

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt  
Rheumatologie und Klinischer Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

*Charakterisierung von niedermolekularen MHC-Klasse-II Beladungskatalysatoren (MLE)  
in vitro und in vivo*

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katharina Dickhaut

aus Bad Homburg v.d. Höhe

Gutachter: 1.: Prof. Dr. med. Falk Hiepe  
2.: Prof. Dr. rer. nat. H.-G. Rammensee  
3.: Prof. Dr. U. Heinemann

Datum der Promotion: 16. Mai 2010

## INHALTSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| ZUSAMMENFASSUNG .....   | 4  |
| EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....                             | 5  |
| METHODIK .....  | 6  |
| In vitro Verfahren .....                                      | 6  |
| In vivo Verfahren .....                                       | 6  |
| ERGEBNISSE.....   | 7  |
| Wirkungsmechanismus von MLE Verbindungen.....                 | 7  |
| Identifizierung kurzer Peptidderivate mit MLE Aktivität ..... | 9  |
| Anwendung von MLE Verbindungen in vivo.....                   | 11 |
| DISKUSSION.....   | 13 |
| LITERATURVERZEICHNIS .....                                    | 15 |
| ERKLÄRUNG ÜBER ANTEIL AN PUBLIKATIONEN.....                   | 18 |
| AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN .....                               | 19 |
| LEBENS LAUF.....  | 49 |
| PUBLIKATIONS LISTE .....                                      | 50 |
| SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG.....                              | 51 |
| DANKSAGUNG.....   | 52 |

## ZUSAMMENFASSUNG

Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) stellen eines der Schlüsselemente der adaptiven Immunabwehr dar. Als eine Familie hochpolymorpher Peptidrezeptoren präsentieren sie auf der Zelloberfläche Antigene an T-Zellen. Während MHC Moleküle normalerweise in einem intrazellulären Kompartiment beladen werden, können zumindest prinzipiell Antigene auch direkt auf der Zelloberfläche an dem Peptidrezeptor binden. Dieser Vorgang spielt insbesondere bei Peptidvakzinierungen eine Rolle, ist jedoch auf Grund der Belegung der MHC Bindungsgrube durch Peptidliganden sowie eines Inaktivierungsmechanismus des „leeren“ MHC Moleküls erschwert. In dieser Studie werden zwei Klassen organischer MHC Beladungskatalysatoren („MHC loading enhancer“; MLE) vorgestellt, welche die Peptidbeladung von humanen MHC Molekülen (HLA-DR) an der Zelloberfläche katalysieren und damit die antigenspezifische Immunantwort verstärken. Es konnte u.a. gezeigt werden, dass Adamantanethanol (AdEtOH) als einfache niedermolekulare Verbindung ebenso wie eine Klasse von kurzen Dipeptiden in der Lage sind, die Beladung sowie den Austausch von Antigenen auf HLA-DR Molekülen *in vitro* höchst effizient zu verstärken. Die katalytische Aktivität beruht hierbei auf der direkten Interaktion der MLE Verbindungen mit einer konservierten Tasche (P1) innerhalb der Peptidbindungsgrube von HLA-DR. In einer Reihe von Peptidimmunisierungen im Mausmodell konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die hier identifizierten Verbindungen die spezifische CD4+ T-Zellantwort auch *in vivo* über den hier vorgestellten Mechanismus modulieren. Über die Erhöhung der Zahl von Peptid/MHC Komplexen auf antigenpräsentierenden Zellen konnte dabei die T-Zellantwort gegen einzelne Peptide, aber auch das komplette tumorassoziierte Antigen NY-ESO-1 *in vivo* signifikant erhöht werden. Vor diesem Hintergrund stellen die hier beschriebenen MLE somit eine neue Klasse potentieller Adjuvant Additiva dar, welche die Effizienz von Peptidvakzinierungen erhöhen könnten.

## EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

CD4+ T-Zellen spielen in einer Vielzahl immunologischer Reaktionen eine zentrale Rolle. Sie stehen deshalb insbesondere in jüngerer Zeit im Fokus diverser klinischer Forschungsprojekte. Die Aktivierung von CD4+ T-Zellen über den hochspezifischen T-Zellrezeptor beruht dabei auf der Erkennung eines Peptidantigens, welches von einem speziellen Oberflächenprotein, dem so genannten Haupthistokompatibilitätskomplex Klasse II Molekül (MHC II) präsentiert wird. Die Proteine des MHC-Klasse II Komplexes werden ausschließlich auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert, wobei Liganden überwiegend aus exogener Proteinquelle stammen. Nach proteolytischer Spaltung erfolgt die Beladung mit internalisiertem Antigen intrazellulär in endosomalen Kompartimenten und unter Beihilfe eines spezifischen Chaperons, HLA-DM [1]. Um die Bindung unspezifischer Peptide zu vermeiden ist die Peptidbindungsgrube des MHC zunächst mit einem „Platzhalter“, dem sogenannten „*Invariant Chain Protein*“ assoziiert [2]. Verlieren MHC- Klasse II Moleküle nach der Beladung ihren Liganden, so führt dies schnell zu einem Kollaps der Bindungsgrube, was mit einer „nicht-rezeptiven“ Konformation des Proteins einhergeht [3]. Die Stabilisierung der rezeptiven Form stellt somit ein zentraler Schritt in der Beladung von MHC-II-Proteinen dar, welcher bei der endosomalen Beladung von HLA-DM übernommen wird. In Abwesenheit von HLA-DM ist die Peptidbeladung deshalb extrem ineffektiv [4].

Die genaue Struktur dieses inaktiven nicht-rezeptiven Zustandes ist bisher nicht bekannt; er ist lediglich dadurch gekennzeichnet, dass eine Beladung des MHC nicht mehr möglich ist. Insbesondere auf der Zelloberfläche scheint die strukturelle Inaktivierung ein wichtiger Sicherheitsmechanismus zu sein, um die unspezifische Bindung potentieller Autoantigene zu verhindern. Für Peptidvaksinierungen, für welche häufig eine direkte Beladung der Oberflächen-MHC-Moleküle erforderlich ist, stellt dies damit jedoch einen limitierenden Schritt dar. Eine Vielzahl an Forschungsprojekten beschäftigt sich daher mit der Erhöhung der Effizienz von Immunisierungen [5].

Im Rahmen dieser Studie werden mit den so genannten „*MHC Loading Enhancern*“ (MLE) niedermolekulare organische Verbindungen vorgestellt, welche in der Lage sind, die Peptidbeladung und –austausch auf humanen HLA-DR Molekülen extrem zu beschleunigen. Ziel der Studie war die genaue Charakterisierung dieser Katalysatoren sowie die Aufklärung des zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus. Weiterhin sollte erstmals die verstärkende Wirkung der MLE auf die antigenspezifische T-Zellantwort im Mausmodell *in vivo* untersucht werden.

## METHODIK

### *In vitro Verfahren*

*In vitro* Peptidbeladungsversuche wurden mittels Enzymimmunoassay (ELISA) durchgeführt. Lösliches HLA-DR, welches in unserem Labor aus transfizierten S2 Insektenzellen gewonnen wird, wurde hierfür mit angegebenen Mengen an Peptid, sowie den zu testenden MLE Verbindungen für jeweils 1h inkubiert, bevor die Peptidbeladung mittels Eu<sup>3+</sup> gekoppeltem Streptavidin im Delfia (*Dissociation-Enhanced Lanthanide Fluorescent Immunoassay*) Fluoreszenzimmunassay detektiert wurde. Für Untersuchungen an membrangebundenem HLA-DR wurden MHC-Klasse II negative Mausfibroblastenzellen (L929) mittels Lipofektion transfiziert und mit biotinyliertem Peptid für 4h beladen. Die Messung der MHCII/Peptid Komplexe an der Zelloberfläche erfolgte mittels fluoreszenzgekoppelter Streptavidinkonjugate im Durchflusszytometer (FACS). Über die spezifische Färbung von HLA-DR auf den Fibroblasten konnte hierbei die Auswertung des Peptidsignals immer auf eine standardisierte MHC-Klasse-II Expression bezogen und verglichen werden. Neben transfizierten Fibroblasten wurden weiterhin dendritische Zellen (DC) in Beladungsversuchen benutzt. Vorläuferzellen wurden hierfür aus dem Knochenmark HLA-DR transgener Mäuse isoliert und gemäß Standardprotokollen in Kultur ausdifferenziert [6]. HLA-DR exprimierende Zellen wurden weiterhin benutzt, um antigenspezifische T-Zellen zu stimulieren. Hierfür wurden die Zellen wie beschrieben beladen und nach mehrmaligem Waschen für 4h Stunden mit spezifischen T-Zellen kokultiviert. Die Analyse der T-Zellantwort erfolgte über die Detektion von sekretiertem Interleukin-2 mittels einer IL-2 abhängigen Zelllinie (CTL-L) im Sekundärassay [7].

*In silico* Analysen zur weiteren Aufklärung des Wirkungsmechanismus wurden in der Gruppe von Dr. Ronald Kühne (FMP, Berlin) mittels spezieller Dockingsoftware (Sybyl 6.92, Tripos Inc.) durchgeführt.

### *In vivo Verfahren*

Zur weiteren Analyse der Substanzen *in vivo* wurden Peptidimmunisierungen in HLA-DR1- transgenen Mäusen durchgeführt. Dafür wurden Mäuse subkutan mit Peptid immunisiert, wobei MLE in einer Konzentration von 10mM direkt dem Adjuvant (Inkomplettes Freund's Adjuvant mit CpG [8] als TLR-Agonist) beigemischt wurden. Die spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort wurde *ex vivo* über Detektion von Interferon- $\gamma$  im Durchflusszytometer sowie mittels ELISPOT (Enzyme Linked Immuno Spot Technique) analysiert. Dafür wurden Einzellsuspensionen aus Lymphknoten und Milzzellen hergestellt, welche für 6h bzw. 24h mit Peptid restimuliert wurden, bevor die Analyse mittels der genannten Methoden erfolgte. Da die Frequenz antigenspezifischer T-Zellen extrem niedrig ist, wurde für Messungen im FACS

zusätzlich zur Färbung des Oberflächenmoleküls CD4 der aktivierungsspezifische Marker CD40L (CD154) herangezogen. Mittels intrazellulärer Färbung konnte so die spezifische IFN $\gamma$ -Sekretion antigenspezifisch aktivierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen untersucht werden.

Für statistische Zwecke wurden für Immunisierungsexperimente Gruppengrößen von bis zu zehn Mäusen gewählt und die Signifikanz der Ergebnisse mittels *t* Test nach student überprüft.

## ERGEBNISSE

Frühere Studien haben gezeigt, dass MHCII/Peptid Komplexe bis zu 100h auf der Zelloberfläche an T-Zellen präsentiert werden können [3]. Während dieser Zeit kommt es jedoch zum stetigen Abdiffundieren von Liganden aus dem Komplex, was zum Vorhandensein leerer MHC Moleküle auf der Zelloberfläche von APC führt [9]. Die unspezifische Beladung der leeren Moleküle mit potentiellen Autoantigenen direkt an der Zelloberfläche wird dabei jedoch durch die spontane Überführung in eine nicht-rezeptive Form verhindert [3]. Auch wenn dieser konformelle Übergang prinzipiell reversibel ist, so liegt das Gleichgewicht deutlich auf Seiten der nicht-rezeptiven Form. In einer früheren Arbeit haben wir bereits gezeigt, dass bestimmte einfache organische Verbindungen in der Lage sind, Peptidbeladung und Ligandenaustausch in begrenztem Umfang zu beschleunigen [7]. Als potentieller Wirkungsmechanismus wurde hierbei vermutet, dass die Kleinmoleküle während des Austauschprozesses die rezeptive Konformation des MHC Moleküls stabilisieren und somit als „chemische Analoga“ des HLA-DM fungieren [10,11]

### *Wirkungsmechanismus von MLE Verbindungen*

In der hier vorgestellten Publikation „*Small Organic Compounds Enhance Antigen Loading of Class II Major Histocompatibility Complex Proteins by Targeting the Polymorphic P1 Pocket*“ von Höpner et al. [12] wird eine neue Klasse von MHC-II-Beladungskatalysatoren vorgestellt, die in der Lage sind, das Gleichgewicht in Richtung einer Peptid-rezeptiven Form sehr effektiv zu verschieben. In Beladungsversuchen von löslichem HLA-DR1-Molekülen wurde eine halbmaximale Peptidbeladung nach nur 30min erreicht, während bei unkatalysierter Reaktion durchschnittlichen etwa 20h benötigt werden. Im Gegensatz zum natürlichen Chaperon HLA-DM sind die hier beschriebenen Moleküle aus der Klasse der Adamantanverbindungen auch bei neutralem pH katalytisch aktiv. Sie können deshalb unter physiologischen Bedingungen direkt auf der Zellmembran wirken. So konnte die Beladung von HLA-DR1 transfizierter Fibroblasten mit Peptiden in Anwesenheit von AdEtOH drastisch erhöht werden. Im Hinblick auf die physiologische Relevanz ist hierbei auch besonders wichtig, dass die in Anwesenheit

von AdEtOH-beladenen Zellen extrem effektiv antigenspezifische T-Zellen stimulieren. Über die Sekretion von Interleukin-2 konnte hierbei gezeigt werden, dass die Sensitivität der T-Zellen dabei um bis zu zwei Zehnerpotenzen in Richtung geringerer Antigenkonzentrationen erhöht werden konnte.

Die Ausweitung der Versuche auf weitere allelische HLA-DR-Varianten (HLA-DR4, -DR2) ergaben eine deutliche allelspezifische Abhängigkeit der katalytischen Aktivität der Adamantylverbindungen. Für zwei HLA-DR2 assoziierte Varianten, nämlich HLA-DRB1\*1501 und -DRB5\*0101, konnte zum ersten Mal eine selektive Wirkung des Beladungskatalysators AdEtOH beobachtet werden. Im Kontext von HLA-DRB1\*0101 (DR1), HLA-DRB4\*01 01 (DR4), sowie HLA-DRB5\*0101 (DR2a) konnte die Beladung in Anwesenheit von AdEtOH drastisch erhöht werden, wohingegen überhaupt kein Einfluss des Katalysators auf die Beladung von HLA-DRB\*1501 (DR2b) beobachtet wurde. Para-Chlorphenol (pCP) hingegen, eine weitere katalytisch aktive Verbindung, welche im Rahmen der Studie untersucht wurde [10,11], zeigte keinerlei Spezifität hinsichtlich der zwei allelischen Varianten von HLA-DR2.

Eine genaue Analyse und Vergleich der Peptidsequenzen der MHC-Moleküle führte dabei zu einem Aminosäuredimorphismus des hochkonservierten Restes  $\beta$ 86 in der Antigenbindungsregion von MHC-Klasse II. In allen bisher sequenzierten HLA-DR Molekülen wird an dieser Position entweder ein Glycin ( $\beta$ 86G) oder ein Valin ( $\beta$ 86V) exprimiert [13]. Auch hinsichtlich seiner Lage ist dieser Rest von besonderem Interesse, da er maßgeblich für die Tiefe der sogenannten P1-Tasche in der Bindungsgrube von MHC-Klasse II-Molekülen verantwortlich ist [14,15]. Eine Vielzahl von Publikationen hat bereits die herausragende Rolle dieser Tasche hinsichtlich Peptidbindung und HLA-DM-vermittelter Beladung, als auch Proteinkonformation beschrieben [16]. In dieser Studie konnte nun eine eindeutige Korrelation der katalytischen Aktivität von AdEtOH mit dem jeweiligen Rest an Position  $\beta$ 86 gezeigt werden. Die Expression eines Glycins an dieser Position macht das Molekül hierbei empfänglich für die MLE-vermittelte Katalyse, ein Valin an dieser Stelle führt hingegen zur Unempfindlichkeit gegenüber AdEtOH-vermittelter Aktivität. Mittels gerichteter Mutagenese wurde durch eine einfache Aminosäuresubstitution von Valin nach Glycin an Position  $\beta$ 86 das zuvor MLE-insensitive HLA-DR2b Molekül (HLA-DRB1\*1501) für AdEtOH-vermittelte Katalyse empfänglich. Mittels der gleichen Technik konnte ebenso ein zuvor AdEtOH-sensitives Moleküle (HLA-DRB1\*0101) in eine insensitive Form überführt werden.

Basierend auf diesen Beobachtungen und mittels zusätzlicher *in silico* Analysen wurde ein Modell des Wirkungsmechanismus von AdEtOH erstellt. Dieses geht hierbei von einer direkten Interaktion des Adamantanmoleküls mit der Tasche P1 aus. Durch die Bindung von Adamantan in P1 wird eine stabile Peptidbindung simuliert, welche den Kollaps der Bindungstasche verhindert und damit eine rezeptive Konformation stabilisiert. Die Expression eines Valins an Position  $\beta$ 86 hingegen führt zu einer flacheren Tasche, in welcher der Adamantanrest keinen Platz mehr findet. Somit wirkt AdEtOH, im Folgenden als

MLE Modellverbindung verwendet, als Platzhalter, welcher, entsprechend eines „Schuhlöffels“, die Bindungsgrube über direkte Interaktion mit P1 stabilisiert und somit den MHC in eine peptid-rezeptive Form überführt. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Gruppen überein, welche eine gefüllte Tasche P1 mit einer peptid-rezeptiven Konformation des MHC- Klasse II Moleküls korrelieren konnten [16].

#### *Identifizierung kurzer Peptidderivate mit MLE Aktivität*

Die Tatsache, dass P1 unter physiologischen Bedingungen Aminosäurereste des jeweiligen Peptides bindet, legte die Vermutung nahe, dass auch Peptide selbst entsprechend dem hier vorgestelltem Modell katalytische Aktivität bei der Beladung von MHC II Molekülen zeigen. Die Publikation „*Anchor Side Chains of Short Peptide Fragments Trigger Ligand-Exchange of Class II MHC Molecules*“ von Gupta et al. [17] beschreibt hier die Ausweitung der Untersuchungen auf eine Klasse natürlicher Katalysatoren, der sogenannten Peptid-MLE. In Vorversuchen wurden hierbei eine Reihe von einzelnen Aminosäuren und Peptidfragmenten unterschiedlicher Länge synthetisiert und mit löslichen HLA-DR Molekülen getestet. Während einzelne Aminosäuren keinerlei katalytische Wirkung vermittelten, zeigte jedoch das einfache Dipeptid Tyrosin-Arginin (YR) eine dosisabhängige MLE Aktivität in entsprechenden Beladungsversuchen mit löslichem HLA-DR1. Das Dipeptid Alanin-Arginin (AR) hingegen, dem der aromatische Anker für P1 fehlt, zeigte hingegen keinerlei Aktivität, welches bereits auf eine Interaktion der Dipeptide mit P1 hinweist.

Die Stabilität der Peptidbindung in der Bindungsgrube ist maßgeblich durch ein komplexes Wasserstoffbrückennetzwerk gegeben, wobei dabei das Peptidrückgrat mit konservierten Resten des MHC-Moleküls interagiert [14]. Die Einführung einer Acetyl-, sowie Amidgruppe am N- bzw. C-Terminus des Dipeptids (Ac-YR-NH<sub>2</sub>) erfolgte zur weiteren Stabilisierung des Katalysators in der Bindungsgruppe durch die Bereitstellung zusätzlicher H-Brücken. Über *in silico* Analysen konnte hierbei bestimmt werden, dass die beschriebene Modifikation der Dipeptide zur theoretischen Ausbildung von bis zu fünf weiteren H-Brücken beiträgt. Entsprechende Beladungsversuche zeigten dementsprechend auch eine 10fache Aktivitätssteigerung von Ac-YR-NH<sub>2</sub> im Vergleich zu unmodifiziertem YR. Interessanterweise führte der Austausch der natürlicherweise vorkommenden L-Aminosäuren hin zur D-Form (Ac-yr-NH<sub>2</sub>) zum kompletten Verlust der katalytischen Aktivität. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer natürlichen Peptidstruktur, welche Voraussetzung für die MLE-MHC Interaktion und damit die katalytische Aktivität ist.

Ein hochkonserviertes H-Brückennetzwerk, sterische Einschränkungen, sowie die chemische Komposition der Bindungstaschen resultiert in einer hochspezifischen Hierarchie der MHC Peptid-

liganden entsprechend ihrer Ankerreste [18,19]. Die tiefe  $\beta$ 86G P1 Tasche von HLA-DR1 (HLA-DRB1\*0101) favorisiert dabei aromatische und, mit entsprechend geringerer Affinität, aliphatische Reste [18]. Als weiteren Beweis für eine direkte Interaktion der Peptid-MLE mit P1 wurde daher eine Reihe von Dipeptiden mit unterschiedlicher Aminosäurekomposition konstruiert. Hierbei konnte sehr deutlich eine sehr genaue Korrelation der katalytischen Aktivität mit den entsprechenden Ankerresten gezeigt werden. Erwartungsgemäß zeigten hierbei Peptid-MLE mit aromatischem Anker die höchste Aktivität (Ac-FR-NH<sub>2</sub>), wohingegen aliphatische Reste graduell die MLE-Aktivität verminderten. Neben der Katalyse von Beladungsreaktionen wurde weiterhin der Einfluss der neu identifizierten Verbindung auf die Dissoziation bereits vorgeformter Peptid-MHC-Komplexe untersucht. Dazu wurde lösliches HLA-DR1 mit einem Fragment des natürlichen Platzhalters ‚Invariant chain‘ (Ii), nämlich CLIP, beladen. Im Gegensatz zu dem in diesen Studien als Modellantigen benutzten, hochaffinen Epitop des Influenza Virus‘ (HA308-316) [20], zeigt CLIP eine mittlere Affinität zu HLA-DR1. Inkubation von HLA-DR1/CLIP mit Dipeptid alleine zeigte hierbei jedoch keinerlei Dissoziation des Komplexes. Die Anwesenheit von freiem HA-Peptid führte hingegen in Anwesenheit von Ac-FR-NH<sub>2</sub> zu einer 50%igen Reduktion der HLA-DR1/CLIP Komplexe in nur 2h, im Vergleich zu ~80h in Abwesenheit von Peptid-MLE. Somit beschleunigen die hier vorgestellten Dipeptide nicht nur die Beladung von leeren HLA-DR Molekülen, sondern sind weiterhin auch in der Lage, die Dissoziation bereits bestehender Peptid/MHC Komplexe zu katalysieren.

Basierend auf den Beobachtungen der Allelspezifität von AdEtOH in Abhängigkeit des Restes  $\beta$ 86 [12], wurden zur weiteren Beweisführung einer direkten Interaktion der Peptid-MLE mit P1 entsprechende Versuche mit mutiertem HLA-DR durchgeführt. Neben der Wildtyp-Form von HLA-DR1( $\beta$ 86G) wurden zusätzlich zwei Mutanten, nämlich DR1( $\beta$ 86G $\rightarrow$ V), sowie DR1( $\beta$ 86G $\rightarrow$ Y) [21] hergestellt. Während die natürlich vorkommende Expression von Valin an Position  $\beta$ 86 eine flacheren P1 Tasche ergibt, füllt ein Tyrosin an dieser Stelle P1 komplett aus. Somit bindet DR1( $\beta$ 86G $\rightarrow$ V) vorwiegend aliphatische Reste und kann aufgrund sterischer Hinderung keine aromatischen Aminosäuren beherbergen, wohingegen DR1( $\beta$ 86G $\rightarrow$ Y) lediglich Liganden akzeptiert, deren Bindung unabhängig von P1 auf der Interaktion mit anderen Taschen in der Bindungsgrube basiert. Erwartungsgemäß korrelierte im Kontext der drei HLA-DR1 Varianten die MLE Aktivität verschiedener Dipeptide mit deren Aminosäurekomposition. Während auf Wildtyp HLA-DR1( $\beta$ 86G) aromatische Dipeptide (WR > FR > YR > LR) die höchste Aktivität zeigten, war eine umgekehrte Hierarchie auf DR1( $\beta$ 86G $\rightarrow$ V) zu erkennen (LR > FR > WR > YR). Bei DR1( $\beta$ 86G $\rightarrow$ Y) hingegen, wo P1 komplett gefüllt vorliegt, zeigte keines der Dipeptide eine katalytische Aktivität. Als Positivkontrolle für die Beladung wurde hierbei p-Chlorphenol (pCP) benutzt, eine einfache Phenolverbindung, deren MLE-Aktivität unabhängig von P1 ist [10,11].

In einer Ausweitung der Experimente von löslichen MHC II Molekülen hin zu membrangebundenem MHC konnte zudem die Aktivität der Peptid-MLE auch bei der Beladung auf der Zelloberfläche gezeigt werden. Dies wurde mittels konfokaler Mikroskopie in Beladungsexperimenten mit T-Zellen gezeigt, welche mit fluoreszenzmarkiertem HLA-DR1 (HLA-DR1-GFP) transfiziert und biotinyliertem Peptid beladen wurden. Während in Abwesenheit von MLE kein Peptid nach Färbung mit markiertem Streptavidin detektiert werden konnte, resultierte die Anwesenheit von Ac-FR-NH<sub>2</sub> in einem deutlichen Signal auf der Zelloberfläche, welches direkt mit dem GFP-Signal des MHC-Moleküls korrelierte. Dies unterstreicht neben der katalytischen MLE Aktivität weiterhin die Spezifität der Reaktion, da kein unspezifisches Peptidsignal in Anwesenheit von Peptid-MLE registriert werden konnte. Die Ergebnisse der Experimente mittels konfokaler Mikroskopie wurden weiterhin in Zellbeladungsexperimenten mithilfe der Durchflusszytometrie (FACS) bestätigt.

Ähnlich wie zuvor mit den Adamantylverbindungen wurden auch mit den kurzen Peptid-MLE T-Zell-Aktivierungsversuche durchgeführt. So konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Beladung von HLA-DR durch Peptid-MLE direkt in einer Verstärkung der antigenspezifischen T-Zellantwort resultiert. In Anwesenheit von Dipeptid konnte die Sensitivität der T-Zellen bis zu 50fach in Richtung geringerer Peptidkonzentrationen verschoben werden. Dies bedeutet eine drastische Verminderung der Reizschwelle zur antigenspezifischen T-Zellaktivierung, die durch eine Erhöhung der MHCII/Peptid Komplexe auf der Zelloberfläche erreicht wurde. Dies konnte nicht nur für T-Zellversuche mit HLA-DR transfizierten Fibroblasten als APC gezeigt werden, sondern zusätzlich auf frisch isolierten Lymphknotenzellen HLA-DR1 transgener Mäuse. Zwölf Tage nach Immunisierung mit HA- Peptid, sowie einem DR1-restrinigiertem Tumor-assoziiertem Antigen (NY-ESO89-101) [22,23] wurde die antigenspezifische Immunantwort detektiert. Dazu wurden die frisch isolierten Lymphknotenzellen *ex vivo* mit den jeweiligen Peptiden in An- bzw. Abwesenheit von Peptid-MLE restimuliert, bevor die antigenspezifische T-Zellantwort über Interferon- $\gamma$  Sekretion im ELISpot detektiert wurde. Die Anzahl IFN $\gamma$  positiver T-Zellen war hierbei für beide verwendeten Antigene signifikant erhöht, wenn Peptid-MLE während der Restimulation präsent waren. Somit zeigen die hier vorgestellten Dipeptide zusätzlich MLE-Aktivität in primären Zellkulturen. Sie sind weiterhin in der Lage, die Antigen sensitivität endogener CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu modulieren.

#### *Anwendung von MLE Verbindungen in vivo*

Basierend auf den oben beschriebenen *in vitro* Experimenten beschreibt die Publikation „*Enhancement of tumour-specific immune responses in vivo by ‘MHC loading-enhancer’ (MLE)*“ von Dickhaut et al. [24] erste Anwendungen *in vivo*. Diese Studie konzentriert sich hierbei auf AdEtOH als MLE-

Modellverbindung, da dessen Wirkungsmechanismus in vorherigen Publikationen bereits genau aufgeklärt werden konnte. Während bisher Beladungsexperimente auf MHC- Klasse II-transfizierten Fibroblasten beschrieben wurden, ist im Hinblick auf *in vivo* Anwendungen von MLE zunächst deren katalytische Aktivität im Kontext professioneller antigenpräsentierender Zellen, nämlich Dendritischer Zellen (DC), zu untersuchen. So konnte in Beladungsversuchen mittels FACS gezeigt werden, dass die Zahl der MHCII/Peptid-Komplexe auf der Oberfläche von DC aus HLA-DR1, bzw. HLA-DR4 transgenen Mäusen in Anwesenheit von MLE stark erhöht werden konnte. Dies spiegelte sich ebenso in einer verstärkten T-Zellantwort wider.

Da die katalytische Wirkung der Adamantylverbindungen auf humane HLA-DR Moleküle begrenzt ist, wurden für die *in vivo* Experimente HLA-DR1- sowie HLA-DR4-transgene Stämme verwendet. BALB/c Mäuse dienten hierbei als Kontrolle, da die hier identifizierten MLE-Verbindungen keine Aktivität auf deren murinem MHC- Klasse-II-Molekül (H-2<sup>d</sup>) zeigen, das verwendete Modellantigen HA306-318 (HA) jedoch an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentieren werden kann [25]. HLA-DR1-transgene, sowie BALB/c Mäuse wurden subkutan mit Peptid immunisiert, wobei MLE direkt dem Adjuvant (Inkomplettes Freund's Adjuvant mit CpG als TLR-Agonist) beigemischt wurde. Zwölf Tage nach Immunisierung wurde mittels Zytokinfärbung im FACS die antigenspezifische IFN $\gamma$  Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Peptidrestimulierung detektiert. Sowohl HLA-DR1tg, als auch BALB/c Mäuse zeigten eine HA-spezifische Immunreaktion. Die Anwesenheit von MLE während der Immunisierung führte hingegen nur in MLE-sensitiven HLA-DR1tg Mäusen zu einer Verstärkung der CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort. Außerdem führte die Anwesenheit von MLE während der Vakzinierung zu keiner detektierbaren unspezifischen T-Zellaktivierung.

Die Verstärkung der Immunantwort erwies sich in größeren Versuchsgruppen (n=10) weiterhin als statistisch signifikant. Im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung von MLE wurden neben dem Modellantigen HA deshalb auch noch weitere, physiologisch relevante Epitope des tumorassoziierten Antigens NY-ESO zur Immunisierung verwendet. Mehrere HLA-DR restringierte Epitope dieses Proteins sind bereits beschrieben. Im Rahmen dieser Studie wurde sich hierbei auf das HLA-DR1 restringierte NY-ESO89-101 und das im Kontext von HLA-DR4 präsentierte NY-ESO119-143 konzentriert [22]. Ausgehend von *in vitro* Beladungsexperimenten auf HLA-DR transfizierten Fibroblasten, in denen MLE für beide NY-ESO Epitope die Beladung drastisch verstärken konnten, wurden HLA-DR1, bzw. -DR4 transgene Mäuse immunisiert. Für beide Epitope führte die Anwesenheit von MLE während der Immunisierung zu einer signifikanten Erhöhung der Zahl antigenspezifischer CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Darüber hinaus konnte zudem eine Verstärkung der Immunantwort in HLA-DR1tg Mäusen gegen das komplette NY-ESO Protein in Anwesenheit von MLE erzielt werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die hier vorgestellten MLE auch *in vivo* potente Beladungskatalysatoren darstellen, die für den potentiellen Einsatz als Additiva bei Peptidvakzinierungen in Frage kommen. Mittels einer Erhöhung der Anzahl von MHCII/Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche von APC *in vivo* kann dabei die Effizienz von Immunisierungen erhöht werden, wobei die Reaktion hochspezifisch bleibt, da MLE lediglich im Kontext von MHC- Klasse II Molekülen katalytisch wirksam sind.

## DISKUSSION

In den hier besprochenen Publikationen werden zwei verschiedene Typen von MHC Beladungskatalysatoren vorgestellt, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* extrem effizient die Peptidbeladung und –austausch auf HLA-DR Molekülen katalysieren. Für Adamantanethanol (AdEtOH), einer Modellverbindung der niedermolekularen MLE, sowie mehrere peptidbasierte MLE konnte nicht nur deren katalytische Aktivität in diversen *in vitro* Versuchen gezeigt werden, sondern zudem auch noch ein sehr exaktes Modell des spezifischen Wirkungsmechanismus entworfen werden. Dieses beruht dabei für beide Klassen auf der direkten Interaktion der MLE mit der Tasche P1 in der Bindungsregion von MHC- Klasse II Molekülen. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die MLE-Aktivität klar mit einem einzelnen Aminosäuredimorphismus an Position  $\beta 86$  von HLA-DR korreliert. Ähnlich der Wirkung des natürlichen Gegenparts HLA-DM kommt es dabei über eine direkte Interaktion der Substanzen mit P1 zu einer Stabilisierung einer Peptid-rezeptiven Konformation, welche in einer Erhöhung der Beladungseffizienz resultiert. Im Gegensatz zu HLA-DM sind MLE jedoch dazu in der Lage, MHC- Klasse II Moleküle bei physiologischem pH direkt an der Zelloberfläche und mit exogenem Antigen zu beladen.

Insbesondere im Hinblick auf die Vielzahl neuer therapeutischer Ansätze zur Tumorstimmulierung stellen MLE eine interessante, neue Alternative zur Modulation bestehender Protokolle dar. Gegenüber bereits erprobten Methoden zur Erhöhung der Effizienz von Immunisierungen, welche überwiegend auf der Konstruktion komplexer Antikörper-Peptid-Chimäre zum gezielten Transfer an APC beruhen [26,27], stellen MHC Beladungskatalysatoren eine kostengünstige und sehr einfache Alternative dar. Die hier vorgestellten Studien konnten zeigen, dass die Anwesenheit von MLE während der Peptidvakzinierung zu einer Erhöhung der Zahl von MHCII/Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche von APC führt, welches wiederum die CD4+ Immunantwort verstärkt. Während lange Zeit vornehmlich CD8+ Epitope bei Tumorstimmulierungen zur Anwendung kamen, zeigen eine Reihe neuerer Studien, dass insbesondere CD4+ T-Zellen maßgeblichen Anteil an einer tumorspezifischen Immunantwort besitzen [28,29]. Dabei stellt die Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen, welche unkatalysiert an der Zelloberfläche ein extrem ineffizienter Prozess ist, einen der limitierenden Schritte dar. Dem kann man

meist nur mit einer Erhöhung der Antigenkonzentration entgegenwirken. MHC Beladungskatalysatoren können somit eine große Bedeutung bei innovativen Immunisierungsstrategien erlangen und herkömmlichen Adjuvantien eine ganz neue Qualität hinzufügen. Im Hinblick auf die erforderliche hohe wirksame Konzentration *in vivo* muss darauf hingewiesen werden, dass es sich bei den hier vorgestellten Substanzen noch um MLE Substanzen der ersten Generation handelt, die noch einer intensiven Verbesserung bedürfen, bevor ein potentieller Einsatz in der Klinik in Betracht zu ziehen ist. Eine weitere offene Frage ist weiterhin, ob und in wie weit die Aufhebung des nichtrezeptiven Zustandes, welcher physiologisch als natürlichen Schutzmechanismus fungiert, durch die MLE an der Ausbildung allergischer oder autoreaktiver Reaktionen beteiligt sein könnte. Dies gilt sowohl für die hier untersuchten Verbindungsklassen, hier als Adjuvant Additiv vorgestellt, als aber auch für mögliche „natürliche“ MLE Verbindungen, welche durch einen ähnliche Mechanismus als Risikofaktoren für Allergien oder Autoimmunerkrankungen wirken könnten. Weitere Untersuchungen sind notwendig um diese Fragen abschließend klären zu können.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Sloan VS, Cameron P, Porter G, Gammon M, Amaya M, et al. (1995) Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature* 375: 802-806.
2. Riberdy JM, Newcomb JR, Surman MJ, Barbosa JA, Cresswell P (1992) HLA-DR molecules from an antigen-processing mutant cell line are associated with invariant chain peptides. *Nature* 360: 474-477.
3. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A (1997) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* 388: 782-787.
4. Joshi RV, Zarutskie JA, Stern LJ (2000) A three-step kinetic mechanism for peptide binding to MHC class II proteins. *Biochemistry* 39: 3751-3762.
5. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M (2009) New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 30: 23-32.
6. Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, et al. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176: 1693--1702.
7. Falk K, Lau JM, Santambrogio L, Esteban VM, Puentes F, et al. (2002) Ligand exchange of major histocompatibility complex class II proteins is triggered by H-bond donor groups of small molecules. *J Biol Chem* 277: 2709-2715.
8. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV (1997) CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186: 1623-1631.
9. Santambrogio L, Sato AK, Fischer FR, Dorf ME, Stern LJ (1999) Abundant empty class II MHC molecules on the surface of immature dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 15050-15055.
10. Marin-Esteban V, Falk K, Rötzschke O (2003) Small-molecular compounds enhance the loading of APC with encephalitogenic MBP protein. *J Autoimmun* 20: 63--69.
11. Marin-Esteban V, Falk K, Rötzschke O (2004) "Chemical analogues" of HLA-DM can induce a peptide-receptive state in HLA-DR molecules. *J Biol Chem* 279: 50684--50690.
12. Höpner S, Dickhaut K, Hofstätter M, Krämer H, Rückerl D, et al. (2006) Small organic compounds enhance antigen loading of class II major histocompatibility complex proteins by targeting the polymorphic P1 pocket. *J Biol Chem* 281: 38535--38542.
13. Ong B, Willcox N, Wordsworth P, Beeson D, Vincent A, et al. (1991) Critical role for the Val/Gly86 HLA-DR beta dimorphism in autoantigen presentation to human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 7343-7347.
14. Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Urban RG, et al. (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature* 368: 215-221.

15. Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW (1998) Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein. *J Exp Med* 188: 1511-1520.
16. Chou CL, Sadegh-Nasseri S (2000) HLA-DM recognizes the flexible conformation of major histocompatibility complex class II. *J Exp Med* 192: 1697-1706.
17. Gupta S, Höpner S, Rupp B, Günther S, Dickhaut K, et al. (2008) Anchor side chains of short peptide fragments trigger ligand-exchange of class II MHC molecules. *PLoS ONE* 3: e1814.
18. Rammensee HG, Bachman J, Stevanovic S (1997) *MHC Ligands and Peptide Motifs*. Austin, TX: Springer Verl; Landis Biosciences.
19. Fleckenstein B, Kalbacher H, Muller CP, Stoll D, Halder T, et al. (1996) New ligands binding to the human leukocyte antigen class II molecule DRB1\*0101 based on the activity pattern of an undecapeptide library. *Eur J Biochem* 240: 71-77.
20. Lamb JR, Eckels DD, Lake P, Woody JN, Green N (1982) Human T-cell clones recognize chemically synthesized peptides of influenza haemagglutinin. *Nature* 300: 66-69.
21. Sato AK, Zarutskie JA, Rushe MM, Lomakin A, Natarajan SK, et al. (2000) Determinants of the peptide-induced conformational change in the human class II major histocompatibility complex protein HLA-DR1. *J Biol Chem* 275: 2165-2173.
22. Chen Q, Jackson H, Parente P, Luke T, Rizkalla M, et al. (2004) Immunodominant CD4+ responses identified in a patient vaccinated with full-length NY-ESO-1 formulated with ISCOMATRIX adjuvant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 9363-9368.
23. Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Türeci O, Gure AO, et al. (1997) A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1914-1918.
24. Dickhaut K, Hoepner S, Eckhard J, Wiesmueller KH, Schindler L, et al. (2009) Enhancement of tumour-specific immune responses in vivo by 'MHC loading-enhancer' (MLE). *PLoS One* 4: e6811.
25. French RA, Tang XL, Anders EM, Jackson DC, White DO, et al. (1989) Class II-restricted T-cell clones to a synthetic peptide of influenza virus hemagglutinin differ in their fine specificities and in the ability to respond to virus. *J Virol* 63: 3087-3094.
26. Tacke PJ, de Vries IJM, Gijzen K, Joosten B, Wu D, et al. (2005) Effective induction of naive and recall T-cell responses by targeting antigen to human dendritic cells via a humanized anti-DC-SIGN antibody. *Blood* 106: 1278-1285.
27. Mahnke K, Guo M, Lee S, Sepulveda H, Swain SL, et al. (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J Cell Biol* 151: 673-684.

28. Toes RE, Ossendorp F, Offringa R, Melief CJ (1999) CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 189: 753--756.
29. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, et al. (1998) The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med* 188: 2357--2368.

## ERKLÄRUNG ÜBER ANTEIL AN PUBLIKATIONEN

### *Publikation 1:*

**Dickhaut K**, Hoepner S, Eckhard J, Wiesmueller KH, Schindler L, Jung G, Falk K, Roetzschke O. (2009).

„Enhancement of tumour-specific immune responses in vivo by 'MHC loading-enhancer' (MLE)“

*Beitrag:* 50%

Design und Durchführung eines Großteils der *in vitro* Zellbeladungsexperimente. Etablierung und Durchführung großer Teile der Mausexperimente. Etablierung der FACS Analysen. Selbstständiges Verfassen des Manuskripts.

### *Publikation 2:*

Gupta S, Höpner S, Rupp B, Günther S, **Dickhaut K**, Agarwal N, Cardoso MC, Kühne R, Wiesmüller KH, Jung G, Falk K, Röttschke O. (2008).

"Anchor side chains of short peptide fragments trigger ligand-exchange of class II MHC molecules."

*Beitrag:* 15%

Durchführung und Mithilfe von *in vitro* Experimenten mit primären Zellen sowie Diskussion und Analyse der Daten und des experimentellen Designs.

### *Publikation 3:*

Höpner S, **Dickhaut K**, Hofstätter M, Krämer H, Rückerl D, Söderhäll JA, Gupta S, Marin-Esteban V, Kühne R, Freund C, Jung G, Falk K, Röttschke O. (2006).

"Small organic compounds enhance antigen loading of class II major histocompatibility complex proteins by targeting the polymorphic P1 pocket."

*Beitrag:* 40%

Design und Durchführung eines Großteils der Zellbeladungsexperimente mittels ELISA oder Durchflusszytometer. Mitarbeit bei der Generierung der HLA-DR Mutanten mittels PCR basierter Mutagenese und anschließende Transfektionen. Mitarbeit am Verfassen der Publikation.

## AUSGEWÄHLTE PUBLIKATIONEN

### *Publikation 1:*

**Dickhaut K**, Hoepner S, Eckhard J, Wiesmueller KH, Schindler L, Jung G, Falk K, Roetzschke O. (2009). PLoS One 4: e6811.

„Enhancement of tumour-specific immune responses in vivo by 'MHC loading-enhancer' (MLE)“

*Publikation 2:*

Gupta S, Höpner S, Rupp B, Günther S, **Dickhaut K**, Agarwal N, Cardoso MC, Kühne R, Wiesmüller KH, Jung G, Falk K, Rötzschke O. (2008). PLoS ONE 3: e1814.

"Anchor side chains of short peptide fragments trigger ligand-exchange of class II MHC molecules."

*Publikation 3:*

Höpner S, **Dickhaut K**, Hofstätter M, Krämer H, Ruckerl D, Söderhäll JA, Gupta S, Marin-Esteban V, Kühne R, Freund C, Jung G, Falk K, Rötzschke O. (2006). J Biol Chem 281: 38535--38542.

"Small organic compounds enhance antigen loading of class II major histocompatibility complex proteins by targeting the polymorphic P1 pocket."

## LEBENS LAUF

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

## PUBLIKATIONSLISTE

### *Journalbeiträge*

---

**Dickhaut K**, Hoepner S, Eckhard J, Wiesmueller KH, Schindler L, Jung G, Falk K, Roetzschke O. (2009). PLoS One 4: e6811.

„Enhancement of tumour-specific immune responses in vivo by 'MHC loading-enhancer' (MLE)“

Gupta S, Höpner S, Rupp B, Günther S, **Dickhaut K**, Agarwal N, Cardoso MC, Kühne R, Wiesmüller KH, Jung G, Falk K, Röttschke O. (2008). PLoS ONE 3: e1814.

"Anchor side chains of short peptide fragments trigger ligand-exchange of class II MHC molecules."

Höpner S, **Dickhaut K**, Hofstätter M, Krämer H, Rückerl D, Söderhäll JA, Gupta S, Marin-Esteban V, Kühne R, Freund C, Jung G, Falk K, Röttschke O. (2006). J Biol Chem 281: 38535--38542.

"Small organic compounds enhance antigen loading of class II major histocompatibility complex proteins by targeting the polymorphic P1 pocket."

### *Poster und Vorträge*

---

Höpner S, **Dickhaut K**, Hofstätter M, Krämer H, Rückerl D, Söderhäll JA, Gupta S, Marin-Esteban V, Kühne R, Freund C, Jung G, Falk K, Röttschke O.

“Catalytic exchange of class II MHC ligands: small molecules as allele-specific enhancers of immune responses.”

16 European Congress of Immunology, 1st joint Meeting of European National Societies of Immunology, Paris 2006. (Poster)

K. Dickhaut, F. Puentes, K. Müller, K. Falk, Röttschke O.

“Induction of antigen-specific tolerance in autoimmune disorders by utilizing parasite derived structures.”

PhD Retreat of the Helmholtz Graduate School 'Molecular Cell Biology' 2007. (Poster)

K. Dickhaut, F. Puentes, K. Falk, Röttschke O.

“Induction of antigen-specific tolerance by repeat antigens.”

10<sup>th</sup> anniversary PhD Retreat of the Helmholtz Graduate School 'Molecular Cell Biology' 2008. (Vortrag)

## SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Katharina Dickhaut, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung von niedermolekularen MHC- Klasse II Beladungskatalysatoren (MLE) *in vitro* und *in vivo*“ von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, dass die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig an entsprechender Stelle in der Arbeit angegeben sind.

Berlin, den 16.11.2009

## DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei Dr. Kirsten Falk und Dr. Olaf Röttschke für die Vergabe der Aufgabe und die Betreuung der Arbeit bedanken. Vorallem auch für zahlreiche interessante Diskussionen und Diskurse in jegliche Winkel der Biologie, die in mir die Lust an wissenschaftlichem Arbeiten geweckt haben.

Für die praktische, aber auch moralische Unterstützung und vorallem dem Spaß im Labor bedanke ich mich beim kompletten wilden Team: Sebastian Günther, Markus Kleinewietfeld, Alexander Sternjak, Mireille Starke, Shashank Gupta, Reiner Mailer, Sabrina Kleissle und Sonja Eising. Ganz besonderer Dank geht hierbei an Sabine Höpner, die lange Nächte in finsternen Laborkorridoren mit mir verbracht hat, oft das einzige menschliche Lebewesen mit mir im Nagerlager war und mich immer wieder motiviert und zum Lachen gebracht hat.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Prof. Falk Hiepe, der mich von Beginn an und vorallem auch in letzter Sekunde unterstützt und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Meiner lieben Familie danke ich für das Vertrauen und die Unterstützung jeglicher Art- weit über diese Arbeit hinaus! Mit dem Wissen, immer weich zu fallen, wagt man mehr. Für Kurzurlaube auf Balkonien und die gesunde Dosis Wahnsinn in meinem Leben sage ich Dir Danke, Janine!

Zuletzt ein ganz besonderer Dank an meinen Kleenen, der unvorstellbare Geduld mit mir zeigt und nicht selten als Krisenhelfer und Seelenklempner Aufbauhilfe geleistet hat. Ohne Dich würde ich in diesem Moment nicht diese Danksagung tippen!