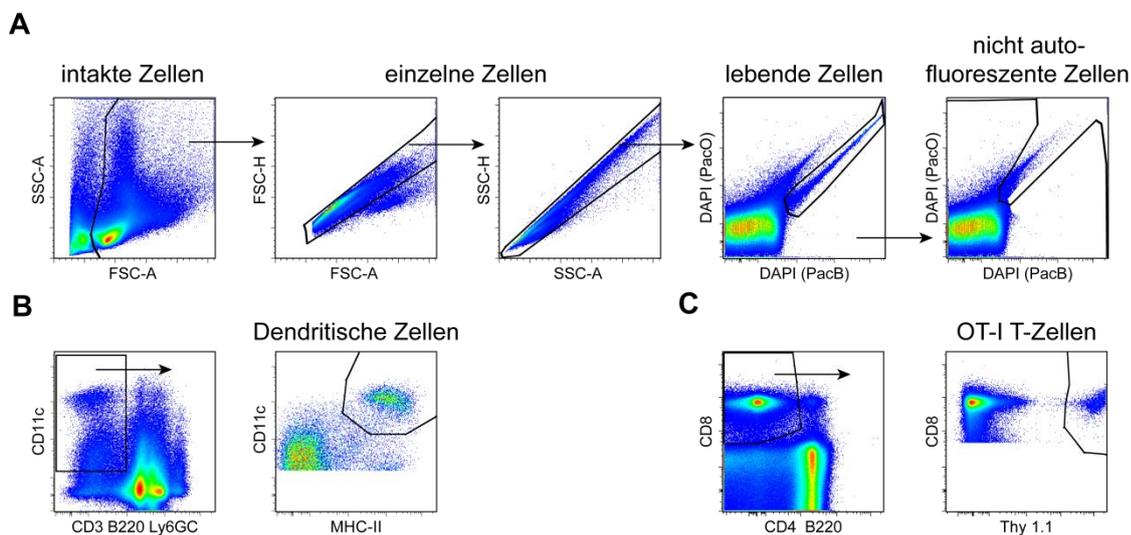


Abb. 7: Standardvorgehen bei der durchflusszytometrischen Analyse

A) Die Zellen wurden anhand der Größe und Granularität im Vorwärts- (FSC; *forward scatter*) und Seitwärtsscatter (SSC; *side scatter*) eingeschlossen, Zelltrümmer wurden ausgegrenzt. Zelldubletten wurden im FSC und SSC identifiziert und ausgegrenzt. Tote Zellen (DAPI⁺) und autofluoreszente Zellen wurden ausgeschlossen. B) Zur Identifikation von DZ wurden des Weiteren CD11c⁺ CD3⁻ B220⁻ Zellen eingeschlossen und anschließend CD11c⁺ MHC II⁺ Zellen eingegrenzt. C) Zur Identifikation von CD8⁺ OT-I T-Zellen wurden CD8⁺ CD4⁻ B220⁻ Zellen eingeschlossen und anschließend CD8⁺ Thy1.1⁺ Zellen eingegrenzt.

3. Ergebnisse

3.1 Entwurf, Klonierung und Expression der XCL1-Fusionsproteine

3.1.1 Struktureller Aufbau der XCL1-Fusionsproteine

Um eine systematische Struktur-Funktionsanalyse von XCL1 durchführen zu können, wurden zu Beginn dieser Arbeit fünf XCL1-Fusionsprotein-Versionen hergestellt. Als Standard für alle funktionellen Experimente diente ein Konstrukt bestehend aus dem XCL1-Wildtyp (WT-XCL1), an den C-terminal das Protein Ovalbumin (OVA) fusioniert wurde. Ein C-terminaler Strep-tag sollte die schnelle Aufreinigung der Konstrukte ermöglichen und in einigen durchflusszytometrischen Analysen die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erlauben (siehe Abb. 8).

Darüber hinaus wurden vier Varianten hergestellt, bei denen nur der N- oder C-Terminus von XCL1 variiert wurde, alle anderen Komponenten der Fusionsproteine blieben gleich: i) eine N-terminal um 7 AS verkürzte XCL1-Variante (Del-N7), ii) eine C-terminal um die letzten 7 AS verkürzte XCL1-Variante (Del-C7), iii) eine C-terminal um die letzten 17 AS verkürzte XCL1-Variante (Del-C17), sowie iv) eine Variante, bei der die letzten 17 AS des XCL1 C-Terminus durch die C-terminale AS-Sequenz des viralen Ratten-XCL1 ersetzt wurden (vCterm) (siehe Abb. 8).

Die genannten Varianten wurden hergestellt, damit die Bedeutung der einzelnen Domänen von XCL1 für die funktionelle Bindung an den Rezeptor XCR1 und die Auslösung von Chemotaxis *in vitro* erfasst werden konnte. Darüber hinaus sollte analysiert werden, welchen Einfluss bestimmte Domänen von XCL1 auf die Bindung an XCR1 *in vivo* haben, wie auch auf die nachfolgende Internalisierung und Prozessierung von OVA und die daraus resultierende Präsentation des dominanten Peptides SIINFEKL im Kontext des MHC I an der Zelloberfläche. Insbesondere mit der Variante vCterm sollte die Hypothese geprüft werden, dass der C-terminale Anteil des viralen Ratten-XCL1 die funktionellen Eigenschaften von XCL1 oder die Prozessierung von Antigen in Dendritischen Zellen *in vivo* verändert.

Der Aufbau der XCL1-Fusionsproteine ist schematisch in Abb. 8 dargestellt. Abb. 9 zeigt einen Vergleich der AS-Sequenzen des jeweiligen XCL1-Anteils der fünf XCL1-OVA Versionen.

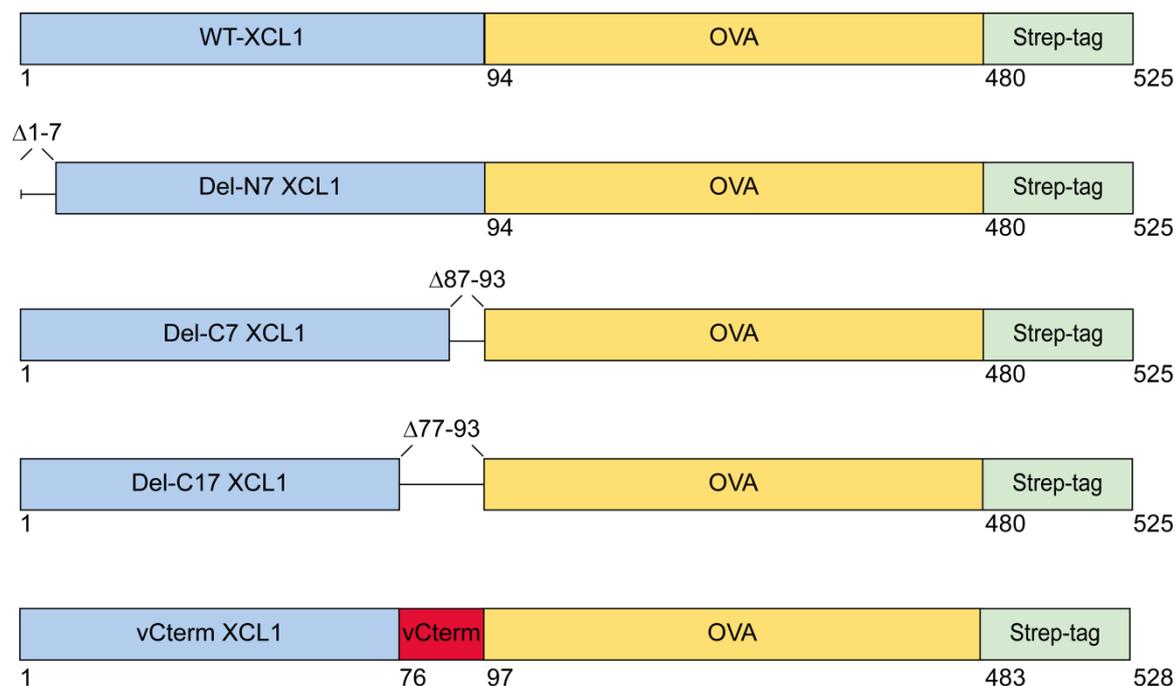


Abb. 8: Aufbau der XCL1-Fusionsproteine

Schematische Darstellung des WT-XCL1 Fusionsproteins aus XCL1, Ovalbumin (OVA) und Strep-tag[®], der korrespondierenden N- und C-terminalen Deletionsvarianten (Del-N7, Del-C7, Del-C17), sowie des Fusionsproteins, dessen C-Terminus durch den C-Terminus des viralen XCL1 (vCterm) ersetzt wurde. Bei den Varianten Del-C7 und Del-C17 wurde zwischen XCL1 und OVA die Sequenz GGGSGGGGS als Verbindungsstück (*linker*) eingefügt (hier nicht dargestellt). Die Aminosäuresequenz des viralen C-Terminus ist um drei Aminosäuren länger als die des C-Terminus des XCL1 Wildtyps.

WT-XCL1	VGTEVLEESSCVNLQTQRLPVQKIKTYIIWEGAMRAVIFVTKRGLKICAD
Del-N7	----- ESSCVNLQTQRLPVQKIKTYIIWEGAMRAVIFVTKRGLKICAD
Del-C7	VGTEVLEESSCVNLQTQRLPVQKIKTYIIWEGAMRAVIFVTKRGLKICAD
Del-C17	VGTEVLEESSCVNLQTQRLPVQKIKTYIIWEGAMRAVIFVTKRGLKICAD
vCterm	VGTEVLEESSCVNLQTQRLPVQKIKTYIIWEGAMRAVIFVTKRGLKICAD
WT-XCL1	PEAKWVKAAIKTVDGRASTRKNMAETVPTGAQRSTSTAITLTG
Del-N7	PEAKWVKAAIKTVDGRASTRKNMAETVPTGAQRSTSTAITLTG
Del-C7	PEAKWVKAAIKTVDGRASTRKNMAETVPTGAQRSTS GGGGSGGGGS
Del-C17	PEAKWVKAAIKTVDGRASTRKNMAET -----GGGGSGGGGS
vCterm	PEAKWVKAAIKTVDGRASTRKNMAET TTVIPTQVPVSTNETTTVYG

Abb. 9: Vergleich der XCL1-Aminosäuresequenz der fünf XCL1-Fusionsproteine

Vergleich des XCL1-Anteils der XCL1-Fusionsproteine Del-N7, Del-C7, Del-C17 und vCterm mit WT-XCL1. Identische Sequenzen sind fett gedruckt und weiß unterlegt, von WT-XCL1 unterschiedliche Sequenzen sind rot unterlegt. Grün unterlegte Bereiche stellen deletierte und bzw. nicht ersetzte Aminosäuren dar.

3.1.2 Klonierung der XCL1-Fusionsproteine

Die für die fünf verschiedenen XCL1-OVA-Strep-tag[®]-Fusionsproteine kodierende DNA wurde zu Beginn dieser Arbeit rekombinant hergestellt und in den *Drosophila* Expressionsvektor pRmHa-3 MT eingefügt [79] (siehe 2.3.2). Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA wurden die Plasmide in *E. coli* Bakterien eingebracht. Nach Expansion der Bakterienkulturen wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien aufgereinigt und sequenziert.

3.1.3 Proteinexpression und Analyse im ELISA

Um die XCL1-Fusionsproteine zu exprimieren, wurden die Plasmide der jeweiligen XCL1-OVA Varianten durch Elektroporation in *Drosophila* Schneider (SL-3) Zellen [67] transfiziert. Die transfizierten Zellen wurden mittels limitierender Verdünnung auf 96-*well*-Rundbodenplatten ausgesät, um später einzelne Klone identifizieren zu können. Nach 30 Tagen Wachstum wurden insgesamt 5760 Klone einzeln unter dem Mikroskop begutachtet und die am besten gewachsenen Klone ausgewählt. Um die Proteinproduktion der induzierten SL-3 Zellklone qualitativ zu prüfen und die produzierte Menge der XCL1-Fusionsproteine quantitativ miteinander zu vergleichen, wurde ein direkter ELISA zum Nachweis des Strep-tag[®] mit dem AK StrepMAB-Classic und ein indirekter *Sandwich* ELISA mit den AK MTAC 311 und 16H6 zum Nachweis des XCL1-Anteils der Fusionsproteine durchgeführt.

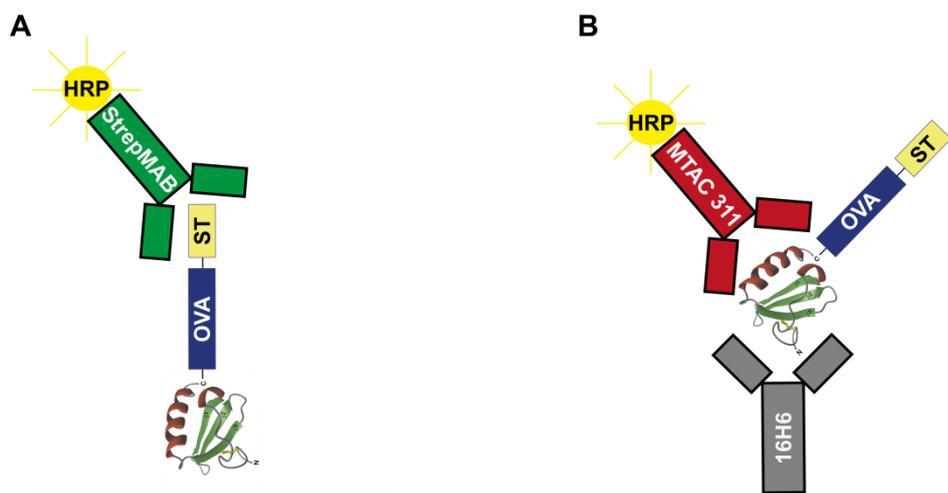


Abb. 10: Analyse der Proteinproduktion durch Strep-tag[®]-ELISA und XCL1-ELISA

Die Zellüberstände wurden mit zwei verschiedenen ELISA-Verfahren auf Produktion der XCL1-Fusionsproteine untersucht. A) Direkter ELISA mit dem Anti-Strep-tag[®] Antikörper StrepMAB-Classic HRP zur Detektion des Strep-tag[®] der XCL1-Fusionsproteine. B) indirekter *Sandwich* ELISA zur Detektion der XCL1-Varianten mit dem Primärantikörper 16H6 (grau) und dem Sekundärantikörper MTAC 311 (rot).

Es wurden die Zellkulturüberstände von 31 induzierten Klonen der Variante WT-XCL1, von jeweils 24 Klonen der Varianten Del-N7, Del-C7 und vCterm und von 20 Klonen der Variante Del-C17 mit beiden ELISA Verfahren untersucht. Die jeweils drei bzw. vier besten Proteinproduzenten wurden identifiziert und in einem zweiten ELISA erneut miteinander verglichen. Die Ergebnisse der am besten produzierenden Klone des zweiten ELISA sind in Tab. 6 dargestellt.

Tab. 6: Berechnete Konzentration der XCL1-Fusionsproteine im Zellkulturüberstand

Dargestellt sind die berechneten Proteinkonzentrationen der XCL1-Fusionsproteine im Zellkulturüberstand, basierend auf dem detektierten Signal des Strep-tag[®]-ELISA bzw. XCL1-ELISA.

XCL1-Fusionsprotein	Klon	Strep-tag [®] -ELISA	XCL1-ELISA
WT-XCL1	F2	4,0 mg/L	1,8 mg/L
Del-N7	E7	2,8 mg/L	Kein Signal
Del-C7	D6	70,0 mg/L	3,8 mg/L
Del-C17	C8a	68,1 mg/L	Kein Signal
vCterm	E1	12,2 mg/L	Kein Signal

Der Strep-tag[®]-ELISA erlaubt neben einem quantitativen Vergleich der in den Zellkulturüberständen vorhandenen Proteinmengen die Aussage, dass der Strep-tag[®] jedes XCL1-Fusionsproteins erfolgreich exprimiert wurde. Die quantitativen Angaben zur Proteinproduktion repräsentieren allerdings nicht die später tatsächlich von den Klonen produzierten Proteinmengen (siehe Tab. 7).

Interessanterweise waren nur die XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1 und Del-C7 im indirekten XCL1-ELISA nachweisbar, nicht jedoch die XCL1-Fusionsproteine Del-N7, Del-C17 und vCterm. Im direkten Strep-tag[®]-ELISA wurden alle fünf XCL1-Fusionsproteine detektiert. Der Negativbefund des indirekten XCL1-ELISA war ein Hinweis darauf, dass jeweils einer der beiden eingesetzten gegen XCL1 gerichteten Antikörper durch die Sequenzveränderung von XCL1 sein Bindungsepitop auf XCL1 verloren hat (siehe 3.3).

Das Kulturvolumen der am meisten XCL1-Fusionsprotein produzierenden SL-3 Zellklone wurde expandiert und die gesamte Kultur mit CuSO₄ induziert.

3.1.4 Aufreinigung der XCL1-Fusionsproteine und Mengenbestimmung

Die XCL1-Fusionsproteine wurden aus den Zellüberständen mit einer StrepTactin[®]-Säule aufgereinigt und anschließend umpuffert. Um die Reinheit und strukturelle Integrität zu

untersuchen, wurde eine Probe des Eluats auf ein SDS-Proteingel aufgetragen, exemplarisch sind in Abb. 11 A die Elutionsfraktionen aus dem Zellkulturüberstand des SL-3 Zellklons F2, welcher das Fusionsprotein WT-XCL1 exprimierte, dargestellt.

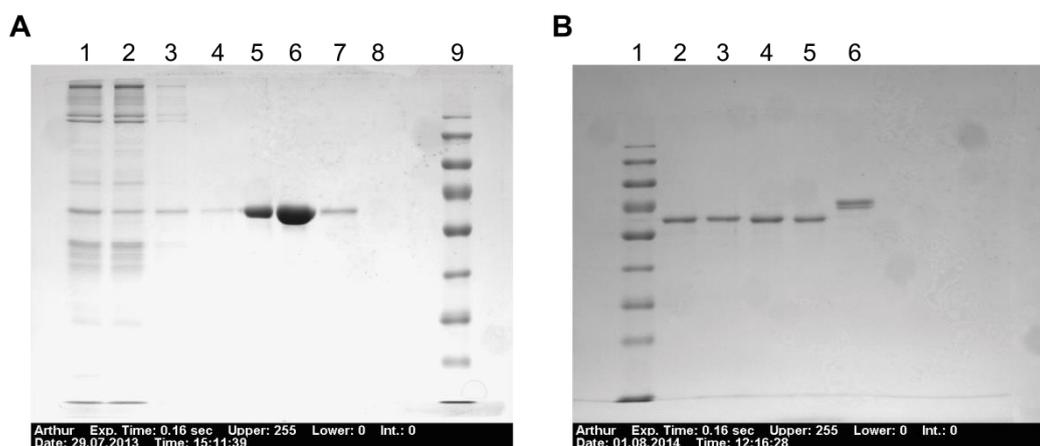


Abb. 11: Analyse und Vergleich der XCL1-Fusionsproteine in der 10 % SDS-PAGE

A) Fraktionen des Aufreinigungsprozesses von WT-XCL1: (1) Zellkulturüberstand vor dem Auftragen auf die StrepTactin[®]-Säule, (2) nach Durchlaufen der StrepTactin[®]-Säule, (3) Durchlauf Puffer W, (4-7) Elutionsfraktionen 1, 2, 3, und 4, (8) Durchlauf Puffer R, (9) vorgefärbte Proteinleiter (Standard). B) Je 0,75 µg der XCL1-Fusionsproteine wurden zum direkten Vergleich im SDS-Proteingel aufgetrennt: (1) vorgefärbte Proteinleiter (Standard), (2) WT-XCL1, (3) Del-C7, (4) Del-C17, (5) Del-N7, (6) vCterm.

Zur Bestimmung der exakten Proteinkonzentration wurden die aufgereinigten XCL1-Fusionsproteine am Spektralphotometer vermessen. Tab. 7 zeigt die insgesamt aufgereinigten Proteinmengen der XCL1-Fusionsproteine.

Tab. 7: Produzierte Proteinmengen und errechnete Ausbeuten pro Liter Zellkultur

XCL1-Variante	Klon	Proteinmenge absolut	produzierte Proteinmenge/L
WT-XCL1	F2	790 µg	1436 µg/L
Del-N7	E7	1012 µg	2530 µg/L
Del-C7	D6	4675 µg	2337,5 µg/L
Del-C17	C8a	1192,2 µg	745,1 µg/L
vCterm	E1	1132,5 µg	2265 µg/L

Zum Vergleich des Molekulargewichts wurden gleiche Mengen der XCL1-Fusionsproteine in einem SDS-Page Proteingel aufgetrennt und das Erscheinungsbild der Banden miteinander verglichen (siehe Abb. 11 B). Die Banden der XCL1-Fusionsproteine lagen innerhalb des Größenspektrums von 55 bis 70 kDa der standardisierten Proteinleiter, was dem erwarteten

Molekulargewicht der XCL1-Fusionsproteine von 56-58 kDa entsprach und bestätigt, dass alle fünf XCL1-Fusionsproteine vollständig exprimiert wurden. Auffälligerweise zeigte das XCL1-Fusionsprotein vCterm ein doppelbandiges Laufmuster, was auf eine besondere Glykosylierung dieser Variante hindeuten könnte.

3.2 Bindungsverhalten der XCL1-Fusionsproteine

Aus Struktur-Funktionsanalysen verschiedener Chemokine lässt sich eine entscheidende Rolle des N-Terminus für die Rezeptorbindung und Signaltransduktion ableiten, jedoch kann auch der C-Terminus an der Rezeptorbindung beteiligt sein [3]. Hartung *et al.* zeigten für natives XCL1 und für mit dem Protein OVA fusioniertes XCL1 (XCL1-OVA, entsprechend der Fusionsprotein-Variante „WT-XCL1“ ohne Strep-tag[®] in dieser Arbeit), dass es spezifisch an den Chemokinrezeptor XCR1 auf kreuzpräsentierenden DZ bindet [57]. Die funktionelle Bedeutung der AS-Sequenz des N- und C-Terminus von XCL1 ist strittig (siehe 4.2, 4.3), bislang gibt es keine Studien zur Interaktion von XCL1-Strukturvarianten mit nativen, den Rezeptor XCR1 exprimierenden Zellen.

Ziel der ersten Experimentserie dieser Arbeit war es zu untersuchen, wie die Modifikationen der N- und C-Termini von XCL1 i) das Bindungsverhalten des Chemokins an seinen Rezeptor beeinflussen, ii) die (unspezifische) Bindung an kreuzpräsentierende DZ bestimmen, welche den XCR1-Rezeptor nicht mehr aufweisen, iii) die unspezifische Bindung an SIRP α^+ DZ und andere Zellen des Immunsystems beeinflusst.

Die Bindungsstudien wurden mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Der Nachweis der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem gegen den Strep-tag[®] gerichteten Antikörper StrepMAB-Immo Oyster 645. In einer separaten Experimentserie wurden die anti-XCL1-Antikörper MTAC 311 und 16H6 eingesetzt, zudem wurde eine Komplexfärbung mit StrepTactin[®]-PE verwendet.

3.2.1 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1⁺ DZ

Zur Untersuchung des Einflusses des N- und C-Terminus auf die Bindung von XCL1 wurden Milzzellen von C57BL/6 Mäusen mit einer Verdünnungsreihe der XCL1-Fusionsproteine inkubiert, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zuerst erfolgte die Analyse der Bindung der XCL1-Fusionsproteine an rezeptortragende XCR1⁺ DZ, welche die einzigen Körperzellen sind, die den Rezeptor XCR1 exprimieren. Wie in der Einleitung beschrieben,

können die XCR1⁺ DZ in CD8⁺ und CD8⁻ unterschieden werden. Funktionell scheinen sich beide Populationen stark zu ähneln, es wird vermutet, dass die CD8⁻ XCR1⁺ DZ noch nicht vollständig ausgereifte Vorläuferzellen der CD8⁺ XCR1⁺ DZ darstellen [80]. Die Bindung der XCL1-Fusionsproteine an ihren Rezeptor wurde für die CD8⁺ bzw. CD8⁻ Population separat dargestellt (siehe Abb. 12, 13, 14).

Bei der Analyse der mit WT-XCL1 inkubierten CD8⁺ XCR1⁺ DZ konnte bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 0,04 µg/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) ein spezifisches Signal gemessen werden. Die Verwendung höherer Fusionsprotein-Konzentrationen verstärkte das Signal konzentrationsabhängig. Bei 1,25 µg/ml WT-XCL1 war die gemessene Signalstärke auf CD8⁺ XCR1⁺ DZ maximal, eine weitere Konzentrationserhöhung führte zu einer geringfügigen Abnahme der Signalstärke.

Interessanterweise konnte nach Inkubation der Zellen mit Del-N7 bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 0,04 µg/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) kein spezifisches Signal detektiert werden. Das bedeutet, dass keine Bindung von Del-N7 an den Rezeptor XCR1 stattgefunden hat. Die schrittweise Erhöhung der verwendeten Konzentration führte zu einem schwach messbaren Signal. Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 2,5 µg/ml wurde ein Signal detektiert, dessen Signalstärke dem der übrigen XCL1-Fusionsproteine bei ca. 62 fach geringerer Konzentration (0,04 µg/ml) entsprach. Die gestörte Bindung von Del-N7 an XCR1 lässt sich offensichtlich in gewissem Maße durch Konzentrationserhöhung kompensieren.

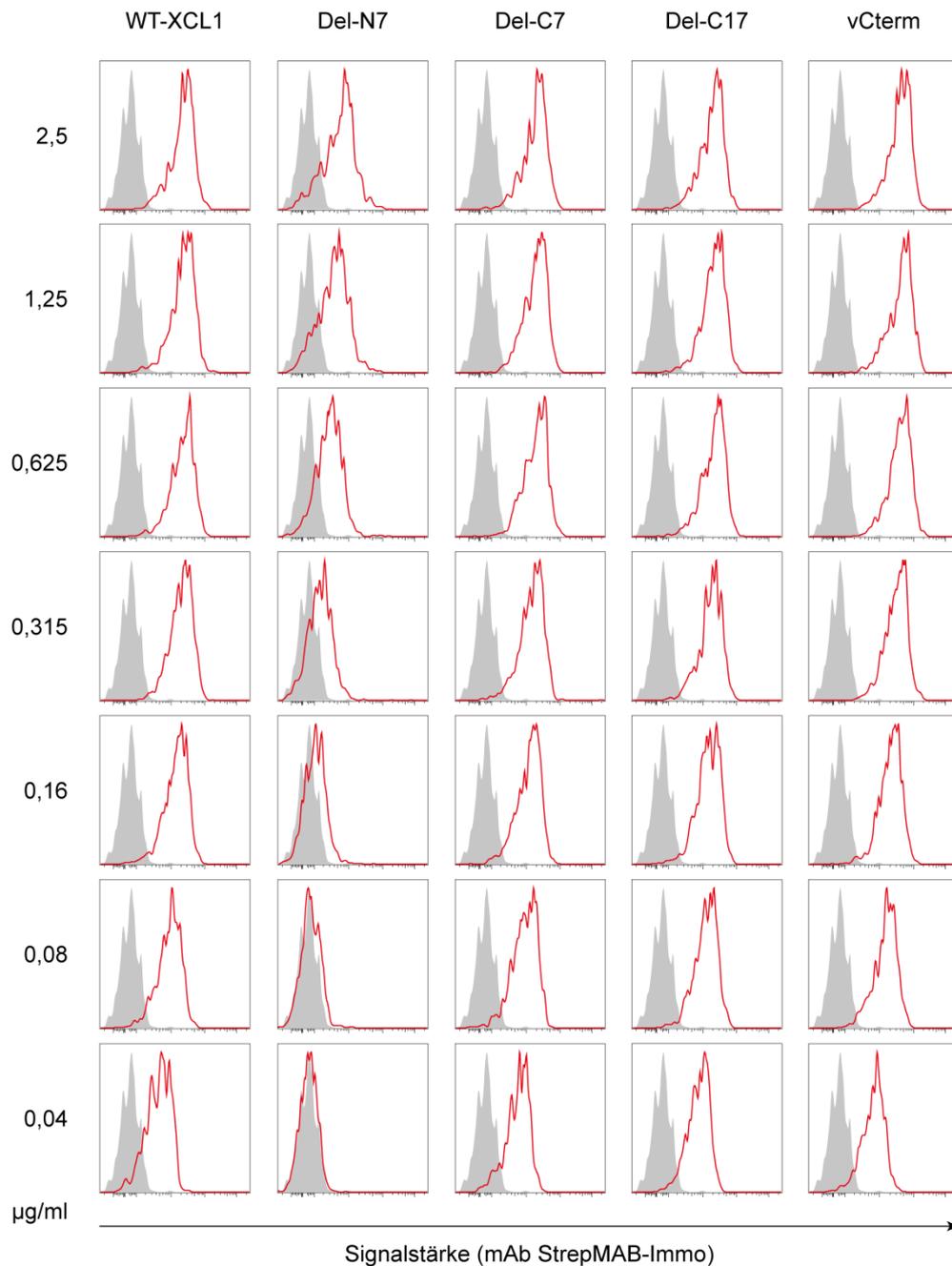


Abb. 12: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an CD8⁺ XCR1⁺ DZ

Splenozyten von C57BL/6 Mäusen wurden mit den XCL1-Fusionsproteinen in den angegebenen Konzentrationen für 25 min inkubiert, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem anti-Strep-tag[®] Antikörper StrepMAB-Immo Oyster-645. Gezeigt werden repräsentative Histogramme: Das Signal der auf CD8⁺ XCR1⁺ DZ (Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺) gebundenen XCL1-Fusionsproteine ist in rot dargestellt. Der Hintergrund (grau) zeigt das Signal der Zellen ohne Inkubation mit XCL1-Fusionsproteinen.

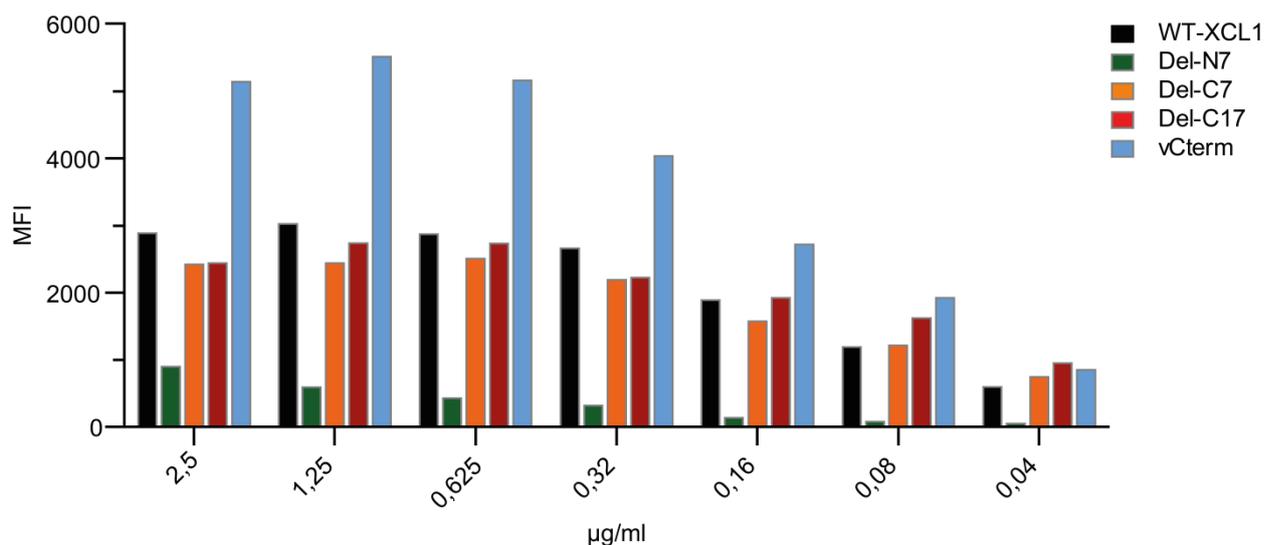


Abb. 13: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an CD8⁺ XCR1⁺ DZ

Splenozyten von C57BL/6 Mäusen wurden mit den XCL1-Fusionsproteinen in den angegebenen Konzentrationen für 25 min inkubiert, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem Anti-Strep-tag[®] Antikörper StrepMAB-Immo Oyster-645. Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) des auf CD8⁺ XCR1⁺ DZ (Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺) detektierten Signals.

Die Untersuchung weiterer Zellpopulationen (siehe Abb. 15) zeigte, dass es sich trotz der hohen eingesetzten Konzentration um eine spezifische Bindung von Del-N7 an XCR1 handelt und nicht um eine generelle, konzentrationsbedingte unspezifische Bindung an Zelloberflächen.

Die Stärke des detektierten Signals nach Inkubation der Zellen mit den XCL1-Fusionsproteinen Del-C7 und Del-C17 war mit der Signalstärke von WT-XCL1 vergleichbar und steigerte sich konzentrationsabhängig auf ähnlichem Niveau. Dies zeigt, dass die Fusionsproteine Del-C7 und Del-C17 vergleichbare Bindungseigenschaften an XCR1 aufweisen. Interessanterweise war bei Analyse der mit vCterm inkubierten Zellen konzentrationsübergreifend eine deutlich höhere Signalintensität zu messen als bei Verwendung der Varianten WT-XCL1, Del-C7 oder Del-C17 (siehe Abb. 13). Dies lässt darauf schließen, dass vCterm besser an XCR1 bindet als die übrigen XCL1-Fusionsproteine. Diese Beobachtung bestätigte sich in etwas schwächerer Ausprägung auch in den Wiederholungsexperimenten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Varianten WT-XCL1, Del-C7 und Del-C17 gleichermaßen an den Rezeptor XCR1 auf CD8⁺ XCR1⁺ DZ binden. Die Variante vCterm bindet stärker an den Rezeptor XCR1, während die Bindung der Variante Del-N7 an XCR1 durch den verkürzten N-Terminus massiv vermindert ist.

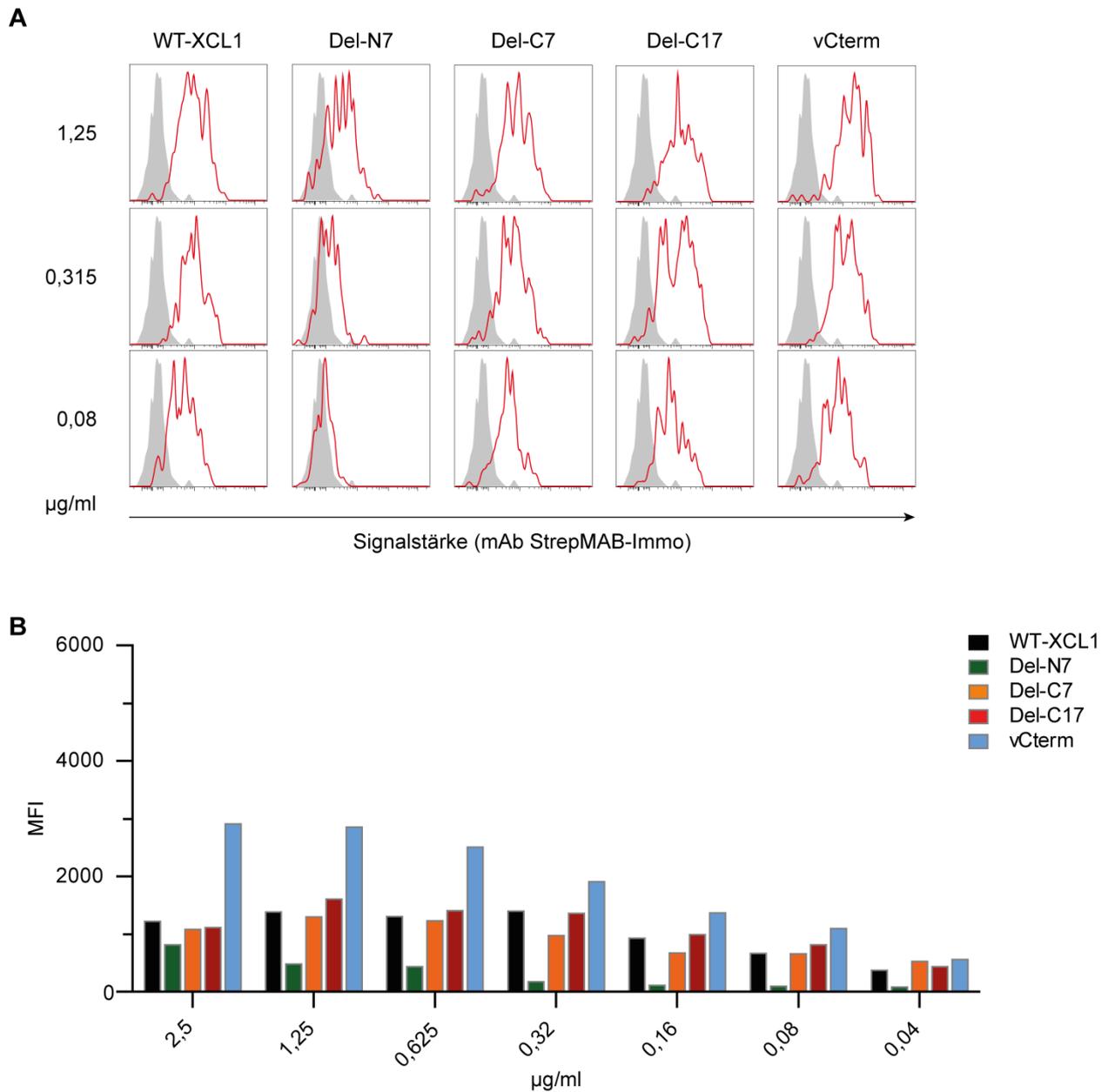


Abb. 14: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an CD8⁻ XCR1⁺ DZ

Splenozyten von C57BL/6 Mäusen wurden mit den XCL1-Fusionsproteinen in den angegebenen Konzentrationen für 25 min inkubiert, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem Anti-Strep-tag[®] Antikörper StrepMAB-Immo Oyster-645. A) Das Signal der auf CD8⁻ XCR1⁺ DZ (Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺) gebundenen XCL1-Fusionsproteine ist in rot dargestellt. Der Hintergrund (grau) zeigt das Signal der Zellen ohne Inkubation mit XCL1-Fusionsproteinen. B) Dargestellt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der auf CD8⁻ XCR1⁺ DZ (Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺) gemessenen Signale.

Die detektierte Signalstärke auf CD8⁻ XCR1⁺ DZ war im Vergleich zu CD8⁺ XCR1⁺ deutlich geringer. Dies liegt vermutlich daran, dass die CD8⁻ XCR1⁺ DZ als Vorläuferzellen weniger XCR1 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Wie auf den XCR1⁺ CD8⁺ DZ steigerte sich die Stärke

des detektierten Signals aller XCL1-Fusionsproteine mit steigender eingesetzter Konzentration. Bei den Varianten WT-XCL1, Del-C7, Del-C17 und vCterm war das Signalmaximum ebenfalls bei einer Konzentration von 1,25 µg/ml zu beobachten. Bei Verwendung von vCterm wurde das jeweils stärkste Signal detektiert. Die gestörte Bindung der Variante Del-N7 ließ sich durch Steigern der eingesetzten Del-N7 Konzentration teilweise kompensieren.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich die Bindungseigenschaften der XCL1-Fusionsproteine an XCR1 auf CD8⁺ und CD8⁻ DZ nicht unterscheiden bzw. unabhängig vom CD8 Status sind.

Ähnliche Ergebnisse über das Bindungsverhalten der XCL1-Fusionsproteine an CD8⁺ und CD8⁻ XCR1⁺ DZ wurden in zwei weiteren Experimenten gewonnen, in denen anstatt des Antikörpers StrepMAB-Immo eine Komplex-Färbung mit StrepTactin[®]-PE zur Detektion der XCL1-Fusionsproteine verwendet wurde (Ergebnisse nicht gezeigt).

3.2.2 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1-defiziente kreuzpräsentierende DZ

Um die Spezifität der XCL1-Fusionsproteine für den Rezeptor XCR1 zu erfassen, wurden die XCL1-Fusionsproteine mit Milzzellen von XCR1-defizienten B6.XCR1-lacZ Mäusen inkubiert, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In der Analyse wurde unterschieden zwischen CD8⁺ XCR1-defizienten DZ und CD8⁻ XCR1-defizienten DZ.

Nach Inkubation mit den maximalen Konzentrationen von 2,5 µg/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) WT-XCL1, Del-C7, Del-N7 oder vCterm zeigte sich auf den CD8⁺ XCR1-defizienten DZ jeweils ein schwaches unspezifisches Signal. Je niedrigerer die eingesetzten Konzentrationen der genannten XCL1-Fusionsproteine, desto geringer war die Signalstärke. Ab einer Konzentration von 0,315 µg/ml XCL1-Fusionsprotein war kein unspezifisches Signal mehr messbar.

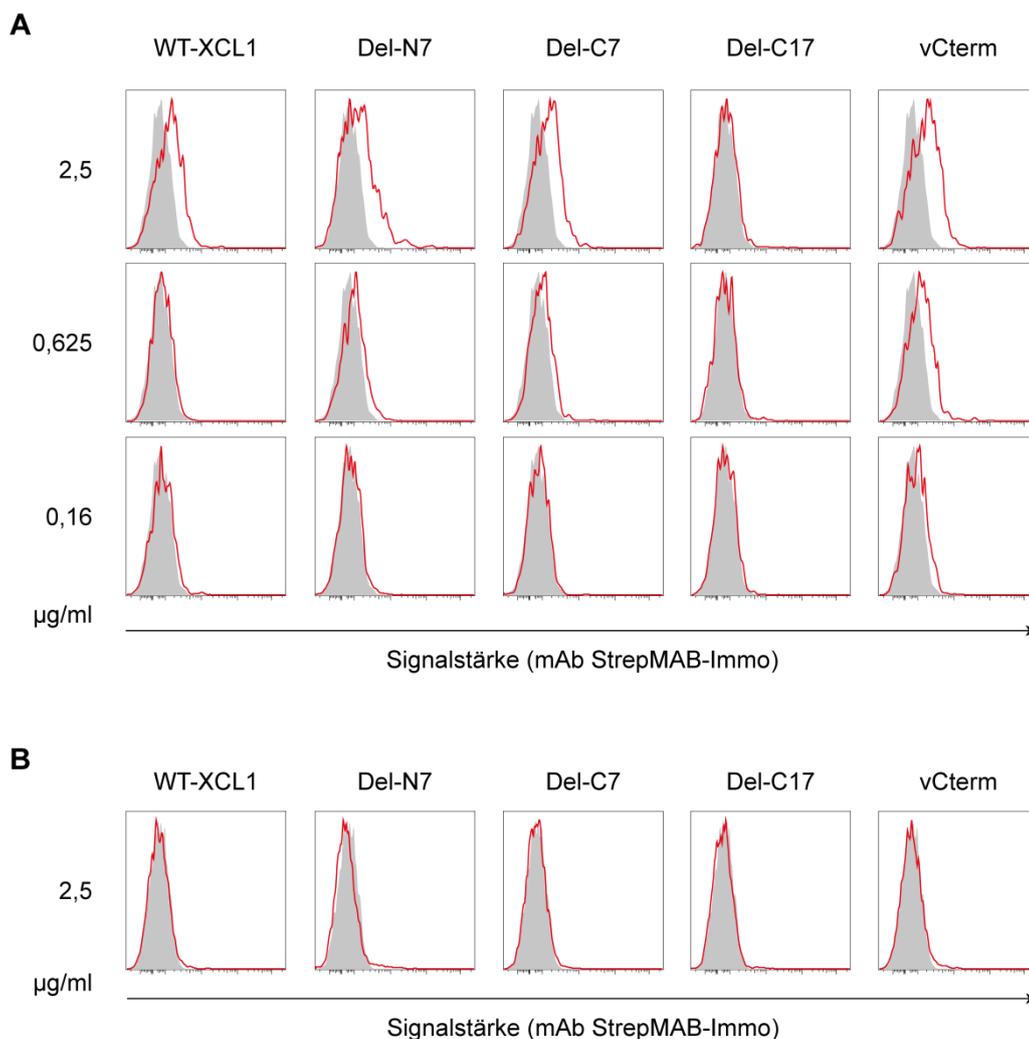


Abb. 15: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an XCR1-defiziente DZ

Splenozyten von B6.XCR1-LacZ Mäusen wurden mit den XCL1-Fusionsproteinen in den angegebenen Konzentrationen für 25 min inkubiert, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem Anti-Strep-tag® Antikörper StrepMAB-Immoo Oyster-645. Die Abbildung zeigt repräsentative Histogramme für A) XCR1-defiziente CD8⁺ DZ (Ly6G⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺) B) XCR1-defiziente CD8⁻ DZ (Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺). Das Signal der gebundenen XCL1-Fusionsproteine ist jeweils in rot dargestellt, der Hintergrund (grau) zeigt das Signal der Zellen ohne Inkubation mit XCL1-Fusionsproteinen.

Bemerkenswerterweise zeigte sich, dass nach Inkubation mit Del-C17, im Gegensatz zu den übrigen XCL1-Fusionsproteinen, auch bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen (1,25 µg/ml; 2,5 µg/ml), kein unspezifisches Signal detektierbar war.

Das Experiment zeigt, dass die XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1, Del-N7, Del-C7 und vCterm bei höheren Konzentrationen unspezifisch an CD8⁺ XCR1-defiziente DZ binden, während dies für Del-C17 nicht zutrifft.

Auf CD8⁻ XCR1-defizienten DZ zeigte sich kein Signal-Unterschied zwischen den mit XCL1-Fusionsproteinen inkubierten Zellen und Hintergrundsignal der nicht mit XCL1 inkubierten Zellen. Daraus kann geschlossen werden, dass keines der XCL1-Fusionsproteine an XCR1-defiziente CD8⁻ DZ bindet. Die unspezifische Bindung von WT-XCL1, Del-C7, Del-N7 und vCterm an XCR1-defiziente DZ scheint vom CD8 Rezeptorstatus abhängig zu sein (siehe 4.3).

3.2.3 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an SIRP α ⁺ DZ und andere Zellen des Immunsystems

Nach einer neuen, einheitlichen Klassifikation lassen sich DZ der Maus in XCR1⁺ und SIRP α ⁺ DZ einteilen (siehe 1.5) [39]. Um das Bindungsverhalten der XCL1-Fusionsproteine an SIRP α ⁺ DZ sowie an weitere Zellen des Immunsystems zu erfassen, wurden Splenozyten aus C57BL/6 Mäusen mit einer Verdünnungsreihe der XCL1-Fusionsproteine inkubiert, gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

Bei der Analyse der SIRP α ⁺ DZ wurde differenziert zwischen CD8⁺ und CD8⁻ DZ Populationen. Weder auf CD8⁺ noch auf CD8⁻ SIRP α ⁺ war ein spezifisches Signal detektierbar, keines der XCL1-Fusionsproteine bindet an SIRP α ⁺ DZ (siehe Abb. 16). Zusätzlich zu den SIRP α ⁺ DZ wurden folgende weitere Zelltypen auf Bindung der XCL1-Fusionsproteine untersucht: Granulozyten, B-Zellen, CD8⁺ T-Zellen, CD8⁻ T-Zellen, Antigenpräsentierende Zellen, die nicht B-Zellen oder DZ zugeordnet werden, Makrophagen und übrige Zellen, welche sich nicht innerhalb der vorher genannten Zellpopulationen befanden. Bei keiner der eingesetzten Konzentrationen von 0,04 μ g/ml bis 2,5 μ g/ml XCL1-Fusionsprotein (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) ließ sich auf den genannten Zelltypen ein spezifisches Signal detektieren. Ein schwaches, auf Makrophagen detektierbares Signal ist auf die unspezifische Bindung des Antikörpers an zahlreiche Fc-Rezeptoren auf der Oberfläche der Makrophagen zurückzuführen und nicht auf eine Bindung der XCL1-Fusionsproteine. Makrophagen sind allgemein dafür bekannt, dass sie unspezifisch AK binden.

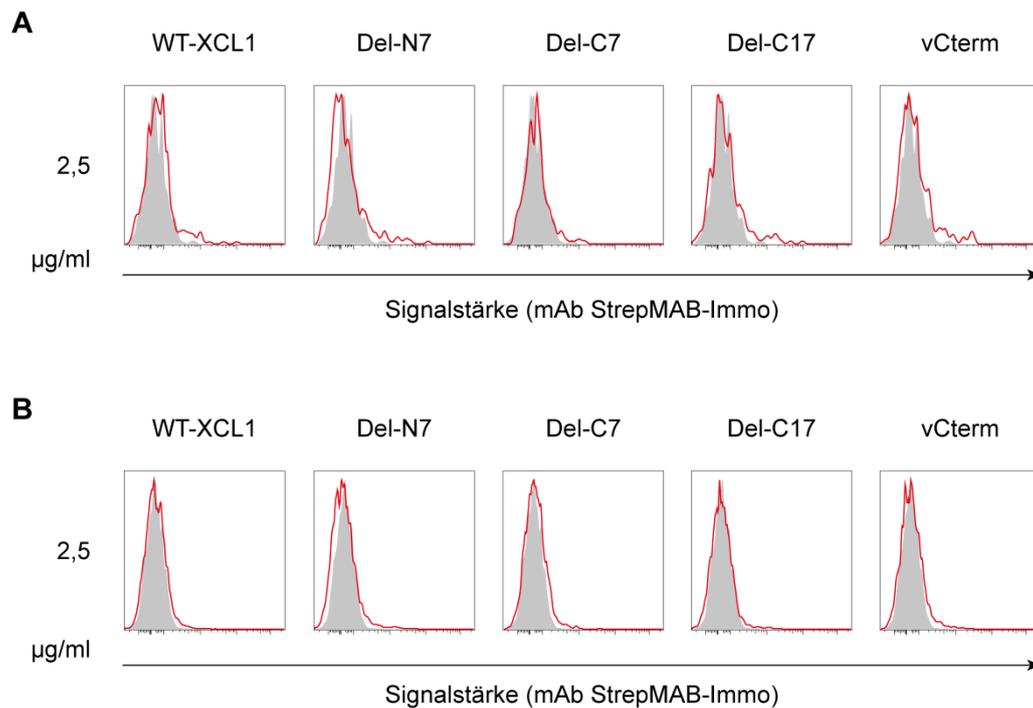


Abb. 16: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an SIRP α^+ DZ

Splenozyten von C57BL/6 Mäusen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der XCL1-Fusionsproteine für 25 min inkubiert, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem Anti-Strep-tag[®] Antikörper StrepMAB-Immo Oyster-645. Die Abbildung zeigt repräsentative Histogramme für A) CD8⁺ XCR1⁻ DZ (Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺). B) DN (CD8⁻ XCR1⁻) DZ (Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺). Das Signal der gebundenen XCL1-Fusionsproteine ist jeweils in rot dargestellt, der Hintergrund (grau) zeigt das Signal der Zellen ohne Inkubation mit XCL1-Fusionsproteinen.

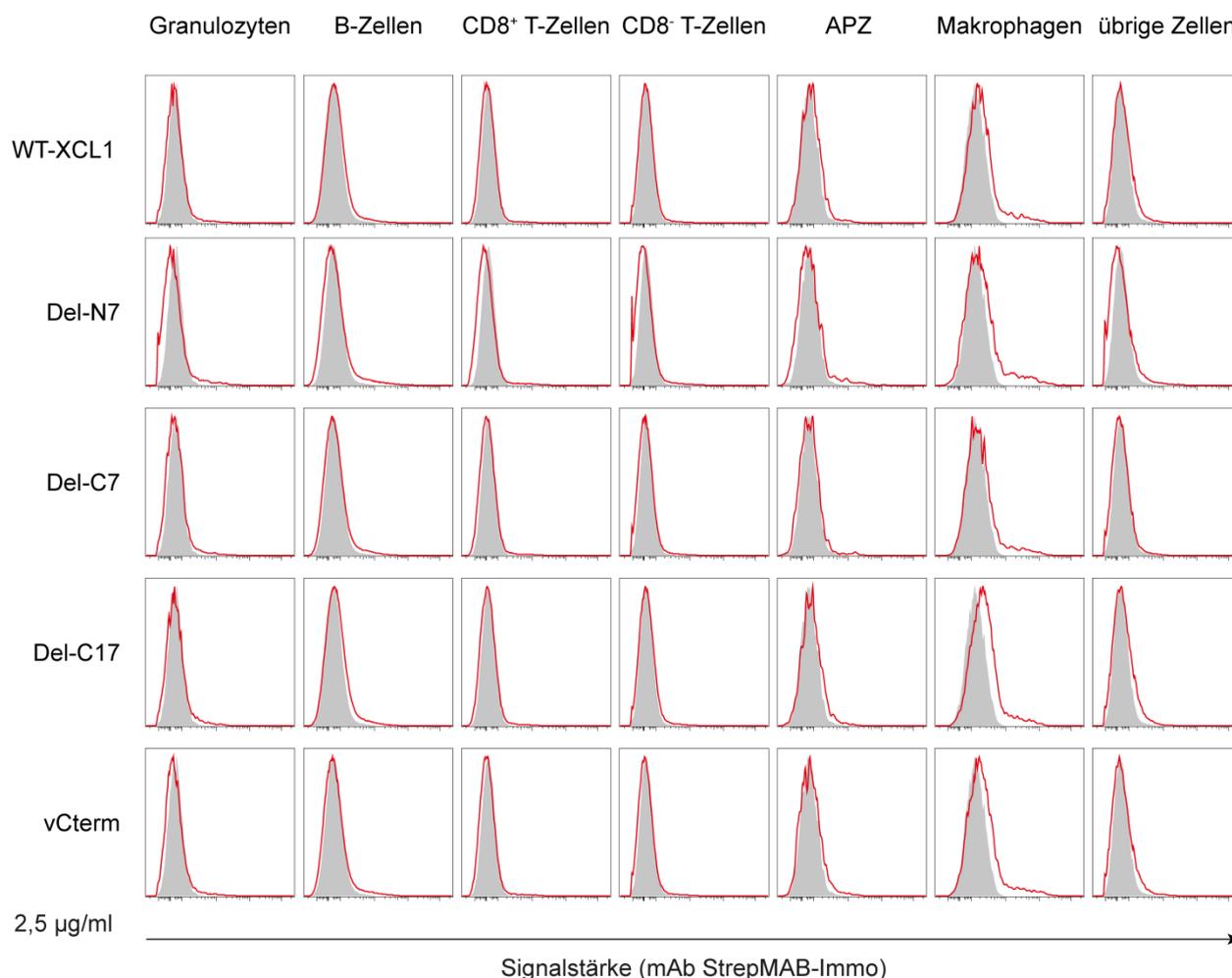


Abb. 17: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an verschiedene Zellen des Immunsystems

Splenozyten von C57BL/6 Mäusen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der XCL1-Fusionsproteine für 25 min inkubiert, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem Anti-Strep-tag[®] Antikörper StrepMAB-Immo Oyster-645. Die Abbildung zeigt repräsentative Histogramme für die angegebenen Zellpopulationen. Das Signal der gebundenen XCL1-Fusionsproteine ist jeweils in rot dargestellt, der Hintergrund (grau) zeigt das Signal der Zellen ohne Inkubation mit XCL1-Fusionsproteinen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Modifikation des N- und C-Terminus nicht zu einer unspezifischen Bindung an Zellen des Immunsystems führt, welche keinen XCR1 Rezeptor auf ihrer Oberfläche tragen.

3.3 Detektion von XCL1 mit den Antikörpern MTAC 311 und 16H6

Für die spezifische Detektion der XCL1-Fusionsproteine können verschiedene Methoden angewendet werden. Außer dem Nachweis des Strep-tag[®] mit einem gegen den Strep-tag[®] gerichteten AK oder der Komplexbildung der XCL1-Fusionsproteine mit StrepTactin[®]-PE, kann

XCL1 auch direkt mit den AK MTAC-311 oder 16H6 detektiert werden. Im Kontext der Evaluation der SL-3 Zellkulturüberstände wurden beide anti-XCL1 AK im indirekten ELISA zum Nachweis der produzierten XCL1-Fusionsproteine eingesetzt. Dabei wurde der Antikörper 16H6 als Primär-, der Antikörper MTAC-311 als Sekundärantikörper verwendet. Wie bereits ausführlich dargelegt (siehe 3.1.3), ließen sich nur die XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1 und Del-C7 nachweisen.

Um zu untersuchen, warum die Varianten Del-N7, Del-C17 und vCterm nicht detektierbar waren, wurde geprüft, ob mit MTAC-311 und 16H6 an XCR1⁺ DZ gebundenes XCL1-Fusionsprotein nachgewiesen werden kann. Dazu wurden Milzzellen von C57BL/6 Mäusen mit einer Konzentration von je 5 µg/ml XCL1-Fusionsprotein (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) inkubiert und anschließend jeweils mit MTAC-311 oder 16H6 gefärbt, gewaschen und durchflusszytometrisch analysiert.

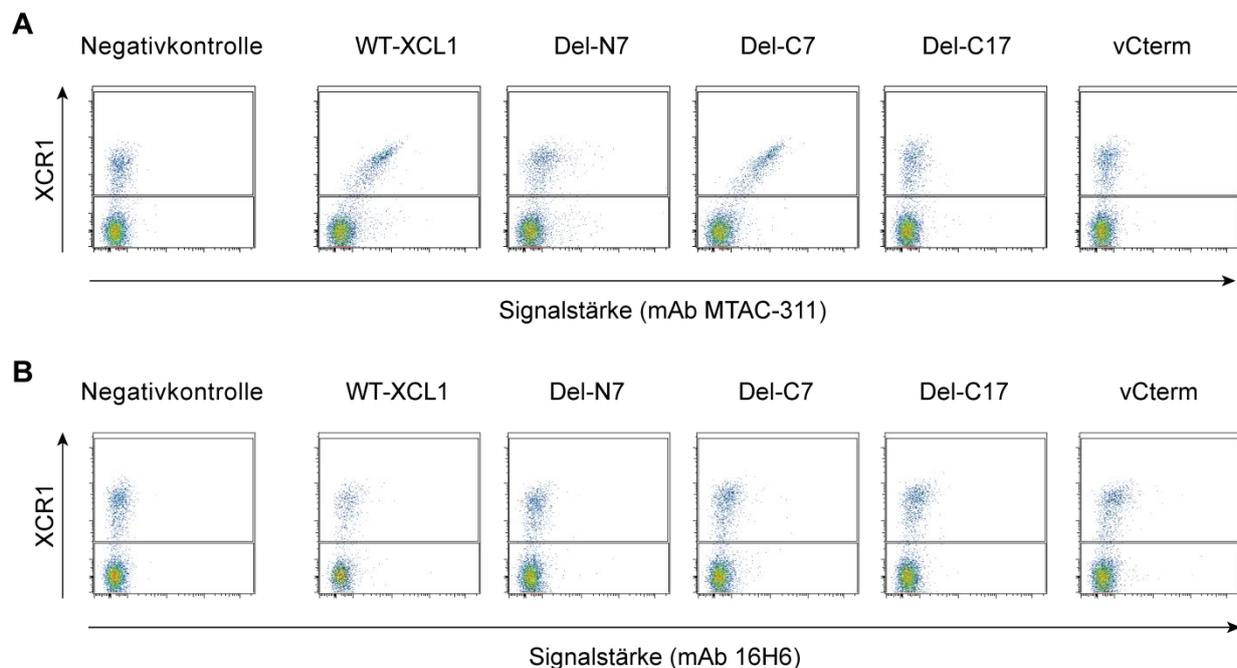


Abb. 18: Färbung der XCL1-Fusionsproteine mit den Anti-XCL1 Antikörpern MTAC-311 und 16H6

Splenozyten von C57BL/6 Mäusen wurden mit den XCL1-Fusionsproteinen in einer Konzentration von 5 µg/ml für 20 min inkubiert. Die Detektion der gebundenen XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit den anti-XCL1 Antikörpern MTAC-311 und 16H6. Dargestellt sind DZ ((Ly6G/C⁻ CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺) unterteilt in XCR1⁺ bzw. XCR1⁻ DZ. A) Färbung der XCL1-Fusionsproteine mit dem Anti-XCL1 Antikörper MTAC-311. B) Färbung der XCL1-Fusionsproteine mit dem Anti-XCL1 Antikörper 16H6.

Interessanterweise ließen sich nur die XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1 und Del-C7 mit dem AK MTAC-311 nachweisen, nicht jedoch Del-C17 und vCterm. Del-N7 ließ sich mit dem AK MTAC-311 ebenfalls nachweisen, das gemessene Signal war allerdings sehr schwach, was

jedoch auf die grundsätzlich sehr schwache Bindung der Variante Del-N7 an XCR1 zurückzuführen ist. Es konnte bereits mit dem AK StrepMAB-Immo gezeigt werden, dass Del-C17 und vCterm an XCR1⁺ DZ binden (siehe 3.2.1). Die mangelnde Färbung durch MTAC-311 ist folglich darauf zurückzuführen, dass MTAC-311 nicht an Del-C17 und vCterm bindet. Daraus lässt sich Folgendes ableiten: Sofern die C-terminale Sequenz AS 77-86 (VPTGAQRSTS) deletiert oder in der Sequenz verändert ist, verliert der AK MTAC-311 sein Bindungsepitop. Dies erklärt auch, warum Variante Del-C17 und vCterm im indirekten ELISA nicht detektierbar waren.

Tab. 8: Evaluation der anti-XCL1 Antikörper MTAC-311 und 16H6

Zusammenstellung der Ergebnisse des indirekten ELISA sowie der Detektion der an XCR1⁺ DZ gebundenen XCL1-Fusionsproteine mit MTAC-311 oder 16H6, + bedeutet, dass ein spezifisches Signal detektiert wurde, - bedeutet, dass kein spezifisches Signal detektiert wurde.

XCL1-Fusionsprotein	Indirekter ELISA (16H6 / MTAC-311)	MTAC-311	16H6
WT-XCL1	+	+	-
Del-N7	-	+	-
Del-C7	+	+	-
Del-C17	-	-	-
vCterm	-	-	-

Mit dem AK 16H6 war keines der an XCR1⁺ DZ gebundenen XCL1-Fusionsproteine nachweisbar (siehe Abb. 18 B, Tab. 8). Allerdings kann aus den Ergebnissen des indirekten ELISA, indem 16H6 als Primärantikörper fungierte, geschlossen werden, dass 16H6 grundsätzlich mindestens die beiden Varianten WT-XCL1 und Del-C7 bindet. Gleichzeitig wurde durch Verwendung des Anti-Strep-tag[®] AK StrepMAB-Immo gezeigt, dass alle fünf XCL1-Fusionsproteine grundsätzlich in der Lage sind, an XCR1⁺ DZ binden. Dass mit 16H6 keines der XCL1-Fusionsproteine auf XCR1⁺ DZ detektiert wurde und Del-N7 im indirekten ELISA nicht nachweisbar war, könnte folgende Erklärung haben: Der Antikörper bindet an den N-Terminus von XCL1 - ist dieser deletiert oder nach erfolgter Rezeptorbindung von XCL1 an XCR1 nicht mehr zugänglich, kann 16H6 nicht binden. Das Bindungsepitop des Antikörpers 16H6 befindet sich folglich innerhalb der ersten sieben N-terminalen AS VGTEVLE.

3.4 Chemotaktische Eigenschaften der XCL1-Fusionsproteine

Das Auslösen von Chemotaxis ist eine Schlüsselfunktion von Chemokinen. Hartung et al. konnten bereits demonstrieren, dass XCL1 und das Fusionsprotein XCL1-OVA gleichermaßen chemotaktisch auf XCR1⁺ DZ wirken [57], [49]. Bisherige Untersuchungen der funktionellen Rolle des N- und C-Terminus von XCL1 bei der Auslösung von Chemotaxis wurden mit XCR1 transfizierten Zelllinien durchgeführt und führten zu widersprüchlichen Ergebnissen [81], [26], [24] (siehe 4.2, 4.3).

Um eventuelle funktionelle Unterschiede der XCL1-Fusionsproteine hinsichtlich ihrer chemotaktischen Wirkung auf XCR1⁺ DZ zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Migrationsversuch mit murinen Milzzellen durchgeführt. Der Anteil XCR1⁺ DZ an der Gesamtzahl der Milzzellen von C57/BL6 Mäusen beträgt normalerweise nur ca. 0,3 %, was eine Untersuchung der Migration XCR1⁺ DZ zu den XCL1-Fusionsproteinen aufgrund der geringen Zellzahl schwierig gestalten würde. Um den Anteil der XCR1⁺ DZ zu erhöhen, wurde den Mäusen vor Verwendung der Milzen ein das Zytokin Flt3-Ligand exprimierender Tumor gesetzt. Flt3-Ligand führt zur Expansion aller konventionellen DZ [82], [83] und insbesondere zur Proliferation der XCR1⁺ DZ [21].

Nach Isolation der Milzzellen der Flt3-Ligand behandelten Mäuse betrug der Anteil aller DZ ca. 25 %, durch Dichtegradienten-Zentrifugation wurde ihr Anteil auf ca. 62 % aller Milzzellen erhöht. Der Anteil der XCR1⁺ DZ an der gesamten Population betrug nach *in vivo* Expansion mittels Flt3-Ligand ca. 13 % und nach Anreicherung durch Dichtegradienten-Zentrifugation ca. 40 % aller Milzzellen. Die Milzzellen wurden in die oberen Kammern eines Zweikammer-*transwell*-Systems eingebracht, die unteren Kammern enthielten je eine Verdünnungsreihe der XCL1-Fusionsproteine in einer Konzentration von 1 ng/ml - 1 000 ng/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1). Der Migrationsversuch wurde über einen Zeitraum von 2 h bei 37°C durchgeführt. Der Typ und die Anzahl der in die jeweilige untere Kammer migrierten Zellen wurde in der Durchflusszytometrie bestimmt. Die prozentuale Migration wurde aus dem Verhältnis der migrierten Zellen zu den in den oberen Kammern eingesetzten Zellen berechnet.

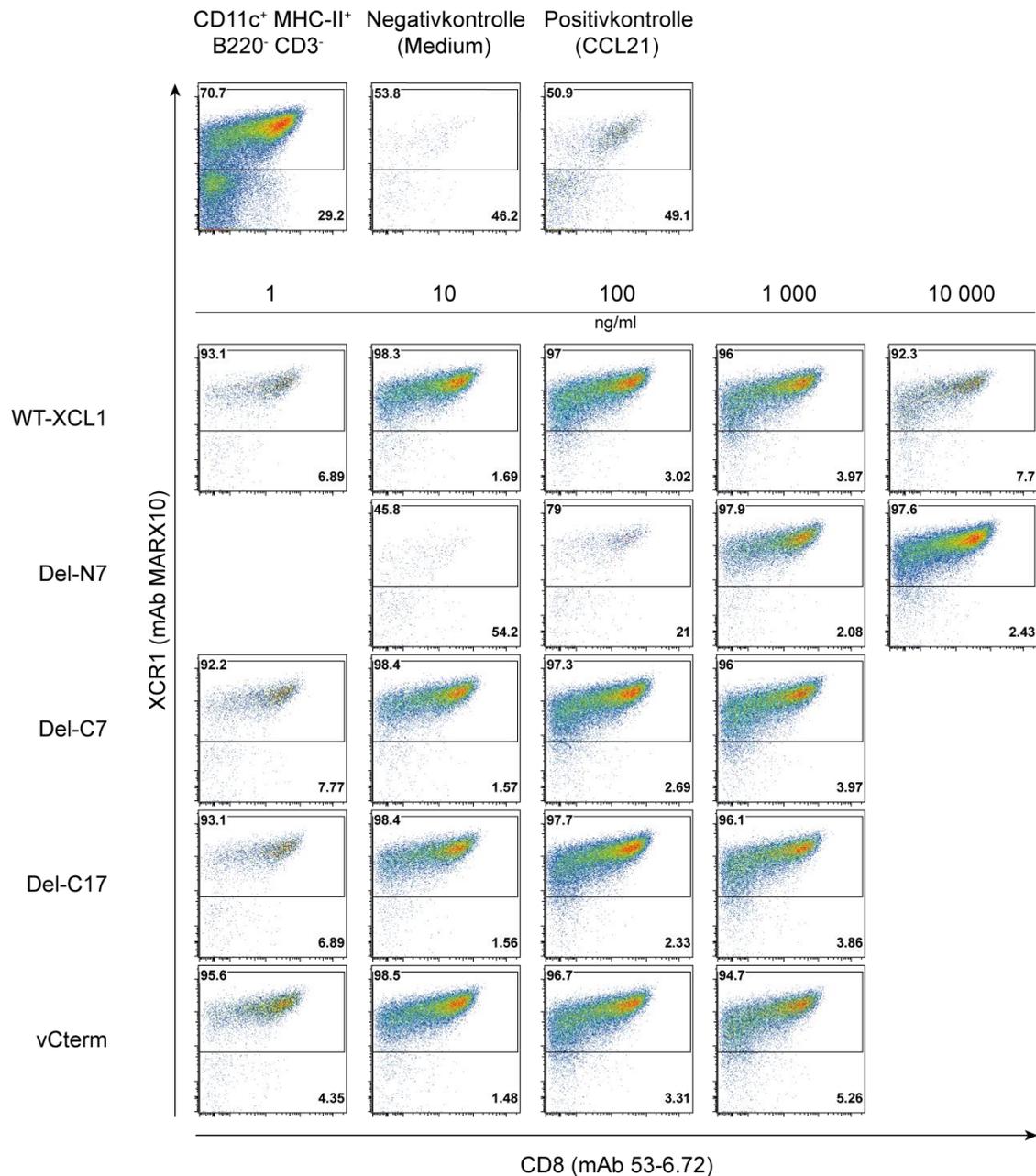


Abb. 19: Chemotaktische Wirkung der XCL1-Fusionsproteine auf XCR1⁺ DZ

Dendritische Zellen (definiert als CD3⁻ B220⁻ CD11c⁺ MCH II⁺) wurden mittels einer Dichtegradientenzentrifugation angereichert und die Migration zu verschiedenen Konzentrationen der XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1, Del-N7, Del-C7, Del-C17 und vCterm getestet. Die eingesetzte DZ-Population setzte sich aus ca. 70 % XCR1⁺ DZ und ca. 30 % XCR1⁻ DZ zusammen. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Chemokin, als Positivkontrolle diente das Chemokin CCL21 (500 ng/ml). Nach dem Migrationsversuch (2 h bei 37°C) wurde die Zahl und die Zusammensetzung der Zellpopulation in den unteren Kammern durchflusszytometrisch bestimmt. Da in allen Versuchen das gleiche (Gesamt-) Volumen der unteren Kammern untersucht wurde, ist die Anzahl der Punkte in den dargestellten *pseudo colour plots* repräsentativ für die Anzahl der migrierten Zellen in dem jeweiligen Versuchsansatz.

Bei der Negativkontrolle (Medium ohne Chemokin) wurde eine Migration von ca. 0,4 % der XCR1⁺ DZ, 1,1 % der SIRP α ⁺ DZ und 1,6 % der T- und B-Zellen beobachtet. Als Positivkontrolle diente das Chemokin CCL21 (500 ng/ml). Circa 5 % der XCR1⁺ DZ, 10 % der SIRP α ⁺ DZ, sowie 25 % der T- und B-Zellen (nicht gezeigt) migrierten durch die Membran in Richtung des CCL21 Gradienten, womit die Durchlässigkeit der Membran für verschiedene Zelltypen belegt wurde. Die Migration in Richtung der verschiedenen Konzentrationen der XCL1-Fusionsproteine wurde einzeln untersucht. WT-XCL1 löste bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 1 ng/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) eine schwache Migration (6,8 %) von XCR1⁺ DZ aus (siehe Abb. 20). Die Varianten Del-C7 und Del-C17 hatten eine ähnliche chemotaktische Wirkung, ca. 14 % der XCR1⁺ DZ migrierten bei gleicher Konzentration in Richtung der Variante vCterm. In höheren Konzentrationen lösten WT-XCL1, Del-C7, Del-C17 und vCterm konzentrationsabhängig jeweils eine ähnlich starke Migration aus, bei 100 ng/ml konnte eine maximale Migration von bis zu 58 % aller XCR1⁺ DZ beobachtet werden.

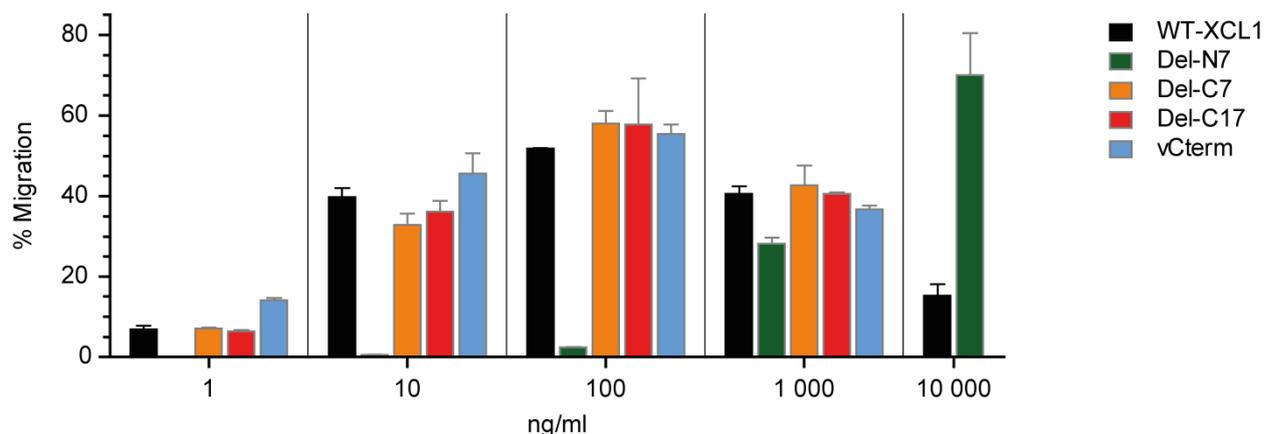


Abb. 20: Chemotaktische Wirkung der XCL1-Fusionsproteine auf XCR1⁺ DZ

Die XCL1-Fusionsproteine induzierten konzentrationsabhängig eine verschieden starke Chemotaxis der XCR1⁺ DZ, dargestellt ist die jeweilige prozentuale Migration der XCR1⁺ DZ berechnet auf die Anzahl der ursprünglich eingesetzten Zellen.

Bei einer Konzentration von 1 000 ng/ml und, soweit getestet bei 10 000 ng/ml, nahm die Chemotaxis der XCR1⁺ DZ in Richtung der XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1, Del-C7, Del-C17 und vCterm wieder ab. Diese vier XCL1-Fusionsproteine zeigten somit die für Chemokine typische glockenförmige Wirkungskurve, mit einem Optimum der Chemotaxis bei 100 ng/ml (siehe Abb. 20). Die chemotaktische Wirkung der Variante Del-N7 unterschied sich deutlich von den übrigen XCL1-Fusionsproteinen. Del-N7 induzierte bei Konzentrationen von 1-100 ng/ml kaum eine spezifische Chemotaxis XCR1⁺ DZ, erst bei 1 000 ng/ml war eine substantielle

Migration von ca. 30 % der XCR1⁺ DZ zu beobachten. Das Optimum der chemotaktischen Wirkung von Del-N7, mit einem maximalen Anteil von ca. 70 % migrierter XCR1⁺ DZ, wurde bei einer Konzentration von 10 000 ng/ml beobachtet, höhere Konzentrationen wurden nicht getestet. Weder Del-N7 noch die übrigen XCL1-Fusionsproteine übten eine spezifische chemotaktische Wirkung auf SIRPα⁺ DZ oder andere Milzzellen aus (nicht gezeigt), konzentrationsabhängig wurde eine Hintergrundmigration von je 1-5 % der SIRPα⁺ DZ und T- und B-Zellen beobachtet. Auch die maximale Konzentration von 10 000 ng/ml WT-XCL1 oder Del-N7 löste keine gesteigerte unspezifische Zellmigration aus.

Die Ergebnisse des Chemotaxisversuches zeigen, dass die XCL1-Fusionsproteine WT-XCL1, Del-C7, Del-C17 und vCterm eine spezifische, quantitativ vergleichbar starke Chemotaxis von XCR1⁺ DZ auslösen. Die Variante Del-N7 wirkt erst bei 100fach höherer Konzentration spezifisch chemotaktisch auf XCR1⁺ DZ, auch das Migrationsoptimum wird erst bei 100fach höherer Chemokin-Konzentration erreicht.

3.5 *In vivo targeting*

3.5.1 *In vivo targeting* von XCR1⁺ DZ – Induktion einer OT-I T-Zellproliferation nach adoptivem T-Zell Transfer

Targeting von Antigen beschreibt das gezielte Einschleusen von Antigen in definierte Zellen. Hartung et al. zeigten, dass an XCL1 gekoppeltes Antigen erfolgreich und hochspezifisch in kreuzpräsentierende XCR1⁺ DZ eingebracht werden kann und eine antigenspezifische CD8⁺ T-Zellproliferation und -aktivierung zur Folge hat [57]. In Mäusen wurde unter anderem demonstriert, dass ein OVA exprimierender Modelltumor mittels *targeting* von XCR1⁺ DZ mit XCL1-OVA hocheffektiv bekämpft werden kann [57].

In Zukunft soll das *targeting* von XCR1⁺ DZ mit Antigen im Menschen Anwendung finden, indem an XCL1 gekoppeltes erregere- oder tumorspezifisches Antigen im Sinne einer therapeutischen Vakzinierung verabreicht wird. Ein umfassendes Wissen über das verwendete Chemokin XCL1 ist im Kontext des *targeting* daher von wesentlicher Bedeutung.

Ziel dieser Experimentserie war es zu untersuchen, wie sich Modifikationen der N- und C-Termini von XCL1 auf das *targeting* von Antigen *in vivo* auswirken. Wie in 3.1.1 ausführlich abgehandelt, ist das Modellantigen OVA C-terminal an XCL1 gekoppelt und Bestandteil jedes der generierten XCL1-Fusionsproteine. Durch Messung der spezifischen T-Zellproliferation nach Immunisierung der Mäuse mit den XCL1-Fusionproteinen wurde bestimmt, ob die XCL1-

Fusionsproteine an XCR1⁺ DZ gebunden haben, das Antigen OVA von den DZ aufgenommen, prozessiert und auf deren Oberfläche im Kontext von MHC I präsentiert wurde. Dazu wurden transgene CD8⁺ OT-I T-Zellen, welche mit ihrem T-Zell-Rezeptor das OVA-spezifische Peptid SIINFEKL im Kontext des MHC I erkennen, isoliert, mit dem Farbstoff CFSE markiert und adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert. Einen Tag später wurden die Mäuse jeweils mit verschiedenen Mengen der XCL1-Fusionsproteine immunisiert. Als Negativkontrolle wurde PBS injiziert. Zwei Tage nach der Immunisierung wurde die Proliferation der OT-I T-Zellen anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt (siehe Abb. 21).

Durchschnittlich 6 % der OT-I T-Zellen der PBS-Kontrollmäuse proliferierten ohne einen spezifischen Stimulus (Hintergrundproliferation). Die Immunisierung mit 0,1 µg WT-XCL1 (berechnet auf den Massenanteil von OVA) induzierte eine Proliferation von durchschnittlich ca. 36 % der OT-I T-Zellen. Bei Steigerung der eingesetzten Menge auf 0,3 µg proliferierten ca. 76 %, nach Applikation von 1 µg mehr als 93 % der OT-I T-Zellen. Dagegen löste das XCL1-Fusionsprotein Del-N7 nur eine schwache T-Zellproliferation aus, mengenabhängig steigerte sich die Proliferationsrate nur geringfügig von durchschnittlich ca. 9 % auf maximal 19 %. Eine Immunisierung mit dem XCL1-Fusionsprotein Del-C7 führte bei gleichen Mengen von OVA jeweils zu einer mit WT-XCL1 vergleichbaren OT-I T-Zellproliferation. Eine Injektion von 0,1 µg bzw. 0,3 µg vCterm führte zur einer Proliferation von durchschnittlich ca. 28 % bzw. 62 % der OT-I T-Zellen, d.h. zu einer durchschnittlich ca. 8 % bzw. 14 % geringeren Proliferationsrate als WT-XCL1. Der Anteil proliferierter OT-I T-Zellen bei der maximal verwendeten Menge von 1 µg vCterm war mit ca. 90 % nur um ca. 3 % schwächer als bei WT-XCL1. Interessanterweise löste eine Immunisierung mit Del-C17 bei allen eingesetzten Konzentrationen eine stärkere OT-I T-Zellproliferation aus als alle übrigen XCL1-Fusionsproteine. Bei einer Menge von 0,1 µg lag der Anteil proliferierter OT-I T-Zellen bereits bei durchschnittlich ca. 59 %, bei 0,3 µg proliferierten ca. 86 % der OT-I T-Zellen, bei 1 µg ca. 96 %.

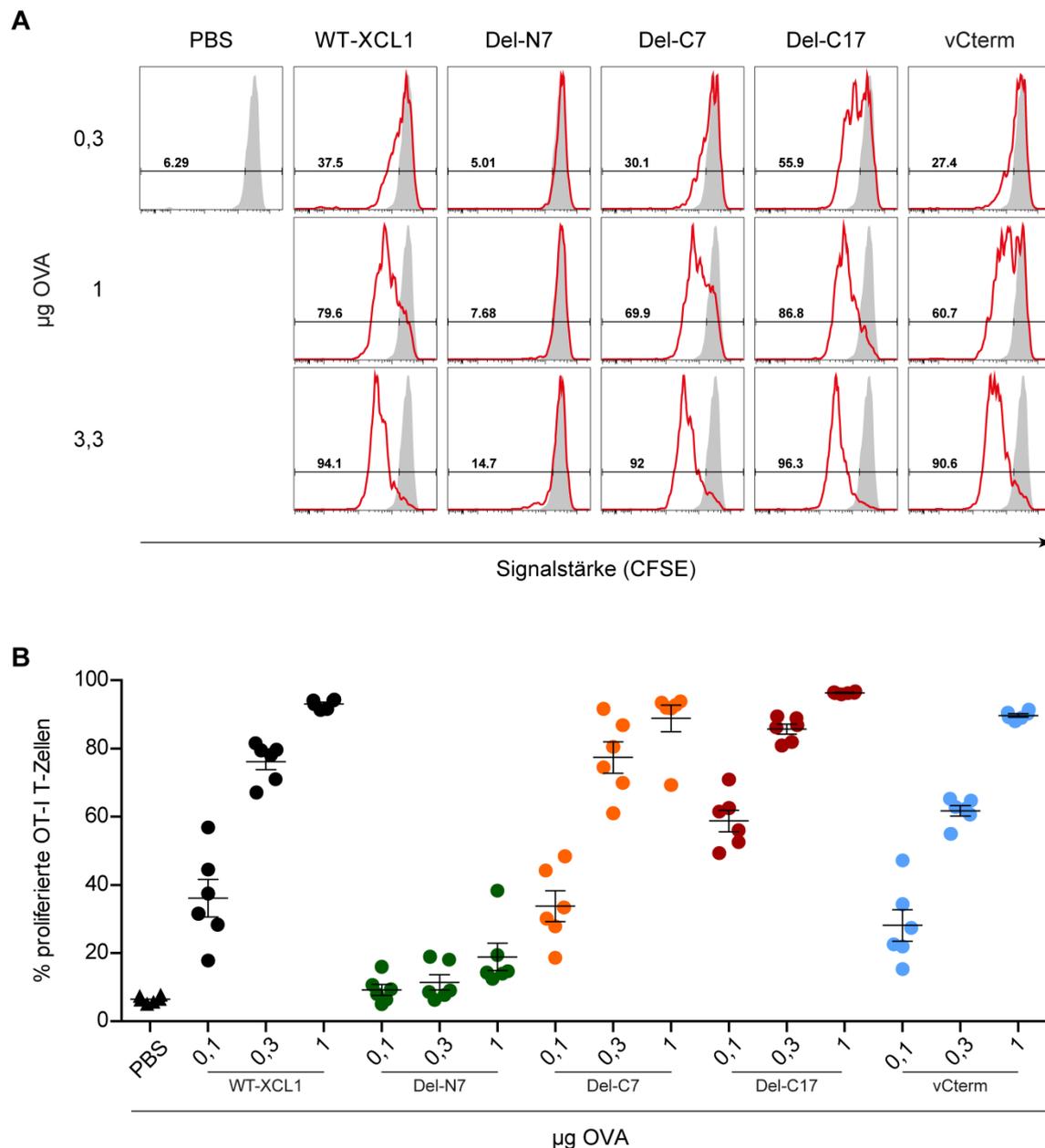


Abb. 21: Proliferation von SIINFEKL-spezifischen CD8⁺ OT-I T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen XCL1-Fusionsproteinen

Es wurden 1×10^6 OT-I T-Zellen mit CFSE markiert und adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert. Einen Tag später wurden die Tiere mit den angegebenen Mengen der XCL1-Fusionsproteine immunisiert, als Negativkontrolle wurde PBS injiziert. Zwei Tage nach der Immunisierung wurden Milzzellen isoliert und die OT-I T-Zellproliferation anhand der Abnahme des CFSE-Signals bestimmt. A) Repäsentative Histogramme der OT-I T-Zellen nach Immunisierung mit 0,3 µg der jeweiligen XCL1-Fusionsproteine (kalkuliert auf den Massenanteil von OVA), das CFSE-Signal ist in rot dargestellt, das Signal der PBS Kontrollgruppe ist als Hintergrund (grau) eingefügt. B) Prozentualer Anteil der proliferierten OT-I T-Zellen (CFSE^{niedrig}) in Bezug auf die Gesamtzahl injizierter OT-I T-Zellen. Dargestellt sind vereinte Daten aus zwei unabhängigen, unter gleichen Bedingungen durchgeführten Experimenten.

3.5.2 *In vivo targeting* von XCR1⁺ DZ – Induktion einer endogenen zytotoxischen T-Zellantwort

Der OT-I T-Zell-Proliferationsversuch zeigte, dass das *targeting* von XCR1⁺ kreuzpräsentierenden DZ mit den fünf XCL1-Fusionsproteinen unterschiedlich starke OT-I T-Zellproliferation auslöst. Allerdings erlaubt das Experiment keine Aussage über die zytotoxischen Eigenschaften der CD8⁺ T-Zellen. Hartung et al. demonstrierten, dass das *targeting* von murinen XCR1⁺ kreuzpräsentierenden DZ mit XCL1-OVA bei adjuvanter Gabe von LPS eine potente, gegen OVA gerichtete endogene CD8⁺ T-Zell Zytotoxizität hervorruft [57].

Ziel der Experimentserie war es zu überprüfen, ob sich die XCL1-Fusionsproteine in ihrem Potenzial, eine endogene zytotoxische Immunantwort gegen antigentragende Zellen auszulösen, unterscheiden. Dazu wurden naive C57BL/6 Mäuse ohne vorherigen adoptiven T-Zell Transfer jeweils mit 0,3 µg, 1 µg und 3,3 µg der XCL1-Fusionsproteine (berechnet auf den Massenanteil von OVA) immunisiert. Als Adjuvans wurde LPS verwendet. Sechs Tage später wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurden Milzzellen mit dem OVA-Peptid SIINFEKL beladen und mit einer hohen Konzentration CFSE markiert (CFSE^{hoch}). Eine gleiche Zahl nicht SIINFEKL-beladener Milzzellen wurde mit einer geringen Konzentration CFSE markiert (CFSE^{niedrig}). Allen Mäusen wurden die CFSE^{hoch} und CFSE^{niedrig} Zellen im Verhältnis 1:1 i.v. injiziert. Am darauffolgenden Tag wurden die Mäuse getötet und das Verhältnis der noch vorhandenen CFSE^{hoch} zu CFSE^{niedrig} Zellen bestimmt. Aus dem Vergleich mit der ursprünglich eingesetzten Zahl CFSE^{hoch} und CFSE^{niedrig} Zellen ließ sich auf die Stärke der zytotoxischen T-Zell-Reaktion gegen SIINFEKL-tragende Zellen (CFSE^{hoch}) schließen.

Die Immunisierung der Mäuse mit der geringsten eingesetzten Menge von 0,3 µg WT-XCL1, Del-C7 oder Del-C17 (kalkuliert auf den Massenanteil von OVA) induzierte jeweils eine hohe Zytotoxizität, je ca. 60 % der antigentragenden Zellen wurden lysiert. Die Variante vCterm löste vergleichsweise eine geringere zytotoxische Aktivität aus (ca. 44 % spezifische Lyse). In starkem Kontrast zu den übrigen Varianten löste Del-N7 nur eine sehr schwache zytotoxische Antwort aus (ca. 11 % spezifische Lyse). Die Steigerung der eingesetzten Menge der Fusionsproteine WT-XCL1, Del-C7, Del-C17 und vCterm auf 1 µg erhöhte den prozentualen Anteil der lysierten Zielzellen, die stärkste Zytotoxizität wurde durch die Variante Del-C17 ausgelöst (92 % spezifische Lyse), während die Zunahme der durch Del-C7 induzierten Zytotoxizität im Vergleich am schwächsten ausfiel (ca. 62 % spezifische Lyse). Die Variante Del-N7 induzierte trotz Konzentrationserhöhung keine verstärkte zytotoxische Reaktion.

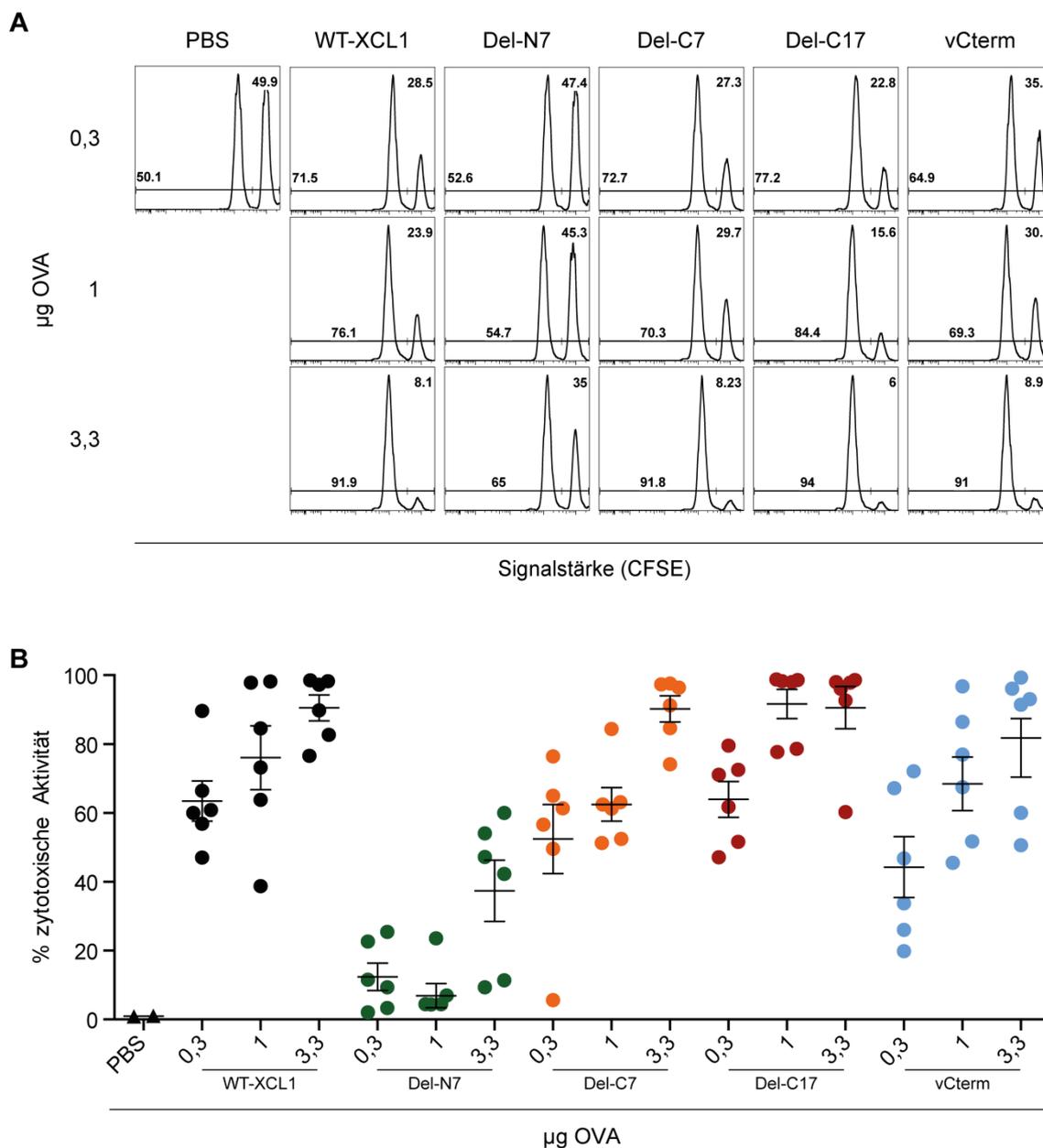


Abb. 22: Endogene zytotoxische T-Zell-Antwort nach Immunisierung mit den XCL1-Fusionsproteinen

Naive C57BL/6 Mäuse wurden i.v. mit den dargestellten Mengen der hergestellten XCL1-Fusionsproteine (kalkuliert auf den Massenanteil von OVA) zusammen mit 3 µg LPS immunisiert. An Tag 6 wurde ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurden CFSE markierte Zielzellen i.v. injiziert, anhand derer die zytotoxische T-Zell Reaktion quantifiziert werden konnte. A) Repräsentative Histogramme zeigen das Verhältnis von verbliebenen CFSE^{hoch} zu CFSE^{niedrig} Zielzellen. B) Prozentuale spezifische Lyse von Zielzellen bzw. spezifische zytotoxische Aktivität nach Immunisierung mit den XCL1-Fusionproteinen. Gezeigt sind vereinte Daten aus zwei unter gleichen Bedingungen durchgeführten Experimenten.

Nach Immunisierung der Mäuse mit der maximalen Menge von 3,3 µg WT-XCL1, Del-C7 und Del-C17 wurde eine vergleichbar starke zytotoxische Reaktion mit ca. 91 % lysierten antigenträgenden Zellen beobachtet. In vier von sechs mit 3,3 µg vCterm immunisierten Tieren

konnte ebenfalls ein Anteil lysierter Zellen von über 90 % beobachtet werden, im Durchschnitt zeigte sich eine etwas schwächere zytotoxische Aktivität (ca. 79 % spezifische Lyse). Del-N7 induzierte nach Injektion von 3,3 µg eine deutliche zytotoxische Aktivität (ca. 37 % spezifische Lyse), die jedoch im Vergleich mit den übrigen XCL1-Fusionsproteinen weniger als halb so stark war.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass Immunisierung mit WT-XCL1, Del-C7, Del-C17 und vCterm mengenabhängig eine starke zytotoxische T-Zellreaktion auslöst. Del-C17 besitzt im Vergleich die höchste Potenz der XCL1-Fusionsproteine, eine Zytotoxizität zu induzieren. Verglichen mit dem WT-XCL1 löst Variante vCterm in allen eingesetzten Mengen insgesamt eine etwas abgeschwächte zytotoxische T-Zellreaktion aus. Variante Del-N7 ist grundsätzlich ebenfalls in der Lage, eine zytotoxische Aktivität auszulösen, allerdings erst bei hohen eingesetzten Mengen.

3.5.3 Bindung der XCL1-Fusionsproteine an sterbende P3X Zellen und murine Milzzellen

Neben den bislang bekannten Funktionen stellt das Chemokin XCL1 vermutlich ein Brückenmolekül zwischen sterbenden bzw. toten Zellen und kreuzpräsentierenden DZ dar. XCL1 bindet außer an den spezifischen Rezeptor XCR1 rezeptorunabhängig an nekrotische murine Milzzellen [49]. XCR1⁺ DZ sind darauf spezialisiert, u.a. zellassoziertes Antigen aufzunehmen und auf MHC I zu präsentieren [21]. Die Bindung von XCL1, auch als „Dekorierung“ bezeichnet, resultiert in einer verstärkten Aufnahme der nekrotischen Zellen durch kreuzpräsentierende XCR1⁺ DZ und Kreuzpräsentation der zellulären Antigene [49].

Über die Beteiligung des N- und C-Terminus von XCL1 am Mechanismus der Bindung an sterbende Zellen war bisher nichts bekannt. Um eventuelle Unterschiede der Bindungsfähigkeit zwischen den XCL1-Fusionsproteinen zu untersuchen, wurde eine Experimentserie mit P3X Myelomzellen und murinen Milzzellen in verschiedenen Stadien des Zelltodes durchgeführt.

Ein Teil der Zellen wurde mit Hitzeschock (52°C für 15 min) behandelt, und alle Zellen für 18 h bei 37 °C inkubiert. Eine Stunde vor Analyse wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der XCL1-Fusionsproteine inkubiert. Zur Differenzierung der unterschiedlichen Zelltodstadien wurde ein Annexin V/DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) Färbesystem etabliert (siehe 2.6.4). Dadurch wurde eine durchflusszytometrische Unterscheidung der Zellen ermöglicht: Lebende Zellen stellen sich Annexin V⁻ DAPI⁻ dar, apoptotische Zellen Annexin V⁺ DAPI⁻, nekrotische Zellen Annexin V⁺ DAPI⁺ und tote Zellen Annexin V⁻ DAPI⁺ [51].

Der Nachweis der XCL1-Fusionsproteine erfolgte mit dem gegen den Strep-tag[®] gerichteten Antikörper StrepMAB-Immo Oyster 645.

Ohne Hitzeschock inkubierte P3X Zellen ließen sich in vier Zellpopulationen unterscheiden: 63 % lebende, 19 % apoptotische, 6 % nekrotische und 5 % tote Zellen (siehe Abb. 23 A, B). Bei einer eingesetzten Konzentration von 1 µg/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) haben alle fünf XCL1-Fusionsproteine an apoptotische und nekrotische P3X Zellen gebunden. Abhängig vom verwendeten XCL1-Fusionsprotein wurde auf ca. 83 - 90 % der apoptotischen und auf 38 - 51 % der nekrotischen Zellen gebundenes XCL1-Fusionsprotein detektiert. Bei Analyse der Bindung an nekrotische Zellen zeigte sich eine Zellpopulation, an die die XCL1-Fusionsproteine nur sehr schwach gebunden haben sowie eine zweite, an die die XCL1-Fusionsproteine stark gebunden haben. Im Vergleich zu den nekrotischen Zellen war das auf apoptotischen Zellen gemessene Signal deutlich stärker (1,5-fach vCterm bis 1,7-fach Del-C17). Auf einem geringen Prozentsatz lebender und toter Zellen war eine schwache Bindung der XCL1-Fusionsproteine nachweisbar. Eine Konzentrationserhöhung der verwendeten XCL1-Fusionsproteine auf 5 µg/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) führte zu insgesamt vergleichbaren Ergebnissen (nicht gezeigt).

Einem Hitzeschock exponierte P3X Zellen ließen sich mithilfe der Annexin V/DAPI Färbung in zwei Zellpopulationen unterteilen: 48 % apoptotische und 51 % nekrotische Zellen. Lebende oder tote Zellen waren nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 23 C). Alle fünf XCL1-Fusionsproteine haben bei den eingesetzten Konzentrationen von 1 µg/ml (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) bzw. 5 µg/ml (nicht gezeigt) gleichermaßen an mehr als 90 % der nekrotischen und apoptotischen P3X Zellen gebunden (siehe Abb. 23 D). Die Intensität des auf nekrotischen Zellen detektierten Signals war stärker als das auf apoptotischen Zellen gemessene Signal.

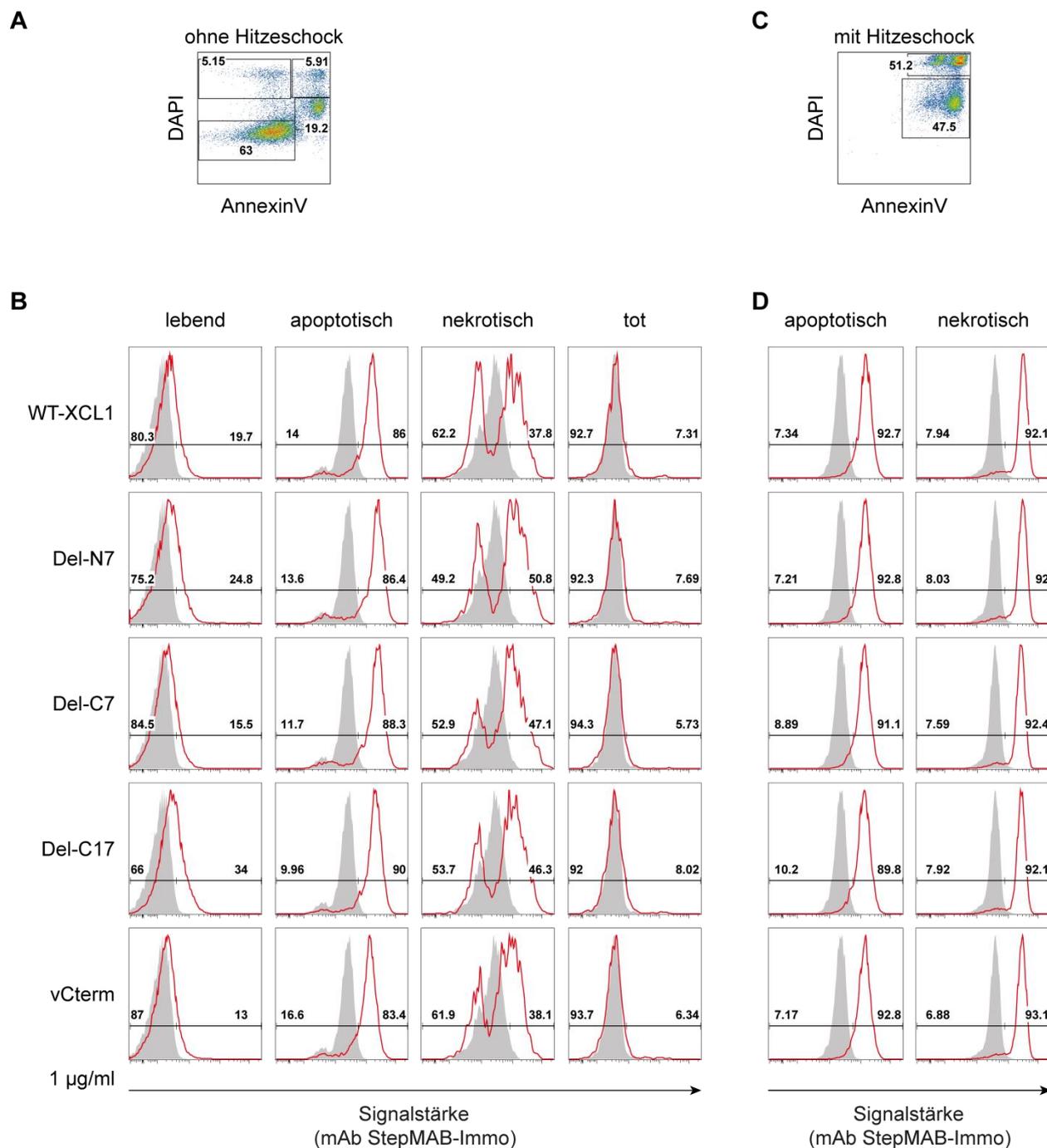


Abb. 23: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an P3X Myelomzellen

P3X Myelomzellen wurden (A, B) ohne Hitzeschock für 18 h bei 37 °C kultiviert bzw. (C, D) einem Hitzeschock (52 °C für 15 min) exponiert und anschließend für 18 h bei 37°C kultiviert. Eine Stunde vor Analyse wurde je 1 µg/ml XCL1-Fusionsprotein (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) hinzugefügt. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte durchflusszytometrisch mit dem Anti-Strep-tag® Antikörper StrepMAB-Immo Oyster-645. A, C) Eine Annexin V Färbung erlaubt die Diskriminierung in: lebende (Annexin V⁻ DAPI⁻), apoptotische (Annexin V⁺ DAPI⁻), nekrotische (Annexin V⁺ DAPI⁺) und tote Zellen (Annexin V⁻ DAPI⁺). B, D) Repräsentative Histogramme: Das Signal der gebundenen XCL1-Fusionsproteine ist in rot dargestellt, der Hintergrund (grau) zeigt das Signal der P3X Zellen, die nicht mit XCL1-Fusionsprotein inkubiert wurden.

Nachdem diese erste Experimenteserie zeigte, dass die fünf XCL1-Fusionsproteine vorrangig an apoptotische und nekrotische P3X Zellen binden, wurde die Bindungsfähigkeit der XCL1-Fusionsproteine an primäre murine Milzzellen in verschiedenen Stadien des Zelltodes getestet. Dazu wurden die gleichen Versuchsansätze wie für die P3X Zellen verfolgt.

Die nicht mit einem Hitzeschock vorbehandelten Milzzellen ließen sich in vier Zellpopulationen unterscheiden: 54 % lebende, 29 % apoptotische, 8 % nekrotische und 4 % tote Zellen (siehe Abb. 24 A).

Bei einer eingesetzten Konzentration von 2 µg/ml XCL1-Fusionsprotein (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) ließen sich auf 39 - 47 % der nekrotischen Zellen die jeweiligen XCL1-Fusionsproteine nachweisen. Die gemessene Signalintensität der fünf XCL1-Fusionsproteine war vergleichbar. Dies bedeutet, dass die XCL1-Fusionsproteine ähnlich stark gebunden haben. Eine Verringerung oder Erhöhung der eingesetzten XCL1-Fusionsproteinkonzentration auf 1 µg/ml bzw. 5 µg/ml führte jeweils zu einem verminderten bzw. vergrößerten prozentualen Anteil der Zellen, an die die XCL1-Fusionsproteine gebunden haben (nicht gezeigt). Auf lebenden, apoptotischen und toten Milzzellen zeigte sich nur bei einem geringen Prozentsatz der Zellen eine schwache Bindung der XCL1-Fusionsproteine (siehe Abb. 24 B).

Die einem Hitzeschock exponierten Milzzellen konnten mithilfe des Annexin V/DAPI-Färbeschemas in nur zwei Zellpopulationen unterschieden werden: 48 % apoptotische und 51 % nekrotische Zellen. Lebende oder tote Zellen waren nicht mehr vorhanden (siehe Abb. 24 C).

Alle fünf XCL1-Fusionsproteine waren auf jeweils ca. 15 - 17 % der nekrotischen Milzzellen nachweisbar (siehe Abb. 24 D). Die gemessene Signalintensität der jeweiligen XCL1-Fusionsproteine war untereinander vergleichbar. An apoptotische Zellen haben die XCL1-Fusionsproteine kaum gebunden.

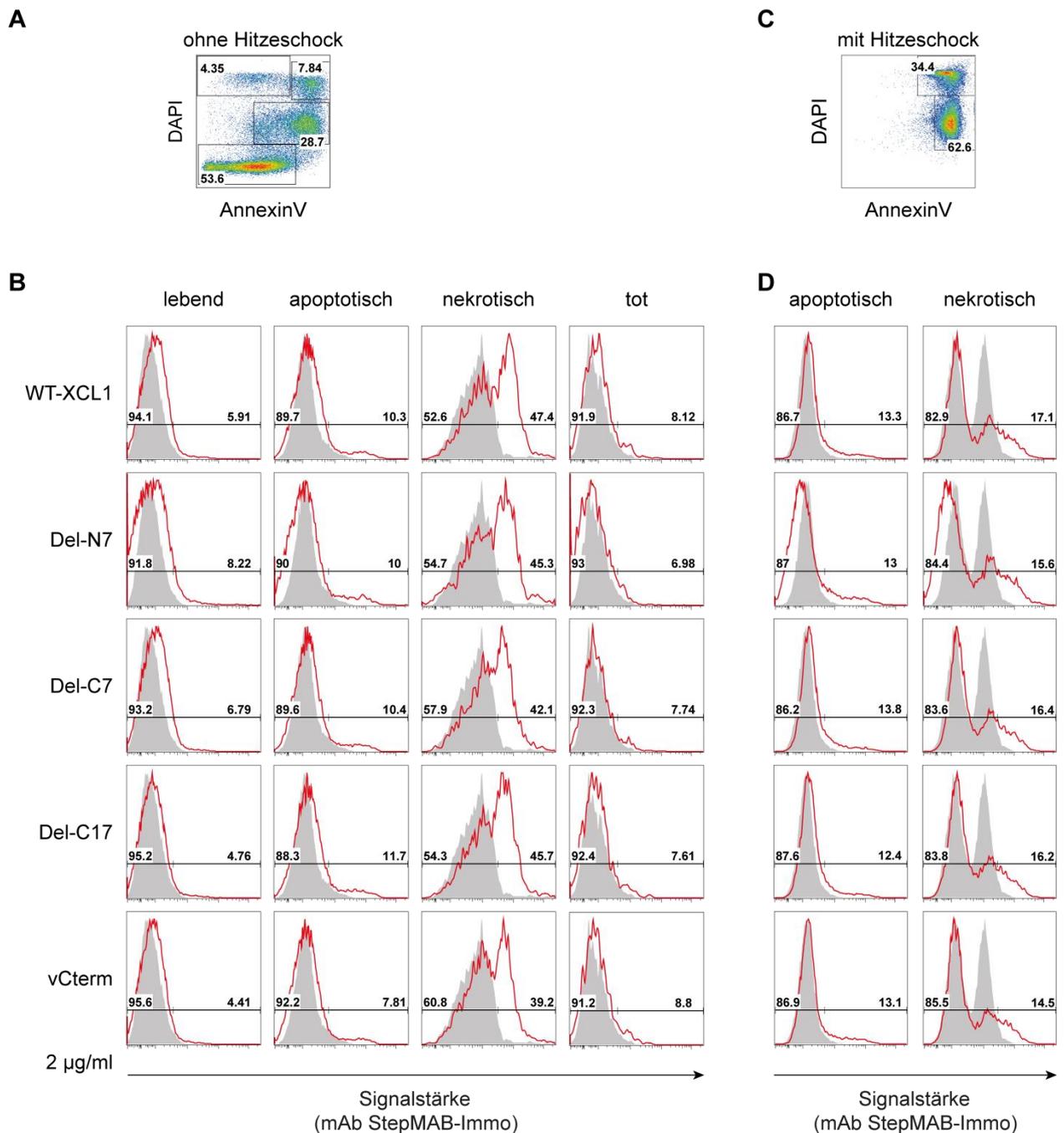


Abb. 24: Bindung der XCL1-Fusionsproteine an primäre murine Milzzellen

Primäre murine Milzzellen wurden (A, B) ohne Hitzeschock für 18 h bei 37 °C kultiviert bzw. (C, D) einem Hitzeschock (52 °C für 15 min) exponiert und anschließend für 18 h bei 37°C kultiviert. Eine Stunde vor Analyse wurde je 2 $\mu\text{g/ml}$ XCL1-Fusionsprotein (berechnet auf den Massenanteil von XCL1) hinzugefügt. Die Detektion der XCL1-Fusionsproteine erfolgte durchflusszytometrisch mit dem Anti-Strep-tag® Antikörper StrepMAB-Immo Oyster-645. A, C) Eine Annexin V Färbung erlaubt die Diskriminierung in: lebende (Annexin V⁻ DAPI⁻), apoptotische (Annexin V⁺ DAPI⁻), nekrotische (Annexin V⁺ DAPI⁺) und tote Zellen (Annexin V⁻ DAPI⁺). B, D) Repräsentative Histogramme: Das Signal der gebundenen XCL1-Fusionsproteine ist in rot dargestellt, der Hintergrund (grau) zeigt das Signal der Milzzellen, die nicht mit XCL1-Fusionsprotein inkubiert wurden.

Insgesamt stellte sich die Färbung der XCL1-Fusionsproteine auf sterbenden Milzzellen mit dem AK StrepMAB-Immo Oyster 645 problematisch dar: Die gemessenen Signalstärken variierten zwischen den mehrfach durchgeführten Experimenten trotz gleicher Methodik z.T. erheblich. Allerdings entsprachen alle Messungen zumindest tendenziell den in der Abbildung exemplarisch dargestellten Ergebnissen (siehe 4.5).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass alle fünf XCL1-Fusionsproteine an apoptotische und nekrotische P3X Zellen, sowie nekrotische Splenozyten binden. Die Bindungseigenschaften der fünf XCL1-Fusionsproteine an diese Zellen unterscheiden sich nicht wesentlich voneinander. Eine Verkürzung bzw. Modifikation des N- bzw. C-Terminus hat dementsprechend keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaften der XCL1-Fusionsproteine an apoptotische bzw. nekrotische Zellen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde erstmals eine umfassende Struktur-Funktionsanalyse des Chemokins XCL1 im Zusammenspiel mit murinen XCR1⁺ DZ durchgeführt. Ergebnisse der Untersuchung geben Aufschluss über die funktionelle Rolle des N- sowie C-Terminus von XCL1, erlauben eine neue Einordnung bisheriger struktureller Erkenntnisse und Theorien und ermöglichen einen zuverlässigen Vergleich zu Struktur- Funktionsuntersuchungen anderer Chemokine. Neben dem Gewinn an Grundlagenkenntnissen sind die Ergebnisse dieser Arbeit von praktischer Relevanz, da XCL1 zukünftig als Vektor zur Induktion zellulärer Immunität im Rahmen der Entwicklung einer neuartigen Vakzine verwendet werden soll. Basierend auf den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen können strukturelle Modifikationen zur Optimierung des Vektorsystems XCL1 vorgenommen werden.

4.1 Design und Expression der XCL1-Fusionsproteine

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die DNA-Sequenzen der XCL1-Fusionsproteine entworfen, die DNA rekombinant mit molekularbiologischen Methoden hergestellt und die XCL1-Fusionsproteine in eukaryonten Zellen exprimiert. Die Modifikation der XCL1-AS Sequenz wurde auf Grundlage von NMR-Studien vorgenommen, welche die AS 1-9 als N-Terminus und die AS 73-93 als C-Terminus identifizierten [22]. Die N-terminale Deletionsvariante Del-N7 wurde lediglich um 7 AS verkürzt (XCL1 8-93) um sicherzustellen, dass sich die Verkürzung ausschließlich auf den N-Terminus auswirkt. Zur Generierung der C-terminalen Deletionsvarianten Del-C7 und Del-C17 wurde der C-Terminus von XCL1 um 7 AS (XCL1 1-86) bzw. 17 AS (XCL1 1-76) verkürzt. An beide XCL1-Varianten wurde jeweils ein 10 AS langer *linker* (GGGS)₂ bestehend aus Glycin und Serin angefügt. Glycin-Serin-*linker* (GS-*linker*) dienen als Verbindungsstücke in Fusionsproteinen und gewährleisten die Trennung funktioneller Proteindomänen [84]. Der verwendete GS-*linker* verbindet den XCL1-Abschnitt von Del-C7 bzw. Del-C17 mit OVA. Durch Einsatz des GS-*linkers* sollte eine Interaktion der durch Deletion des C-Terminus räumlich näher aneinander gerückten XCL1-Kerndomäne und des gekoppelten OVA-Proteins verhindert werden. Der GS-*linker* besitzt in diesem Kontext verschiedene vorteilhafte Eigenschaften: Aufgrund fehlender Seitenketten von Glycin zeichnet er sich durch eine hohe Rotations-Flexibilität zwischen den verbundenen Proteinen aus. Serin besitzt einen polaren Rest, was eine gute Löslichkeit des *linkers* bedingt [85]. In wässrigen Lösungen werden Wasserstoffbrücken mit umgebenden Wassermolekülen gebildet, was die

Stabilität des *linkers* erhöht und unerwünschte Interaktionen zwischen *GS-linker* und dem gekoppelten Protein OVA minimiert [84]. Aufgrund dieser Charakteristika konnte man davon ausgehen, dass der *GS-linker* keinen verfälschenden Einfluss auf strukturelle oder funktionelle Eigenschaften der XCL1-Fusionsproteine Del-C7 und Del-C17 hatte.

Zur Expression der XCL1-Fusionsproteine wurde die DNA sowohl in den *Drosophila*-Expressionsvektor pRmHa-3 MT, als auch in den *HEK*-Zell-Expressionsvektor pEX kloniert. *HEK*-Zellen zeichnen sich normalerweise u.a. durch eine unkomplizierte Handhabung, schnelle Reproduktion sowie effiziente Transfektion und Protein-Produktion aus [86]. Die Expression der XCL1-Fusionsproteine in *HEK*-Zellen ist jedoch trotz mehrfacher Versuche in dieser Arbeit nicht gelungen, ohne dass eine Ursache eruiert werden konnte. Im Labor konnte auch natives XCL1 ohne OVA-Protein und Strep-tag[®] nicht in *HEK*-Zellen exprimiert werden (unveröffentlichte Daten).

Nach Aufreinigung der in *Drosophila* SL-3 Zellen exprimierten XCL1-Fusionsproteine wurden diese zur Kontrolle der Reinheit und des Molekulargewichts im SDS-PAGE aufgetrennt. Die Variante vCterm zeigte ein doppelbandiges Laufmuster, während die Proteinbanden von WT-XCL1, Del-N7, Del-C7 und Del-C17 homogen erschienen. Das virale Chemokin vXCL1 besitzt in verschiedenen Proteinabschnitten starke N- und O-Glykosylierungen [60]. Vermutlich weist entsprechend auch die XCL1-Variante vCterm, deren C-Terminus dem vXCL1 C-Terminus entspricht, unterschiedlich starke Glykosylierungen auf. Diese würden das erhöhte Molekulargewicht und die daraus resultierende Protein-Doppelbande erklären.

4.2 Die funktionelle Rolle des N-Terminus von XCL1

Der N-Terminus von Chemokinen ist dem aktuellen Stand der Forschung zufolge wesentlich an der Rezeptorbindung und Signalvermittlung beteiligt [3]. Studien an unterschiedlichen Chemokinen zeigten, dass Deletion oder Modifikation des N-Terminus zu veränderten Chemokin-Eigenschaften führen kann: Die Rezeptorbindungseigenschaften können sich bezüglich Rezeptoraffinität und/oder -spezifität vom nativen Chemokin unterscheiden, auch die Fähigkeit der Rezeptoraktivierung und Signaltransduktion durch den Rezeptor kann durch N-terminale Veränderungen des Chemokins beeinflusst werden [3].

Für XCL1 wurden bisher nur wenige Struktur-Funktionsanalysen publiziert. Diese kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Bedeutung der Länge und AS-Sequenz des N-Terminus für Rezeptorbindung und -aktivierung.

Dorner *et al.* nahmen an, dass eine N-terminal um die erste AS verkürzte XCL1-Variante funktionell intakt sei [17]. Auch Hedrik *et al.* postulierten, dass der N-Terminus von XCL1 veränderbar sei, ohne dass es zu einer funktionellen Alteration des Chemokins komme [23]. Allerdings wurde die Interaktion von XCL1-Varianten mit Zelltypen untersucht, die, wie erst später gezeigt werden konnte, den XCR1-Rezeptor nicht aufweisen und an die XCL1 nicht bindet [39]. Die Ergebnisse der genannten und weiterer Studien über XCL1, wie von Kelner *et al.* [14] und Kennedy *et al.* [15], müssen daher sehr kritisch bewertet werden. Die erhobenen Ergebnisse dürfen z.T. nicht in die Analyse der Struktur-Funktionsbeziehungen von XCL1 einbezogen werden, da sie nach heutigem Kenntnisstand nicht korrekt sind [20], [80].

Valide Struktur-Funktionsanalysen von (humanem) XCL1 wurden von Tuinstra *et al.* durchgeführt: Verschiedene XCL1-Strukturvarianten wurden an XCR1-transfizierten HEK-Zellen untersucht. Die Bindung von XCL1 an XCR1 und die Rezeptoraktivierung wurden durch Analyse intrazellulären Kalzium-Einstroms gemessen. Unverändertes XCL1 löste einen Kalzium-Einstrom aus, N-terminal verkürztes (2-93 XCL1), verlängertes (+1-93 XCL1), oder in der AS-Sequenz verändertes XCL1 zeigte keine Wirkung. Tuinstra *et al.* postulierten, dass die Integrität des N-Terminus von XCL1 essenziell für Rezeptoraktivierung und Funktion von XCL1 ist [24].

In dieser Arbeit ist erstmals *in vitro* und *in vivo* eine Struktur-Funktionsanalyse des Chemokins XCL1 im Zusammenwirken mit nativen, den Rezeptor XCR1 tragenden DZ gelungen. Des Weiteren konnte, anders als in bisherigen Struktur- Funktionsuntersuchungen, eine hochspezifische Methode zum Nachweis der XCL1-XCR1 Interaktion angewendet werden. Der Einsatz des anti-XCR1 AK MARX10 erlaubte eine exakte Identifizierung der XCR1⁺ Zellen [57]. Die gebundenen XCL1-Fusionsproteine konnten mit einem anti-Strep-tag[®] AK präzise detektiert werden.

Es zeigte sich, dass alle fünf XCL1-Fusionsproteine spezifisch an XCR1⁺ DZ binden, sich aber abhängig von ihrer Struktur erheblich in ihrer Bindungsstärke bzw. -affinität zu XCR1 unterscheiden. Eine Verkürzung des N-Terminus um sieben AS resultierte in einer massiv (ca. 50 fach) verminderten Rezeptorbindung. Es kann geschlussfolgert werden, dass der N-Terminus

von XCL1 maßgeblich für die Bindung an XCR1 sowie die Stabilisierung der Rezeptor-Ligand-Interaktion verantwortlich ist [87].

Die gestörte Rezeptorbindung der XCL1-Variante Del-N7 ließ sich durch Konzentrationserhöhung teilweise kompensieren, ohne die Rezeptorspezifität zu verändern. Folglich müssen weitere, vom N-Terminus unabhängige Abschnitte von XCL1 mit XCR1 interagieren [87]. Dem zweistufigen Modell der Chemokin-Rezeptor-Interaktion zufolge könnte es sich z.B. um XCL1-Kerndomänen handeln, die an extrazelluläre Schleifen von XCR1 binden.

Für einzelne Chemokine anderer Chemokinfamilien konnten präzise Ligand-Rezeptor-Interaktionsmechanismen beschrieben und diverse an der Bindung beteiligte Chemokindomänen identifiziert werden. Beispielsweise sind AS-Reste der N-Schleife, 3₁₀ Helix und 40s Schleife der Chemokine CCL2 und CCL4 in die Rezeptorbindung involviert und stellen möglicherweise die primären Kontaktstellen für den zugehörigen Rezeptor dar [88], [7]. Bei den Chemokinen CCL2 und CXCL10 stellen Schleifen zwischen den β -Faltblättern Kontaktstellen für den entsprechenden Rezeptor dar und tragen zur Rezeptor-Ligand-Interaktion bei [89], [90].

Für XCL1 existieren bislang keine vergleichbaren Erkenntnisse, allerdings teilen alle Chemokine eine stark konservierte Tertiärstruktur [3]. Es ist also prinzipiell denkbar, dass korrespondierende Chemokinabschnitte von XCL1 für Interaktionen mit XCR1 verantwortlich sind. Basierend auf NMR Untersuchungen wird für XCL1 vermutet, dass die vom N-Terminus entkoppelte 30s Schleife zur Interaktion mit XCR1 beiträgt. Dies ist übereinstimmend mit der Annahme, dass die 30s Schleife generell eine Rolle bei der Rezeptor-Bindung von Chemokinen spielt [22]. Welche vom N-Terminus unabhängigen Abschnitte von XCL1 dem Rezeptor XCR1 zugänglich und für die Rezeptorbindung mitverantwortlich sind, muss Gegenstand zukünftiger Struktur-Funktionsanalysen sein.

Zusammenfassend konnte erstmals auf XCR1⁺ DZ demonstriert werden, dass der N-Terminus von XCL1 maßgeblich, aber nicht ausschließlich die Rezeptorbindung vermittelt und entscheidend für die Rezeptoraffinität ist, während die Rezeptorspezifität vom N-Terminus unbeeinflusst ist.

Neben der Rezeptorbindung wurde die chemotaktische Wirkung der XCL1-Fusionsproteine auf Milzzellen *in vitro* untersucht. Während WT-XCL1 die für Chemokine typische glockenförmige Wirkungskurve, mit einem Migrationsoptimum XCR1⁺ DZ bei ca. 100 ng/ml zeigte, induzierte die XCL1-Variante Del-N7 erst bei 100fach höherer Konzentration eine verstärkte Migration [87]. Die Migration in Richtung der Variante Del-N7 war trotz der hohen verwendeten

Konzentration spezifisch für XCR1⁺ DZ. Dies zeigt, dass das XCL1-Fusionsprotein Del-N7 hinsichtlich seiner chemotaktischen Funktion vollständig funktionell intakt ist, sein Wirkungsoptimum allerdings erst bei wesentlich höheren Konzentrationen erreicht. Die zwischen den AS 8 – 76 gelegenen Domänen von XCL1 enthalten alle für die Induktion einer effektiven Chemotaxis notwendigen Strukturen [87].

Das XCL1-Fusionsprotein WT-XCL1 induzierte in höchster eingesetzter Konzentration (10 000 ng/ml) nur noch eine geringe Chemotaxis der XCR1⁺ DZ. Interessanterweise steigerte sich im Gegensatz dazu die chemotaktische Wirkung der Variante Del-N7 bei maximalen Konzentrationen wesentlich, sodass Del-N7 eine bedeutend stärkere Migration XCR1⁺ DZ induzierte als WT-XCL1 im Wirkungsoptimum (100 ng/ml). Diese Beobachtung legt nahe, dass der N-Terminus von XCL1 dessen Aktivität bei sehr hohen Konzentrationen hemmt, im Sinne einer negativ regulatorischen Funktion [87].

Eine gemeinsame Bewertung der Versuche zur Rezeptorbindung und Chemotaxis der XCL1-Variante Del-N7 erlaubt folgende Feststellung: Die XCR1-Rezeptorbindung bzw. -affinität wird entscheidend durch den N-Terminus von XCL1 determiniert. An der Rezeptor-Aktivierung und Auslösung der für Chemotaxis notwendigen intrazellulären Signaltransduktion sind die ersten sieben Aminosäuren nicht unmittelbar beteiligt [87].

Die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen die These von Tuinstra *et al.*, dass N-terminal verkürztes XCL1 keine Rezeptoraktivierung auslösen könne, keine agonistische Aktivität an XCR1 besäße und essenziell für die Funktion von XCL1 wäre [24].

Die erhobenen Befunde stehen des Weiteren in gewissem Kontrast zu dem allgemeinen Konzept, dass N-Termini von Chemokinen Schlüssel-Signal-Domänen darstellen. Studien an diversen Chemokinen zeigten, dass Deletion oder Modifikation häufig zu Chemokinvarianten führt, die kein Signal induzieren, ihre Rezeptoraffinität jedoch oft behalten [3], [91], [89], [92], [93]. So führt z.B. N-terminale Verkürzung u.a. von CCL7, CCL8 und CCL13 zum Verlust der chemotaktischen Funktion bei erhaltener Rezeptoraffinität [3], [94]. Bei N-terminal deletiertem XCL1 verhält es sich umgekehrt, die Rezeptoraffinität ist beeinträchtigt, während die Fähigkeit Signalinduktion erhalten ist. Der Grundsatz, dass der N-Terminus eine Schlüssel-Signal-Domäne darstelle, ist daher für XCL1 nicht gültig.

4.3 Die funktionelle Rolle des C-Terminus von XCL1

Der ungewöhnlich lange, unstrukturierte C-Terminus ist ein einzigartiges Merkmal von XCL1 und stellt neben der fehlenden zweiten Disulfidbrücke einen weiteren strukturellen Unterschied zu Chemokinen anderer Chemokin-Familien dar [22], [12]. Der C-Terminus ist zwischen den Spezies Mensch, Rhesusaffe, Ratte und Maus hoch konserviert, die letzten 7 C-terminalen AS sind in den genannten Spezies identisch [22], [24]. Zwischen Mensch und Maus besteht innerhalb der letzten 22 AS eine 68,2 %ige Identität [23]. Bislang konnten in der C-terminalen AS-Sequenz keine strukturell einzigartigen Elemente identifiziert werden, die direkte Rückschlüsse auf eine funktionelle Rolle des C-Terminus für XCL1 erlaubt hätten [22]. Allerdings wirft die besondere Beschaffenheit und die starke Konservierung des C-Terminus die Frage nach einer herausragenden Bedeutung für die Funktion von XCL1 auf. Bisherige Untersuchungen zur funktionellen Rolle des C-Terminus bezüglich der XCR1-Rezeptorbindung und Aktivierung kamen trotz sehr ähnlicher Versuchsansätze zu entgegengesetzten Ergebnissen. Marcaurette *et al.* untersuchten eine C-terminal um 21 AS verkürzte XCL1-Variante (XCL1 1-72) hinsichtlich ihrer Fähigkeit an XCR1-transfizierte HEK-Zellen zu binden und ein Signal zu induzieren, welches mittels intrazellulärem Kalziumeinstrom bestimmt wurde. Im Gegensatz zu intaktem XCL1 wurde bei Verwendung der Deletionsvariante XCL1 1-72 kein intrazellulärer Kalziumeinstrom gemessen. Marcaurette *et al.* schlossen daraus, dass der C-Terminus für die Aktivität von XCL1 unabdingbar sei [26].

Tuinstra *et al.* stellten verschiedene C-terminal verkürzte XCL1-Varianten (1-68, 1-72, 1-78, 1-85) her, die alle in der Lage waren, an XCR1 zu binden und einen intrazellulären Kalziumeinstrom in XCR1-exprimierende HEK-Zellen auszulösen [24]. Lediglich eine um 40 AS verkürzte XCL1 1-53 Variante, der aufgrund der starken Verkürzung die C-terminale α -Helix fehlte, war nicht mehr in der Lage, einen Kalziumeinstrom zu induzieren. Tuinstra *et al.* postulierten daher, dass der C-Terminus keine Rolle für die Rezeptoraktivierung spiele [24].

Hedrick *et al.* stellten die Hypothese auf, dass der ungewöhnlich lange C-Terminus von XCL1 eine stabilisierende Funktion auf die Tertiärstruktur besitzen und das Fehlen der zweiten Disulfidbrücke kompensieren würde, welche zur Stabilisierung anderer Chemokine beiträgt [23]. In bisher publizierten Studien wurden ausschließlich *in vitro* Experimente zur Untersuchung der Funktion des C-Terminus von XCL1 durchgeführt und bei funktionellen Untersuchungen keine nativen XCR1⁺ DZ verwendet [24].

In dieser Arbeit gelang es, analog zur N-terminalen Deletionsvariante Del-N7, die Funktion des C-Terminus mit den XCL1-Deletionsvarianten Del-C7 und Del-C17 erstmals im Zusammenwirken mit nativen XCR1⁺ DZ *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass sich die Rezeptorbindung der XCL1-Varianten Del-C7 und Del-C17 an XCR1⁺ DZ *in vitro* nicht vom Bindungsverhalten von WT-XCL1 unterscheidet. Der C-Terminus von XCL1 besitzt demnach keine entscheidende Funktion bei der Interaktion mit dem Rezeptor XCR1 [87]. Auch die Spezifität der Bindung von XCL1 an XCR1 ist unbeeinflusst vom C-Terminus – Del-C7 und Del-C17 haben ausschließlich an XCR1⁺ DZ gebunden [87].

Mithilfe von Milzzellen genetisch veränderter, XCR1-defizienter LacZ Mäuse wurde untersucht, ob die XCL1-Fusionsproteine auch XCR1-unabhängig an kreuzpräsentierende DZ binden können. Tatsächlich konnte bei hohen eingesetzten Fusionsprotein-Konzentrationen eine schwache, vom XCR1 Rezeptor unabhängige, also unspezifische Bindung der Varianten WT-XCL1, Del-N7, Del-C7 und vCterm an CD8⁺ XCR1-defiziente, nicht aber an CD8⁻ XCR1-defiziente DZ festgestellt werden. CD8⁻ XCR1⁺ DZ stellen vermutlich Vorläuferzellen der CD8⁺ XCR1⁺ DZ dar [80], möglicherweise ist die für die XCR1-unabhängige unspezifische Bindung verantwortliche Oberflächenstruktur auf CD8⁻ XCR1⁺ DZ noch nicht vorhanden.

Dass natives XCL1 schwach an CD8⁺ XCR1-defiziente DZ bindet, wurde bereits zuvor im Labor beobachtet (unveröffentlichte Daten). Die Variante Del-C17 bindet als einziges der fünf XCL1-Fusionsproteine auch bei hohen Konzentrationen (2,5 µg) nicht an CD8⁺ XCR1-defiziente kreuzpräsentierende DZ [87]. Die übrigen bei hoher Proteinkonzentration gemessenen unspezifischen Signale scheinen vom C-Terminus, insbesondere den Aminosäuren 77-87, vermittelt zu sein [87]. Die Relevanz dieser Bindung *in vivo* ist fraglich [87].

Da XCL1 außer an XCR1⁺ DZ an keine anderen Zellen des Immunsystems bindet, muss es sich bei dem Interaktionspartner von XCL1 um eine auf kreuzpräsentierenden, normalerweise XCR1-positiven DZ exprimierte Oberflächenstruktur handeln. Hypothetisch sind verschiedene XCR1-unabhängige Interaktionspartner von XCL1 denkbar:

- i) Eine Konfiguration von GAG auf der Zelloberfläche könnte einen XCR1-unabhängigen Interaktionspartner von XCL1 darstellen. Der C-Terminus von XCL1 würde bei dieser Annahme eine wichtige Funktion bei der Bindung dieser GAG Konfiguration einnehmen – ist er um 17 AS verkürzt, findet keine Bindung statt.
- ii) Es könnte ein zweiter Chemokinrezeptor für XCL1 auf XCR1⁺ DZ existieren. Dagegen spricht die Beobachtung, dass die Variante Del-N7 schwach an CD8⁺ XCR1-defiziente DZ bindet. Die Untersuchung der XCL1:XCR1-Interaktion zeigte, dass der N-Terminus

entscheidend für die Rezeptorbindung ist. Es erscheint unwahrscheinlich, dass der N-Terminus für die Bindung von XCL1 an einen möglichen zweiten Chemokinrezeptor nicht wichtig ist. Um die Rezeptor-Hypothese zu überprüfen, wäre zukünftig ein *in vivo* Zytotoxizitätsversuch in XCR1-defizienten LacZ Mäusen sinnvoll. Dieser würde zeigen, ob XCL1 mit gekoppeltem Antigen (XCR1 unabhängig) an einen Rezeptor bindet, dieser internalisiert und das Antigen präsentiert wird. In diesem Versuch wäre insbesondere ein Vergleich des WT-XCL1 mit der Variante Del-C17 von Interesse.

Außer der Funktion für die Rezeptorbindung wurde der Einfluss des C-Terminus auf die chemotaktischen Eigenschaften von XCL1 untersucht. Die Varianten Del-C7 und Del-C17 wirken gleichermaßen spezifisch chemotaktisch auf XCR1⁺ DZ, vergleichbar zum WT-XCL1. Der C-Terminus hat folglich *in vitro* keinen Einfluss auf die chemotaktischen Eigenschaften von XCL1 [87].

Für Chemokine anderer Chemokinfamilien wurden bezüglich der Funktion des C-Terminus vergleichbare Erkenntnisse veröffentlicht. Beispielsweise wurde für das C-terminal um sieben AS verkürztes CCL2, einem Chemokin der CC-Chemokinfamilie, gezeigt, dass die Fähigkeit, Chemotaxis und intrazellulären Kalziumeinstrom auszulösen, nicht von Länge und Integrität des C-Terminus abhängig ist [95]. Auch beim CXCL8 (IL-8), einem Chemokin der CXC-Familie, sind die letzten 20 C-terminalen AS nicht wesentlich für Rezeptorbindung und Funktion [25].

Eine denkbare, bislang noch nicht untersuchte Funktion des XCL1 C-Terminus wäre seine Beteiligung bei der Bindung an GAG. Allerdings ist über die Bindung von Chemokinen an GAG, welche eine sehr heterogene Gruppe von Molekülen zusammenfassen, bislang nur wenig bekannt [3]. Experimentell wurde für natives XCL1 demonstriert, dass es an eine Heparin-Sepharose (Heparin-Agarose) Säule mit hoher Affinität bindet [96], zudem wurden einige XCL1-Domänen identifiziert, die für die XCL1:GAG Interaktion in Frage kämen, der C-Terminus war bislang jedoch nicht darunter [22]. Studien haben gezeigt, dass eine Heparin-Bindung Chemokine vor Proteolyse bzw. Zersetzung schützt [3], [97]. Es wäre denkbar, dass der C-Terminus, sofern er an der GAG-Bindung beteiligt ist, einen Schutz von XCL1 vor enzymatischem Abbau vermittelt und damit eine gewisse XCL1-Reservoir-Funktion im Gewebe gewährleistet.

Zur weiteren Erforschung der Funktion des C-Terminus von XCL1 wäre eine ergänzende Experimentserie sinnvoll, in der die Bindung der C-terminal deletierten XCL1-Varianten an GAG getestet wird. Allerdings sind bisherige experimentelle Modelle für die GAG-Bindung nur

schwer auf reale Bedingungen übertragbar. Die GAG stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, sie lassen sich nicht wie AS oder Proteine auf Grundlage einer Matrize synthetisieren und die GAG-Struktur, an die ein Chemokin präferiert bindet, ist nur schwierig analytisch zu erfassen [3].

Zusammenfassend konnte dem XCL1 C-Terminus in dieser Arbeit keine spezifische Funktion bezüglich der Rezeptorbindung an XCR1 oder Chemotaxis zugeordnet werden. Allerdings können die gegensätzlichen Beobachtungen von Tuinstra *et al.* und Marcaurelle *et al.* neu bewertet werden. Die von Tuinstra *et al.* mit XCR1-transfizierten HEK-Zellen gewonnene Erkenntnis, dass der C-Terminus von XCL1 keine Rolle für die Rezeptoraktivierung spielt, konnte bestätigt und erstmals ihre Gültigkeit für die Interaktion von XCL1 mit nativen XCR1⁺ DZ demonstriert werden.

4.4 *In vivo* Funktion des N- und C-Terminus von XCL1 im Kontext des *targeting* von Antigenen zu XCR1⁺ DZ

Dendritische Zellen sind entscheidende Regulatoren der T- und B-Zellimmunität und stellen aufgrund ihrer ausgezeichneten Fähigkeiten zur Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen einen vielversprechenden Ansatzpunkt für neuartige Therapieverfahren dar [98]. Die Identifizierung von Rezeptoren, die spezifisch auf DZ exprimiert werden, ermöglicht die Entwicklung neuer Vakzinierungs-Strategien. Zu diesen zählt das als *targeting* von Antigenen bezeichnete gezielte Beladen von DZ mit einem Antigen, mit dem Ziel, eine spezifische zytotoxische T-Zellantwort zu induzieren. Studien zeigen, dass die Effektivität des *in vivo targeting* von zahlreichen Faktoren abhängt, u.a. vom Expressionsmuster des spezifischen Rezeptors [98]. *In vivo targeting* von DZ ist verschiedenen Arbeitsgruppen im Mausmodell mit unterschiedlichen auf kreuzpräsentierenden DZ exprimierten Oberflächenmolekülen wie z.B. CD205 [99], Clec9A [100], CD207 [101] oder CD 103 [102] gelungen. Allerdings werden alle bisher genutzten Oberflächenmoleküle nicht nur auf kreuzpräsentierenden DZ, sondern auch auf anderen Zelltypen exprimiert.

Der entscheidende Vorteil des Rezeptor XCR1 als *targeting*-Zielstruktur ist, dass er ausschließlich auf kreuzpräsentierenden DZ exprimiert wird [21] und daher eine hochselektive Beladung via XCL1 als natürlichen Ligand möglich ist. Der Vorteil der hohen Spezifität ist u.a., dass Wirkung und mögliche Nebenwirkungen eindeutig zuzuordnen wären. Außerdem ist die

benötigte Antigendosis vergleichsweise gering, da das XCL1-*targeting*-Reagenz nicht an andere Zellen bindet und damit dessen effektive Dosis des XCL1-*targeting*-Reagenz, das in der Blutbahn zirkuliert, nicht vermindert wird [49]. Neben der hohen Spezifität für XCR1⁺ DZ, ist die Verwendung von XCL1 als *targeting*-Reagenz vorteilhaft, da XCL1 als körpereigenes Protein nicht immunogen wirkt und damit wiederholte Anwendungen, z.B. im Rahmen einer Tumorthherapie möglich wären [57]. Alternativ ist auch die Nutzung eines gegen XCR1 gerichteten Antikörpers möglich [57].

In einer Reihe von *in vivo* Experimenten in der Maus konnte bereits gezeigt werden, dass *targeting* von XCR1 mit an XCL1 gekoppeltem Antigen eine vielversprechende Methode darstellt: i) Rekombinant an XCL1 angefügtes OVA löst *in vivo* nach adoptivem Transfer von OVA-spezifischen OT-I CD8⁺ T-Zellen eine spezifische T-Zell Proliferation aus [57]. ii) Bei Verwendung von LPS als Adjuvans kann *in vivo* eine endogene zytotoxische CD8⁺ T-Zellantwort gegen das Antigen OVA induziert werden. iii) Im Mausmodell kann durch *targeting* von XCR1⁺ DZ Wachstum von Tumoren, die das Modellantigen OVA exprimieren, hocheffektiv bekämpft und verhindert werden [57].

Obwohl eine *in vivo* Testung der Antigen-Kreuzpräsentation im Menschen nicht möglich ist, ist es aufgrund der stark konservierten Expression und Funktion des Rezeptors XCR1 und Liganden XCL1 sehr wahrscheinlich, dass *targeting* via XCL1 auch im Menschen zur Kreuzpräsentation des Antigens und spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort führt [57].

In einem humanisierten Mausmodell, in dem der humane Rezeptor XCR1 auf kreuzpräsentierenden DZ der Maus exprimiert wird, konnte durch Applikation von humanem XCL1-OVA eine potente, spezifische CD8⁺ T-Zellantwort induziert werden. Insgesamt sprechen die bislang gewonnen Ergebnisse für eine Übertragbarkeit der tierexperimentell erworbenen Erkenntnisse auf den Menschen [57].

In diesem Kontext wurde in dieser Arbeit erstmals *in vivo* untersucht, ob der N- oder C-Terminus von XCL1 die Bindung an XCR1⁺ DZ, sowie die Internalisierung, Prozessierung oder Kreuzpräsentation von Antigen beeinflusst. Als Modellantigen wurde analog zu Experimenten von Hartung *et al.* [57] OVA genutzt, das rekombinant an XCL1 gekoppelt Bestandteil jedes XCL1-Fusionsproteins war.

Einem festen Schema folgend, wurden Mäuse mit XCL1-Fusionsproteinen immunisiert und die Proliferation zuvor adoptiv transferierter, OVA-spezifischer OT-I T-Zellen untersucht. Eine OT-I T-Zellproliferation findet nur statt, wenn das Antigen OVA erfolgreich in kreuzpräsentierende DZ eingebracht, prozessiert und auf MHC I präsentiert wird; OT-I T-Zellen binden mit ihrem

OVA-spezifischen T-Zellrezeptor an das präsentierte OVA-Peptid, werden aktiviert und zur Proliferation angeregt. Daher eignen sich OT-I T-Zellen gut, um experimentell *in vivo* indirekt die Bindung, Prozessierung und Präsentation von Antigen durch kreuzpräsentierende DZ zu überprüfen. In einem zweiten Versuchsansatz wurde geprüft, ob Immunisierung mit den XCL1-Fusionsproteinen eine endogene CD8⁺ T-Zellantwort induziert und ob die T-Zellen zytotoxisch gegen antigentragende Zellen wirksam sind.

Del-N7 induzierte nur eine vergleichsweise geringe OT-I T-Zellproliferation und nur eine schwache zytotoxische Reaktion gegen antigentragende Zellen. Im Kontext der bereits diskutierten Ergebnisse des *in vitro* Rezeptorbindungsversuchs ist davon auszugehen, dass die Rezeptorbindung von Del-N7 an XCR1 auch *in vivo* stark vermindert ist und deshalb nur wenig Antigen die XCR1⁺ DZ erreichte [87]. Die Verwendung größerer Mengen Del-N7 zur Immunisierung induzierte eine verstärkte OT-I Proliferation bzw. zytotoxische T-Zellreaktion. Dies zeigt, dass die verminderte Bindungsfähigkeit von Del-N7 an XCR1 auch *in vivo* teilweise durch Mengenerhöhung kompensiert werden konnte. Bindet Del-N7 an XCR1, laufen Mechanismen der Internalisierung, Prozessierung und Präsentation von OVA offensichtlich vom N-Terminus unbeeinflusst ab. Die zytotoxische Potenz der körpereigenen aktivierten CD8⁺ T-Zellen wird nicht durch einen verkürzten N-Terminus beeinflusst. Die Funktion des N-Terminus von XCL1 beschränkt sich vermutlich auf die Rezeptorbindung, es scheinen weder die Signalkaskade, die zur Internalisierung des Ligand-Rezeptorkomplexes führt, noch intrazelluläre Mechanismen vom N-Terminus beeinflusst zu werden.

Der Vergleich der C-terminal deletierten Varianten Del-C7 und Del-C17 mit dem WT-XCL1 zeigt, dass der XCL1 C-Terminus keinen entscheidenden Einfluss auf die Aufnahme und Prozessierung von Antigen hat. Diese Feststellung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass auch der Ersatz des nativen C-Terminus durch eine virale Aminosäuresequenz keinen wesentlichen Einfluss auf die Antigenpräsentation hatte [87].

Allerdings induzierte die C-terminal um 17 AS verkürzte XCL1-Variante Del-C17 bei geringen Dosen reproduzierbar eine etwas stärkere OT-I T-Zellproliferation und eine potentere zytotoxische T-Zellantwort gegen antigentragende Zellen als Del-C7 oder WT-XCL1 [87].

Es gibt verschiedene, weitgehend hypothetische Erklärungen für die gesteigerte Effektivität der Variante Del-C17 *in vivo*. Eine mögliche Interpretation wäre, dass der native XCL1 C-Terminus *in vivo* eine regulatorische Funktion besitzt und einen hemmenden Einfluss auf Rezeptorbindung, Antigenprozessierung oder -präsentation ausübt. Eine Verkürzung um 17 AS

würde demzufolge in einer optimierten Bindung des Fusionsproteins und in der Konsequenz zu einer verstärkten Präsentation des Antigens OVA führen. Allerdings konnte, wie bereits diskutiert, im *in vitro* Rezeptorbindungsversuch kein nennenswerter Unterschied zwischen den C-terminal verkürzten XCL1 Varianten und WT-XCL1 festgestellt werden. Ein direkter Einfluss des C-Terminus auf die Chemokin-Rezeptor-Interaktion erscheint somit zweifelhaft.

Eine weitere hypothetische Erklärung ist, dass der C-Terminus rezeptorunabhängige Bindungen von XCL1 vermittelt. Eine Deletion des C-Terminus würde dazu führen, dass diese Bindungen nicht mehr stattfinden könnten. Als Konsequenz würde eine erhöhte Menge Del-C17 frei im Blutkreislauf zirkulieren und zur Bindung an XCR1⁺ DZ zur Verfügung stehen. Eine gesteigerte Menge des gekoppelten Antigens würde die XCR1⁺ kreuzpräsentierenden DZ erreichen, in der Folge würde eine größere Zahl antigenspezifischer T-Zellen aktiviert werden. Dies würde die beobachtete verstärkte OT-I T-Zellproliferation bzw. die potentere zytotoxische Reaktion gegen antigenträgende Zellen erklären.

Das prominenteste Beispiel rezeptorunabhängiger Bindungen von Chemokinen ist die Bindung an GAG. Die meisten Chemokine besitzen zwei unterschiedliche Bindungsdomänen, eine hoch-affine, für die Rezeptor-Ligand-Interaktion verantwortliche Bindungsstelle und eine zweite, geringerer Affinität für GAG- oder Heparin-Bindung [103]. Funktionell ist die Bindung an GAG *in vivo* essenziell, um die für Chemotaxis von Immunzellen notwendigen Chemokingradienten zu etablieren. Für XCL1 wurde grundsätzlich nachgewiesen, dass es an GAG bindet, ohne dass exakte Strukturen definiert werden konnten, welche für die GAG-Bindung verantwortlich sind [22]. Bislang wird die Beteiligung der 40s Schleife und der C-terminalen α -Helix an der Bindung von XCL1 an GAG diskutiert [22]. Im Kontext der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse wäre auch eine Beteiligung des C-Terminus von XCL1 an der Bindung an GAG denkbar.

Möglicherweise existiert eine GAG Konfiguration in der extrazellulären Matrix, an die XCL1 bindet, zwecks Aufbau von Chemokingradienten und/oder Etablierung eines Chemokin-Reservoirs z.B. in entzündlichen Geweben. Hypothetisch könnte es sich um dieselbe GAG Konfiguration handeln, die möglicherweise auf XCR1⁺ DZ den XCR1-unabhängigen Bindungspartner von XCL1 darstellt. Dafür spricht, dass einzig Del-C17 nicht an XCR1-defiziente kreuzpräsentierende DZ gebunden hat (siehe 3.2.2) und sich ebenfalls Del-C17 durch eine etwas effektivere Induktion einer T-Zellantwort auszeichnet. Allerdings sind diese Annahmen hypothetisch und müssen in weiteren Experimentserien verfolgt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können in die Entwicklung einer XCL1-basierten therapeutischen Vakzine einfließen, voraussichtlich zunächst zur Bekämpfung von Neoplasien mit stabilem

Tumorantigen. Eventuell lässt sich, wie im Mausmodell in dieser Arbeit erstmals demonstriert, die Initiierung einer zytotoxischen Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen durch Verwendung einer C-terminal verkürzten XCL1-Variante weiter optimieren. Diese Optimierung des *targeting* von Antigen würde eine effektivere Bekämpfung des Zieltumors oder Erregers ermöglichen und eine Reduktion der notwendigen Antigenmenge erlauben.

Zudem sind weitere Studien erforderlich, um zu überprüfen, ob ein *linker* zwischen XCL1 und angekoppeltem Antigen notwendig ist oder ob auf diesen zukünftig verzichtet werden kann.

4.5 „Dekorierung“ sterbender Zellen mit den XCL1-Fusionsproteinen

Zelltod begleitet verschiedene Prozesse wie Infektionen, Tumore oder den physiologischen Umsatz von Gewebe [53]. Sterbende Zellen verändern ihr Oberflächenprofil und werden von phagozytierenden Zellen erkannt und beseitigt. Zu den phagozytierenden Zellen gehörten neben Makrophagen und Granulozyten auch DZ. Ein gut erforschter Mechanismus der Zellmembranveränderung sterbender Zellen im Apoptosestadium ist beispielsweise die Translokation von Phosphatidylserinen (PS) auf die äußere Membran der Lipiddoppelschicht [104]. Die Interaktion zwischen apoptotischen und phagozytierenden Zellen kann durch verschiedene Rezeptoren und Brückenmoleküle vermittelt werden.

Je nach Subtyp unterscheiden sich DZ in ihrer Fähigkeit Antigen aufzunehmen; zellassoziertes Antigen wird insbesondere von XCR1⁺ kreuzpräsentierenden DZ deutlich effizienter aufgenommen als von anderen DZ [21].

Das in dieser Arbeit untersuchte Chemokin XCL1 stellt vermutlich ein Brückenmolekül zwischen sterbenden Zellen und kreuzpräsentierenden DZ dar [49]; die Bindung von XCL1 an sterbende Zellen steigert die Aufnahme dieser durch kreuzpräsentierende DZ erheblich [49].

Der „Dekorierung“ sterbender Zellen durch XCL1 könnte nach Hartung [49] der hier vereinfacht dargestellte Mechanismus zu Grunde liegen: NK-Zellen töten infizierte oder entartete Zellen ab und sekretieren gleichzeitig XCL1, welches an die sterbenden Zellen bindet. XCR1⁺ DZ erkennen die mit XCL1 „dekorierten“ Zellen, nehmen diese verstärkt auf, präsentieren die zellassozierten Antigene im Kreuzpräsentationsweg auf MHC I und lösen damit eine spezifische, zytotoxische T-Zellantwort aus [49]. Wie andere Brückenmoleküle, bindet XCL1 vermutlich an eine Struktur der sterbenden Zelle, die im vitalen Zustand verborgen bleibt und erst zugänglich wird, wenn der Zelltod eintritt [49]. Es war bislang unklar, an welche Strukturen XCL1 auf sterbenden Zellen bindet und welche Bereiche von XCL1 für die Bindung verantwortlich sind.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob der N- oder C-Terminus von XCL1 an der Bindung des Chemokins an sterbende Zellen beteiligt ist. Zur Unterscheidung verschiedener Zelltodstadien wurde ein Annexin V/DAPI-Färbeschema genutzt, mit Hilfe dessen lebende, apoptotische und nekrotische Zellen unterschieden werden konnten. Für den Eintritt lebender Zellen in den regulierten Zelltod, die sog. Apoptose, gibt es vielfältige Ursachen, von Hypoxie bis zur Induktion von Apoptose durch spezifische Liganden. Werden apoptotische Zellen nicht von Phagozyten abgeräumt, tritt die sog. sekundäre Nekrose ein, welche die Endstufe der Apoptose darstellt und sich u.a. durch den vollständigen Verlust der Membranintegrität auszeichnet [51]. Davon zu unterscheiden ist die sog. primäre Nekrose, welche durch massive äußere Zellschädigung, wie z.B. einen Hitzeschock, ausgelöst wird [51].

Das in dieser Arbeit verwendete Annexin V/DAPI-Färbeschema lässt keine klare Differenzierung von primär nekrotischen Zellen zu sekundär nekrotischen Zellen zu, andere Biomarker zur eindeutigen Unterscheidung von primärer Nekrose und sekundärer Nekrose bzw. Apoptose existieren nicht [51]. Bei den untersuchten Zellpopulationen handelte es sich auf Grund der beobachteten Dynamik größtenteils um sekundär nekrotische Zellen. Ob die mit einem Hitzeschock behandelten Zellen primär oder sekundär nekrotisch waren, lässt sich nicht mit Sicherheit bestimmen, vermutlich handelte es sich sowohl um primär- als auch um sekundär nekrotische Zellen.

Die Experimente zeigten, dass alle fünf XCL1-Fusionsproteinvarianten an apoptotische und nekrotische P3X Zellen binden. Die Bindung ist vom N- und C-Terminus unabhängig und wird von anderen Chemokinabschnitten vermittelt [87]. Unterschiede zwischen der apoptotischen und nekrotischen Population gehen wahrscheinlich auf eine unterschiedlich starke Expression der für die XCL1-Bindung verantwortlichen Strukturen zurück. Möglicherweise werden diese zugänglicher oder zahlreicher, je weiter der Zelltod fortschreitet. In einem stark fortgeschrittenen Stadium des Zelltodes, an dem keine PS mehr nachweisbar sind (Annexin V⁻ DAPI⁺), geht die XCL1-Bindungsstruktur im Zuge der Auflösung der Zellen verloren.

Die Experimente mit sterbenden Splenozyten zeigten, dass die XCL1-Fusionsproteine vor allem an nekrotische und schwach an apoptotische Splenozyten binden. Damit konnten die von Hartung *et al.* durchgeführten Experimente bestätigt werden. Es ließ sich kein wesentlicher Unterschied zwischen den XCL1-Fusionsproteinvarianten beobachten, weder der N-Terminus noch der C-Terminus scheint die Bindung von XCL1 an sterbende Splenozyten zu determinieren [87].

Im Verlauf der Experimente erwies sich die Färbung von an sterbende Splenozyten gebundenem XCL1 als problematisch, während die Färbung von XCL1 auf P3X Zellen unkompliziert war. Das detektierte Signal der XCL1-Färbung mit dem Antikörper StrepMAB-Immo auf sterbenden Splenozyten war deutlich ungenauer als auf P3X Zellen: Sowohl der Prozentanteil XCL1-dekorierter Splenozyten, als auch die detektierte Signalstärke variierte zwischen den vierfach unter gleichen Bedingungen durchgeführten Experimenten erheblich. Der alternative Einsatz des ebenfalls gegen den Strep-tag[®] gerichteten Antikörpers StrepMAB-Classic führte zu keinem besseren Ergebnis.

Vorversuche mit dem von E. Hartung erfolgreich zum Nachweis von an sterbende Zellen gebundenem XCL1 verwendeten Antikörper MTAC-311 zeigten, dass das Bindungsepitop dieses AK innerhalb der C-terminalen AS 77-86 (VPTGAQRSTS) von XCL1 lokalisiert ist. MTAC-311 ist daher nicht fähig, an Del-C17 und vCterm zu binden, und war für die Versuche ungeeignet. Das Bindungsepitop des alternativen, ebenfalls gegen XCL1 gerichteten Antikörpers 16H6 liegt wiederum innerhalb der ersten 7 N-terminalen AS (VGTEVLE), was die Detektion der Variante Del-N7 unmöglich machte. Folglich musste trotz der diskutierten Unschärfe der Färbung auf den Antikörper StrepMAB-Immo zurückgegriffen werden. Anders als in den Experimenten dieser Arbeit wurde von Hartung *et al.* WT XCL1 ohne angekoppeltes OVA verwendet. Möglicherweise erschwerte das Vorhandensein des OVA-Proteins die Antikörperfärbung auf sterbenden Splenozyten.

Zusammenfassend zeigte sich, dass vom N- und C-Terminus unabhängige zentrale Abschnitte des Chemokins XCL1 für die Bindung an sterbende Zellen verantwortlich sein müssen [87].

4.6 Einfluss des vXCL1 C-Terminus auf die funktionellen Eigenschaften des Chemokins

Im Rahmen bestimmter Virusinfektionen exprimieren infizierte Körperzellen virale Chemokine. Unter anderen gehört das Zytomegalovirus (CMV) zu den Viren, die für virale Chemokine kodierende DNA enthalten. Mit dem CMV-Virusstamm *english isolate of rat (murid herpesvirus 8, MuHV8)* infizierte Rattenzellen exprimieren eine als vXCL1 bezeichnete virale XCL1-Variante [60]. vXCL1 weist weitreichende Sequenz-Identitäten mit dem physiologisch exprimierten XCL1 der Ratte (rXCL1, 64 % Identität), der Maus (mXCL1, 58 % Identität) und des Menschen (hXCL1, 46 % Identität) auf [60].

Wie ausführlich in der Einleitung dargelegt, unterscheidet sich insbesondere die C-terminale AS-Sequenz von vXCL1 deutlich von den AS-Sequenzen der korrespondierenden nativen

Chemokine (siehe 1.7). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob dem C-Terminus von vXCL1 eine funktionelle Bedeutung zukommt.

Bislang wurde die Expression von vXCL1 nur in CMV (MuHV8) infizierten Ratten, nicht in CMV (MuHV1) infizierten Mäusen nachgewiesen. Die in dieser Arbeit angewandten experimentellen Verfahren sind jedoch nur für den murinen Organismus im Labor etabliert. Um trotzdem eine funktionelle Untersuchung des vXCL1 C-Terminus durchzuführen, wurde der C-Terminus von murinem XCL1 rekombinant durch den C-Terminus von vXCL1 ersetzt und analog zu den übrigen Strukturvarianten mit OVA und Strep-tag[®] fusioniert („vCterm“).

Der Ansatz, die Wirkung des vXCL1 C-Terminus als Bestandteil von nativem mXCL1 auf XCR1⁺ DZ der Maus zu untersuchen, erscheint zunächst sehr artifiziell. Allerdings basiert die Hypothese, dass sich eine mögliche Wirkung bzw. Funktion des viralen vXCL1 C-Terminus auch in der Maus manifestieren könnte, auf verschiedenen Erkenntnissen:

i) Die AS-Sequenzen von nativem rXCL1 und mXCL1 weisen eine große Sequenzhomologie auf [60]. ii) Der gegen den murinen XCR1-Rezeptor gerichtete AK MARX10 bindet ebenfalls spezifisch an XCR1 der Ratte, d.h. auf Rezeptorebene besteht zwischen Ratte und Maus eine große Homologie [60]. iii) rXCL1 bindet an XCR1⁺ DZ der Maus und induziert Chemotaxis, mXCL1 wiederum bindet auch an XCR1⁺ DZ der Ratte (unveröffentlichte Daten). iv) CD4⁺ XCR1⁺ DZ der Ratte entsprechen CD8⁺ XCR1⁺ der Maus, d.h. die Zielzellen von rXCL1 und mXCL1 sind ebenfalls homolog [60]. v) Die AS-Sequenz des C-Terminus von vXCL1 unterscheidet etwa gleich stark von der AS-Sequenz des C-Terminus von rXCL1 und mXCL1.

Die dargelegten Homologien auf Chemokin-, Rezeptor- und Zell-Ebene ließen vermuten, dass sich funktionelle Auswirkungen des vXCL1 C-Terminus auch in Mäusen beobachten lassen. Die in dieser Arbeit rekombinant hergestellte XCL1 Variante vCterm wurde deswegen gemeinsam mit den übrigen XCL1-Varianten hinsichtlich Rezeptorbindung, Chemotaxis und Bindungsfähigkeit an tote Zellen untersucht. Zudem wurde überprüft, ob der virale C-Terminus die Prozessierung und Präsentation des Antigens OVA *in vivo* beeinflusst.

Die Variante vCterm hat *in vitro* spezifisch an XCR1⁺ DZ gebunden, im Vergleich zu WT-XCL1 sogar mit einer deutlich gesteigerten Affinität. Dies war überraschend, da die Untersuchung der C-terminal verkürzten Varianten Del-C7 und Del-C17 zeigte, dass der C-Terminus von nativem XCL1 *in vitro* keinen entscheidenden Einfluss auf die Rezeptorbindung hat. Möglicherweise bedingt der virale C-Terminus eine Konformation des Chemokins, welche die Rezeptoraffinität günstig beeinflusst.

Im Chemotaxis-Versuch dieser Arbeit zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der chemotaktischen Wirkung der XCL1-Fusionsproteine vCterm und WT-XCL1 auf murine XCR1⁺ DZ. Offensichtlich bedingt die zuvor beobachtete gesteigerte Affinität von vCterm zu XCR1 keine gesteigerte Chemotaxis von XCR1⁺ DZ.

Es wäre denkbar, dass vXCL1 in intrazelluläre Prozesse der Kreuzpräsentation eingreift, um die Präsentation viraler Antigene zu verhindern und die DZ „arbeitsunfähig“ zu machen. Für humanes CMV (HCMV) sind derartige immumodulatorische Mechanismen bekannt [107]. In Anbetracht der besonderen AS-Sequenz wäre es möglich, dass der C-Terminus des vXCL1 die Prozessierung und Präsentation von Antigen beeinflusst.

In diesem Kontext wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das *in vivo targeting* von XCR1⁺ DZ mit dem XCL1-Fusionsprotein vCterm, verglichen mit WT-XCL1, unterschiedliche Immunreaktionen bedingt. Dazu wurde überprüft, ob das in den Fusionsproteinen enthaltene Modellantigen OVA regelrecht prozessiert und präsentiert wird und eine normale T-Zell-Proliferation und -Zytotoxizität auslöst.

Es zeigte sich, dass vCterm, verglichen mit WT-XCL1, *in vivo* in beiden Versuchsansätzen eine etwas abgeschwächte T-Zellproliferation auslöst. Allerdings schließt der beobachtete, nur geringe Effekt einen wesentlichen Einfluss der viralen Sequenz auf Antigenaufnahme und -prozessierung weitgehend aus. Die erhaltene Funktionalität von vCterm unterstützt somit die in früheren Experimenten gemachte Beobachtung, dass der C-Terminus von XCL1 nicht entscheidend an der Prozessierung und Präsentation des Antigens beteiligt ist [87].

4.7 Schlussfolgerung

Diese Arbeit konnte bislang bestehende Unklarheiten und Widersprüche bezüglich der Struktur-Funktions-Beziehung des N- und C-Terminus von XCL1 klären. Der N-Terminus von XCL1 ist für die Rezeptorbindung entscheidend, auch wenn er an der Signalauslösung und -vermittlung nicht unmittelbar beteiligt ist. Es konnte ein klarer Nachweis erbracht werden, dass der native C-Terminus von XCL1 für die Prozessierung und Präsentation von Antigen nicht relevant ist. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass im Rahmen des *targeting* von Antigen ein verkürzter C-Terminus vorteilhaft ist, höchstwahrscheinlich indem unspezifische Bindungen minimiert werden. Diese Erkenntnisse haben zum einen Grundlagencharakter, zum anderen auch unmittelbare Relevanz für die Entwicklung eines XCL1-basierten therapeutischen Impfstoffes.



5. Literaturverzeichnis

1. Zlotnik A and Yoshie O, *The chemokine superfamily revisited*. Immunity, 2012;36(5):705-16.
2. Moser B, Wolf M, Walz A, and Loetscher P, *Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control*. Trends Immunol, 2004;25(2):75-84.
3. Allen SJ, Crown SE, and Handel TM, *Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism*. Annu.Rev.Immunol., 2007;25:787-820.
4. Moser B and Willimann K, *Chemokines: role in inflammation and immune surveillance*. Ann Rheum Dis, 2004;63 Suppl 2:ii84-ii9.
5. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, and Power CA, *International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors*. Pharmacol.Rev., 2000;52(1):145-76.
6. Zlotnik A, Yoshie O, and Nomiya H, *The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution*. Genome Biol, 2006;7(12):243.
7. Clark-Lewis I, Kim KS, Rajarathnam K, Gong JH, Dewald B, Moser B, Baggiolini M, and Sykes BD, *Structure-activity relationships of chemokines*. J Leukoc Biol, 1995;57(5):703-11.
8. Fernandez EJ and Lolis E, *Structure, function, and inhibition of chemokines*. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol., 2002;42:469-99.
9. de Mendonca FL, da Fonseca PC, Phillips RM, Saldanha JW, Williams TJ, and Pease JE, *Site-directed mutagenesis of CC chemokine receptor 1 reveals the mechanism of action of UCB 35625, a small molecule chemokine receptor antagonist*. J Biol Chem, 2005;280(6):4808-16.
10. Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z, Lau EK, LiWang P, Clark-Lewis I, Borlat F, Wells TN, and Kosco-Vilbois MH, *Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A, 2003;100(4):1885-90.

11. Alon R, Grabovsky V, and Feigelson S, *Chemokine induction of integrin adhesiveness on rolling and arrested leukocytes local signaling events or global stepwise activation?* Microcirculation, 2003;10(3-4):297-311.
12. Müller S, Dorner B, Korthäuer U, Mages HW, D'Apuzzo M, Senger G, and Kroczek RA, *Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes.* Eur. J. Immunol., 1995;25(6):1744-8.
13. Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Takagi S, and Yoshie O, *Identification of single C motif-1/lymphotactin receptor XCR1.* J. Biol. Chem., 1998;273(26):16551-4.
14. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, Kleyensteuber S, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Bazan JF, Moore KW, Schall TJ, and Zlotnik A, *Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine.* Science, 1994;266(5189):1395-9.
15. Kennedy J, Kelner GS, Kleyensteuber S, Schall TJ, Weiss MC, Yssel H, Schneider PV, Cocks BG, Bacon KB, and Zlotnik A, *Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin.* J. Immunol., 1995;155(1):203-9.
16. Yoshida T, Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, and Yoshie O, *Molecular cloning of a novel C or gamma type chemokine, SCM-1.* FEBS Lett., 1995;360(2):155-9.
17. Dorner B, Müller S, Entschladen F, Schröder JM, Franke P, Kraft R, Friedl P, Clark-Lewis I, and Kroczek RA, *Purification, structural analysis, and function of natural ATAC, a cytokine secreted by CD8(+) T cells.* J. Biol. Chem., 1997;272(13):8817-23.
18. Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS, Hüser MB, Kaufmann SH, Radbruch A, Flesch IE, and Kroczek RA, *MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002;99(9):6181-6.
19. Heiber M, Docherty JM, Shah G, Nguyen T, Cheng R, Heng HH, Marchese A, Tsui LC, Shi X, George SR, and et al., *Isolation of three novel human genes encoding G protein-coupled receptors.* DNA Cell Biol., 1995;14(1):25-35.
20. Dorner BG, Dorner MB, Zhou X, Opitz C, Mora A, Güttler S, Hutloff A, Mages HW, Ranke K, Schaefer M, Jack RS, Henn V, and Kroczek RA, *Selective expression of the*

- chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells.* Immunity, 2009;31(5):823-33.
21. Bachem A, Hartung E, Guttler S, Mora A, Zhou X, Hegemann A, Plantinga M, Mazzini E, Stoitzner P, Gurka S, Henn V, Mages HW, and Kroczeck RA, *Expression of XCR1 Characterizes the Batf3-Dependent Lineage of Dendritic Cells Capable of Antigen Cross-Presentation.* Front Immunol, 2012;3:214.
 22. Kuloglu ES, McCaslin DR, Kitabwalla M, Pauza CD, Markley JL, and Volkman BF, *Monomeric solution structure of the prototypical 'C' chemokine lymphotactin.* Biochemistry, 2001;40(42):12486-96.
 23. Hedrick JA, Saylor V, Figueroa D, Mizoue L, Xu Y, Menon S, Abrams J, Handel T, and Zlotnik A, *Lymphotactin is produced by NK cells and attracts both NK cells and T cells in vivo.* J. Immunol., 1997;158(4):1533-40.
 24. Tuinstra RL, Peterson FC, Elgin ES, Pelzek AJ, and Volkman BF, *An engineered second disulfide bond restricts lymphotactin/XCL1 to a chemokine-like conformation with XCR1 agonist activity.* Biochemistry, 2007;46(10):2564-73.
 25. Clark-Lewis I, Schumacher C, Baggiolini M, and Moser B, *Structure-activity relationships of interleukin-8 determined using chemically synthesized analogs. Critical role of NH2-terminal residues and evidence for uncoupling of neutrophil chemotaxis, exocytosis, and receptor binding activities.* J Biol Chem, 1991;266(34):23128-34.
 26. Marcaurelle LA, Mizoue LS, Wilken J, Oldham L, Kent SB, Handel TM, and Bertozzi CR, *Chemical synthesis of lymphotactin: a glycosylated chemokine with a C-terminal mucin-like domain.* Chemistry., 2001;7(5):1129-32.
 27. Trombetta ES and Mellman I, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo.* Annu Rev Immunol, 2005;23:975-1028.
 28. Murphy K, Travers P, Walport M, and Janeway C, *Janeway's immunobiology.* 7th ed. 2008, New York: Garland Science. xxi, 887 p.

29. Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, and Austyn JM, *Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants*. J Exp Med, 1990;172(5):1483-93.
30. Stoitzner P, Holzmann S, McLellan AD, Ivarsson L, Stossel H, Kapp M, Kammerer U, Douillard P, Kampgen E, Koch F, Saeland S, and Romani N, *Visualization and characterization of migratory Langerhans cells in murine skin and lymph nodes by antibodies against Langerin/CD207*. J Invest Dermatol, 2003;120(2):266-74.
31. Shortman K and Heath WR, *The CD8⁺ dendritic cell subset*. Immunol. Rev., 2010;234(1):18-31.
32. Wilson NS and Villadangos JA, *Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications*. Adv Immunol, 2005;86:241-305.
33. Villadangos JA and Schnorrer P, *Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo*. Nat Rev Immunol, 2007;7(7):543-55.
34. Yewdell JW, Reits E, and Neefjes J, *Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation*. Nat Rev Immunol, 2003;3(12):952-61.
35. Bevan MJ, *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. 1976*. J Immunol, 2010;185(3):1361-6.
36. Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, and Levitsky H, *Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens*. Science, 1994;264(5161):961-5.
37. Kurts C, Robinson BW, and Knolle PA, *Cross-priming in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2010;10(6):403-14.
38. Villadangos JA and Young L, *Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells*. Immunity, 2008;29(3):352-61.

39. Gurka S, Hartung E, Becker M, and Kroczeck RA, *Mouse Conventional Dendritic Cells Can be Universally Classified Based on the Mutually Exclusive Expression of XCR1 and SIRPalpha*. *Front Immunol*, 2015;6:35.
40. Hildner K, Edelson BT, Purtha WE, Diamond M, Matsushita H, Kohyama M, Calderon B, Schraml BU, Unanue ER, Diamond MS, Schreiber RD, Murphy TL, and Murphy KM, *Batf3 deficiency reveals a critical role for CD8alpha+ dendritic cells in cytotoxic T cell immunity*. *Science*, 2008;322(5904):1097-100.
41. Edelson BT, Kc W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, Bhattacharya D, Stappenbeck TS, Holtzman MJ, Sung SS, Murphy TL, Hildner K, and Murphy KM, *Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells*. *J Exp Med*, 2010;207(4):823-36.
42. Pooley JL, Heath WR, and Shortman K, *Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells*. *J Immunol*, 2001;166(9):5327-30.
43. Hashimoto D, Miller J, and Merad M, *Dendritic cell and macrophage heterogeneity in vivo*. *Immunity*, 2011;35(3):323-35.
44. Becker M, Guttler S, Bachem A, Hartung E, Mora A, Jakel A, Hutloff A, Henn V, Mages HW, Gurka S, and Kroczeck RA, *Ontogenic, Phenotypic, and Functional Characterization of XCR1(+) Dendritic Cells Leads to a Consistent Classification of Intestinal Dendritic Cells Based on the Expression of XCR1 and SIRPalpha*. *Front Immunol*, 2014;5:326.
45. Cerovic V, Houston SA, Westlund J, Utriainen L, Davison ES, Scott CL, Bain CC, Joeris T, Agace WW, Kroczeck RA, Mowat AM, Yrlid U, and Milling SW, *Lymph-borne CD8alpha+ dendritic cells are uniquely able to cross-prime CD8+ T cells with antigen acquired from intestinal epithelial cells*. *Mucosal Immunol*, 2015;8(1):38-48.
46. Iyoda T, Shimoyama S, Liu K, Omatsu Y, Akiyama Y, Maeda Y, Takahara K, Steinman RM, and Inaba K, *The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo*. *J Exp Med*, 2002;195(10):1289-302.

47. Schulz O and Reis e Sousa C, *Cross-presentation of cell-associated antigens by CD8alpha+ dendritic cells is attributable to their ability to internalize dead cells*. Immunology, 2002;107(2):183-9.
48. Schnorrer P, Behrens GM, Wilson NS, Pooley JL, Smith CM, El-Sukkari D, Davey G, Kupresanin F, Li M, Maraskovsky E, Belz GT, Carbone FR, Shortman K, Heath WR, and Villadangos JA, *The dominant role of CD8+ dendritic cells in cross-presentation is not dictated by antigen capture*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006;103(28):10729-34.
49. Hartung E, *Spezifische Antigenbeladung kreuzpräsentierender dendritischer Zellen über den Chemokinrezeptor XCR1*. [Dissertation], 2013.
50. Poon IK, Hulett MD, and Parish CR, *Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance*. Cell Death Differ, 2010;17(3):381-97.
51. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K, and Vandenabeele P, *Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis*. Methods, 2008;44(3):205-21.
52. Sancho D, Joffre OP, Keller AM, Rogers NC, Martinez D, Hernanz-Falcon P, Rosewell I, and Reis e Sousa C, *Identification of a dendritic cell receptor that couples sensing of necrosis to immunity*. Nature, 2009;458(7240):899-903.
53. Steinman RM and Banchereau J, *Taking dendritic cells into medicine*. Nature, 2007;449(7161):419-26.
54. Berzofsky JA, Ahlers JD, and Belyakov IM, *Strategies for designing and optimizing new generation vaccines*. Nat Rev Immunol, 2001;1(3):209-19.
55. Steinman RM, *Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science*. Immunity, 2008;29(3):319-24.
56. Rappuoli R, *Bridging the knowledge gaps in vaccine design*. Nat Biotechnol, 2007;25(12):1361-6.
57. Hartung E, Becker M, Bachem A, Reeg N, Jakel A, Hutloff A, Weber H, Weise C, Giesecke C, Henn V, Gurka S, Anastassiadis K, Mages HW, and Kroczeck RA, *Induction of potent CD8 T cell cytotoxicity by specific targeting of antigen to cross-presenting dendritic cells in vivo via murine or human XCR1*. J Immunol, 2015;194(3):1069-79.

58. Mocarski ES, *Cytomegaloviruses and their replication*. 2001.
59. Beisser PS, Lavreysen H, Bruggeman CA, and Vink C, *Chemokines and chemokine receptors encoded by cytomegaloviruses*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2008;325:221-42.
60. Geyer H, Hartung E, Mages HW, Weise C, Beluzic R, Vugrek O, Jonjic S, Kroczek RA, and Voigt S, *Cytomegalovirus expresses the chemokine homologue vXCL1 capable of attracting XCR1+ CD4- dendritic cells*. *J Virol*, 2014;88(1):292-302.
61. Hubert FX, Voisine C, Louvet C, Heslan JM, Ouabed A, Heslan M, and Josien R, *Differential pattern recognition receptor expression but stereotyped responsiveness in rat spleen dendritic cell subsets*. *J Immunol*, 2006;177(2):1007-16.
62. Yrlid U and Macpherson G, *Phenotype and function of rat dendritic cell subsets*. *APMIS*, 2003;111(7-8):756-65.
63. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, and Carbone FR, *T cell receptor antagonist peptides induce positive selection*. *Cell*, 1994;76(1):17-27.
64. Bunch TA, Grinblat Y, and Goldstein LS, *Characterization and use of the Drosophila metallothionein promoter in cultured Drosophila melanogaster cells*. *Nucleic Acids Res*, 1988;16(3):1043-61.
65. Hanahan D, Jessee J, and Bloom FR, *Plasmid transformation of Escherichia coli and other bacteria*. *Methods Enzymol*, 1991;204:63-113.
66. Cherbas L, Moss R, and Cherbas P, *Transformation techniques for Drosophila cell lines*. *Methods Cell Biol*, 1994;44:161-79.
67. Schneider I, *Cell lines derived from late embryonic stages of Drosophila melanogaster*. *J Embryol Exp Morphol*, 1972;27(2):353-65.
68. Mach N, Gillessen S, Wilson SB, Sheehan C, Mihm M, and Dranoff G, *Differences in dendritic cells stimulated in vivo by tumors engineered to secrete granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or Flt3-ligand*. *Cancer Res*, 2000;60(12):3239-46.

-
69. Ponath PD, Wang J, and Heath H, *Transwell chemotaxis*. *Methods Mol Biol*, 2000;138:113-20.
70. Lyons AB and Parish CR, *Determination of lymphocyte division by flow cytometry*. *J Immunol Methods*, 1994;171(1):131-7.
71. Tomonari K, *A rat antibody against a structure functionally related to the mouse T-cell receptor/T3 complex*. *Immunogenetics*, 1988;28(6):455-8.
72. Metlay JP, Witmer-Pack MD, Agger R, Crowley MT, Lawless D, and Steinman RM, *The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies*. *J Exp Med*, 1990;171(5):1753-71.
73. Ortega G, Robb RJ, Shevach EM, and Malek TR, *The murine IL 2 receptor. I. Monoclonal antibodies that define distinct functional epitopes on activated T cells and react with activated B cells*. *J Immunol*, 1984;133(4):1970-5.
74. Gallatin WM, Weissman IL, and Butcher EC, *A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes*. *Nature*, 1983;304(5921):30-4.
75. Löhning M, Hutloff A, Kallinich T, Mages HW, Bonhagen K, Radbruch A, Hamelmann E, and Kroczeck RA, *Expression of ICOS in vivo defines CD4+ effector T cells with high inflammatory potential and a strong bias for secretion of interleukin 10*. *J Exp Med*, 2003;197(2):181-93.
76. Hestdal K, Ruscetti FW, Ihle JN, Jacobsen SE, Dubois CM, Kopp WC, Longo DL, and Keller JR, *Characterization and regulation of RB6-8C5 antigen expression on murine bone marrow cells*. *J Immunol*, 1991;147(1):22-8.
77. Porgador A, Yewdell JW, Deng Y, Bennink JR, and Germain RN, *Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody*. *Immunity*, 1997;6(6):715-26.
78. Raynal P and Pollard HB, *Annexins: the problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium- and phospholipid-binding proteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1994;1197(1):63-93.

-
79. Wallny H, *Production of soluble MHC class II molecules in Drosophila melanogaster Schneider cells*. Immunol. Methods Manual, 1997;1:51-9.
80. Kroczek RA and Henn V, *The Role of XCR1 and its Ligand XCL1 in Antigen Cross-Presentation by Murine and Human Dendritic Cells*. Front Immunol, 2012;3:14.
81. Bachem A, Guttler S, Hartung E, Ebstein F, Schaefer M, Tannert A, Salama A, Movassaghi K, Opitz C, Mages HW, Henn V, Kloetzel PM, Gurka S, and Kroczek RA, *Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c+CD141+ cells as homologues of mouse CD8+ dendritic cells*. J Exp Med, 2010;207(6):1273-81.
82. Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, and McKenna HJ, *Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified*. J Exp Med, 1996;184(5):1953-62.
83. Shortman K and Naik SH, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007;7(1):19-30.
84. Chen X, Zaro JL, and Shen WC, *Fusion protein linkers: property, design and functionality*. Adv Drug Deliv Rev, 2013;65(10):1357-69.
85. Reddy Chichili VP, Kumar V, and Sivaraman J, *Linkers in the structural biology of protein-protein interactions*. Protein Sci, 2013;22(2):153-67.
86. Thomas P and Smart TG, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. J Pharmacol Toxicol Methods, 2005;51(3):187-200.
87. Kroczek AL, Hartung E, Gurka S, Becker M, Reeg N, Mages HW, Voigt S, Freund C, and Kroczek RA, *Structure-Function Relationship of XCL1 Used for in vivo Targeting of Antigen Into XCR1(+) Dendritic Cells*. Front Immunol, 2018;9:2806.
88. Blanpain C, Doranz BJ, Bondue A, Govaerts C, De Leener A, Vassart G, Doms RW, Proudfoot A, and Parmentier M, *The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle*. J Biol Chem, 2003;278(7):5179-87.

-
89. Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Freedman R, Grunberger D, Krstenansky J, Lee S, McCarley D, and Mulkins M, *Identification of residues in the monocyte chemotactic protein-1 that contact the MCP-1 receptor, CCR2*. *Biochemistry*, 1999;38(40):13013-25.
 90. Campanella GS, Lee EM, Sun J, and Luster AD, *CXCR3 and heparin binding sites of the chemokine IP-10 (CXCL10)*. *Journal of Biological Chemistry*, 2003;278(19):17066-74.
 91. Jarnagin K, Grunberger D, Mulkins M, Wong B, Hemmerich S, Paavola C, Bloom A, Bhakta S, Diehl F, and Freedman R, *Identification of surface residues of the monocyte chemotactic protein 1 that affect signaling through the receptor CCR2*. *Biochemistry*, 1999;38(49):16167-77.
 92. Zhang Y and Rollins BJ, *A dominant negative inhibitor indicates that monocyte chemoattractant protein 1 functions as a dimer*. *Molecular and cellular biology*, 1995;15(9):4851-5.
 93. Gong J-H and Clark-Lewis I, *Antagonists of monocyte chemoattractant protein 1 identified by modification of functionally critical NH2-terminal residues*. *The Journal of experimental medicine*, 1995;181(2):631-40.
 94. McQuibban GA, Gong J-H, Wong JP, Wallace JL, Clark-Lewis I, and Overall CM, *Matrix metalloproteinase processing of monocyte chemoattractant proteins generates CC chemokine receptor antagonists with anti-inflammatory properties in vivo*. *Blood*, 2002;100(4):1160-7.
 95. Proost P, Struyf S, Couvreur M, Lenaerts J-P, Conings R, Menten P, Verhaert P, Wuyts A, and Van Damme J, *Posttranslational modifications affect the activity of the human monocyte chemotactic proteins MCP-1 and MCP-2: identification of MCP-2 (6-76) as a natural chemokine inhibitor*. *The Journal of Immunology*, 1998;160(8):4034-41.
 96. Kuschert GS, Coulin F, Power CA, Proudfoot AE, Hubbard RE, Hoogewerf AJ, and Wells TN, *Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses*. *Biochemistry*, 1999;38(39):12959-68.
 97. Sadir R, Imberty A, Baleux F, and Lortat-Jacob H, *Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against*

-
- proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV*. Journal of Biological Chemistry, 2004;279(42):43854-60.
98. Tacke PJ, de Vries IJM, Torensma R, and Figdor CG, *Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting*. Nature Reviews Immunology, 2007;7(10):790-802.
99. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, and Steinman RM, *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med, 2002;196(12):1627-38.
100. Caminschi I, Proietto AI, Ahmet F, Kitsoulis S, Shin TJ, Lo JC, Rizzitelli A, Wu L, Vremec D, van Dommelen SL, Campbell IK, Maraskovsky E, Braley H, Davey GM, Mottram P, van dV, Jensen K, Lew AM, Wright MD, Heath WR, Shortman K, and Lahoud MH, *The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement*. Blood, 2008;112(8):3264-73.
101. Idoyaga J, Cheong C, Suda K, Suda N, Kim JY, Lee H, Park CG, and Steinman RM, *Cutting edge: langerin/CD207 receptor on dendritic cells mediates efficient antigen presentation on MHC I and II products in vivo*. The Journal of Immunology, 2008;180(6):3647-50.
102. Semmrich M, Plantinga M, Svensson-Frej M, Uronen-Hansson H, Gustafsson T, Mowat A, Yrlid U, Lambrecht B, and Agace W, *Directed antigen targeting in vivo identifies a role for CD103+ dendritic cells in both tolerogenic and immunogenic T-cell responses*. Mucosal immunology, 2012;5(2):150-60.
103. McFadden G and Kelvin D, *New strategies for chemokine inhibition and modulation: you take the high road and I'll take the low road*. Biochemical pharmacology, 1997;54(12):1271-80.
104. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, and Henson PM, *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. The Journal of Immunology, 1992;148(7):2207-16.

105. Lüttichau HR, *The cytomegalovirus UL146 gene product vCXCL1 targets both CXCR1 and CXCR2 as an agonist*. Journal of Biological Chemistry, 2010;285(12):9137-46.
106. Rock KL and Shen L, *Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance*. Immunol Rev, 2005;207:166-83.
107. Loureiro J and Ploegh HL, *Antigen Presentation and the Ubiquitin-Proteasome System in Host-Pathogen Interactions*. Advances in immunology, 2006;92:225-305.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Arthur Leonard Kroczek, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Struktur-Funktionsanalyse des Chemokins XCL1“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit der Betreuerin angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste

Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Arthur Leonard Kroczek hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Kroczek AL, Hartung E, Gurka S, Becker M, Reeg N, Mages HW, Voigt S, Freund C, and Kroczek RA, *Structure-Function Relationship of XCL1 Used for in vivo Targeting of Antigen Into XCRI(+) Dendritic Cells*. Front Immunol, 2018;9:2806.

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung aller Experimente, Auswertung der Daten, Erstellen aller Abbildungen sowie Verfassen von Teilen des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel der betreuenden der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Ich danke meiner Betreuerin Prof. Elke Krüger herzlich für die anhaltende Unterstützung und Förderung dieser Promotion, den Austausch und das mir entgegengebrachte Verständnis. Meinem Betreuer Prof. Freund danke ich ebenfalls für die professionelle und freundliche Betreuung und die Flexibilität. Dr. Mages und den Mitarbeitern am RKI gilt mein besonderer Dank für Anleitung, Unterstützung und Diskussion hinsichtlich praktischer Fragen.

Ein spezieller Dank gilt meiner Familie, die mich zu jeder Zeit bestärkt und in besonderem Maße unterstützt hat.