

**Hefezellen als neuartiges Vehikel
für ein zielgerichtetes Delivery
in phagozytierende Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Biologin
Ruth Maria Kiefer

Saarbrücken

2019

Tag des Kolloquiums: 25.06.2019
Dekan: Prof. Dr. Guido Kickelbick
Prüfungsausschuss:
1. Berichterstatter: PD Dr. Frank Breinig
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Marc Schneider
Vorsitzender: Prof. Dr. Gert-Wieland Kohring
Akademischer Mitarbeiter: Dr. Gilles Gasparoni

,The difference between winning and losing is most often not quitting'

- Walt Disney

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Publikationen:

Barbara Walch-Rückheim, **Ruth Kiefer**, Gernot Geginat, Manfred J. Schmitt und Frank Breinig (2016): Coexpression of human perforin improves yeast-mediated delivery of DNA and mRNA to mammalian antigenpresenting cells. *Gene Ther.* 23, 103–107.

Elisabeth E. Kenngott, **Ruth Kiefer**, Nicole Schneider-Daum, Alf Hamann, Marc Schneider, Manfred J. Schmitt und Frank Breinig (2016): Surface-modified yeast cells: A novel eukaryotic carrier for oral application. *J Control Release* 224, 1–7.

Ruth Kiefer, Marijas Jurisic, Charlotte Dahlem, Marcus Koch, Manfred J. Schmitt, Alexandra Kiemer, Marc Schneider und Frank Breinig (2019): Targeted delivery of functionalized PLGA nanoparticles to macrophages using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a carrier. *Zur Publikation eingereicht.*

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------|---|
| AIDS | „Acquired Immuno Deficiency Syndrom“ |
| Amp | Ampicillin |
| AOX | Alkohol-Oxidase |
| APC | „antigen presenting cell“ |
| BCG | Bacillus Calmette–Guerin |
| BLAST | „Basic Local Alignment Search Tool“ |
| bp | Basenpaare |
| BSA | bovines Serumalbumin |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| CEA | carcinoembryonales Antigen |
| CFSE | Carboxyfluorescein-Succinimidylester |
| CLIP | „class II associated Ii peptide“ |
| CMV | Cytomegalievirus |
| cNP | Chitosan-PLGA-Nanopartikel |
| CTL | „cytotoxic T-cell“ |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DC | „dendritic cell“ |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNTP | Desoxynukleosidtriphosphat |
| d/o | „drop out“ |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| eGFP | „enhanced green fluorescent protein“ |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| FACS | „fluorescence activated cell sorting“ |
| FAE | Follikel-assoziiertes Epithel |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |
| FKS | fötales Kälberserum |
| FSC | „forward scatter“ |
| GALT | „gut associated lymphoid tissue“ |
| GILZ | „Glucocorticoid-induced Leucine Zipper“ |

| | |
|----------------|---|
| GLB | „gel loading buffer“ |
| GRAS | „generally recognized as safe“ |
| GTE | Glukose/Tris/EDTA |
| HIV | „human immunodeficiency virus“ |
| HLA | „human leukocyte antigen“ |
| iDC | „immature dendritic cell“ |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IPTG | Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid |
| IRES | „internal ribosomal entry site“ |
| LB | „lysogeny broth“ |
| LiAc | Lithiumacetat |
| LLO | Listeriolysin |
| MIIC | „MHC class II compartment“ |
| MCS | „multiple cloning site“ |
| mDC | „mature dendritic cell“ |
| MHC | „major histocompatibility complex“ |
| MOI | „multiplicity of infection“ |
| MOPS | 3-(<i>N</i> -Morpholino)propansulfonsäure |
| mRNA | „messenger“ RNA |
| MyD88 | „myeloid differentiation primary response 88“ |
| NF- κ B | „nuclear factor-kappaB“ |
| OD | Optische Dichte |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAMP | „pathogen associated molecular pattern“ |
| PBMC | „peripheral blood mononuclear cells“ |
| PBS | „phosphate buffered saline“ |
| PCR | „polymerase chain reaction“ |
| PE | Phycoerythrin |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PEI | Polyethylenimin |
| PLGA | „poly lactic-co-glycolic acid“ |
| PMA | Phorbol-12-myristat-13-acetat |
| PRR | „pattern recognition receptor“ |

| | |
|------------|---|
| PSL | Polystyrol-Latex |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SSC | „side scatter“ |
| TAP | „transporter associated with antigen presentation“ |
| <i>Taq</i> | <i>Thermus aquaticus</i> |
| TBE | Tris/Borsäure/EDTA |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TCR | „T cell receptor“ |
| TE | Tris/EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TLR | „toll-like receptor“ |
| TNF | Tumor-Nekrose-Faktor |
| TRIF | „TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β “ |
| U | „unit“ |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| UV | Ultraviolett |
| v/v | „volume per volume“ |
| w/v | „weight per volume“ |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxyl- β -D-Galactopyranosid |
| YNB | „yeast nitrogen base“ |
| YPD | „yeast extract/peptone/dextrose“ |

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| ABSTRACT | 1 |
| I. EINLEITUNG | 2 |
| 1. DAS IMMUNSYSTEM | 2 |
| 1.1. Das angeborene Immunsystem | 2 |
| 1.2. Das adaptive Immunsystem | 3 |
| 1.3. Antigen-präsentierende Zellen..... | 4 |
| 2. IMPFSTOFFE | 7 |
| 2.1 Lebendimpfstoffe..... | 8 |
| 2.2 Totimpfstoffe | 9 |
| 2.3 Genetische Immunisierung | 10 |
| 3. DELIVERY-SYSTEME | 10 |
| 3.1. Nanopartikel..... | 11 |
| 3.2. Hefen..... | 12 |
| 4. ZIELE DER ARBEIT | 14 |
| II. MATERIAL UND METHODEN..... | 15 |
| 1. ORGANISMEN..... | 15 |
| 1.1. Bakterienstämme | 15 |
| 1.2. Hefestämme | 15 |
| 1.3. Zelllinien..... | 16 |
| 1.4 Versuchstiere | 16 |
| 2. NÄHRMEDIEN UND KULTIVIERUNGSBEDINGUNGEN | 17 |
| 2.1. Bakterien..... | 17 |
| 2.2. Hefen..... | 18 |
| 2.3. Säugerzellen..... | 19 |
| 3. KRYOKULTUREN..... | 20 |
| 3.1. Kryokulturen von Bakterien und Hefen..... | 20 |
| 3.2. Einfrieren von Säugerzellen..... | 20 |
| 3.3. Auftauen von Säugerzellen | 20 |
| 4. PLASMIDE | 21 |
| 5. OLIGONUKLEOTIDE | 22 |
| 6. POLYMERASE-KETTENREAKTION | 23 |
| 7. SEQUENZIERUNG | 24 |
| 8. AGAROSEGELELEKTROPHORESE | 24 |
| 9. DNA-REISOLIERUNG AUS AGAROSEGELEN..... | 25 |

| | |
|--|----|
| 10. ACCEPTOR-CLONING | 25 |
| 11. DNA-RESTRIKTION | 26 |
| 12. DNA-LIGATION | 27 |
| 13. DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG | 27 |
| 14. DNA-ISOLIERUNG | 28 |
| 14.1. Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen | 28 |
| 14.2. Plasmidisolierung aus Bakterien..... | 28 |
| 14.2.1. Alkalische Lyse | 28 |
| 14.2.2. innuPREP Plasmid Mini Kit..... | 29 |
| 15. TRANSFORMATIONSMETHODEN | 30 |
| 15.1. Bakterien..... | 30 |
| 15.2. Hefen..... | 31 |
| 16. ZELLZAHLBESTIMMUNG | 32 |
| 16.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl bei Hefezellen..... | 32 |
| 16.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl bei Säugerzellen..... | 32 |
| 16.3. Bestimmung der Optischen Dichte | 33 |
| 17. ZELLAUFSCHLUSS VON HEFEZELLEN | 33 |
| 18. SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE) | 34 |
| 19. WESTERN BLOT-ANALYSE..... | 36 |
| 20. VITALITÄTSBESTIMMUNG | 37 |
| 20.1. Propidiumiodid | 37 |
| 20.2. MTT-Assay | 37 |
| 21. FLUORESZENZFÄRBUNG | 38 |
| 21.1. Indirekte Immunfluoreszenz | 38 |
| 21.2. Intrazelluläre Cytokinfärbung..... | 38 |
| 21.3. Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Pentameren..... | 39 |
| 22. DURCHFLUSSCYTOMETRIE | 40 |
| 23. FLUORESZENZMIKROSKOPIE | 41 |
| 23.1. Epifluoreszenzmikroskopie | 41 |
| 23.2. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM) | 41 |
| 24. TRANSMISSIONS-ELEKTRONENMIKROSKOPIE..... | 42 |
| 25. SERUMGEWINNUNG AUS HUMANEM VOLLBLUT | 42 |
| 26. OPSONISIERUNG VON HEFEZELLEN..... | 42 |
| 27. <i>IN VITRO</i> DIFFERENZIERUNG VON HUMANEN MAKROPHAGEN..... | 42 |
| 28. IMMUNISIERUNG VON MÄUSEN..... | 43 |
| 29. MILZENTNAHME UND HERSTELLUNG EINER EINZELZELLSUSPENSION | 43 |
| 30. NANOPARTIKEL | 44 |
| 31. STATISTIK | 44 |

| | |
|--|------------|
| III. ERGEBNISSE | 45 |
| 1. OPTIMIERUNG DES HEFE-BASIERTEN DELIVERY-SYSTEMS | 45 |
| 1.1. Steigerung der immunstimulatorischen Wirkung von Hefezellen durch rekombinante Flagellinexpression | 45 |
| 1.1.1. Heterologe Expression des Flagellinderivats FliC in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 46 |
| 1.1.2. Einfluss der subzellulären Lokalisation von Flagellin in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> auf die Aktivierung von Makrophagen..... | 48 |
| 1.2. Optimierung des Nukleinsäure-Deliverys durch Koexpression von Perforin | 49 |
| 2. ANWENDUNG DES HEFE-BASIERTEN DELIVERY-SYSTEMS <i>IN VIVO</i> | 50 |
| 2.1. Oberflächenmodifikation von Hefezellen zur verbesserten Aufnahme nach oraler Applikation | 51 |
| 2.2. Nachweis einer Antigen-spezifischen Immunreaktion in Mäusen nach Vakzinierung mit rekombinanten Hefen..... | 53 |
| 3. ZIELGERICHTETES DELIVERY FUNKTIONALISierter NANOPARTIKEL MIT HILFE VON HEFEZELLEN..... | 57 |
| 3.1. Interaktion von Hefezellen mit PLGA-Partikeln | 59 |
| 3.2 Wirkung von PLGA-Partikeln auf Hefezellen..... | 65 |
| 3.3 Aufnahme von cNP/Hefe-Komplexen durch Makrophagen | 66 |
| IV. DISKUSSION | 74 |
| OPTIMIERUNG DES HEFE-BASIERTEN DELIVERY-SYSTEMS..... | 75 |
| <i>IN VIVO</i> -STUDIEN ZUR ÜBERPRÜFUNG DER ANWENDBARKEIT VON HEFEN ALS DELIVERYVEHIKEL..... | 77 |
| cNP/HEFE-KOMPLEXE ALS NEUARTIGE „NANO-IN-MICRO“ CARRIER | 80 |
| AUSBLICK | 86 |
| ZUSAMMENFASSUNG | 88 |
| LITERATURVERZEICHNIS | 90 |
| DANKSAGUNG | 102 |

Abstract

The specific targeting of phagocytic cells is a particularly promising tool for preventing infections as well as treating a wide variety of diseases (e.g. Alzheimer's disease, arthritis and cancer) using active immunotherapy. Yeast cells are naturally taken up by phagocytic cells and have been successfully used as a vehicle in many studies. In this work already established systems could be further optimized; thus, both the expression of flagellin and of human perforin led to an improvement of the yeast-based delivery system by enhancing the immunostimulatory effect on macrophages resp. by increasing the delivery efficiency into phagocytic cells. Furthermore, *in vivo* experiments have confirmed that invasin-expressing yeast can be used as an efficient vehicle for oral administration. In addition, the interaction between different yeast genera and chitosan-coated PLGA particles was characterized and a nano-in-micro carrier was established, which allows a targeted delivery of nanoparticles into macrophages. This novel combination of nanoparticles and yeast cells would significantly expand the possibilities of delivery systems used so far with regard to specificity, capacity and efficiency.

Das gezielte Targeting phagozytischer Zellen stellt eine besonders vielversprechende Möglichkeit dar, um mittels aktiver Immuntherapie sowohl Infektionen vorzubeugen als auch verschiedenste Erkrankungen (z. B. Alzheimer, Arthritis und Krebs) zu therapieren. Hefezellen werden natürlicherweise von phagozytischen Zellen aufgenommen und konnten in mehreren Studien erfolgreich als Vehikel eingesetzt werden. In dieser Arbeit konnten bereits etablierte Systeme weiter optimiert werden; so führten sowohl die Expression von Flagellin als auch von humanem Perforin durch Verstärkung des immunstimulatorischen Effekts auf Makrophagen bzw. durch Steigerung der Delivery-Effizienz in phagozytische Zellen zu einer Verbesserung des Hefe-basierten Delivery-Systems. Weiterhin konnten *in vivo*-Versuche bestätigen, dass Invasin-exprimierende Hefen als effizientes Vehikel für eine orale Applikation eingesetzt werden können. Darüber hinaus wurde die Interaktion zwischen verschiedenen Hefegattungen und Chitosan-beschichteten PLGA-Partikeln charakterisiert und ein „nano-in-micro“ Carrier etabliert, welcher ein zielgerichtetes Delivery von Nanopartikeln in Makrophagen ermöglicht. Diese neuartige Kombination aus Nanopartikeln und Hefezellen würde die Möglichkeiten bislang eingesetzter Delivery-Systeme hinsichtlich Spezifität, Kapazität und Effektivität deutlich erweitern.

I. Einleitung

1. Das Immunsystem

Im Laufe der Evolution haben mehrzellige Lebewesen ein Abwehrsystem entwickelt, um sich vor Pathogenen, wie Viren, Bakterien und Pilzen zu schützen. Abgesehen von körperfremden Substanzen werden auch fehlerhafte körpereigene Zellen von verschiedenen Proteinen und Zellen des Immunsystems (Latein: immunis - unberührt, frei, rein) erkannt und zerstört. Die Abwehr infektiöser Partikel wird entsprechend ihres Entwicklungszeitpunktes in eine angeborene und eine adaptive Immunantwort unterteilt.

1.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem umfasst evolutionär hochkonservierte Abwehrmechanismen, welche auch schon in Invertebraten und sogar Pflanzen vorkommen. Neben physikalischen und chemischen Barrieren, wie Epithelien und dem sauren pH-Wert des Magensaftes, umfasst das angeborene Immunsystem auch zelluläre Bestandteile. Makrophagen, Granulocyten und Natürliche Killerzellen sind zudem in der Lage in den Körper eingedrungene Krankheitserreger unspezifisch über „pattern recognition receptors“ (PRR) zu erkennen und zu eliminieren. Diese Rezeptoren, zu denen beispielsweise „toll-like“ Rezeptoren (TLR) gehören, erkennen „Pathogen Associated Molecular Patterns“ (PAMP), wie Nukleinsäuren und Lipopolysaccharide, und können durch Interaktion mit Adapterproteinen, vor allem „myeloid differentiation primary response 88“ (MyD88) und „TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β “ (TRIF), Signalkaskaden auslösen. Diese führen wiederum zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie NF- κ B und Interferon-regulierende Faktoren (IRF), welche die Produktion proinflammatorischer Proteine initiieren. Ein weiterer wichtiger Bestandteil der angeborenen Immunantwort sind lösliche Faktoren, die körperfremde Partikel zusätzlich markieren und zu einer Verstärkung der Immunantwort führen können. Zu ihnen gehören Typ I-Interferone, Komplementproteine, akute-Phase-Proteine, Cytokine und Lysozym. Durch das Zusammenspiel dieser Mechanismen können Erreger schnell und effizient bekämpft und eine Infektion kann bis zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems eingedämmt werden (Janeway *et al.*, 2002).

1.2. Das adaptive Immunsystem

Die Aktivierung des adaptiven Immunsystems setzt erst vier bis sieben Tage nach Beginn der Infektion ein. Ist ein Pathogen dem angeborenen Immunsystem entkommen, so kann es nun gezielt durch das adaptive Immunsystem abgetötet werden. Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC), zu denen Makrophagen, Dendritische Zellen (DC) und B-Lymphocyten gehören, nehmen Antigene der Erreger in nicht-lymphatischen Geweben auf und präsentieren diese mittels „major histocompatibility complex“ (MHC)-Molekülen auf ihrer Oberfläche. Die so präsentierten Antigenfragmente werden von naiven T-Lymphocyten mit Hilfe des T-Zellrezeptors (TCR) erkannt, was wiederum die Proliferation und Differenzierung zu $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H -Zellen) oder $CD8^+$ cytotoxischen T-Zellen (CTL) stimuliert. Für diese Aktivierung der T-Zellen, die auch als Priming bezeichnet wird, werden zusätzlich zur Antigenpräsentation kostimulatorische Signale, die durch den Rezeptor CD28 erkannt werden, benötigt. Zu diesen Signalen gehören die von DCs exprimierte Oberflächenmoleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) (Bachmann *et al.*, 1999).

Die klassische Einteilung der $CD4^+$ T-Lymphocyten unterscheidet T_H1 - und T_H2 -Zellen, welche sich in ihrer Funktion sowie im jeweiligen Sekretionsprofil voneinander abgrenzen. T_H1 -Zellen spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Makrophagen und sezernieren vor allem Cytokine wie Interferon γ ($INF\gamma$), Tumor-Nekrose-Faktor α ($TNF\alpha$) und $TNF\beta$, welche neben ihrer antiviralen Funktion auch zur Hochregulierung zellulärer Komponenten wie z. B. MHC-Molekülen führen. T_H2 -Zellen hingegen unterstützen durch Sekretion verschiedener Interleukine und Interferone die Proliferation von B-Lymphocyten und deren Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen (Leung & Ada, 1982). Neben den bekannten T_H1 - und T_H2 -Effektorzellen wurde mittlerweile ein weiterer Subtyp beschrieben, der aufgrund der Sekretion von IL-17 als T_H17 bezeichnet wird. Neben der Beseitigung von Pathogenen, die nicht von T_H1 - und T_H2 -Zellen adressiert werden, spielen T_H17 -Zellen eine wichtige Rolle in der mukosalen Homöostase (Weaver *et al.*, 2006). Abgesehen von Effektorzellen können $CD4^+$ Zellen allerdings auch zu regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) differenziert werden. Diese besitzen durch Expression des Transkriptionsrepressors *FOXP3* die Fähigkeit T-Zellantworten zu unterdrücken und somit Autoimmunreaktionen zu verhindern (Sakaguchi, 2003). Die Funktion von $CD8^+$ CTL besteht vor allem in der Abtötung von infizierten Zellen, was durch Sekretion von cytotoxischen Proteinen, wie Granzymen und Perforin ermöglicht wird. Perforin ermöglicht durch Insertion in die Plasma- bzw. Endosomenmembran und anschließender

Polymerisierung zu porenbildenden Aggregaten das Eindringen von Granzymen in die Zielzelle, wo diese schließlich Apoptose induzieren (Krähenbühl & Tschopp, 1990; Shresta *et al.*, 1998; Froelich *et al.*, 1998).

Eine weitere wichtige Funktion des adaptiven Immunsystems ist die Etablierung eines immunologischen Gedächtnisses, welches eine schnelle und effiziente Immunantwort im Falle einer erneuten Infektion mit dem gleichen Erreger ermöglicht. Reife antigenspezifische Lymphocyten können nach Abklingen der Immunreaktion zu Gedächtniszellen umgewandelt werden. Bei erneutem Kontakt mit dem entsprechenden Pathogen differenzieren diese schnell zu Effektorzellen und verhindern so den Ausbruch der Krankheit (Janeway *et al.*, 2002).

1.3. Antigen-präsentierende Zellen

APC nehmen nach einer Infektion die jeweiligen Erreger auf, prozessieren diese und präsentieren entsprechende Antigenfragmente über MHC-Moleküle. Diese heterodimeren Proteine werden in zwei Klassen unterteilt, die spezifisch mit $CD4^+$ oder $CD8^+$ Zellen interagieren können. MHC Klasse I-Moleküle werden von nahezu allen Zellen exprimiert und sind für die Präsentation intrazellulärer Peptide verantwortlich, während MHC Klasse II-Moleküle nur in APC vorkommen und vorwiegend exogene Peptide präsentieren (Morrison *et al.*, 1986).

Intrazelluläre Proteine werden proteasomal zu Peptiden abgebaut und über den „transporter associated with antigen presentation“ (TAP) ins endoplasmatische Retikulum (ER) transloziert, wo sie an MHC Klasse I-Heterodimere binden können (Momburg *et al.*, 1994; Neefjes *et al.*, 1993). MHC Klasse I-Moleküle bestehen aus einer polymorphen schweren Kette und einer leichten Kette, dem sogenannten β_2 -Mikroglobulin. Die Stabilität dieses Heterodimers wird zunächst durch Chaperone wie Calreticulin oder Protein Disulfid Isomerase (PDI) gewährleistet. Durch Bindung des Peptids an das MHC Klasse I-Molekül kommt es zur Dissoziation der Chaperone und schließlich zum Transport des vollständig assemblierten Komplexes zur Zelloberfläche, wo er von $CD8^+$ Zellen mit Hilfe des TCR erkannt werden kann (Pamer & Cresswell, 1998; Vyas *et al.*, 2008).

Extrazelluläre Proteine werden von APC durch Endocytose aufgenommen und mittels MHC Klasse II-Moleküle präsentiert. Nach Assemblierung der α - und β -Kette im ER assoziiert das MHC Klasse II-Dimer mit dem Molekül „invariant chain“ (Ii). Dieser Komplex wird über den Golgi-Apparat zu einem späten Endosomen-Kompartiment, genannt „MHC class II compartment“ (MIIC), transportiert, wo es durch das vorherrschende saure Milieu zur Spaltung der Ii kommt. Das an der Bindestelle

verbleibende „class II associated li peptide“ (CLIP) kann mit Hilfe des Moleküls „human leukocyte antigen“ (HLA)-DM durch das zu präsentierende Peptid ersetzt werden. Der entstandene Komplex wird anschließend zur Plasmamembran transportiert, wo das Antigen CD4⁺ Zellen präsentiert werden kann (Hiltbold & Roche, 2002; Lennon-Dumenil *et al.*, 2002).

Dendritische Zellen

DC gehören aufgrund ihrer hohen Effizienz bezüglich Antigenprozessierung und -präsentation zu den wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen. Unreife DC (iDC) werden aus hämatopoetischen Vorläufern gebildet und dann über das Blut vom Knochenmark in periphere nicht-lymphatische Gewebe transportiert. Sie sind dazu in der Lage Antigene durch Phagozytose, Makropinocytose oder Clathrin-vermittelte Endocytose aufzunehmen; allerdings können sie diese im unreifen Zustand aufgrund geringer Oberflächenexpression von MHC-Molekülen naiven T-Zellen nicht effizient präsentieren. Stattdessen reifen iDC nach Antigenkontakt zu reifen DC (mDC), wodurch die Aufnahmekapazität für Antigene zwar reduziert, die Expression von MHC-Molekülen hingegen stark hochreguliert wird. Bereits während der Reifung wandern sie in lymphatische Organe, um dort naive T-Zellen zu stimulieren (Mellman & Steinman, 2001).

Eine weitere Besonderheit von DC ist ihre Fähigkeit Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und über MHC Klasse I-Moleküle zu präsentieren. Dieses Phänomen, das als „cross-presentation“ bezeichnet wird, ist besonders wichtig bei einer Infektion von Nicht-Immunzellen, da nur so eine effiziente Immunantwort mittels CD8⁺ Zellen hervorgerufen werden kann (Albert *et al.*, 1998; Bevan, 1976). Abgesehen von löslichen exogenen Antigenen, können iDC auch sterbende infizierte Zellen und sogar Tumorzellen in der Peripherie über spezifische Rezeptoren phagozytieren und die entsprechenden Antigene CD8⁺ T-Zellen präsentieren (Rodriguez *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 1998).

Makrophagen

Auch Makrophagen gehören zu den professionellen APC und sind vor allem für die Phagozytose und Prozessierung von körperfremden Fragmenten, Zelltrümmern und toten Zellen verantwortlich. Sie sind über den gesamten Körper verteilt und übernehmen eine wichtige Überwachungsfunktion, indem sie ihre Umgebung permanent auf Signale überprüfen, die bspw. auf eine Infektion oder Gewebeschäden hinweisen. Die Erkennung dieser Signale erfolgt über spezialisierte Rezeptoren, wie Scavenger Rezeptoren, die an

apoptotische sowie nekrotische Zellen, opsonisierte Pathogene und Zelltrümmer binden (Murray & Wynn, 2011). Makrophagen differenzieren aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), genauer gesagt Monocyten, welche aus myeloiden Progenitorzellen im Knochenmark gebildet werden. Nach ihrer Reifung über Monoblasten und Pro-Monocyten, werden die Monocyten schließlich in den Blutstrom entlassen, von wo aus sie in die jeweiligen Gewebe migrieren, um dort die Makrophagenpopulation aufrechtzuerhalten (Gordon & Taylor, 2005). Makrophagen verfügen über eine außergewöhnliche phänotypische Plastizität, die auf einem hoch variablen transkriptionellen Repertoire beruht, welches auf äußere Faktoren reagiert. Dadurch können sie Funktionen in einer Vielzahl immunologischer Prozesse, wie Pathogenabwehr, Wundheilung, Regulierung entzündlicher Reaktionen und Tumorsuppression, übernehmen (Reinartz *et al.*, 2014; Mosser & Edwards, 2008).

In Anlehnung an die Polarisierung von T-Helferzellen in T_{H1} und T_{H2} , hat sich zur Klassifizierung von Makrophagen das M1-/M2-Modell etabliert, welches zwischen klassisch-aktivierten (M1) und alternativ-aktivierten (M2) Makrophagen unterscheidet (Mills *et al.*, 2000; Verreck *et al.*, 2004; Biswas & Mantovani, 2010). Der M1-Phänotyp kann durch $IFN\gamma$ allein oder zusammen mit mikrobiellen Bestandteilen, v. a. Lipopolysaccharid (LPS), aber auch durch verschiedene Cytokine, wie $TNF\alpha$, induziert werden. Charakteristisch für diese klassische Aktivierung ist die hohe Fähigkeit zur Antigenpräsentation und eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Cytokine, u. a. $TNF\alpha$, IL-6, IL-12, IL-23 und verschiedener Interferone (Verreck *et al.*, 2004; Mantovani *et al.*, 2004, Martinez & Gordon, 2014). Die Funktion von M1-Makrophagen besteht vor allem in der Beseitigung von Pathogenen, Aktivierung der adaptiven Immunabwehr und Tumorsuppression, allerdings können sie auch an der Entstehung von Autoimmun- und chronisch entzündlichen Erkrankungen beteiligt sein (Murray & Wynn, 2011).

M2-Makrophagen werden generell durch eine geringe Produktion pro-inflammatorischer Cytokine charakterisiert (Mantovani *et al.*, 2004). Aufgrund unterschiedlicher Phänotypen je nach Induktionsstimulus werden M2-Makrophagen in Subtypen untergliedert. Stein *et al.* beschrieben 1992 die ersten alternativ-aktivierten Makrophagen, welche durch IL-4 induziert werden. Diese wurden später als M2a bezeichnet und sind durch eine hohe Expression von Scavenger- und Mannose-Rezeptoren sowie des IL-1 Rezeptoragonisten charakterisiert. M2b hingegen exprimieren sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Cytokine und werden durch Immunkomplexe und TLR-Agonisten aktiviert. Ein weiterer Subtyp, M2c, wird durch IL-10 stimuliert und ist durch hohe Expression anti-

inflammatorischer Cytokine sowie Mediatoren (z. B. IL-10) und des Mannose-Rezeptors charakterisiert (Mantovani *et al.*, 2004). Insgesamt haben M2-Makrophagen wichtige Funktionen in der Immunregulation, in Wundheilungsprozessen und bei Allergien, sind aber auch am Tumorwachstum beteiligt (Murray & Wynn, 2011).

2. Impfstoffe

Die Entwicklung von Impfstoffen hat maßgeblich dazu beigetragen die Ausbreitung von Infektionskrankheiten einzudämmen. Seit der Entdeckung von Edward Jenner im Jahre 1798, dass eine Infektion mit Kuhpocken dem Menschen Immunität gegen eine Pockeninfektion verleiht, konnten zahlreiche Epidemien bekämpft und Erkrankungen ausgerottet werden (Fenner *et al.*, 1988; Plotkin *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen mit Kuhpockenmaterial prägten auch den Begriff „Vaccine“ (vom Lateinischen, *vaccinus*-von Kühen stammend). Weitere Meilensteine in der Impfstoffforschung gelangen Louis Pasteur mit seiner Formulierung der Keimtheorie (1864) und Robert Koch mit dem ersten Nachweis von bakteriellen Krankheitserregern, nämlich *Bacillus anthracis* (1876) und *Mycobacterium tuberculosis* (1881). Kurz darauf gelang Louis Pasteur zusammen mit Emile Roux die Entwicklung von Impfstoffen gegen Milzbrand und Tollwut (Plotkin *et al.*, 2008). Obwohl seit diesem Zeitpunkt bereits viele weitere Vakzine gegen Infektionskrankheiten, wie z. B. Typhus, Cholera, Pest, Poliomyelitis, u.v.m. entwickelt werden konnten, existieren bis heute immer noch Erreger, insbesondere Viren wie das Epstein-Barr-Virus (EBV) und das „human immunodeficiency virus“ (HIV), gegen welche noch kein effizientes Vakzin entwickelt werden konnte. Aus diesem Grund beschäftigt sich auch aktuell ein Großteil der Forschung mit der Entwicklung neuer Impfstoffe.

Allgemein wird durch eine Impfung das Immunsystem stimuliert, sodass nach Kontakt mit dem jeweiligen Erreger eine Infektion verhindert werden kann. Bezüglich der Immunisierungsart wird hierbei zwischen passiver und aktiver Immunisierung unterschieden. Die passive Immunisierung besteht in der Gabe von Immunglobulin-Präparaten, was zu einer sofortigen Neutralisierung des Erregers führt. Da der Körper in diesem Fall nicht selbst eine Immunreaktion etablieren muss, erfolgt die Abwehr zwar schneller, allerdings kann so auch kein immunologisches Gedächtnis gebildet werden, wodurch bei einer erneuten Infektion kein weiterer Schutz besteht. Daher wird die passive Immunisierung lediglich als Notfallmaßnahme bei einer bereits erfolgten Infektion eingesetzt. Prominente Anwendungsbeispiele sind die Post-Expositionsprophylaxe nach einem Biss durch ein potentiell mit Tollwut infiziertes Tier oder die Expositionprophylaxe,

wenn innerhalb der nächsten Wochen ein erhöhtes Risiko eines Erregerkontaktes besteht und eine aktive Immunisierung zeitlich nicht mehr möglich ist (Modrow *et al.*, 2010).

Die aktive Immunisierung ist deutlich weiter verbreitet, da sie eine körpereigene Immunantwort aktiviert und somit einen prophylaktischen Schutz im Falle einer Infektion mit dem entsprechenden Erreger bietet. Dieser Effekt kann durch den Einsatz verschiedener Impfstoffe hervorgerufen werden; hier wird zwischen Lebend- und Totimpfstoffen unterschieden.

2.1 Lebendimpfstoffe

Lebendimpfstoffe bestehen aus Erregern, die nicht vollständig inaktiviert, sondern lediglich attenuiert wurden. Diese Attenuierung wird durch kontinuierliches Passagieren der Kultur erreicht, wodurch sich Mutationen im Genom anhäufen, welche zu einer verminderten Virulenz führen. Attenuierte Organismen sind somit noch vermehrungsfähig und folgen dem gleichen Prozessierungs- und Präsentationsweg des natürlichen Pathogens. Dadurch kann eine sehr effiziente Immunantwort sowohl auf humoraler als auch auf zellulärer Ebene hervorgerufen werden, ohne jedoch eine ausgeprägte Erkrankung zu verursachen. Diese Entdeckung machte Pasteur erstmals im Jahre 1880 als er mit dem Geflügelcholera-Erreger, *Pasteurella multocida*, arbeitete und feststellte, dass dieser nach längerer Kultivierung einen abgeschwächten Krankheitsverlauf verursachte (Pasteur, 1880). Kurze Zeit später fand Henry Toussaint am Beispiel von *Bacillus anthracis* heraus, dass Erreger auch durch Hitze und Chemikalien attenuiert werden können (Toussaint, 1881). Der erste große Erfolg von Lebendimpfstoffen war die Ausrottung der Pocken (Fenner, 1982). Ein weiterer bekannter Vertreter attenuierter Vakzine ist Priorix-Tetra, ein Vierfachimpfstoff, welcher zur Prävention von Masern, Mumps, Röteln und Varizella eingesetzt wird (Hanna *et al.*, 2009). Bis 1998 wurde auch gegen Poliomyelitis ein Lebendimpfstoff eingesetzt, welcher allerdings aufgrund vereinzelter Fälle von Vakzin-assoziierten Erkrankungen europaweit durch einen inaktivierten Impfstoff ersetzt wurde. Besonders bei Immunsupprimierten, aber auch durch Rückmutationen der Erreger, kann ein Krankheitsausbruch nach Immunisierung mittels attenuierter Vakzine nie vollständig ausgeschlossen werden. Ein weiterer Nachteil von Lebendimpfstoffen ist die konstante Aufrechterhaltung einer Kühlkette, was die Lagerungs- und Transportbedingungen, insbesondere in Entwicklungsländern, deutlich erschwert (Modrow *et al.*, 2010).

2.2 Totimpfstoffe

Bei Totimpfstoffen handelt es sich ebenfalls um vollständige Pathogene, die allerdings chemisch oder physikalisch inaktiviert wurden und somit ihre Fähigkeit zur Replikation verloren haben. Wichtige Vertreter dieser Impfstoffklasse sind Vakzine gegen Hepatitis A und Poliomyelitis (Just & Berger, 1992; Simizu *et al.*, 2006).

Eine weitere Form von Totimpfstoffen sind Spaltvakzine, welche nicht aus intakten Pathogenen bestehen, sondern lediglich Fragmente des Erregers beinhalten. Diese Fragmente können entweder durch Aufspaltung der Pathogene mit organischen Lösungsmitteln gewonnen oder rekombinant hergestellt werden, wie im Falle des Hepatitis B Impfstoffes (Poland & Jacoson, 2004). Totimpfstoffe werden von APCs allerdings ausschließlich als extrazelluläre Erreger erkannt, was dazu führt, dass die prozessierten Antigene vorwiegend über MHC Klasse II-Moleküle präsentiert werden. Dies hat zur Folge, dass zwar eine humorale Immunantwort mit Produktion spezifischer Antikörper hervorgerufen wird, die Aktivierung CD8⁺ CTL aber ausbleibt. Aus diesem Grund bedarf es zum einen einer wiederholten Gabe des Impfstoffes und zum anderen müssen häufig immunstimulatorische Adjuvantien eingesetzt werden, um eine ausreichende Immunantwort zu erreichen (McKee *et al.*, 2007). Obwohl durch ausgewählte Adjuvantien, wie Aluminiumhydroxide und „Complete Freund’s Adjuvant“ (CFA) effiziente Immunreaktionen hervorgerufen werden können, bergen diese leider auch die Gefahr von unerwünschten Nebenwirkungen (Audibert & Lise, 1993; Huleatt *et al.*, 2006). Ein sehr vielversprechendes Adjuvans ist Flagellin. Dieser Bestandteil bakterieller Flagellen ist dazu in der Lage die Cytokinproduktion angeborener Immunzellen anzuregen und führt zu einer effizienten Aktivierung von B- und T-Lymphocyten (Ciacci-Woolwine *et al.*, 1998; Mizel & Bates, 2010). Innerhalb der letzten Jahrzehnte konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass Flagellin, auch unter Verwendung unterschiedlicher Applikationsarten, durch Stimulation des TLR5 die Immunreaktion auf verschiedene Impfstoffe effizient verstärken kann (Ben-Yedidia *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 2009). Eine weitere Möglichkeit die immunstimulatorische Wirkung eines Vakzins zu steigern ist durch kovalente Bindung des Antigens an bakterielle Polysaccharide oder virale Hüllfragmente. Beispiele für diese sogenannten konjugierten Impfstoffe sind Gardasil, ein quadrivalentes Vakzin zur Prävention einer Infektion mit Humanen Papillomaviren (HPV), und der Impfstoff gegen *Haemophilus influenzae* Typ B (Barr & Tamms, 2007; Ojo *et al.*, 2010).

2.3 Genetische Immunisierung

Die Verwendung Nukleinsäure-basierter Impfstoffe bietet eine besondere und relativ neue Art der Immunisierung. Das Prinzip der DNA-Vakzinierung besteht in der Verabreichung eines Antigen-codierenden Plasmides, welches daraufhin in die Zellen gelangt und aufgrund eines eingefügten Promotors effizient transkribiert wird. Nach vollständiger Prozessierung und Präsentation des Antigens kommt es zur Aktivierung einer humoralen und zellulären Immunantwort, da durch intrazelluläre Expression des Antigens eine Präsentation mittels MHC Klasse I-Molekülen stattfindet. Gleichzeitig können auch Antigene aus transfizierten Zellen von APCs aufgenommen werden, was zu einer MHC Klasse II vermittelten Aktivierung des Immunsystems führt. Ein großer Vorteil von genetischen Impfstoffen ist, dass im Gegensatz zu Lebendimpfstoffen keine Gefahr der Rückmutation zu einer virulenten Form besteht. Außerdem überzeugen DNA-Vakzine durch kostengünstige sowie einfache Herstellung, gute Temperaturstabilität, lange Haltbarkeit und einfache Manipulation (Shedlock & Weiner, 2000). Nachteile von DNA-Impfstoffen sind allerdings zum einen die Gefahr der Integration ins Wirtsgenom, was zur Entstehung von Tumorzellen führen kann, und zum anderen die Tatsache, dass die DNA zunächst im Cytosol vorliegt und somit, um eine Transkription zu ermöglichen, erst in den Zellkern gelangen muss (Nichols *et al.*, 1995). Diese Nachteile können durch Verwendung von mRNA umgangen werden, da RNA im Gegensatz zu DNA direkt im Cytosol translatiert werden und nicht ins Genom integrieren kann (Pascolo, 2008). Ein Nachteil von RNA-Vakzinen ist allerdings, dass sie schnell von ubiquitären Ribonukleasen abgebaut werden können, weshalb sie auf den Schutz durch Deliveryvehikel angewiesen sind.

3. Delivery-Systeme

Nicht nur für die Impfstoffforschung, sondern auch im Bereich der aktiven Immuntherapie zur Behandlung von Tumor- und Autoimmunerkrankungen, sind Delivery-Systeme von großer Bedeutung. Zu den am besten untersuchten Systemen gehören virale Vektoren, wie Retroviren, Adenoviren und Herpesviren (Huang *et al.*, 2011). Die Genome von viralen Vektoren werden durch gezielte Deletion so modifiziert, dass ihre Fähigkeit zur Replikation beeinträchtigt wird, was ihrer Sicherheit beiträgt. Allerdings haben virale Vektoren auch Nachteile, wie eine hohe Immunogenität, die Entzündungsreaktionen und Gewebeschädigungen hervorrufen kann, einen erhöhten Herstellungsaufwand und eine limitierte Cargokapazität (Gardlik *et al.*, 2005). Die Verwendung nicht human-pathogener Viren hingegen hat sich aufgrund niedriger Expressionsraten als ineffizient erwiesen (Ada

& Blanden, 1994). Nicht-virale Vektoren umfassen alle physikalischen und chemischen Systeme, abgesehen von viralen Vektoren. Physikalische Systeme dienen vor allem dem Einbringen nackter DNA oder Partikeln durch Elektroporation oder mit Hilfe einer Genkanone, wodurch allerdings bisher keine ausreichende Transfektionseffizienz erreicht werden kann. Chemische Methoden hingegen umfassen eine Bandbreite kationischer Liposomen und Polymere, die auf verschiedenste Art und Weise auf ihr Cargo und die Zielzellen angepasst werden können (Hirai *et al.*, 1997; Qadir *et al.*, 2019).

3.1. Nanopartikel

Im Bereich nicht-viraler Delivery-Systeme haben sich Nanopartikel (NP), insbesondere bezüglich einer effizienten Immuntherapie, schon häufig als sehr nützliche Vehikel erwiesen (Amoozgar & Goldberg, 2015). Die erste Synthese therapeutischer NP wurde in den 50er Jahren von Jatzkewitz beschrieben, dem es gelang ein wirksames Konjugat aus Polyvinylpyrrolidon und Mescaline herzustellen (Jatzkewitz, 1955). Einen weiteren großen Durchbruch erzielte Kulkarni *et al.*, der Polymilchsäure (PLA) und Polyglykolsäure (PGA) als biokompatible Alternativen zu den bisherigen synthetischen NP untersuchte. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie *in vivo* mit einer definierten Geschwindigkeit zu natürlichen Metaboliten des Körpers hydrolysiert werden und somit weder akkumulieren noch eine unerwünschte Immunantwort auslösen (Kulkarni *et al.*, 1966; Kulkarni *et al.*, 1971). Neben ihrer Sicherheit zeichnen sich biokompatible Polymere durch ihre Stabilität sowie ihre hohe Variabilität bezüglich Partikelgröße und Ladung aus, was sie zu einem sehr interessantem Vehikel macht (Ravi Kumar *et al.*, 2004; Nafee *et al.*, 2007). Durch Verbindung der beiden Polymere PLA und PGA zum Copolymer Polymilchsäure-co-Glykolsäure (PLGA) wurde durch Variation des Lactid/Glycolid-Verhältnisses sogar die genaue Dosierung und Festlegung der Wirkstofffreisetzung möglich (Jackanicz *et al.*, 1973; Makadia & Siegel, 2012). PLGA-basierte NP haben sich in den letzten Jahrzehnten sehr häufig als effizientes Vehikel zum Delivery verschiedenster Wirkstoffe, u. a. Krebsmedikamente, Plasmid-DNA und Proteine, erwiesen (Brannon-Peppas & Blanchette, 2004; Ribeiro *et al.*, 2005; Cegnar *et al.*, 2004). Zusätzlich zu den Vorteilen biokompatibler Polymere zeichnen sich PLGA-Partikel insbesondere durch ihre kostengünstige Herstellung, einfache Modifikation und eine außergewöhnlich hohe Kapazität zur Wirkstoffaufnahme aus (Hamdy *et al.*, 2011). Des Weiteren wurde PLGA bereits sowohl von der „Food and Drug Administration“ (FDA) als auch von der „European Medicine Agency“ (EMA) für Delivery-Systeme zugelassen (Mir *et al.*, 2017). Ein Nachteil von PLGA-Polymeren bezüglich ihrer Bindung an Nukleinsäuren und

Proteine, aber auch an Zellmembranen, ist ihre negative Ladung. Diese Limitierung kann allerdings durch kationische Oberflächenmodifikation, bspw. mit Polyethylenimin (PEI) oder Chitosan, überwunden werden (Trimaille *et al.*, 2003; Vila *et al.*, 2002). Ravi Kumar *et al.* gelang es 2004 das Herstellungsverfahren Chitosan-modifizierter PLGA-Partikel durch Anwendung einer Emulsions-Diffusions-Abdampfungstechnik mit Polyvinylalkohol (PVA)-Chitosan so zu optimieren, dass Partikel mit einheitlicher Größe entstehen, die effizient DNA binden können. Außerdem konnte gezeigt werden, dass derartig hergestellte Chitosan-PLGA-Partikel dazu in der Lage sind Plasmid-DNA *in vivo* über die nasalen Schleimhäute zu transportieren, ohne dabei eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (Kumar *et al.*, 2004). Ein verbleibender Nachteil von NP ist allerdings die fehlende Fähigkeit bestimmte Zelltypen zielgerichtet zu adressieren. Obwohl durch Oberflächenmodifikation der Partikel mit spezifischen Liganden und durch entsprechende Anpassung ihrer physikochemischen Eigenschaften bereits die Aufnahme und auch die Retention in Zielzellen gesteigert werden kann, können Akkumulationen und die unerwünschte Aufnahme in andere Zelltypen bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden (Brown *et al.*, 2019).

3.2. Hefen

Hefezellen erfüllen von Natur aus viele Ansprüche, die an ein Deliveryvehikel für eine erfolgreiche aktive Immuntherapie gestellt werden, indem sie Vorteile von Einzellern mit denen von Eukaryonten vereinen. Es konnte bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden, dass Hefen verschiedenste Stoffe zielgerichtet in APC transportieren können (Stubbs *et al.*, 2001; Bazan *et al.*, 2011; Walch *et al.*, 2012; Seif *et al.*, 2016, 2017). Abgesehen davon können Hefezellen einfach und kostengünstig zu hohen Zelldichten kultiviert werden. Viele Hefestämme sind außerdem bereits gut charakterisiert und verfügen über spezielle Expressionssysteme, welche die genetische Manipulation erleichtern und zu einer hohen Expressionsrate des gewünschten Antigens oder Arzneimittels führen. Die Synthese rekombinanter Proteine in Hefen läuft zudem unter Verwendung eukaryonter Glykosilierungsmuster und komplexer posttranslationaler Modifikationen ab, was zu einer besseren Erkennung in Säugerzellen und somit zur Ausbildung einer effektiveren Immunantwort führt (Bucarey *et al.*, 2009). Des Weiteren besitzen viele Hefegattungen, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae* und *Kluyveromyces lactis*, den GRAS („generally recognized as safe“)-Status und bieten die Möglichkeit der oralen Applikation. Die Fähigkeit von Hefezellen, ihr Cargo beim Passieren des Gastrointestinaltraktes vor einer Degradation durch den sauren pH oder Proteasen zu

schützen und von M-Zellen im Darm aufgenommen zu werden, konnte schon mehrfach nachgewiesen werden (Beier & Gebert, 1998).

Um eine optimale Immunantwort zu induzieren, sind DCs notwendig, da nur diese dazu in der Lage sind, exogene Antigene mittels MHC Klasse I-Molekülen zu präsentieren und so sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-Zellen zu aktivieren (Banchereau & Steinman, 1998; Rodriguez *et al.*, 1999; Ridge *et al.*, 1998). Verschiedene Hefegattungen werden von DCs effektiv phagozytiert und rufen eine verstärkte Expression von MHC Klasse I- und II-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen, wie CD40, CD54, CD80, CD83 und CD86, hervor, was wiederum zur Sekretion verschiedener Cytokine führt (Newman & Holly, 2001; Bazan *et al.*, 2018). Dieser adjuvante Effekt der Hefen ist in Bezug auf deren Nutzung als Immuntherapeutikum äußerst vorteilhaft. Verantwortlich für die Aufnahme von Hefen sind vor allem Dectin-1 und Mannoserezeptoren, die auf der Zelloberfläche von phagozytierenden Zellen exprimiert werden und Zellwandbestandteile der Hefen, wie β -Glukan und Mannan, erkennen (Reis e Sousa *et al.*, 1993; Brown & Gordon, 2001; Bazan *et al.*, 2011; Bazan *et al.*, 2014).

Im Jahre 2001 konnte bereits mittels rekombinanter *S. cerevisiae* eine zelluläre Immunantwort gegen HIV-1- und Tumorantigene bei Mäusen hervorgerufen werden (Stubbs *et al.*, 2001). Breinig und Mitarbeiter konnten am Beispiel des Organismus *Schizosaccharomyces pombe* (*Sz. pombe*) nachweisen, dass nach rekombinanter Expression des Cytomegalievirus (CMV)-Antigens pp65 eine Aktivierung von spezifischen T-Zellen erzielt wird, die der Immunantwort nach Kontakt mit CMV entspricht (Breinig *et al.*, 2003). Im Jahre 2009 konnte erstmalig die Expression von eGFP und Ovalbumin in APCs nach DNA- bzw. RNA-Delivery mittels *S. cerevisiae* und später auch mittels *Sz. pombe* nachgewiesen werden (Walch, 2009; Walch *et al.*, 2012; Walch-Rückheim *et al.*, 2014). Des Weiteren konnte bei den bisher eingesetzten Hefen kein toxischer Effekt auf Säugerzellen festgestellt werden, was ihnen einen deutlichen Vorteil gegenüber den als Delivery-System verwendeten Bakterien verschafft (Breinig *et al.*, 2003; Walch, 2009).

4. Ziele der Arbeit

Die aktive Immuntherapie hat sich in den letzten Jahrzehnten nicht nur im Bereich der Schutzimpfungen, sondern auch u. a. zur Behandlung von Allergien und Tumorerkrankungen, als sehr vielversprechende Methode etabliert. Die Ansprüche an ein therapeutisches Deliveryvehikel sind allerdings sehr hoch: neben Effizienz, Sicherheit, Akzeptanz und einer immunstimulierenden Wirkung, werden außerdem eine kostengünstige Herstellung, einfaches Handling und eine möglichst angenehme Applikation vorausgesetzt. Trotz exzessiver Forschung bezüglich potentieller Vehikel für eine effiziente und zielgerichtete Immuntherapie konnte bisher noch kein perfekter Carrier gefunden werden (Zahirović & Lunder, 2018).

Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf Vorarbeiten von Bazan und Walch, Hefezellen als Deliveryvehikel weiter zu optimieren. Zunächst sollte die immunstimulatorische Wirkung von *S. cerevisiae* durch Expression des pharmakologisch optimierten Flagellinderivats FliC gesteigert werden. Außerdem sollte der Einfluss der subzellulären Lokalisation von Flagellin bezüglich der Aktivierung von Makrophagen überprüft werden. Hierzu wurden unterschiedliche Flagellinvarianten hergestellt, die entweder zur intrazellulären, sekretorischen, Zellwand-verankerten oder VLP-assoziierten Expression in *S. cerevisiae* eingesetzt wurden. Als Maß der Makrophagenaktivierung wurde die TNF α -Produktion der Säugerzellen durchflusscytometrisch analysiert. Außerdem sollte überprüft werden ob die Koexpression des porenbildenden Proteins Perforin einen positiven Effekt auf das Delivery von DNA und mRNA im Vergleich zu einer nicht funktionellen Perforinvariante (PerforinD435A) hat.

Als Nächstes sollte die Einsetzbarkeit von *S. cerevisiae* als Transportvehikel *in vivo* geprüft werden. Zum einen sollte die verbesserte Aufnahme von Hefezellen durch M-Zellen im Darmlumen durch Oberflächenexpression von Invasin mittels *in vivo*-Experimenten nachgewiesen werden. Zum anderen sollten Immunisierungsversuche mit Ovalbumin-exprimierenden Hefen im Tiermodell durchgeführt werden.

Abschließend befasst sich diese Arbeit mit der Etablierung eines „nano-in-micro“ Carriers bestehend aus Hefezellen und Nanopartikeln. Hierzu sollte zunächst überprüft werden, ob bzw. inwiefern Hefen verschiedener Gattungen mit PLGA-Partikeln interagieren. Für diese Experimente wurden Stämme der Hefegattungen *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *K. lactis* und *Sz. pombe* eingesetzt. Im Anschluss sollte die Fähigkeit von NP/Hefe-Komplexen zu einem zielgerichteten Delivery in Makrophagen analysiert werden.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme werden im Folgenden aufgeführt (Tabelle 1; Tabelle 2).

1.1. Bakterienstämme

Tabelle 1: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *E. coli* Stämme sowie deren Genotyp und Referenz.

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|------------------|---|------------|
| TOP 10 | F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i> | Invitrogen |
| DH5α | F ⁻ Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i> | Pharmacia |
| NovaBlue Singles | <i>endA1 hsdR17</i> (rK ₁₂ ⁻ mK ₁₂ ⁺) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac F'</i> [<i>proA⁺B⁺ lacI^fZ</i> ΔM15::Tn10] (Tet ^R) | Novagen |

1.2. Hefestämme

Tabelle 2: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sowie deren Genotyp und Referenz.

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|--|--|-----------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> S86c | MATα <i>ura3-2 leu2 his3 pra1 prb2 prc1 cps1</i> [L-O], [M-O], Verlust der viralen L- und M-Genome nach Hitzebehandlung des Stammes S86 | Schmitt, 1995 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> BY4742 | MATα <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i> | Open Biosystems |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> EBY100 | MATα <i>ura3-52 trp 1 leu2Δ1 his3Δ200 pep4:HIS3 prb1Δ1.6R can1 GAL</i> enthält das <i>AGA1</i> -Gen unter der Kontrolle des <i>GAL</i> -Promotors und dem <i>URA3</i> Selektionsmarker | Invitrogen |
| <i>Kluyveromyces lactis</i> GG799 | Keine Auxotropien oder genetische Marker | New England Biolabs |
| <i>Schizosaccharomyces pombe</i> PW260 | <i>h-leu1.32 ura4. dl18 ade 6.210</i> | Wagner <i>et al.</i> , 1993 |
| <i>Pichia pastoris</i> KM71 | <i>his4, arg4, aox1::ARG4</i> | Invitrogen |
| <i>Pichia pastoris</i> GS115 | <i>his4</i> | Invitrogen |

1.3. Zelllinien

IC21

IC21 ist eine Makrophagenzelllinie, die aus SV 40 transformierten Peritonealmakrophagen der C57BL/6 Maus entwickelt wurde. Die Zelllinie eignet sich als Modell zur Untersuchung von Mausmakrophagenaktivitäten, da sie grundlegende Eigenschaften der ursprünglichen peritonealen Mausmakrophagen beibehalten hat (Mauel & Defendi, 1971).

THP-1

Die humane Monocytenzelllinie THP-1 wurde aus dem Blut eines an akuter Monocytenleukämie erkrankten Jungen entwickelt. Sie wurde auf verschiedene Monocytenmarker getestet und behält diese Charakteristika auch während einer Kultivierung über mehrere Monate bei (Tsuchiya *et al.*, 1980).

1.4 Versuchstiere

BALB/c

Weibliche BALB/c Mäuse wurden von Charles River (Wilmington, MA, USA) bezogen und in Kooperation mit Elisabeth Kenngott im Institut für experimentelle Rheumatologie (Charité, Berlin) im Alter von acht bis zehn Wochen für die Versuche zur oralen Applikation eingesetzt.

C57BL/6J

Weibliche C57BL/6J Mäuse wurden von Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Frankreich) bezogen und unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Universitätsklinikum des Saarlandes) unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20-22 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 % und einem 12 h-Tag/Nacht-Rhythmus in individuell ventilierten Käfigen gehalten. Die Tiere wurden nach einwöchiger Eingewöhnungszeit im Alter von sieben Wochen für Vakzinierungsversuche eingesetzt. Sie wurden wöchentlich umgesetzt und erhielten Futter und Wasser *ad libitum*. Der MHC-Haplotyp dieses Stammes ist H-2^b.

2. Nährmedien und Kultivierungsbedingungen

Alle Nährmedien und Puffer wurden, wenn nicht anders vermerkt, mit H₂O_{dest.} angesetzt und autoklaviert.

2.1. Bakterien

LB-Medium

| | |
|-------------|--------|
| Trypton | 1,0 % |
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| NaCl | 0,5 % |
| (Agar | 1,5 %) |

Ampicillin-Stammlösung

| | |
|------------|----------|
| Ampicillin | 50 mg/ml |
| Ethanol | 50 % |

Kanamycin-Stammlösung

| | |
|-----------|----------|
| Kanamycin | 25 mg/ml |
|-----------|----------|

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

X-Gal-Stammlösung

| | |
|---------------------|----------|
| X-Gal | 20 mg/ml |
| In Dimethylformamid | |

Die Lösung wurde im Dunkeln bei -20 °C gelagert.

IPTG-Stammlösung

| | |
|------|--------|
| IPTG | 100 mM |
|------|--------|

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei -20 °C gelagert.

Die Anzucht von *E. coli* in LB-Flüssigmedium erfolgte im Schüttelinkubator bei 37 °C und 220 Upm. LB-Platten wurden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Selektion von Plasmiden mit Ampicillin- oder Kanamycinresistenz wurden 5 ml LB-Medium mit 20 µl einer Ampicillin-Stammlösung bzw. 10 µl einer Kanamycin-Stammlösung versetzt. Die Selektion auf LB-Platten erfolgte durch Zugabe von 200 µl einer 1:5 verdünnten Ampicillin-Stammlösung. Für das AccepTor Cloning wurden 20 µl IPTG-Stammlösung, 20 µl Kanamycin-Stammlösung, 40 µl X-Gal-Stammlösung und 120 µl H₂O auf die Platte gegeben.

2.2. HefenYPD-Medium

| | |
|-------------|--------|
| Glukose | 2,0 % |
| Pepton | 2,0 % |
| Hefeextrakt | 1,0 % |
| (Agar | 1,5 %) |

YNB-CAA

| | |
|---------------------|---------------|
| Glukose / Galaktose | 2,0 % / 3,0 % |
| YNB | 6,7 % |
| Ammoniumsulfat | 0,5 % |
| Casaminosäuren | 0,5 % |

YE-Medium (*Schizosaccharomyces pombe*)

| | |
|-------------|--------|
| Glukose | 3,0 % |
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| Uracil | 2,0 % |
| (Agar | 2,0 %) |

Drop out (d/o)-Medium

Lösung A

| | |
|-----------------|-------|
| Glukose/Maltose | 2,0 % |
| Agar | 1,5 % |

Lösung B

| | |
|------------------|---------|
| Ammoniumsulfat | 0,5 % |
| 10x drop out-Mix | 0,087 % |

10x drop out-Mix

| | |
|----------|-------|
| Adenin | 2,5 g |
| Arginin | 1,2 g |
| Aspartat | 6,0 g |
| Glutamat | 6,0 g |
| Histidin | 1,2 g |
| Leucin | 3,6 g |

| | |
|--------------|--------|
| Lysin | 1,8 g |
| Methionin | 1,2 g |
| Phenylalanin | 3,0 g |
| Serin | 22,5 g |
| Threonin | 12,0 g |
| Tyrosin | 1,8 g |
| Tryptophan | 1,2 g |
| Valin | 9,0 g |
| Uracil | 1,2 g |

Zur Herstellung des jeweiligen 10x drop out-Mix wurde die zur Selektion nötige Aminosäure weggelassen.

Lösung C

| | |
|-----|--------|
| YNB | 0,17 % |
|-----|--------|

Die Lösungen A und B wurden getrennt voneinander autoklaviert. Lösung C wurde sterilfiltriert. Anschließend wurden die drei Lösungen vereinigt.

Die Kultivierung der Hefen im jeweiligen Flüssigmedium erfolgte in einem Schüttelinkubator bei 30 °C und 220 Upm. Zur Kultivierung auf Agarplatten wurden die Hefen in einem 30 °C Brutschrank inkubiert.

2.3. Säugerzellen

Zellkulturmedium

| | |
|-----------|------|
| RPMI 1640 | 90 % |
| FKS | 10 % |

Das Zellkulturmedium wurde bei 4 °C gelagert.

Die Anzucht von Säugerzellen erfolgte bei 37 °C und einem CO₂-Gehalt von 5 % im Brutschrank. Nach Erreichen einer Konfluenz von 70-80 % wurde die adhärente Zelllinie IC21 nach 15-minütiger Inkubation in 1x PBS mit Hilfe eines Zellschabers abgelöst, in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:3 gesplittet. Die Suspensionszelllinie THP-1 wurde bei Erreichen einer Zelldichte von etwa 8×10^5 Zellen/ml subkultiviert; hierfür wurden 2×10^5 Zellen/ml in frischem Zellkulturmedium resuspendiert.

3. Kryokulturen

3.1. Kryokulturen von Bakterien und Hefen

Zur langfristigen Lagerung von Hefe- und Bakterienstämmen wurden Kryokulturen hergestellt, welche bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert werden können. Dazu wurde 1 ml einer frischen Übernacht-Kultur mit 1 ml sterilem Glycerin in einem Kryoröhrchen gemischt und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

3.2. Einfrieren von Säugerzellen

Einfriermedium

| | |
|-----------|------|
| FKS | 60 % |
| DMSO | 20 % |
| RPMI 1640 | 20 % |

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden konfluente Zellen mit 1x PBS gewaschen und mittels Zellschaber abgelöst. Nach Resuspension in Zellkulturmedium wurde die Gesamtzellzahl bestimmt und die Zellsuspension wurde 5 min bei $300 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ zentrifugiert. Das Medium wurde abgenommen und das Zellpellet in $900\text{ }\mu\text{l}$ RPMI 1640 je 2×10^6 Zellen resuspendiert. Nach langsamer Zugabe von Einfriermedium im Verhältnis 1:1 wurden jeweils 1,8 ml der Zellsuspension in ein Kryoröhrchen überführt. Durch Verwendung einer Einfrierbox (CryoSaveTM, Scienceware) wurde ein schonendes Herabkühlen der Zellen bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 24 h gewährleistet, bevor die langfristige Lagerung in flüssigem Stickstoff erfolgte.

3.3. Auftauen von Säugerzellen

Die Zellen wurden für 2-3 min im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut und in 5 ml vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei $300 \times g$ und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in frischem Zellkulturmedium kultiviert.

4. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sowie deren Eigenschaften und Herkunft.

| Plasmid (Größe) | Eigenschaften | Herkunft |
|--|---|-------------------------------|
| pSTBlue-1 (3,8 kbp) | Multiple Cloning Region, <i>LacZα</i> , pUC origin, Kanamycin-Resistenz-Gen, Ampicillin-Resistenz-Gen | Novagen |
| YEp351 (5,6 kbp) | 2μ Hefe/ <i>E.coli</i> „shuttle“-Vektor mit <i>LEU2</i> - und Ampicillin-Resistenz-Gen; MCS aus pUC18 | Hill <i>et al.</i> , 1986 |
| YEp352 (5,2 kbp) | 2μ Hefe/ <i>E.coli</i> „shuttle“-Vektor mit <i>URA3</i> - und Ampicillin-Resistenz-Gen; MCS aus pUC18 | Hill <i>et al.</i> , 1986 |
| pPGK-Ova (7.2 kbp) | 2μ Hefe/ <i>E.coli</i> „shuttle“-Vektor, <i>URA3</i> -Gen, Ampicillin-Resistenz-Gen, <i>PGK</i> -Promotor, enthält die Sequenz des Ovalbumin-Gens; abgeleitet von pPGK-M28-I (Schmitt & Tipper, 1995) | Bazan, 2011 |
| pPGK-Ova _{cyt} (6.9 kbp) | Grundvektor pPGK-M28-I, enthält die Sequenz der cytosolischen Ovalbumin-Variante (Ova _{cyt}) | Bazan, 2011 |
| pFB2-Ova _{cyt} /sed1 (7.9 kbp) | Grundvektor pPGK-M28-I mit <i>KRE1/HA/CWP2</i> -Sequenzen (Breinig, 2002), <i>CWP2</i> ersetzt durch die Sequenz der Ova _{cyt} /sed1 Fusion | Bazan, 2011 |
| pG[0]G-Ova _{cyt} (9.0 kbp) | Grundvektor pPGK-M28-I, enthält die Sequenz der GAG/Ova _{cyt} Fusion | Bazan, 2011 |
| pPGK-6His/Xa/GST (6.7 kbp) | Grundvektor pPGK-M28-I, enthält 6His-GST-Konstrukt mit Faktor Xa-Schnittstelle | Bernardy, 2006 |
| pICL1-IRES-eGFP (6,9 kbp) | Grundvektor pPGK-M28-I, enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion und anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des <i>ICL1</i> - Promotors | Walch, 2009 |
| pCMV-IRES-eGFP (6,9 kbp) | Grundvektor pPGK-IRES-eGFP; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des <i>CMV</i> -Promotors | Walch, 2009 |
| p*ICL1-PerforinΔC (7,4 kbp) | Grundvektor YEp351; enthält die ICL1-Promotor Sequenz, die Sequenz von Perforin (C-terminal verkürzt) und die Sequenz von CYCTT | Walch, 2009 |
| pYD1 (5 kbp) | Hefe-Display-Vektor, enthält <i>AGA2</i> -Gen, Xpress-Epitop, V5-Epitop und His-Tag; <i>TRP</i> -Gen; <i>GALI</i> -Promotor, T7-Promotor und Ampicillin-Gen | Invitrogen |
| pYD1-Y.ent Inv ₁₉₈ (5,2 kbp) | Grundvektor pYD1; enthält die Sequenz für das 198 AS lange Fragment des Invasin-Gens von <i>Yersinia enterocolitica</i> | Kenngott <i>et al.</i> , 2016 |

Die in dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Auflistung der im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide sowie deren Eigenschaften.

| Plasmid (Größe) | Eigenschaften |
|-----------------------------------|---|
| pPGK-FliC-V5 (6,9kbp) | Grundvektor pPGK-6His/Xa/GST, enthält die Sequenz des V5-getaggten Flagellin-Gens (FliC-V5) als <i>XhoI/BglII</i> -Fragment |
| pPGK-K1SS-FliC-V5 (7,0 kbp) | pPGK-FliC-V5 mit zusätzlich eingefügtem Sekretionssignal des K1 α -Toxins |
| pPGK-PIR1-FliC-V5 (7,9 kbp) | pPGK-FliC-V5 mit zusätzlich eingefügter <i>PIR1</i> -Sequenz als <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment |
| pPGK-PIR2-FliC-V5 (7,9 kbp) | pPGK-FliC-V5 mit zusätzlich eingefügter <i>PIR2</i> -Sequenz als <i>EcoRI/XhoI</i> -Fragment |
| p*ICL1-PerforinD435A (7,4 kbp) | Grundvektor p*ICL1-Perforin Δ C, enthält anstelle von Perforin Δ C die Sequenz der inaktiven Variante PerforinD435A |

5. Oligonukleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von Sigma-Aldrich bezogen und sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Auflistung der Namen und Größen der zur PCR verwendeten Primer sowie deren Sequenz. Die Sequenzen sind in 5'-3' Richtung angegeben. Die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen, Signalsequenzen sind in Kleinbuchstaben geschrieben und Tag-Sequenzen sind fett gedruckt.

| Name (Größe) | Sequenz |
|--------------------------|---|
| 5'FliC (41 bp) | <u>CTCGAG GAATTC GCTAGC</u> ATG GCT CAA GT TAT CAA TAC CAA |
| 5'K1SS-FliC (119 bp) | <u>CTCGAG</u> atg acg aag cca acc caa gta tta gtt aga tcc gtc agt ata tta ttt ttc atc aca tta cta cac cta gtc gta gcg <u>GAATTC GCTAGC</u> ATG GCT CAA GTT ATC AAT ACC AA |
| 3'FliC-V5 (89 bp) | <u>AGATCT GCGGCCGC</u> CTA <u>ACTAGT</u> CGT AGA ATC GAG ACC GAG GAG AGG GTT AGG GAT AGG CTT ACC TCT CAA CAA AGA CAA GAC GTT TTG TGG AA |
| 5'PIR1 (53 bp) | <u>GGATCC AAGCTT CTCGAG</u> ATG TAC AGG AAC TTA ATA ATT GCT ACT GCC CTT AC |
| 3'PIR1-Xpress (63 bp) | <u>GAATTC</u> CTT ATC GTC ATC GTC GTA CAG ATC ACA CTC TAT GAG GTC TAC AAT GTC CAA CTC GAC |
| 5'PIR2 (46 bp) | <u>GGATCC AAGCTT CTCGAG</u> ATG AAG CTC GCT GCA CTC TCC ACT ATT G |
| 3'PIR2-Xpress (60 bp) | <u>GAATTC</u> CTT ATC GTC ATC GTC GTA CAG ATC ACA TGA AAT GAG ATC AAC AGC CTT CAA GTG |

6. Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) dient in erster Linie der Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Diese Methode kann aber auch zur gezielten Mutagenese (site-directed mutagenesis) genutzt werden, indem die gewünschte Mutation in die Primer eingebracht und somit während der Reaktion mit amplifiziert wird.

Zunächst werden bei 95 °C die Wasserstoffbrücken zwischen den DNA-Strängen aufgelöst, was dazu führt, dass die DNA einzelsträngig vorliegt. Anschließend erfolgt das Anlagern der Primer bei der sogenannten „Annealing“-Temperatur, die 3-5 °C unter der Schmelztemperatur der Primer liegen sollte. Die Schmelztemperatur lässt sich wie folgt berechnen:

$$T_m = 2 \text{ °C}(A+T) + 4 \text{ °C}(G+C)$$

Im nächsten Schritt folgt die Synthese des komplementären Stranges durch die *Taq*-Polymerase aus *Thermus aquaticus* bei 72 °C. Diese drei Schritte werden in 23 Zyklen wiederholt, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung der DNA kommt. Die *Taq*-Polymerase fügt an das 3`-Ende des synthetisierten Stranges ein Desoxyadenosin an, wodurch das PCR-Produkt für die TA-Klonierung genutzt werden kann.

Die PCR wurde nach folgendem Schema angesetzt:

| | |
|------------------------------------|----------|
| PCR-Puffer | 2,5 µl |
| 5`-Primer | 0,25 µl |
| 3`-Primer | 0,25 µl |
| template | 0,5 µl |
| dNTPs | 0,5 µl |
| Polymerase | 0,25 µl |
| H ₂ O _{steril} | ad 25 µl |

Die Durchführung erfolgte nach folgendem Programm:

| | | |
|-------|-------|-------------|
| 95 °C | 120 s | } 23 Zyklen |
| 95 °C | 20 s | |
| 57 °C | 20 s | |
| 72 °C | 60 s | |
| 72 °C | 120 s | |
| 4 °C | ∞ | |

7. Sequenzierung

Zur Überprüfung der PCR-Produkte auf korrekte DNA-Sequenz wurde eine Didesoxy-Sequenzierung nach Sanger *et al.* (1977) von der Firma GATC Biotech durchgeführt. Hierzu wurden 30 µl einer DNA-Lösung mit einer DNA-Konzentration von 75 ng/µl eingesetzt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms „SeqMan“ („DNA-Star“-Software Paket).

8. Agarosegelelektrophorese

TBE-Puffer (10x)

| | |
|----------------------|--------|
| Tris | 0,89 M |
| Borsäure | 0,89 M |
| Na ₂ EDTA | 20 mM |

Der TBE-Puffer wurde autoklaviert.

GLB („gel loading buffer“)

| | |
|----------------------|--------|
| Glycerin | 50 % |
| SDS | 1 % |
| Na ₂ EDTA | 125 mM |
| Bromphenolblau | 0,05 % |
| Xylencyanol | 0,05 % |

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Fragmenten anhand ihrer Größe. Die aufzutrennenden Proben werden dabei auf ein Agarosegel aufgetragen. Nach Anlegen eines elektrischen Feldes bewegt sich die DNA aufgrund ihrer negativen Ladung in Richtung der Anode, wobei kleinere Fragmente schneller durch die Maschen im Gel wandern können als größere Fragmente. Die Auftrennung ist dabei abhängig von der Agarosekonzentration, der Stromstärke und der Pufferzusammensetzung. Die entstandenen DNA-Banden werden durch Ethidiumbromid, welches sich in DNA-Stränge einlagert und unter UV-Licht fluoresziert, sichtbar gemacht. Die Größe der zu untersuchenden DNA-Stücke kann mit Hilfe eines Molekulargewichtsmarkers bestimmt werden (Abbildung 1).

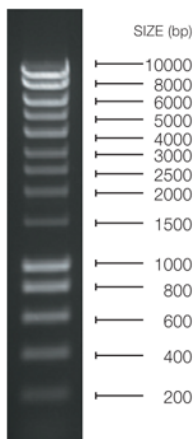


Abbildung 1: Fragmentgrößen des Markers „HyperLadder™1kb“ (Bioline), der zur Größenbestimmung der DNA-Fragmente bei einer Agarosegelelektrophorese verwendet wurde.

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung wurden 25 µl der DNA-Probe mit 5 µl „Gel loading Buffer“ (GLB) versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurden zusätzlich 3 µl des Markers HyperLadder aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 10 V/cm in 1x TBE-Puffer. Anschließend erfolgte die Färbung des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) über 15 min. Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte mit Hilfe des „ChemiDoc XRS system“ und der Software „Quantity One 4.6.2“ der Firma Bio-Rad.

9. DNA-Reisolierung aus Agarosegelen

Zur Reisolierung von DNA nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurde das „E.Z.N.A. Gel Extraction Kit“ von Omega Bio-Tek verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers. Mit dieser Technik können DNA-Fragmente mit einer Größe von 70 bp bis 20 kb aus Agarosegelen isoliert werden. Dabei wird die gewünschte DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten, in „Binding Buffer“ gelöst und an eine „DNA HiBind“-Säule gebunden. Nach drei Waschschrritten wird die DNA mit deionisiertem Wasser eluiert.

10. Acceptor-Cloning

Mit Hilfe des Acceptor-Clonings können PCR-Produkte mit 3'dA-Überhängen direkt mit dem linearisierten Vektor pSTBlue-1 ligiert werden, da dieser 3'dU-Überhänge besitzt. Nach Transformation in den *E. coli* Stamm „NovaBlue Singles“ wird Uracil in Thymin umgeschrieben. Die Durchführung erfolgte nach Anweisung des Herstellers (pSTBlue-1 AccepTor Vector-Kit, Novagen). Dieses System ermöglicht eine Selektion mittels Blau-Weiß-„Screening“.

11. DNA-Restriktion

Restriktionsendonukleasen dienen in Bakterien natürlicherweise der Inaktivierung fremder DNA. Ihre eigene DNA schützen die Bakterien durch Methylierung von Adenin oder Cytosin vor der Restriktion. Die Typ II-Restriktionsendonukleasen, die für die Molekularbiologie die größte Bedeutung haben, erkennen kurze definierte Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren aus gegenläufig gleichen Nukleotiden (Palindrome) und schneiden innerhalb dieser DNA-Sequenz entweder versetzt („sticky ends“) oder gerade („blunt ends“), wobei „sticky ends“ für eine Ligation besser geeignet sind. Die Namensgebung der Restriktionsenzyme erfolgt aufgrund ihrer Herkunft; der erste Buchstabe steht für die Gattung, der zweite und dritte Buchstabe für die Art und römische Ziffern geben die Reihenfolge der Entdeckung an (Bsp.: *EcoRI* aus *Escherichia coli* RY13).

Die Restriktionen wurden (falls nicht anders vom Hersteller angegeben) nach folgendem Schema angesetzt:

| | |
|------------------------------------|----------|
| 10x Puffer | 2,0 µl |
| Restriktionsenzym I | 0,4 µl |
| Restriktionsenzym II | 0,4 µl |
| RNase A | 0,1 µl |
| DNA | 1 µl |
| H ₂ O _{steril} | ad 20 µl |

Für einen Kontrollverdau wurde der Ansatz eine Stunde lang bei 37 °C inkubiert. Bei einem präparativen Verdau wurde die Inkubationszeit auf mindestens zwei Stunden erhöht. Anschließend erfolgte eine gelelektrophoretische Auftrennung und gegebenenfalls eine Reisolation der gewünschten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel.

12. DNA-Ligation

Bei einer Ligation werden DNA-Fragmente mit Hilfe einer DNA-Ligase miteinander verbunden. Dabei wird durch Verknüpfung der 3'Hydroxylgruppe mit der 5'Phosphatgruppe eine Phosphodiesterbindung ausgebildet. Soll ein DNA-Fragment mit einem Vektor ligiert werden, so werden Vektor und Insert zunächst mit der gleichen Restriktionsendonuklease geschnitten, sodass eine komplementäre Basenpaarung ermöglicht wird.

Die Restriktion der Proben erfolgte bei 37 °C über drei Stunden. Die Ansätze wurden im Anschluss gelelektrophoretisch aufgetrennt und die zu ligierende DNA aus dem Agarosegel reisoliert. Die Ligation wurde nach folgendem Schema angesetzt:

| | |
|---------------------------------|---------|
| Insert | x µl |
| Vektor | 17-x µl |
| 10x Reaktionspuffer (Applichem) | 2 µl |
| T4-DNA-Ligase (Applichem) | 1 µl |

Die Menge des eingesetzten Inserts wurde je nach DNA-Konzentration der verwendeten Insert- und Vektorproben angepasst. Die Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht.

13. DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde spektralphotometrisch bestimmt. Diese Methode macht sich die unterschiedlichen Absorptionsspektren von DNA und Proteinen zunutze. Während das Absorptionsmaximum von DNA bei einer Wellenlänge von 260 nm liegt, absorbieren die in Proteinen enthaltenen aromatischen Aminosäuren vor allem Licht der Wellenlänge 280 nm. Eine Verunreinigung der DNA durch Proteine liegt vor, wenn der Quotient aus A_{280}/A_{260} unter einem Wert von 1,8 liegt.

Nachdem eine 1:60-Verdünnung der DNA-Proben hergestellt wurde, wurde diese in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm vermessen. Als Referenz wurde steriles Wasser verwendet. Die Absorptionsmessung erfolgte am Spektralphotometer „Ultrospec™ 2100pro“ (GE Healthcare). DNA-Konzentration und der Quotient A_{280}/A_{260} wurden vom Gerät berechnet.

14. DNA-Isolierung

14.1. Isolierung genomischer DNA aus Hefezellen

Breaking Buffer

| | |
|------------------|--------|
| Triton X-100 | 2 % |
| SDS | 1 % |
| NaCl | 100 mM |
| Tris-HCl, pH 8,0 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |

Zur Gewinnung genomischer DNA aus Hefezellen wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur 5 min bei 9.000 Upm zentrifugiert und mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 40 µl Breaking Buffer aufgenommen und mit 0,06 g Glasperlen ($\varnothing=0,5$ mm) sowie 70 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol versetzt. Der Zellaufschluss erfolgte bei 4 °C in einer Schwingmühle (RetschTM, Haan) in drei Zyklen von je 1 min mit 1-minütiger Pause. Nach Zugabe von 40 µl TE-Puffer (siehe 15.2) und 5-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde die wässrige Phase abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit Ethanol gefällt (1 min, RT) und bei 13.000 Upm für 1 min zentrifugiert. Das Pellet wurde nach dem Trocknen in 40 µl sterilem Wasser aufgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

14.2. Plasmidisolierung aus Bakterien

14.2.1. Alkalische Lyse

GTE-Lösung

| | |
|----------------------|-------|
| Glukose | 50 mM |
| Tris-HCl | 25 mM |
| Na ₂ EDTA | 10 mM |

NaOH/SDS-Lösung

| | |
|------|-------|
| NaOH | 0,2 M |
| SDS | 1 % |

KAc-Lösung

| | |
|------------------|-----------|
| Eisessig (98 %) | 29,5 ml |
| H ₂ O | ad 100 ml |

KOH-Plätzchen wurden bis zum Erreichen eines pH-Wertes von 4,8 zugegeben.

Mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly (1979) kann Plasmid-DNA einfach und schnell aus Bakterien gewonnen werden. Dazu werden die Zellen zunächst in GTE-Lösung aufgenommen, was durch den darin enthaltenen Komplexbildner EDTA, zu einer Destabilisierung der Zellwand führt. Die weiteren Bestandteile, Glukose und Tris-Puffer, dienen der Aufrechterhaltung des osmotischen Milieus und des pH-Wertes. Anschließend werden durch Zugabe des anionischen Detergenz SDS die zellulären Proteine denaturiert, und durch Erhöhung des pH-Wertes mit Natriumhydroxid fallen Plasmid- und chromosomale DNA aus. Kaliumacetat wirkt pH-neutralisierend und führt dazu, dass Plasmid-DNA renaturieren kann, wobei chromosomale DNA weiterhin in denaturierter Form vorliegt. Durch Zugabe von Ethanol werden Plasmid-DNA und RNA gefällt. Um Verunreinigungen durch RNA zu vermeiden, wird im folgenden Restriktionsansatz RNase zugegeben.

Zur alkalischen Lyse wurden 1,5 ml der Übernachtskultur 20 s bei 13.000 Upm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension des Pellet in 100 µl GTE-Lösung, wurden 200 µl NaOH/SDS zugegeben, und die Suspension wurde nach mehrfachem Invertieren 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgte die Zugabe von 150 µl KAc und eine Inkubation auf Eis für 3 min. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm und 4 °C wurde der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und die darin enthaltene DNA durch Zugabe von 800 µl 99 %igem Ethanol gefällt, pelletiert (3 min, 13.000 Upm) und in 20 µl Wasser aufgenommen. Die Aufbewahrung der DNA-Lösung erfolgte bei -20 °C.

14.2.2. innuPREP Plasmid Mini Kit

Das innuPREP Plasmid Mini Kit (analytikjena, Jena) ermöglicht eine schnelle Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in hochreiner Form. Die Methode basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse mit anschließender Bindung der DNA an das Filtermaterial einer Zentrifugationssäule. Die DNA wird nach mehreren Waschschritten mit sterilem Wasser eluiert. Die Plasmidisolierung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

15. Transformationsmethoden

15.1. Bakterien

SOC-Medium

| | |
|-------------------|--------|
| Hefeextrakt | 0,5 % |
| Pepton | 2,0 % |
| Glukose | 20 mM |
| NaCl | 10 mM |
| MgSO ₄ | 10 mM |
| MgCl ₂ | 10 mM |
| KCl | 2,5 mM |

Die Elektroporation ist eine effiziente Transformationsmethode für pro- und eukaryontische Zellen. Es wird mit Hilfe eines Kondensators kurzzeitig ein elektrisches Feld angelegt, was zur Bildung von Poren in der Zellmembran elektrokompenter Zellen führt. Dadurch sind die Zellen in der Lage Makromoleküle aus ihrer Umgebung aufzunehmen (Calvin & Hanawalt, 1988; Dower *et al.*, 1988).

Herstellung elektrokompenter Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* mittels Elektroporation werden elektrokompente Zellen benötigt, welche sich dadurch auszeichnen, dass sie in der logarithmischen Wachstumsphase geerntet und vollkommen salzfrei präpariert wurden. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurden 200 ml LB-Medium 1 %ig mit einer TOP10-Übernachtskultur angeimpft und für etwa vier Stunden bei 37 °C und 220 Upm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,7 bis 1,2 erreicht wurde. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Kultur für 5 min bei 4 °C und 8.000 Upm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit 10 %igem Glycerin gewaschen und im verbleibenden Überstand resuspendiert. Nachdem die Suspension in ein Eppendorfgefäß überführt wurde, erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 4 °C und 8.000 Upm. Anschließend wurde das Pellet einmal mit 10 %igem Glycerin gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in gleichem Volumen 10 %igem Glycerin aufgenommen. Von dieser Suspension wurden 40 µl-Aliquots hergestellt, welche bei -80 °C aufbewahrt wurden.

Elektroporation

Zur Elektroporation wurden zunächst die zu transformierenden Ligationsansätze eine Stunde auf einer Nitrocellulosemembran (Millipore, Eschborn) gegen 10 %iges Glycerin dialysiert. Die Dialyse dient der Entfernung von Salzen aus der Lösung, um eine Spannungsentladung im Ansatz zu vermeiden. Anschließend wurden 40 µl elektrokompetente Zellen mit dem dialysierten Ligationsansatz versetzt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Bio-Rad) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 200 Ω, 25 µF und 2,5 kV/cm (Gene PulseII, Bio-Rad). Nach sofortiger Zugabe von 1 ml SOC-Medium wurde der Ansatz eine Stunde bei 37 °C und 220 Upm inkubiert. Von der Suspension wurden jeweils 500 µl, 300 µl und 200 µl auf eine LB_{Amp}-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

15.2. Hefen

Lithiumacetat-Lösung (10x)

| | |
|---|------|
| Lithiumacetat | 10 M |
| Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 7,5 eingestellt. | |

PEG-Lösung (50 %)

| | |
|------------------------|------------|
| Polyethylenglykol-4000 | 50 % (v/v) |
|------------------------|------------|

TE-Puffer (10x)

| | |
|--|--------|
| Tris | 100 mM |
| Na ₂ EDTA | 10 mM |
| Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt. | |

LiAc/TE-Lösung

| | |
|-------------------|------------|
| 10x Lithiumacetat | 10 % (v/v) |
| 10x TE-Puffer | 10 % (v/v) |
| Aqua dest. | 80 % (v/v) |

PEG-Lösung

| | |
|-------------------|------------|
| 10x Lithiumacetat | 10 % (v/v) |
| 10x TE-Puffer | 10 % (v/v) |
| PEG 4000 (50 %) | 80 % (v/v) |

Zur Transformation mittels Lithiumacetat-Methode wurde 1 ml Übernachtskultur pelletiert (5 min, 8.000 Upm). Das Pellet wurde in 500 µl LiAc/TE gewaschen und in 100 µl LiAc/TE resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl Carrier-DNA (Heringssperma-DNA, 10 mg/ml, hitzedenaturiert), etwa 300 ng des zu transformierenden Plasmides, 3 µl 10x LiAc und 600 µl PEG-Lösung zugegeben, und der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C und 220 Upm inkubiert. Nach 15-minütigem Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad wurde der Ansatz 1 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 500 µl 1x TE gewaschen und in 500 µl 1x TE aufgenommen. Die Zellsuspension wurde auf den entsprechenden d/o-Agar ausplattiert und drei bis fünf Tage bei 30 °C inkubiert.

16. Zellzahlbestimmung

16.1. Bestimmung der Gesamtzellzahl bei Hefezellen

Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer-improved, Kammertiefe: 0,1 mm) bestimmt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^3} = \frac{\text{Zellzahl in 80 Kleinquadraten} \times 4.000.000 \text{ cm}^{-3}}{80 \times \text{Verdünnungsstufe}}$$

16.2. Bestimmung der Gesamtzellzahl bei Säugerzellen

Zählkammer:

Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer (Neubauer-improved, Kammertiefe: 0,1 mm) bestimmt. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet (Phelan, 2007):

$$\frac{\text{Zellen}}{\text{cm}^3} = \frac{\text{Zellzahl in 64 Quadraten} \times 160.000 \text{ cm}^{-3}}{64 \times \text{Verdünnungsstufe}}$$

Zellanalysegerät CASY®:

Alternativ wurde die Zellzahl von Säugerzellen mit Hilfe des „cell counter and analyzer system“ CASY® (Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Dieses Gerät misst die Änderung des Widerstandes in Abhängigkeit von der Zeit, während die Zellen mit konstanter Geschwindigkeit eine Leitfähigkeitsmesszelle passieren. Gleichzeitig wird eine Pulsflächenanalyse durchgeführt, wodurch neben der Zellzahl auch die Zellgröße bestimmt werden kann. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

16.3. Bestimmung der Optischen Dichte

Die Optische Dichte einer Mikroorganismen-Kultur wurde durch spektralphotometrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm und als Referenz diente das entsprechende unbeimpfte Medium.

17. Zellaufschluss von Hefezellen

Proteaseinhibitor-Stammlösung

Eine Tablette des „protease inhibitor cocktail with EDTA“ (Roche, Mannheim) wurde in 2 ml sterilem H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

SUMEB-Puffer

| | |
|----------------|--------|
| SDS | 1,0 % |
| Harnstoff | 8,0 M |
| Ammoniumsulfat | 0,3 M |
| MOPS (pH 6,8) | 10 mM |
| EDTA | 10 mM |
| Bromphenolblau | 0,01 % |

MOPS wurde sterilfiltriert und dem restlichen Puffer nach dem Autoklavieren zugegeben.

Zum Zellaufschluss wurden etwa 1×10^9 Hefezellen einer Übernachtskultur 5 min bei 8.000 Upm zentrifugiert und einmal mit sterilem H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl SUMEB-Puffer mit 10 % Proteaseinhibitor-Stammlösung resuspendiert und es wurden etwa 0,3 g Glasperlen zugegeben. Der Zellaufschluss erfolgte in einer Schwingmühle (RetschTM, Haan) in drei Zyklen von 1 min mit je 1-minütiger Pause. Der Ansatz wurde anschließend 5 min bei 90 °C inkubiert und zur SDS-PAGE eingesetzt.

Zur Gewinnung von sezernierten Proteinen wurde der entsprechende Kulturüberstand mit 10 % Trichloressigsäure (TCA) gefällt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm und zweimaligem Waschen mit 80 % Aceton wurde das Pellet in SDS-Probenpuffer aufgenommen und zur SDS-PAGE eingesetzt.

18. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

3 x SDS-Probenpuffer

| | |
|------------------------|--------|
| 10 % SDS | 8,0 ml |
| 0,3 M Tris-HCl, pH 6,8 | 6,0 ml |
| Glycerin | 5,0 ml |
| H ₂ O | 1,0 ml |
| Bromphenolblau | |

Bei Verwendung von reduzierendem Probenpuffer wurden 5 % β -Mercaptoethanol zugegeben.

Tris-HCl/SDS

| | |
|-------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 8,45 | 3,0 M |
| SDS | 0,3 % |

5 x Anodenpuffer

| | |
|------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 8,9 | 1,0 M |
|------------------|-------|

5 x Kathodenpuffer

| | |
|--------|-------|
| Tris | 0,5 M |
| Tricin | 0,5 M |
| SDS | 0,5 % |

Zur SDS-PAGE wurden 10 %ige Tris/Tricin-Gele, bestehend aus einem Sammel- und einem Trenngel, nach folgendem Ansatz hergestellt:

Trenngel

| | |
|---------------------------------|------------|
| Rotiphorese [®] Gel 30 | 5,9 ml |
| Tris-HCl/SDS | 3,1 ml |
| H ₂ O dest. | 7,8 ml |
| Glycerin 79 % | 2,0 ml |
| TEMED | 25 μ l |
| APS (10 %) | 80 μ l |

Sammelgel

| | |
|---------------------------------|--------|
| Rotiphorese [®] Gel 30 | 1,6 ml |
| Tris-HCl/SDS | 3,1 ml |
| H ₂ O dest. | 7,8 ml |
| TEMED | 25 µl |
| APS (10 %) | 80 µl |

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit 2-Propanol überschichtet. Nach der Auspolymerisierung wurde das 2-Propanol abgenommen und das Sammelgel gegossen.

Die vorbereiteten Proben wurden in die Geltaschen pipettiert und zum Größenvergleich wurden 7 µl Marker „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific; s. Abb. 2) auf jedes Gel aufgetragen.

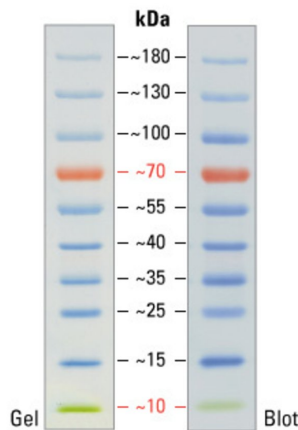


Abbildung 2: Fragmentgrößen des Markers „PageRuler™ Prestained Protein Ladder“ (Thermo Scientific), der zur Größenbestimmung der Proteine bei einer SDS-PAGE verwendet wurde.

Die Auftrennung der Proben erfolgte gelelektrophoretisch mit Hilfe des „Mini-Protean II“ Systems (Bio-Rad) zunächst bei 80 V; nach etwa 15 min wurde die Spannung auf 120 V erhöht.

19. Western Blot-Analyse

Transferpuffer

| | |
|----------|---------|
| Tris | 0,303 % |
| Glycin | 1,44 % |
| SDS | 0,1 % |
| Methanol | 20 % |

10x TBS

| | |
|------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 7,5 | 1,0 M |
| NaCl | 1,0 M |

Waschpuffer

| | |
|---------|--------|
| 10x TBS | 10 % |
| Tween20 | 0,05 % |

Blocking-Puffer

| | |
|----------------|-------|
| Magermilch | 5,0 % |
| In Waschpuffer | |

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels „Semi-dry-blotting“ auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Roche) übertragen. Dazu wurde die Membran zuerst 2 min in Methanol und anschließend in Transferpuffer inkubiert. Die verwendeten Filterpapiere (3 mm, Bio-Rad) und das SDS-Gel wurden ebenfalls etwa 10 min in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgte in einer „Trans-Blot® SD Electrophoretic Transfer Cell“ (Bio-Rad) für 90 min bei 50 mA pro Gel ($0,9 \text{ mA/cm}^2$), wobei die Spannung auf 15 V begrenzt wurde. Nach dem Transfer wurde die Membran über Nacht bei 4 °C in Blocking-Puffer inkubiert. Die Bindung des 1:1000 verdünnten primären anti-V5 Antikörpers (Maus, Bio-Rad) erfolgte für 1 h bei 20 °C unter ständigem Taumeln. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und 1 h bei 20 °C mit 1:10.000 verdünnten Meerrettich-Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörper (anti-Maus IgG, Sigma) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Chemilumineszenzreaktion unter Verwendung des „Western Lightning® Plus-ECL, Enhanced Chemiluminescence Substrate“ Kits (PerkinElmer), die mit Hilfe des „ChemiDoc XRS system“ (Bio-Rad) analysiert wurde.

20. Vitalitätsbestimmung

20.1. Propidiumiodid

Zur Überprüfung der Porenbildung in der Plasmamembran von Hefezellen wurde Propidiumiodid (PI) verwendet. PI ist ein Nukleinsäureinterkalator, welcher nur in Zellen mit perforierter Zellmembran eindringen kann. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm und das Emissionsmaximum bei 590 nm. Diese Maxima verschieben sich zu 535 nm bzw. 617 nm, wenn PI in DNA interkaliert. Zur PI-Färbung wurden 10^7 Hefezellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend mit 5 µg/ml Propidiumiodid für 15 min auf Eis im Dunkeln gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS konnten die Zellen zur FACS-Analyse oder Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

20.2. MTT-Assay

Das gelbe, wasserunlösliche Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) wird in metabolisch aktiven Zellen zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazanderivat reduziert. Durch Messung der Absorption bei 570 nm kann die relative Menge des Formazans nachgewiesen und somit Rückschlüsse auf die Zellvitalität gezogen werden.

Zur Analyse der Zellvitalität wurden je 10^7 Hefezellen in 100 µl Nanopartikellösung für 1 h inkubiert. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13.000 Upm wurde das Pellet in 100 µl YPD aufgenommen. Anschließend wurden 10 µl MTT-Lösung (Endkonzentration 0,5 g/l) zugegeben und 2 h bei 30 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die entstandenen Kristalle durch Zugabe von 100 µl DMSO gelöst. Die spektralphotometrische Messung erfolgte bei 550 nm mittels „SpectraMax® Pradigm® Multi-Mode Microplate Platform“ unter Verwendung der „Multi-Mode Analysis Software 2010“ (Molecular Devices).

21. Fluoreszenzfärbung

21.1. Indirekte Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Zellwandexpression der konstruierten Flagellin- und Invasinfusionsproteine wurde eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Dazu wurde ein primärer Antikörper verwendet, der an das entsprechende Proteinkonstrukt bindet, sowie ein FITC-gekoppelter, sekundärer Antikörper, der an den primären Antikörper bindet.

Nach entsprechender Kultivierung des transformierten Hefestammes wurden 200 µl der Kultur 5 min bei 9.000 Upm zentrifugiert und mit 1x PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl 1x PBS aufgenommen, mit 1 µl des primären Antikörpers (siehe Tabelle 6) versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen, in 100 µl 1x PBS aufgenommen und mit 1 µl FITC-konjugiertem anti-Maus IgG für 30 min im Dunkeln auf Eis gefärbt. Nach erneutem zweimaligen Waschen mit 1x PBS konnten die Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt werden.

Tabelle 6: Zur indirekten Immunfluoreszenz verwendete Antikörper, deren Ursprungsorganismus, Konjugation und Hersteller.

| Antikörper | Organismus | Konjugation | Hersteller |
|---------------|------------|-------------|------------|
| Anti-XPress | Maus | - | Invitrogen |
| Anti-V5 | Maus | - | Bio-Rad |
| Anti-Maus IgG | Ziege | FITC | Sigma |

21.2. Intrazelluläre Cytokinfärbung

Waschpuffer

| | |
|-------------|--------|
| FKS | 1 % |
| Natriumazid | 0,02 % |
| in 1x PBS | |

Zum intrazellulären Nachweis der Cytokinproduktion muss zunächst die Ansammlung der Cytokine in der Zelle durch Inhibierung der Sekretion sichergestellt werden. Hierfür wurde Brefeldin A verwendet, welches den Golgi-Transport inhibiert und somit die Cytokinsekretion verhindert. Für eine intrazelluläre Färbung müssen außerdem die Plasmamembranen der Zellen permeabilisiert werden, damit die Antikörper in die Zelle eindringen können. Zur Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurde das BD Cytotfix/Cytoperm™ Kit (BD Biosciences) nach Herstellerangaben verwendet; die verwendeten Antikörper sind in Tabelle 7 dargestellt.

Die Einzelzellsuspension einer Milz wurde mit 20 µg/ml Peptid in Gegenwart von 10 µg/ml Brefeldin A 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ restimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit Waschpuffer gewaschen und die Oberflächenmarker mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern für 30 min im Dunkeln gefärbt. Nach zwei Waschschritten wurden die Splenocyten mit 100 µl Fixation/Permeabilization solution 20 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit Perm/Wash™ Puffer gewaschen und 30 min bei 4 °C im Dunkeln mit BV421-konjugierten Cytokinantikörpern gefärbt. Die intrazellulären Antikörper wurden in Perm/Wash™ Puffer vorverdünnt, um die Permeabilität der Zellmembran aufrechtzuerhalten. Die Zellen wurden noch zweimal mit Perm/Wash™ Puffer gewaschen und bis zur FACS-Analyse bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

Tabelle 7: Zur intrazellulären Cytokinfärbung verwendete Antikörper, deren Ursprungsorganismus, Klon, Konjugation und Hersteller.

| Antikörper | Organismus | Klon | Konjugation | Hersteller |
|-------------------|------------|----------|-------------|--------------|
| Anti-CD8 | Ratte | 53-6.7 | BB515 | BD Horizon |
| Anti-CD4 | Ratte | RM4-5 | PE | BD Phamingen |
| Anti-IFN γ | Ratte | XMG1.2 | BV421 | BD Horizon |
| Anti-TNF α | Ratte | MP6-XT22 | BV421 | BD Horizon |

21.3. Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen mittels Pentameren

Durch Immunisierung mit einem Peptid kommt es zur Expansion einer spezifischen T-Zellpopulation, die ein bestimmtes TCR Repertoire aufweist. Um diese Population gezielt zu analysieren, können MHC-I-Peptid-Komplexe genutzt werden, die direkt an den jeweiligen TCR binden. Die in dieser Arbeit verwendeten Pro5[®] MHC class I Pentamere (ProImmune, Oxford) bestehen aus 5 PE-gekoppelten MHC-I-SIINFEKL-Untereinheiten und ermöglichen so die Detektion SIINFEKL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen.

Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben; die Stimulationszeit betrug 6 h und im Anschluss daran wurde die weiteren Färbungen wie unter 21.2. beschrieben durchgeführt.

22. Durchflusscytometrie

Fixierlösung (FACS-FIX):

| | |
|-----------------|--------|
| NaCl | 0,85 % |
| Paraformaldehyd | 1 % |

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,4 eingestellt.

Die Durchflusscytometrie ist eine Methode, welche die Analyse einzelner Zellen einer Zellpopulation aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika, wie Größe und Granularität, und ihrer Fluoreszenzeigenschaften ermöglicht. Eine Zellsuspension wird im Durchflusscytometer, auch „fluorescence activated cell sorting“ (FACS) genannt, durch Überdruck stark beschleunigt und in den Mikrokanal einer hochpräzisen Küvette eingeführt, wodurch ein Strahl aus einzelnen Zellen entsteht. Diese Zellen passieren einen Laserstrahl, der fluoreszierende Moleküle anregt und so zur Emission einer bestimmten Wellenlänge führt. Gleichzeitig wird auch das Streulicht detektiert, welches in Vorwärtsstreulicht (FSC = „forward scatter“) und Seitwärtsstreulicht (SSC = „side scatter“) unterteilt wird. Das Vorwärtsstreulicht wird auf Höhe des Laserstrahls gemessen und ist proportional zur Zellgröße. Die SSC-Diode detektiert das gestreute Licht im 90° Winkel zum Laserstrahl und gibt Auskunft über die Granularität der Zelle. Durch Festlegung eines „gates“ in einem Punktwolkendiagramm („dot plot“), in dem FSC und SSC gegeneinander aufgetragen sind, können die resultierenden Ergebnisse der Analyse auf die gewünschte Zellpopulation beschränkt werden.

Zur Untersuchung von IC21 auf TNF α -Expression wurde zunächst ein FACSCalibur™ (BD Biosciences, Heidelberg) verwendet. Die Analyse der eGFP-Expression in IC21 nach Nukleinsäure-Delivery erfolgte am Institut für Virologie (Universitätsklinikum Homburg) mittels BD FACScan™. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Programms BD CellQuest™. Alle weiteren durchflusscytometrischen Untersuchungen wurden am BD LSRFortessa™ durchgeführt und mit Hilfe der Software BD FACSDiva™ ausgewertet. Sofern notwendig wurden Hefezellen vor der Analyse mit CFSE (25 μ M, eBiosciences) bzw. Makrophagen mit CellTracker™ Deep Red (Life Technologies™) angefärbt. Von jeder zu untersuchenden Probe wurden mindestens 10.000 Zellen analysiert. Die für die Messung eingesetzten Zellen wurden, sofern nicht anders angegeben, in ein Rundbodengefäß (Falcon™) überführt und mit 1x PBS gewaschen (10 min, 300 x g). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das verbleibende Pellet in 200 μ l FACS-Fix aufgenommen und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis gelagert.

23. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine spezielle Form der Lichtmikroskopie, welche die Beobachtung von fluoreszierenden Molekülen ermöglicht. Diese sogenannten Fluorochrome sind dazu in der Lage, bei Anregung durch eine bestimmte Wellenlänge Licht zu emittieren. Durch Absorption von Photonen erreichen fluoreszierende Moleküle einen angeregten Zustand, in dem sie allerdings nur kurz verweilen. Anschließend fallen sie unter Energieverlust auf das ursprüngliche Energieniveau zurück und geben die übrige Energie in Form von Licht ab. Das emittierte Licht weist hierbei stets eine größere Wellenlänge auf als das anregende Licht und ist somit energieärmer (Stokes-Verschiebung).

23.1. Epifluoreszenzmikroskopie

Die Überprüfung der heterologen Expression von Proteinen in Hefezellen wurde am „Biozero BZ-8000“ (KEYENCE) unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs (PlanApo, VC, 100x, NA: 1.40 (Nikon)) durchgeführt. Dieses Mikroskop ist mit einer Quecksilberdampfampe und 3 unterschiedlichen Farbfiltern ausgestattet und ermöglicht eine schnelle fluoreszenzmikroskopische Analyse mit einer maximalen Auflösung von 200 nm.

23.2. Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie (CLSM)

Im Gegensatz zur konventionellen Lichtmikroskopie wird bei der konfokalen Laser-Scanning Mikroskopie nicht das gesamte Präparat gleichzeitig beleuchtet, sondern von einem fokussierten Laserstrahl punktförmig abgerastert. Durch diese Technik kann zum einen eine bessere Auflösung erreicht werden und zum anderen ermöglicht sie die Darstellung von kontrastreichen optischen Schnittbildern, welche lediglich das emittierte Licht eines kleinen Bereichs um die jeweilige Fokusebene enthalten. Zur Untersuchung der Lokalisation von Nanopartikeln in Hefezellen bzw. in Makrophagen wurde daher ein Zeiss Axio Observer mit LSM 710 Scanning Modul verwendet. Die Analyse der Bilddaten erfolgte mit Hilfe der ZEN 2 (blue edition) Software (Carl Zeiss Mikroskopie GmbH, Jena). Um besser zwischen Zellinnerem und -peripherie unterscheiden zu können wurde die Zellwand der untersuchten Hefen mit CFTM488A-konjugiertem Concanavalin A (Biotium) angefärbt; die Fixierung der Hefezellen erfolgte durch Zugabe von FluorSaveTM (Calbiochem) im Verhältnis 3:2. Die Gegenfärbung der Makrophagen erfolgte mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Roth) und CellMaskTMGreen (Life TechnologiesTM).

24. Transmissions-Elektronenmikroskopie

Die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) wurde mit Hilfe von Marcus Koch am Leibniz-Institut für neue Materialien (INM, Saarbrücken) durchgeführt. Dazu wurde ein Tropfen der zu untersuchenden Lösung auf einen Kohle-Lochfilm (Typ S147-4, Plano, Wetzlar) gegeben und bei RT getrocknet. Die TEM-Analyse wurde an einem JEM-2100 LaB6 Elektronenmikroskop (JEOL, Akashima, Japan) mit einer Beschleunigungsspannung von 200 kV durchgeführt. Für TEM-Aufnahmen mit einer Auflösung von 1024x1024 Pixeln wurde eine Orius SC1000 CCD Kamera (Gatan, Pleasanton, USA) verwendet (binning 2, Aufnahmezeit: 0,5 s).

25. Serumgewinnung aus humanem Vollblut

Für die Serumgewinnung erfolgte zunächst die Entnahme von humanem Vollblut mit Hilfe von Serum-Gel S-Monovetten[®] (Sarstedt, Nümbrecht). Nach ausreichender Gerinnung des Blutes (ca. 30 min bei Raumtemperatur) wurde es für 12 min bei 2.000 x g ohne Bremse zentrifugiert. Im Anschluss daran lag das Serum als Überstand vor, welcher durch eine Gelschicht vom Blutkuchen getrennt wurde. Das Serum wurde in ein steriles Gefäß überführt und bei -20 °C gelagert.

26. Opsonisierung von Hefezellen

Zur Opsonisierung wurden Zellen des jeweiligen Hefestammes mit einer Dichte von maximal 2×10^7 Zellen/ml in 1x PBS mit 25 % Serum aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend in RPMI 1640 aufgenommen. Die so präparierten Zellen konnten dann zur Inkubation mit APCs eingesetzt werden.

27. *In vitro* Differenzierung von humanen Makrophagen

Makrophagen lassen sich in M1- und M2-Subtypen unterteilen, wobei M1 Makrophagen durch Sekretion von entzündungsfördernden Cytokinen, wie IL-23, für die Aktivierung von T_H1-Zellen verantwortlich sind, während M2 Makrophagen durch die Produktion von IL-10 eher antiinflammatorische Effekte stimulieren (Verreck *et al.*, 2004). Außerdem unterscheiden sich M1 und M2 Makrophagen durch ihre morphologische Erscheinung; M1 Makrophagen haben eine klassische „Spiegelei“-Form, M2 Makrophagen hingegen zeigen eher eine gestreckte, spindelförmige Morphologie (Verreck *et al.*, 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Zellen der Monocytenzelllinie THP-1 zu Makrophagen differenziert und gegebenenfalls anschließend zu M1- bzw. M2-Phänotypen polarisiert. Im

Jahre 1996 entdeckten Schwende *et al.*, dass THP-1 Monocyten durch Zugabe von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenziert werden können. Basierend auf dieser Erkenntnis wurden zur Differenzierung von THP-1 Makrophagen 3×10^5 THP-1 Monocyten pro ml ausgesät und für 48 h in RPMI 1640 mit 10 % FKS und 30 ng/ml PMA kultiviert (Caras *et al.*, 2011). Zur Polarisierung von M1-Makrophagen wurden die PMA-differenzierten Zellen für weitere 40 h mit 1 μ g/ml LPS und 20 ng/ml IFN γ inkubiert. Stimulation der Makrophagen mit 200 ng/ml Il-10 für 40 h führte zur Ausbildung des M2-Phänotyps.

28. Immunisierung von Mäusen

Die Immunisierungsversuche wurden in Kooperation mit Priv.-Doz. Dr. Christoph Beisswenger und unter Anleitung von Anja Honecker im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Universitätsklinikum des Saarlandes) durchgeführt. C57BL/6J Mäuse wurden nach einwöchiger Eingewöhnung mit 3×10^8 Hefezellen in 200 μ l 1x PBS oder reinem PBS subkutan immunisiert. Nach 7 bzw. 14 Tagen erfolgte jeweils eine sogenannte Boosterimpfung um eine möglichst effiziente Immunisierung zu erreichen. Um nekrotischen Veränderungen an den Injektionsstellen vorzubeugen wurden die Vakzinierungen wechselseitig durchgeführt. Der Allgemeinzustand der Tiere wurde täglich überprüft und dokumentiert. Das Versuchsvorhaben (23/2013; AZ: C-1 2.4.2.2) wurde vom Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt.

29. Milzentnahme und Herstellung einer Einzelzellsuspension

Erythrocytenlysepuffer

| | |
|--------------------|--------|
| NH ₄ Cl | 150 mM |
| HEPES | 20 mM |
| EDTA | 0,1 mM |

Zur Organentnahme wurde die Maus mittels Überdosierung des Betäubungsmittels Ketamin/Xylazin getötet. Nach Eröffnung des Thorax wurde die Milz steril entnommen und zum Transport in 1x PBS auf Eis gelagert. Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurde die Milz in eine 6 well-Platte mit 5 ml 1x PBS überführt und durch ein 70 μ m Zellsieb passiert. Die entstandene Suspension wurde in Rundbodengefäße (Falcon™) überführt und 5 min bei 1.500 Upm und 4 °C zentrifugiert.

30. Nanopartikel

Die verwendeten Nanopartikel wurden am Institut für Biopharmazie und Pharmazeutische Technologie (Prof. Dr. Marc Schneider, Universität des Saarlandes) durch Emulsions-Diffusions-Abdampfungs-Technik aus Poly(Lactid-co-Glycolid) (PLGA) und ggf. Chitosan (cNP) hergestellt (Ravi Kumar *et al.*, 2004). Die Charakterisierung der Partikel erfolgte mit Hilfe eines Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical). Die Eigenschaften der verwendeten Nanopartikel sind in Tabelle 8 angegeben.

Tabelle 8: Eigenschaften der in dieser Arbeit verwendeten PLGA-Partikel. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte mit Standardabweichung (n=3) von Größe, Polydispersitätsindex (PDI), Zetapotential und Konduktivität der unterschiedlichen Partikel in 5 mM bzw. 154 mM NaCl-Lösung.

| | PLGA (5 mM) | PLGA (154 mM) | cNP (5 mM) | cNP (154 mM) |
|------------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|
| Größe [nm] | 193,8 ± 4,3 | 198,9 ± 1,15 | 237,5 ± 3,2 | 202,3 ± 2,7 |
| PDI | 0,042 ± 0,011 | 0,019 ± 0,014 | 0,09 ± 0,018 | 0,046 ± 0,006 |
| Zetapotential [mV] | -8,52 ± 0,2 | -1,69 ± 0,5 | 11,6 ± 1,4 | 3,25 ± 0,33 |
| Konduktivität [mS/cm] | 0,0372 ± 0,003 | 18,6 ± 1,85 | 0,516 ± 0,014 | 19,4 ± 1,7 |

31. Statistik

Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte (Student'scher t-Test) wurden mit dem Programm Microsoft Excel 2008 berechnet. In Abbildungen wird das Signifikanzniveau mit Sternen ausgedrückt; dabei bedeuten: * (signifikant): $p < 0,05$; ** (hoch signifikant): $p < 0,01$ und *** (extrem signifikant): $p < 0,001$.

III. Ergebnisse

Delivery-Systeme sind in den letzten Jahrzehnten in den Fokus vieler verschiedener Forschungsbereiche gerückt. Sowohl in der Tumorbekämpfung als auch bei Vakzinierungen ist es essentiell das entsprechende Arzneimittel bzw. Antigen sicher und effizient in die jeweiligen Zielzellen einzubringen. Aufgrund ihrer wichtigen Rolle bei der Generierung angeborener und adaptiver Immunantworten, aber auch ihrer Beteiligung an der Entstehung von chronisch entzündlichen Erkrankungen, sind Antigen-präsentierende Zellen (APC) sehr vielversprechende Zielzellen für verschiedene therapeutische Ansätze. In mehreren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass rekombinante Hefezellen dazu in der Lage sind Antigene in APC einzubringen und infolgedessen eine spezifische T-Zellaktivierung hervorzurufen (Stubbs *et al.*, 2001; Bazan *et al.*, 2011; Walch-Rückheim *et al.*, 2014).

In der vorliegenden Arbeit sollte das bereits etablierte Hefe-basierte Delivery-System zunächst durch zusätzliche Expression von immunstimulatorischen bzw. porenbildenden Proteinen optimiert werden und seine Funktionalität *in vivo* überprüft werden. Außerdem sollte die Interaktion zwischen verschiedenen Hefegattungen und PLGA-Partikeln als Grundlage für ein neuartiges „nano-in-micro“ Delivery-System untersucht werden.

1. Optimierung des Hefe-basierten Delivery-Systems

Im Rahmen der Dissertationen von Bazan und Walch wurde bereits ein Hefe-basiertes System etabliert, welches das Einbringen von Antigenen sowohl als Protein als auch in Form von Nukleinsäuren in APC ermöglicht. Dieses System sollte in der vorliegenden Arbeit optimiert werden um die Effizienz des Deliverys weiter zu verbessern.

1.1. Steigerung der immunstimulatorischen Wirkung von Hefezellen durch rekombinante Flagellinexpression

Ein Vehikel, welches als Impfstoffcarrier eingesetzt werden soll, muss über eine gewisse immunstimulatorische Wirkung verfügen, damit die zusätzliche Gabe von Adjuvantien vermieden werden kann. Obwohl die Hefezellwand bereits natürliche Stimulantien wie β -1,3-Glukan und Mannan beinhaltet (Suzuki *et al.*, 1989; Toda *et al.*, 1997), könnte der adjuvante Effekt eines Hefevakzins durch rekombinante Flagellinexpression zusätzlich verstärkt werden.

1.1.1. Heterologe Expression des Flagellinderivats FliC in *Saccharomyces cerevisiae*

Die in dieser Arbeit verwendete Flagellinvariante basiert auf dem pharmakologisch optimierten Derivat CBLB505, welches aus den konservierten N- und C-terminalen Domänen des Flagellins aus *Salmonella enterica* (FliC) besteht. Dieses Derivat zeichnet sich durch seine außerordentliche Stabilität, uneingeschränkte NF- κ B Aktivierung und geringen toxischen Effekt aus (Burdelya *et al.*, 2008). Die im weiteren Verlauf als FliC bezeichnete Variante setzt sich im Detail aus den Flagellinfragmenten 1-175 und 401-504, die durch einen 16 AS-Linker miteinander verbunden sind, zusammen. Die FliC-Sequenz wurde als Codon-optimierte Version von GeneArt[®] (Regensburg) synthetisiert, anschließend mit entsprechenden Primern mittels PCR amplifiziert und über die Schnittstellen *XhoI* und *BglII* in den Vektor pPGK einkloniert (Abb. 3A). Zur Konstruktion der sekretorischen FliC-Variante wurde der Primer 5'K1SS-FliC verwendet, der zusätzlich die Sequenz des Sekretionssignals von K1 beinhaltet. Die Transformation der konstruierten Vektoren in den *S. cerevisiae* Stamm S86c wurde mittels Lithiumacetat-Methode durchgeführt. Anschließend erfolgte die Expressionskontrolle mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse des Zelllysats (FliC-V5) bzw. Kulturüberstandes (K1SS-FliC-V5) unter Verwendung eines anti-V5-Antikörpers. Das in Abbildung 3B dargestellte Ergebnis zeigt sowohl für die intrazelluläre als auch für die sekretorische FliC-Variante ein Signal in Höhe von etwa 36 kDa, was der erwarteten Größe des Proteins entspricht.

Für die Oberflächenexpression von FliC wurde ein Hefe-Display-System angewandt, das auf Pir-Proteinen aus *Pichia pastoris* beruht. „Proteins with internal repeats“ (PIR) sind hochkonservierte Glykoproteine und bilden die größte Familie unter den Zellwandproteinen, die eine Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-unabhängige Zellwandverankerung vermitteln (Sumita *et al.*, 2005). Die hier verwendeten Gene *PIR1* und *PIR2* bestehen aus 1068 bzw. 972 Basen, die für eine sich wiederholende 12 Aminosäuren-Sequenz (SQIGDGQIQATT) codieren (Khasa *et al.*, 2011). Beide Gensequenzen wurden mittels PCR aus dem *P. pastoris* Stamm GS115 isoliert und durch entsprechende Primersequenzen mit Schnittstellen versehen. Die so entstandenen Genfragmente wurden anschließend über die Restriktionsstellen *XhoI* und *EcoRI* in den Vektor pPGK-FliC-V5 zwischen Promotor und FliC eingebracht. Nach Transformation des Plasmids pPGK-PIR1/PIR2-FliC-V5 in S86c wurde die Flagellinexpression mittels indirekter Immunfluoreszenz mit Hilfe eines anti-V5-Antikörpers nachgewiesen (Abb. 3C).

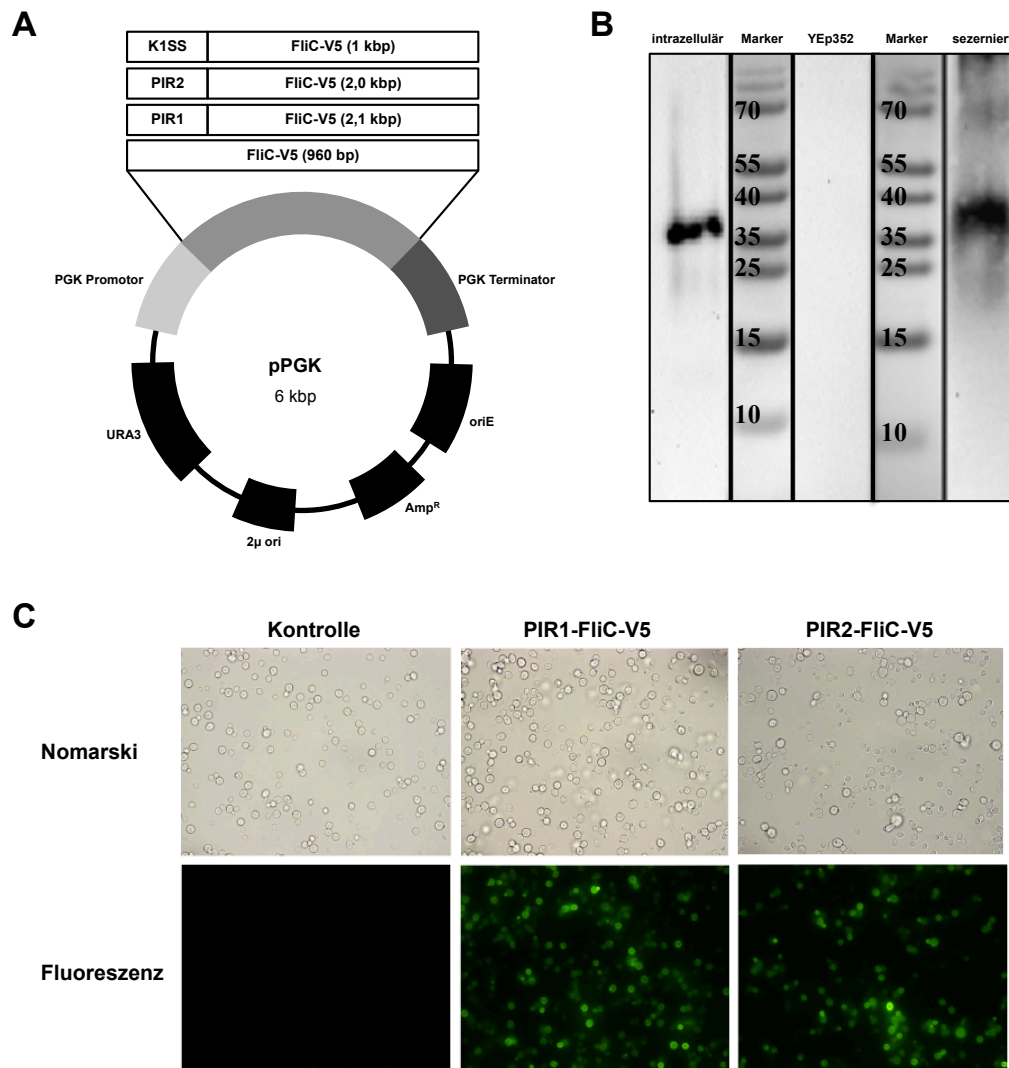


Abbildung 3: Heterologe Expression von FliC in *S. cerevisiae*. (A) Schematische Darstellung der konstruierten Vektoren zur Expression der Flagellin-Varianten. (B) Expressionsnachweis der cytosolischen und sekretorischen FliC-Variante; der dargestellte Western-Blot zeigt FliC-spezifische Signale (36 kDa) für beide Varianten. (C) Expressionskontrolle der zellwandverankerten FliC-Fusionsproteine; Nomarski- und Fluoreszenzaufnahmen von *S. cerevisiae* S86c nach indirekter Immunfärbung mit anti-V5- (Maus) und FITC-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper; neben den mit pPGK-PIR1/PIR2-FliC-V5 transformierten Hefezellen, wurden mit Leervektor transformierte Zellen als Kontrolle mitgeführt.

Nachdem die Expression aller FliC-Varianten im Stamm S86c erfolgreich nachgewiesen werden konnte, wurden die Hefezellen zur Untersuchung der Aktivierung von murinen Makrophagen eingesetzt.

1.1.2. Einfluss der subzellulären Lokalisation von Flagellin in *Saccharomyces cerevisiae* auf die Aktivierung von Makrophagen

Die immunstimulatorische Wirkung der FliC-exprimierenden Hefezellen sollte *in vitro* an der murinen Makrophagenzelllinie IC21 überprüft werden. Als Maß für die Aktivierung der APC wurde die TNF α -Produktion gemessen. Hierzu wurden 2×10^5 Makrophagen pro ml im 24-well Format ausgesät und nach vollständiger Adhärenz mit 1×10^6 Zellen der zu untersuchenden rekombinanten Hefen (MOI 5) für 16 h inkubiert. Anschließend wurden nicht-phagozytierte Hefezellen durch sorgfältiges Waschen entfernt und die Makrophagen aus den wells gelöst. Nach Permeabilisierung der Makrophagen folgte die intrazelluläre Färbung mit PE-gekoppeltem anti-TNF α Antikörper. Die Zellen wurden schließlich durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht.

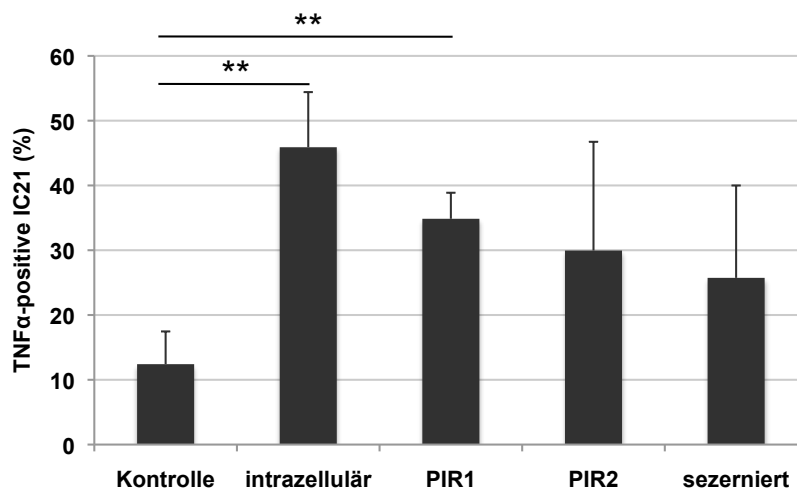


Abbildung 4: Aktivierung von Makrophagen durch FliC-exprimierende Hefezellen. Murine Makrophagen (IC21) wurden mit Hefezellen (S86c) inkubiert, welche die verschiedenen FliC-Varianten exprimieren; als Kontrolle wurden Leervektor-tragende S86c mitgeführt. Die Anzahl TNF α -positiver IC21 wurde mittels FACS-Analyse bestimmt; dargestellt sind die Mittelwerte aus 3 unabhängigen Experimenten mit dazugehöriger Standardabweichung; zur statistischen Analyse wurde der Student'sche t-Test durchgeführt; ** $p < 0,01$.

Abbildung 4 zeigt, dass die TNF α -Produktion in Makrophagen durch Flagellin-exprimierende Hefezellen gesteigert werden kann. Während nach Inkubation mit Leervektor-tragenden Hefen lediglich bei etwa 12 % der Makrophagen eine Expression von TNF α nachweisbar war, stieg die Anzahl TNF α -positiver Zellen bei Zellwandverankerung von FliC via Pir1 signifikant auf ca. 35 % und sogar auf 45 % bei intrazellulärer FliC-Expression. Obwohl die Expression von sezerniertem Flagellin und die Oberflächenmodifikation durch PIR2-FliC anhand dieser Ergebnisse eine gesteigerte Makrophagenaktivierung vermuten lassen (26 % bzw. 30 %), kann diese aufgrund fehlender Signifikanz nicht konkret bestätigt werden.

1.2. Optimierung des Nukleinsäure-Deliverys durch Koexpression von Perforin

Für ein effizientes Einbringen von DNA und mRNA in die Zielzelle ist die Translokation aus dem Phagolysosom in das Cytosol entscheidend. Daher sollte überprüft werden, ob durch Koexpression des porenbildenden Proteins Perforin die Translokationseffizienz der Nukleinsäuren gesteigert werden kann. Perforin dient natürlichen Killerzellen und CTLs der Abtötung von Zielzellen. Das etwa 70 kDa große Protein liegt in cytoplasmatischen Granula vor und kann nach der Freisetzung Poren in der Zielzelle bilden, wodurch diese schließlich abgetötet wird. Die Porenbildung ist ein Ca^{2+} -abhängiger Prozess, bei dem es zunächst zur Insertion von Perforin in die Plasmamembran und anschließend durch Polymerisierung zu porenbildenden Aggregaten kommt (Podack & Konigsberg, 1984; Masson & Tschopp, 1985). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von Listeriolysin (LLO) aus *Listeria monocytogenes* zur Steigerung eines Proteindeliverys in APC führt (Walch *et al.*, 2011). Da es sich bei Listeriolysin allerdings um ein bakterielles Toxin handelt, ist sowohl die Zulassung als auch die Akzeptanz eines LLO-beihaltenden Vehikels fragwürdig. Aus diesem Grund sollte LLO durch humanes Perforin ersetzt werden. In ihrer Dissertation hat Walch bereits eine auf 124 Aminosäuren verkürzte Perforinvariante (Perforin Δ C, Li *et al.*, 2001) erfolgreich in Hefen exprimiert und konnte einen toxischen Effekt auf die Zellen ausschließen. Im Folgenden sollte der positive Effekt der Perforinexpression auf ein DNA- und mRNA-Delivery im Vergleich zu einer nicht funktionellen Perforinvariante (PerforinD435A) nachgewiesen werden. Voskoboinik *et al.* (2005) konnten zeigen, dass eine Mutation an der Stelle 435 von Aspartat zu einem Alanin zum Funktionsverlust des Proteins führt. Die PerforinD435A-Sequenz wurde von GeneArt (Regensburg) in Form eines Gene StringsTM synthetisiert und nach Anfügen von A-Überhängen mittels AccepTor Cloning in den Vektor pSTBlue-1 inkloniert. Schließlich wurde die PerforinD435A-Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *XhoI* und *XbaI* in den Zielvektor p*ICL1 eingebracht (Abb. 5A) und zusammen mit pCMV-IRES-eGFP bzw. pICL1-IRES-eGFP in den *S. cerevisiae* Stamm S86c kotransformiert. Die Selektion erfolgte auf Ura/Leu d/o-Medium. Analog dazu erfolgte die Kotransformation von p*ICL1-Perforin Δ C bzw. dem Leervektor YEp351 mit den beiden Plasmiden zum DNA- und RNA-Delivery. Die rekombinanten Hefen wurden dann mit einer MOI von 7 zu der Makrophagenzelllinie IC21 gegeben und für 16 h inkubiert. Die Effizienz des Nukleinsäure-Deliverys wurde anhand der Anzahl eGFP-exprimierender Makrophagen durchflusscytometrisch analysiert.

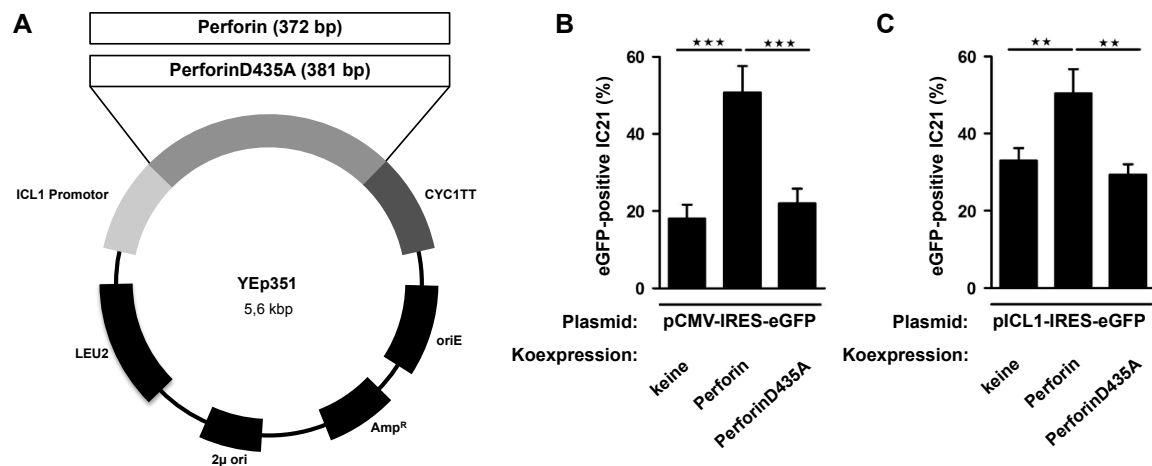


Abbildung 5: Koexpression von Perforin zur Verbesserung des Nukleinsäure-Deliverys.

(A) Schematische Darstellung der Vektoren zur Expression von Perforin bzw. PerforinD435A. (B)+(C) Hefezellen, die mit pCMV-IRES-eGFP (B: DNA-Delivery) oder pICL1-IRES-eGFP (C: RNA-Delivery) transformiert sind und zusätzlich Perforin bzw. das inaktive Derivat PerforinD435A exprimieren, wurden mit einer MOI von 7 zu IC21 gegeben. Nach 16-stündiger Inkubation wurde die Anzahl eGFP-exprimierender Makrophagen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen zweier unabhängiger Experimente, die jeweils in Duplikaten durchgeführt wurden; zur statistischen Analyse wurde der Student'sche t-Test durchgeführt; **p < 0,01, ***p < 0,001 (vgl. Walch-Rückheim *et al.*, 2016).

In Abbildung 5B ist zu erkennen, dass die eGFP-Expression unter Kontrolle des CMV Promotors (DNA-Delivery) durch Koexpression von Perforin signifikant von etwa 19 % eGFP-positiver Zellen auf 50 % gesteigert werden konnte, während die Koexpression des inaktiven PerforinD435A zu keiner Veränderung führte.

Bezüglich des Deliverys von eGFP-codierender mRNA (Abb. C) konnte eine eGFP-Expression in 35 % der Makrophagen nachgewiesen werden, welche durch Koexpression von Perforin, nicht aber durch PerforinD435A, signifikant auf etwa 50 % eGFP-positiv Zellen erhöht werden konnte. Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, dass eine Verbesserung des Nukleinsäure-Deliverys erzielt werden konnte, welche eindeutig auf die porenbildende Aktivität von Perforin zurückzuführen ist.

2. Anwendung des Hefe-basierten Delivery-Systems *in vivo*

Nachdem die Funktionalität des Hefe-basierten Delivery-Systems *in vitro* durch mehrere Studien bestätigt werden konnte, sollte im Rahmen dieser Arbeit die Anwendbarkeit *in vivo* unter verschiedenen Gesichtspunkten überprüft werden. Zum einen sollte die effiziente Aufnahme von modifizierten Hefezellen in Zellen des Darmepithels nach oraler Applikation bestätigt werden und zum anderen sollten Vakzinierungsexperimente zur Überprüfung des Hefe-vermittelten Antigen-Deliverys im Mausmodell durchgeführt werden.

2.1. Oberflächenmodifikation von Hefezellen zur verbesserten Aufnahme nach oraler Applikation

Die orale Applikation von Arznei- oder Impfstoffen bietet verglichen mit Injektionen viele Vorteile. Neben der Tatsache, dass die Bereitschaft der Bevölkerung zu einer oralen und somit schmerzfreien Medikamentenverabreichung wesentlich höher ist als zu einer Injektion, ist die orale Applikation auch mit deutlich geringerem Aufwand verbunden, da weder spezielle Materialien (Kanülen, Spritzen,...) noch geschultes Personal dafür benötigt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Hefezellen im Darm von M-Zellen aufgenommen und durch das Darmepithel transportiert werden können (Beier & Gebert, 1998). Um die Adhäsion der Hefen an die Epithelzellen zu verbessern, etablierte Kenngott im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2010) ein System zur Expression von Invasin auf der Hefezellwand und verglich die Effizienz verschiedener Invasinderivate aus *Yersinia pseudotuberculosis* und *Yersinia enterocolitica* mit Hilfe eines M-Zell-Modells. Da die auf 198 AS verkürzte Invasinvariante aus *Y. enterocolitica* (Y.ent Inv₁₉₈) *in vitro* die effektivste Bindung an M-Zellen vermitteln konnte, sollte nun überprüft werden, ob die Oberflächenmodifikation von Hefezellen mit dieser Variante *in vivo* zu einer verstärkten Aufnahme über die Darmschleimhaut führt. Hierzu wurden Zellen des *S. cerevisiae* Stammes EBY100 mit dem bereits vorhandenen Plasmid zur α -Agglutinin-vermittelten Oberflächenexpression von Y.ent Inv₁₉₈ (pYD1-Y.ent Inv₁₉₈) transformiert und nach Selektion auf Trp d/o Medium in glukosehaltigem Medium (YNB-CAA) kultiviert. Da sowohl *AGA1* als auch das *AGA2*-Invasin-Fusionsgen unter Kontrolle eines GAL-Promotors stehen, erfolgte die Induktion in galaktosehaltigem YNB-CAA. Die Expressionskontrolle wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz unter Verwendung eines anti-Xpress-Antikörpers durchgeführt.

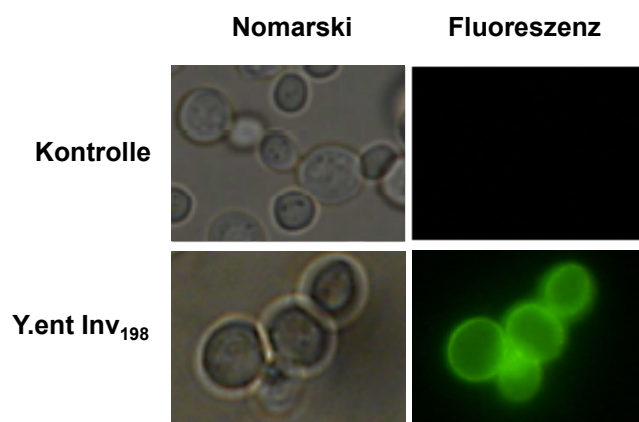


Abbildung 6: Expressionskontrolle der verkürzten Invasinvariante aus *Y. enterocolitica*. Nomarski- und Fluoreszenzaufnahmen von *S. cerevisiae* EBY100 nach indirekter Immunfärbung mit anti-Xpress- (Maus) und FITC-gekoppeltem anti-Maus-Antikörper; neben den mit pYD1-Y.ent Inv₁₉₈ transformierten Hefezellen, wurden wildtypische EBY100 als Kontrolle mitgeführt.

Abbildung 6 zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der mit pYD-Y.ent Inv₁₉₈ transformierten Hefen. Diese wiesen nach indirekter Immunfärbung im Gegensatz zur untransformierten Kontrolle eine deutliche Färbung im Bereich der Zellperipherie auf, was auf eine korrekte Verankerung der Invasinvariante in der Hefezellwand schließen lässt.

Nach erfolgreicher Expressionskontrolle wurden die rekombinanten Hefen in Aliquots zu je 1×10^8 Zellen lyophilisiert um eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den Proben bei Anwendung in unterschiedlichen Experimenten zu gewährleisten. Die folgenden *in vivo* Experimente wurden im Institut für experimentelle Rheumatologie (Charité, Berlin) von Elisabeth Kenngott durchgeführt. Hierzu wurden die Hefezellen zunächst mittels CFSE gefärbt und dann in einem Gesamtvolumen von 200 μ l oral über eine Sonde an jeweils drei Mäuse des Stammes BALB/c verabreicht.

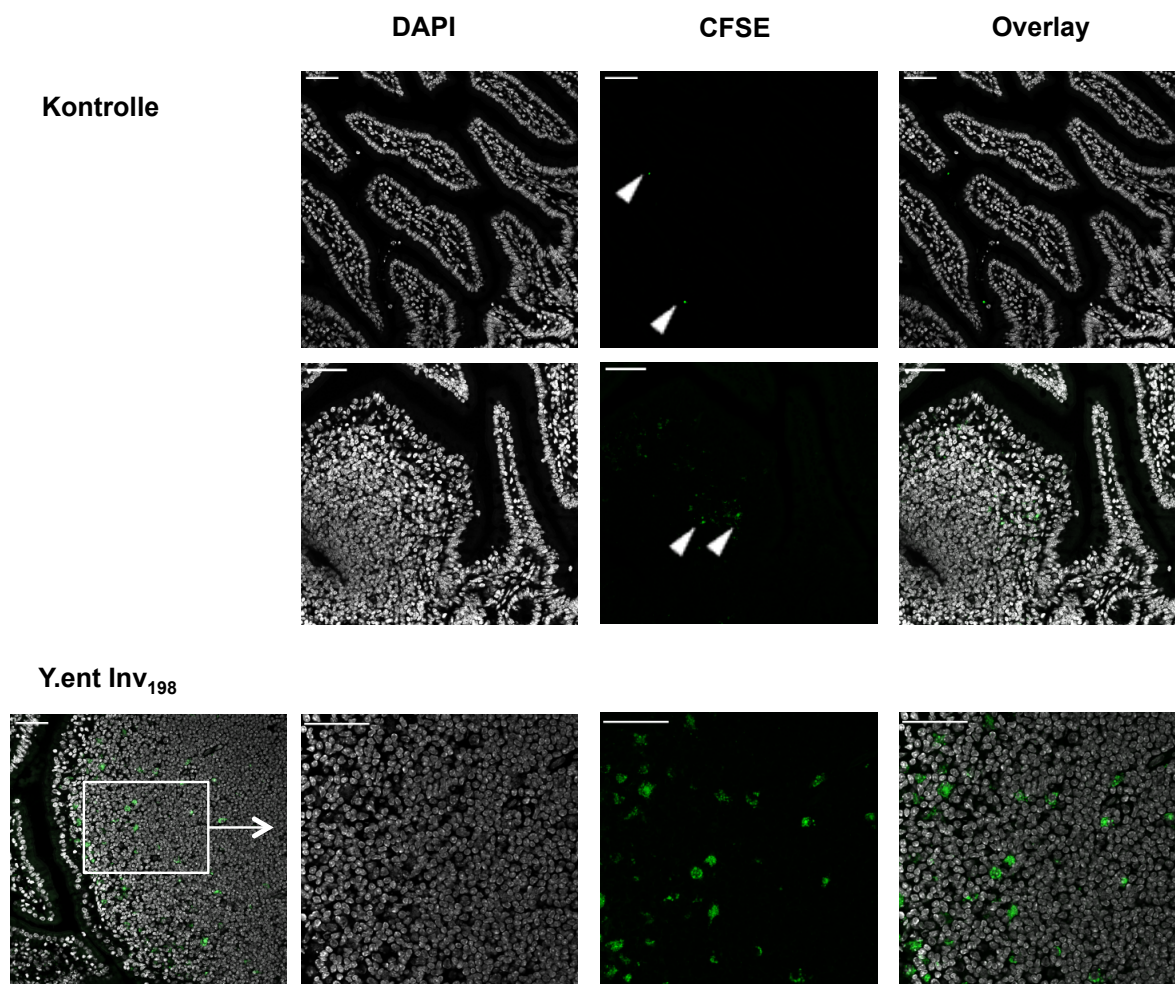


Abbildung 7: Expression von Invasin erhöht die Aufnahme von Hefezellen aus dem Darmlumen *in vivo*. BALB/c Mäusen wurden 1×10^8 CFSE-gefärbte Hefezellen oral verabreicht. Nach 4 h wurde der Dünndarm entfernt und zur Kryosektion vorbereitet. Die Schnitte wurden mit DAPI-haltigem Mounting Medium überschichtet und zur konfokalen Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Beispiel sowohl als Einzelfluoreszenzaufnahme, als auch als Overlay (n=3; Maßstab: 50 μ m; vgl. Kenngott *et al.*, 2016).

Abbildung 7 zeigt mikroskopische Aufnahmen der Dünndarmschnitte vier Stunden nach oraler Verabreichung von Leervektor-Hefen (obere und mittlere Reihe) bzw. Y.ent Inv₁₉₈-exprimierenden Hefezellen (untere Reihe). Die Lokalisation der CFSE-gefärbten Kontrollzellen beschränkte sich fast ausschließlich auf das Darmlumen (Abb. obere Reihe). Lediglich vereinzelte Signale innerhalb der Peyer'schen Plaques weisen auf die bereits bestätigte Aufnahme unmodifizierter Hefezellen über M-Zellen aus dem Darmlumen hin (Abb. 7 mittlere Reihe; Beier & Gebert, 1998). Im Gegensatz dazu konnte eine Vielzahl Y.ent Inv₁₉₈-exprimierender Hefezellen im Gewebe der Peyer'schen Plaques nachgewiesen werden (Abb. 7 untere Reihe). Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass Hefezellen durch Oberflächenmodifikation mit Invasin gezielter und effizienter an M-Zellen binden und somit verstärkt in umliegendes Gewebe aufgenommen werden können.

2.2. Nachweis einer Antigen-spezifischen Immunreaktion in Mäusen nach Vakzinierung mit rekombinanten Hefen

Zur Untersuchung des Hefe-vermittelten Antigen-Deliverys *in vivo* wurde das Modellprotein Ovalbumin zur rekombinanten Expression in *S. cerevisiae* verwendet. Ovalbumin (Ova) ist ein 43 kDa großes, sekretorisches Glykoprotein, welches ein H-2K^b restringiertes Epitop (SIINFEKL) enthält und sich somit zum Nachweis einer spezifischen T-Zellaktivierung eignet. Da sekretorische Proteine weniger effektiv im Kontext mit MHC-I Molekülen präsentiert werden, sollten in dieser Arbeit verschiedene subzelluläre Lokalisationen von Ovalbumin untersucht werden (Rush *et al.*, 2002). In ihrer Dissertation konnte Bazan bereits verschiedene Ovalbuminderivate im *S. cerevisiae* Stamm S86c exprimieren und deren Fähigkeit zur Aktivierung von Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellen *in vitro* nachweisen (Bazan *et al.*, 2011). Neben wildtypischem, sezerniertem Ovalbumin (Ova) wurden hierzu eine cytosolische Variante mit deletiertem Sekretionssignal (Ova_{cyt}), ein zellwandverankertes Ovalbuminderivat (Ova-sed1) und Ovalbumin-VLPs (Ova-VLP) eingesetzt. Die bereits von Bazan konstruierten Expressionsplasmide (Abb. 8) wurden für die folgenden Versuche in den Stamm S86c transformiert und nach erfolgter Expressionskontrolle (Daten nicht gezeigt) wurden die rekombinanten Hefen in Aliquots von je 1×10^8 Zellen zur besseren Vergleichbarkeit lyophilisiert.

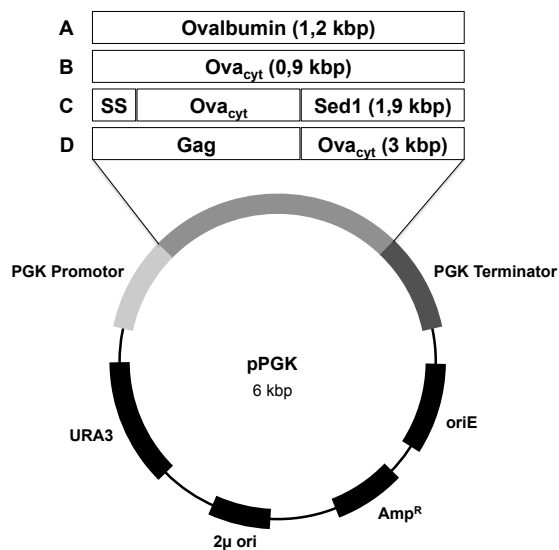


Abbildung 8: Heterologe Expression der Ovalbuminvarianten in *S. cerevisiae*.

Schematische Darstellung der Vektoren zur Expression von Ovalbumin. (A) Wildtypisches Ovalbumin, welches aufgrund einer internen Signalsequenz sezerniert wird. (B) Cytosolische Ovalbuminvariante (Ova_{cyt}) mit deletiertem Sekretionssignal. (C) Fusion zur Zellwandverankerung von Ovalbumin, bestehend aus Ova_{cyt} und Sed1 mit vorangestelltem *KRE1*-Sekretionssignal. (D) Derivat zur Assemblierung von Ovalbumin-VLPs durch in frame-Klonierung von Ova_{cyt} in die L-A *gag*-Sequenz.

Die Immunisierungsversuche wurden im Institut für medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Universitätsklinikum des Saarlandes) in Kooperation mit Priv.-Doz. Dr. Christoph Beisswenger und unter Anleitung von Anja Honecker durchgeführt. C57BL/6J Mäuse wurden im Intervall von jeweils einer Woche insgesamt dreimal mit Ova-exprimierenden Hefezellen, leervektortragenden Hefezellen oder 1x PBS subkutan immunisiert (Abb. 9). Eine Woche nach der dritten Injektion erfolgte die Milzentnahme und nach Herstellung einer Einzelzellsuspension wurden die Splenocyten mit 20 µg/ml SIINFEKL restimuliert und auf spezifische Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen untersucht.



Abbildung 9: Schematische Darstellung der Vakzinierungsversuche. Nach einwöchiger Eingewöhnung wurden C57BL/6J Mäusen dreimal im Abstand von jeweils 7 Tagen subkutan Ova-exprimierende Hefezellen (3×10^8 Zellen in 200 µl 1x PBS) injiziert. Als Kontrollen wurden zusätzlich leervektortragende Hefezellen und reines PBS mitgeführt. An Tag 28 erfolgten die Präparation der Milzen sowie die Herstellung der Einzelzellsuspensionen.

Die Analyse der Splenocyten erfolgte durchflusscytometrisch nach Anfärbung der CD8⁺ Zellen und intrazellulärer Cytokinfärbung. In Abbildung 10 ist der prozentuale Anteil Cytokin-produzierender CD8⁺ Zellen dargestellt. Bezüglich der IFN γ -Produktion konnte verglichen mit der PBS-Kontrolle eine signifikante Steigerung nach Immunisierung mit Hefen, die sezerniertes Ova, Ova_{cyt} oder Ova-VLP exprimierten, nachgewiesen werden. Allerdings zeigten die Splenocyten aus mit leervektortragenden Hefen (YEp) immunisierten Mäusen eine ebenso hohe IFN γ -Produktion. Für die Produktion von TNF α konnte aufgrund der hohen Streuung der Einzelergebnisse für keine der untersuchten Proben eine signifikante Steigerung nachgewiesen werden. Die Medianwerte ließen jedoch eine erhöhte TNF α -Produktion nach Vakzinierung mit Hefe-assoziiertem Ova, Ova_{cyt} und zellwandverankertem Ovalbumin (Ova-Sed1) vermuten.

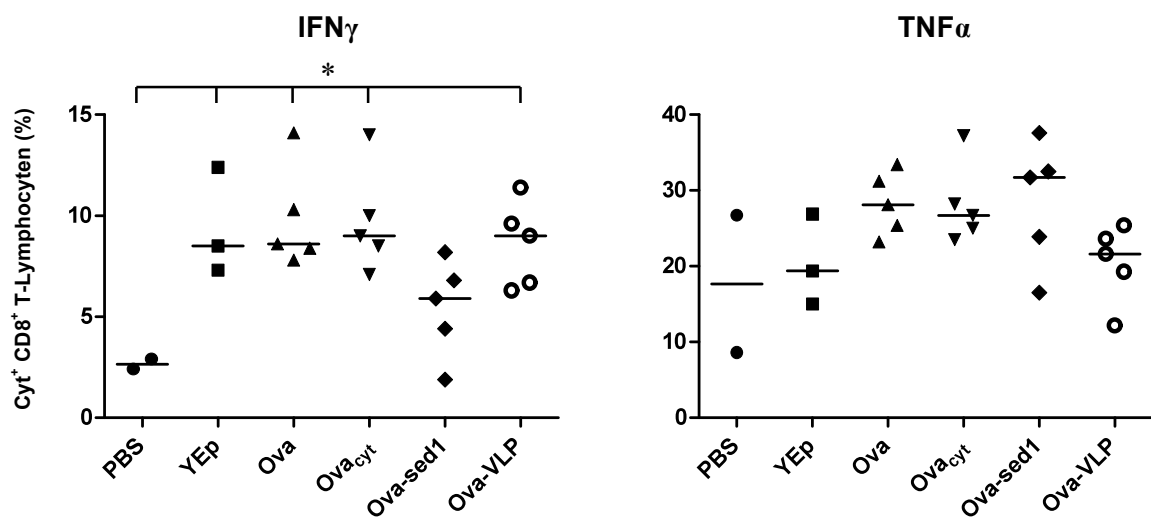


Abbildung 10: Cytokinproduktion in CD8⁺ Splenocyten nach Restimulation mit SIINFEKL. C57BL/6J Mäuse wurden mit Ova-exprimierenden *S. cerevisiae*, leervektortragenden *S. cerevisiae* oder PBS immunisiert. Anschließend wurden die Splenocyten isoliert und nach Restimulation wurden die CD8⁺ T-Lymphocyten durchflusscytometrisch hinsichtlich der IFN γ - und TNF α -Produktion analysiert; zur statistischen Analyse wurde der Student'sche t-Test im Vergleich zur PBS-Kontrolle durchgeführt; *p < 0,05.

Um aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen sollte daraufhin die zu untersuchende T-Zellpopulation besser eingegrenzt werden. Hierzu wurden fluoreszenzmarkierte Pentamere verwendet, die mit dem Peptid SIINFEKL gekoppelt sind, und somit die gezielte Analyse von Ova-spezifischen T-Lymphocyten erlauben. Die weitere Färbung und durchflusscytometrische Analyse erfolgte wie zuvor beschrieben.

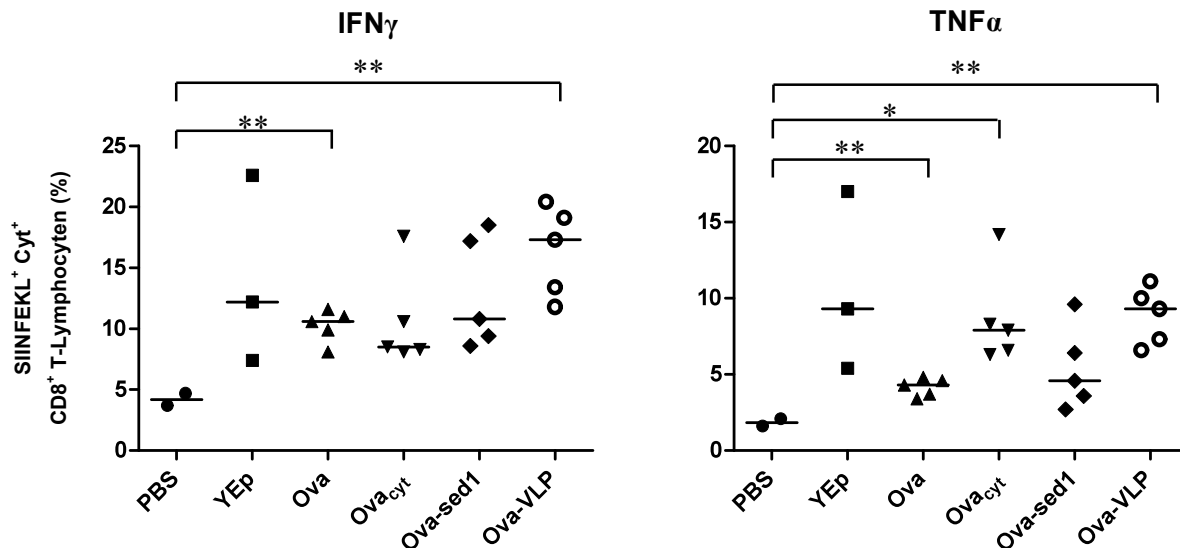


Abbildung 11: Cytokinproduktion in Ova-spezifischen CD8⁺ Splenocyten nach Restimulation und Färbung mit SIINFEKL-Pentameren. C57BL/6J Mäuse wurden mit Ova-exprimierenden *S. cerevisiae*, leervektortragenden *S. cerevisiae* oder PBS immunisiert. Im Anschluss daran erfolgte die Splenocytenisolierung und nach Restimulation sowie Färbung mit PE-markierten SIINFEKL-Pentameren wurden die Ova-spezifischen CD8⁺ T-Lymphocyten durchflusscytometrisch hinsichtlich der IFN γ - und TNF α -Produktion analysiert; zur statistischen Analyse wurde der Student'sche t-Test im Vergleich zur PBS-Kontrolle durchgeführt; *p < 0,05; **p < 0,01.

Die Ergebnisse der durchflusscytometrischen Analyse der Cytokinproduktion in Ova-spezifischen CD8⁺ T-Lymphocyten in Abbildung 11 zeigen, dass sowohl die Anzahl Cytokin-positiver Zellen in der PBS-Kontrolle, als auch die Varianz zwischen den untersuchten immunisierten Individuen einer Gruppe deutlich verringert werden konnten. Verglichen mit der PBS-Kontrollgruppe (Medianwerte: 4,2 % bzw. 1,8 %) konnten hochsignifikante Steigerungen der IFN γ - und TNF α -Produktion nach Immunisierung mit Ova- und Ova-VLP-exprimierenden Hefen gemessen werden. Die Anzahl TNF α -produzierender Zellen wurde außerdem nach Behandlung mit Hefe-assoziiertem Ova_{cyt} signifikant auf 7,9 % erhöht. Für beide untersuchten Cytokine konnte die höchste Anzahl positiver T-Lymphocyten bei Ova-VLP immunisierten Mäusen (IFN γ : 17,3 %; TNF α : 9,4 %) nachgewiesen werden. Allerdings wurden erneut für beide untersuchten Cytokine hohe Werte (Medianwerte: 12,2 % bzw. 9,3 %) in den mit YEp vakzinierten Kontrollen nachgewiesen, auch wenn diese aufgrund der hohen Varianz nicht signifikant sind. Da im Vergleich zur Leervektorkontrolle keine signifikanten Steigerungen beobachtet werden konnten wurden die Versuche aus Gründen des Tierschutzes zu diesem Zeitpunkt eingestellt.

3. Zielgerichtetes Delivery funktionalisierter Nanopartikel mit Hilfe von Hefezellen

Nanopartikel als nicht-virale Delivery-Systeme haben besonders im Bereich der Immuntherapie in den letzten Jahren stark an Bedeutung gewonnen (Amoozgar & Goldberg, 2015). Neben den vielen Vorteilen biokompatibler Polymere, wie Stabilität und Sicherheit, zeichnen sich Partikel aus PLGA insbesondere durch ihre einfache Herstellung und Modifikation sowie eine hohe Kapazität zur Wirkstoffaufnahme aus (Hamdy *et al.*, 2011). Obwohl das Targeting von Nanopartikeln an bestimmte Zelltypen durch Oberflächenmodifikation und Anpassung der physikochemischen Eigenschaften verbessert werden kann, kann die unerwünschte Aufnahme der Partikel in andere Zellen bisher nicht vollständig ausgeschlossen werden (Brown *et al.*, 2019). Um dadurch entstehende off-target Effekte zu vermeiden sollte in dieser Arbeit ein Delivery-System etabliert werden, welches die Vorteile von Nanopartikeln und Hefezellen vereint und somit einen effizienten und sicheren zielgerichteten Transport in Makrophagen ermöglicht. Eine schematische Skizze dieses Systems ist in Abbildung 12 dargestellt. Es beruht auf der Annahme, dass positiv geladene Nanopartikel mit der Zelloberfläche von Hefen interagieren und möglicherweise auch von diesen aufgenommen werden, was eine zusätzliche Schutzhülle für das Cargo bedeuten würde. Die entstandenen NP/Hefe-Komplexe sollen daraufhin mit Makrophagen inkubiert und das Delivery des Modellcargos Rhodamin durch Fluoreszenzmessung untersucht werden.

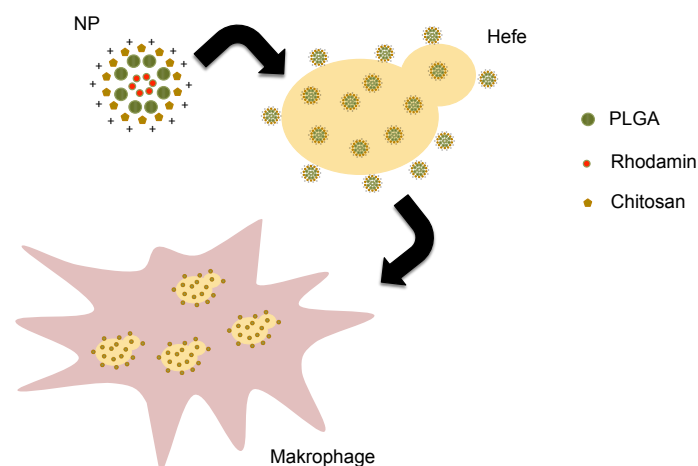


Abbildung 12: Schematische Darstellung des zielgerichteten Deliverys in Makrophagen mittels NP/Hefe-Komplexen. Positiv geladene, mit Rhodamin markierte Chitosan-PLGA-Partikel werden mit Hefezellen inkubiert, sodass es zu einer Assoziation bzw. Aufnahme der Partikel mit den bzw. in die Zellen kommt. Nach Phagozytose der NP/Hefe-Komplexe durch Makrophagen kann ein erfolgreiches Delivery durch Rhodaminfluoreszenz nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wurden Makrophagen als Zielzellen gewählt, weil diese neben ihrer wichtigen Funktion in immunologischen Prozessen auch an chronisch entzündlichen Erkrankungen und Tumorwachstum beteiligt sind und somit einen besonders vielversprechenden Angriffspunkt für verschiedene therapeutische Maßnahmen darstellen. Des Weiteren sind sie als professionelle APC dafür bekannt, Hefezellen auf natürliche Weise aufzunehmen, was eine Grundvoraussetzung für das zu etablierende Delivery-System darstellt. Makrophagen verfügen über eine hohe phänotypische Variabilität und können je nach Polarisierung vollkommen kontroverse Funktionen ausüben. Das geläufigste Modell zur Klassifizierung von Makrophagen unterscheidet zwei Subtypen: klassisch-aktivierte M1- und alternativ-aktivierte M2-Makrophagen (Verreck *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit sollten beide Subtypen untersucht werden, welche durch entsprechende Differenzierung und Polarisierung aus THP-1 Monocyten gewonnen wurden. Zunächst sollte die Fähigkeit beider Makrophagentypen zur Aufnahme verschiedener Hefegattungen überprüft werden. Dazu wurden die Makrophagen zunächst mit CellTracker™ Deep Red angefärbt. Die zu untersuchenden Hefegattungen *S. cerevisiae* (BY4742 und S86c), *P. pastoris* (GS115 und KM71), *K. lactis* (GG799) und *Sz. pombe* (PW260) wurden mit CFSE gefärbt und entweder mit humanem Serum opsonisiert oder unbehandelt eingesetzt. Anschließend wurden die Hefezellen mit einer MOI von 5 zu den Makrophagen gegeben und nach vierstündiger Inkubation wurden die Deep Red-positiven Makrophagen durchflusscytometrisch auf CFSE-Fluoreszenz untersucht. Die Ergebnisse dieser Messung sind in Abbildung 13 dargestellt und zeigen, dass alle Hefegattungen von beiden Makrophagentypen aufgenommen werden konnten. Insbesondere die Stämme S86c und PW260 zeigten eine signifikant erhöhte Aufnahme nach Opsonisierung im Vergleich zu unbehandelten Zellen des gleichen Stammes. Aber auch die Phagozytose aller anderen Stämme konnte durch Opsonisierung der Zellen verstärkt werden. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Experimente zur Aufnahme in Makrophagen ausschließlich opsonierte Hefezellen verwendet.

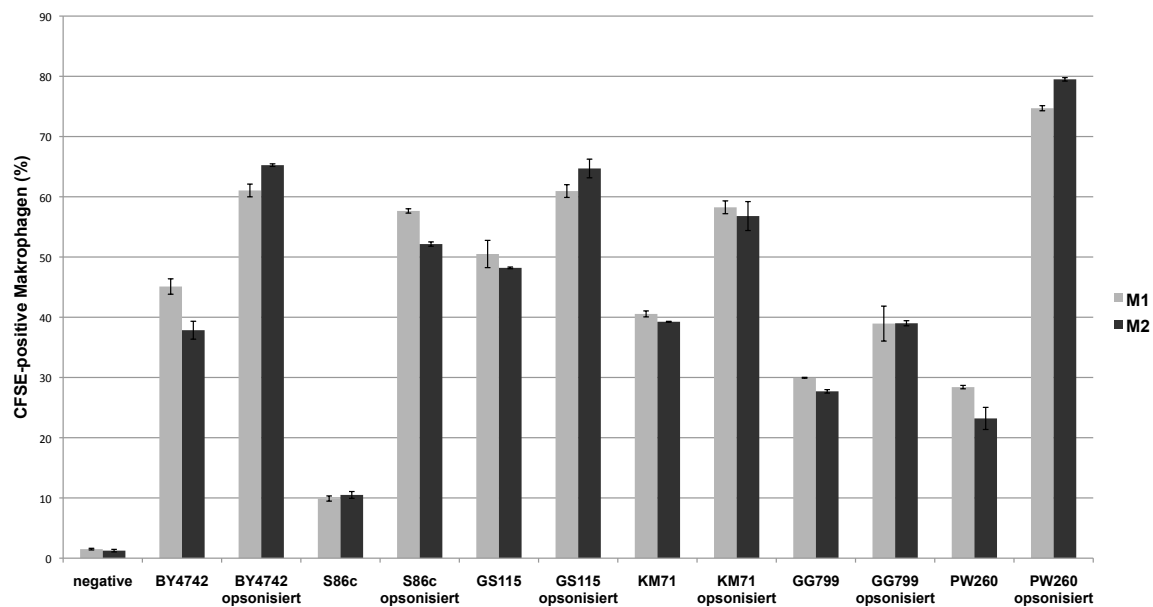


Abbildung 13: Aufnahme verschiedener Hefegattungen in M1- und M2-polarisierte Makrophagen. M1- und M2-Makrophagen wurden nach Anfärbung mittels CellTracker™ Deep Red mit unbehandelten oder opsonierten Hefezellen (MOI 5) für 4 h inkubiert. Durch vorherige CFSE-Färbung der Hefen konnte die Aufnahme durch Messung der CFSE-positiven Makrophagen analysiert werden. Dargestellt sind die Prozentwerte mit dazugehöriger Standardabweichung (n=2).

Nachdem die Aufnahme der zu untersuchenden Hefegattungen in M1- und M2-Makrophagen bestätigt werden konnte, sollte im Folgenden die Interaktion zwischen Nanopartikeln und Hefezellen näher untersucht werden.

3.1. Interaktion von Hefezellen mit PLGA-Partikeln

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen PLGA-Partikeln und verschiedenen Hefegattungen wurden zunächst sowohl nackte als auch Chitosan-beschichtete PLGA-Partikel eingesetzt, die zur besseren Visualisierung mit Rhodamin markiert waren. Da sich allerdings in ersten Experimenten bereits zeigte, dass durch die negative Ladung der PLGA-Partikel keine nennenswerte Bindung an Hefezellen stattfindet (Daten nicht gezeigt), wurden im weiteren Verlauf der Arbeit nur noch Chitosan-beschichtete Nanopartikel verwendet, die im Folgenden als cNP bezeichnet werden. Um die Wechselwirkung zwischen cNP und Hefen zu untersuchen wurden jeweils 1×10^7 Hefezellen in 100 μ l cNP-Lösung für 1 h bei 20 °C und 100 Upm inkubiert und anschließend durchflusscytometrisch bezüglich ihrer Rhodaminfluoreszenz analysiert. Hierzu wurden cNP-Lösungen mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration eingesetzt (5 mM bzw. 154 mM), da bereits gezeigt werden konnten, dass die Ionenstärke im Medium einen beträchtlichen Einfluss auf die Bindung von Polystyrol-Latex (PSL)-Partikeln an Hefen hat (Nomura *et al.*, 2013; Miyazaki *et al.*, 2014).

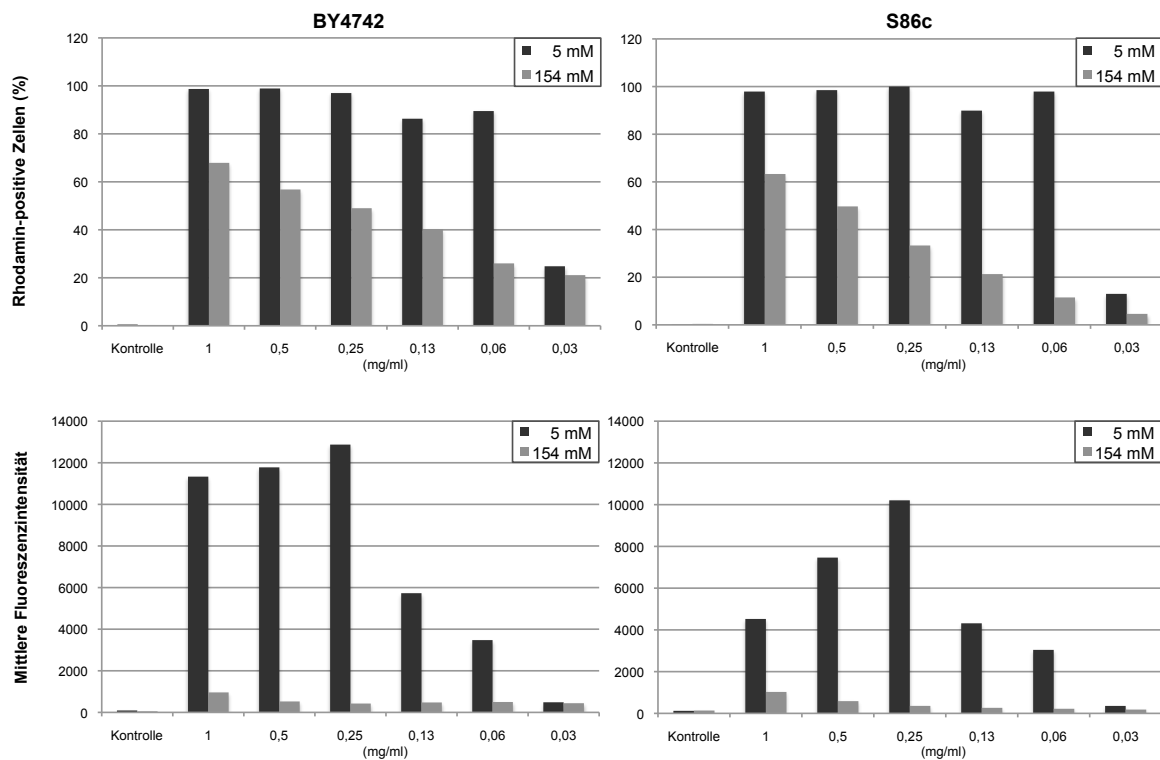


Abbildung 14: Interaktion von *S. cerevisiae* mit Chitosan-PLGA-Partikeln. Nach einstündiger Inkubation in 100 μ l cNP-Lösung bei 20 °C und 100 Upm wurden 1×10^7 Zellen der *S. cerevisiae* Stämme BY4742 und S86c mittels FACS auf positive Rhodaminfluoreszenz untersucht. Es wurden Verdünnungsreihen von cNP in 5 mM und 154 mM NaCl-Lösung im Bereich von 1 mg/ml bis 0,03 mg/ml eingesetzt. Dargestellt ist sowohl der prozentuale Anteil Rhodamin-positiver Zellen (obere Reihe) als auch die mittlere Fluoreszenzintensität der Hefezellen (untere Reihe).

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse für die *S. cerevisiae* Stämme BY4742 und S86c dargestellt. Diese zeigten eine konstant hohe Anzahl Rhodamin-positiver Zellen zwischen 86 und 99 % in nicht isotoner (5 mM NaCl) cNP-Lösung; erst bei einer Konzentration von 0,03 mg/ml sank die Anzahl auf 25 % für BY4742 bzw. 13 % für S86c. In isotonem Milieu (154 mM NaCl) konnte lediglich ein Maximum von 68 % Rhodamin-positiver Zellen für die höchste Konzentration (1 mg/ml) erreicht werden und mit sinkender Partikelkonzentration kam es auch zu einer kontinuierlichen Abnahme der cNP-positiven Hefezellen. Bei Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (Abb. 14, unten) wird die unterschiedliche Bindungseffizienz der cNP in Abhängigkeit von der Ionenstärke noch deutlicher. Während in 154 mM NaCl-Lösung nur Intensitäten von maximal 1.000 erreicht werden konnten, stieg diese in hypotoner Lösung auf bis zu 10.000 (S86c) bzw. 13.000 (BY4742) an. Diese Intensitätsmaxima wurden in beiden *S. cerevisiae* Stämmen nach kontinuierlichem Anstieg bei einer Partikelkonzentration von 0,25 mg/ml erreicht.

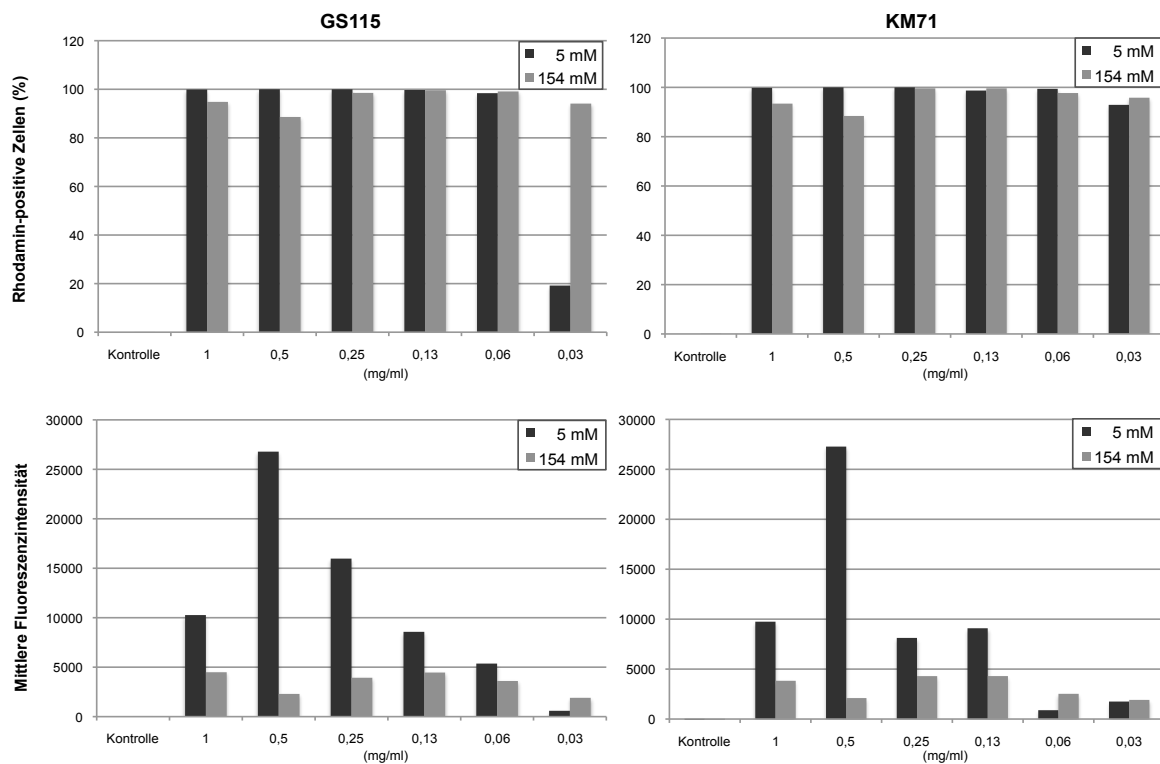


Abbildung 15: Interaktion von *P. pastoris* mit Chitosan-PLGA-Partikeln. Nach einstündiger Inkubation in 100 μ l cNP-Lösung bei 20 °C und 100 Upm wurden 1×10^7 Zellen der *P. pastoris* Stämme GS115 und KM71 mittels FACS auf positive Rhodaminfluoreszenz untersucht. Es wurden Verdünnungsreihen von cNP in 5 mM und 154 mM NaCl-Lösung im Bereich von 1 mg/ml bis 0,03 mg/ml eingesetzt. Dargestellt ist sowohl der prozentuale Anteil Rhodamin-positiver Zellen (obere Reihe) als auch die mittlere Fluoreszenzintensität der Hefezellen (untere Reihe).

Als Nächstes wurde die Wechselwirkung von cNP mit Zellen der Hefegattung *P. pastoris* untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine konstant hohe Anzahl Rhodamin-positiver Hefezellen von bis zu 100 % in 5 mM NaCl-Lösung bis zu einer Partikelkonzentration von 0,03 mg/ml (Abb. 15, oben). Im Gegensatz zu *S. cerevisiae* waren bei beiden *P. pastoris* Stämmen (GS115 und KM71) auch ähnlich positive Werte in isotoner Partikellösung zu beobachten, welche selbst bei niedrigeren Konzentrationen stabil zu sein schienen. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) zeigten allerdings wiederum einen deutlichen Unterschied zwischen den beiden Salzkonzentrationen, was auf eine höhere Bindungsaffinität der cNP in hypotoner Umgebung schließen lässt (Abb. 15, unten). Während die MFI in 154 mM NaCl-Lösung permanent unterhalb von 5.000 lag, wurde in 5 mM NaCl-Lösung ein Maximum von 27.000 bei einer Partikelkonzentration von 0,5 mg/ml für GS115 und KM71 erreicht.

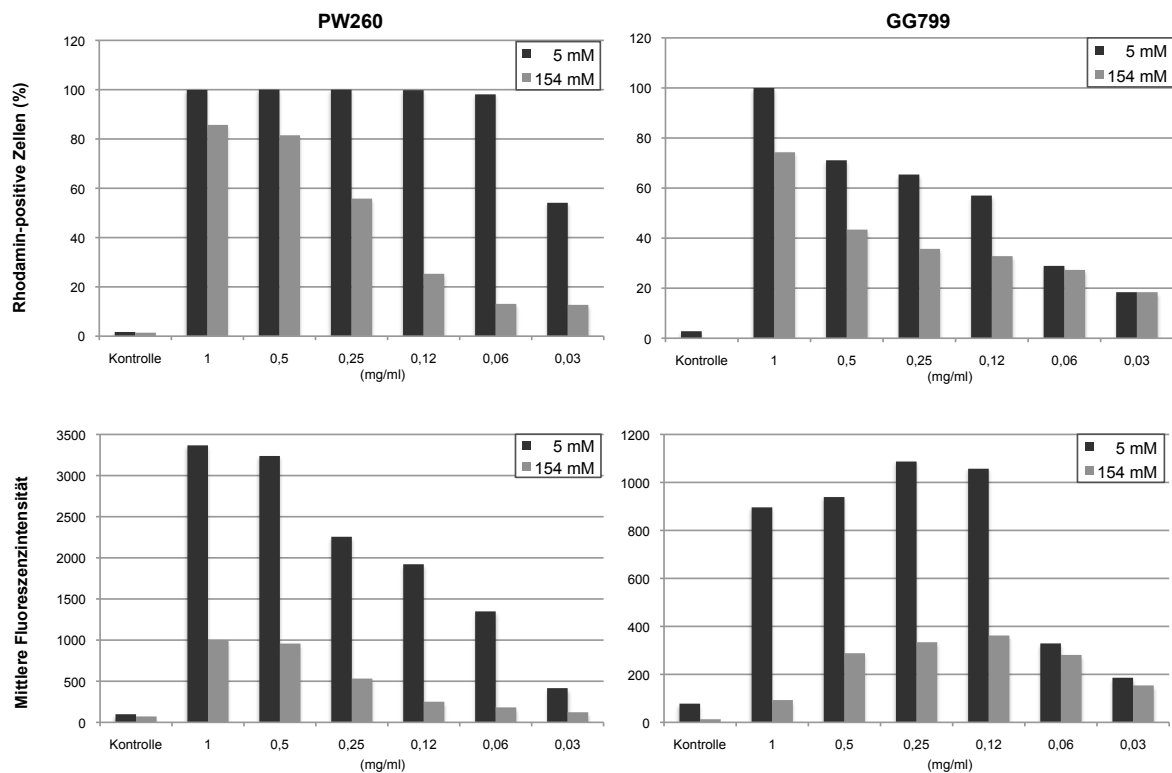


Abbildung 16: Interaktion von *Sz. pombe* und *K. lactis* mit Chitosan-PLGA-Partikeln. Nach einstündiger Inkubation in 100 μ l cNP-Lösung bei 20 °C und 100 Upm wurden 1×10^7 Zellen der Stämme PW260 und GG799 durchflusscytometrisch auf positive Rhodaminfluoreszenz untersucht. Es wurden Verdünnungsreihen von cNP in 5 mM und 154 mM NaCl-Lösung im Bereich von 1 mg/ml bis 0,03 mg/ml eingesetzt. Dargestellt ist sowohl der prozentuale Anteil Rhodamin-positiver Zellen (obere Reihe) als auch die mittlere Fluoreszenzintensität der Hefezellen (untere Reihe).

Abschließend wurde die Interaktion der Hefegattungen *Sz. pombe* und *K. lactis* mit cNP mittels FACS untersucht. Zellen des *Sz. pombe* Stammes PW260 zeigten, ähnlich wie die bisher untersuchten Hefestämme, nach Inkubation in 5 mM NaCl-Lösung zu 100 % Wechselwirkungen mit cNP bis zu einer Partikelkonzentration von 0,06 mg/ml auf (Abb. 16, links). Nach Behandlung in isotoner Umgebung mit 1 mg/ml cNP waren über 80 % Rhodamin-positive Zellen nachweisbar, welche aber mit sinkender Konzentration stetig bis auf nur noch 13 % zurückgingen. Bezüglich der MFI war bereits bei der höchsten Partikelkonzentration ein deutlicher Unterschied zwischen isotoner (1.000) und hypotoner (3.400) Behandlung sichtbar. Bei beiden untersuchten NaCl-Konzentrationen war weiterhin eine stetige Abnahme der Fluoreszenzintensität mit sinkendem cNP-Gehalt zu beobachten.

Im Gegensatz zu allen anderen Hefegattungen konnte beim *K. lactis* Stamm GG799 lediglich bei 1 mg/ml cNP und 5 mM NaCl in 100 % der Zellen eine Wechselwirkung mit cNP nachgewiesen werden, welche mit abnehmender Partikelkonzentration rapide nachlässt (Abb. 16, rechts). Auch die MFI zeigte hier mit maximal 1.100 (5 mM NaCl)

bzw. 400 (154 mM NaCl) deutlich die niedrigsten Werte, was auf eine weniger effiziente Interaktion schließen lässt.

Nach der quantitativen Analyse sollte anschließend die Art der Interaktion von Hefen mit cNP näher untersucht werden. Um zwischen Bindung der Nanopartikel an und Aufnahme in die Hefezellen besser unterscheiden zu können, wurden die Zellwände der Hefen zunächst mit CFTM488-konjugiertem Concanavalin A (ConA-488) angefärbt und nach cNP-Inkubation mittels CLSM analysiert. In Abbildung 17 sind die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aller untersuchten Hefestämme dargestellt. Analysiert wurden jeweils eine Kontrolle ohne Nanopartikel und Zellen, die in cNP-Lösung unterschiedlicher Konzentrationen inkubiert wurden. Dargestellt sind Aufnahmen derjenigen Proben, welche die deutlichste Aufnahme bzw. Bindung von cNP aufzeigten. Außerdem ist neben den Fluoreszenzbildern im Rot/Grün- und Rot-Kanal auch das entsprechende Fluoreszenzintensitätsprofil dargestellt, welches die Unterscheidung zwischen Zellinnerem und -peripherie vereinfacht. Während die Kontrollen aller untersuchten Hefestämme lediglich eine Grünfärbung im Bereich der Zellwand aufwiesen, war in den cNP-behandelten Proben zusätzlich eine mehr oder weniger deutliche Rotfärbung zu erkennen. Die höchsten Rhodamin-Fluoreszenzintensitäten wurden hierbei im *S. cerevisiae* Stamm BY4742 und im *P. pastoris* Stamm GS115 nachgewiesen. Alle Stämme zeigten nach Inkubation in 1 mg/ml cNP eine gleichmäßige Verteilung der roten Fluoreszenzsignale in den Zellen, was auf eine Aufnahme der Partikel schließen lässt. Im Gegensatz dazu war nach Behandlung mit niedriger konzentrierter Partikellösung (0,5 bzw. 0,25 mg/ml) eine Akkumulation der Nanopartikel im Bereich der Hefezellwand zu beobachten, was an der Kollokalisierung von grüner und roter Fluoreszenz in den jeweiligen Zellen erkennbar ist. Eine Ausnahme bildet hier der *Sz. pombe* Stamm PW260, der auch bei hoher cNP-Konzentration bereits überwiegend eine Ansammlung der Partikel an der Zelloberfläche und nur wenige rote Signale im Zellinneren aufwies. Ebenso wie in der durchflusscytometrischen Analyse, zeigten Zellen des *K. lactis* Stammes GG799 auch bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop die geringste Fluoreszenzintensität, was die verminderte cNP-Interaktion verglichen mit anderen Hefegattungen bestätigt. Erstaunlicher Weise waren sowohl bei *S. cerevisiae* als auch bei *P. pastoris* deutliche Unterschiede bezüglich der cNP-assoziierten Fluoreszenzintensitäten zwischen beiden untersuchten Stämmen der jeweiligen Gattung zu sehen. Diese Beobachtung könnte durch unterschiedlichen Zellwandaufbau der einzelnen Stämme erklärt werden, welcher auch einen Einfluss auf die Oberflächenladung der Zellen haben kann (Bazan *et al.*, 2014). Eine

Messung des Zetapotentials der Hefezellen ergab, dass der Stamm BY4742 (-15 mV) eine negativere Ladung als S86c (-10 mV) aufweist. Das Zetapotential von *P. pastoris* hingegen betrug für beide Stämme etwa -27 mV. Auf eine nähere Untersuchung der stammspezifischen Unterschiede wurde an dieser Stelle aus zeitlichen Gründen verzichtet und für die weiteren Versuche wurden die bisher vielversprechendsten Stämme BY4742 und GS115 eingesetzt.

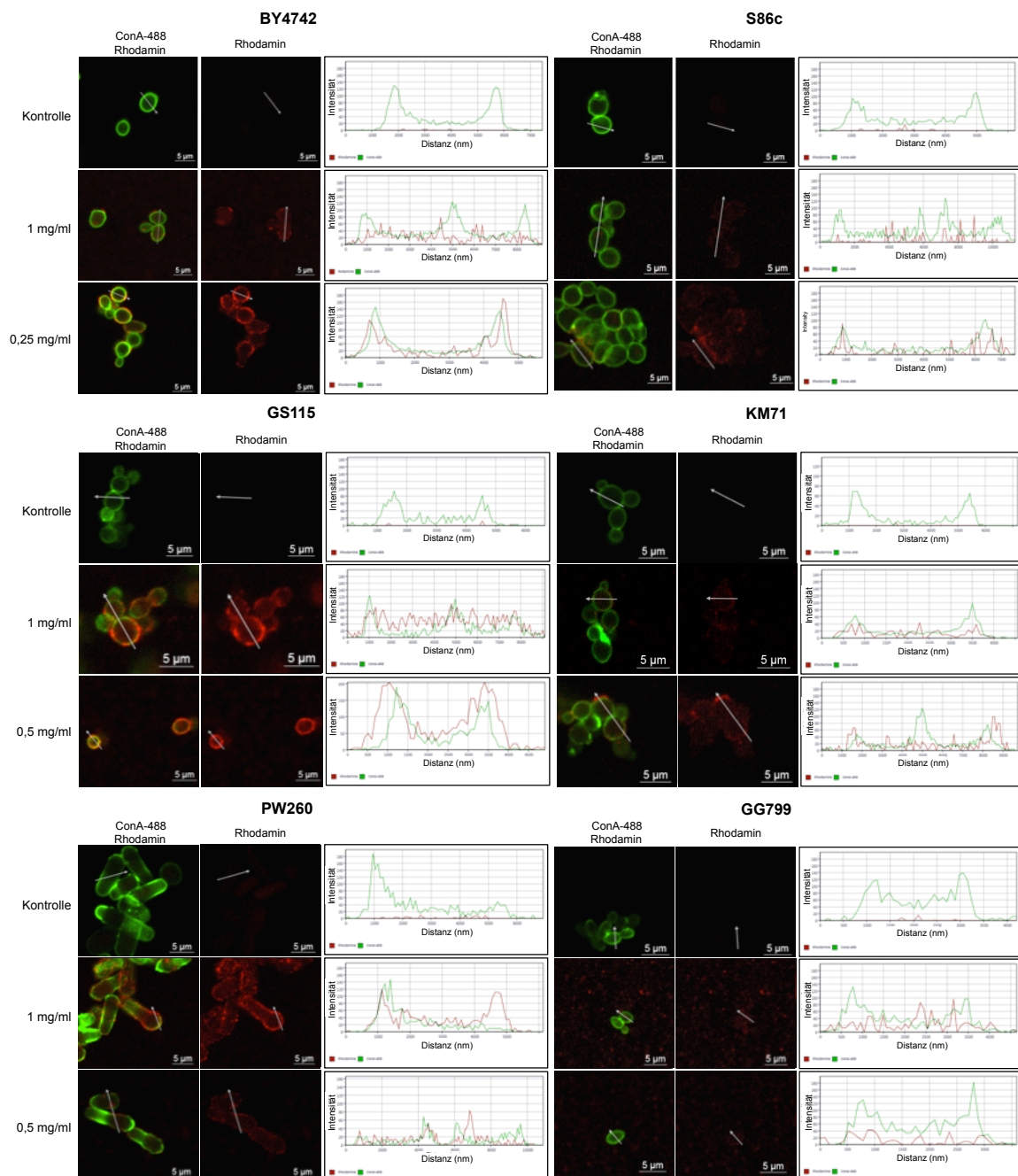


Abbildung 17: Fluoreszenzmikroskopische Analyse der Interaktion von Hefezellen mit cNP. 1×10^7 Hefezellen wurden mit ConA-488 angefärbt, 1 h bei 20 °C mit Rhodamin-markierten cNP (5 mM NaCl) bzw. H₂O als Kontrolle inkubiert und nach Fixierung mit FluorSave™ mittels CLSM untersucht. Dargestellt sind jeweils die Fluoreszenzbilder und das zugehörige Fluoreszenzintensitätsprofil der angegebenen Hefestämme.

3.2 Wirkung von PLGA-Partikeln auf Hefezellen

Die bisher nachgewiesene starke Interaktion zwischen Hefezellen und cNP legt die Frage nahe, ob die Partikelbindung bzw. -aufnahme durch die Zellen zu einer Veränderung der Membranintegrität oder Zellviabilität führt. Um dies zu überprüfen wurde, nach Inkubation der Hefen mit unmarkierten cNP, zunächst eine PI-Färbung mit anschließender FACS-Analyse durchgeführt. Die Ergebnisse in Abbildung 18A zeigen, dass die Anzahl PI-positiver Zellen nach Inkubation in hypotoner cNP-Lösung bis zu einer Konzentration von 0,13 (BY4742) bzw. 0,06 mg/ml (GS115) zwischen 80 und 100 % liegt, was für die Bildung von Poren in den Zellmembranen spricht. In isotoner Umgebung ist ein deutlicher Unterschied zwischen den Hefegattungen zu erkennen: während *S. cerevisiae* keinerlei PI-positive Zellen aufweist, führt die Inkubation von *P. pastoris* in konzentrierter Partikellösung zu knapp 90 % PI-assoziiierter Fluoreszenz, welche aber wesentlich schneller abnimmt als in 5 mM NaCl-Lösung.

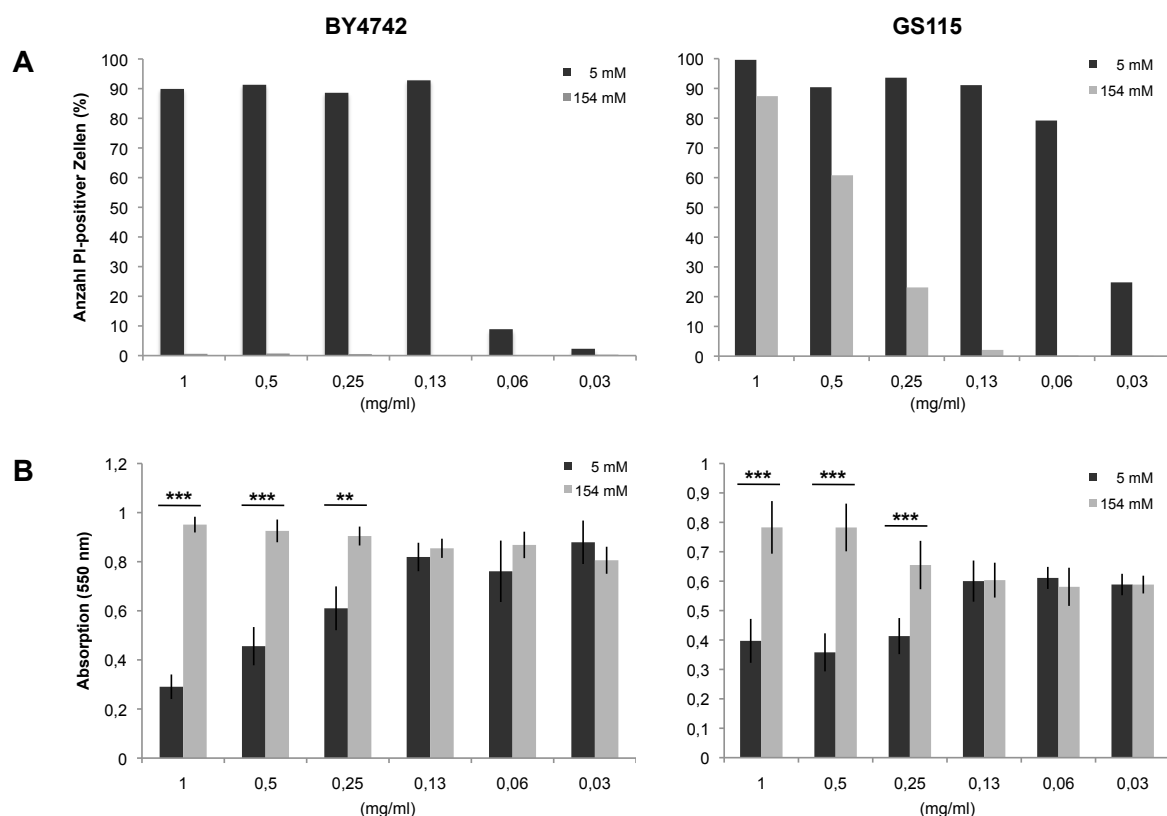


Abbildung 18: Einfluss von PLGA-Partikeln auf Membranintegrität und Viabilität von Hefezellen. 1×10^7 Zellen der Stämme BY4742 und GS115 wurden 1 h bei 20 °C in 100 μ l unmarkierter cNP-Lösung der angegebenen Konzentration inkubiert. Anschließend wurde die Hefezellen (A) mit PI angefärbt und durchflusscytometrisch auf den prozentualen Anteil PI-positiver Zellen analysiert bzw. (B) mittels MTT-Assay hinsichtlich ihrer Viabilität untersucht; dargestellt ist die mittlere Absorption der Zellen bei 550 nm mit zugehöriger Standardabweichung (n=8); zur statistischen Analyse wurde der Student'sche t-Test durchgeführt; **p < 0,01, ***p < 0,001.

Da eine Beeinträchtigung der Membranintegrität nicht zwingend mit einer Verminderung der Viabilität einhergeht, wurde ein MTT-Assay durchgeführt, um die tatsächliche Viabilität der Zellen zu bestimmen. In Abbildung 18B ist, in direktem Vergleich zu isotonen Bedingungen, eine signifikante Reduzierung der Absorption bei 550 nm, und somit auch der Viabilität, durch cNP in 5 mM NaCl bis zu einer Konzentration von 0,25 mg/ml in beiden Hefestämmen zu erkennen. Erstaunlicherweise konnten in Zellen des Stammes GS115 in diesem Konzentrationsbereich erhöhte Absorptionswerte nach Behandlung mit cNP in 154 mM NaCl nachgewiesen werden. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass cNP in hoher Konzentration und vor allem unter hypotonen Bedingungen Poren in der Plasmamembran von Hefezellen bilden und damit auch die Vitalität der Zellen verringern können. Da für ein effizientes Delivery allerdings nicht zwingend lebende Hefezellen verwendet werden müssen, wurden für die weiteren Experimente weiterhin konzentrierte cNP eingesetzt.

3.3 Aufnahme von cNP/Hefe-Komplexen durch Makrophagen

Da die Aufnahme von Hefezellen in Makrophagen auf der Erkennung spezifischer Bestandteile der Zellwand durch Oberflächenrezeptoren der Makrophagen beruht, sollte zunächst überprüft werden, ob eine Bindung von Nanopartikeln an Hefen deren Phagocytose beeinflusst. Dazu wurden stellvertretend Zellen des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 mittels CFSE angefärbt und wie zuvor beschrieben mit cNP in 5 mM oder 154 mM NaCl inkubiert; die Inkubation der Kontrollzellen erfolgte stattdessen in Wasser. Nach Opsonisierung der Hefen wurden diese mit einer MOI von 5 zu M1- bzw. M2-polarisierten THP-1 Makrophagen gegeben und für 4 h inkubiert. Die Aufnahme der Hefezellen in die jeweiligen Makrophagentypen wurde anschließend durch Analyse der CFSE-positiven Makrophagen mittels FACS bestimmt (Abb. 19). Ein negativer Einfluss der cNP-Behandlung auf die Phagocytose von Hefezellen konnte mit diesen Ergebnissen eindeutig ausgeschlossen werden. Interessanterweise ist hingegen eher eine leichte jedoch nicht signifikante Steigerung der Hefeaufnahme nach cNP-Inkubation zu erkennen.

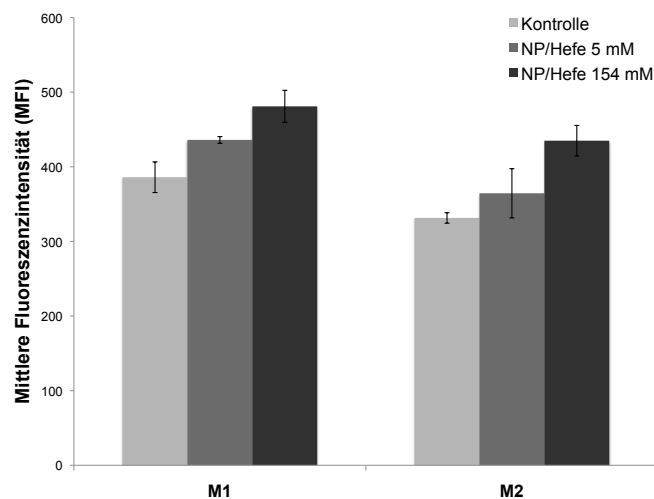


Abbildung 19: Aufnahme cNP-beladener Hefezellen in M1- und M2-polarisierte Makrophagen. Makrophagen wurden für 4 h mit CFSE-gefärbten Hefezellen des Stammes BY4742 (MOI 5) inkubiert und die resultierende Phagozytoserate mittels durchflusscytometrischer Analyse der CFSE-positiven Makrophagen bestimmt. Neben unbehandelten Hefen (Kontrolle) wurden cNP/Hefe-Komplexe, die entweder unter hypotonen (5 mM NaCl) oder isotonen (154 mM NaCl) Bedingungen hergestellt wurden, eingesetzt. Gezeigt sind die mittleren Fluoreszenzintensitäten mit zugehörigen Standardabweichungen (n=2).

Anschließend sollte die Effizienz von cNP/Hefe-Komplexen als Deliveryvehikel für ein Targeting von Makrophagen mit reinen Nanopartikeln verglichen werden. Nach Inkubation der Hefezellen mit Rhodamin-markierten cNP wurden freie Nanopartikel durch Dichtegradientenzentrifugation über 13 % Sucrose von den gebildeten cNP/Hefe-Komplexen getrennt. Durch Fluoreszenzmessung der voneinander getrennten Fraktionen konnte gezeigt werden, dass etwa 62 % der Partikel in der wässrigen Phase verblieben. Außerdem wurde die erfolgreiche Separation mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie visualisiert. Im Vergleich zur ursprünglichen Lösung (Abb 20, Links), in der Hefezellen und ungebundene Nanopartikel zu erkennen waren, konnte nach der Auftrennung in der Sucrose-Phase (Abb. 20, Mitte) eine deutlich verringerte Anzahl freier cNP nachgewiesen werden, während die wässrige Phase (Abb. 20, Rechts) ausschließlich cNP in konzentrierter Form enthielt. Des Weiteren war in diesen Aufnahmen die Bindung einzelner Partikel an die Hefezellwand zu erkennen; eine Partikelaufnahme in die Zellen ist mittels TEM allerdings nicht nachweisbar. Nach erfolgreicher Abtrennung der ungebundenen Partikel konnten die cNP/Hefe-Komplexe somit für Delivery-Experimente in Makrophagen eingesetzt werden.

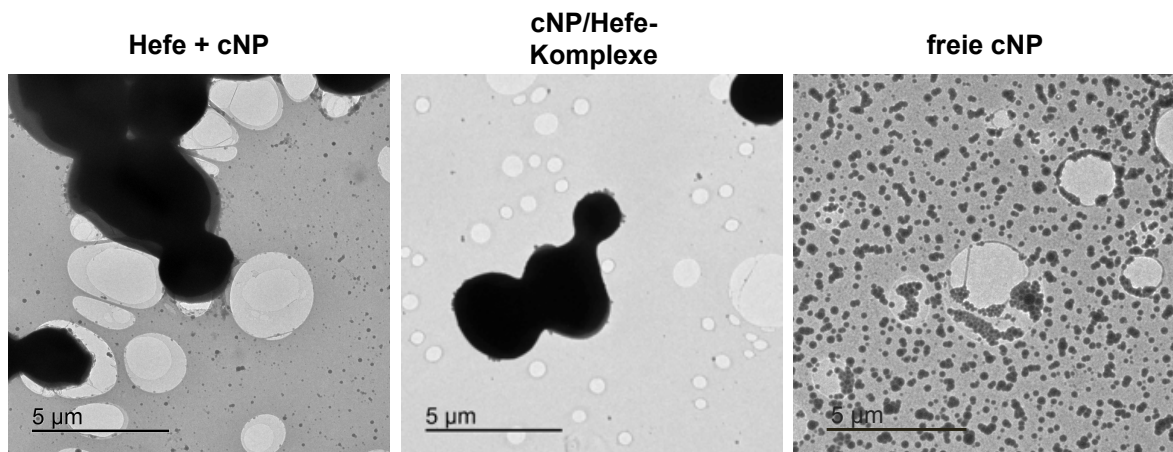


Abbildung 20: Trennung der cNP/Hefe-Komplexe von ungebundenen cNP. Zellen des Hefestammes BY4742 wurden für 1 h mit 1 mg/ml cNP inkubiert und die nach Dichtgradientenzentrifugation erhaltenen Fraktionen mittels Transmission-Elektronenmikroskopie untersucht. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen der ursprünglichen Lösung mit Hefen und cNP (Links) und der aufgetrennten Sucrose-Phase (Mitte) sowie der wässrigen Phase (Rechts).

Anschließend wurden cNP/Hefe-Komplexe aus Hefezellen der Stämme BY4742 und GS115 mit einer MOI von 5 zu M1- und M2-polarisierten THP-1 Makrophagen gegeben und für 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Zum direkten Vergleich wurden Makrophagen mit reinen cNP (Endkonzentration: 50 µg/ml) behandelt; als Kontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Im Anschluss wurden die Makrophagen mit DAPI und CellMask gegengefärbt und sowohl durchflusszytometrisch als auch fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 21). Die Internalisierung von cNP in Makrophagen wurde durch Bestimmung des prozentualen Anteils an DAPI/Rhodamin doppelt-positiven Zellen mittels FACS ermittelt (Abb. 21A). Die höchste Partikelaufnahme konnte für beide Makrophagentypen durch unter hypotonen Bedingungen hergestellte cNP/BY4742-Komplexe erreicht werden. Die Anzahl cNP-positiver Makrophagen erreichte mit 57 % (M1) bzw. 39 % (M2) sogar deutlich höhere Werte als die Zellen, die mit reinen cNP behandelt wurden (35 % bzw. 24 %). Vergleicht man die Subtypen untereinander ist in beiden Fällen eine höhere Aufnahme durch M1-Makrophagen zu erkennen. Mit cNP/GS115-Komplexen, die in 5 mM NaCl-Lösung gebildet wurden, konnten mit 27 bzw. 30 % immerhin noch eine ähnlich hohe Anzahl cNP-assoziiierter Makrophagen nachgewiesen werden wie mit reinen cNP. Hingegen zeigten unter isotonen Bedingungen hergestellte cNP/Hefe-Komplexe mit maximal 9 % Rhodamin-positiven Zellen die geringste Effizienz.

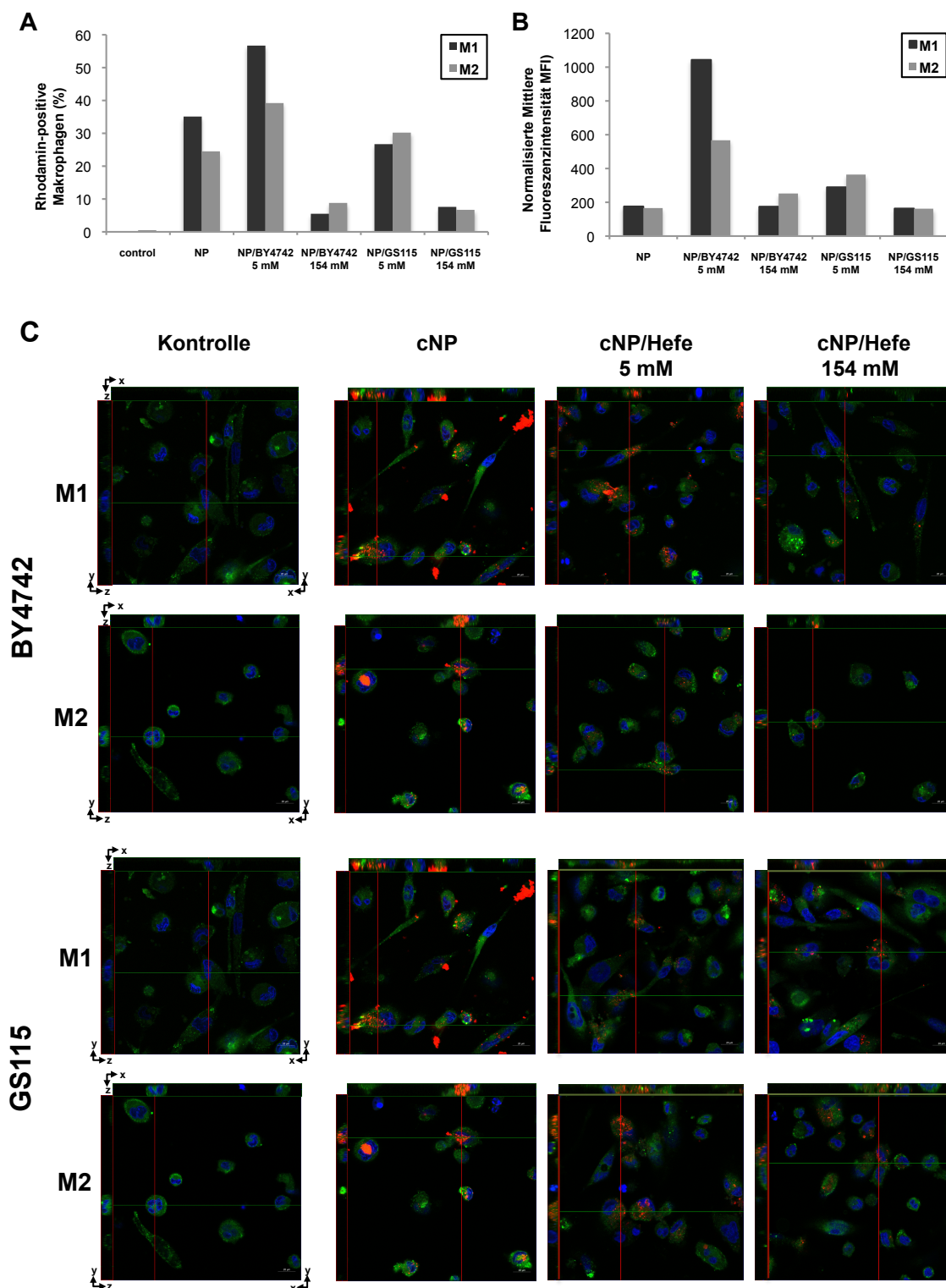


Abbildung 21: Delivery Rhodamin-markierter cNP in Makrophagen mit Hilfe von Hefezellen.

Hefen der Stämme BY4742 und GS115 wurden mit cNP wie zuvor beschrieben unter isotonen oder hypotonen Bedingungen (154 mM bzw. 5 mM NaCl) vorbehandelt. Anschließend wurden M1- und M2-Makrophagen für 16 h mit reinen cNP oder cNP/Hefe-Komplexen inkubiert und mit DAPI (Nucleus, blau) und CellMask (Cytosol, grün) gegengefärbt. (A) Quantitative Analyse mittels FACS; dargestellt ist die Anzahl DAPI- und Rhodamin-positiver Zellen in Prozent. (B) Mittlere Fluoreszenzintensität der Makrophagen, normalisiert auf die Menge zugegebener cNP. (C) Orthogonale Ansicht der CLSM-Aufnahmen; dargestellt ist jeweils ein horizontaler (x-y) Ausschnitt mit zugehörigen x-z und y-z Ebenen.

Da die hier eingesetzte Konzentration der reinen cNP die der verbleibenden Partikel in den verwendeten cNP/Hefe-Komplexen ($\approx 38\%$ der ursprünglichen Konzentration) deutlich übersteigt, wurden die mittleren Fluoreszenzintensitäten zur besseren Vergleichbarkeit auf die tatsächlich eingesetzte Partikelkonzentration normalisiert (Abb. 21B). Diese Darstellung zeigt den Effizienzgewinn durch Einsatz des *S. cerevisiae* Stammes BY4742 noch deutlicher: verglichen mit reinen cNP wurden mit cNP/BY4742 5 mM bis zu 5-fach höhere Fluoreszenzintensitäten in M1- und 3-fach höhere in M2-Makrophagen erreicht. Mit *P. pastoris* in hypotoner Lösung konnte die Rhodaminfluoreszenz in M1- um das 1,5-fache und in M2-Makrophagen um das 2-fache gesteigert werden. Selbst unter isotonen Bedingungen hergestellte cNP/Hefe-Komplexe zeigten bei dieser Betrachtung immer noch eine ähnliche Effizienz wie reine cNP. Diese Beobachtungen konnten durch Visualisierung der Partikelaufnahme mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie weiter bestätigt werden (Abb. 21C). Besonders die Tendenz von cNP/GS115-Komplexen (5 mM) zu einer besseren Aufnahme in den M2-Subtyp erscheint in diesen Aufnahmen noch deutlicher. Außerdem war bei Behandlung mit reinen cNP eine starke unerwünschte Agglomeration der Partikel im Medium zu erkennen, welche durch Komplexierung der cNP an Hefezellen vollkommen beseitigt werden konnte. Da sich die Bildung von Agglomeraten extrem störend auf ein erfolgreiches Delivery auswirken würde, stellt deren Vermeidung durch cNP/Hefe-Komplexe einen besonderen Vorteil dar.

Abschließend sollte nachgewiesen werden, dass durch Verwendung eines hefebasierten „nano-in-micro“ Vehikels tatsächlich ein gezieltes Targeting von Phagozyten erreicht werden kann. Hierzu wurde ein Modell aus primären humanen Makrophagen und humanen Zervixkarzinomzellen (HeLa) angewandt. Die Kokultur-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Charlotte Dahlem im Institut für pharmazeutische Biologie (Prof. Dr. Kiemer, Universität des Saarlandes) durchgeführt (vgl. Kiefer *et al.*, noch nicht veröffentlicht). Da sich der *S. cerevisiae* Stamm BY4742 in der quantitativen Analyse bezüglich des Deliverys von cNP als effizientester erwiesen hat, wurde dieser für die nachfolgenden Versuche eingesetzt. Nach Kokultivierung der Säugerzellen im Verhältnis 1:1 für 24 h wurden diese für 0,5 bzw. 4 h mit cNP/Hefe-Komplexen oder reinen cNP inkubiert und anschließend durchflusscytometrisch im Hinblick auf Partikel-assoziierte Fluoreszenz untersucht (Abb. 22). Zur einfacheren Unterscheidung der Säugerzellen wurden Makrophagen zuvor mit CellTracker Deep Red und HeLa-Zellen mit CellTracker Violet BMQC angefärbt.

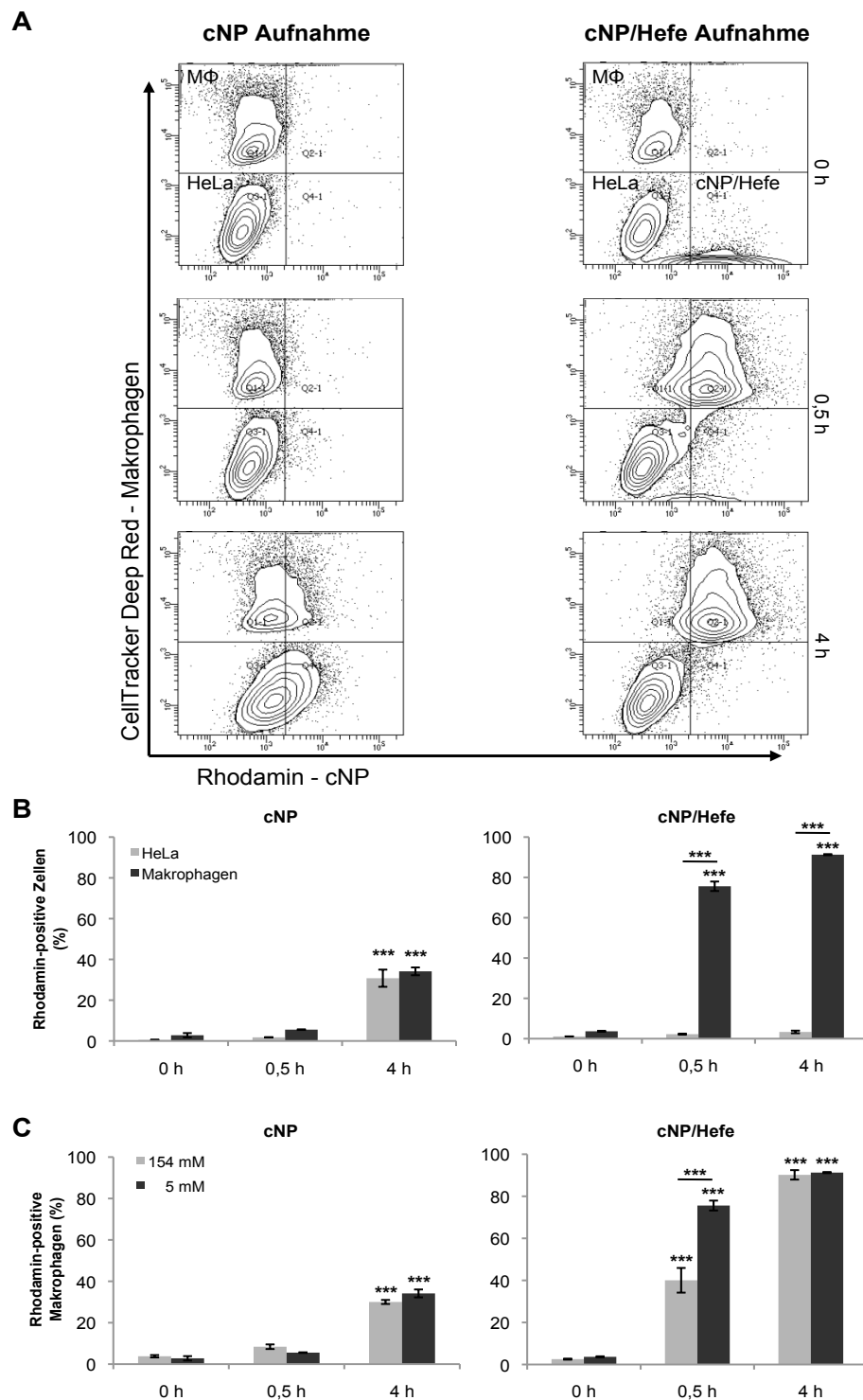


Abbildung 22: Aufnahme Rhodamin-markierter cNP durch kokultivierte HeLa-Zellen und primäre humane Makrophagen. Die Säugerzellen wurden entweder mit reinen cNP oder mit cNP-tragenden *S. cerevisiae* BY4742 für 0,5 bzw. 4 h inkubiert. Die Prozentzahl Rhodamin-positiver HeLa und Makrophagen wurde mittels FACS Analyse bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Proben, die zum Zeitpunkt 0 genommen wurden. (A) Repräsentative Dotplots zur Veranschaulichung der Partikelaufnahme nach Behandlung mit reinen cNP bzw. cNP/Hefe-Komplexen (5 mM NaCl). In (B) sind die zugehörigen Balkendiagramme dargestellt. (C) Quantitative Analyse der Aufnahme von isotonen und nicht-isotonen cNP in Makrophagen, sowohl als reine cNP (links) als auch in Form von cNP/Hefe-Komplexen (rechts); dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM zweier unabhängiger Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender, die jeweils in Duplikaten gemessen wurden; p-Werte wurden durch einseitige Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt, *** $p < 0,001$.

Die Dotplots in Abbildung 22A zeigen zum Zeitpunkt 0 die Deep Red-positiven Makrophagen im oberen linken Quadranten, während sich die HeLa-Zellen als deutlich davon getrennte Population im unteren linken Quadranten befinden. Nach 4-stündiger Inkubation mit reinen cNP (linke Spalte) zeigten beide Zelltypen eine zunehmende Partikelaufnahme, was an der Rechtsverschiebung der Populationen im Dotplot zu erkennen ist. Eine Behandlung mit cNP/Hefe-Komplexen (rechte Spalte) zeigte bereits nach 0,5 h eine deutliche Verschiebung der Makrophagen-, nicht aber der HeLa-Population. Die zugehörigen Balkendiagramme (Abb. 22B), in denen die Anzahl Rhodamin-positiver Zellen beider Zelltypen miteinander verglichen werden, zeigen noch drastischer, dass Hefen nicht nur dazu in der Lage sind ein Makrophagen-spezifisches Targeting von cNP zu bewerkstelligen, sondern auch die Effizienz der Partikelaufnahme verglichen mit reinen cNP signifikant von 35 auf 91 % zu steigern. Außerdem wird die Aufnahme der cNP durch Hefezellen stark beschleunigt, was daran zu erkennen war, dass nach 0,5 h Inkubation mit cNP/Hefe-Komplexen bereits 76 % der Makrophagen eine cNP-assoziierte Fluoreszenz aufwiesen, während bei reinen cNP lediglich 6 % der Zellen Rhodamin-positiv waren. Abbildung 22C zeigt den Einfluss der Salzkonzentration der Partikellösung auf die Aufnahme in Makrophagen. Bei Behandlung mit reinen cNP war wie erwartet kein Effekt durch den unterschiedlichen Salzgehalt zu erkennen. Im Gegensatz dazu zeigten cNP/Hefe-Komplexe, die in 5 mM NaCl hergestellt wurden, nach 0,5 h eine signifikant höhere Aufnahme von 76 % verglichen mit 40 % bei Inkubation in 154 mM NaCl. Dieser Effekt relativierte sich allerdings nach 4-stündiger Kultivierung.

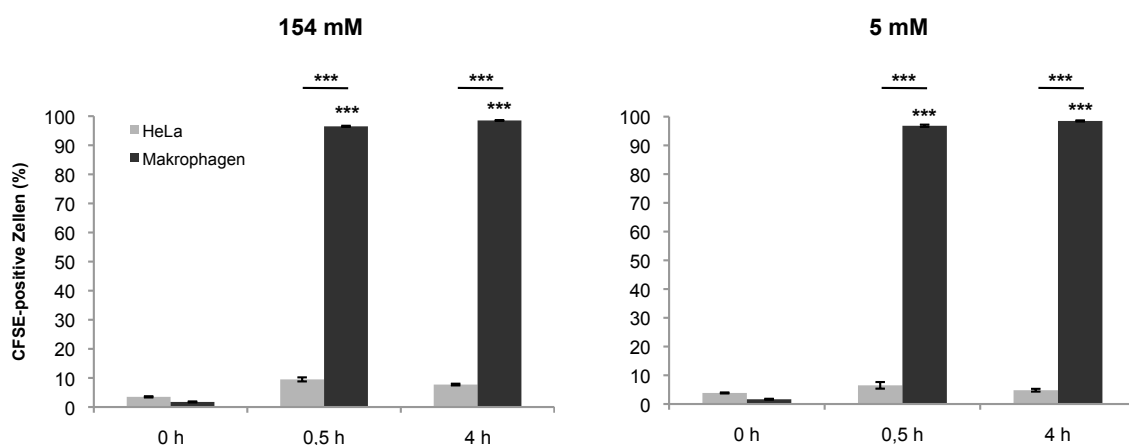


Abbildung 23: Aufnahme CFSE-gefärbter Hefezellen durch kokultivierte HeLa-Zellen und primäre humane Makrophagen. Die Säugerzellen wurden für 0,5 oder 4 h mit *S. cerevisiae* BY4742 (MOI 5) inkubiert, die zuvor entweder unter isotonen (links) oder hypotonen (rechts) Bedingungen mit cNP komplexiert wurden. Die Prozentzahl an CFSE-positiven HeLa und Makrophagen wurde mittels FACS Analyse bestimmt. Als Negativkontrolle dienten Proben, die zum Zeitpunkt 0 genommen wurden; p-Werte wurden durch einseitige Varianzanalyse (ANOVA) bestimmt, ***p < 0,001.

Um auszuschließen, dass diese Beobachtung auf eine unterschiedliche Aufnahme der Hefekomplexe in Makrophagen zurückzuführen ist, wurde die Phagozytose CFSE-gefärbter Hefen im Kokulturmodell durchflusscytometrisch untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse in Abbildung 23 zeigen, dass für beide untersuchten Salzkonzentrationen 97 % der Makrophagen bereits nach 0,5 h Hefezellen aufgenommen haben. HeLa-Zellen hingegen weisen zu maximal 9 % eine CFSE-positive Fluoreszenz auf.

Zusammenfassend konnte durch diese Experimente gezeigt werden, dass sowohl *P. pastoris* als auch *S. cerevisiae* nicht nur dazu in der Lage sind Nanopartikel in großer Menge zu binden bzw. aufzunehmen, sondern auch diese zielgerichtet und effizient in Makrophagen zu transportieren. Diese Erkenntnisse machen cNP/Hefe-Komplexe zu einem sehr vielversprechenden Vehikel im Bereich der aktiven Immuntherapie.

IV. Diskussion

Die aktive Immuntherapie steht im Fokus vieler Forschungsbereiche, da sie nicht nur zur Prävention von Infektionskrankheiten, sondern auch als vielversprechender Therapieansatz bei AIDS, Alzheimer, Krebs und chronischen entzündlichen Erkrankungen eingesetzt werden kann (Dalglish, 1992; Schenk *et al.*, 1999; Timmerman & Levy, 1999; Hristodorov *et al.*, 2012). Im Gegensatz zur passiven Immuntherapie mittels Antikörpern oder adoptivem T-Zelltransfer spielt hierbei die Aktivierung von APC eine entscheidende Rolle und führt somit zu einer langanhaltenden körpereigenen Immunantwort (Fong & Engleman, 2000). Das gezielte Targeting von APC stellt allerdings für viele Anwendungsbereiche bis heute eine Herausforderung dar (Bartlett *et al.*, 2007). Durch Akkumulation der Arzneistoffe und Eindringen in unerwünschte Zelltypen kann es unter Umständen zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kommen (Brown *et al.*, 2019). Aus diesem Grund ist die Entwicklung eines sicheren und zielgerichteten Delivery-Systems von besonderem Interesse. Hefezellen haben sich schon oft als sehr effiziente Carrier, insbesondere für ein Delivery von Antigenen in APC, erwiesen (Stubbs *et al.*, 2001; Bazan *et al.*, 2011; Walch *et al.*, 2012; Seif *et al.*, 2016, 2017). Ein besonderer Vorteil von Hefen ist die Verknüpfung der positiven Eigenschaften eines Einzellers, wie günstige Kultivierung und schnelles Wachstum, mit denen von Eukaryonten. So sind rekombinante Proteine aus Hefen mit eukaryonten Glykosylierungsmustern sowie komplexen posttranslationalen Modifikationen versehen und werden daher in Säugerzellen besser erkannt, was zur Ausbildung einer effektiveren Immunantwort führt (Bucarey *et al.*, 2009). Allerdings werden besonders in der Gattung *S. cerevisiae* Proteine häufig hyperglykosyliert, was die korrekte Faltung des Proteins behindern kann. In dieser Arbeit soll daher die Eignung von Hefezellen als Deliveryvehikel unter verschiedenen Gesichtspunkten untersucht werden.

Optimierung des Hefe-basierten Delivery-Systems

Hefezellen verschiedener Gattungen wurden schon mehrfach erfolgreich als Impfstoffvehikel eingesetzt. Stubbs und Mitarbeiter konnten bereits im Jahre 2001 nachweisen, dass durch Antigen-Delivery mittels *S. cerevisiae* die Reifung von DC hervorgerufen und eine MHC Klasse I- und Klasse II-abhängige Immunantwort induziert werden kann. Die Präsentation des Antigens über beide Klassen der MHC-Komplexe ist besonders wichtig, da es nur so zur Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ Zellen kommt (Zinkernagel & Doherty, 1979; Schwartz, 1984). Außerdem konnte mit Hilfe des CMV-Antigens pp65, welches rekombinant in *Sz. pombe* exprimiert wurde, eine spezifische Aktivierung von T-Lymphocyten nachgewiesen werden (Breinig *et al.*, 2003). Des Weiteren gelang es Walch im Rahmen ihrer Dissertation (2009) ein Delivery-System zu entwickeln, durch welches Antigen-codierende Nukleinsäuren mittels *S. cerevisiae* in APC eingebracht werden können. Unter Verwendung eines Ovalbumin-basierten Delivery-Systems konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die subzelluläre Proteinlokalisierung in Hefezellen einen entscheidenden Einfluss auf die Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphocyten hat (Bazan *et al.*, 2011). Basierend auf diesen Ergebnissen sollten in dieser Arbeit Optimierungen des Hefe-basierten Delivery-Systems vorgenommen werden, um dessen Effizienz weiter zu steigern.

Zunächst sollte untersucht werden, ob durch Expression von Flagellin in *S. cerevisiae* ein zusätzlicher adjuvanter Effekt erreicht werden kann. Auch wenn Hefezellen über natürliche immunstimulatorische Bestandteile wie Mannan und β -Glukan verfügen, so konnte sich Flagellin doch in mehreren Studien als ein sehr wirkungsvolles systemisches und mukosales Adjuvans beweisen, das eine verstärkte adaptive Immunantwort gegen das gleichzeitig verabreichte Antigen hervorruft (Tarahomjoo, 2014). So führte beispielsweise die Inkorporation von Flagellin in Influenza-VLP zu einer erhöhten virusspezifischen Antikörperproduktion sowie zu einer vermehrten MHC Klasse I- und Klasse II-abhängigen zellulären Immunantwort (Wang *et al.*, 2008). Außerdem konnte durch Oberflächenmodifikation mit Flagellin sowohl bei Nanopartikeln als auch bei Bakteriophagen nach oraler Applikation die Antikörperproduktion deutlich gesteigert werden (Salman *et al.*, 2009; Synott *et al.*, 2009). In dieser Arbeit sollte nicht nur eine generelle Steigerung der immunstimulatorischen Wirkung von Hefezellen durch die Expression Flagellin, sondern auch ein möglicher Einfluss der subzellulären Lokalisation des Adjuvans untersucht werden. Hierzu wurden Zellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c mit unterschiedlichen Codon-optimierten FliC-Varianten transformiert, sodass sie

Flagellin entweder cytosolisch, sekretorisch oder zellwandverankert, via PIR1 bzw. PIR2, exprimierten. Der Einfluss auf die Aktivierung von Immunzellen wurde in der murinen Makrophagen-Zelllinie IC21 durch intrazelluläre Antikörperfärbung von TNF α und anschließende durchflusscytometrische Analyse untersucht. Diese zeigte eine signifikant höhere Anzahl TNF α -positiver Makrophagen bei cytosolisch exprimiertem und PIR1-verankertem FliC verglichen mit Leervektor-tragenden S86c. Eine erhöhte Makrophagenaktivierung durch sezerniertes FliC konnte anhand dieser Ergebnisse lediglich vermutet, allerdings wegen fehlender Signifikanz nicht bestätigt werden. Da Flagellin vor allem durch TLR5, welcher an der Plasmamembran vorliegt, erkannt wird, lag die Vermutung nahe, dass zellwandverankertes FliC zu einer deutlich stärkeren Aktivierung führt als cytosolisch vorliegendes Flagellin (Hayashi *et al.*, 2001). Allerdings konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass Flagellin auch von Nod-like Rezeptoren, welche im Cytosol vorliegen, erkannt wird (Miao *et al.*, 2008; Tarahomjoo, 2014). Da im Rahmen dieser Arbeit keine quantitative Analyse der Expressionsstärke erfolgt ist, könnten die Unterschiede in der Makrophagenaktivierung allerdings auch durch variierende Proteinmengen begründet sein. Insgesamt konnte aber durch diese Ergebnisse gezeigt werden, dass der adjuvante Effekt von *S. cerevisiae* sowohl durch cytosolische als auch durch zellwandverankerte Expression von Flagellin gesteigert werden kann.

Eine weitere Strategie zur Optimierung des Hefe-basierten Delivery-Systems ist die Koexpression porenbildender Proteine. Für ein effizientes Delivery spielt die Freisetzung des Cargos aus dem Phagolysosom der Zielzellen eine entscheidende Rolle. Insbesondere nach einem Delivery Antigen-codierender Nukleinsäuren sollte eine vermehrte Translokation ins Cytosol zu einer deutlich verbesserten Antigenexpression in APC führen. Die Koexpression von LLO in Bacillus Calmette–Guerin (BCG)-Stämmen und in Hefe führte bereits zu einer gesteigerten Cargo-Translokation ins Cytosol von APC (Hess *et al.*, 1998; Walch *et al.*, 2011). Da es sich bei LLO allerdings um einen der wichtigsten Virulenzfaktoren der Listerien handelt und es außerdem einen toxischen Effekt auf Hefezellen hat, untersuchte Walch in ihrer Dissertation zusätzlich die Koexpression von humanem Perforin in *S. cerevisiae* (Walch, 2009). Aufbauend auf diesen Vorarbeiten wurde im Rahmen dieser Arbeit in Kooperation mit Barbara Walch die Auswirkung der zusätzlichen Expression von Perforin auf ein Nukleinsäure-Delivery in APC mittels *S. cerevisiae* im direkten Vergleich zu einer nicht funktionellen Perforinvariante untersucht. Es konnte durch Koexpression von funktionellem Perforin, sowohl nach DNA- als auch nach RNA-Delivery, eine signifikante Steigerung der Expression des

Modellcargos eGFP in Makrophagen nachgewiesen werden. Des Weiteren führte die Koexpression von Perforin in Ova_{cyt}-exprimierenden Hefezellen zu einer verstärkten Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphocyten (Walch-Rückheim *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass Perforin, anders als lange vermutet, Poren in endocytotischen Kompartimenten und nicht ausschließlich in der Plasmamembran der Zielzellen erzeugt und so die Translokation von Effektormolekülen ins Cytosol verstärkt (Froelich *et al.*, 1998; Pipkin & Lieberman, 2007; Thiery *et al.*, 2011).

***In vivo*-Studien zur Überprüfung der Anwendbarkeit von Hefen als Deliveryvehikel**

Die Verabreichungsform eines Medikaments kann einen entscheidenden Einfluss auf dessen Wirkung haben. Da viele Pathogene über Schleimhäute in den Körper eindringen, ist eine mukosale Immunantwort zur Bekämpfung einer solchen Infektion von besonderer Wichtigkeit. Nach oraler Applikation eines Arzneistoffes kommt es durch Aktivierung des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes (GALT) neben der Induktion einer zellulären Immunantwort auch zur Produktion von IgA-Antikörpern, welche als erste Abwehrlinie das Eindringen eines Pathogens in die Schleimhäute verhindern können (Neutra & Kozlowski, 2006). Das GALT beinhaltet zusammenhängende lymphoide Follikel, die sogenannten Peyer'schen Plaques, welche mit Follikel-assoziiertem Epithel (FAE) überdeckt sind. Im FAE befinden sich wiederum M-Zellen, welche für die Aufnahme, die Prozessierung und den Transport von Antigenen verantwortlich sind (Gebert, 1997). Im Bereich der Impfstoffentwicklung stellt die effiziente Bindung des Antigens an M-Zellen und die damit verbundene Internalisierung einen kritischen Faktor dar (Woodrow *et al.*, 2012).

Da sich Hefezellen, wie bereits beschrieben, schon häufig als vielversprechende Antigen-Carrier bewiesen haben und die orale Applikationsroute außerdem ihrem natürlichen Eintrittsweg in den Körper entspricht, bieten sie sich besonders gut als Impfstoffvehikel zur Induktion einer mukosalen Immunantwort an. Weitere Vorteile eines Hefe-basierten oralen Vakzins sind der Schutz des Antigens vor Proteasen und dem sauren Milieu in der Magen-Darm-Passage, ein zusätzlicher adjuvanter Effekt durch immunstimulatorische Bestandteile der Hefezellwand und die Tatsache, dass Hefen von M-Zellen aufgenommen werden (Kirchhelle *et al.*, 1996; Bazan *et al.*, 2014; Beier & Gebert, 1998). Basierend auf der Beobachtung, dass die rekombinante Expression von Invasionsproteine aus *Yersinien* (Invasine) zu einer erhöhten Aufnahme von *Salmonella typhimurium* und *E. coli* in M-Zellen führt, etablierte Kennigott im Rahmen ihrer Diplomarbeit (2010) ein System zur

Expression von Invasin auf der Zellwand von *S. cerevisiae* (Simonet *et al.*, 1994; Critchley-Thorne *et al.*, 2006). Zur Oberflächenexpression verschiedener Invasinderivate wurde u. a. ein Hefe-Display-System, welches durch C-terminale Fusion an Aga2p die Verankerung des gewünschten Proteins über den α -Agglutininrezeptor in *S. cerevisiae* ermöglicht, angewandt (Boder & Wittrup, 1997). Durch Untersuchung der Bindungsfähigkeit der rekombinanten Hefezellen mit Hilfe eines *in vitro* M-Zell-Modells konnte gezeigt werden, dass die auf 198 AS verkürzte Invasinvariante aus *Y. enterocolitica* die effektivste Bindung an M-Zellen vermitteln konnte (Kenngott, 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher weiterführende Versuche in Kooperation mit Elisabeth Kenngott durchgeführt, um zu überprüfen ob die Oberflächenexpression dieser Variante *in vivo* zu einer verstärkten Aufnahme von Hefezellen aus dem Darmlumen führt. Im Mausmodell konnte nach oraler Applikation CFSE-gefärbter Hefezellen verglichen mit den entsprechenden Kontrollhefen eine deutlich erhöhte Aufnahme der Invasin-exprimierenden Hefen in die Peyer'schen Plaques mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen werden (Kenngott *et al.*, 2016). Diese Ergebnisse bestätigen, dass die Bindefähigkeit von Hefezellen an M-Zellen und die damit verbundene Aufnahme in die darunter liegenden lymphatischen Gewebe durch Oberflächenmodifikation der Zellen mit Invasin deutlich verbessert werden kann. Insbesondere die Expression der verkürzten Invasinvariante aus *Y. enterocolitica* in *S. cerevisiae* führt zu einem effizienten M-Zell-Targeting und bietet somit die Grundlage für ein sehr vielversprechendes System zur oralen Applikation von Impfstoffen oder Arzneimitteln.

Das Auslösen einer Immunantwort nach einer Vakzinierung wird von vielen Faktoren, u. a. der Applikationsform, der Dosierung, der Verfügbarkeit des Antigens zur Prozessierung und verschiedenen kostimulatorischen Signalen zum Zeitpunkt der Antigenaufnahme, beeinflusst (Rush *et al.*, 2002). Das in dieser Arbeit angewandte Immunisierungsschema basiert auf Vorarbeiten von Franzusoff und Mitarbeitern, die bereits in mehreren Studien zeigen konnten, dass Hefe-basierte Impfstoffe zu einer erhöhten Expression von MHC Klasse I- und Klasse II-Molekülen und zur Rekrutierung sowie Aktivierung antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führt (Bernstein *et al.*, 2008; Stubbs *et al.*, 2001; Franzusoff *et al.*, 2005; Ardiani *et al.*, 2010). Der Stamm S86c wurde für die hier durchgeführten Versuche eingesetzt, weil er verglichen mit anderen *S. cerevisiae* Stämmen die effektivste Ausreifung von iDC zu mDC vermittelt und sich somit gut als Impfstoffvehikel eignet (Walch, 2009). Des Weiteren sollte in dieser Arbeit verschiedene Varianten des Modellantigens Ovalbumin in S86c exprimiert und miteinander verglichen

werden, da in mehreren Studien bereits nachgewiesen werden konnte, dass die Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphocyten abhängig von der subzellulären Lokalisation des Antigens variiert (Rush *et al.*, 2002; Howland & Wittrup, 2008; Bazan *et al.*, 2011).

Nach Vakzinierung mit Ovalbumin-exprimierenden Hefen und anschließender Restimulation mit SIINFEKL konnte zwar verglichen mit PBS-behandelten Mäusen eine erhöhte Produktion von IFN γ und TNF α in CD8⁺ Splenocyten nachgewiesen werden, aber es kam zu großen individuellen Schwankungen innerhalb der Versuchsgruppen und es konnte keine signifikante Steigerung im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle festgestellt werden. Deshalb sollte die zu untersuchende T-Zellpopulation mit Hilfe von SIINFEKL-spezifischen Pentameren besser eingegrenzt werden. Die hier verwendeten Pentamere von ProImmune wurden schon mehrfach erfolgreich zum Nachweis Ovalbumin-spezifischer T-Lymphocyten eingesetzt (Brinkman *et al.*, 2004; Amidi *et al.*, 2012). Auch in dieser Arbeit führte der Einsatz der spezifischen Pentamere zu einer deutlich verringerten Varianz der Ergebnisse innerhalb der Versuchsgruppen und nach Immunisierung mit Ovalbumin-sezernierenden und Ova-VLP-exprimierenden Hefezellen konnten verglichen mit der PBS-Kontrolle hochsignifikante Steigerungen der IFN γ sowie TNF α -Produktion nachgewiesen werden. Allerdings führte auch bei dieser Analyse die Behandlung mit Leervektor-tragenden Hefen zu einer stark erhöhten Cytokinproduktion und es konnte keine weitere Steigerung durch zusätzliche Ovalbuminexpression gemessen werden. Diese Ergebnisse stimmen nicht mit der Beobachtung von Stubbs *et al.* überein, die durch Immunisierung mit Ovalbumin-exprimierenden *S. cerevisiae* die Bildung von Tumoren im E.G-7 Tumormodell verhindern konnten (Stubbs *et al.*, 2001). Mit Hilfe einer Protein BLAST („Basic Local Alignment Search Tool“-)Analyse wurde daraufhin die Peptidsequenz SIINFEKL mit der Proteinsequenzdatenbank von *S. cerevisiae* abgeglichen und es konnte eine 100 %ige Übereinstimmung von sieben der acht Aminosäuren des Ovalbuminpeptids (SIINFEK) im RNA-Polymerase Transkriptionsfaktor Rrn3p nachgewiesen werden. Diese in allen untersuchten *S. cerevisiae* Stämmen konservierte Sequenzübereinstimmung könnte die in dieser Arbeit beobachtete Ova-spezifische Aktivierung von T-Lymphocyten durch Leervektor-tragende Hefezellen erklären. Auch der scheinbare Widerspruch der hier gewonnen Ergebnisse zu den Beobachtungen von Stubbs *et al.* kann hiermit aufgeklärt werden, da in dieser Veröffentlichung lediglich PBS und nicht Leervektor-tragende Hefen als Kontrolle mitgeführt wurden und somit die hier beschriebene Problematik vermieden wurde.

cNP/Hefe-Komplexe als neuartige „nano-in-micro“ Carrier

In den letzten Jahrzehnten haben sich biokompatible Nanopartikel aufgrund ihrer vielen positiven Eigenschaften, wie Stabilität, hohe Variabilität, einfache Manipulierbarkeit und hohe Cargo-Kapazität, als sehr vielversprechende Vehikel etabliert (Ravi Kumar *et al.*, 2004; Nafee *et al.*, 2007; Hamdy *et al.*, 2011). Besonders PLGA-Partikel zeigten sich bereits als Delivery-Systeme für Arzneistoffe, Proteine und DNA zur Behandlung verschiedenster Erkrankungen als sehr erfolgreich (Mir *et al.*, 2017). So wurden PLGA-basierte Nanopartikel bereits in zahlreichen Studien erfolgreich als Deliveryvehikel zur Therapie von neurodegenerativen Erkrankungen, Krebs und chronisch entzündliche Erkrankungen, aber auch zur prophylaktischen Immunisierung, eingesetzt (Fornaguera *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015; Tahara *et al.*, 2011; Rietscher *et al.*, 2017). Trotz vielfältiger Möglichkeiten durch Oberflächenmodifikation der Polymere stellt das zielgerichtete Targeting von Nanopartikeln in die gewünschte Zellpopulation bis heute eine Schwierigkeit dar (Brown *et al.*, 2019). Um diese Problematik zu adressieren sollte in dieser Arbeit durch Kombination aus PLGA-Partikeln und Hefezellen ein neuartiger „nano-in-micro“ Carrier etabliert und untersucht werden. Die Nutzung eines Hefebasierten Delivery-Systems bietet bezüglich eines Makrophagen-Targetings den besonderen Vorteil, dass nach der Aufnahme von Hefezellen in Makrophagen eine Phänotypänderung in Richtung des M1-Subtyps beobachtet werden konnte, was für die Behandlung vieler Erkrankungen von großem Vorteil wäre (Seif *et al.*, 2016).

Zur Charakterisierung der Interaktion zwischen Nanopartikeln und Hefezellen wurden fluoreszenzmarkierte Chitosan-beschichtete PLGA-Partikel (cNP) und Hefen der Gattungen *S. cerevisiae*, *P. pastoris*, *K. lactis* und *Sz. pombe* eingesetzt. Des Weiteren wurde die Komplexierung in Lösungen mit unterschiedlicher NaCl-Konzentration untersucht, da bereits gezeigt werden konnte, dass die Ionenstärke im umgebenden Medium die elektrostatische Anziehung zwischen PSL-Partikeln und *S. cerevisiae* stark beeinflusst (Nomura *et al.*, 2013; Miyazaki *et al.*, 2014). In Anlehnung an diese Studie wurde für die hier durchgeführten Experimente jeweils eine isotone (154 mM) und eine hypotone (5 mM) NaCl-Lösung verwendet. Mittels durchflusscytometrischer Analyse konnte gezeigt werden, dass alle untersuchten Hefegattungen zur Interaktion mit cNP fähig sind. Allerdings waren zwischen den einzelnen Hefestämmen große Unterschiede bezüglich der Bindungsstärke zu erkennen: während nahezu alle Zellen der *S. cerevisiae* und *P. pastoris* Stämme auch bei sehr geringer Partikelkonzentration (0,06 mg/ml) noch eine Assoziation mit cNP in hypotoner Lösung aufwiesen, zeigte der *K. lactis* Stamm

lediglich bei der höchsten Konzentration (1 mg/ml) eine effiziente Interaktion mit cNP. Bei *Sz. pombe* konnte zwar in einer großen Anzahl von Zellen eine cNP-assoziierte Fluoreszenz nachgewiesen werden, diese wiesen allerdings nur eine geringe Fluoreszenzintensität auf. Alle untersuchten Hefestämme zeigten verglichen mit isotonen Bedingungen deutlich höhere Fluoreszenzintensitäten nach Inkubation in hypotoner NaCl-Lösung, was die These der verstärkten elektrostatischen Anziehung von Nomura *et al.* unterstützt. Die stärkste Wechselwirkung mit cNP in 154 mM NaCl konnte in den *P. pastoris* Stämmen GS115 und KM71 nachgewiesen werden. Diese Beobachtung könnte durch die stark negativ geladene Zelloberfläche (Zetapotential: -27 mV) der Stämme und die damit verbundene stärkere Anziehungskraft auf die positiv geladenen cNP erklärt werden. Im Vergleich dazu weisen die untersuchten *S. cerevisiae* Stämme lediglich Zetapotentiale von -10 mV (S86c) bzw. -15 mV (BY4742) auf. Die negativere Oberflächenladung von BY4742 geht in den hier durchgeführten Experimenten verglichen mit S86c auch mit höheren cNP-assoziierten Fluoreszenzintensitäten einher, was den Einfluss der elektrostatischen Anziehung auf die Interaktion zwischen Hefen und cNP weiter unterstreicht. Eine weitere interessante Feststellung konnte bezüglich der konzentrationsabhängigen Fluoreszenzmaxima der Hefezellen getroffen werden: entgegen der Annahme, dass die Partikel-assoziierte Fluoreszenzintensität mit sinkender cNP-Konzentration abnimmt bzw. eventuell bis zu einer bestimmten Konzentration konstant bleibt, konnte in *S. cerevisiae* und *P. pastoris* bei abnehmender Partikelkonzentration zunächst eine deutliche Zunahme der Intensität bis zu einem Maximum bei 0,25 mg/ml (*S. cerevisiae*) bzw. 0,5 mg/ml (*P. pastoris*) beobachtet werden.

Die fluoreszenzmikroskopische Analyse der cNP/Hefe-Komplexe konnte nicht nur Aufschluss über die Lokalisation der cNP innerhalb der Hefezellen geben, sondern bestätigte auch die erhöhte Fluoreszenzintensität bei einer Partikelkonzentration von 0,25 mg/ml für BY4742 und S86c bzw. 0,5 mg/ml für GS115 und KM71. Es war außerdem zu erkennen, dass bei diesen Konzentrationen eine vermehrte Akkumulation der cNP an der Zelloberfläche stattfand. Nach Inkubation in höher konzentrierter cNP-Lösung konnte hingegen eine gleichmäßige Verteilung der Partikel in den Zellen beobachtet werden. Zellen des *Sz. pombe* Stammes PW260 wiesen bereits bei hoher cNP-Konzentration eine starke Kollokalisierung der Partikel im Bereich der Zellwand und lediglich eine geringe Anzahl aufgenommener cNP im Zellinneren auf. *K. lactis* zeigte wie erwartet auch hier die geringste Wechselwirkung mit cNP. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse lassen demnach vermuten, dass sich die Hefegattungen

S. cerevisiae und *P. pastoris* besser für ein Delivery von cNP eignen als *Sz. pombe* und *K. lactis*. Außerdem deuten die Beobachtungen darauf hin, dass durch Variation der Partikelkonzentration je nach Anwendungsbereich entweder eine cNP-Aufnahme in die Hefezellen oder eine Bindung an die Zelloberfläche erreicht werden kann. So könnte beispielsweise eine Lokalisation Antigen-beschichteter Nanopartikel an der Hefezellwand von Vorteil sein, da das Antigen so für Proteasen besser zugänglich ist und somit zu einer effizienteren Kreuzpräsentation in DC führt (Howland & Wittrup, 2008). Für ein Delivery instabiler Wirkstoffe oder Nukleinsäuren, insbesondere nach oraler Applikation, wäre hingegen eine zusätzliche Schutzhülle in Form von Hefezellen wünschenswert. Diese Möglichkeit der variablen Cargo-Verpackung bietet einen großen Vorteil verglichen mit anderen Strategien für ein zielgerichtetes Delivery in phagozytierende Zellen. So war es Soto *et al.* (2012) beispielsweise möglich ein gezieltes Delivery von Silicapartikeln an phagozytierende Zellen durch Bindung der Partikel an PEI-beschichtete Glukanpartikel nachzuweisen, allerdings war die Effizienz durch eine limitierte Cargokonzentration stark eingeschränkt.

Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war inwiefern die Interaktion mit cNP eine Auswirkung auf die Membranintegrität und die Viabilität von Hefen hat. Mittels PI-Färbung konnte festgestellt werden, dass die Inkubation von *S. cerevisiae* und *P. pastoris* in 5 mM cNP-Lösung bis zu einer Konzentration von 0,06 (BY4742) bzw. 0,03 mg/ml (GS115) zur Bildung von Poren in der Zellmembran führt. Die Wechselwirkung mit cNP in isotoner NaCl-Lösung verursachte lediglich in GS115 bis zu einer Konzentration von 0,25 mg/ml eine Beeinträchtigung der Membranintegrität, nicht aber in BY4742. Die zusätzliche Analyse mittels MTT-Assay ergab für die beiden untersuchten Hefegattungen eine verminderte Zellviabilität bis zu einer cNP-Konzentration von 0,25 mg/ml. In Kombination mit den Ergebnissen der PI-Färbung ist das ein Hinweis darauf, dass die Bildung von Poren in der Plasmamembran von Hefezellen durch cNP nicht zwingend mit einer Verminderung der Zellviabilität einhergeht. Diese Ergebnisse stimmen insofern mit den Beobachtungen von Nomura und Mitarbeitern überein, dass in beiden Studien die Inkubation der Hefen in hypotoner nicht aber in isotoner Partikellösung zum Zelltod führt. Im Gegensatz zu der Feststellung von Nomura *et al.*, dass PSL-Partikel nur von lebenden Hefen aufgenommen wurden, konnte in dieser Arbeit auch oder eher gerade in toten Hefezellen eine effiziente Aufnahme von cNP nachgewiesen werden (Nomura *et al.*, 2013; Miyazaki *et al.*, 2014); diese Unterschiede könnten allerdings auf die Verwendung unterschiedlicher Polymere zurückzuführen sein. Außerdem konnte in den hier

durchgeführten Versuchen beobachtet werden, dass die Inkubation von GS115 mit höher konzentrierten cNP in 154 mM NaCl in erhöhten Absorptionwerten nach MTT-Behandlung resultierte. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass die durch cNP gebildeten Poren in der Membran der Hefezellen (vgl. PI-Färbung) zwar nicht zu einer Beeinträchtigung der Vitalität, aber zu einer fälschlich erhöhten Menge an Formazankristallen in den Zellen führt. Diese Vermutung wird von Grela *et al.* (2015) bestätigt, die beobachten konnten, dass die Beeinträchtigung der Membranintegrität von *Proteus mirabilis* zu künstlich erhöhten Werten im MTT-Assay führt.

In weiterführenden Experimenten konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass cNP/Hefe-Komplexe von M1- und M2-Makrophagen aufgenommen werden und ein Delivery des Modellcargos Rhodamin vermitteln können. Dies bestätigt auch die Ergebnisse von Seif *et al.* (2017), die in ihrer Studie nachweisen konnten, dass sich Hefezellen für ein Delivery sowohl in M1- als auch in M2-Makrophagen eignen. Wie durch die bisherigen Ergebnisse vermutet, konnte in diesen Experimenten nach Komplexierung in 5 mM NaCl-Lösung ein effizienteres Delivery erreicht werden als mit Komplexen die in 154 mM NaCl gebildet wurden. Verglichen mit reinen cNP konnte durch Assoziation der Partikel an Hefezellen ein deutlicher Effizienzgewinn nachgewiesen werden; besonders durch den *S. cerevisiae* Stamm BY4742, aber auch durch *P. pastoris* GS115, konnte nach Behandlung mit hypotoner cNP-Lösung die Rhodamin-assoziierte Fluoreszenzintensität in Makrophagen um ein Vielfaches gesteigert werden. Komplexe, die in isotoner Lösung gebildet wurden, wiesen verglichen mit reinen cNP immer noch eine gleichwertige Delivery-Effizienz auf. Bezüglich der untersuchten Makrophagensubtypen konnte eine höhere Aufnahme von reinen Partikeln und BY4742-assoziierten cNP in M1-Makrophagen festgestellt werden, während GS115 eher eine Tendenz zur besseren Aufnahme in M2-Makrophagen zeigten. Die höhere Partikel-Phagozytose durch M1 widerspricht den Ergebnissen von Hoppstädter *et al.* (2015), die eine deutliche erhöhte Aufnahme von Silica-Partikeln nach M2-Polarisierung nachweisen konnten. Dieser scheinbare Widerspruch kann allerdings auf die unterschiedlichen Eigenschaften der Nanopartikel zurückgeführt werden, da diese nicht nur aus anderem Material aufgebaut sind, sondern vor allem auch eine deutlich geringere Größe aufweisen (26 bzw 45 nm vs. 240 nm). So konnte bereits gezeigt werden, dass M1-Makrophagen eher auf die Phagozytose von Mikroorganismen spezialisiert sind, während M2-Makrophagen eine höhere Aktivität in der Beseitigung von Zelltrümmer aufzeigen (Krysko *et al.*, 2011; Rey-Giraud *et al.*, 2012). Zusammenfassend sind diese Ergebnisse ein Hinweis darauf, dass die

Phagocytoserate der Makrophagentypen je nach Eigenschaften des zu phagozytierenden Materials variiert.

Nanopartikel neigen, besonders in Anwesenheit von Proteinen, zur Bildung von Agglomeraten, was sich entscheidend auf deren Eigenschaften auswirken kann und somit auch ihre Bindung an sowie die Aufnahme in Zielzellen beeinflusst (Lankoff *et al.*, 2012). In dieser Arbeit konnte mit Hilfe von CLSM-Analysen gezeigt werden, dass im Gegensatz zur Behandlung mit reinen cNP durch Verwendung von cNP/Hefe-Komplexen die Bildung von Partikelagglomeraten während der Inkubation mit Makrophagen vollständig vermieden werden kann, was bezüglich eines Einsatzes als Deliveryvehikel einen großen Vorteil darstellt.

Mit Hilfe von Kokultur-Experimenten konnte in dieser Arbeit eindeutig bestätigt werden, dass Hefezellen ein gezieltes Targeting phagozytierender Zellen vermitteln können. Im Gegensatz zu reinen cNP erfolgte die Aufnahme von cNP/Hefe-Komplexen ausschließlich in Makrophagen und nicht in HeLa-Zellen. Somit konnte auch in primären humanen Makrophagen eine signifikante Steigerung der Partikelaufnahme durch Verwendung von cNP/BY4742-Komplexen nachgewiesen werden. Insbesondere durch cNP/Hefe-Komplexe, die in hypotoner Lösung gebildet wurden, konnte das Delivery in Makrophagen zudem stark beschleunigt werden; bereits nach einer halben Stunde zeigten 76 % (5 mM NaCl) bzw. 40 % (154 mM NaCl) der mit cNP/Hefe-Komplexen behandelten Makrophagen eine positive Rhodaminfluoreszenz auf, während reine cNP lediglich in maximal 8 % der Makrophagen nachgewiesen werden konnten. Der Unterschied hinsichtlich der Delivery-Effizienz durch Verwendung verschiedener Salzkonzentration bei der Herstellung der Komplexe wurde allerdings nach längerer Inkubationszeit ausgeglichen. Durch Untersuchung der Aufnahme von Hefezellen im Kokulturmodell konnte eine verminderte oder zeitverzögerte Phagocytoserate der in 154 mM NaCl gebildeten cNP/Hefe-Komplexe als Begründung für diese Beobachtung ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die erhöhte elektrostatische Anziehung in hypotoner Lösung wie bereits vermutet zu einer vermehrten Bindung der cNP an die Hefezellen führt, was zwar eine höhere Delivery-Effizienz zur Folge hat, welche aber wegen der hohen Phagocytoserate der primären Makrophagen nach einer gewissen Zeit nicht mehr nachgewiesen werden kann. Da die Verfügbarkeit der Hefen in diesem Modell allerdings nicht der *in vivo* Situation entspricht, könnte die beobachtete unterschiedliche Effizienz im Tiermodell durchaus einen Effekt zeigen.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Erkenntnisse von Soto *et al.* (2012), dass die Verwendung von Glukanpartikeln aus *S. cerevisiae* ein zielgerichtetes Delivery von Nanopartikeln in Makrophagen ermöglicht und somit eine vielversprechende Basis für ein hoch effizientes „nano-in-micro“ Delivery-System darstellt. Allerdings bietet die Verwendung lebender Hefezellen im Gegensatz zu leeren Glukanhüllen diverse Vorteile, wie eine effizientere Cargoaufnahme und die Möglichkeit einer zusätzlichen rekombinanten Expression diverser Proteine, welche die Effizienz des Carriers, wie auch im Rahmen dieser Arbeit gezeigt, weiter steigern können (z. B.: Perforin, Walch-Rückheim *et al.*, 2016; oder Invasin, Kenngott *et al.*, 2016).

Ausblick

Ein Ziel dieser Arbeit war die Optimierung des Hefe-basierten Delivery-Systems, welches bereits erfolgreich zum Einbringen von Antigenen in APC eingesetzt wurde (Bazan *et al.*, 2011; Walch *et al.*, 2012). Zur potentiellen Steigerung der immunstimulatorischen Wirkung von Hefezellen konnten in dieser Arbeit verschiedene Varianten eines Flagellinderivats in *S. cerevisiae* exprimiert und eine erhöhte Aktivierung von Makrophagen durch cytosolisch vorliegendes und zellwandverankertes Flagellin nachgewiesen werden. Zum besseren Vergleich der hier untersuchten Flagellinvarianten untereinander sollte allerdings noch eine quantitative Bestimmung der Expressionsstärke erfolgen. Des Weiteren sollten weiterführend Koexpressionsexperimente mit einem Modellantigen durchgeführt werden, um eine tatsächliche Steigerung der antigenspezifischen Immunantwort durch die zusätzliche adjuvante Wirkung nachzuweisen. Eine weitere Verbesserung des Delivery-Systems konnte durch Koexpression von humanem Perforin erreicht werden. Die zusätzliche Expression des porenbildenden Proteins führte *in vitro* sowohl nach Nukleinsäure- als auch nach Proteindelivery zu einer verstärkten Translokation ins Cytosol der APC und infolgedessen zu einer effizienteren T-Zellaktivierung (Walch-Rückheim *et al.*, 2016). Als Nächstes wäre es daher interessant die Funktionalität dieses Systems im Tiermodell zu überprüfen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die rekombinante Expression von Invasin aus *Y. enterocolitica* auf der Zellwand von *S. cerevisiae* nach oraler Applikation zu einer erhöhten Aufnahme der Hefezellen aus dem Darmlumen von Mäusen führt. Weiterführend wäre die Koexpression eines funktionellen Modellcargos denkbar, um die Anwendung von Invasin-exprimierenden Hefen als orales Deliveryvehikel abschließend überprüfen zu können.

Unter Verwendung des Ovalbumin-basierten Modellsystems konnte in den hier durchgeführten Immunisierungsversuchen leider keine gesteigerte Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphocyten durch Ovalbumin-exprimierende Hefezellen im Vergleich zur Leervektorkontrolle nachgewiesen werden. Die hohe Sequenzähnlichkeit einer hochkonservierten Domäne im *S. cerevisiae*-Protein Rrn3 zum Ovalbuminpeptid SIINFEKL könnte eine Erklärung für diese Beobachtung sein und legt somit nahe für zukünftige Versuche ein anderes Modellsystem zu wählen. Aus zeitlichen Gründen konnte die Etablierung eines neuen Modellsystems für ein Hefe-vermitteltes Antigen-Delivery in dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden. Vorstellbar wäre allerdings die Expression

des carcinoembryonalen Antigens (CEA), welches als Tumormarker für viele verschiedene Krebserkrankungen verwendet wird und schon mehrfach erfolgreich als Modellantigen in *S. cerevisiae* eingesetzt wurde (Bernstein *et al.*, 2008; Bilusic *et al.*, 2014).

Abschließend konnte im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiger „nano-in-micro“ Carrier etabliert werden, der ein zielgerichtetes Einbringen von funktionalisierten Nanopartikeln in phagozytierende Zellen ermöglicht. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass Komplexe aus Rhodamin-markierten cNP und Hefezellen ausschließlich ein Delivery in Phagozyten vermitteln, wäre es interessant den Farbstoff Rhodamin durch ein funktionelles Modellcargo zu ersetzen, welches einen nachweisbaren Effekt auf Makrophagen ausübt. Ein vielversprechendes Beispiel hierfür wäre Curcumin, ein natürlicher Farbstoff der durch Inhibierung von NF- κ B und Induktion des „Glucocorticoid-induced Leucine Zipper“ (GILZ) eine anti-inflammatorische Wirkung auf Makrophagen ausübt (Hoppstädter *et al.*, 2016).

Zusammenfassung

Die Entwicklung von effizienten und sicheren Delivery-Systemen steht aktuell im Mittelpunkt vieler Forschungsbereiche. Das zielgerichtete Targeting phagozytischer Zellen ist für die Prävention von Infektionskrankheiten, aber auch als Therapieansatz bei Makrophagen-assoziierten Krankheiten und Tumorerkrankungen von besonderem Interesse. Da Hefezellen bereits mehrfach erfolgreich zum Transport von Proteinen und Nukleinsäuren in APC eingesetzt werden konnten, bestand der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der Weiterentwicklung des bereits etablierten Hefe-basierten Delivery-Systems.

Durch heterologe Expression von Flagellin in *S. cerevisiae* konnte im Rahmen dieser Arbeit eine verstärkte immunstimulatorische Wirkung im Vergleich zu wildtypischen Hefen nachgewiesen werden. Eine nähere Betrachtung des Einflusses der subzellulären Lokalisation des Adjuvans ergab, dass sowohl eine intrazelluläre als auch eine Pir1-vermittelte Zellwandexpression zu einer erhöhten Aktivierung von Makrophagen führt, während durch Sekretion von Flagellin und Zellwandverankerung via Pir2 kein signifikanter Effekt nachgewiesen werden konnte. Auch durch Koexpression von humanem Perforin in *S. cerevisiae* konnte eine Verbesserung des Hefe-basierten Delivery-Systems erreicht werden; verglichen mit einer nicht funktionellen Variante bewirkte Perforin eine verstärkte Translokation des Cargos aus dem Endolysosom ins Cytosol von APC und führte somit zu einer deutlich gesteigerten Delivery-Effizienz. Eine weitere Optimierung des Delivery-Systems, insbesondere im Hinblick auf eine orale Applikation, erfolgte durch heterologe Expression von Invasin in Hefezellen. Die Oberflächenmodifikation von *S. cerevisiae* mit dem Invasionsprotein aus *Y. enterocolitica* führte im Mausmodell zu einer deutlichen gesteigerten Aufnahme in lymphatische Gewebe durch M-Zellen.

Der Nachweis einer Antigen-spezifischen Immunreaktion in Mäusen nach Vakzinierung mit Ovalbumin-exprimierenden Hefen scheiterte in dieser Arbeit leider aufgrund eines nicht für *S. cerevisiae* geeigneten Modellantigens. Auch wenn durchaus nach Immunisierung mit Hefezellen deutliche Unterschiede bezüglich der Aktivierung von T-Lymphocyten zur PBS-Kontrolle nachgewiesen werden konnten, so konnte trotzdem wegen fehlender signifikanter Unterschiede zu Leervektor-tragenden Hefezellen keine aussagekräftige Schlussfolgerung aus diesen Versuchen gezogen werden.

Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neuartiger „nano-in-micro“ Carrier durch Komplexierung von Hefezellen und Nanopartikeln etabliert. Die Charakterisierung der Interaktion von unterschiedlichen Hefegattungen mit cNP bestätigte den Einfluss der Ionenstärke im umgebenden Medium auf die elektrostatische Anziehung zwischen Hefen und positiv geladenen Nanopartikeln. Die stärkste Wechselwirkung mit cNP zeigten in diesen Experimenten der *S. cerevisiae* Stamm BY4742 und der *P. pastoris* Stamm GS115. Je nach Wahl der Partikelkonzentration konnte hier entweder eine Internalisierung oder eine Akkumulation der cNP an der Hefezellwand erreicht werden. Außerdem konnte neben einer Beeinträchtigung der Membranintegrität bei Verwendung hoch konzentrierter cNP in hypotoner Lösung auch ein toxischer Effekt auf die Hefezellen festgestellt werden.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von cNP/Hefe-Komplexen ein zielgerichtetes Delivery in Makrophagen erreicht werden kann, welches die Effizienz reiner cNP deutlich übersteigt und gleichzeitig eine Agglomeration der Partikel vollkommen verhindert.

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Eignung von Hefen als effizientes Deliveryvehikel für ein Targeting phagozytischer Zellen und bieten außerdem eine Grundlage für verschiedene Optimierungsmöglichkeiten des bereits etablierten Systems. Weiterhin eröffnet die Verwendung von cNP/Hefe-Komplexen völlig neue Möglichkeiten, da durch den Einsatz von Nanopartikeln ein deutlich breiteres Wirkungsspektrum im Hefe-basierten Delivery-System angewandt und mit der Expression diverser Proteine kombiniert werden kann.

Literaturverzeichnis

- Ada, G.L., Blanden, R.V. (1994). CTL immunity and cytokine regulation in viral infection. *Res Immunol.* 145, 625-629.
- Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 392, 86-89.
- Amidi, M., van Helden, M.J., Tabataei, N.R., de Goede, A.L., Schouten, M., de Bot, V., Lanzi, A., Gruters, R.A., Rimmelzwaan, G.F., Sijts, A.J., Mastrobattista, E. (2012). Induction of humoral and cellular immune responses by antigen-expressing immunostimulatory liposomes. *J Control Release.* 164, 323-330.
- Amoozgar, Z., Goldberg, M.S. (2015). Targeting myeloid cells using nanoparticles to improve cancer immunotherapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 91, 38-51.
- Ardiani, A., Higgins, J.P., Hodge, J.W. (2010). Vaccines based on whole recombinant cells. *FEMS Yeast Research.* 10, 1060-1069.
- Audibert, F.M., Lise, L.D. (1993). Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. *Immunol Today.* 14, 281-284.
- Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A., Kopf, M. (1999): Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol.* 29, 291-299.
- Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392, 245-252.
- Barr, E., Tamms, G. (2007). Quadrivalent Human Papillomavirus Vaccine. *Clin Infect Dis.* 45, 609-617.
- Bartlett, D.W., Su, H., Hildebrandt, I.J., Weber, W.A., Davis, M.E. (2007). Impact of tumorspecific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality *in vivo* imaging, *PNAS.* 104, 15549-15554.
- Bates, J.T., Uematsu, S., Akira, S., Mizel S.B. (2009). Direct stimulation of tlr5+/+CD11c cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J Immunol.* 182, 7539-7547.
- Bazan, S.B. (2011). Comparative study of using different yeast genera as vehicles for protein delivery to antigen-presenting cells. *Dissertation, Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.*
- Bazan, S.B., Breinig, T., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2014). Heat treatment improves antigen-specific T cell activation after protein delivery by several but not all yeast genera. *Vaccine.* 32, 2591-2598.

- Bazan, S.B., Geginat, G., Breinig, T., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2011). Uptake of various yeast genera by antigen-presenting cells and influence of subcellular antigen localization on the activation of ovalbumin-specific CD8 T lymphocytes. *Vaccine*. 29, 8165-8173.
- Bazan, S.B., Walch-Rückheim, B., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2018). Maturation and cytokine pattern of human dendritic cells in response to different yeasts. *Med Microbiol Immunol*. 207, 75-81.
- Beier, R., Gebert, A. (1998). Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am J Physiol*. 275, G130-137.
- Ben-Yedidia, T., Tarrab-Hazdai, R., Schechtman, D., Arnon, R. (1999). Intranasal administration of synthetic recombinant peptide-based vaccine protects mice from infection by *Schistosoma mansoni*. *Infect Immun*. 67, 4360-4366.
- Bernstein, M.B., Chakraborty, M., Wansley, E.K., Guo, Z., Franzusoff, A., Mostbock, S., Sabzevari, H., Schlom, J., Hodge, J.W. (2008). Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CEA) as a potent activator of murine dendritic cells. *Vaccine*. 26, 509-521.
- Bevan, M.J. (1976). Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming. *J Immunol*. 117, 2233-2238.
- Bilusic, M., Heery, C.R., Arlen, P.M., Rauckhorst, M., Apelian, D., Tsang, K.Y., Tucker, J.A., Jochems, C., Schlom, J., Gulley, J.L., Madan, R.A. (2014). Phase I trial of a recombinant yeast-CEA vaccine (GI-6207) in adults with metastatic CEA-expressing carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 63, 225-234.
- Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7, 1513-1523.
- Biswas, S.K., Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol*. 11, 889-896.
- Boder, E.T., Wittrup, K.D. (1997). Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*. 15, 553-557.
- Brannon-Peppas, L., Blanchette, J.O. (2004). Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev*. 56, 1649-1659.
- Breinig, F., Heintel, T., Schumacher, A., Meyerhans, A., Schmitt M.J. (2003). Specific activation of CMV-primed human T lymphocytes by cytomegalovirus pp65 expressed in fission yeast. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 38, 231-239.
- Brinkman, M., Walter, J., Jenness, I., Neugebauer, M., Bertling, W., Grein, S., Thies, M., Weigand, M., Beyer, T., Herrmann, M. (2004). Recombinant Murine Polyoma Virus-like-particles Induce Protective Antitumour Immunity. *Lett Drug Des Discov*. 1, 137-147.

- Brown, G.D., Gordon, S. (2001). Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature*. 413, 36-37.
- Brown, S., Pistiner, J., Adjei, I., Sharma, B. (2019). Nanoparticle properties for delivery to cartilage: the implications of disease state, synovial fluid, and off-target uptake. *Mol Pharm*. 16, 469-479.
- Bucarey, S.A., Noriega, J., Reyes, P., Tapia, C., Sáenz, L., Zuñiga, A., Tobar, J.A. (2009): The optimized capsid gene of porcine circovirus type 2 expressed in yeast forms virus-like particles and elicits antibody responses in mice fed with recombinant yeast extracts. *Vaccine*. 27, 5781-5790.
- Burdelya, L.G., Krivokrysenko, V.I., Tallant, T.C., Strom, E., Gleiberman, A.S., Gupta, D., Kurnasov, O.V., Fort, F.L., Osterman, A.L., Didonato, J.A., Feinstein, E., Gudkov, A.V. (2008). An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science*. 320, 226-230.
- Calvin, N.M., Hanawalt, P.C. (1988). High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J Bacteriol*. 170, 2796-2801.
- Caras, I., Tucureanu, C., Lerescu, L., Pitica, R., Melinceanu, L., Neagu, S., Salageanu, A. (2011). Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: in vitro models of macrophage-tumor environment interaction. *Tumori*. 97, 647-654.
- Cegnar, M., Premzl, A., Zavasnik-Bergant, V., Kristl, J., Kos, J. (2004). Poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as a carrier system for delivering cysteine protease inhibitor cystatin into tumor cells. *Exp Cell Res*. 301, 223-231.
- Ciacchi-Woolwine, F., Blomfield, I.C., Richardson, S.H., Mizel, S.B. (1998). Salmonella flagellin induces tumor necrosis factor alpha in a human promonocytic cell line. *Infect Immun*. 66, 1127-1134.
- Critchley-Thorne, R.J., Stagg, A.J., Vassaux, G. (2006). Recombinant *Escherichia coli* expressing invasin targets the Peyer's patches: the basis for a bacterial formulation for oral vaccination. *Mol Ther*. 14, 183-191.
- Dalglish, A.D. (1992). Immunotherapy of AIDS. *Curr Opin Biotechnol*. 3, 650-655.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res*. 16, 6127-6145.
- Fenner, F. (1982). A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev Infect Dis*. 4, 916-930.
- Fenner, F., Henderson, D.A., Arita, I., Jezek, Z., Ladnyi, I.D. (1988). Early efforts at control: variolation, vaccination and isolation and quarantine. *History of International Public Health*. 6, 245-276.
- Fong, L., Engleman, E.G. (2000). Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol*. 18, 245-273.

- Fornaguera, C., Dols-Perez, A., Calderó, G., García-Celma, M.J., Camarasa, J., Solans, C. (2015). PLGA nanoparticles prepared by nano-emulsion templating using low-energy methods as efficient nanocarriers for drug delivery across the blood–brain barrier. *J Control Release*. 211, 134-143.
- Franzusoff, A., Duke, R.C., King, T.H., Lu, Y., Rodell, T.C. (2005). Yeasts encoding tumour antigens in cancer immunotherapy. *Expert Opin Biol Ther*. 5, 565-575.
- Froelich, C.J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G.M., Bleackley, R.C., Dixit, V.M., Hanna, W. (1996). New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J Biol Chem*. 271, 29073-29079.
- Gardlik, R., Palffy, R., Hodosy, J., Lukacs, J., Turna, J., Celec, P. (2005). Vectors and delivery systems in gene therapy. *Med Sci Monit*. 11, 110-121.
- Gebert, A. (1997). The role of M cells in the protection of mucosal membranes. *Histochem Cell Biol*. 108, 455-470.
- Gordon, S., Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev Immunol*. 5, 953-964.
- Grela, E., Ząbek, A., Grabowiecka, A. (2015). Interferences in the Optimization of the MTT Assay for Viability Estimation of *Proteus mirabilis*. *Med Biotech*. 7, 159-167.
- Hamdy, S., Haddadi, A., Hung, R.W., Lavasanifar, A. (2011). Targeting dendritic cells with nano-particulate PLGA cancer vaccine formulations. *Adv Drug Deliv Rev*. 63, 943-55.
- Hanna, C., Volker, S., Fred, Z., Susanna, E., Martine, D., Paul, W. (2009). A combined measles, mumps, rubella and varicella vaccine (Priorix-TetraTM): Immunogenicity and safety profile. *Vaccine*. 27, 6504-6511.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. 410, 1099-1103.
- Hess, J., Miko, D., Catic, A., Lehmsiek, V., Russell, D.G., Kaufmann, S.H. (1998). *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin strains secreting listeriolysin of *Listeria monocytogenes*. *PNAS*. 95, 5299-5304.
- Hill, J.E., Myers, A.M, Koernery, T.J., Tzagoloff, A. (1986). Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*. 2, 163-167.
- Hiltbold, E.M., Roche, P.A. (2002). Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr Opin Immunol*. 14, 30-35.

- Hirai, H., Satoh, E., Osawa, M., Inaba, T., Shimazaki, C., Kinoshita, S., Nakagawa, M., Mazda, O., Imanishi, J. (1997). Use of EBV-based vector/ HVJ-liposome complex vector for targeted gene therapy of EBV-associated neoplasms. *Biochem Biophys Res Commun.* 241, 112-118.
- Hoppstädter, J., Hachenthal, N., Valbuena-Perez, J.V., Lampe, S., Astanina, K., Kunze, M.M., Bruscoli, S., Riccardi, C., Schmid, T., Diesel, B., Kiemer, A.K. (2016). Induction of Glucocorticoid-induced Leucine Zipper (GILZ) Contributes to Anti-inflammatory Effects of the Natural Product Curcumin in Macrophages. *J Biol Chem.* 291, 22949-22960.
- Hoppstädter, J., Seif, M., Dembek, A., Cavelius, C., Huwer, H., Kraegeloh, A., Kiemer, A.K. (2015). M2 polarization enhances silica nanoparticle uptake by macrophages. *Front Pharmacol.* 6, 55.
- Howland, S.W., Wittrup, K.D. (2008). Antigen release kinetics in the phagosome are critical to cross-presentation efficiency. *J Immunol.* 180, 1576-1583.
- Hristodorov, D., Mladenov, R., Huhn, M., Barth, S., Thepen, T. (2012). Macrophage-targeted therapy: CD64-based immunotoxins for treatment of chronic inflammatory diseases. *Toxins.* 4, 676-694.
- Huang, Y., Liu, X., Dong, L., Liu, Z., He, X., Liu, W. (2011). Development of Viral Vectors for Gene Therapy for Chronic Pain. *Pain Res Treat.* 2011, 968218.
- Huleatt, J.W., Jacobs, A.R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E.B., Huang, Y., Song, L., Nakaar, V., Powell, T.J. (2007). Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine.* 25, 763-775.
- Janeway, J.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (2002). Immunologie, 5. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Jatzkewitz, H. (1955). An ein kolloidales Blutplasmaersatzmittel (Polyvinylpyrrolidon) gebundenes Peptamin (glycyl-leucyl-mezcalin) als neuartige Depotform für biologisch aktive Primäre Amine (Mezcalin). *Z Naturforsch. B* 10, 27-31.
- Just, M., Berger, R. (1992). Reactogenicity and immunogenicity of inactivated hepatitis A vaccines. *Vaccine.* 10, S110-S113.
- Kenngott, E.E. (2010). Untersuchungen zum Einsatz Invasinexprimierender Hefezellen als neuartige Impfvehikel zur oralen Applikation. *Diplomarbeit*, Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.
- Kenngott, E.E., Kiefer, R., Schneider-Daum, N., Hamann, A., Schneider, M., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2016). Surface-modified yeast cells: A novel eukaryotic carrier for oral application. *J Control Release.* 224, 1-7.
- Khasa, Y.P., Conrad, S., Sengul, M., Plautz, S., Meagher, M.M., Inan, M. (2011). Isolation of *Pichia pastoris* PIR genes and their utilization for cell surface display and recombinant protein secretion. *Yeast.* 28, 213-226.

- Kirchhelle, A., Frühwein, N., Tobüren, D. (1996). Treatment of persistent diarrhea with *Saccharomyces boulardii*. Results of a prospective investigation. *Fortschr Med.* 114, 136-140.
- Krähenbühl, O., Tschopp, J. (1990). Involvement of granule proteins in T-cell-mediated cytotoxicity. *Nat Immun Cell Growth Regul.* 9, 274-82.
- Krysko, O., Holtappels, G., Zhang, N., Kubica, M., Deswarte, K., Derycke, L., Claeys, S., Hammad, H., Brusselle, G.G., Vandenabeele, P., Krysko, D.V., Bachert, C. (2011). Alternatively activated macrophages and impaired phagocytosis of *S. aureus* in chronic rhinosinusitis. *Allergy.* 66, 396-403.
- Kulkarni, R.K., Moore, E.G., Hegyeli, A.F., Leonard, F. (1971). Biodegradable Poly(lactic acid) Polymers. *J Biomed Mater Res.* 5, 169-181.
- Kulkarni, R.K., Pani, K.C., Neuman, C., Leonard, F. (1966). Polylactic Acid for Surgical Implants. *Arch Surg.* 93, 839-843.
- Kumar, R., Mohapatra, S.S., Kong, X., Jena, P.K., Bakowsky, U., Lehr, C.M. (2004). Cationic poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles as efficient *in vivo* gene transfection agents. *J Nanosci Nanotechnol.* 4, 990-994.
- Lankoff, A., Sandberg, W.J., Wegierek-Ciuk, A., Lisowska, H., Refsnes, M., Sartowska, B., Schwarze, P.E., Meczynska-Wielgosz, S., Wojewodzka, M., Kruszewski, M. (2012). The effect of agglomeration state of silver and titanium dioxide nanoparticles on cellular response of HepG2, A549 and THP-1 cells. *Toxicol Lett.* 208, 197-213.
- Lee, L.H., Burg, E. 3rd, Baqar, S., Bourgeois, A.L., Burr, D.H., Ewing, C.P., Trust, T.J., Guerry, P. (1999). Evaluation of a truncated recombinant flagellin subunit vaccine against *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun.* 67, 5799-5805.
- Lennon-Dumenil, A.M., Bakker, A.H., Wolf-Bryant, P., Ploegh, H.L., Lagaudriere-Gesbert, C. (2002). A closer look at proteolysis and MHC- class-II-restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol.* 14, 15-21.
- Leung, K.N., Ada, G.L. (1982). Different functions of subsets of effector T cells in murine influenza virus infection. *Cell Immunol.* 67, 312-324.
- Li, F., Zhou, X., Qin, W., Wu, J. (2001). Full-length cloning and 3'-terminal portion expression of human perforin cDNA. *Clin Chim Acta.* 313, 125-131.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25, 677-686.
- Martinez, F.O., Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports.* 6, 1-13.
- Masson, D., Tschopp, J. (1985). Isolation of a lytic, pore-forming protein (perforin) from cytolytic T-lymphocytes. *J Biol Chem.* 260, 9069-9072.

- Mauel, J., Defendi, V. (1971). Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40. *J Exp Med.* 134, 335-350.
- Mellman, I., Steinman, R.M. (2001). Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 106, 255-258.
- Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E., Bader, M.W., Miller, S.I., Aderem, A. (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin-1b via Ipaf. *Nat Immunol.* 7, 569-575.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 Macrophages and the Th1/Th2 Paradigm. *J Immunol.* 164, 6166-6173.
- Mir, M., Ahmed, N., Rehman, A.U. (2017). Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 159, 217-231.
- Miyazaki, J., Kuriyama, Y., Miyamoto, A., Tokumoto, H., Konishi, Y., Nomura, T. (2014). Adhesion and internalization of functionalized polystyrene latex nanoparticles toward the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Powder Technol.* 25, 1394-1397.
- Mizel, S.B., Bates J.T. (2010). Flagellin as an Adjuvant: Cellular Mechanisms and Potential. *J Immunol.* 185, 5677-5682.
- Modrow, S., Falke, D., Truyen, U., Schätzl, H. (2010). Molekulare Virologie, 3. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J.C., Butcher, G.W., Hämmerling, G.J., Neefjes, J.J. (1994). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature.* 367, 648-651.
- Morrison, L.A., Lukacher, A.E., Braciale, V.L., Fan, D.P., Braciale, T.J. (1986). Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones. *J Exp Med.* 163, 903-921.
- Mosser, D.M. and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 8, 958-969.
- Murray, P.J., Wynn, T.A. (2011). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 11, 723-737.
- Nafee, N., Taetz, S., Schneider, M., Schaefer, U.F., Lehr, C.M. (2007). Chitosan-coated PLGA nanoparticles for DNA/RNA delivery: effect of the formulation parameters on complexation and transfection of antisense oligonucleotides. *Nanomedicine.* 3, 173-183.
- Neefjes, J.J., Momburg, F., Hammerling, G.J. (1993). Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science.* 261, 769-771.
- Neutra, M.R., Kozlowski, P.A. (2006). Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol.* 6, 148-158.

- Newman, S.L., Holly, A. (2001). *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun.* 69, 6813-6822.
- Nichols, W.W., Ledwith, B.J., Manam, S.V., Troilo, P.J. (1995). Potential DNA vaccine integration into the host cell genome. *Ann N Y Acad Sci.* 772, 30-39.
- Nomura, T., Miyazaki, J., Miyamoto, A., Kuriyama, Y., Tokumoto, H., Konishi, Y. (2013). Exposure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to functionalized polystyrene latex nanoparticles: influence of surface charge on toxicity. *Environ Sci Technol.* 47, 3417-23.
- Ojo, L.R., O'Loughlin, R.E., Cohen, A.L., Loo, J.D., Edmond, K.M., Shetty, S.S., Bear, A.P., Privor-Dumm, L., Griffiths, U.K., Hajjeh, R. (2010). Global use of *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccine. *Vaccine.* 28, 7117-7122.
- Pamer, E., Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol.* 16, 323-358.
- Pascolo, S. (2008). Vaccination with Messenger RNA (mRNA). *Handb Exp Pharmacol.* 183, 221-35.
- Pasteur, L. (1880). De l'attenuation du virus du cholera des poules. *CR Acad Sci Paris.* 91, 673-680.
- Phelan, M.C. (2007). Techniques for mammalian cell tissue culture. *Curr Protoc Neurosci.* Appendix 3, Appendix 3B.
- Pipkin, M.E., Lieberman, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol.* 19, 301-308.
- Plotkin, S.A., Orenstein, W.A., Offit, P.A. (2008). Vaccines, 5. Auflage, *Elsevier Health Sciences*, Philadelphia, USA.
- Podack, E.R., Konigsberg, P.J. (1984). Cytolytic T cell granules. Isolation, structural, biochemical, and functional characterization. *J Exp Med.* 160, 695-710.
- Poland, G.A., Jacobson, R.M. (2004). Clinical practice: prevention of hepatitis B with the hepatitis B vaccine. *N Engl J Med.* 351, 2832-2838.
- Qadir, A., Gao, Y., Suryaji, P., Tian, Y., Lin, X., Dang, K., Jiang, S., Li, Y., Miao, Z., Qian, A. (2019). Non-Viral Delivery System and Targeted Bone Disease Therapy. *Int J Mol Sci.* 20, 565-585.
- Ravi Kumar, M.N., Bakowsky, U., Lehr, C.M. (2004). Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers. *Biomaterials.* 25, 1771-1777.
- Reinartz, S., Schumann, T., Finkernagel, F., Wortmann, A., Jansen, J.M., Meissner, W., Krause, M., Schwörer, A.M., Wagner, U., Müller-Brüsselbach, S., Müller, R. (2014). Mixed-polarization phenotype of ascites-associated macrophages in human ovarian carcinoma: correlation of CD163 expression, cytokine levels and early relapse. *Int J Cancer.* 134, 32-42.

- Reis e Sousa, C., Stahl, P.D., Austyn, J.M. (1993). Phagocytosis of antigens by Langerhans cells *in vitro*. *J Exp Med.* 178, 509-519.
- Rey-Giraud, F., Hafner, M., Ries, C.H. (2012). *In vitro* generation of monocyte- derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS One.* 7, e42656.
- Ribeiro, S., Hussain, N., Florence, A.T. (2005). Release of DNA from dendriplexes encapsulated in PLGA nanoparticles. Selected contributions from the 5th European Workshop on Particulate Systems. *Int J Pharm.* 298, 354-360.
- Ridge, J.P., Di Rosa, F., Matzinger, P.A. (1998). Conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 393, 474-478.
- Rietscher, R., Schröder, M., Janke, J., Czaplewska, J., Gottschaldt, M., Scherließ, R., Hanefeld, A., Schubert, U.S., Schneider, M., Knolle, P.A., Lehr, C.M. (2016). Antigen delivery via hydrophilic PEG-b-PAGE-b-PLGA nanoparticles boosts vaccination induced T cell immunity. *Eur J Pharm Biopharm.* 102, 20-31.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol.* 1, 362-368.
- Rush, C., Mitchell, T., Garside, P. (2002). Efficient priming of CD4⁺ and CD8⁺ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways. *J Immunol.* 169, 4951-4960.
- Sakaguchi, S. (2003). The origin of *FOXP3*-expressing CD4⁺ regulatory T cells: thymus or periphery. *J Clin Invest.* 112, 1310-1312.
- Salman, H.H., Irache, J.M., Gamazo C. (2009). Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine.* 27, 4784-4790.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *PNAS.* 74, 5463-5467.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandevent, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D., Seubert, P. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature.* 400, 173-177.
- Schmitt, M.J., Tipper, D.J. (1995). Sequence of the M28 dsRNA: preprotoxin is processed to an α/β heterodimeric protein toxin. *Virology.* 213, 341-351.
- Schwartz, R.N. (1984). The role of gene products of the major histocompatibility complex in T cell activation and cellular interactions. In *Fundamental Immunology*. W.E. Paul, editor. Raven Press, New York, 385-392.

- Seif, M., Hoppstädter, J., Breinig, F., Kiemer, A. (2017). Yeast-mediated mRNA delivery polarizes immuno-suppressive macrophages towards an immuno-stimulatory phenotype. *Eur J Pharm Biopharm.* 117, 1-13.
- Seif, M., Philippi, A., Breinig, F., Kiemer, A.K., Hoppstädter, J. (2016). Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) polarizes both M-CSF and GM-CSF-differentiated macrophages toward an M1-like phenotype. *Inflammation.* 39, 1690-1703.
- Shedlock, D.J., Weiner, D.B. (2000). DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol.* 68, 793-806.
- Shresta, S., Pham, C.T., Thomas, D.A., Graubert, T.A., Ley, T. J. (1998). How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Op Immunol.* 10, 581-587.
- Silva, J.M., Zupancic, E., Vandermeulen, G., Oliveira, V.G., Salgado, A., Videira, M., Gaspar, M., Graca, L., Pr at, V., Florindo, H.F. (2015). *In vivo* delivery of peptides and Toll-like receptor ligands by mannose-functionalized polymeric nanoparticles induces prophylactic and therapeutic anti-tumor immune responses in a melanoma model. *J Control Release.* 198, 91-103.
- Simizu, B., Abe, S., Yamamoto, H., Tano, Y., Ota, Y., Miyazawa, M., Horie, H., Satoh, K., Wakabayashi, K. (2006). Development of inactivated poliovirus vaccine derived from Sabin strains. *Biologicals.* 34, 151-154.
- Simonet, M., Fortineau, N., Beretti, J.L., Berche, P. (1994). Immunization with live aroA recombinant *Salmonella typhimurium* producing invasins inhibits intestinal translocation of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun.* 62, 863-867.
- Soto, E.R., Caras, A.C., Kut, L.C., Castle, M.K., Ostroff, G.R. (2012). Glucan Particles for Macrophage Targeted Delivery of Nanoparticles. *J Drug Deliv.* 2012, 1-13.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 176, 287-92.
- Stubbs, A.C., Martin, K.S., Coeshott, C., Skaates, S.V., Kuritzkes, D.R., Bellgrau, D., Franzusoff, A., Duke, R.C., Wilson, C.C. (2001). Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nat Med.* 7, 625-629.
- Sumita, T., Yoko-o, T., Shimma, Y., Jigami, Y. (2005). Comparison of cell wall localization among Pir family proteins and functional dissection of the region required for cell wall binding and bud scar recruitment of Pir1p. *Eukaryot Cell.* 4, 1872-1881.
- Suzuki, I., Hashimoto, K., Ohno, N., Tanaka, H., Yadomae, T. (1989). Immunomodulation by orally administered beta-glucan in mice. *Int J Immunopharmacol.* 11, 761-769.
- Synnott, A., Ohshima, K., Nakai, Y., Tanji, Y. (2009). IgA response of BALB/c mice to orally administered *Salmonella typhimurium* flagellin-displaying T2 bacteriophages. *Biotechnol Prog.* 25, 552-558.

- Tahara, K., Samura, S., Tsuji, K., Yamamoto, H., Tsukada, Y., Bando, Y., Tsujimoto, H., Morishita, R., Kawashima, Y. (2011). Oral nuclear factor- κ B decoy oligonucleotides delivery system with chitosan modified poly(d,l-lactide-co-glycolide) nanospheres for inflammatory bowel disease. *Biomaterials*. 32, 870-878.
- Tarahomjoo, S. (2014). Utilizing bacterial flagellins against infectious diseases and cancers. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 105, 275-288.
- Thiery, J., Keefe, D., Boulant, S., Boucrot, E., Walch, M., Martinvalet, D., Goping, I.S., Bleackley, R.C., Kirchhausen, T., Lieberman, J. (2011). Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nature Immunol.* 12, 770-777.
- Timmerman, J.M., Levy, R. (1999). Dendritic Cell Vaccines for Cancer Immunotherapy. *Annu Rev Med.* 50, 507-529.
- Toda, S., Ishii, N., Okada, E., Kusakabe, K.I., Arai, H., Hamajima, K., Gorai, I., Nishioka, K., Okuda, K. (1997). HIV-1-specific cell-mediated immune responses induced by DNA vaccination were enhanced by mannan-coated liposomes and inhibited by anti-interferon-gamma antibody. *Immunology*. 92, 111-117.
- Toussaint, H. (1881). Vaccinations charbonneuses. Association française pour l'avancement des sciences: Compte rendu de la 9e session, 1021–1025.
- Trimaille, T., Pichot, C., Delair, T. (2003). Surface functionalization of poly(D,L lactic acid) nanoparticles with poly(ethylenimine) and plasmid DNA by the layer-by-layer approach. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp.* 221, 39-48.
- Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T., Tada, K. (1980). Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer*. 26, 171-176.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., Hoeve, M.A., Kramer, M., Vaisberg, E., Kastelein, R., Kolk, A., de Waal-Malefyt, R., Ottenhoff, T.H.M. (2004). Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *PNAS*. 101, 4560–4565.
- Verreck, F.A.W., de Boer, T., Langenberg, D.M.L., van der Zanden, L., Ottenhoff, T.H.M. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN- γ - and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol.* 79, 285–293.
- Vila, A., Sánchez, A., Tobío, M., Calvo, P., Alonso, M.J. (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *J Control Release*. 78 15–24.
- Voskoboinik, I., Thia, M.C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M.J., Trapani, J.A. (2005). Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J Biol Chem*. 280, 8426-8434.

- Vyas, J.M., Van der Veen, A.G., Ploegh, H.L. (2008). The known unknowns of antigen processing and presentation. *Nature Rev Immunol.* 8, 607-618.
- Wagner, P., Grimaldi, M., Jenkins, J.R. (1993). Putative dehydrogenase tms1 suppresses growth arrest induced by a p53 tumour mutant in fission yeast. *Eur J Biochem.* 217, 731-736.
- Walch, B. (2009). „Delivery“ funktioneller Nukleinsäuren in Antigen-präsentierende Säugerzellen mittels rekombinanter Hefen. *Dissertation, Molekular- und Zellbiologie, Universität des Saarlandes.*
- Walch, B., Breinig, T., Geginat, G., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2011). Yeast-based protein delivery to mammalian phagocytic cells is increased by coexpression of bacterial listeriolysin. *Microbes Infect.* 13, 908-913.
- Walch, B., Breinig, T., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2012). Delivery of functional DNA and messenger RNA to mammalian phagocytic cells by recombinant yeast. *Gene Ther.* 19, 237-245.
- Walch-Rückheim, B., Kiefer, R., Geginat, G., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2016). Coexpression of human perforin improves yeast-mediated delivery of DNA and mRNA to mammalian antigen-presenting cells. *Gene Ther.* 23, 103-107.
- Walch-Rückheim, B., Schmitt, M.J., Breinig, F. (2014). *Schizosaccharomyces pombe*: A novel transport vehicle of functional DNA and mRNA into mammalian antigen-presenting cells. *Vaccine.* 32, 6029-6033.
- Wang, B.Z., Quan, F.S., Kang, S.M., Bozja, J., Skountzou, I., Compans, R.W. (2008). Incorporation of membrane-anchored flagellin into influenza virus-like particles enhances the breadth of immune responses. *J Virol.* 82, 11813-11823.
- Weaver, C.T., Harrington, L.E., Mangan, P.R., Gavrieli, M., Murphy, K.M. (2006). Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity.* 24, 677-688.
- Woodrow, K.A., Bennett, K.M. Lo, D.D. (2012). Mucosal vaccine design and delivery. *Annu Rev Biomed Eng.* 14, 17-46.
- Zahirović, A., Lunder, M. (2018). Microbial Delivery Vehicles for Allergens and Allergen-Derived Peptides in Immunotherapy of Allergic Diseases. *Front Microbiol.* 9, 1449.
- Zinkernagel, R.M., Doherty, P.C. (1979). MHC-restricted cytotoxic T cells: studies on the biological role of polymorphic major transplantation antigens determining T cell restriction specificity, function, and responsiveness. *Adv Immunol.* 27, 51-177.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Frank Breinig für die Vergabe dieses interessanten und herausfordernden Themas und die damit verbundene Ermöglichung meiner Promotion danken. Vielen Dank für Dein unerschütterliches Vertrauen und Deine Unterstützung sowie stete Diskussionsbereitschaft. Außerdem danke ich Prof. Dr. Manfred J. Schmitt für sein stets entgegengebrachtes Interesse an meinen Experimenten während seiner Zeit als Lehrstuhlleiter, aber auch darüber hinaus. Ein besonders großes Dankeschön geht auch an Prof. Dr. Marc Schneider für die Übernahme des Zweitgutachtens und die überaus gewinnbringende Kooperation im Bereich Nanopartikel. Danke für Ihre Unterstützung sowohl durch Bereitstellung der Partikel als auch durch hilfreiche Anregungen und Ratschläge.

Ein weiterer Dank geht an meine Kooperationspartner, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Prof. Dr. Markus Bischoff, Priv.-Doz. Dr. Christoph Beisswenger und Anja Honecker für die Unterstützung bei den Immunisierungsversuchen, Marijas Jurisic für die Herstellung der PLGA-Partikel, Dr. Marcus Koch für die Durchführung der elektronenmikroskopischen Analyse, Prof. Dr. Alexandra Kiemer und Charlotte Dahlem für die Kooperation bezüglich der Kokulturversuche, Barabara Walch-Rückheim für die Zusammenarbeit im Perforin-Projekt und Elisabeth Kenngott, die die *in vivo* Versuche zur oralen Applikation von Hefezellen ermöglicht hat.

Ein großes Dankeschön geht natürlich an die gesamte Arbeitsgruppe der Molekular- und Zellbiologie für die angenehme Zusammenarbeit und das freundschaftliche Betriebsklima. Insbesondere danke ich Nicole Jundel für ihre Hilfe bei verwaltungstechnischen Fragen und die Unterstützung durch ihre herzlichen und aufmunternden Worte. Ein ganz besonderer Dank gilt Andrea Blum und Stefanie Gier für die schönen Mittagspausen und die weit über gewöhnliche Kollegialität hinausgehende seelisch-moralische, aber auch fachliche Unterstützung im Laboralltag. Außerdem möchte ich meinen Studenten Mylène Lanter, Nils Vogel, Rebecca Grosshans, Alexandra Fink, Amélie Ringede und Lisa Horn danken, die mich mit ihren Bachelor- und Masterarbeiten bei der Bearbeitung dieses Themas unterstützt haben.

Ich danke von Herzen meiner Familie und meinen Freunden, die mich während der gesamten Promotion mit viel Verständnis unterstützt haben. Ihr habt immer an mich geglaubt und mich in schwierigen Situationen aufgebaut, was maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat. Dabei geht ein besonderer Dank an meinen Freund Thorsten, der zeitweise am meisten unter meinen Launen leiden musste und mich trotzdem immer mit viel Geduld auf jede erdenkliche Weise unterstützt hat.

Zuletzt danke ich Dimanche und Isimo, für jede willkommene Ablenkung und die erholsamen Auszeiten!

Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, 2019

(Ruth Kiefer)