

Hautklinik

Lehrstuhl für Haut- und Geschlechtskrankheiten

Adresse

Ulmenweg 18
91052 Erlangen
Tel.: +49 9131 8533661
Fax: +49 9131 8536175
www.hautklinik.uk-erlangen.de

Vorstand

Prof. Dr. med. Gerold Schuler

Ansprechpartner

Prof. Dr. med. Andreas Baur
Tel.: +49 9131 8532783
Fax: +49 9131 8536175
andreas.baur@uk-erlangen.de

Forschungsschwerpunkte

- Dendritischen Zellen (DZ) Subpopulationen und T-Zell Antwort
- Impfung mit Dendritischen Zellen (DZ), (insbesondere bei malignem Melanom)
- RNA-Elektroporation zur Verbesserung von Dendritischen-Zell-Vakzinen und zur Herstellung antigenspezifischer T-Zellen
- Signaltransduktion und interzelluläre Kommunikation im Tumor-Mikromilieu

Struktur der Einrichtung

Im Bereich des Lehrstuhls arbeiten über 70 Mediziner und Naturwissenschaftler. Die Forschungsaktivitäten gliedern sich in drei Hauptbereiche, die „Experimentelle Immuntherapie“, die „Tumorbiologie und Signaltransduktion“ sowie den Bereich „Biologie Dendritischer Zellen“ auf. Alle drei Bereiche sind thematisch eng miteinander verknüpft und zielen insbesondere auf eine Verbesserung der Diagnostik und Therapie des malignen Melanoms sowie einem besseren Verständnis des Tumor-Mikromilieus. Im Mittelpunkt steht die Entwicklung und klinische Prüfung innovativer, auf dem Einsatz *ex-vivo* generierter DZ beruhender immunologischer Therapieansätze. Hierzu steht eine GMP-Facility auf dem Gelände der Hautklinik zur Verfügung. Es wurden bereits mehrere klinische Studien mit Peptid-beladenen DZ bei über 200 Melanompatienten durchgeführt. Kürzlich wurde vom BMBF ein Großantrag zur Generierung einer individualisierten Tumorzelle genehmigt. Die Entwicklung dieser DZ-Vakzine der dritten Generation erfolgt in enger Zusammenarbeit mit der Firma Miltenyi sowie dem Helmholtz-Zentrum für Immunologie in München. Einen weiteren Schwerpunkt bildet die molekularbiologisch immunologische

Grundlagenforschung. Hier werden die *ex-vivo* Biologie von humanen DZ und T-Zellen sowie das Tumor-Mikromilieu mit molekularbiologischen Methoden untersucht. Darüber hinaus wurde 2009 eine neue „Toponom“ Arbeitsgruppe etabliert, welche eine neuartige automatisierte Technik zur Polyantigen-Färbung von Geweben aufbaut und testet. Alle Projekte werden überwiegend von Drittmitteln finanziert, darunter der SFB643 „Strategien der zellulären Immunintervention“, welcher von der Hautklinik aus geleitet wird.

Forschung

Dendritischen Zellen (DZ) Subpopulationen und T-Zell Antwort

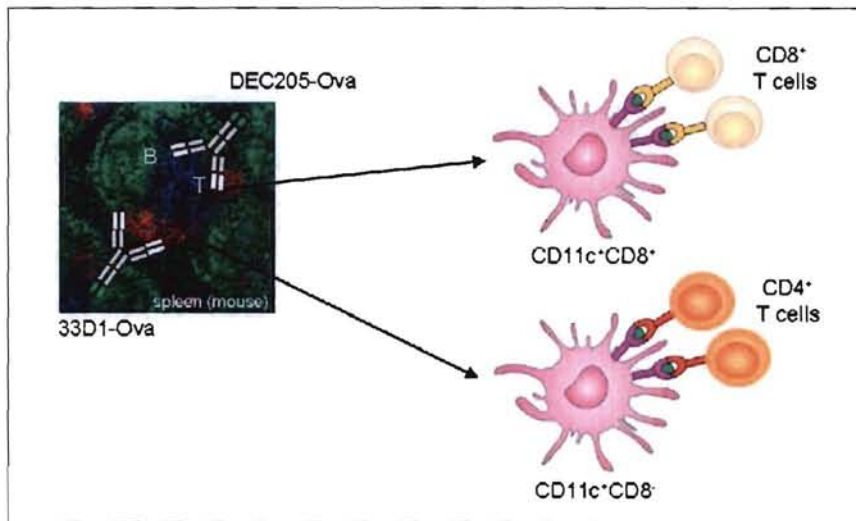
Die Emmy-Noether und BayGene Nachwuchsgruppe von Prof. Dudziak beschäftigt sich mit der Charakterisierung von Dendritischen Zellsubpopulationen in Maus und Mensch. In Experimenten in der Maus konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass Antigene *in vivo* über Antigen-gekoppelte Antikörper, die gegen C-Typ Lektin- und Endozytose-Rezeptoren auf DCs gerichtet sind, beladen werden können. Abhängig von der DC-Subpopulation konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass die T-Zellantwort stark beeinflusst werden kann. Dies zeigte sich insbesondere darin, dass die Antigenpräsentation über CD11c+CD8- DCs eher zu einer CD4 T-Zellantwort führte und die Antigenpräsentation über CD11c+CD8+ DCs eine bessere CD8 T-Zellantwort initiierte (Dudziak et al., Science, 2007). Dieser Ansatz erlaubt die Aufrechterhaltung, bzw. Initiation Antigen-spezifischer Toleranz als auch die Induktion von „maßgeschneiderter“ Immunität. In der Arbeitsgruppe um Prof. Dudziak wird derzeit mittels eines Ria-Freifrau-von-Fritsch Preises untersucht, ob die durch *in vivo* Antigen-Beladung von DC-Subpopulationen erzielten Immunantworten stark genug sind, Melanomzellen abzutöten. Andererseits wird in der Arbeitsgruppe daran geforscht, die Strategie der „*in vivo* Antigen Beladung“ in das humane System zu übertragen. Dazu konnte bereits erfolgreich ein Protokoll zur Gewinnung von humanen Zellen als Einzelzellsuspension aus dem Gewebe etabliert werden. Mittels konfokaler Mikroskopie, FACS, Zellsortierung und Microarray konnten distinkte DC-Subpopulationen aus dem Gewebe charakterisiert werden. Mit Hilfe der neu identifizierten Endozytose-Rezeptoren werden Antigen-gekoppelte Antikörper hergestellt, die vorerst in *in vitro* T-Zellstimulationsexperimen-

ten getestet werden sollen. Unsere Ergebnisse werden wichtige Erkenntnisse für das Verständnis von DC-Subpopulationen im humanen Gewebe sowie neue Möglichkeiten in der Tumortherapie in der Klinik erbringen.

Impfung mit Dendritischen Zellen, (insbesondere bei malignem Melanom)

Ziel der Einheit „Experimentelle Immuntherapie“ ist die Entwicklung und klinische Prüfung innovativer immunologischer Therapieansätze insbesondere zur Behandlung maligner Tumoren (Melanom als Modell). Die Therapieansätze beruhen auf dem Einsatz von autologen DZ. Die Produktion der Vakzine erfolgt in spezialisierten Reinraumlaboratorien, dem sogenannten GMP (Good Manufacturing Practice) Standard entsprechend. Der Bereich Experimentelle Immuntherapie war in den Jahren 2007 und 2008 insbesondere mit der Erweiterung der Herstellungserlaubnis (unter Mitwirkung von Dr. Uwe Koch und Dr. Jan Dörrie) für DZ, beladen mit autologer Tumor-RNA, sowie der Vorbereitung einer randomisierten, multizentrischen Phase III Studie für die Indikation Uveamelanom (unter Mitwirkung von Prof. Eckhart Kämpgen) beschäftigt. Zudem wurde in diesem Zeitraum eine klinische Studie durchgeführt, die DZ mit definierter RNA für die Tumorantigene MAGE-3, MelanA und Survivin beladen und zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom eingesetzt hat. Die medizinische Betreuung von Studienpatienten erfolgt in enger Verzahnung mit der Dermatologischen Gruppe um Prof. Dr. Eckhart Kämpgen.

Die RNA-Projektgruppe (Leiter: Dr. Niels Schaft und Dr. Jan Dörrie) verbesserte die RNA-Transfektion als Ansatz, DZ einerseits mit Antigen zu beladen und diese andererseits mit funktionellen Proteinen auszustatten („Designer-DZ“). So wurde ein chimäres E/L-Selektin-Fusionsprotein, das es den DZ erlaubt, nach intravenöser Injektion in die Lymphknoten zu wandern, durch RNA-Elektroporation in die DZ eingebracht. Dieser Ansatz könnte die Effizienz der Impfung verbessern und wird zurzeit klinisch getestet. Darüber hinaus hat die RNA-Gruppe den Transfer von T-Zell-Rezeptoren (TCR) durch RNA-Elektroporation in T-Zellen initiiert. TCR, spezifisch für verschiedene Epitope aus Tumorantigenen (gp100, MAGE-A3, MelanA) oder aus viralen Proteinen (HIV-gag, HIV-pol), wurden erfolgreich in T-Zellen transfiziert.



Antigen targeting to murine Dendritic cell subpopulations in vivo

RNA-Elektroporation zur Verbesserung von Dendritischen-Zell-Vakzinen und zur Herstellung antigenspezifischer T-Zellen

Forschungsbereich 1 zielt auf die Optimierung der Impfung gegen Melanom durch gezielte Modulation der mRNA-transfizierten dendritischen Zellen (DC) ab. Um diese Optimierung zu erreichen wurden zwei Strategien verfolgt. Einerseits wurde die Tumorantigenbeladung von DC mit Hilfe von chimären Proteinkonstrukte verbessert, die aus einem Tumorantigen und einer Bindungskomponente bestehen, die an den Endozytoserezeptor DEC-205 auf den DC bindet. Diese Antigenbeladungsstrategie erwies sich als wirksamer als die Transfektion mit mRNA oder das Pulsen mit Peptid. Andererseits wurde die Immunogenität von DC folgendermaßen verbessert: i) durch Elektroporation von CD40L-kodierender mRNA wurde den DC ein T-Zell-Hilfesignal gegeben, ii) durch Elektroporation von mRNA kodierend für CD70, CD40L und konstitutiv aktiven TLR4 wurden der DC Reifungs- und Hilfe-Signale vermittelt und iii) durch Elektroporation von mRNA kodierend für konstitutiv aktiven Mutanten von Elementen des NfκappaB-Signalweges wurde dieser Signalweg in den DC manipuliert. Alle drei Ansätze führten zu einer deutlichen Verbesserung der Fähigkeit der DC tumorantigen-spezifischen T-Zellen zu stimulieren. Ansatz i) und ii) werden bereits in kleinen klinischen Studien getestet.

Forschungsbereich 2 befasst sich mit der direkten Erzeugung tumorspezifischer T-Zellen, die für die adoptiven Immuntherapie eingesetzt werden können. Die RNA-Gruppe konnte natürliche T-Zell-Rezeptoren (TZR), spezifisch für Tumorantigene und virale Antigene, und chimäre Antigen-Rezeptoren (CAR), spezifisch für Tumorproteine erfolgreich durch RNA-Elektroporation in T-Zellen einbringen. Dadurch wurde die Spezifität dieser Zellen umprogrammiert und sie produzierten Zytokine und lysierten Zielzellen. Darüber hinaus entwickelte die RNA-Gruppe eine schnelle und robuste Methode zur Klonierung und funktionelle Validierung neuer TZR. Die Gruppe bereitet jetzt

den Schritt aus dem Reagenzglas in den Patienten vor.

Signaltransduktion und interzelluläre Kommunikation im Tumor-Mikromilieu

Projektleiter: A. Baur

Die Projektgruppe untersucht und vergleicht neue Formen der interzellulären Kommunikation im Mikromilieu des malignen Melanoms und von HIV-infizierten T-Zellen. Hierbei werden zum einen Zellmembranen und assoziierte Moleküle von einer Zelle auf die andere übertragen (sog. Trogozytose). Zum anderen kommt es durch die Sekretion beziehungsweise Aufnahme von Mikrovesikeln zu einer Übertragung von Zellmaterial und Verbreitung von Effektorfunktionen. Die funktionellen Konsequenzen dieser Protein-Übertragung als auch ihre molekularen Grundlagen sind bislang wenig untersucht. Wir gehen von der Hypothese aus, dass diese Mechanismen in erster Linie dem Tumor „immune-escape“ dienen und zumindest teilweise durch einen spezifischen, MAP Kinase-abhängigen Signalkomplex reguliert werden. Unsere Vorarbeiten zu diesem Projektbereich basieren auf Erkenntnissen, welche im Zusammenhang mit der Erforschung der Funktion des Nef-Proteins von HIV erarbeitet wurden. Demnach führt die Komplexierung eines hnRNPK-abhängigen Signalkomplexes zur Aktivierung von MAP Kinase und zu einer verstärkten Sekretion von Mikrovesikeln, sowie einer Aktivierung von Trogozytose.

Hinsichtlich der Aufklärung der beschriebenen Vorgänge konnten in 2009-2011 deutliche Fortschritte gemacht werden. So ist es uns gelungen, die molekularen Zusammenhänge der Exosomen Sekretion aufzuklären. Demnach handelt es sich um einen Integrin-abhängigen Prozess, an dem die Signalproteine Paxillin, sowie Pak1 und Pak2 wesentlich beteiligt sind (Publikation in Vorbereitung). Auch die Funktion der Mikrovesikel konnte zumindest teilweise aufgeklärt werden. So werden durch den Integrin-abhängigen Prozess aktivierte Metalloproteinasen in die Mikrovesikel geschleust. So ausgerüstet sind die Vesikel in der Lage in rezipi-

enten Zellen eine Proteinase-abhängige Zytokinsekretion auszulösen.

Lehre

Die Mitarbeiter der Klinik unterrichten Studenten der Humanmedizin, Zahnmedizin, Molekularen Medizin und Biologie auf dem Gebiet der Haut- und Geschlechtskrankheiten sowie in molekularer und zellulärer Immunologie inklusive translationaler Applikationen (GMP-Labor). Die Ausbildung findet in Form von Seminaren, praktischen Kursen, Vorlesungen, Laborpraktika, Bachelor-, Master- und Dissertationsarbeiten statt. Die Klinik ist verantwortlicher Organisator von regionalen dermatologischen Fortbildungsreihen für Ärzte. Darüberhinaus koordiniert die Klinik den SFB 643 (Strategien der zellulären Immunintervention).

Ausgewählte Publikationen

Wolf D, Witte V, Clark P, Blume K, Lichtenheld MG, Baur AS (2008) HIV Nef enhances Tat-mediated viral transcription through a hnRNP-K-nucleated signaling complex. *Cell Host Microbe*, 4: 398-408

Birkholz K, Hofmann C, Hoyer S, Schulz B, Harrer T, Kämpgen E, Schuler G, Dörrie J, Schaft N (2009) A fast and robust method to clone and functionally validate T-cell receptors. *J Immunol Methods*, 346: 45-54

Birkholz K, Hombach A, Krätzel K, Reuter S, Kershaw M, Kämpgen E, Schuler G, Abken H, Schaft N, Dörrie J (2009) Transfer of mRNA encoding recombinant immunoreceptors reprograms CD4+ and CD8+ T cells for use in the adoptive immunotherapy of cancer. *Gene Ther*, 16: 596-604

Muratori C, Cavallin LE, Krätzel K, Tinari A, De Milito A, Fais S, D'Aloja P, Federico M, Vullo V, Fomina A, Mesri EA, Superti F, Baur AS (2009) Massive secretion by T cells is caused by HIV Nef in infected cells and by Nef transfer to bystander cells. *Cell Host Microbe*, 6: 218-30

Thomas S, Klobuch S, Heemskerck MHM, Stolle D, Besold K, Plachter B, Schaft N, Theobald M, Voss RH, Herr W (2009) Generation of CMV Specific T Cells From CMV Seronegative Donors by T Cell Receptor RNA Transfer. *Blood*, 114: 1386-1386

Birkholz K, Schwenkert M, Kellner C, Gross S, Fey G, Schuler-Thurner B, Schuler G, Schaft N, Dörrie J (2010) Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation. *Blood*, 116: 2277-85