

**Exogene Expression von CD70 auf humanen Dendritischen Zellen
mittels Elektroporation zur Herstellung einer verbesserten
Tumorvakzine**

Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Ute Weingartz

Kiel
2006

für meine Eltern

Referentin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Frank Kempken

Tag der mündlichen Prüfung

Zum Druck genehmigt:

(Der Dekan)

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität | 1 |
| 1.2 | Zentrale Aufgaben Dendritischer Zellen..... | 2 |
| 1.3 | Kostimulatorische Moleküle der TNFR/TNFRL-Familie | 5 |
| 1.4 | Einsatz von Dendritischen Zellen als Tumorstoffe..... | 7 |
| 1.5 | Antigenbeladung von Dendritischen Zellen durch Elektroporation | 10 |
| 1.6 | Fragestellung:..... | 13 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 14 |
| 2.1 | Geräte und Verbrauchsmaterial..... | 14 |
| 2.2 | Material für molekularbiologische Methoden..... | 15 |
| 2.2.1 | Vektoren..... | 15 |
| 2.2.2 | Restriktionsenzyme | 15 |
| 2.2.3 | Bakterien | 15 |
| 2.2.4 | Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie..... | 15 |
| 2.2.5 | Gele | 16 |
| 2.2.6 | Medien für die Bakterienkultur nach Sambrook und Russell | 18 |
| 2.2.7 | Kits | 18 |
| 2.3 | Molekularbiologische Methoden | 19 |
| 2.3.1 | Restriktionsverdau und mRNA-Herstellung | 19 |
| 2.3.2 | Quantifizierung und Aliquotierung von mRNA | 20 |
| 2.3.3 | <i>In vitro</i> -Polyadenylierung von mRNA..... | 20 |
| 2.3.4 | Umklonierung von EGFP aus pEGFP in pSP73/A64/NotI | 20 |
| 2.3.5 | Klonierung von humanem CD70 | 25 |
| 2.4 | Material für zellbiologische Methoden | 29 |
| 2.4.1 | Zelllinien und Blutpräparate | 29 |
| 2.4.2 | Puffer, Medien und Zusätze | 30 |
| 2.4.3 | Antikörper | 30 |
| 2.5 | Zellbiologische Methoden..... | 31 |
| 2.5.1 | Kultivierung von Zelllinien..... | 31 |
| 2.5.2 | Gewinnung von Leukozyten aus dem Aphereseprodukt | 31 |
| 2.5.3 | Kryokonservierung von Zellen | 32 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.5.4 | Generierung von immaturren Dendritischen Zellen nach Monozytenadhärenz | 32 |
| 2.5.5 | Generierung von immaturren Dendritischen Zellen nach ELUTRA-Separation..... | 33 |
| 2.5.6 | Maturation von Dendritischen Zellen | 33 |
| 2.5.7 | Elektroporation von Dendritischen Zellen..... | 33 |
| 2.5.8 | Separation von CD4-T-Zellen mit MACS-Beads | 37 |
| 2.5.9 | Kokultur von Dendritischen Zellen mit CD4-Zellen | 37 |
| 2.5.10 | Blockierung von CD70 durch einen anti-hCD70mAK..... | 38 |
| 2.6 | Analytik..... | 38 |
| 2.6.1 | Bestimmung der Zellzahl | 38 |
| 2.6.2 | Nachweis von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie.... | 39 |
| 2.6.3 | Nachweis der Zytokinsekretion..... | 40 |
| 3 | ERGEBNISSE | 42 |
| 3.1 | Optimierung der Elektroporationsparameter zur Transfektion von mRNA in Dendritische Zellen | 42 |
| 3.1.1 | Umklonierung von EGFP aus pEGFP in pSP73/A64/NotI zur Herstellung polyadenylierter EGFP-mRNA | 42 |
| 3.1.2 | Bestimmung der optimalen Feldstärke..... | 43 |
| 3.1.3 | Bestimmung der optimalen Pulszeit..... | 46 |
| 3.1.4 | Bestimmung der optimalen mRNA-Konzentration | 49 |
| 3.1.5 | Expression von polyadenylierter und nicht polyadenylierter EGFP-mRNA nach Elektroporation in Dendritische Zellen..... | 50 |
| 3.1.6 | Ergebnisse zur Optimierung der Elektroporation | 51 |
| 3.2 | Klonierung von humanem CD70 | 53 |
| 3.2.1 | Nachweis von CD70 auf BLCL-Zellen..... | 53 |
| 3.2.2 | Reverse Transkription und Klonierung der cDNA-Konstrukte in einen TOPO-Vektor | 54 |
| 3.2.3 | Restriktionsverdau nach Umklonierung der CD70-Konstrukte aus den TOPO-Vektoren in den Vektor pSP73/A64/NotI | 55 |
| 3.2.4 | Membranständige Expression von CD70 nach CD70-mRNA-Transfektion in K562-Zellen..... | 57 |
| 3.3 | RNA-Transfektion von maturaen Dendritische Zellen..... | 58 |
| 3.3.1 | Charakterisierung von zytokinmaturierten Dendritischen Zellen | 58 |
| 3.3.2 | Die Elektroporation erniedrigt nicht die Expression der Maturationsmarker | 60 |
| 3.3.3 | Die Elektroporation selbst induziert nur eine geringe CD70-Expression auf Dendritischen Zellen | 62 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.4 | Einfluss der CD70-Expression auf die Th1-Immunantwort | 63 |
| 3.4.2 | Einfluss der CD70-Expression auf die IFN γ - und IL-4-Sekretion..... | 65 |
| 3.4.3 | IL-12p70- und IL-10-Sekretion nach kognitivem Kontakt..... | 68 |
| 3.4.4 | Expression von endogenem CD70 auf humanen Dendritischen Zellen nach SEB-vermitteltem MHCII/TCR-Kontakt | 70 |
| 4 | DISKUSSION | 72 |
| 4.1 | Optimierung der Elektroporationsparameter zur mRNA-Transfektion von Dendritischen Zellen | 72 |
| 4.2 | Charakterisierung der ELUTRA-Dendritischen Zellen | 76 |
| 4.3 | Abhängigkeit der Transfektionsrate vom Maturationszustand der Dendritischen Zellen | 77 |
| 4.4 | Einfluss der Elektroporation auf die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf zytokinmaturierten Dendritischen Zellen | 78 |
| 4.5 | Auswirkung der CD70-Expression auf die Th1-Immunantwort..... | 79 |
| 4.6 | IL-12p70 und IL-10-Sekretion nach SEB-vermitteltem kognitivem Kontakt | 83 |
| 4.7 | Expression von endogenem CD70 auf humanen Dendritischen Zellen..... | 85 |
| 4.8 | Ausblick | 89 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 90 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|--|
| AK | Antikörper |
| APC | <i>antigen presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zelle |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| BCR | <i>B cell receptor</i> , B-Zellrezeptor |
| BLCL-Zellen | <i>B lymphoblastoide cell-line</i> , B-lymphoblastoide Zelllinie |
| bp | Basenpaare |
| CD | <i>Cluster of Differentiation</i> |
| CD70mDC | mit CD70-mRNA transfizierte DC |
| cDNA | <i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA |
| CIAP | <i>calf intestine alkaline phosphatase</i> , Alkalische Phosphatase |
| CTL | <i>cytotoxic T-cells</i> , zytotoxische T-Zellen |
| DC | <i>dendritic cell</i> , Dendritische Zelle |
| DMF | N,N-Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ddH ₂ O | doppelt destilliertes Wasser |
| EGFP | <i>enhanced green fluorescent protein</i> |
| E-PAP | E. coli Poly-(A)-Polymerase I |
| FB-Mikrotiterplatte | Flachboden-Mikrotiterplatte |
| FITC | Fluorescein-Isothiocyanat |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| GM-CSF | <i>granulocyte macrophage-colony stimulating factor</i> , Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase |
| iDC | <i>immature dendritic cell</i> , unreife Dendritische Zelle |
| IL | Interleukin |
| LMP-Gel | <i>low melting point</i> -Gel, Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| mAK | monoklonaler Antikörper |
| MCS | <i>multiple cloning site</i> , multiple Klonierungsstelle |
| mDC | <i>mature dendritic cell</i> , mature Dendritische Zelle |
| MHC | <i>main histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex |
| MMR | Makrophagen-Mannose-Rezeptor |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------|---|
| NK | natürliche Killerzellen |
| PABPs | <i>poly-(A)-binding proteins</i> , Poly-(A)-bindende Proteine |
| PAMPs | <i>pathogen associated molecular patterns</i> , Pathogen-assoziierte molekulare Muster |
| PBS | <i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion |
| PE | Phycoerythrin |
| PGE ₂ | Prostaglandin-2 |
| RB-Mikrotiterplatte | Rundboden-Mikrotiterplatte |
| RF-Puls | Radiofrequenzpuls |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RT | Raumtemperatur |
| SEB | Staphylokokken Enterotoxin B |
| TC | Tricolor™, Phycoerythrin-Cy5 |
| TCR | <i>T cell receptor</i> , T-Zellrezeptor |
| Th-Zelle | T-Helferzelle |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TNFR | Tumornekrosefaktor-Rezeptor |
| TLR | Toll-like Rezeptor |
| X-Gal | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-β-D-Galaktopyranosid |

1 Einleitung

1.1 Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität

Der Körper des Menschen ist ständig von Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten bedroht. Das Immunsystem dient der Abwehr dieser Pathogene und setzt sich bei Säugern aus dem angeborenen und erworbenen Immunsystem zusammen. Während das angeborene Immunsystem nach Kontakt mit einem Pathogen schnell und unspezifisch reagiert, ist das erworbene, adaptive Immunsystem langsam, besitzt dafür eine sehr hohe Spezifität und kann Gedächtniszellen ausbilden.

Ein Pathogen, das eine hohe Reproduktionsrate besitzt und sich schnell im Körper ausbreitet, kann durch das Zusammenspiel des angeborenen und des erworbenen Immunsystems abgewehrt werden.

So wird z.B. nach Invasion eines Bakteriums in das Gewebe zunächst das unspezifische, angeborene Immunsystem aktiv¹. Lösliche Faktoren des angeborenen Immunsystems wie die Proteine des Komplementsystems, antimikrobielle Peptide wie Defensine oder Lysozym, Akute-Phase-Proteine und Interleukine werden in Reaktion auf das Pathogen aktiviert bzw. freigesetzt. Sie führen zur Anlockung (Chemotaxis) von Phagozyten, bewirken die Erweiterung der Blutgefäße und die Lockerung des Endothelzellverbandes, so dass der Übertritt (Diapedese) von Phagozyten aus dem Blut in das Gewebe erleichtert wird, und können außerdem die Lyse des Bakteriums durch Bildung von Poren erreichen.

Zu den zellulären Bestandteilen des angeborenen Immunsystems zählen neben den natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie den Mastzellen auch die bereits genannten Phagozyten. Hier unterscheidet man neutrophile Granulozyten, die Pathogen sowie Zelldebris aufnehmen (phagozytieren) und so eliminieren. Daneben existieren Monozyten, die nach Übertritt in das Gewebe zu Gewebsmakrophagen differenzieren sowie Dendritische Zellen. Makrophagen und Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) patrouillieren im Gewebe, phagozytieren Pathogene bei Kontakt und präsentieren die prozessierten Antigene den Zellen des erworbenen, adaptiven Immunsystems.

Ziel aller oben erwähnten Faktoren ist es, die Ausbreitung des eingedrungenen Pathogens zu verhindern und das Pathogen möglichst zu eliminieren. Gelingt dies nicht, so werden 4 bis 7 Tage nach Eintritt des Pathogens die Effektoren der

erworbenen Immunität aktiviert. Effektoren des erworbenen Immunsystems sind auf der zellulären Seite die T- und B-Zellen sowie auf der löslichen Seite die Antikörper. So differenzieren CD4-T-Zellen nach Antigenerkennung in T-Helferzellen, die je nach Effektorfunktion T-Helfer-1 (Th1)-Zytokine wie Interferon γ (IFN γ) oder Th2-Zytokine wie Interleukin (IL)-4 und IL-10 ausschütten^{2,3}. Th1-Zellen koordinieren die zelluläre Infektabwehr. So führt die Freisetzung von IFN γ zur Aktivierung von Makrophagen im peripheren Gewebe, die daraufhin in ihren Phagosomen vorliegende intrazelluläre Parasiten und Bakterien abtöten^{4,5}.

Th2-Zellen sind an der Aufrechterhaltung der humoralen Infektabwehr beteiligt und wirken im Zusammenspiel mit B-Zellen⁶. B-Zellen erkennen Antigene spezifisch über den B-Zellrezeptor (BCR) und präsentieren diese nach Internalisierung und Prozessierung. Th2-Zellen erkennen das präsentierte Antigen und induzieren die Teilung der B-Zelle und ihre nachfolgende Differenzierung in Plasmazellen, die den BCR als löslichen Antikörper sezernieren⁷.

Antikörper sind Proteine, die das Pathogen spezifisch erkennen und binden. Durch diese Bindung wird das Pathogen neutralisiert, es kann also schlechter an Zelloberflächen adsorbieren, so dass seine Pathogenität sinkt. Gleichzeitig wird durch die Bindung von Antikörpern an das Pathogen eine Opsonierung, also eine Markierung, erreicht, die es den Phagozyten ermöglicht, die opsonierten Partikel zu erkennen und schneller zu phagozytieren. Ferner führt die Antigen-Antikörper-Bindung erneut zur Aktivierung von Komplement und damit zur Lyse des Bakteriums.

Das Zusammenspiel von angeborener und erworbener Infektabwehr führt in aller Regel schließlich zur Eliminierung des Pathogens innerhalb einiger Wochen.

Neben den vom erworbenen Immunsystem gebildeten Effektorzellen werden gegen die meisten Pathogene B- und T-Gedächtniszellen mit entsprechender Spezifität für das Pathogen gebildet. Bei Zweitkontakt mit dem gleichen Pathogen kann so die erworbene Immunantwort auch nach Jahren umgehend initiiert und das Pathogen schnell abgewehrt werden.

1.2 Zentrale Aufgaben Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen gehören neben Gewebsmakrophagen und B-Zellen zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC), die Einfluss sowohl auf die angeborene wie die erworbene Immunantwort haben⁸.

Ihre zwei zentralen Aufgaben, nämlich die Aufnahme und Präsentation von Antigenen sowie die Aktivierung von T-Zellen, nehmen Dendritische Zellen in zwei verschiedenen Zuständen wahr.

Im immaturren Zustand kann die Zelle durch Endozytose große Mengen von Antigen aufnehmen. Die Endozytose erfolgt dabei durch Pinozytose und Makropinozytose⁹, durch rezeptorvermittelte Phagozytose via Fc-Rezeptor, Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR) oder DEC 205-Rezeptor^{10, 11, 12} oder durch Phagozytose von Mikroben oder apoptotischen Zellen^{13, 14, 15, 16}.

Die für die Endozytose erforderlichen Rezeptoren werden auf immaturren Dendritischen Zellen stark exprimiert. Auch Komplementrezeptoren wie CR(*complement receptor*)⁴, die die Phagozytose stimulieren, werden auf immaturren Dendritischen Zellen exprimiert.

Dendritische Zellen exprimieren zudem zwei verschiedene MHC(*major histocompatibility complex*)-Molekülklassen, MHC Klasse I (MHCI) und MHC Klasse II (MHCII). Die endozytierten Antigene werden unabhängig davon, ob es sich um Antigene aus Körperzellen (Selbst-Antigen) oder um Proteine aus Pathogenen (Nichtselbst-Antigen) handelt, nach Prozessierung im MHC-Kontext präsentiert. Peptide, die aus dem Cytosol der Zelle stammen, werden in MHCI präsentiert. Peptide, die dagegen durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wurden, also aus dem vesikulären Kompartiment der Zelle stammen, werden im (MHCII) präsentiert. Die Präsentation von Peptiden im MHC-Kontext gewährleistet, dass durch die sterische Übereinstimmung des MHC:Peptid-Komplexes der Dendritischen Zelle mit dem T-Zellrezeptor (*T cell receptor*, TCR) nur diejenigen T-Zellen ausgewählt und aktiviert werden, die für eine Pathogenabwehr geeignet sind.

Im maturateden Zustand der Dendritischen Zelle ist diese in der Lage, die Aktivierung von T-Zellen und deren klonale Expansion und Differenzierung in Effektorzellen zu induzieren.

Immature Dendritische Zellen (iDC) maturatedieren im Gewebe nach Toll-like Rezeptor (TLR)-vermittelter Bindung an molekulare Motive, sogenannte *pathogen associated molecular patterns* (PAMPs), die für das vorliegende Pathogen charakteristisch sind^{17, 18}. Daneben kann eine Maturation durch Gewebeschädigung und damit verbundener Freisetzung von Entzündungsmediatoren erfolgen. So wurde *in vitro* die Maturation von Dendritischen Zellen durch den Zusatz eines Zytokincocktails bestehend aus den inflammatorischen Zytokinen TNF α (Tumornekrosefaktor α), IL-1 β und IL-6 sowie PGE₂ (Prostaglandin-2)

zeigt^{19, 20}. Auch durch Ligation von CD40, das auf immaturren Dendritischen Zellen schwach exprimiert wird, kann die Maturation von Dendritischen Zellen *in vitro* induziert werden^{21, 22}.

Die Maturation ist dabei eng mit der Migration der Zellen aus dem peripheren Gewebe in den Lymphknoten verknüpft^{23, 24}. Hier treffen die muren Dendritischen Zellen (mDC) auf T-Zellen.

Die für die Migration (Chemokinrezeptoren), die Interaktion mit der T-Zelle (Adhäsionsmoleküle) und die Kostimulation (B7-Moleküle und TNFR-Liganden) erforderlichen Moleküle werden im muren Zustand auf der Zelloberfläche der Dendritischen Zellen im hohen Maße exprimiert²⁵.

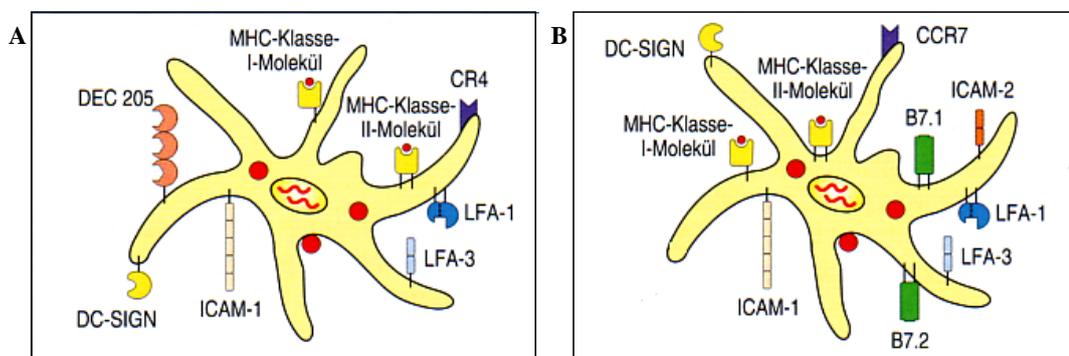


Abbildung 1: Oberflächenmoleküle auf immaturren und muren Dendritischen Zellen²⁶.

Immaturre DC (A) exprimieren neben den Phagozytoserezeptoren, z.B. DEC205 und Komplementrezeptoren, wie CR4 ebenfalls Adhäsionsmoleküle, die bei der Interaktion mit T-Zellen eine Rolle spielen, sowie MHC-Moleküle. Bei muren DC (B) tritt die Endozytose in den Hintergrund, und es werden verstärkt Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ICAM-2, DC-Sign, LFA-1 und LFA-2), kostimulatorische Moleküle (B7.1, B7.2) und Präsentationsmoleküle (MHCI, MHCII) exprimiert. (Bezeichnungen s. Text).

So exprimieren mure Dendritische Zellen die Adhäsionsmoleküle LFA-3 (*Lymphocyte Function-Associated Antigen-3*), ICAM (*intercellular adhesion molecule*)-1, ICAM-2 und DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin*), die an CD (*cluster of differentiation*)2, LFA-1 und ICAM-3 auf T-Zellen binden, im Vergleich zu immaturren DC verstärkt. Auch die Expression der MHC-Moleküle ist verstärkt. Als Chemokinrezeptor wird zudem CCR7 (*chemokine (C-C motif) receptor 7*) exprimiert²⁷. Zu den kostimulatorischen Molekülen zählen die B7-Moleküle CD80 und CD86, die an CD28 auf T-Zellen binden, sowie die Liganden der TNF-Rezeptorfamilie (TNFR-Liganden).

Die T-Zellaktivierung wird durch die spezifische MHC/TCR-Bindung zwischen Dendritischer Zelle und T-Zelle initiiert. Diese Bindung wirkt als 1. Aktivierungssignal in die T-Zelle. Voraussetzung für die klonalen T-Zellexpansion und nachfolgenden Differenzierung der T-Zellen in Effektorzellen ist jedoch die

Bindung an zusätzliche kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche der APC (*antigen presenting cell*) (2. Aktivierungssignal). Während die B7-CD28-Ligation eine kurzzeitige Aktivierung der T-Zellen durch Freisetzung von IL-2 in den ersten Tagen induziert, kann die T-Zelle durch die Ligation der TNFR/TNFRL-Familienmitglieder weitere Überlebenssignale erhalten²⁸.

1.3 Kostimulatorische Moleküle der TNFR/TNFRL-Familie

Zu den TNFR-Liganden, die auf Dendritischen Zellen exprimiert werden, gehören die Moleküle OX40-Ligand, CD70, CD30-Ligand, 4-1BB-Ligand, Light (*lymphotoxin-related inducible ligand*) und GITR (*glucocorticoid-induced TNF receptor*)-Ligand. Es wird angenommen, dass diese TypII Transmembranproteine als Monomere oder Oligomere in der Zellmembran vorliegen und trimere Signalkomplexe bei Interaktion mit dem Liganden bilden²⁹. Die kostimulatorisch wirkenden TNF-Rezeptoren Ox40, CD27, CD30, 4-1BB, HVEM (*herpes virus entry mediator*) und GITR auf T-Zellen, die bei Interaktion mit ihren Liganden auf Dendritischen Zellen ebenfalls trimerisieren, sind dagegen Typ I Transmembranproteine^{28, 29}.

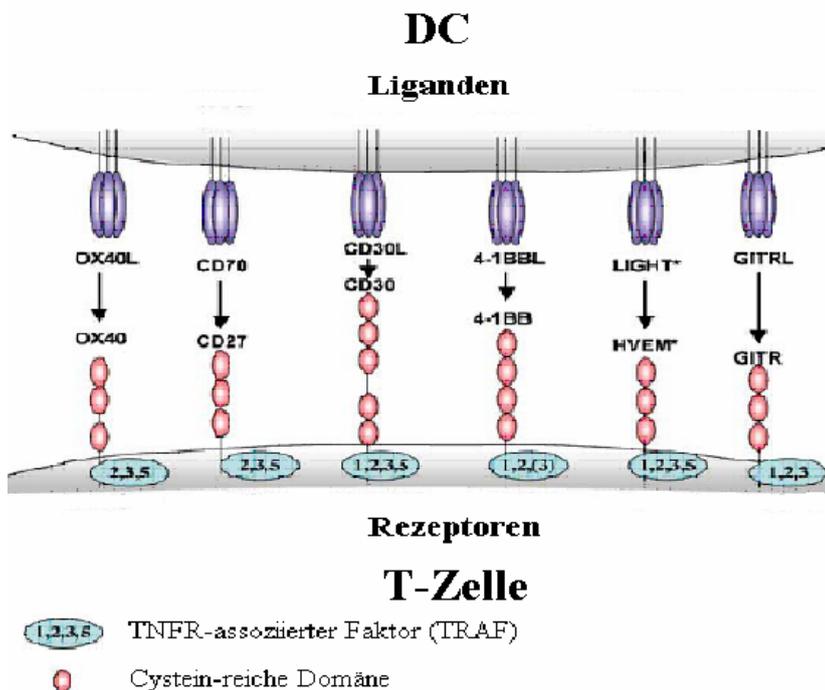


Abbildung 2: Auswahl kostimulatorisch wirkender TNFR-TNFR-Ligandenfamilienmitglieder²⁸.

Bei TNFR-Ligation werden TNFR-bindende Faktoren (TRAF) an den Rezeptor rekrutiert. Alle Rezeptoren binden TRAF2. CD27 bindet zusätzlich TRAF3 und TRAF5.

Die Signaltransduktion aller kostimulatorischen TNFR-Familienmitglieder, so auch die von CD27, erfolgt über TRAF (*TNFR-binding factor*)-Proteine, die bei

Rezeptorligation an den TNFR rekrutiert werden und als Adapterproteine für Kinasen fungieren. Alle TNFR binden TRAF2. Daneben bindet CD27 zusätzlich TRAF3 und TRAF5³⁰.

Jeder TNFR-Ligand kann ebenfalls auf T-Zellen exprimiert werden. Deshalb wird angenommen, dass dies die Interaktion von T-Zellen untereinander ermöglicht, um eine Amplifizierung des Signals zu erreichen, das initial durch eine Antigen-präsentierende Zelle induziert wurde²⁹.

Das Molekül CD70 gehört ebenfalls in die Gruppe der TNFR-Liganden. CD70 ist ein 193 Aminosäuren langes Peptid, dessen intrazelluläre Domäne von 12 Aminosäuren gebildet wird³¹. Es wird im humanen wie im murinen Modell auf aktivierten Dendritischen Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und allen aktivierten T-Zellen exprimiert²⁸.

Auf murinen Dendritischen Zellen wurde eine CD70-Expression sowohl durch CD40-Ligation als auch durch Stimulation mittels PAMPs induziert^{32, 33}. Auf humanen Dendritischen Zellen wurde eine CD70-Expression nach LPS-Stimulation in Abwesenheit von IL-4 beschrieben³⁴. Auf B-Zellen erfolgt die CD70-Expression nach B-Zellrezeptor vermittelter Aktivierung, nach CD40-Ligation oder nach LPS-Stimulation^{35, 28}.

Auf murinen aktivierten T-Zellen wird CD70 nur schwach exprimiert³⁵. Dagegen zeigen humane T-Zellen vier Tage nach Staphylokokken Enterotoxin A (SEA)-Stimulation eine starke CD70-Expression³⁶.

CD70 ist der Ligand des TNFR CD27 auf T-Zellen. CD27 ist 242 Aminosäuren lang, wobei 46 Aminosäuren zytoplasmatisch vorliegen³¹. CD27 wird konstitutiv auf aktivierten B-Zellen³⁰ und allen ruhenden T-Zellen exprimiert. Nach Antigen-abhängiger T-Zellaktivierung wird bei humanen Zellen zunächst eine Zunahme der CD27-Expression beobachtet. Im Verlauf der T-Zell-expansion nimmt die CD27-Expression jedoch ab³⁷. Der Verlust bzw. die Einschränkung der CD27-Expression auf aktivierten T-Zellen scheint mit dem Grad der Effektorfunktion assoziiert zu sein. So wurde beschrieben, dass der Perforingehalt in zytotoxischen T-Zellen sich gegenläufig zur CD27-Expression verhält³⁸.

Die CD27-CD70-Ligation wurde in der Literatur als kostimulatorisches Signal für die T-Zellproliferation und Differenzierung beschrieben. So führt die Interaktion von CD27 auf T-Zellen mit seinem Liganden CD70 auf Dendritischen Zellen zu einer Antigen-abhängigen T-Zellproliferation³⁹ und IFN γ -Sekretion sowohl aus CD4- als

auch CD8-T-Zellen, die durch Blockierung mit anti-CD70-Antikörper unterbunden werden kann^{32, 33, 40}. In Untersuchungen mit löslichem CD70 wurde eine verstärkte Bildung von IFN γ und zytotoxischen T-Zellen beschrieben⁴¹.

Außerdem wurde beschrieben, dass durch die CD27-CD70-Interaktion die Bildung von Gedächtniszellen begünstigt wird⁴². Eine anhaltende CD70-CD27-Ligation in CD70-transgenen Mäusen führte zu einer verstärkten Bildung von T-Effektorzellen und dem Verlust von B-Zellkeimzentren in der Milz⁴³. Jedoch wurde bei anhaltender CD70-CD27-Interaktion auch eine T-Zelldepletion beobachtet, die auf den erhöhten T-Zellumsatz zurückgeführt wurde⁴⁴.

Wegen der kostimulatorischen Wirkung der CD27-Ligation auf die T-Zellproliferation und Differenzierung stellte sich die Frage, ob die exogene Expression von CD70 auf Dendritischen Zellen ebenfalls zu einer verbesserten T-Zellantwort führt. Dies könnte bei Einsatz dieser CD70-transfizierten DC als Vakzine zu verbesserten Responderaten führen.

1.4 Einsatz von Dendritischen Zellen als Tumorstoffe

Neben der Induktion von Immunität gegen Pathogene sind Dendritische Zellen vermutlich ebenfalls für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegen Selbst-Antigene verantwortlich^{45, 46}. So können Dendritische Zellen periphere Toleranz durch Deletion von T-Zellen, Anergie oder Expansion von Regulatorischen T-Zellen induzieren^{47, 48}.

In diesem Kontext kann die Entstehung von Tumoren als ein Prozess verstanden werden, bei dem eine Induktion von Toleranz gegen entartete Zellen stattfindet. Die zu entwickelnde Tumorstoffe sollte daher in der Lage sein, durch die Induktion von spezifischen Effektor-Zellen und Effektor-Gedächtniszellen Immunität gegen die Tumorstoffe zu erzeugen. Diese Tumorstoffe könnten eingesetzt werden, um ein verzögertes Tumorstoffe, die Bildung von Metastasen und den Schutz vor Tumorstoffe in bereits erkrankten oder gefährdeten Patienten, z.B. nach Hepatitis B- oder C-Infektion, zu erreichen^{23, 49}.

Es werden zwei Modelle diskutiert, die erklären sollen, auf welcher Grundlage Dendritische Zellen die Entscheidung treffen, ob Toleranz oder Immunität induziert wird¹⁶.

Nach Matzinger führt die Anwesenheit zelleigener Produkte, die aus geschädigten Zellen freigesetzt werden, wie Hitzeschockproteine (*heat shock protein*, HSP) oder mitochondriale Komponenten, zu einer Aktivierung von Dendritischen Zellen. Diese

wandeln sich daraufhin in Zellen, die Immunität erzeugen. Dagegen wird Toleranz durch Dendritische Zellen erzeugt, die keinen Gefahrensignalen ausgesetzt waren.

Diese These wird durch die Beobachtung unterstützt, dass die bei Zellschädigung freigesetzten inflammatorischen Zytokine eine Maturation der Dendritischen Zellen erzeugen, so dass durch die gestiegene Anzahl an kostimulatorischen Molekülen eine T-Zellaktivierung möglich ist^{19,20}. Es wurde ebenfalls beschrieben, dass auch immature Dendritische Zellen wie mature Dendritische Zellen die peripheren lymphatischen Gewebe, also die Orte der T-Zellaktivierung, durchwandern²⁴. Außerdem kann dieses Modell die Immunität gegen Tumoren erklären. So können unkontrolliert wachsende Tumore nekrotisieren, wodurch Dangersignale gesetzt werden¹⁶. Allerdings müsste auch nach Gewebeschädigung Immunität erzeugt werden, was jedoch nicht beobachtet wird.

Das Modell nach Janeway geht bei der Induktion von Immunität davon aus, dass DC über Toll-like Rezeptoren (TLR) verfügt, die ein Pathogen aufgrund seiner charakteristischen Muster, den PAMPs, erkennen kann. Trifft dagegen eine aktivierte, jedoch nicht mit PAMPs in Berührung gekommene Dendritische Zelle im Lymphknoten auf T-Zellen, so wird Toleranz induziert. Diese Hypothese kann die Immunität gegen Pathogene gut erklären. Jedoch kann hiermit nicht erklärt werden, wie Immunität gegen Tumore entsteht, da bei Tumorgeschehen keine Pathogene vorliegen.

Ausgehend von dem Gefahrensignal-Modell nach Matzinger wurden erste Tumorstoffe entwickelt. Dabei wurden zwei Gründe angenommen, um zu erklären, warum ein wachsender Tumor vom Immunsystem nicht erkannt wird^{50,51}.

Zum einen geht das Tumorstoffwachstum mit der Expression von immunsupprimierenden Faktoren einher. Zum anderen gehen nur wenige Tumorstoffzellen während des nicht nekrotischen Tumorstoffwachstums unter.

Da durch die Immunsuppression nur wenige apoptotische Tumorstoffzellen vorliegen, ist die Konzentration von Tumorstoffprotein niedrig. Daher steht die erforderliche Tumorstoffantigenkonzentration für eine effektive Crosspräsentation, also für die Endozytose von apoptotischen Zellen durch Dendritische Zellen und die Präsentation der in diesen apoptotischen Zellen enthaltenen Tumorstoffproteine im MHC-Kontext, nicht zur Verfügung⁵⁰.

So wurde von Heath und Carbone gezeigt, dass die Antigenkonzentration in von Dendritischen Zellen crosspräsentierten Zellen größer als 0,03ng OVA/ μ g Protein sein muss, um die Induktion einer primären T-Zellantwort zu induzieren¹⁶.

Auch die verminderte Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen, die für die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf der maturierten Dendritischen Zelle erforderlich sind, ist bei einer tumorinduzierten Immunsuppression vermindert. Die Unterdrückung der Maturation der Dendritischen Zellen aufgrund der fehlenden Gefahrensignale sowie niedrige Antigenkonzentrationen könnten dazu führen, dass eine periphere Toleranz gegen Tumorzellen ausgebildet wird.

Erste Tumorstoffe wurden aufgrund dieser Annahme durch eine *ex vivo* vorgenommene Beladung der Dendritischen Zellen mit Tumorantigenen und einer gleichzeitigen Maturation der Dendritischen Zellen hergestellt⁵⁰. Die Ergebnisse zeigten zwar die Überlegenheit von DC-basierten Vakzinen im Vergleich zu anderen Vakzinierungsstrategien, wie Vakzinierung mit Peptiden, Tumorzellen oder Tumorantigenen exprimierenden viralen Vektoren. Es sprachen jedoch nur 9,5% der behandelten Patienten auf die DC-Vakzinierungen an^{52, 23}.

Ursache für die geringe Responderate kann die Verwendung von Peptid-gepulsten DC sein, bei denen Peptide durch Inkubation der DC in die Grube des MHC-I-Moleküls eingebracht werden. Nachteile dieser Vakzine sind, dass nur ein Epitop präsentiert wird und die Beladung der DC HLA-Genotyp-abhängig erfolgt. Zudem werden T-Helferzellen, die Antigen über MHC-II-Moleküle erkennen, nicht angesprochen.

Verbesserte Responderaten sind daher bei Transfektion von DC mit Antigenen zu erwarten. Durch mRNA-Transfektion wird das Protein in der DC translatiert und prozessiert, so dass mehrere Epitope generiert werden. Die Präsentation dieser Epitope erfolgt sowohl in MHC-I als auch in MHC-II, so dass T-Helferzellen ebenfalls angesprochen werden können. Nicht zuletzt ist die Präsentation der Epitope nicht HLA-Genotyp-abhängig.

Ein weiterer Grund für die niedrige Responderate kann die Verwendung von nicht mit PAMPs aktivierten und daher nicht lizenzierten Dendritischen Zellen sein.

In der Literatur wird die Lizenzierung von Dendritischen Zellen definiert als ein Signal, das die Dendritischen Zellen zur Bildung von IL-12p70 und zur Aktivierung funktioneller CD4-Zellen befähigt^{53, 54} und in der Konsequenz zur Aktivierung von CD8-T-Zellen und deren Differenzierung in funktionelle zytotoxische T-Zellen⁵⁵ und Gedächtniszellen^{56, 57} führt.

Diese Konditionierung der Dendritischen Zelle wird zum einen durch die Aktivierung über TLR⁵³, zum anderen durch die T-Zellhilfe gegeben⁵⁶. Die Ligation

von CD40 auf Dendritischen Zellen mit CD154 (CD40L) auf T-Zellen ist dabei das entscheidende Signal für die Lizenzierung^{58, 57}.

Es kann angenommen werden, dass die TLR-Signale unter anderem auch zu einer verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen führen, die ebenfalls erst durch die T-Zellhilfe induziert werden. CD70, ein Mitglied der TNFR-Ligandenfamilie, könnte ein solches kostimulatorisches Molekül sein. Die Expression von CD70 ist streng reguliert und erfolgt auf DC nur nach PAMPs-Stimulation oder CD40-Ligation, jedoch nicht nach Maturation mittels Zytokincocktail³³. Die CD70-Expression ist dabei von dem verwendeten PAMPs-Typ abhängig und erfolgte im Vergleich zur Expression nach CD40L-Stimulation verzögert. Es wurde beschrieben, dass lösliches CD70 bei gleichzeitiger Antigengabe die Bildung von OVA-spezifischen CD8-T-Zellen im Vergleich zu LPS stark amplifizierte⁴¹. Die CD27-Stimulation führte außerdem neben einer verstärkten primären CD8-T-Zellantwort zur Ausbildung einer sekundären T-Zellantwort, die durch LPS-Stimulation allein nicht erreicht wurde. Für die Entwicklung einer neuen DC-basierten Tumorstoffimpfung kann die exogene Expression von CD70 daher zu verbesserten Responderaten führen.

Der Erfolg einer Vakzinierung ist jedoch außer durch die Verwendung von *ex vivo* Antigen-beladenen, lizenzierten Dendritischen Zellen ebenfalls von der Tumorumgebung abhängig. So kann z.B. durch die Anwesenheit von CD4+CD25+-regulatorischen Zellen eine Immunsuppression induziert werden⁵⁹. Eine kombinierte Therapie, bestehend aus der Reduktion von Tumormasse vor Vakzinierung, der Eliminierung von CD4+CD25+-regulatorischen Zellen und der Vakzinierung selbst müßte daher angestrebt werden.

1.5 Antigenbeladung von Dendritischen Zellen durch Elektroporation

Die Induktion von Immunität gegen Tumore kann außer durch die Verwendung von lizenzierten Dendritischen Zellen auch durch die Präsentation hoher Tumorantigenkonzentrationen positiv beeinflusst werden. Die Elektroporation hat hier verschiedene Vorteile im Vergleich zu anderen Antigenbeladungsmethoden wie der Lipofektion, viralen Transfektionsmethoden, der Calcium-Phosphatmethode oder der Beladung mittels Peptidpuls.

So liegt die transfizierte Nukleinsäure nach Elektroporation im Zytoplasma der Zelle vor. Wird zudem mRNA eingesetzt, so wird das translatierte Protein in Proteasomen prozessiert und über die TAP (*transporters associated with antigen processing*)-Translokase in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, in dem die Beladung

von MHCI-Molekülen erfolgt⁶⁰. Außerdem bedeutet die Transfektion von mRNA gegenüber der DNA-Transfektion keine gentechnische Veränderung der Dendritischen Zellen, wodurch die Zulassung der DC-Vakzine zu klinischen Studien erleichtert wird. Auch wird hierdurch eine eventuell vorliegende transkriptionale Regulation umgangen⁶¹. Die Transfektionsraten nach Elektroporation betragen 65%^{62, 63} und liegen damit über den Transfektionsraten anderer Methoden.

Gegenüber der Lipofektion, bei der Nukleinsäure an kationische Lipide gebunden über den Endozytoseweg in die Zelle aufgenommen wird, besteht bei der Elektroporation nicht die Gefahr des teilweisen Abbaus der Nukleinsäure in späten Lysosomen. So werden bei Lipofektion, auch bedingt durch den toxischen Effekt der verwendeten Lipide, nur Transfektionsraten bis 30% erreicht^{64, 65}. Positive Auswirkungen kann dagegen die Ligation der zu transfizierenden mRNA mit dem TLR 7 und TLR 8 haben. Diese TLR liegen in Endosomen vor, so dass eine PAMPs-Stimulation mit der Lipofektion einhergehen kann⁶⁶. So wurde gezeigt, dass die Transfektion von nackter PSA (Prostate-specific Antigen)-mRNA in immaturren Dendritischen Zellen zu einer Stimulation von spezifischen CTL führt^{67, 68}.

Im Vergleich mit viralen Transfektionsmethoden, bei denen Adenoviren als Vehikel zum Einbringen von Nukleinsäuren in den Kern genutzt werden, besteht bei Elektroporation nicht die Gefahr der genetischen Veränderung der genomischen DNA durch Integration der Nukleinsäure. Zudem können mittels Elektroporation auch sich nicht teilende Zellen transfiziert werden, während durch DNA-Viren vorgenommene Transfektionen nur in sich teilenden Zellen erfolgreich sind⁶⁹. Es kann bei viraler Transfektion ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass andere Zellen nach Vakzinierung ebenfalls durch Viren infiziert werden, wodurch die Gefahr der Onkogenese und Mutagenese steigt⁶⁹. Die erreichten Transfektionsraten sind dagegen mit Transfektionsraten nach Elektroporation vergleichbar⁶⁴.

Die Transfektion von Dendritischen Zellen mittels Calcium-Phosphatmethode liefert auch bei Einsatz hoher DNA-Mengen nur niedrige Transfektionsraten von 20%⁷⁰. Im Vergleich zu den übrigen Transfektionsmethoden ist diese Methode daher für die Herstellung großer Mengen Antigen-beladener Dendritischer Zellen für Vakzinierungsstudien die am wenigsten geeignete.

Neben den genannten Transfektionsmethoden kann die Beladung von MHCI auch über Inkubation von Dendritischen Zellen mit Peptiden (Peptidpulsen) erfolgen. Hierbei bindet das Peptid HLA-abhängig in der Grube des MHCI-Moleküls. Diese Methode der Antigenbeladung erlaubt nur die Verwendung von Epitopen bekannter

Tumor-assoziiertes Antigen (*tumor associated antigens*, TAA). Im Gegensatz dazu werden bei einer Antigenbeladung mittels Elektroporation auch unbekannte Epitope von der Dendritischen Zelle präsentiert, da das nach Translation der transfizierten mRNA vorliegende vollständige Protein prozessiert wird. Außerdem werden sowohl MHCI- als auch MHCII-Moleküle beladen und die Beladung erfolgt in Gegensatz zum Peptidpuls unabhängig von vorliegenden HLA-Allelen⁶⁹. Daher steigt nach Antigenbeladung von Dendritischen Zellen mittels Elektroporation die Wahrscheinlichkeit, alle für den Tumor spezifischen CD4- und CD8-T-Zellen stimulieren zu können.

Aufgrund der aufgeführten Vorteile, die die Elektroporation von mRNA mit sich bringt, ist sie zur Antigenbeladung von Dendritischen daher die Methode der Wahl.

1.6 Fragestellung:

Aufgrund der hohen Anzahl an kostimulatorischen Molekülen gelten Dendritische Zellen (DC) als gute Stimulatoren der zellulären Immunantwort und werden daher für den Einsatz als Tumorstoffe diskutiert. Die niedrigen Responderaten früherer DC-basierter Vakzine könnten durch die Verwendung von Peptid-gepulsten DC oder nicht lizenzierten DC bedingt sein. Eine verbesserte Tumorstoffe kann daher durch Antigen-Beladung mittels Elektroporation und die Verwendung von lizenzierten DC erreicht werden.

DC werden zum einen durch die Aktivierung über TLR⁵³ zum anderen durch die T-Zellhilfe lizenziert⁵⁶, wodurch sie zur Induktion einer zellulären adaptiven Immunität befähigt werden. Möglicherweise führen TLR-Signale oder T-Zellhilfe u.a. auch zu einer verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen. CD70, ein Mitglied der TNFR-Ligandenfamilie, könnte ein solches kostimulatorisches Molekül sein. Die Expression von CD70 ist streng reguliert und erfolgt auf DC nur nach PAMPs-Stimulation oder CD40-Ligation³³. Lösliches CD70 amplifiziert die primäre Expansion von OVA-spezifischen CD8-T-Zellen und induziert im Gegensatz zu LPS eine Sekundärantwort nach erneuter Antigengabe⁴¹. Die exogene Expression von CD70 auf DC könnte daher bei deren Einsatz als Tumorstoffe zu verbesserten Responderaten führen.

In dieser Arbeit soll die exogene Expression von CD70 in humanen zytokinmaturierten Dendritischen Zellen mittels Elektroporation von CD70-mRNA erreicht werden mit dem Ziel, eine Basis zur Herstellung einer verbesserten DC-basierten Vakzine zu schaffen. Dazu soll zunächst die Elektroporation der DC optimiert werden. Nachfolgend wird die Auswirkung der CD70-Expression auf die Zytokinantwort durch Kokultivierung der transfizierten DC mit autologen CD4-T-Zellen untersucht. Hieraus abgeleitet ergeben sich folgende Einzelziele:

1. „methodische“ Einzelziele:

- 1.1. Optimierung der Elektroporationsparameter zur mRNA-Transfektion
- 1.2. Klonierung von humanem CD70

2. „immunologische“ Einzelziele:

- 2.1. Untersuchung der Auswirkung der Elektroporation auf die Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle auf zytokinmaturierten DC
- 2.2. Untersuchung der Zytokinsekretion nach Kokultur von CD70-mRNA transfizierten DC mit autologen CD4-T-Zellen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterial

| | |
|--------------------------------------|---|
| Beckmann Coulter, Heidelberg | Hochgeschwindigkeitszentrifuge Avanti J-251 |
| Becton Dickinson, Heidelberg | Facs Calibur Analyzer |
| Bender Hobein AG, Zürich, Schweiz | Vortex |
| Biometra, Göttingen | PCR Maschine UnoII |
| Biorad, München | Gene-Pulser II mit RF-Modul, Spannungsgerät Powerpac 300 mit Gelkammer, 6Well- und 24Well- Mikrotiterplatten |
| Braun Melsungen AG, Melsungen | Aqua ad iniectabilia (H ₂ O (reinst), RNase und DNase frei) |
| Eppendorf, Hamburg | Tischzentrifugen 5417C und 5417R, Reaktionsgefäße, UV-Küvetten 220- 1600nm |
| Falcon | Zentrifugenröhrchen (50ml), Facs- Röhrchen |
| Forma Scientific Inc., Marietta USA | Zellkulturinkubator |
| Greiner, Kehlheim | PS-Röhrchen GLKL 0,6ml, Filterspitzen, T25-, T75- und T175- Zellkulturflaschen, Kryoröhrchen (2ml) |
| Heraeus, Hanau | Megafuge 1.0, Biofuge fresco |
| Kendro, Langenselbold | Minifuge RF |
| Miltenyi Biotech, Bergisch Glattbach | Super MACS Separationsmagnet |
| Nalgene Labware, Hereford, UK | Einfrierbehälter |
| Neckermann Versand, Frankfurt/Main | Mikrowellengerät 675/008 |
| Nunc, Wiesbaden | Polysorp 96 Well Platten, Zentrifugenröhrchen (10ml, spitz), Triple Flaschen |
| Perkin Elmer GmbH, Rodgau-Jügesheim | UV/VIS-Spektromerter λ 2 |
| Ritter GmbH, Schwabmünchen | Multipettenspitzen (Ritips) |
| Tecan Deutschland GMBH | ELISA-Reader |
| Sarstedt, Nürnbergrecht | Einmalpipetten 5ml, 10ml, 25ml |

| | |
|------------------------------|-------------------------------------|
| Satorius Analytic, Göttingen | Analysewaage |
| Sigma, Deisendorf | Hochgeschwindigkeitszentrifuge 3K30 |
| Zeiss, Jena | Mikroskope ID03 und Axioskop |

2.2 Material für molekularbiologische Methoden

2.2.1 Vektoren

| Vektor | Quelle |
|----------------------|---|
| EGFP_pcDNA3.1-Vektor | Dr. M. Marget, Immunologie Kiel |
| pEGFP | BD Biosciences, Heidelberg |
| pSP73/A64 /NotI | D. Boczkowski, Durham, USA |
| Her2neu_pcDNA3.1/A64 | S. Pruitt, Durham, USA |
| pCR2.1 TOPO-Vektor | Invitrogen, Karlsruhe, Dr. M. Marget, Immunologie Kiel |

2.2.2 Restriktionsenzyme

Die Restriktionsenzyme AccI, ApoI, BbsI, EcoRI, HindIII, SacI und SmaI mit den dazugehörigen Puffern wurden von New England Biolabs, Frankfurt/Main bezogen. Alle übrigen Enzyme, die Alkalische Phosphatase sowie die Ligase inkl. Puffer stammen von Promega, Mannheim.

2.2.3 Bakterien

Für die Klonierung wurden kompetente E.coli XL-1 blue eingesetzt, zur Verfügung gestellt von Dr. M. Marget, Immunologie Kiel.

2.2.4 Puffer und Lösungen für die Molekularbiologie

2.2.4.1 Tris-Acetat-EDTA-(TAE) Puffer (50x Stocklösung) nach Sambrook und Russell

242g Tris Base

57,1ml Eisessig

100ml 0,5M EDTA (pH8,0)

ad 1000ml ddH₂O.

Die TAE (1x)-Gebrauchslösung wurde durch Verdünnung in ddH₂O hergestellt.

2.2.4.2 Ethidiumbromid-Lösung:

Für die Färbung von DNA-Molekülen in Agarosegelen wurde eine 1mg/ml Ethidiumbromidlösung eingesetzt, die bei 4°C im Dunkeln gelagert wurde. Zu 50ml eines 1%igen Agarosegels wurden 5µl Ethidiumbromidlösung zugesetzt.

2.2.4.3 Molekulare Größenmarker:

Als Größenstandards wurden ein peqGOLD 100bp Größenstandard (peqlab, Erlangen) sowie der 10.000bp-Größenstandard Hyperladder I (Bioline, Luckenwalde) mit den dazu gehörigen Ladepuffern verwendet.

2.2.4.4 Ampizillin-Stocklösung:

Für die Herstellung der Ampizillin-Stocklösung wurden 100mg/ml Ampizillin (Sigma, Deisendorf) in 70%(v/v) Ethanol gelöst. Die Stocklösung wurde bei -20°C gelagert. In dem verwendeten Selektionsmedium zur Kultivierung von transformierten E.coli wurde Ampizillin in einer Endkonzentration von 100µg/ml eingesetzt.

2.2.4.5 X-Gal-Lösung:

Für die Blau/Weiß-Selektion zur Erkennung von Transformanten wurde eine 4mg/ml X-Gal-Lösung (Merk, Darmstadt) in Dimethylformamid (Sigma, Deisendorf) eingesetzt. 50µl der X-Gal-Lösung wurden auf eine vorgewärmte LB-Agarplatte ausgespatelt und die Platte vor Aufbringen der Bakteriensuspension im Brutschrank getrocknet.

2.2.5 Gele

2.2.5.1 1%iges Agarosegel:

Für die Herstellung eines 1%igen Agarosegel wurden 0,5g Agarose mit 50ml TAE (1x) Puffer aufgekocht und nach Abkühlen 5µl Ethidiumbromidlösung (1mg/ml) zugesetzt. Das Gel wurde in die Gelkammer gegeben und 1h polymerisiert. Maximal 1µg Probe wurde nach Verdünnung in Ladepuffer pro Tasche aufgetragen und das Gel bei 90V 60min gefahren.

2.2.5.2 Formaldehydgel:

MOPS-Puffer (10x):

200mM MOPS (pH7,0)

50mM Natriumacetat

5mM EDTA

41,86g MOPS wurden in 700ml ddH₂O gelöst und nach Einstellen des pH-Wertes 16,7ml einer 3M Natriumacetatlösung (pH 7,0) und 10ml EDTA-Lösung (pH 8,0) zugesetzt. Die Lösung wurde auf 1 Liter mit ddH₂O aufgefüllt und sterilfiltriert. Diese Lösung ist 4 Wochen haltbar.

Laufpuffer:

Für den Gellauf wurde MOPS (1x)-Puffer eingesetzt.

Probenpuffer:

100µl Formamid

70µl Formaldehydlösung (37%)

50µl 10xMOPS-Puffer

20µl Bromphenolblau (1%)

1µl Ethidiumbromid (1%)

259µl ddH₂O

Zur Denaturierung der RNA wurden mindestens 4µg RNA mit 25µl Probenpuffer gemischt und für 10min bei 75°C inkubiert.

Herstellung des denaturierenden Formaldehydgels:

Für ein 1,5%iges Agarosegel wurden 0,75g Agarose in 36ml ddH₂O aufgeköcht, leicht abgekühlt und unter dem Abzug 7ml MOPS (10x) und 7ml Formaldehyd (37%) zugesetzt. Die Gelkammer und der Gelschlitten wurden mit 70%igem Ethanol und nachfolgend mit ddH₂O gereinigt. Das Gel wurde in den Gelschlitten gegossen und für 1h unter dem Abzug polymerisiert.

Probenvorbereitung und Gellauf:

Die Gelkammer wurde mit 70%igem Ethanol und nachfolgend mit ddH₂O gereinigt. Nach Auffüllen mit Laufpuffer und Einsetzen des Gelschlittens wurde das Gel für 10min bei 60V gefahren. Nach Auftragen der RNA-Proben auf das Gel wurde die Spannung auf 80V erhöht und die Proben für 1,5h getrennt.

2.2.6 Medien für die Bakterienkultur nach Sambrook und Russell

Für die Kultivierung der Bakterienkulturen wurden Medien nach Sambrook und Russel eingesetzt⁷¹.

2.2.6.1 LB-Flüssigmedium

Für das flüssige LB-Medium wurden 10g Bactotrypton (BD Biosciences, Heidelberg), 5g Bactoyeast (BD Biosciences, Heidelberg) und 10g NaCl (Merk, Darmstadt) in ddH₂O gelöst. Der pH-Wert wurde auf pH 7,0 eingestellt und die Lösung auf ein Endvolumen von 1L mit ddH₂O aufgefüllt und autoklaviert. Vor dem Animpfen von Flüssigkulturen wurden 100µg/ml Ampizillin zugesetzt.

2.2.6.2 LB-Agarplatten

Für LB-Platten wurden dem LB-Flüssigmedium nach pH-Einstellung 3% (w/v) Bactoagar (BD Biosciences, Heidelberg) zugesetzt. Nach dem Autoklavieren und Abkühlen auf 60°C wurden 100µg/ml Ampizillin zugesetzt, bevor die Platten gegossen wurden.

2.2.7 Kits

| Kit | Firma |
|---------------------------------|---|
| RNeasy Midi Kit | Qiagen, Hilden |
| RNeasy Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiaprep Spin Miniprep Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiagen Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiaquick Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| Qiaquick PCR-Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| HotStarTaq PCR Kit | Qiagen, Hilden |
| mMessage mMachine Kit | Ambion Europe, Huntingdon, Cambridgeshire, UK |
| Poly(A)Tailing Kit | Ambion Europe, Huntingdon, Cambridgeshire, UK |
| First strand cDNA synthesis Kit | Amersham Biosciences Europe, Freiburg, freundliche Gabe von Dr. M. Marget, Immunologie Kiel |

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Restriktionsverdau und mRNA-Herstellung

Die Herstellung von mRNA mittels *in vitro*-Transkription erfolgte mit Hilfe des mMessage-mMachine Kits (Ambion Europe, Huntingdon, Cambridgeshire, UK) wie vom Hersteller angegeben. Grundsätzlich wurden für das Arbeiten mit RNA nur kürzlich autoklavierte 1,5ml-Eppendorfgefäße und Filterspitzen verwendet. Alle benötigten Reagenzien wurden bei RT aufgetaut, gemischt, zentrifugiert und auf Eis gestellt. Das Enzym wurde bei -20°C im Kühlaggregat gehalten, um Inaktivierung zu vermeiden.

Um RNA einer definierten Länge *in vitro* transkribieren zu können, wurde der EGFP_pcDNA3.1-Vektor mit BbsI geschnitten. Der pSP73/A64/NotI-Vektor und alle Klonierungsvarianten des pSP73/A64/NotI-Vektoren wurden dagegen mit SpeI geschnitten. Der Restriktionsansatz wurde so angesetzt, dass eine Endkonzentration des Templates von $900\text{ng}/\mu\text{l}$ bis $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ vorlag. Für einen $100\mu\text{l}$ Restriktionsansatz wurden $10\mu\text{l}$ 10x-Restriktionspuffer mit der entsprechenden Menge an Vektor-DNA und, falls erforderlich, $1\mu\text{l}$ BSA (100x) sowie mit 10U des Restriktionsenzym gemischt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle der Restriktion wurde nachfolgend ein 1%iges Agarosegel gefahren.

Für einen $100\mu\text{l}$ -Transkriptionsansatz wurden in einem sterilen Eppendorfgefäß $50\mu\text{l}$ NTP/CAP mit $10\mu\text{l}$ Reaktionspuffer (10x) und $30\mu\text{l}$ DNA-Template ($c=90\text{ng}/\mu\text{l}$ bis $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) gemischt. Nachfolgend wurden $10\mu\text{l}$ Enzym zugesetzt, gemischt, zentrifugiert und der Ansatz für 2h bei 37°C inkubiert. Durch Zusatz von $5\mu\text{l}$ DNaseI und Inkubation für 15min bei 37°C wurde das DNA-Template abgebaut. Durch Zugabe von $150\mu\text{l}$ RNase freiem Wasser und $125\mu\text{l}$ LiCl mit nachfolgender Inkubation bei -20°C für 30min wurde die RNA gefällt und bei 4°C für 30min bei 16000xg (Eppendorf-Tischzentrifuge) pelletiert. Der Überstand wurde mit einer sterilen Pipettenspitze entfernt und das Pellet mit $1000\mu\text{l}$ Ethanol 70%(v/v) bei 16000xg gewaschen. Der Überstand wurde entfernt, das Pellet getrocknet und anschließend in $50\mu\text{l}$ RNase freiem Wasser gelöst.

2.3.2 Quantifizierung und Aliquotierung von mRNA

Für die Quantifizierung der mRNA wurde eine Verdünnung (1:200) in RNase freiem Wasser hergestellt und die Extinktion bei 260nm photometrisch gemessen. Für die Berechnung der Konzentration wurde folgende Formel nach Sambrook und Russell⁷¹ eingesetzt:

$$\text{RNA-Konzentration} = E_{260\text{nm}} \times 38 \times \text{Verdünnung} = \text{RNA} [\text{ng}/\mu\text{l}]$$

Die Ausbeute lag in Abhängigkeit von der Genlänge des Templates in der Regel bei 140µg-160µg. Für die Berechnung der Reinheit wurde der Quotient der Extinktionen bei 260nm und 280nm errechnet, der in der Regel bei $E_{260}/E_{280} = 1,67-1,7$ lag.

Für die Elektroporationen wurde die hergestellte mRNA als 10µg-Aliquots in sterilen Eppendorfgefäßen bei -20°C bis zur Verwendung gelagert.

2.3.3 *In vitro*-Polyadenylierung von mRNA

Für die Polyadenylierungsreaktion wurde das Poly-(A)-Tailing Kit (Ambion Europe, Huntingdon, Cambridgeshire, UK) eingesetzt. Das im Assay verwendete Enzym *E.coli* Poly-(A) Polymerase I (E-PAP) fügt Adenosine an das 3'-Ende einer RNA an. Für die *in vitro*-Polyadenylierung wurden in einem 100µl Ansatz 20µl mRNA aus dem Transkriptions-Ansatz mit 20µl 5x E-PAP Puffer, 10µl 25mM MnCl_2 , 10µl 10mM ATP sowie 4µl E-PAP gemischt und bei 37°C für 1h inkubiert. Als negative Kontrolle wurde ein Ansatz ohne E-PAP gefahren.

Der Ansatz wurde nachfolgend photometrisch quantifiziert und zur Analyse der Transkriptlänge auf ein Formaldehydgel aufgetragen.

2.3.4 Umklonierung von EGFP aus pEGFP in pSP73/A64/NotI

2.3.4.1 Hitzeschocktransformation von kompetenten *E.coli* XL-1 blue

Zur Transformation der Bakterien wurden 200µl kompetente *E.coli* XL-1 blue mit 20ng Plasmid bzw. 10µl Ligationsansatz gemischt und 30min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden ohne vorheriges Schütteln 45sec bei 42°C inkubiert und danach umgehend auf Eis gestellt. 1ml circle-grow-Komplettmedium (Bio 101, Inc., La Jolla, USA) wurde zügig unter sterilen Bedingungen zugesetzt und die Suspension in ein 10ml Schüttelröhrchen überführt. Die Bakteriensuspension wurde 1h bei 37°C im Schüttelschrank inkubiert, um eine Rekonstitution der Transformanten zu erreichen. Die Bakterien wurden anschließend auf ampizillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Dazu wurden 10µl der Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte, 100µl auf eine zweite Agarplatte und die übrigen Transformanten nach Zentrifugation für 5min bei 6500xg und Resuspension im Rücklauf auf eine dritte

Agarplatte ausgespatelt. Alle Platten wurden bei 37°C 16h inkubiert. Die hergestellten Transformanten wurden am nächsten Tag je nach Verwendungszweck für die Mini- oder Maxipräparation in Flüssigmedium weiterkultiviert.

2.3.4.2 Maxipräparation

Für die Maxipräparation wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Die Aufarbeitung der Bakteriensuspension erfolgte nach den Angaben des Herstellers mit leichten Modifikationen.

250ml LB-Füssigmedium mit 100µg/ml Ampizillin wurden mit einer Einzelkolonie von der Selektionsplatte beimpft und 16h bei 37°C kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde in zwei Zentrifugenbecher überführt und bei 6000xg 15min und 4°C in der Hochgeschwindigkeitszentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und der Rücklauf durch Tupfen auf ein Zellstofftuch entfernt. Das Pellet wurde in 10ml 4°C kaltem Puffer P1 vollständig resuspendiert und je 5ml in 30ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Nach Zusatz von 10ml Puffer P2 wurden die Bakterien lysiert. Da die austretende genomische DNA durch zu starkes Schütteln brechen kann, wodurch sie bei der nachfolgenden Zentrifugation weniger gut abtrennbar ist, wurde das Röhrchen nur vorsichtig geschwenkt. Den Ansätzen wurden nach Inkubation für 5min bei RT je 10ml 4°C kalter Puffer 3 zugesetzt und vorsichtig gemischt. In diesem Schritt wurden die Proteine und die genomische DNA denaturiert.

Nach Inkubation für 10min auf Eis wurden die Ansätze bei 20000xg und 4°C 30min zentrifugiert. Währenddessen wurden die Quiagensäulen mit 10ml QBT-Puffer equilibriert, wobei je 30ml-Zentrifugenröhrchen für eine Säule eingesetzt wurde. Nach Zentrifugation wurden die geklärten Überstände auf die Säule pipettiert. Die im Lysat vorhandenen Plasmide werden bei Passage des Lysats durch die Säule zurückgehalten, Proteine und RNA werden jedoch durch das nachfolgende Waschen der Säule entfernt. Die Säule wurde 2x mit je 30ml QC-Puffer gewaschen. Um die in der Säule gebundenen Plasmide zu eluieren, wurden je Säule 15ml QF-Puffer pipettiert und das Eluat in Corex-Zentrifugenröhrchen aufgefangen. 10,5ml Isopropanol (100%) wurden je Ansatz zugeben, um die Plasmid-DNA zu fällen und der Ansatz bei 4°C und 10500xg 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet mit je 5ml 70%(v/v) Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets wurden je 400µl H₂O (reinst) zugesetzt, das Pellet resuspendiert und der Gehalt an doppelsträngiger DNA bei 260nm photometrisch bestimmt.

2.3.4.3 Restriktion

Zur Umklonierung von EGFP in den Zielvektor pSP73/A64/NotI wurden 6µg EGFP-Vektor sowie 4,4µg des Zielvektors pSP73/A64/NotI mit je 0,5µl HindIII und 0,5µl EcoRI in einem 20µl Ansatz 2h bei 37°C inkubiert. Der geschnittene Zielvektor wurde nachfolgend dephosphoryliert.

2.3.4.4 Dephosphorylierung des Zielvektors pSP73/A64/NotI

Um zu verhindern, dass der geschnittene Zielvektor ohne Aufnahme des Inserts erneut ligiert, wurde eine Dephosphorylierung der 5'-Enden des geschnittenen Zielvektors vorgenommen. Um die Menge an hierfür benötigter Alkalischer Phosphatase (calf intestine alkaline phosphatase, CIAP) zu errechnen, wurde wie folgt vorgegangen:

Berechnung der Anzahl von 5'-Enden im Ansatz:

Der Ziel-Vektor besitzt eine Größe von 2464bp. Für die Berechnung wurde eine Größe von 2500bp angenommen.

$$\begin{aligned} \text{Anzahl von 5'-Enden} &= 2 \times \text{Stoffmenge (Vektors)} \\ &= 2 \times 4,4\mu\text{g} / (660\mu\text{g}/\mu\text{mol} \times 2500\text{bp}) \\ &= 5,33 \times 10^{-6} \mu\text{mol} = 5,33 \text{pmol 5'-Enden.} \end{aligned}$$

Da der Vektor mit 2 Restriktionsenzymen geschnitten wurde, befinden sich doppelt so viele 5'-Enden, also 10,6pmol 5'-Enden im Ansatz. Für die Dephosphorylierung werden laut Angabe des Herstellers für 1pmol 5'-Enden 0,01U CIAP benötigt. Zu einem 20µl-Restriktionsansatz wurden daher nach Pipettieren von 5µl 10xPuffer und 14,4µl H₂O 0,106U Alkalische Phosphatase zugesetzt. Der Ansatz wurde nach Mischen und Zentrifugieren 30min bei 37°C inkubiert, danach ein zweites Mal 0,106U Alkalische Phosphatase zugesetzt und erneut 30min bei 37°C inkubiert. Um Dephosphorylierung des Inserts im Ligationsansatz durch die Alkalische Phosphatase zu vermeiden und die Restriktion zu prüfen, wurde ein LMP-Gel mit anschließender Gelextraktion angeschlossen. Hierdurch wurde die Alkalische Phosphatase aus dem Ansatz entfernt.

2.3.4.5 LMP-Gel und Extraktion von DNA aus dem Gel

Zur Überprüfung der Restriktion und Entfernung der Alkalischen Phosphatase wurden beide Restriktionsansätze aus 2.3.4.3 vollständig auf ein 1,5%iges LMP-Gel aufgetragen und 1h bei 90V getrennt. Ein Größenstandard wurde mitgeführt. Die EGFP-Bande sowie der Zielvektor pSP73/A64/NotI wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die Aufarbeitung der

DNA erfolgte mit dem Qiaquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers.

Zu je 100mg Gel wurden 300µl Puffer QG pipettiert. Der Ansatz wurde bei 65°C unter Schütteln 5-10min inkubiert, bis das Gelstück sich vollständig aufgelöst hatte. Je 100mg Gel wurden 100µl Isopropanol (100%) zugesetzt und gemischt. Maximal 800µl wurden auf je eine vorbereitete Säule gegeben, bei 9500xg in der Eppendorf-Tischzentrifuge für 1 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Je 750µl Puffer PE wurden auf die Säulen gegeben und der Ansatz bei 9500xg für 1min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, die Säule durch Zentrifugieren getrocknet und in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Die Säule wurde mit 50µl Puffer H₂O (reinst) bei 16000xg für 1min eluiert und die gewonnene DNA für die nachfolgende Ligation eingesetzt.

2.3.4.6 Ligation

Für den Ligationsansatz wurde das LigaFast-System (Promega, Mannheim) verwendet. Das EGFP-Konstrukt und der pSP73/A64/NotI-Zielvektor wurden in verschiedenen Ligationsansätzen in den Verhältnissen 1:1, 1:3 und 3:1 gemischt eingesetzt. Für die Ansätze wurden je 5µl 2x Ligationspuffer mit 4µl des jeweiligen DNA-Gemisches sowie 1µl Ligase pipettiert. Als Kontrolle wurde ein Ligationsansatz ohne EGFP-Insert mitgeführt. Alle Ligationsansätze wurden über Nacht bei 16°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach Hitzeschocktransformation (2.3.4.1) und nachfolgender Kultur auf ampizillinhaltigen LB-Platten (2.2.6.2) sollten auf der Kontrollplatte nur wenige Kolonien wachsen, während auf den übrigen Platten viele Kolonien gefunden werden sollten.

2.3.4.7 Minipräparation des hergestellten EGFP_pSP73/A64/NotI-Vektors

Zur Kontrolle des hergestellten EGFP_pSP73/A64/NotI-Vektors wurden 12 verschiedene Kolonien von den Ligationsplatten ausgewählt und für 16h in je 4ml LB-Flüssigmedium, versetzt mit 100µg/ml Ampizillin, bei 37°C im Brutschrank schüttelnd inkubiert. Die Ansätze wurden bei 6500xg 10min bei RT zentrifugiert, die Überstände entfernt und die Isolation der Plasmide mit Hilfe des Qiaprep Spin Miniprep Kits nach den Angaben des Herstellers wie folgt durchgeführt.

Die Bakterienpellets wurden in 250µl 4°C kaltem Puffer P1 resuspendiert und in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt. 250µl Puffer P2 wurden je Ansatz zugegeben und vorsichtig gemischt. Nach Zugabe von je 350µl Puffer N3 und vorsichtigem Mischen entsteht ein weißer Niederschlag aus genomischer DNA und Protein, der durch die anschließende Zentrifugation für 10min bei 16000xg und RT pelletiert wurde. Die

Überstände wurden auf die vorbereiteten Qiagen-Säulen gegeben und für 1min bei 16000xg und RT in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. In der Probe vorhandenes Plasmid wurde an das Harz in der Säule gebunden, während RNA und Proteine nicht gebunden wurden. Das Eluat wurde verworfen und je 750µl Puffer PE auf die Säule pipettiert. Nach Zentrifugation für 1min bei 16000xg bei RT und Verwerfen des Eluats wurde die Säule durch Zentrifugation getrocknet. Die Säule wurde in ein frisches 1,5ml Eppendorfgefäß überführt und 50µl H₂O (reinst) direkt auf den Filter pipettiert. Nach Inkubation für 1min bei RT wurden die Ansätze bei 16000xg für 1min zentrifugiert.

2.3.4.8 Kontrollverdau des hergestellten EGFP_pSP73/A64/NotI-Vektors

Um die in der Minipräparation gewonnenen Plasmide auf das EGFP-Konstrukt zu untersuchen, wurden je 2µl DNA aus der Minipräparation mit 2µl 10x Enzympuffer und 0,5µl HindIII und 0,5µl EcoRI in einem 20µl-Ansatz für 2h bei 37°C verdaut. Die Ansätze wurden zusammen mit einem 10kb- und 100bp-Größenstandard sowie dem isolierten EGFP-Konstrukt und dem aufgereinigten pSP73/A64/NotI-Vektor aus der Gelextraktion auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Das Gel wurde bei 200V und 60min aufgetrennt. Bei erfolgreicher Klonierung sollten sich 2 Banden auf Höhe des pSP73/A64/NotI-Vektors und des EGFP-Konstruktes pro Ansatz zeigen.

2.3.4.9 Lagerung von Vektoren in Bakterien-Glycerinkultur

1ml Flüssigkultur aus der Maxipräparations-LB-Kultur wurde mit 1ml autoklaviertem Glycerin (Merk, Darmstadt) in einem gut verschließbaren 2ml-Vial gemischt und sofort auf Trockeneis gestellt. Nach 5 min wurde das Vial in den -80°C Kühlschrank überführt.

Um die Bakterien erneut in Kultur zu bringen, wurde der auf Trockeneis gelagerten, gefrorenen Glycerinkultur unter sterilen Bedingungen ein Aliquot entnommen und in eine ampizillinhaltige LB-Flüssigkultur überführt. Die Kultur wurde 16h im 37°C im Brutschrank schüttelnd inkubiert.

2.3.4.10 Lagerung von Vektoren auf Filterpapier

20µg DNA-Lösung wurden auf ein sauberes Blatt Filterpapier getropft, die betreffende Stelle mit einem Bleistift gekennzeichnet und bei RT getrocknet. Das Filterpapier wurde anschließend in Klarsichtfolie eingewickelt und kann so bei RT gelagert werden.

Zum Wiederverwendung des Vektors wurde der Filter zerschnitten und in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt. Es wurden 200µl EB-Puffer zugesetzt und der Ansatz

15min bei RT inkubiert, um die Plasmide in Lösung zu bringen. Nach Zentrifugation für 5min bei Höchstgeschwindigkeit in einer Eppendorf-Tischzentrifuge und Überführen des Überstandes in ein neues 1,5ml-Eppendorfgefäß wurde eine Hitzeschocktransformation (2.3.4.1) angeschlossen.

2.3.5 Klonierung von humanem CD70

2.3.5.1 Isolation von Gesamt-RNA aus BLCL-Zellen

BLCL-Zellen wurden durch Transformation von B-Zellen mittels attenuiertem EBV-Virus aus der Affenzelllinie B95-8 hergestellt⁷². Aus der CD70-exprimierenden BLCL-Zelllinie wurde die Gesamt-RNA mit Hilfe des RNeasy Maxi Kit (Qiagen, Hilden) nach Angabe des Herstellers isoliert.

Für die Herstellung des gebrauchsfertigen RLT-Puffers wurden 10µl β-Mercaptoethanol mit je 1ml RLT-Puffer gemischt. Die BLCL-Zellen wurden geerntet, 1x in PBS gewaschen und gezählt. 5×10^6 BLCL-Zellen wurden in 350µl RLT-Puffer vollständig lysiert und durch Zugabe von 350µl 70%(v/v) Ethanol die DNA denaturiert. Die Probe wurde homogenisiert und 700µl des Homogenisats auf eine RNeasy Mini Säule pipettiert. Nach Zentrifugation für 15sec bei 16000xg in der Eppendorf-Tischzentrifuge und Verwerfen des Eluats wurden 700µl Puffer RW1 auf die Säule pipettiert und diese für 15sec bei 16000xg zentrifugiert. Nach Umsetzen in ein neues 2ml-Eppendorfgefäß wurde die Säule 2x mit je 500µl Puffer RPE bei 16000xg für 15sec zentrifugiert, erneut in ein frisches Eppendorfgefäß umgesetzt und bei gleicher Geschwindigkeit 2min durch Zentrifugation getrocknet. Nach Umsetzen in ein steriles 1,5µl Eppendorfgefäß wurden 50µl H₂O (reinst) auf die Mitte des Filters pipettiert und die Säule nach 1-minütiger Inkubation bei RT und Höchstgeschwindigkeit eluiert. Die Quantifizierung der gewonnenen Gesamt-RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm (2.3.2).

2.3.5.2 Herstellung von CD70-cDNA

Für die reverse Transkription von CD70-mRNA in cDNA wurde das First Strand cDNA-Synthese Kit von Amersham (Amersham Biosciences Europe, Freiburg) verwendet. Für einen 20µl Ansatz wurden 2µl 10xPuffer mit 2µl dNTP-RandomMix, 2µl pd(N6)Primer sowie 1µl Reverse Transkriptase zu 1,0µg BLCL-Gesamt-RNA gegeben. Der Ansatz wurde 1h bei 37°C inkubiert und für die Amplifizierung der CD70-cDNA eine PCR angeschlossen.

2.3.5.3 PCR

Für die Amplifizierung der CD70-cDNA wurden die in der Tabelle angegebenen Primer verwendet. Die Schnittstellen für die angegebenen Restriktionsenzyme liegen bei Primerpaar AH2 innerhalb der 5'- und 3'-nicht-kodierenden Bereiche des CD70-Gens. Das Primerpaar UW2 führt die Schnittstellen SmaI und SacI dagegen neu in die 5'- und 3'-nicht-kodierenden Bereiche des CD70-Gens ein.

| Primer | Sequenz | Restriktions- enzym | Sequenz der Schnittstelle |
|--------|----------------------------|------------------------|------------------------------------|
| 5'-AH2 | 5'-GTTGAAGCAAGTAGACGCCC-3' | SmaI | 5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5' |
| 3'-AH2 | 5'-GGCCCCTGTGTGTACACTTT-3' | ApoI | 5'-Pu AATTPy-3' 3'-PyTTAA Pu-5' |
| 5'-UW2 | 5'-GATCGCCCCGGGCGATGC-3' | SmaI | 5'-CCC GGG-3' 3'-GGG CCC-5' |
| 3'-UW2 | 5'-GAGCTCAGGGGCGCACC-3' | SacI | 5'-GAGCT C-3' 3'-C TCGAG-5' |

Für die PCR wurde das HotStarTaq PCR Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt. Es wurden je Primerpaar 10 Ansätze á 50µl angesetzt. Dazu wurden pro 50µl-Ansatz 25µl MasterMix mit je 50pmol 5'-Primer, 50pmol 3'-Primer und 50ng cDNA-Ansatz aus der reversen Transkription gemischt. Alle Proben wurden zentrifugiert und die CD70-cDNA mit folgendem PCR-Programm amplifiziert.

Aktivierung der Taq-Polymerase: 95°C für 15min

Schmelztemperatur: 94°C für 30sec

Annealing: 60°C für 30sec

Elongation: 72°C für 1min

Anzahl der Zyklen: 35

Deckeltemperatur: 110°C

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben auf 4°C abgekühlt. Die Ansätze wurden nachfolgend vereint, mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und in 50µl H₂O (reinst) aufgenommen. Zur Kontrolle der PCR wurden je 10µl des gewonnenen PCR-Ansatzes mit 2µl Ladepuffer (6x) und 2µl H₂O (reinst) auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen.

2.3.5.4 Klonierung von CD70-cDNA in den pCR2.1 TOPO-Vektor

Um die Klonierung in den Zielvektor pSP73/A64/NotI zu erleichtern, wurde die in der PCR amplifizierte CD70-cDNA zunächst in dem pCR2.1 TOPO-Vektor vermehrt. Es wurde das TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe) eingesetzt. Die Insertion von PCR-Produkten in den TOPO-Vektor erfolgt nach folgendem Prinzip. Der pCR2.1 TOPO-Vektor liegt als linearisiertes Molekül vor und besitzt an den 3'-Enden eine 5'-CCCTT-Sequenz. Am 3'-Thymidin ist eine Topoisomerase über den Phosphatrest gebunden. Während der PCR wurde durch die Taq-Polymerase an die 3'-Enden der PCR-Produkte jeweils ein Adenosinnukleotid eingebaut. Dieses kann mit dem 3'-Thymidin im Vektor durch komplementäre Basenpaarung in Wechselwirkung treten. Durch die räumliche Annäherung wird die Hydrolyse der Phosphat-Topoisomerasebindung möglich. Die freiwerdende Energie wird für die Ligation des Inserts in den TOPO-Vektor verwendet.

Für den Ligationsansatz wurden je 4µl CD70-cDNA mit 1µl Salzlösung und 1µl pCR2.1 TOPO-Vektor in einem 10µl Ansatz gemischt und 5min bei RT inkubiert. Als Kontrolle wurde ein Ligationsansatz ohne CD70-cDNA mitgeführt. Es wurde eine Hitzeschocktransformation in One Shot[®] E.coli (im Kit enthalten) nach Protokoll 2.3.4.1 durchgeführt. Die Transformanten wurden auf vorgewärmten ampizillinhaltigen LB-Agarplatten ausgespatelt, auf denen zuvor 50µl X-Gal-Lösung (4mg/ml in DMF) ausgestrichen wurden. Die Platten wurden 16h bei 37°C inkubiert und durch Blau-/Weiß-Selektion diejenigen Klone ausgewählt, die den pCR2.1 TOPO-Vektor mit insertierter CD70-cDNA enthalten.

2.3.5.5 Überprüfung der Klonierung des CD70-Konstruktes in den pCR2.1 TOPO-Vektor durch eine Bakterien-PCR

Zur schnellen Überprüfung der Transformanten wurde zeitgleich zum Ansatz der Kulturen für die Minipräparation für die Restriktionskontrolle eine Bakterien-PCR durchgeführt. Dazu wurden weiße Kolonien mit einem Holzstab gepickt, kurz der Boden eines PCR-Vials damit berührt, bevor die ampizillinhaltige 4ml-LB-Flüssigkultur für die Minipräparation angeimpft wurde.

Für die PCR wurden 10µl MasterMix sowie je 1µl (20pmol) des jeweiligen Primers in einem 20µl Ansatz zu den Bakterien pipettiert. Die Ansätze wurden mit dem oben beschriebenen PCR-Programm gefahren. Für die Überprüfung im Agarosegel wurden die Ansätze mit je 3µl Ladepuffer (6x) versetzt und vollständig aufgetragen.

2.3.5.6 Restriktion des pCD2.1 TOPO-Vektors zur Umklonierung von CD70 in den Zielvektor pSP73/A64/NotI

Für die Umklonierung der CD70-cDNA aus dem pCR2.1 TOPO-Vektor in den Zielvektor pSP73/A64/NotI wurden zunächst Plasmide aus einem Klon je Primerpaar, der in der Bakterien-PCR bestätigt worden ist, mittels Minipräparation gewonnen (2.3.4.7). Diese Klone wurden mit den jeweiligen Restriktionsenzymen sukzessive geschnitten, da die Temperaturoptima für die verwendeten Restriktionsenzyme unterschiedlich waren.

Restriktion für den CD70(AH2)_pCR2.1 TOPO-Vektor

Je 25µl CD70(AH2)_pCR2.1 TOPO-Vektor wurden mit 2µl SmaI in einem 50µl Ansatz mit 5µl Enzympuffer über Nacht bei RT inkubiert, die Ansätze mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit aufgereinigt und in 50µl H₂O (reinst) aufgenommen. Je 15µl des geschnittenen Vektors wurden mit 2µl APOI, 2µl Enzympuffer und 0,2µl BSA (100x) in einem 20µl Ansatz bei 50°C über Nacht inkubiert.

Restriktion für das Primerpaar UW2

Für den CD70(UW2)_pCR2.1 TOPO-Vektor wurden 25µl zunächst ebenfalls mit SmaI wie oben angegeben geschnitten und aufgereinigt. Anschließend wurden je 15µl des Vektors mit 2µl Puffer 4, 0,2µl BSA (100x) und 2µl SacI in einem 20µl Ansatz bei 37°C über Nacht inkubiert.

Alle Restriktionsansätze wurden in einem Agarosegel überprüft.

2.3.5.7 Umklonierung der CD70-Konstrukte aus dem pCR2.1 TOPO-Vektor in den Zielvektor pSP73/A64/NotI

Der Zielvektor pSP73/A64/NotI, in den die CD70-Konstrukte kloniert werden sollten, um die Herstellung von polyadenylierter CD70-mRNA zu ermöglichen, wurde in gleicher Weise wie unter 2.3.5.6 beschrieben sukzessive geschnitten und anschließend dephosphoryliert (2.3.4.4).

Je 10µl aller Doppelrestriktionen sowie der dephosphorylierte Zielvektor wurden auf ein 1,5%iges LMP-Gel aufgetragen und bei 200V 60min getrennt.

Die Extraktion aus dem LMP-Gel erfolgte wie unter 2.3.4.5 beschrieben. Für die Ligation wurden der entsprechend geschnittene Zielvektor mit dem in gleicher Weise geschnittenen CD70-cDNA-Konstrukt im Verhältnis 1:4 gemischt, in einem 10µl Ligationsansatz wie unter 2.3.4.6 beschrieben ligiert. Die Ligationsansätze wurden in E.coli XL-1 blue transformiert (2.3.4.1), auf ampizillinhaltigen LB-Agarplatten ausplattiert und 16h bei 37°C inkubiert.

Je 12 Klone wurden sowohl von dem CD70(AH2)_pSP73/A64/NotI-Vektor als auch von dem CD70(UW2)_pSP73/A64/NotI-Vektor in einer Minipräparation

aufgearbeitet und eine Restriktion wie unter 2.3.5.6 durchgeführt. Die gewonnenen geschnittenen Vektoren wurden auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Als Kontrollen wurden der leere, dephosphorylierte pSP73/A64/NotI-Vektor sowie das jeweilige CD70-cDNA-Konstrukt und ein Größenstandard ebenfalls aufgetragen. Jeweils Klon 1 wurde in einer Maxipräparation vermehrt (2.3.4.2) und der gewonnene CD70_pSP73/A64/NotI-Vektor für die Herstellung von CD70-mRNA wie unter 2.3.1 beschrieben eingesetzt.

2.4 Material für zellbiologische Methoden

2.4.1 Zelllinien und Blutpräparate

2.4.1.1 Zelllinien

| Zelllinien | Beschreibung |
|----------------|---|
| K562-Zellen | MHC-I und MHC-II defiziente Zelllinie aus dem Pleurapunktat eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie im Blastenstadium. Die Zelllinie wird allgemein als NK-Targetzelle eingesetzt. In dieser Arbeit wurden die Zellen zur Prüfung der Expression von transfizierter mRNA eingesetzt. |
| BLCL-Zelllinie | Durch Transformation von B-Zellen mit attenuierten EBV-Virus aus der Affenzelllinie B95-8 hergestellte Zelllinie, die konstitutiv CD70 auf der Oberfläche exprimiert. |

2.4.1.2 Apheresen

Apheresen wurden durch die Transfusionsmedizin, UK-SH Kiel zur Verfügung gestellt. Alle Spender waren HLA-A2 positiv.

Die ELUTRA-Separation wurde durch die Arbeitsgruppe Dr. Humpe, Mildred Scheel Haus, UKSH, Campus Kiel durchgeführt.

2.4.2 Puffer, Medien und Zusätze

| Puffer und Medien | Firma |
|------------------------------|----------------------------------|
| RPMI 1640 mit L-Glutamin | PAA, Pasching, Österreich |
| Leukozyten-Separationsmedium | PAA, Pasching, Österreich |
| AIM-V-Medium | Invitrogen, Karlsruhe |
| Opti-MEM | Invitrogen, Karlsruhe |
| X-VIVO 15 | Bio Whittaker, Verviers, Belgien |
| PBS | Cell Concepts, Umkirch |

| Zusätze | Firma |
|--------------------------------------|-----------------------|
| Penicillin/Streptomycin (100x) | Biochrom AG, Berlin |
| Gentamycin | Biochrom AG, Berlin |
| FKS | Biochrom AG, Berlin |
| Nichtessentielle Aminosäuren (100x) | Invitrogen, Karlsruhe |
| DMSO | Sigma-Aldrich, Seelze |

2.4.3 Antikörper

2.4.3.1 Antikörper für die Durchflusszytometrie

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Antikörper für die Durchflusszytometrie von Caltag Laboratories, Hamburg bezogen. Zum Blocken wurde 10% Mausserum in PBS eingesetzt.

2.4.3.2 Aufreinigung mit Antikörper-Beads

Für die Isolierung von CD4-T-Zellen wurde das MACS-Isolationskit II der Firma Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach verwendet. Nicht-CD4-Zellen wurden mittels eines Antikörpercocktails markiert und über Avidin-Streptavidin an Magnetbeads gekoppelt. Die Gewinnung der nicht markierten CD4-T-Zellen erfolgte im magnetischen Feld.

2.4.3.3 Blockierungs-Antikörper

Maus anti-human CD70mAK, Klon HNE.51 sowie der Maus IgG1-mAK wurden von DAKO Cytomation GmbH, Hamburg bezogen.

2.4.3.4 Reagenzien für den ELISA

Die monoklonalen Antikörperpaare Anti-Human IL-10 sowie Anti-Human IL-12 wurden unkonjugiert als Catch-Antikörper und biotinyliert als Detektionsantikörper

eingesetzt. Alle Antikörper sowie die Horseradish Peroxidase und die TMB Substratlösung wurden von Endogen/ Perbio Science, Bonn bezogen.

2.5 Zellbiologische Methoden

2.5.1 Kultivierung von Zelllinien

Für die Kultivierung der Zelllinien wurde RPMI 1640 mit L-Glutamin versetzt mit 10% FKS und 100U/mL Penicillin sowie 100ng/ml Streptomycin eingesetzt. Die Zellen wurden jeden 3. Tag geteilt.

2.5.1.1 Herstellung von BLCL-Zellen

Das transformierende Epstein-Barr-Virus wurde aus Überständen der Affenzelllinie B95-8 gewonnen⁷². Die B95-8 Zelllinie sezerniert EBV-Virus, das jedoch attenuiert ist und sich in humanen Zellen nicht vermehren kann. Das Virusgenom wird jedoch zuverlässig in humane B-Lymphozyten eingebaut und transformiert diese zu schnell proliferierenden unsterblichen B-Zelllinien.

Die Affenzelllinie B95-8 wurde bis zur Konfluenz in RPMI+10%FCS+PS kultiviert. Um die Viren freizusetzen wurde die Kultur bei RT 3 Tage im Dunkeln inkubiert. Die Überstände wurden geerntet, bei 2800xg 15min zentrifugiert und sterilfiltriert, um alle B95-8 Zellen abzutrennen. 2×10^6 PBMC verschiedener Spender wurden in 400µl RPMI+10%FCS+PS in einem Schrägröhrchen (Nunc, Wiesbaden) resuspendiert und 1ml Virusüberstand zugesetzt. Nach Inkubation für 24h bei 37°C/5%CO₂ wurden 2,8µg/ml Cyclosporin A (Sandoz, Nürnberg) zugesetzt, um die CTL-Antwort zu unterdrücken. Der Ansatz wurde 1 Woche bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden in Spitzröhrchen überführt und bei 250xg für 10min zentrifugiert. Das Pellet wurde in frischem RPMI+10%FCS+PS versetzt mit 1µg/ml Cyclosporin A resuspendiert und die Zellen weitere 4-6 Wochen kultiviert. Bei Bedarf wurde frisches Medium zusetzt. Waren mehr als 50% der Zellen in der Kultur vital (beginnende Proliferation der BLCL-Zelllinie), so erfolgte die Umsetzung der BLCL-Zelllinie in T25-Zellkulturflaschen.

2.5.2 Gewinnung von Leukozyten aus dem Aphereseprodukt

Die Zellsuspension wurde aus dem Apheresebeutel steril in eine T175-Zellkulturflasche überführt und mit PBS auf ein Endvolumen von 560ml aufgefüllt. In 50ml-Falconröhrchen wurden je 15ml Lymphozyten-Separationsmedium vorgelegt und mit je 35ml der verdünnten Zellsuspension überschichtet. Die Röhrchen wurden bei 900xg und RT für 20min ohne Bremse zentrifugiert, der Lymphozytenring in neue 50ml-Falconröhrchen überführt und die Zellen 3x mit PBS

bei 250xg gewaschen. Zur Zellzahlbestimmung und anschließender Kultur wurden die Zellen in AIM-V aufgenommen. Nicht benötigte Zellen wurden kryokonserviert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.3 Kryokonservierung von Zellen

Autologes Plasma wurde für die Kryokonservierung der aufgearbeiteten Zellen aus dem Aphereseprodukt bzw. der ELUTRA-Separation verwendet. Es wurde aus dem Plasmabeutel steril in 50ml-Falconröhrchen überführt und für 30min bei 56°C hitzeinaktiviert. Die Röhrchen wurden auf Eis abgekühlt, bei 2700xg 20min zentrifugiert und die Überstände in frische 50ml-Falconröhrchen überführt.

Für die Kryokonservierung wurde eine Einfrierlösung (20%(v/v) DMSO in autologem Plasma) hergestellt und auf 4°C gekühlt. Die Zellen wurden bei 250xg zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 4°C kaltem autologen Plasma auf eine Zellkonzentration von maximal 4×10^8 Zellen/ml eingestellt. 1ml der Zellsuspension wurde in vorgekühlten Kryovials mit 1ml Einfrierlösung gemischt und in einem Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren.

Für die Kryokonservierung von Zelllinien wurde statt autologem Plasma FKS eingesetzt. Alle Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.4 Generierung von immaturren Dendritischen Zellen nach Monozytenadhärenz

Die aus dem Aphereseprodukt gewonnenen PBMC wurden für die Generierung von Dendritischen Zellen nach Monozytenadhärenz eingesetzt.

Soweit nicht anderes angegeben wurden 2×10^8 PBMC in eine T175-Zellkulturflasche in einem Gesamtvolumen von 35ml serumfreiem AIM-V für 2h bei $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$ kultiviert. Die nicht-adhärente Fraktion wurde durch Klopfen der Flasche und Spülen mit warmen PBS entfernt und die adhärenente Fraktion in 35ml AIM-V, versetzt mit 500U/ml IL-4 und 800U/ml GM-CSF, kultiviert. Am 3. und 7. Kulturtag wurden erneut 500U/ml IL-4 und 800U/ml GM-CSF zugesetzt. Für die Optimierung der Elektroporationsparameter wurden immature Dendritische Zellen am 4. Kulturtag geerntet. Für die Untersuchung der CD4-T-Zellantwort wurden die Zellen bis Tag 10 kultiviert, bevor die Maturationsagenzien zugesetzt wurden.

2.5.5 Generierung von immaturren Dendritischen Zellen nach ELUTRA-Separation

Die Anreicherung von Monozyten erfolgte durch differenzielle Zentrifugation mit Hilfe des ELUTRA™-Gerätes. Dabei werden die Zellen im Gegenstrom aufgrund ihrer Größe separiert. Es wurden 5 verschiedene Zellfraktionen hergestellt. Für die hier beschriebenen Versuche wurden die ELUTRA-Fraktion 2, welche die T-Zellfraktion enthält, sowie die ELUTRA-Fraktion 5, welche die Monozytenfraktion enthält, eingesetzt.

Für die Generierung von immaturren Dendritischen Zellen wurden Zellen aus Fraktion 5 steril in 50ml-Falconröhrchen überführt, bei 250xg pelletiert und in AIM-V aufgenommen. Je 1×10^8 Monozyten wurden in einer Triple-Flasche in 85ml Medium ausgesät und mit 500U/ml IL-4 und 800U/ml GM-CSF kultiviert. Am 3. und 7. Kulturtag wurden erneut 500U/ml IL-4 und 800U/ml GM-CSF zugesetzt. Am 10. Kulturtag erfolgte die Maturation durch Zusatz von Maturationsagenzien. Sollten iDC in die Kokultur eingesetzt werden, so wurden die Zellen ohne Maturationsagenzien bis Tag 11 weiterkultiviert.

2.5.6 Maturation von Dendritischen Zellen

Immature Dendritische Zellen wurden am 10. Kulturtag durch Zusatz eines Zytokincocktails, bestehend aus 2×10^5 U/ml $\text{TNF}\alpha$, 10ng/ml IL-1 β , 100U/ml IL-6 und 1 μ g/ml PGE_2 , maturiert. In einigen Fällen wurde für die Maturation 2×10^5 U/ml $\text{TNF}\alpha$ und 100ng/ml LPS (Sigma, Seelze) eingesetzt. Nach Inkubation für 16–24 Stunden wurden die maturierten Dendritischen Zellen geerntet, die Zellzahl mittels Trypanblau-Zellzählung bestimmt und für weitere Untersuchungen eingesetzt oder kryokonserviert.

2.5.7 Elektroporation von Dendritischen Zellen

Zellen können durch das Anlegen einer elektrischen Spannung mit geladenen Makromolekülen wie DNA, RNA oder Proteinen beladen, also transfiziert werden. So wurde bereits 1982 durch Neumann gezeigt, dass Maus-Lyoma-Zellen mit Herpes Simplex-Thymidin-Kinase kodierender DNA stabil transfiziert werden können, wenn ein starkes elektrisches Feld an die Zell-DNA-Suspension angelegt wird⁷³. Aus der mathematischen Beschreibung der Porenbildung in der Membran einer sphärischen Zelle werden die einflussnehmenden physikalischen Parameter erkennbar.

Die Bildung einer Pore wird durch die Oberflächenpolarisation der Zellmembran eingeleitet. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes wandern in der

Zellsuspension Ionen entsprechend ihrer Ladung, d.h. Kationen wandern zur Kathode, während Anionen zur Anode wandern. Bei ihrer Wanderung treffen die Ionen auf die in der Lösung vorliegenden Zellen, deren Plasmamembran für die Ionen undurchlässig ist. An der Plasmamembran werden die Ionen aufgehalten, und die Plasmamembran elektrisch aufgeladen. Induziert durch das elektrische Feld finden auch im Zytoplasma eine Wanderung von Ionen statt, so dass sich über der Plasmamembran eine Transmembranspannung $\Delta\varphi$ aufbaut (**Abb. 3**). Überschreitet diese Transmembranspannung einen kritischen Wert, so reißt die Membran auf und es bildet sich eine Pore.

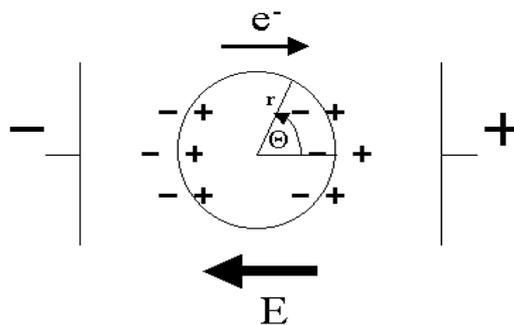


Abbildung 3: Oberflächenpolarisation sphärischer Zellen in einem homogenen elektrischen Feld nach Cimitrov⁷⁴.

Für sphärische Zellen gilt für die Transmembranspannung

$$\Delta\varphi = -\frac{3}{2} E \cdot r \cdot |\cos\Theta| \cdot f(\lambda) \quad 74$$

mit $\Delta\varphi$ = Transmembranspannung

E = Feldstärke

r = Radius der Zelle

$\cos\Theta$ = Winkel, mit dem das elektrische Feld auf die Zelle wirkt

$f(\lambda)$ = Funktion, die die Leitfähigkeit von Membran, Medium und Zytoplasma beschreibt.

Nach dem oben vorgestellten Modell der Oberflächenpolarisation ist die Transmembranspannung nicht nur von dem angelegten elektrischen Feld, sondern auch von der Zeit abhängig, in der der angelegte Polarisationsstrom fließt⁷⁴.

Danach ist die aufzuwendende elektrische Arbeit W_c zum Aufbau der kritischen Transmembranspannung, bei der eine Pore gebildet wird, gegeben durch

$$W_c = G_P \left(\frac{3}{2} r \right)^2 \cdot E_c^2 \cdot \Delta t \quad 74$$

mit G_p = Leitfähigkeit der Membranoberfläche
 r = Radius der Zelle
 E_c = kritische Feldstärke
 Δt = Pulszeit

Es wird deutlich, dass die zur Bildung einer Pore in der Plasmamembran aufzuwendende Arbeit proportional zum Quadrat der Feldstärke E ist, während die Pulszeit eine lineare Abhängigkeit zeigt.

Die zur Transfektion von mRNA eingesetzte Elektroporationsmethode sollte in dieser Arbeit hinsichtlich der Parameter Feldstärke, Pulszeit sowie der benötigten mRNA-Konzentration optimiert werden. Es sollte dabei eine möglichst hohe Transfektionsrate, also ein hoher Anteil an transfizierten Zellen bezogen auf die Gesamtzellpopulation, erreicht werden. Gleichzeitig sollte eine hohe Transfektionseffizienz erreicht werden, die als die Ausbeute an transfizierten Zellen nach Elektroporation definiert wird. Es sollte außerdem ermittelt werden, wie hoch die mRNA-Konzentration im Transfektionsansatz wenigstens sein muss, um eine hohe Transfektionsrate zu erzielen. Da die Feldstärke einen größeren Einfluss auf die Bildung einer kritischen Transmembranspannung hat als die Pulszeit, wurden die Parameter in dieser Reihenfolge optimiert.

Zur Elektroporation wurden die Zellen gezählt und unmittelbar vor Elektroporation bei 85xg 3min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in Opti-MEM eingestellt. 200µl der Zellsuspension wurden mit der zu transfizierenden mRNA gemischt und in eine 0,4cm Elektroporationsküvette überführt.

Die Elektroporation erfolgte mit dem Genepulser II-RF-Modul, soweit nicht anders angegeben, bei optimierten Elektroporationsparametern von 240V und einer Pulszeit von 16ms mit 0% Modulation. Unmittelbar nach Elektroporation wurden 200µl Medium direkt in die Küvette gegeben, um die Salzkonzentration im Ansatz zu heben. Die Zellen wurden umgehend in frisches Medium überführt und je nach Verwendung weiterkultiviert oder für die Versuche eingesetzt.

Für die Optimierung der Elektroporation wurden je 2×10^6 EGFP-mRNA transfizierte immature Dendritische Zellen in je 3ml Maturationsmedium (AIM-V + 2×10^5 U/ml TNF α , 10ng/ml IL-1 β , 100U/ml IL-6 und 1 μ g/ml PGE $_2$) aufgenommen und 16h inkubiert. Die Zellen wurden mit Versene (Invitrogen, Karlsruhe) vollständig geerntet, und nach Zellzahlbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest die EGFP-Expression sowie der Anteil an toten Zellen nach Zusatz von 1 μ l Propidiumjodid (1mg/ml) durchflusszytometrisch gemessen.

Die Transfektion von K562-Zellen erfolgte nach identischem Protokoll, jedoch wurde hier nach Transfektion keine Maturationsagenzien zugesetzt.

Für die Untersuchungen zur Phänotypisierung und Expressionsstärke nach Elektroporation wurden zytokinmaturierte Dendritische Zellen nach Elektroporation in 3ml AIM-V resuspendiert, die pro Well einer 6-Well-Platte vorgelegt wurden.

Für die Kokulturversuche wurden die Dendritischen Zellen nach Elektroporation in 9ml warmem AIM-V-Medium aufgenommen, das in einem Spitzröhrchen vorgelegt worden war. Die Zellen wurden bei 85xg 5min zentrifugiert, die Zahl an viablen Zellen mittels Trypanblau-Ausschlusstest ermittelt und für die Kokultivierung eingesetzt.

Zur Untersuchung der Expressionskinetik wurden CD70-mRNA transfizierte zytokinmaturierte Dendritische Zellen 3h nach Transfektion durch Zusatz von 2%(v/v) Formaldehyd in PBS (steril) im Verhältnis 1:1 fixiert. Nach Inkubation für 5min bei 4°C wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden zusammen mit nicht transfizierten und transfizierten, aber nicht fixierten DC für 24h inkubiert und nachfolgend durchflusszytometrisch untersucht.

2.5.8 Separation von CD4-T-Zellen mit MACS-Beads

CD4-T-Zellen wurden mit dem MACS Isolationskit II (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

T-Zellen aus ELUTRA-Fraktion 2, die am Vortag aufgetaut und über Nacht in AIM-V kultiviert wurden, wurden bei 250xg 5min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Pellet in 40µl kaltem, sterilen Separationspuffer (0,5% BSA, 2mM EDTA in PBS, pH7,2) je 1×10^7 Zellen resuspendiert.

10µl des Biotin-AK-Cocktails, bestehend aus monoklonalen Antikörpern gegen CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ und Glycophorin A, wurden zu je 1×10^7 Zellen pipettiert, gemischt und bei 4°C 10min inkubiert. Der Ansatz wurde mit 30µl Separationspuffer je 1×10^7 Zellen aufgefüllt und 20µl Anti-Biotin Microbeads je 1×10^7 Zellen zugesetzt. Der Ansatz wurde gemischt und 15min bei 4°C inkubiert. 10ml Separationspuffer wurden zum Ansatz gegeben und bei 250xg für 5min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in 2ml kaltem Separationspuffer resuspendiert.

Für die Magnetseparation wurden MACS LS Säulen eingesetzt. Die Säule wurde nach Einbringen in das Magnetfeld mit 3ml kaltem Separationspuffer äquilibriert. Die Zellen wurden auf die Säule pipettiert und der Durchlauf in einem frischen 10ml Röhrchen gesammelt. Nach Durchlauf der Suspension wurde 3x je 3ml kalter Puffer auf die Säule gegeben. Die aufgefangene Fraktion wurde bei 250xg 5min zentrifugiert und in warmen AIM-V resuspendiert. Zur Bestimmung der Reinheit der Fraktion wurden die Zellen mit anti-CD4 und anti-CD3 gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht.

2.5.9 Kokultur von Dendritischen Zellen mit CD4-Zellen

Immature Dendritische Zellen und zytokinmaturierte Dendritische Zellen wurden an Tag 11 geerntet und gezählt. Ein Teil der mDC wurde nachfolgend mit CD70-mRNA elektroporiert.

1×10^5 Dendritische Zellen in AIM-V wurden pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert und nach 3h bei 37°C/5%CO₂ inkubiert, um die Expression von CD70 nach Transfektion zu ermöglichen. Danach wurden je $7,5 \times 10^5$ CD4-T-Zellen pro Well pipettiert. Zu einigen Wells wurde zusätzlich 10µl einer 200ng/ml SEB-Lösung in AIM-V zugesetzt. Die Endkonzentration von SEB im Ansatz betrug 10ng/ml. Die hierdurch entstandenen Volumenunterschiede zu den übrigen Wells wurden ausgeglichen. Die Kokultur wurde 24h bei 37°C/5%CO₂ kultiviert.

Nach 24h wurden die Überstände für die Bestimmung der IL-10- und IL-12-Konzentrationen gesammelt und bei -20°C bis zur Bestimmung mittels ELISA gelagert.

Die Zellen wurden in je 200 μl frischem AIM-V resuspendiert und in Spitzröhrchen überführt. Nach Waschen in 2ml warmen AIM-V wurden die Zellen für die Bestimmung der IFN γ /IL-4-Sekretion im Zytokinsekretionsassay und die Phänotypisierung nach Kokultivierung eingesetzt.

2.5.10 Blockierung von CD70 durch einen anti-hCD70mAK

Für die CD70-Blockierungsexperimente wurden 1×10^5 CD70-mRNA transfizierte mDC mit $7,5 \times 10^5$ CD4-T-Zellen wie unter 2.5.9 beschrieben in einem Well einer Mikrotiterplatte gemischt. In einige Wells wurde neben dem Zusatz von SEB je Well Maus IgG1 bzw. anti-hCD70-mAK, HNE.51 in einer Endkonzentration von 1,25 $\mu\text{g/ml}$ zugesetzt und die Kokulturen für 24h bei $37^{\circ}\text{C}/5\%\text{CO}_2$ inkubiert. Die hierdurch entstandenen Volumenunterschiede zwischen den Blockierungsansätzen und den Ansätzen ohne AK-Zusatz wurden ausgeglichen.

Die Zellen und Überstände wurden in gleicher Weise wie unter 2.5.9 beschrieben weiterverarbeitet.

2.6 Analytik

2.6.1 Bestimmung der Zellzahl

2.6.1.1 Bestimmung der Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlusstest

Für die Zellzahlbestimmung von viablen Zellen wurde die Trypanblau-Ausschlussfärbung eingesetzt. Die Zellmembran viabler Zellen ist intakt, so dass der Farbstoff nicht in die Zelle diffundieren kann. Daher erscheinen nur tote Zellen im Gesichtsfeld blau.

Für die Zellzählung wurde eine Verdünnung der Zellsuspension in Trypanblau hergestellt und in der Neubauer-Zählkammer 3 Großquadrate ausgezählt. Nach Mittelwertbildung wurde die Zellzahl nach folgender Formel berechnet:

Zellen im Großquadrat x Verdünnung x 10^4 = Zellen/ml.

2.6.1.2 Bestimmung der Zellzahl mit 3%iger Essigsäure

Für Zellsuspensionen, in denen die Anzahl von Leukozyten bestimmt werden sollte, die jedoch gleichzeitig einen hohen Anteil an Erythrozyten aufzeigten, wurde die Zellzählung in 3%iger Essigsäure in PBS vorgenommen. Hierdurch werden die Erythrozyten im Ansatz lysiert und bei der Zellzählung nicht erfaßt. Nachteil dieser Methode ist jedoch, dass eine Unterscheidung von lebenden und toten Leukozyten

nicht vorgenommen werden kann. Daher wurde diese Methode nur bei Bestimmung der Zellzahl nach Zellaufarbeitung aus dem Aphereseprodukt oder der ELUTRA-Separation eingesetzt. In diesen Fällen zeigten die Zellen erfahrungsgemäß eine hohe Viabilität.

2.6.1.3 Propidiumjodid-Färbung zur Bestimmung des Anteils an toten Zellen

Zur Bestimmung von toten Zellen mittels Durchflusszytometrie wurde die Propidiumjodid-Färbung eingesetzt. Propidiumjodid wird nur von Zellen aufgenommen, die eine geschädigte Zellmembran besitzen. Es emittiert Licht im roten Spektralbereich und kann daher fluorimetrisch erfasst werden.

Zur Bestimmung der Viabilität von Zellen nach Elektroporation wurden den Ansätzen 1µl Propidiumjodid (1mg/ml) zugesetzt. Die Fluoreszenzmessung wurde innerhalb von 30min nach Propidiumjodidzusatz durchgeführt, da Propidiumjodid selbst toxisch wirkt.

2.6.2 Nachweis von Oberflächenmolekülen mittels Durchflusszytometrie

2.6.2.1 Färbung im Facs-Röhrchen

Zur Bestimmung des Phänotyps wurden 3×10^5 Zellen in 100µl 10% Mausserum in PBS pro Facs-Röhrchen pipettiert. Je 5µl AK-Lösung wurden zugesetzt, gemischt und die Ansätze im Dunkeln bei RT 20min inkubiert. Die Röhrchen wurden mit PBS aufgefüllt und bei 141xg 5min zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände und nochmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 250µl PBS resuspendiert. Erfolgt die Messung nicht innerhalb der nächsten 24h, so wurden statt PBS 250µl 2%Formaldehyd in PBS zugesetzt, um die Zellen zu fixieren.

2.6.2.2 Färbung in 96-Well-Spitzbodenplatten

Nach Kokultivierung von DC mit T-Zellen stehen nur geringe Zellzahlen für die Bestimmung des Phänotyps der Zellen zur Verfügung. Um den Zellverlust zu minimieren, wurde die Färbung in einer 96-Well-Spitzbodenplatte durchgeführt.

$4,0 \times 10^4$ Zellen pro Well wurden pipettiert und die Platte mit 100µl PBS bei 141xg 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf Zellstoff geblottet und je 10µl der verdünnten AK-Lösungen (1:5 in 10% Mausserum in PBS) mit einer Multipette zugesetzt. Alle Zellen wurden mit einer Multikanalpipette resuspendiert und die Platte bei RT im Dunkeln für 20min inkubiert. Die Platte wurde bei 141xg 5min zentrifugiert und auf Zellstoff geblottet, um den Überstand zu entfernen. Je 100µl PBS werden in die Wells gegeben, die Pellets resuspendiert und die Platte bei 141xg 5min zentrifugiert. Nach nochmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden alle

Proben durch Zusatz von 100µl 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert und in 0,6ml-Röhrchen (Greiner, Kehlheim) überführt. Diese wurden in Facsröhrchen überführt und können nach Entfernen der äußeren Probennadel am Facs-Gerät, ohne Zusatz von weiterem Puffer und hierdurch bedingter Verdünnungen gemessen werden.

2.6.3 Nachweis der Zytokinsekretion

2.6.3.1 IFN γ -/IL-4-Sekretionsassay

Mit Hilfe des Zytokinsekretionsassays (Miltenyi Biotech GmbH, Bergisch Gladbach) können, im Gegensatz zu intrazellulären Färbungen, die von Zellen freigesetzte Zytokine detektiert werden. Zur Untersuchung der Zytokinsekretion werden die Zellen mit einem Catch-Antikörper beladen. Dieser besteht aus zwei IgG-Antikörpern, die an ihren Fc-Enden aneinander gekoppelt sind und sich in ihrer Spezifität unterscheiden. So erkennt und bindet ein AK an CD95, das auf allen Zellen exprimiert wird. Der zweite AK des AK-Konjugates ist dagegen spezifisch für das zu untersuchende Zytokin. Nach Beladen der Zellen mit dem Catch-AK wird eine einstündige Sekretionsphase angeschlossen, in der die vorstimulierten Zellen Zytokine freisetzen. Diejenigen Zytokine, die vom Catch-AK erkannt und gebunden werden, können nachfolgend mit einem Detektions-AK nachgewiesen werden. Der Detektions-AK besitzt dabei die gleiche Spezifität wie der Catch-AK, ist aber zusätzlich mit einem Farbstoff gekoppelt, so dass eine durchflusszytometrische Auswertung durchgeführt werden kann.

Der Zytokinsekretionsassay wurde nach den Angaben des Herstellers mit leichten Modifikationen eingesetzt. Nach 24-stündiger Kokultivierung von Dendritischen Zellen mit CD4-T-Zellen wurden die Zellen in 10ml-Spitzröhrchen überführt und mit warmem AIM-V gewaschen. Die Überstände wurden abgesaugt und die Zellen auf eine Konzentration von $3,3 \times 10^6$ /ml in AIM-V eingestellt. Je 80µl der Zellsuspension wurden in Facsröhrchen überführt und 20µl Catch-Matrix Reagenz Mix (IFN γ -Catch-AK+IL-4-Catch-AK im Verhältnis 1:1) zugesetzt. Die Röhrchen wurden mit Parafilm verschlossen und bei -20°C für 5min inkubiert. Zu allen Ansätzen wurden jeweils 500µl warmes AIM-V gegeben und die Ansätze bei 37°C für 1h inkubiert. Während der Inkubation wurden die Röhrchen alle 5-10min gemixt, um Zytokingradienten zu vermeiden. Nach beendeter Inkubation wurde die Zytokinsekretion durch Zusatz von 4ml kaltem PBS abgestoppt und die Ansätze in einer auf 4°C gekühlten Zentrifuge 5min bei 250xg zentrifugiert. Die Überstände

wurden abgesaugt, die Zellen in kaltem 100µl AIM-V resuspendiert und für die IFN γ /IL-4-Färbung in eine Spitzbodenplatte überführt.

Eine Dreifachfärbung mit den Antikörpern IFN γ -FITC, IL-4-PE und CD4-TC wurde wie unter 2.6.2.2 durchgeführt und die Proben nach Fixierung durchflusszytometrisch untersucht. Der Catch-AK (CD95) bindet ebenfalls an die im Ansatz vorliegenden DC. In der Auswertung wurden jedoch nur CD4-T-Zellen auf gebundenes IFN γ und IL-4 untersucht.

2.6.3.2 IL-10- und IL-12-ELISA

Nach 24-stündiger Kultivierung von Dendritischen Zellen mit CD4-T-Zellen wurden die Überstände aus den Dreifachansätzen geerntet und vereint. Die Überstände wurden bis zur Bestimmung bei -20°C gelagert.

Zum Beschichten wurden je 100µl der jeweiligen Antikörperlösung in einer Konzentration von 2µg/ml in PBS in die Wells einer PolySorp-Platte pipettiert. Die Platte wurde mit Folie versiegelt und über Nacht bei RT inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Platte geleert, auf Zellstoff ausgeschlagen und mit 200µl Blockingpuffer (4%BSA in PBS) je Well 1h bei RT geblockt. Die Platte wurde 3x mit je 200µl Waschpuffer (0,2% Tween20 in 50mM TrisHCl, pH 8,0) je Well gewaschen und gut auf Zellstoff ausgeschlagen. Für die Standardreihe wurden die Konzentrationen (1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,3, 15,6 und 7,8)pg/ml in Blockingpuffer als Doppelansätze in der Platte hergestellt. Je 50µl Überstand aus den Kokulturen wurden als Doppelbestimmung in die Platte pipettiert. Als Leerwert wurden 50µl Blockingpuffer mitgeführt. Die Platte wurde mit Folie versiegelt und bei RT 1h inkubiert. 50µl des jeweiligen biotinylierten 2. AK (0,5µg/ml in Blockingpuffer) wurden zu den Ansätzen pipettiert, ohne die Platte zu leeren. Die Platte wurde versiegelt, 1h bei RT inkubiert und anschließend 3x mit Waschpuffer gewaschen. Für die Detektion wurden je 100µl HRP-konjugiertes Streptavidin (1:10000 in Blockingpuffer) pro Well pipettiert, die Platte versiegelt und 30min bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen und Ausschlagen der Platte auf Zellstoff wurden je 100µl TMB-Lösung pro Well pipettiert, die Platte versiegelt und im Dunkeln bei RT für 30min inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von 20µl Stop Lösung (1M H₃PO₄) abgestoppt. Die Detektion erfolgte im ELISA-Reader bei 450nm (Hintergrund: 570nm) innerhalb von 30min.

3 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Zuge der Herstellung einer DC-basierten Tumorstoffimpfung die exogene Expression von CD70 in humanen Dendritischen Zellen durch Elektroporation von CD70-mRNA zu erreichen und nachfolgend die Auswirkung der CD70-Expression auf die Th1-Zytokinantwort durch Kokultivierung der transfizierten DC mit autologen CD4-T-Zellen zu untersuchen.

Um die Fragestellung zu bearbeiten wurde zunächst die Elektroporation von mRNA in Dendritische Zellen optimiert. Weitere Schritte bei der Bearbeitung der Fragestellung waren die Klonierung von humanem CD70 und die Überprüfung des Kokultursystems, bevor die Auswirkung der CD70-Expression auf die Zytokinsekretion untersucht wurde. Im Folgenden wird zunächst die Optimierung der Elektroporationsparameter dargestellt.

3.1 Optimierung der Elektroporationsparameter zur Transfektion von mRNA in Dendritische Zellen

Da ein Einsatz mRNA-transfizierter Dendritischer Zellen als Tumorstoffimpfung in klinischen Studien auch in Kiel geplant ist, sollte ein optimiertes Protokoll zur Elektroporation von mRNA in Dendritischen Zellen gefunden werden. Die zur Transfektion eingesetzte Elektroporationsmethode sollte hinsichtlich der Parameter Feldstärke, Pulszeit sowie der benötigten mRNA-Konzentration optimiert werden, so dass hohe Transfektionsraten und, bezogen auf die Zellausbeuten, hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden können.

Aufgrund der theoretischen Überlegungen zur Elektroporation (s. 2.5.7) hat die Feldstärke den größten Einfluss auf den Elektroporationserfolg, gefolgt von der Pulszeit und der vorliegenden RNA-Konzentration im Elektroporationsmedium. Daher wurden diese Parameter in der genannten Reihenfolge optimiert.

3.1.1 Umklonierung von EGFP aus pEGFP in pSP73/A64/NotI zur Herstellung polyadenylierter EGFP-mRNA

Für die Optimierung der Elektroporation wurde *enhanced green fluorescent protein* (EGFP)-mRNA eingesetzt, da das von dieser RNA translatierte Protein grün fluoresziert und durchflusszytometrisch direkt erfasst werden kann. Zur Herstellung ausreichender Mengen polyadenylierter EGFP-mRNA wurde die codierende EGFP-Sequenz zunächst in den Vektor pSP73/A63/NotI umkloniert. Dieser Vektor besitzt hinter der *multiple cloning site* (MCS) eine Poly-(A)-Sequenz. Daher kann nach

Restriktionsverdau strangabwärts von dieser Poly-(A)-Sequenz und nach anschließender *in vitro*-Transkription eine polyadenylierte mRNA mit definierter Länge und einer 5' cap-Struktur hergestellt werden.

Abb. 4 zeigt die Ergebnisse des Restriktionsverdaus nach Umklonierung des EGFP-Konstruktes aus dem pEGFP-Vektor in den pSP73/A64/NotI-Vektor. Dazu wurden die Klone der einzelnen Minipräparationen mit HindIII und EcoRI geschnitten und die Ansätze zusammen mit einem 10kb- und 100bp-Größenstandard sowie dem isolierten EGFP-Konstrukt und dem aufgereinigten pSP73/A64/NotI-Vektor auf ein Agarosegel aufgetragen. Alle Klone enthielten das 450bp große EGFP-Konstrukt. Für die Herstellung von polyadenylierter EGFP-mRNA wurde Klon 2 eingesetzt.

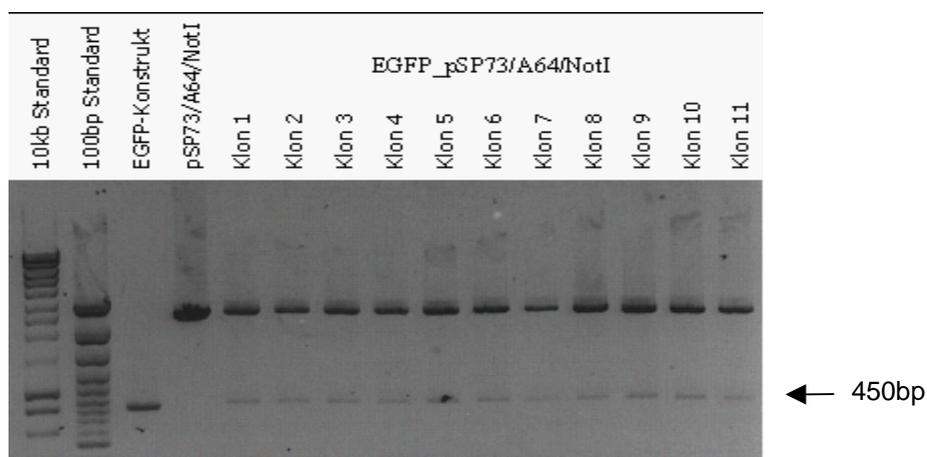


Abbildung 4: Restriktionsverdau mit HindIII und EcoRI nach Klonierung von EGFP in den RNA-Vektor pSP73/A64/NotI.

Nach Klonierung wurden 11 Minipräparationen mit HindIII und EcoRI geschnitten und die Ansätze zusammen mit einem 10kb- und einem 100bp-Größenstandard sowie dem isolierten EGFP-Konstrukt und dem aufgereinigten pSP73/A64/NotI-Vektor auf ein Agarosegel aufgetragen. Alle Klone zeigen das 450bp große EGFP-Konstrukt. Für die Herstellung von polyadenylierter EGFP-mRNA wurde Klon 2 eingesetzt.

3.1.2 Bestimmung der optimalen Feldstärke

Ausgangspunkt für die Optimierung der Elektroporation waren die Arbeiten von Van Tendeloo, der die Elektroporation von immaturren Dendritischen Zellen bereits mit hohen Transfektionsraten gezeigt hat⁶². Die dort beschriebenen Parameter wurden jedoch durch Optimierung der Elektroporation an K562-Zellen gewonnen, die zudem mittels Entladungspuls elektroporiert wurden. Bei Elektroporation mittels Entladungspuls wird der Gerätekapazität bei Stromfluss durch die gefüllte Elektroporationsküvette vollständig entladen. Hieraus ergibt sich eine über die Zeit exponentiell abfallende Spannungskurve. Bei dem für die hier beschriebene Optimierung eingesetzten Rechteckpuls bleibt die elektrische Spannung über die

Pulszeit hinweg dagegen konstant, da ein hochkapazitiver Kondensator eingesetzt wird, der sich nur teilweise entlädt. Diese zeitlich konstante Spannung kann zu einer vermehrten Bildung von Poren in der Zellmembran und dadurch bedingt zu einer verbesserten Transfektionsrate führen. Daher sollte die Optimierung der Elektroporationsparameter mittels Rechteckpuls und direkt an Dendritischen Zellen vorgenommen werden.

Um die optimale Feldstärke für die Elektroporation von Dendritischen Zellen festzustellen, wurden immaturen Dendritischen Zellen von zwei verschiedenen Spendern eingesetzt. Die Zellen wurden in einer Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/ml in OptiMEM eingestellt und je $200 \mu\text{l}$ der Zellsuspension mit $10 \mu\text{g}$ EGFP-mRNA bei konstanter Pulszeit von 10ms und variabler Feldstärke elektroporiert. Nach 16-stündiger Inkubation in Maturationsmedium, das die Zytokine IL-1 β , IL-6, PGE₂ und TNF α enthielt, wurden die Zellen vollständig geerntet und nach Propidiumjodidfärbung der Anteil toter Zellen sowie die EGFP-Fluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt. Die Transfektionsrate wurde dabei als der Anteil lebender EGFP-positiver Zellen an der Gesamtpopulation definiert. Die Viabilität errechnete sich durch Subtraktion des Anteils Propidiumjodid-gefärbter Zellen von 100.

Abb. 5 zeigt die Auftragung der Transfektionsrate bzw. Viabilität gegen die Feldstärke nach Elektroporation mittels Rechteckpuls. Eine messbare Transfektion von EGFP-mRNA wurde bei einer Feldstärke von $0,25 \text{ kV/cm}$ bei Zellen der Isolation 021026 bzw. bei $0,20 \text{ kV/cm}$ bei Zellen der Isolation 021111 nicht gefunden. Die Zellen beider Isolationen zeigten eine maximale Transfektionsrate bei einer Feldstärke von $0,5 \text{ kV/cm}$ (**Abb. 5**).

Bei Feldstärken $> 0,5 \text{ kV/cm}$ fällt für die Zellen der Isolation 021026 die Transfektionsrate bedingt durch die abnehmende Viabilität ab (**Abb. 5A**). Dagegen bleibt für die Zellen der Isolation 021111 die Viabilität auch bei hoher Feldstärke bei Werten über 90% (**Abb. 5B**).

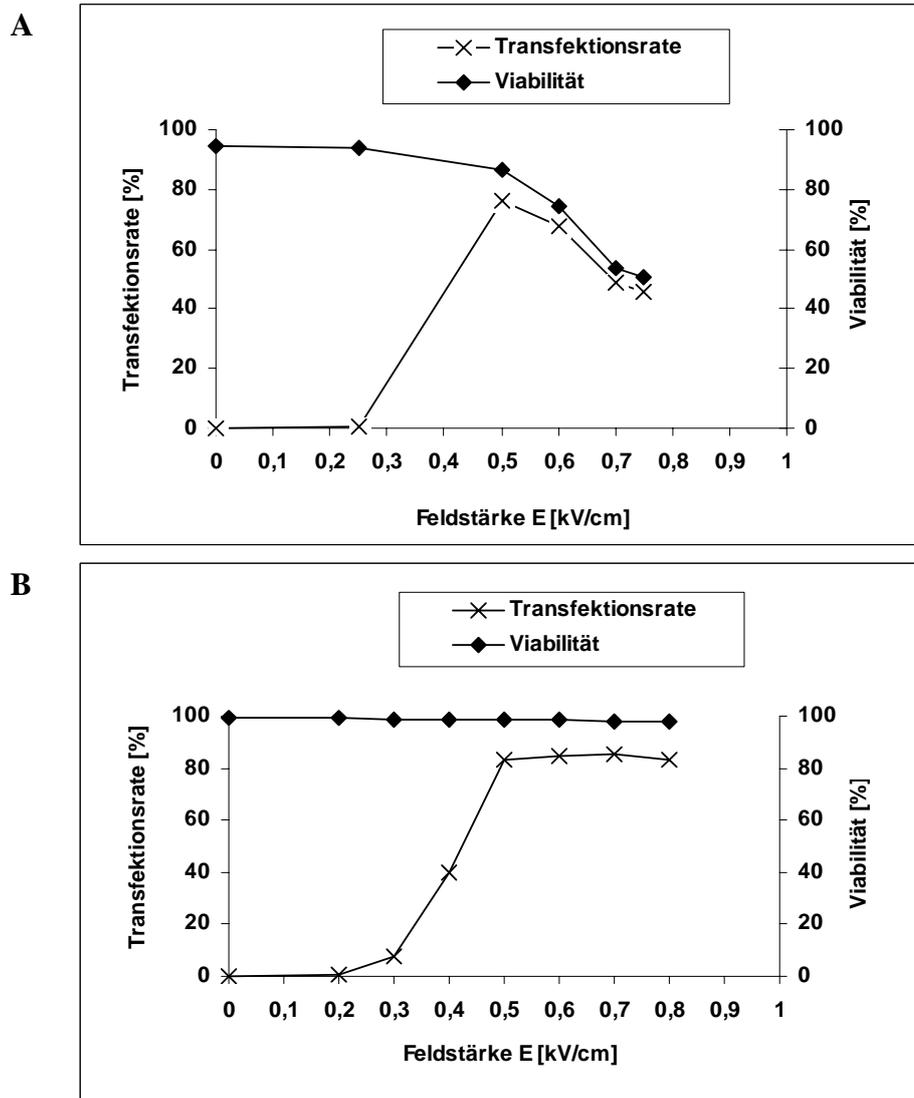


Abbildung 5: Abhängigkeit der Transfektionsrate und Viabilität von der Feldstärke nach EGFP-mRNA Transfektion mit Rechteckpuls.

Je 2×10^6 Zellen wurden in $200 \mu\text{l}$ OptiMEM mit $10 \mu\text{g}$ EGFP-mRNA bei variabler Feldstärke mit Rechteckpuls 10ms elektroporiert. Die Zellen wurden in Maturationsmedium 16 Stunden kultiviert und nach Propidiumjodidfärbung der Anteil an toten Zellen sowie die EGFP-Fluoreszenz durchflusszytometrisch gemessen. Die Transfektionsrate entspricht dem Anteil lebender EGFP-positiver Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation der Dendritischen Zellen. Die Viabilität errechnet sich durch Subtraktion des Anteils Propidiumjodid gefärbter Zellen von 100. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der Experimente mit Dendritischen Zellen der Isolationen 021026 (A) und 021111 (B).

Zur Bestimmung der optimalen Feldstärke sollten nicht allein die Transfektionsraten, also der jeweilige Anteil an viablen EGFP-positiven Zellen bezogen auf die Gesamtpopulation der Dendritischen Zellen, berücksichtigt werden, sondern ebenfalls die Zellausbeute nach Transfektion.

Aus diesem Grund wurde die Transfektionseffizienz definiert, die als Anteil der nach Transfektion und Inkubation wiedergefundenen transfizierten Zellen aller transfizierten Zellen definiert wurde. Sie spiegelt die Ausbeute an transfizierten Zellen nach Elektroporation wider. Durch Multiplikation der Transfektionsrate mit der mittels Trypanblau-Test bestimmten Zellausbeute nach Transfektion wurde die Transfektionseffizienz errechnet. Die für die jeweilige Messreihe aus **Abb. 5** berechneten Transfektionseffizienzen wurden nachfolgend gemittelt und erneut gegen die Feldstärke aufgetragen (**Abb. 6**).

Die optimale Feldstärke bezogen auf die Transfektionseffizienz wurde bei 0,6kV/cm gefunden und beträgt $35,3\% \pm 5,63\%$ (n=2).

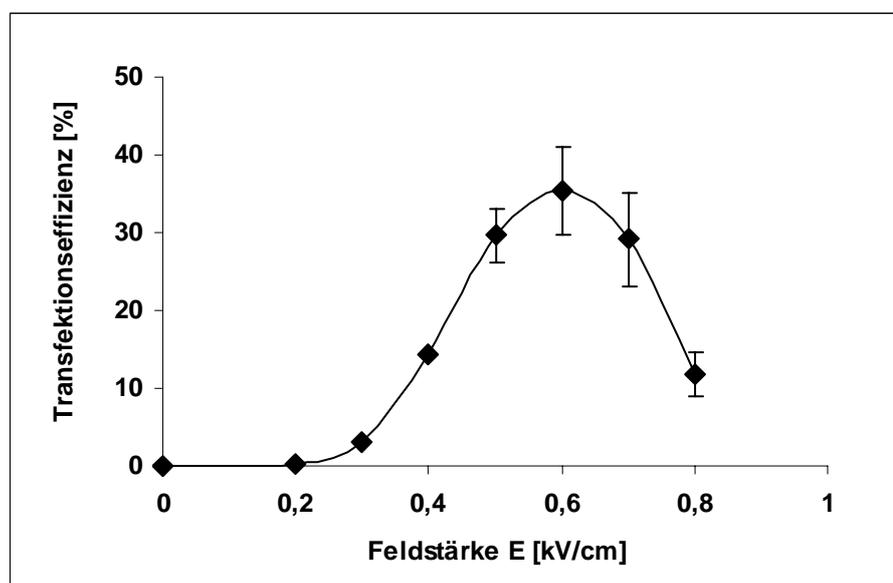


Abbildung 6: Bestimmung der optimalen Feldstärke bezogen auf die Transfektionseffizienz.

Für die Bestimmung der Transfektionseffizienz wurden die Transfektionsraten nach Rechteckpuls mit den dazugehörigen Zellausbeuten, bestimmt mittels Trypanblau-Test, multipliziert. Die für die einzelnen Feldstärken berechneten Transfektionseffizienzen der beiden Messreihen wurden gemittelt und erneut gegen die Feldstärke aufgetragen. Die optimale Feldstärke lag bei 0,6kV/cm mit einer Transfektionseffizienz von $35,3\% \pm 5,63\%$ (n=2).

3.1.3 Bestimmung der optimalen Pulszeit

Um eine möglichst starke Expression der transfizierten mRNA zu erreichen, sollte die Anzahl der mRNA-Kopien pro Zellen nach Transfektion möglichst hoch sein. Dies kann bei niedriger RNA-Konzentration im Elektroporationsansatz durch eine verlängerte Pulszeit erreicht werden, so dass mRNA im elektrischen Feld an die Zellmembran transportiert werden kann. Es wird daher eine möglichst lange Pulszeit

gesucht, die zu hohen Fluoreszenzintensitäten nach EGFP-Transfektion führt, ohne dass eine Zellschädigung, z.B. durch Erwärmung des Transfektionsansatzes, eintritt.

Zur Bestimmung der optimalen Pulszeit wurden daher immature Dendritische Zellen von zwei verschiedenen Spendern, wie oben beschrieben, mit 10 μ g EGFP-mRNA bei optimierter Feldstärke von 0,6kV/cm und variablen Pulszeiten von 0 bis 20ms mit Rechteckpuls elektroporiert. Die Zellen wurden in Maturationsmedium 16 Stunden kultiviert, vollständig geerntet und nach Propidiumjodidfärbung der Anteil an toten Zellen sowie die EGFP-Fluoreszenz und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) durchflusszytometrisch bestimmt.

In **Abb. 7A** sind die Mittelwerte der Transfektionsrate bzw. Viabilität von zwei unabhängigen Versuchen gegen die Pulszeit aufgetragen. Bereits nach 2ms beträgt die Transfektionsrate $70,9 \pm 3,1\%$ bei einer Viabilität von $96,4 \% \pm 0,8\%$. Diese Transfektionsrate liegt damit im Bereich der maximalen Transfektionsrate von $72,2\% \pm 2,1\%$.

In **Abb. 7B** ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) als Maß für die Anzahl an elektroporierter und translatierter EGFP-mRNA gegen die Pulszeit aufgetragen.

Die MFI steigt bei den Zellen der Isolation 030111 mit steigender Pulszeit annähernd linear bis zu einer Pulszeit von 16ms an. Für längere Pulszeiten bleibt die Abhängigkeit der MFI von der Pulszeit linear, jedoch fällt die Zunahme der MFI hier stärker aus. Die Ergebnisse aus Isolation 030119 zeigen die gleichen Zusammenhänge, jedoch wird der starke Anstieg der MFI erst nach 18ms beobachtet und die MFI sind insgesamt niedriger.

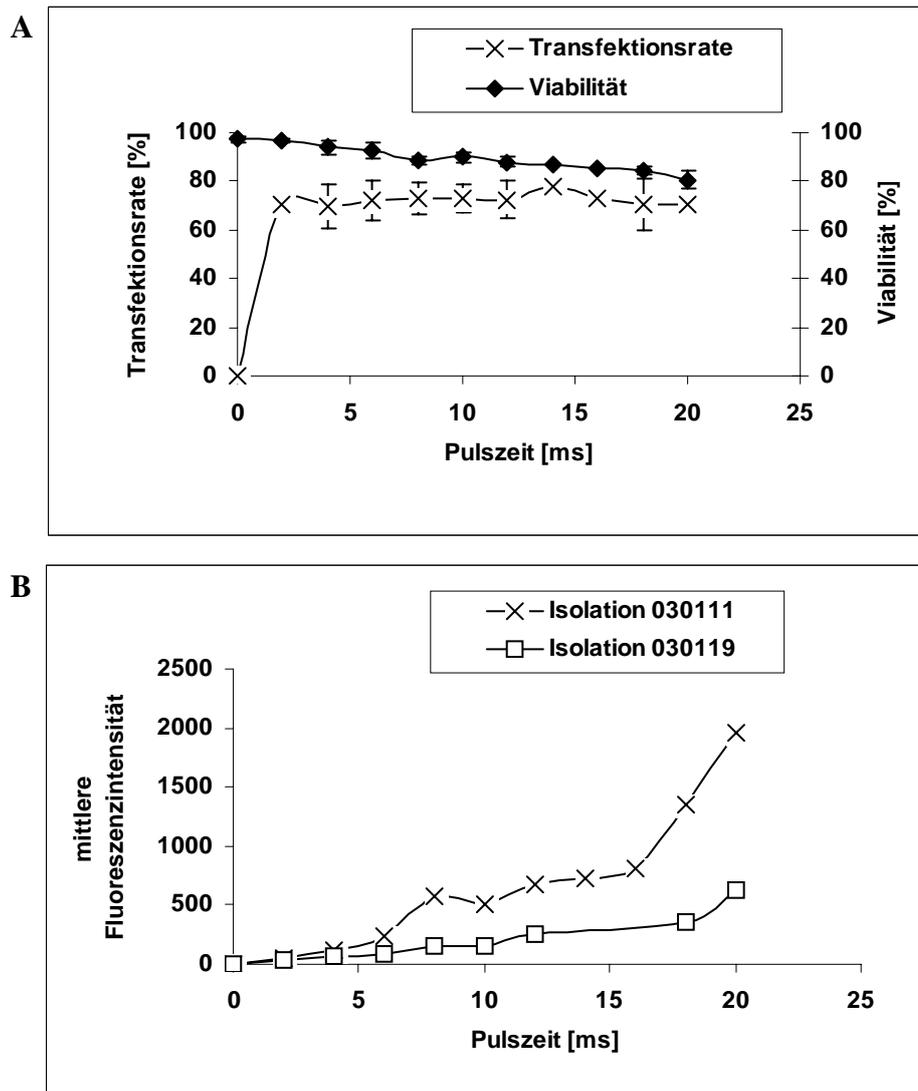


Abbildung 7: Abhängigkeit der mittleren Fluoreszenzintensität von der Pulszeit.

Je 2×10^6 iDC von zwei verschiedenen Spendern wurden in $200 \mu\text{l}$ OptiMEM mit $10 \mu\text{g}$ EGFP-mRNA bei einer Feldstärke von $0,6 \text{ kV/cm}$ und variabler Pulszeit mit Rechteckpuls elektroporiert. Die Zellen wurden 16 Stunden in Maturationsmedium kultiviert und nach Propidiumjodidfärbung die Viabilität, der Anteil EGFP-positiver Zellen (Transfektionsrate) sowie die Intensität der EGFP-Fluoreszenz (als mittlere Fluoreszenzintensität der Zellen) durchflusszytometrisch ermittelt. Für Isolation 030119 wurden die Messpunkte bei 14ms und 16ms nicht erhoben. Es wurden zwei unabhängige Experimente durchgeführt.

A: Auftragung der Transfektionsrate und Viabilität gegen die Pulszeit. Nach 2ms wurde eine Transfektionsrate von $70,9\% \pm 3,1\%$ erreicht ($n=2$).

B: Auftragung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) gegen die Pulszeit. Die MFI dient als Maß für die Menge an elektroporierter und translaterter EGFP-mRNA, die bei gegebener Pulszeit in die Zelle aufgenommen wird. Bis zu einer Pulszeit von 16ms verläuft die mittlere Fluoreszenzintensität annähernd linear, steigt dann jedoch stark an.

Eine Erwärmung des Elektroporationsmediums infolge des Anlegens einer elektrischer Spannung ist beschrieben⁷⁴ und kann Ursache für den stärkeren Anstieg der MFI bei langen Pulszeiten sein. In Anlehnung an das *Stokes'sche Gesetz* ist die Wanderungsgeschwindigkeit v eines sphärischen Partikels im elektrischen Feld einerseits von der Ladung Q und der anliegenden Feldstärke E , andererseits von der Reibungskraft, die dem Partikel durch das Medium entgegengesetzt wird ($6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta$), abhängig.

Es gilt:

$$v = \frac{Q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Übertragen auf die Transfektion von mRNA kann angenommen werden, dass die Viskosität η eines wässrigen Mediums durch dessen Erwärmung herabgesetzt wird, so dass mRNA-Moleküle im elektrischen Feld aufgrund der niedrigeren Reibungskräfte schneller wandern. Pro Zeiteinheit erreichen daher bei höherer Medientemperatur mehr mRNA-Moleküle die Zellmembran als bei niedrigerer Medientemperatur, wodurch die Wahrscheinlichkeit zur Transfektion steigt.

Aufgrund der Annahme, dass die Erwärmung des Transfektionsmediums die Ursache für den starken Anstieg der MFI bei langen Pulszeiten ist und dass eine zu starke Wärmeentwicklung zur Schädigung der Zellen führt, wurde diejenige Pulszeit als optimal festgesetzt, die die höchste MFI erzeugt und im weitgehend linearen Bereich aller MFI liegt. Die optimale Pulszeit wurde unter Berücksichtigung von Isolation 030111 daher auf 16ms festgelegt.

3.1.4 Bestimmung der optimalen mRNA-Konzentration

Zur Bestimmung der optimalen mRNA-Konzentration für die Transfektion von Dendritischen Zellen wurden wie beschrieben je 2×10^6 Zellen in 200 μ l OptiMEM bei den optimierten Parametern für die Feldstärke ($E = 0,6\text{kV/cm}$) und der Pulszeit ($t = 16\text{ms}$) mit Rechteckpuls elektroporiert. Die EGFP-mRNA-Konzentration im Transfektionsansatz wurden in dem Bereich von 0 bis 100 μ g/ml variiert. **Abb. 8** zeigt die Ergebnisse der Untersuchung von 4 unabhängigen Experimenten.

Eine durchschnittliche maximale Transfektionsrate von $73,0\% \pm 1,3\%$ wird ab einer mRNA-Konzentration von 15 μ g/ml erreicht. Der Zusatz von 3 μ g EGFP-mRNA zu einem 200 μ l Ansatz reicht damit aus, um diese maximale Transfektionsrate zu erreichen. Höhere mRNA-Konzentrationen verbessern die Transfektionsrate nicht, führen jedoch aufgrund der steigenden Anzahl der EGFP-mRNA-Moleküle zu einer

steigenden MFI (Daten nicht gezeigt). Für alle weiteren Untersuchungen wurde bei RNA-Konzentrationen von 50µg/ml gearbeitet, um Ungenauigkeiten während der Quantifizierung und Aliquotierung der mRNA auszugleichen.

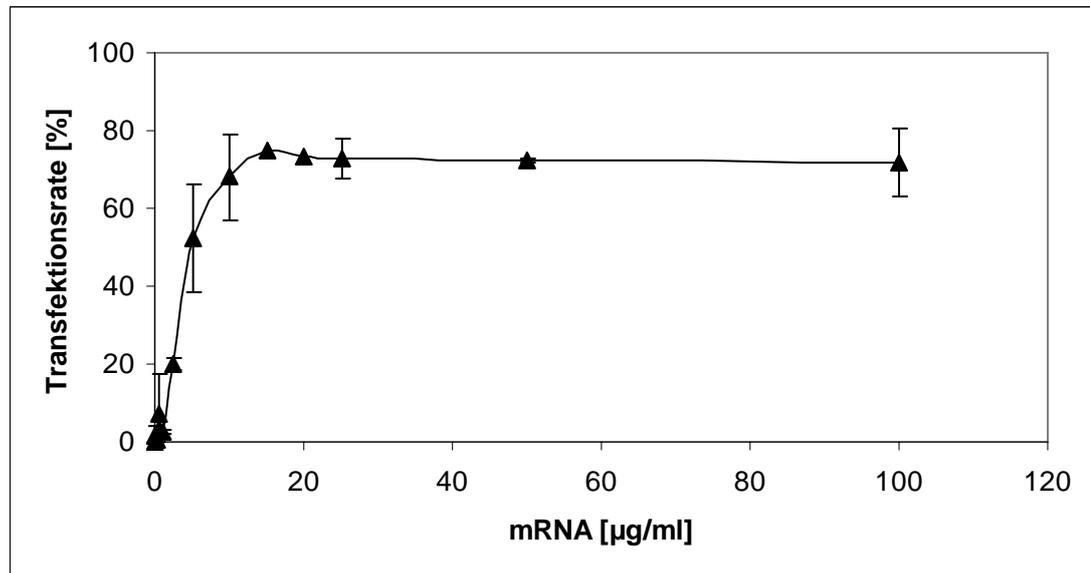


Abbildung 8: Abhängigkeit der Transfektionsrate von der mRNA-Konzentration.

Je 2×10^6 iDC wurden in 200µl OptiMEM bei den optimierten Parametern für die Feldstärke ($E=0,6\text{kV/cm}$) und der Pulszeit ($t=16\text{ms}$) mit variablen RNA-Konzentrationen mit Rechteckpuls elektroporiert. Die Zellen wurden anschließend in Maturationsmedium 16 Stunden kultiviert und nach Propidiumjodidfärbung die EGFP-Fluoreszenz durchflusszytometrisch ermittelt.

Ab einer EGFP-mRNA-Konzentration von 15µg/ml wird eine maximale Transfektionsrate von $73,5\% \pm 1,2\%$ erreicht. Höhere mRNA-Konzentrationen erhöhen die Transfektionsrate nicht. Gezeigt sind Mittelwerte von 4 unabhängige Experimente. Nicht jeder Messpunkt wurde vierfach gemessen.

3.1.5 Expression von polyadenylierter und nicht polyadenylierter EGFP-mRNA nach Elektroporation in Dendritische Zellen

Die Verwendung einer gecapten und polyadenylierten mRNA ist essentiell für den Transfektionserfolg⁶¹. Durch die Anlagerung von Poly-(A)-bindenden Proteinen (PABPs) an die Poly-(A)-Sequenz der mRNA werden im Zytoplasma „closed loop“-Strukturen gebildet, die die Translation der mRNA initiieren können⁷⁵. Weiterhin bewirkt die Bindung dieser PABPs einen Schutz vor Endo- und Exonukleasen und erhöht damit die Stabilität der mRNA.

Die Auswirkungen einer fehlenden Polyadenylierung auf die Expression der transfizierten mRNA in Dendritischen Zellen sollte im Folgenden gezeigt werden. Dazu wurde der Vektor EGFP_pcDNA3.1, der das Reportergen EGFP ohne nachfolgende Poly-(A)-Sequenz enthält, strangabwärts von EGFP mit BbsI

geschnitten und unter T7 Kontrolle *in vitro* transkribiert. Ein Aliquot der so hergestellten EGFP-mRNA wurde nachfolgend mit Poly-(A)-Polymerase I (E-PAP) am 3'-Ende polyadenyliert. Zur Kontrolle der Polyadenylierung wurden die E-PAP-behandelten und nicht behandelten EGFP-mRNA-Ansätze in einem denaturierenden Formaldehydgel aufgetrennt (**Abb. 9A**). Die verwendete nicht polyadenylierte EGFP-mRNA ist 1000bp groß. Durch Polyadenylierung werden mRNA-Moleküle von mehr als 1000bp erzeugt. Dies wird im Gel durch eine verbreiterte Bande sichtbar.

In **Abb. 9B** sind die Ergebnisse nach Transfektion der nicht polyadenylierten bzw. polyadenylierten EGFP-mRNA in K562-Zellen und immaturren Dendritischen Zellen gezeigt. Die Zellen wurden nach Transfektion über Nacht kultiviert, wobei die Dendritischen Zellen durch Zusatz eines Zytokincocktails zusätzlich maturiert wurden. Nur nach Polyadenylierung erfolgte die Expression von EGFP in Dendritischen Zellen. Obwohl K562-Zellen auch ohne Polyadenylierung eine geringe EGFP-Expression zeigten, konnte die MFI durch Polyadenylierung der transfizierten EGFP-mRNA deutlich gesteigert werden. In der Konsequenz stieg hierdurch auch die durch den Marker definierte Transfektionsrate an.

3.1.6 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Optimierung der Elektroporation

Die Elektroporationsmethode wurde im Hinblick auf die Parameter Feldstärke, Pulszeit und benötigte RNA-Konzentration optimiert. Bei einer Feldstärke von 0,6kV/cm (**Abb. 6**) und einer Pulszeit von 16ms (**Abb. 7B**) wird ab einer RNA-Konzentration von 15µg/ml eine optimale Transfektionsrate von 73,0% ± 1,3% (n=5) mit einer Viabilität von 83,1% ± 3,9% (n=5) und einer Transfektionseffizienz nach Optimierung der RNA-Konzentration von 33,3% ± 4,8% (n=5) (**Abb. 8**) erreicht. Voraussetzung für die starke Expression eines Proteins, insbesondere in Dendritischen Zellen, ist dabei die Verwendung einer polyadenylierten und gecapten mRNA.

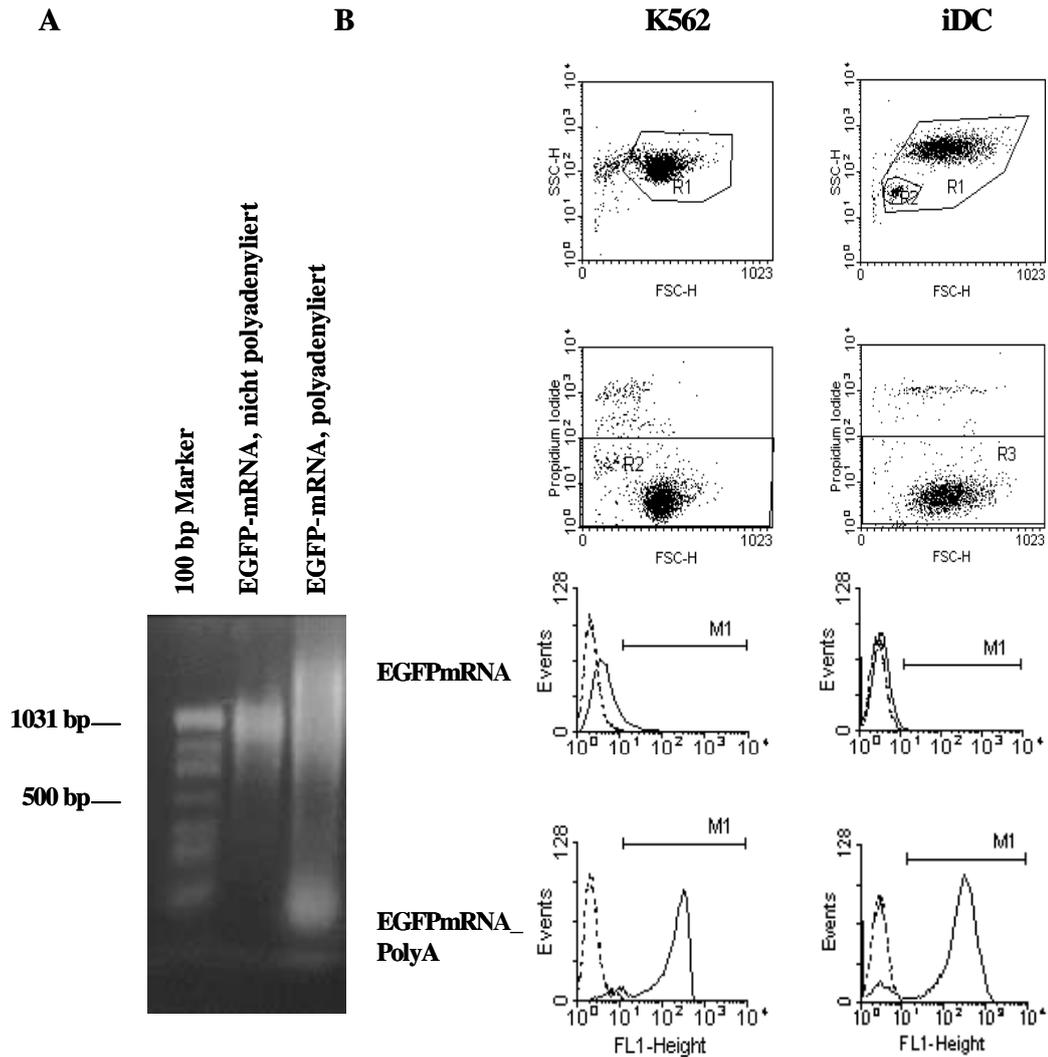


Abbildung 9: Nur polyadenylierte EGFP-mRNA wird nach Transfektion in DC translatiert.

A: Nachweis der *in vitro*-Polyadenylierung von EGFP-mRNA im Formaldehydgel. Zur Herstellung nicht polyadenylierter EGFP-mRNA wurde der EGFP_pcDNA3.1-Vektor strangabwärts von EGFP mit BbsI geschnitten und unter T7 Kontrolle *in vitro* transkribiert. Nach *in vitro*-Polyadenylierung wurden nicht polyadenylierte und polyadenylierte EGFP-mRNA auf ein Formaldehydgel aufgetragen. Ein 100bp Standard wurde mitgeführt. Die polyadenylierte EGFP-mRNA-Probe enthält Konstrukte, die deutlich länger als 1000bp sind.

B: Transfektion von K562 und iDC mit polyadenylierter bzw. nicht polyadenylierter EGFP-mRNA. Je 2×10^6 K562-Zellen bzw. iDC wurden mit $20 \mu\text{g}$ EGFP-RNA bzw. polyadenylierter EGFP-RNA transfiziert. Dendritische Zellen wurden in Maturierungscocktail 24 Stunden inkubiert und nach Zusatz von Propidiumjodid die Fluoreszenz durchflusszytometrisch ermittelt. Als Kontrolle wurden nicht transfizierte Zellen (gestrichelte Linie) mitgeführt. Es wurden nur lebende, großen Zellen für die Auswertung herangezogen.

3.2 Klonierung von humanem CD70

Für die Klonierung von humanem CD70 wurde Gesamt-RNA aus BLCL-Zellen eingesetzt, die durch Transformation von humanen B-Zellen mit attenuiertem EBV-Virus aus der Affenzelllinie B95-8 hergestellt wurden⁷². Diese B-Zelllinie exprimiert CD70 als membranständiges Molekül. Mittels reverser Transkription hergestellte CD70-cDNA enthält folglich die komplette Sequenz des CD70-Proteins inklusive der Information für die transmembrane Domäne. Die nach Klonierung in den pSP73/A64/NotI-Vektor hergestellte polyadenylierte CD70-mRNA führte konsequenterweise nach Transfektion zur Expression eines membranständigen CD70-Moleküls.

Im Folgenden sind die wichtigsten Teilergebnisse der CD70-Klonierung dargestellt.

3.2.1 Nachweis von CD70 auf BLCL-Zellen

Nach Generierung der BLCL-Zelllinie durch Transformation mit attenuiertem EBV-Virus aus der Affenzelllinie B95-8 wurde die membranständige Expression von CD70 auf der Zellmembran untersucht. **Abb. 10** zeigt den Nachweis von CD70 mittels Antikörperfärbung gegen CD70 und CD19, einem Oberflächenmarker für B-Zellen, sowie die Isotypkontrolle.

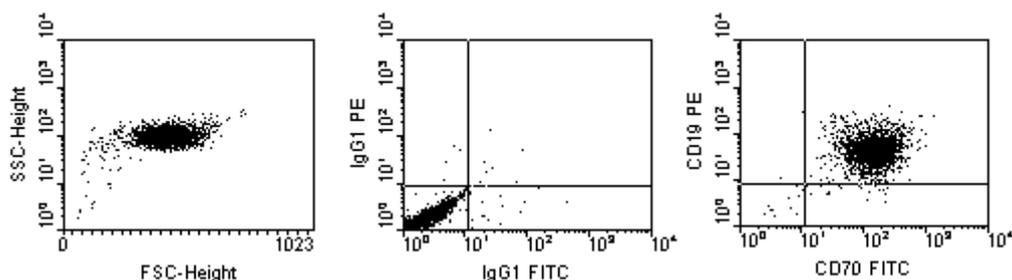


Abbildung 10: Antikörperfärbung von BLCL-Zellen zum Nachweis der membranständigen Expression von CD70.

BLCL-Zellen wurden mit den monoklonalen Antikörpern anti-CD70 FITC und anti-CD19 PE gefärbt (rechts). Eine Isotypkontrolle zum Nachweis unspezifischer Färbung wurde mitgeführt (Mitte).

Alle BLCL-Zellen exprimierten CD70 als membranständiges Molekül. Daher wurde die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und im nachfolgenden Versuch als Template für die reverse Transkription des CD70-Gens eingesetzt.

3.2.2 Reverse Transkription und Klonierung der cDNA-Konstrukte in einen TOPO-Vektor

Die aus den BLCL-Zellen isolierte Gesamt-DNA wurde als Template für die reverse Transkription eingesetzt, die mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt wurde. Primerpaar AH2 generiert ein PCR-Konstrukt, das die Schnittstellen für SmaI und ApoI innerhalb des 5' und 3'-Nichtcodierungsbereiches enthält. Primerpaar UW2 führte die Schnittstellen SmaI und SacI innerhalb des 5'- und 3'-Nichtcodierungsbereiches dagegen neu ein.

Die durch reverse Transkription hergestellten cDNA-Konstrukte wurden zunächst in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert und in E.coli vermehrt. **Abb. 11** zeigt die Ergebnisse der Bakterien-PCR nach Auswahl von 10 verschiedenen Klonen je Primerpaar.

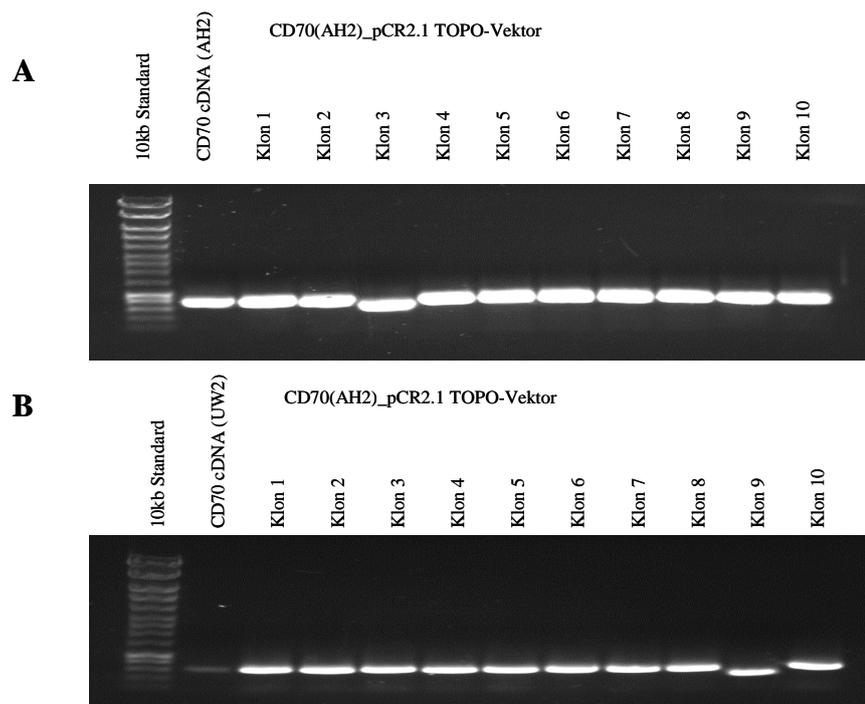


Abbildung 11: Bakterien-PCR nach Klonierung von CD70-cDNA in den pCR2.1 TOPO-Vektor.

CD70-cDNA, hergestellt mit zwei verschiedenen Primerpaaren (AH2 in A, UW2 in B), wurde in den pCR2.1 TOPO-Vektor kloniert und nach Hitzeschocktransformation und Inkubation 10 verschiedene Klone ausgewählt. In einem PCR-Ansatz mit je 20pmol 5'-Primer und 3'-Primer in einem 50µl PCR-Ansatz gemischt. Das PCR-Programm entspricht dem für die cDNA-Herstellung verwendeten Programm. Je 15µl des PCR-Ansatzes wurden zusammen mit der für die Klonierung verwendeten CD70-cDNA und einem 10kb Standard auf ein Agarosegel aufgetragen.

In beiden Klonierungsansätzen wurde jeweils ein Klon mit verkürztem CD70-Konstrukt gefunden. Weder Klon 3 aus dem Klonierungsansatz CD70-cDNA(AH2) noch Klon 9 aus dem Klonierungsansatz CD70-cDNA(UW2) zeigte das vollständige CD70-cDNA-Konstrukt (**Abb. 11**).

Für die Umklonierung der CD70-Konstrukte in den pSP73/A64/NotI-Vektor zur Herstellung von CD70-mRNA wurde im nachfolgenden Versuch jeweils Klon 1 eingesetzt.

3.2.3 Restriktionsverdau nach Umklonierung der CD70-Konstrukte aus den TOPO-Vektoren in den Vektor pSP73/A64/NotI

Zur Umklonierung der CD70-cDNA-Konstrukte in den Vektor pSP73/A64/NotI wurden beide CD70-cDNA-enthaltenden TOPO-Vektoren mit den entsprechenden Restriktionsenzymen geschnitten, in den Zielvektor pSP73/A64/NotI umkloniert und in *E.coli* vermehrt. Für den Restriktionsverdau wurden 12 Klone des Vektors CD70(AH2)_pSP73/A64/NotI ausgewählt und nach Minipräparation ein Aliquot mit SmaI und ApoI geschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen. Für den Vektor CD70(UW2)_pSP73/A64/NotI wurde in gleicher Weise verfahren, jedoch wurde mit den Restriktionsenzymen SmaI und SacI geschnitten. Auf das Agarosegel wurden ebenfalls die jeweils verwendeten dephosphorylierten Vektoren, die für die Klonierung verwendeten CD70-Konstrukte sowie ein 10kb-Standard aufgetragen. **Abb.12** zeigt die Ergebnisse der Gelläufe.

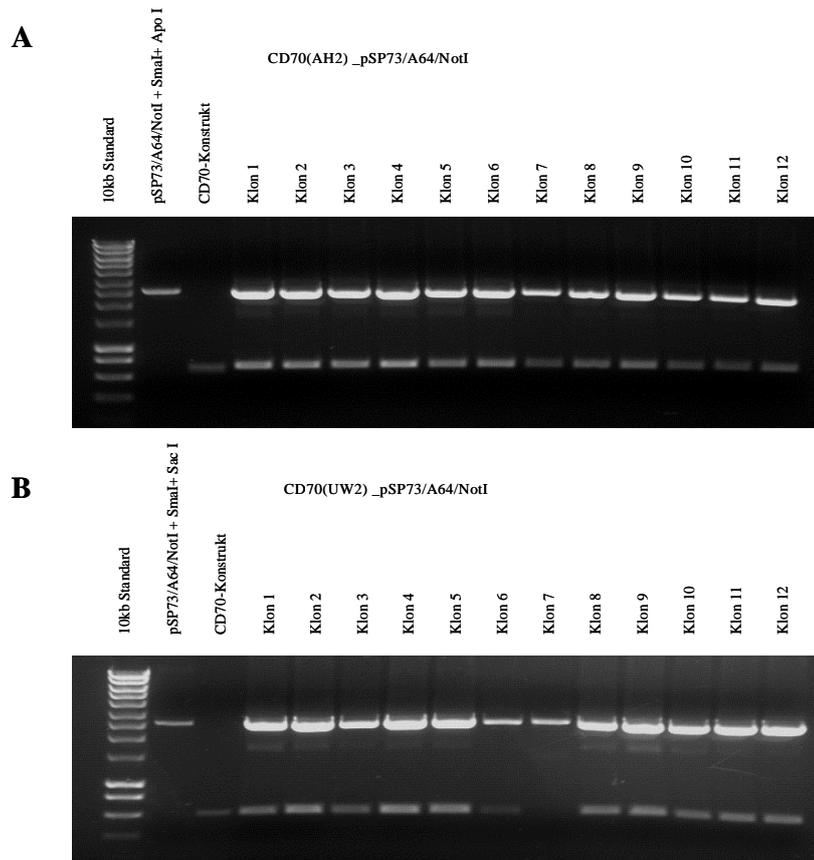


Abbildung 12: Restriktionsverdau nach Umklonierung von CD70-Konstrukten aus den CD70_pCR2.1 TOPO-Vektoren in pSP73/A64/NotI.

12 Klone wurden ausgewählt und nach Minipräparation jeweils ein Aliquot mit SmaI und ApoI (A: Vektor CD70(AH2)_pSP73/A64/NotI) bzw. SmaI und SacI (B: Vektor CD70(UW2)_pSP73/A64/NotI) geschnitten und auf ein Agarosegel aufgetragen. Der dephosphorylierte Vektor, das für die Klonierung verwendete CD70-Konstrukt sowie ein 10kb Standard wurden ebenfalls aufgetragen.

Alle untersuchten Klone enthielten den CD70(AH2)_pSP73/A64/NotI-Vektor, der das vollständige CD70-Konstrukt enthält (**Abb. 12A**). Nach Umklonierung von CD70(UW2) aus dem TOPO-Vektor in den Zielvektor pSP73/A64/NotI wurde ein Klon ohne CD70-Insert gefunden (**Klon7, Abb. 12B**). Alle übrigen Klone enthielten den CD70(UW2)_pSP73/A64/NotI-Vektor.

Jeweils Klon 1 aus beiden Klonierungsansätzen wurde vermehrt und die Vektoren mittels einer Maxipräparation isoliert. Beide Vektoren wurden zur Herstellung von CD70-mRNA eingesetzt und die membranständige Expression nach mRNA-Transfektion überprüft.

3.2.4 Membranständige Expression von CD70 nach CD70-mRNA-Transfektion in K562-Zellen

Die nach *in vitro*-Transkription unter Verwendung der jeweiligen CD70-Vektoren CD70(AH2)_pSP73/A64/NotI bzw. CD70(UW2)_pSP73/A64/NotI hergestellten mRNA-Konstrukte CD70-mRNA(AH2) bzw. CD70-mRNA(UW2) wurden mittels Elektroporation in K562-Zellen transfiziert und auf die membranständige Expression von CD70 untersucht.

Die Expression war für beide CD70-mRNA-Konstrukte auf der Zelloberfläche nachweisbar. Nach Transfektion von CD70-mRNA(AH2) waren 84,2% der lebenden Zellen CD70-positiv (**Abb. 13A**). Nach Transfektion von CD70-mRNA(UW2) waren 80,2% der lebenden Zellen CD70-positiv (**Abb. 13B**). Deshalb wurde in allen nachfolgenden Versuchen stets CD70-mRNA(AH2) eingesetzt.

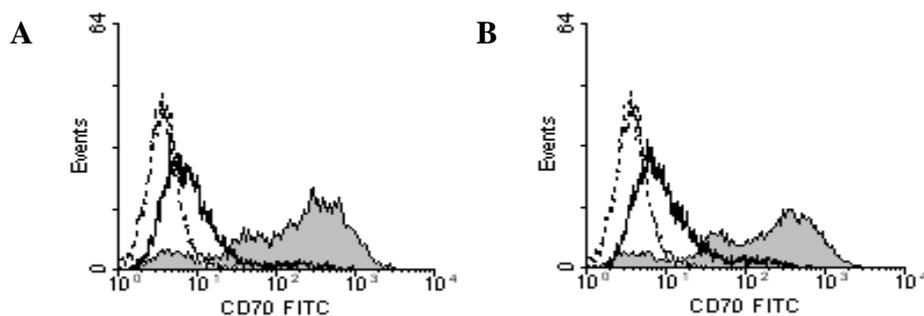


Abbildung 13: Membranständige Expression von CD70 nach CD70-mRNA-Transfektion in K562-Zellen.

K562-Zellen wurden mit CD70-mRNA(AH2) (A) bzw. CD70-mRNA(UW2) (B) transfiziert und über Nacht bei 37°C/5%CO₂ inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen mit anti-CD70-FITC-mAK (gefülltes Histogramm) bzw. anti-IgG1-mAK (durchgezogene Linie) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Nicht transfizierte K562-Zellen zeigten keine CD70-Expression (gestrichelte Linie). Beide CD70-mRNA-Moleküle induzierten eine membranständige CD70-Expression auf K562-Zellen (n=1). Gezeigt sind lebende Zellen nach Auswahl der großen Zellen in der FSC/SSC-Auftragung.

Zur Kontrolle der CD70-Expression nach Transfektion wurden in dem vorangegangenen Versuch nicht transfizierte K562-Zellen eingesetzt. Es stellt sich die Frage, ob eine endogene CD70-Expression auf Dendritischen Zellen durch Elektroporation induziert wird. Auf diese Frage wird in einem späteren Versuch eingegangen (s. 3.3.3). Zunächst sollen jedoch die für die weiteren Versuche eingesetzten Dendritischen Zellen genauer charakterisiert werden.

3.3 RNA-Transfektion von maturaen Dendritische Zellen

Nach Optimierung der Elektroporationsparameter und der Klonierung von humanem CD70 für die Herstellung von CD70-mRNA sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die RNA-Transfektion selbst auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle maturaer Dendritischer Zellen hat. Die für diese Versuche eingesetzten Zellen wurden zunächst charakterisiert.

3.3.1 Charakterisierung von zytokinmaturierten Dendritischen Zellen

Die in dieser Arbeit verwendeten Dendritischen Zellen wurden aus Monozyten generiert, die durch ein spezielles Zellseparationsverfahren aus dem Aphereseprodukt gewonnen wurden. Die Zellseparation erfolgte in einem geschlossenen Gegenstromverfahren, in dem die Zellen aufgrund ihrer Größe und zu einem geringeren Teil aufgrund ihrer Dichte aufgetrennt werden können.

Die aus dieser ELUTRA-Separation gewonnene Monozytenfraktion wurde für die Generierung der ELUTRA-iDC 10 Tage in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF kultiviert. Der Anteil an kontaminierenden T-Zellen betrug $2,0\% \pm 2,31\%$ (n=5), der Anteil an kontaminierenden CD19-positiven B-Zellen betrug $1,01\% \pm 0,13\%$ (n=2). Dagegen zeigten Dendritischen Zellen, für die Monozyten durch Plastikadhärenz aus dem Aphereseprodukt gewonnen wurden (Adhärenz-DC), nach 10-tägiger Kultivierung in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF eine wesentlich höhere T-Zellverunreinigung von $22,7\% \pm 8,84\%$ (n=2) und eine B-Zellverunreinigung von $4,61\% \pm 5,81\%$ (n=2).

Bei der Untersuchung des Phänotyps zeigten bereits Adhärenz-iDC eine starke Expression von CD40, CD86 und MHCII. Lediglich CD83 wurde durch Zusatz der Maturationszytokine auf Adhärenz-mDC verstärkt exprimiert (**Abb. 14**).

Im Vergleich zu Adhärenz-DC zeigte sich bei ELUTRA-DC im Phänotyp nach Zytokinmaturation eine erniedrigte Expressionsstärke der untersuchten Oberflächenmarker. Die Expression von CD70 war unabhängig vom Maturationszustand und weder auf Adhärenz-DC noch auf ELUTRA-DC nachweisbar (**Abb. 14**).

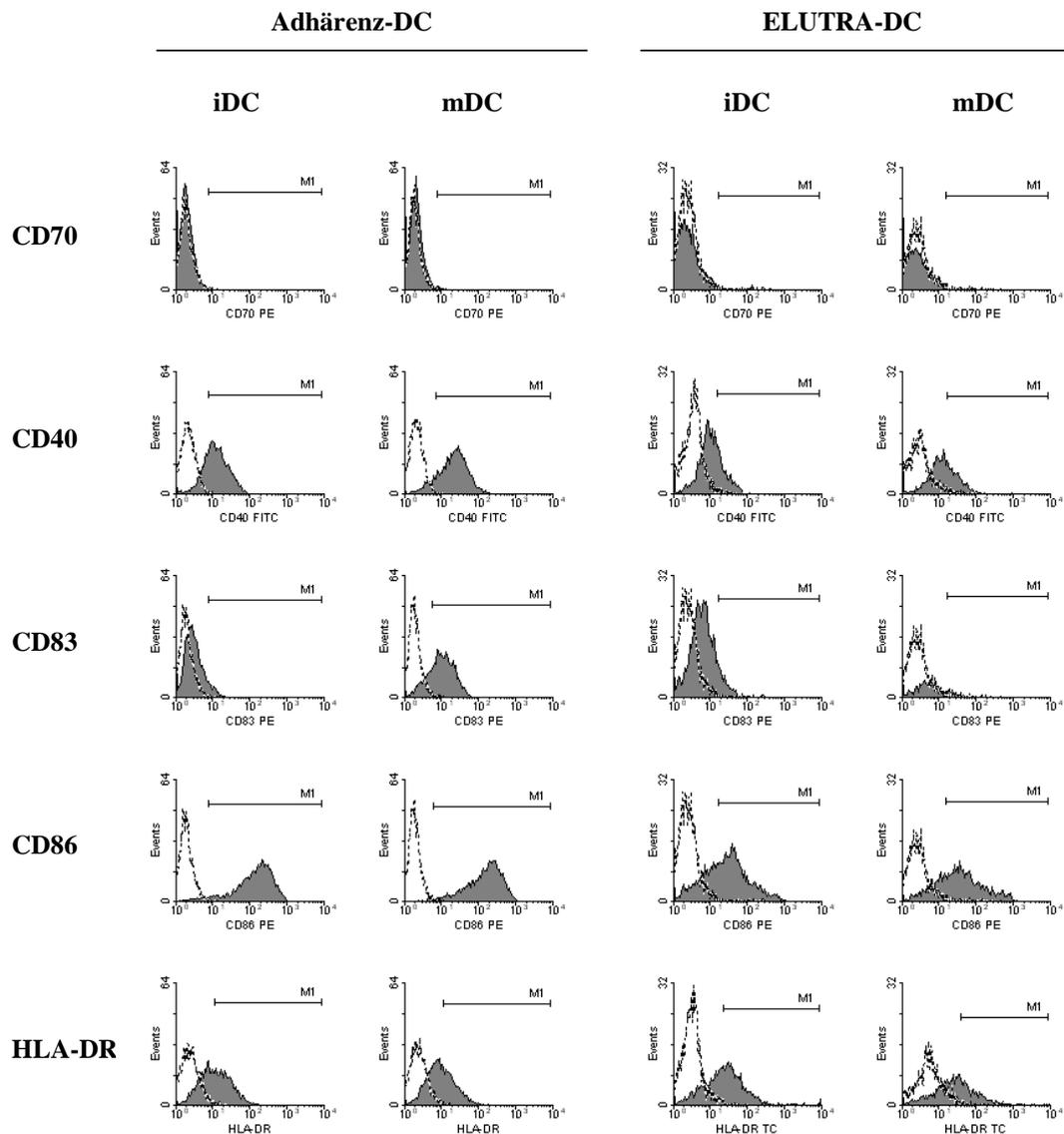


Abbildung 14: Phänotyp von Adhärenz-Dendritischen Zellen (Adhärenz-DC) und ELUTRA-Dendritischen Zellen (ELUTRA-DC) vor und nach Zytokinmaturation.

Monozyten wurden durch ELUTRA-Separation oder Plastikadhärenz aus dem Aphereseprodukt gewonnen und in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF 10 Tage kultiviert. Beide Ansätze wurden durch Zusatz eines Zytokincocktails, bestehend aus IL-1 β , IL-6, PGE₂ und TNF α , über Nacht maturiert, geerntet und gegen die Marker CD70, CD40, CD83, CD86 und MHCII gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten.

Der Grund für die lange Kultivierung der Monozyten in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 war es, eine hohe CD83-Expression nach Zytokinmaturation zu erreichen. Dieser Phänotyp kennzeichnet den „voll maturen“ Zustand von Dendritischen Zellen, der Voraussetzung für die Induktion von Immunität zu sein scheint^{76, 77}. Ein solch hoher Anteil an CD83-exprimierenden maturen Adhärenz-DC konnte in unseren Händen nur erreicht werden, wenn die Maturation von Adhärenz-DC mittels des Zytokincocktails, bestehend aus IL-1 β , IL-6, PGE₂ und TNF α , erst am 10. Kulturtag

eingeleitet wurde. Adhärenz-DC, die nach der in der Literatur beschriebenen üblichen Kulturdauer von 7 Tagen maturiert wurden, zeigten dagegen regelmäßig eine niedrige CD83-Expression (Daten nicht gezeigt). Für die Herstellung von ELUTRA-DC wurde dieses verlängerte Kultivierungsprotokoll beibehalten.

Die in allen weiteren Versuchen eingesetzten Dendritischen Zellen wurden aus ELUTRA-separierten Monozyten generiert und mit dem oben aufgeführten Zytokincocktail maturiert (zytokinmaturierte Dendritische Zellen).

3.3.2 Die Elektroporation erniedrigt nicht die Expression der Maturationsmarker

Die Optimierung der Elektroporationsparameter wurde mit immaturren Dendritischen Zellen durchgeführt, die bereits nach einer Kultivierungsdauer von vier Tagen eingesetzt wurden. Für die Herstellung hoch CD83-exprimierender Adhärenz-DC wurde die Kultivierung jedoch auf 10 Tage verlängert. Weiterhin wurde beschrieben, dass mature Dendritische Zellen geringere Transfektionsraten als immature Dendritische Zellen zeigen⁶².

Es musste daher geprüft werden, ob die Transfektion von mRNA in zytokinmaturierte Dendritische Zellen eine erniedrigte Transfektionsrate oder Expressionsstärke des translatierten Proteins zur Folge hat. Daher wurden zytokinmaturierte Dendritische Zellen mit EGFP-mRNA bei optimierten Elektroporationsparametern transfiziert und die Transfektionsrate sowie die Expressionsstärke des EGFP-Proteins durchflusszytometrisch untersucht.

Es zeigte sich, dass auch nach Elektroporation von maturaen Dendritischen Zellen eine hohe Transfektionsrate und Expressionsstärke erreicht wird (**Abb. 15**).

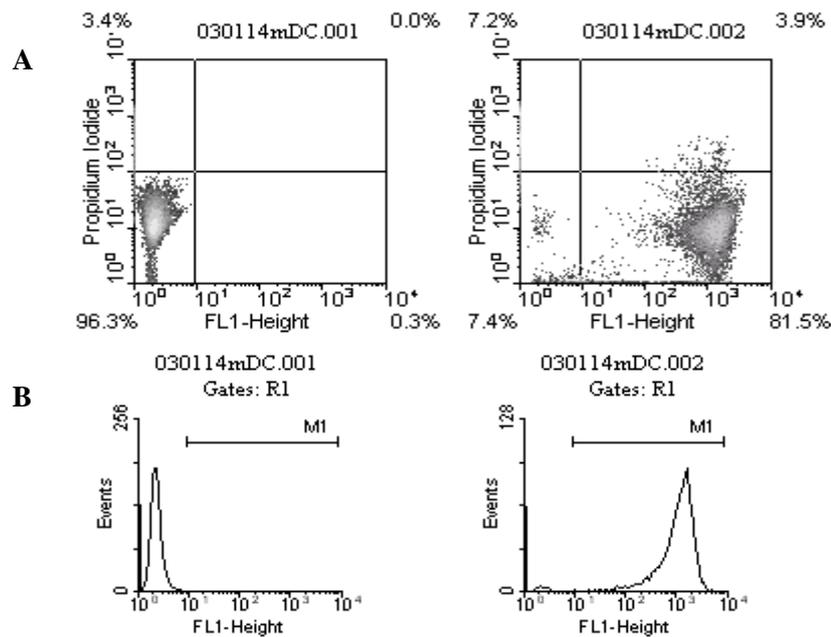


Abbildung 15: Hohe Transfektionsrate und Expressionsstärke nach Elektroporation von EGFP-mRNA in mature Dendritische Zellen.

Zytokinmaturierte Dendritische Zellen wurden mit $10\mu\text{g}$ EGFP-mRNA nach optimiertem Elektroporationsprotokoll transfiziert und über Nacht kultiviert. Die Zellen wurden nach Ernte mit Propidiumjodid gefärbt und die EGFP-Fluoreszenz durchflusszytometrisch bestimmt. Die Transfektionsrate ergibt sich aus dem Anteil EGFP-positiver Zellen (A), die Expressionsstärke aus der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI), gemessen als Rechtsverschiebung des Histogramm-Medians (B). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus fünf.

Neben der Gewährleistung, dass eine starke Expression des Proteins nach mRNA-Transfektion erfolgt, darf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD83, CD86 sowie die Expression der MHCII-Moleküle nicht erniedrigt werden. In dem angestrebten Kokulturmodell, in dem die Wirkung der CD70-Expression auf CD4-Th1-Antwort untersucht werden soll, würde anderenfalls eine im Vergleich zu nicht transfizierten DC weniger starke Immunantwort ausgelöst.

Um zu prüfen, ob eine verringerte Expressionsstärke der Oberflächenmarker nach Elektroporation stattfindet, wurden zytokinmaturierte Dendritische Zellen mit CD70-mRNA transfiziert und 24 Stunden in AIM-V in Abwesenheit von Maturationszytokinen inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gegen die Oberflächenmoleküle CD70, CD40, CD83, CD86 und MHCII gefärbt. Zur Kontrolle wurden nicht transfizierte Dendritische Zellen mitgeführt.

Nach Transfektion von CD70-mRNA waren $65,9\% \pm 10,9\%$ ($n=3$) der transfizierten zytokinmaturierten Dendritischen Zellen CD70-positiv. Die Zellen exprimierten auch

nach Elektroporation die Oberflächenmarker in hohem Maße, wobei die Elektroporation zu einer verstärkten CD83-Expression führte (**Abb. 16**).

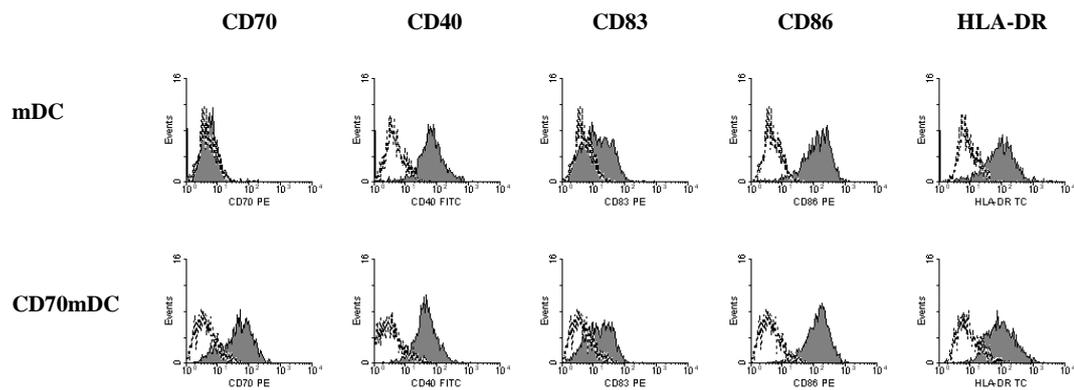


Abbildung 16: Transfektion von CD70-mRNA in zytokinmaturierte Dendritische Zellen hat keinen Einfluss auf die Expressionsstärke der übrigen Maturationsmarker.

Zytokinmaturierte Dendritische Zellen wurden mit CD70-mRNA transfiziert oder unbehandelt belassen. Nach 24-stündiger Inkubation in Abwesenheit von IL-4 und GM-CSF wurden die Zellen geerntet und gegen die Maturationsmarker CD70, CD40, CD83, CD86 und MHCII gefärbt. Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis aus vier unabhängigen Versuchen.

3.3.3 Die Elektroporation selbst induziert nur eine geringe CD70-Expression auf Dendritischen Zellen

In dem bereits beschriebenen Versuch zur Prüfung der membranständigen Expression von CD70 nach Klonierung wurden nicht transfizierte K562-Zellen zur Kontrolle der CD70-Expression eingesetzt (siehe 3.2.4). Es musste daher geklärt werden, ob eine Expression von endogenem CD70 durch die Elektroporation induziert wird.

Hierzu wurden zytokinmaturierte Dendritische Zellen mit Her2/neu-mRNA als Kontroll-mRNA entweder allein oder zusammen mit CD70-mRNA nach optimiertem Transfektionsprotokoll transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubation wurde die Expression des Her2/neu- und CD70-Proteins durch Antikörperfärbung durchflusszytometrisch überprüft.

Die Transfektion von Her2/neu-mRNA allein führte nur zu einer geringen Expression von CD70 auf Dendritischen Zellen (**Abb. 17B**). So waren nach Her2/neu-mRNA-Transfektion 2,9% der Dendritischen Zellen CD70-positiv. Wurde CD70-mRNA allein transfiziert, so waren 85,5% der Zellen CD70-positiv (**Abb. 17C**). Nach Kotransfektion von Her2/neu-mRNA zusammen mit CD70-mRNA exprimierten 42,1% der Dendritische Zellen sowohl CD70 als auch Her2/neu auf der Zelloberfläche (**Abb. 17D**). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Expression von endogenem CD70 auf Dendritischen Zellen durch die Elektroporation nicht induziert wird.

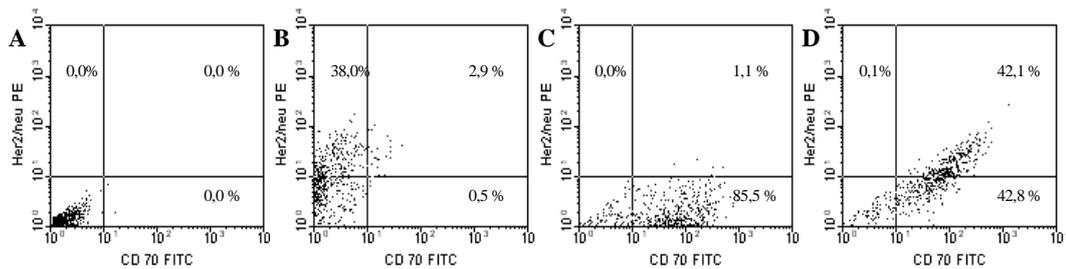


Abbildung 17: Die Elektroporation selbst induziert nur eine geringe CD70-Expression auf Dendritischen Zellen.

Zytokinmurierte Dendritische Zellen wurden mit je 10 μ g Her2/neu-mRNA (B und D) und CD70-mRNA (C und D) nach optimierten Elektroporationsprotokoll transfiziert. Die Zellen wurden 24 Stunden kultiviert, geerntet und mit anti-CD70-FITC und anti-Her2/neu-PE gefärbt. Nicht transfizierte Zellen wurden mitgeführt (A).

3.4 Einfluss der CD70-Expression auf die Th1-Immunantwort

Um die Wirkung eine CD70-Expression auf die Th1-Antwort zu untersuchen, wurden Dendritische Zellen eingesetzt, die durch einen Zytokincocktail, bestehend aus IL-1 β , IL-6, PGE₂ sowie TNF α , für 16-20 Stunden maturiert wurden. Die Zellen wurden mit CD70-mRNA mittels Elektroporation transfiziert und zusammen mit nicht transfizierten DC in einer Kokultur mit autologen CD4-T-Zellen eingesetzt. Durch Zusatz von SEB (Staphylokokken Enterotoxin B) wurde eine Th1-Antwort induziert und der Einfluss der CD70-Expression auf die Th1-Antwort in CD70-Blockierungsexperimenten durch Messen der Konzentration von IFN γ und IL-4 untersucht. In Vorversuchen soll zunächst geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt nach CD70-mRNA-Transfektion Dendritische Zellen eine ausreichend hohe CD70-Expression zeigen, um in die Kokultur eingesetzt werden zu können. Diese Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

3.4.1.1 Kinetik der exogenen CD70-Expression nach Transfektion von CD70-mRNA in zytokinmurierte Dendritische Zellen

Um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt nach Elektroporation transfizierte Dendritische Zellen eine ausreichend hohe CD70-Expression zeigten, so dass sie in die Kokultur eingesetzt werden können, wurde die Kinetik der CD70-Expression nach Transfektion untersucht.

Zytokinmurierte Dendritische Zellen wurden mit CD70-mRNA transfiziert oder unbehandelt belassen. Drei Stunden nach Transfektion wurde ein Aliquot der transfizierten Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und zusammen mit nicht transfizierten und transfizierten, jedoch nicht fixierten DC für weitere 24 Stunden

inkubiert. Alle Zellen wurden nachfolgend gegen die Oberflächenmoleküle CD70, CD40, CD83, CD86 und MHCII gefärbt.

Bereits drei Stunden nach CD70-mRNA-Transfektion waren 60,1% der transfizierten Zellen CD70-positiv. Der Anteil an CD70-positiven Dendritischen Zellen erhöhte sich auf 82,0%, wenn die Zellen 27 Stunden nach Transfektion untersucht wurden (Abb. 18).

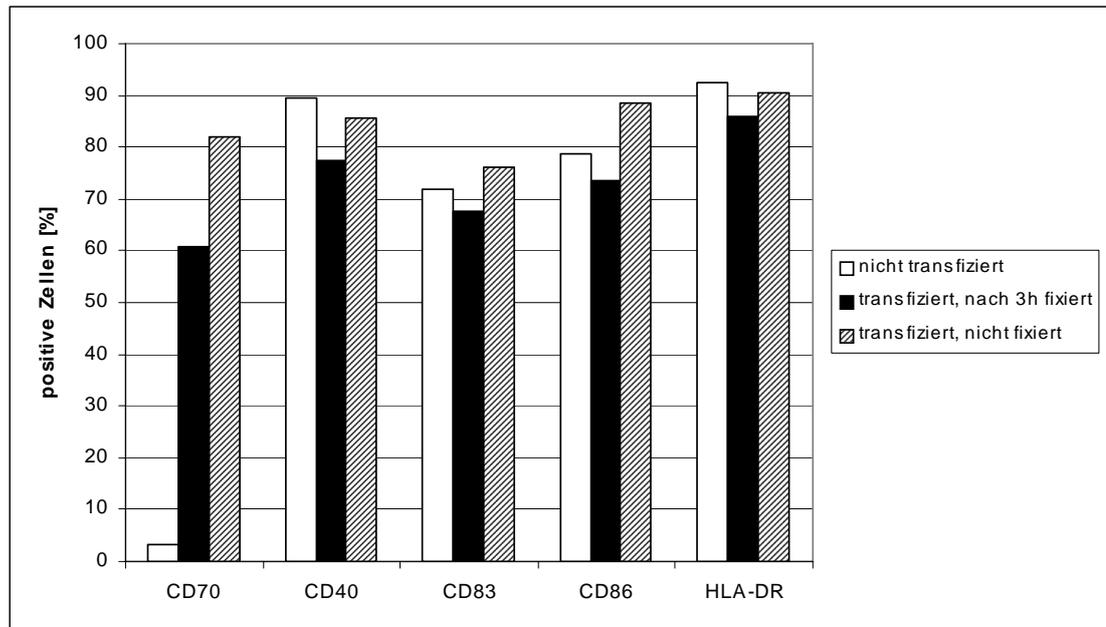


Abbildung 18: Kinetik der CD70-Expression nach Transfektion von CD70-mRNA in zytokinmaturierte Dendritische Zellen.

Zytokinmaturierte Dendritische Zellen wurden mit CD70-mRNA transfiziert oder unbehandelt belassen. Drei Stunden nach Transfektion wurde ein Aliquot der transfizierten Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und zusammen mit nicht transfizierten sowie transfizierten, jedoch nicht fixierten DC für weitere 24 Stunden inkubiert. Alle Ansätze wurden nachfolgend gegen CD70, CD40, CD83, CD86 und MHCII gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (n=1).

Wie schon im vorangegangenen Versuch gezeigt, wurde auch hier die Expression der übrigen kostimulatorischen Moleküle durch die Elektroporation nicht beeinträchtigt. Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde die Kokultur von autologen CD4-T-Zellen mit CD70-mRNA transfizierten zytokinmaturierten Dendritischen Zellen bzw. nicht transfizierten Dendritischen Zellen in den nachfolgenden Experimenten drei Stunden nach Transfektion gestartet.

3.4.1.2 Reinheit der eingesetzten CD4-T-Zellfraktion

Die in den Kokulturen eingesetzten autologen CD4-T-Zellen wurden durch Depletion mittels magnetischer Beads aus der ELUTRA-T-Zellfraktion gewonnen. Die Reinheit der CD4-Population betrug $93,4\% \pm 3,9\%$ ($n=3$). Die Expression von CD70 auf CD4-Zellen betrug vor Kokultur $8,0\% \pm 4,3\%$ ($n=3$).

3.4.2 Einfluss der CD70-Expression auf die IFN γ - und IL-4-Sekretion

Um den Einfluss der CD70-Expression auf die IFN γ - und IL-4-Sekretion zu untersuchen, wurden 1×10^5 zytokinmaturierte Dendritische Zellen mit CD70-mRNA transfiziert (CD70mDC) oder unbehandelt gelassen (mDC) und nachfolgend mit autologen $7,5 \times 10^5$ CD4-T-Zellen für 24 Stunden in An- oder Abwesenheit des Superantigens SEB inkubiert. Alle Zellen wurden nachfolgend geerntet und in einem Zytokinsekretionsassay untersucht. Dazu wurden die Zellen mit IFN γ - und IL-4-Antikörpern in Verhältnis 1:1 beladen. Die in der nachfolgenden einstündigen Sekretionsphase an die Antikörper gebundenen Zytokine wurden mit einem Detektions-Antikörper gefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Für die Auswertung wurden der Anteil an IFN γ - bzw. IL-4-sezernierenden CD4-T-Zellen berücksichtigt.

Das Th1-Zytokin IFN γ wurde sowohl nach Stimulation von T-Zellen mit nicht transfizierten DC als auch mit CD70-mRNA transfizierten DC exprimiert, wenn SEB als Antigen in der Kokultur vorlag (**Abb. 19A**). Drei der vier untersuchten Isolationen zeigten nach Stimulation mit CD70-mRNA-transfizierten DC ein höherer Anteil an IFN γ -sezernierenden CD4-T-Zellen als nach Stimulation mit nicht transfizierten DC. Dagegen wurde in Kokulturen in Abwesenheit von SEB kaum IFN γ -freigesetzt. Auch CD4-T-Zellen, die allein oder in Anwesenheit von SEB kultiviert wurden, zeigten keine IFN γ -Sekretion.

Das Th2-Zytokin IL-4 wurde nur in einer der vier untersuchten Isolationen in geringem Maß sezerniert, jedoch war diese unabhängig von der exogenen CD70-Expression oder der Anwesenheit von SEB (**Abb. 19B**).

Die Ergebnisse zeigen insgesamt, dass durch den stärksten MHCII/TCR-vermittelten Kontakt eine Th1-Antwort induziert wurde.

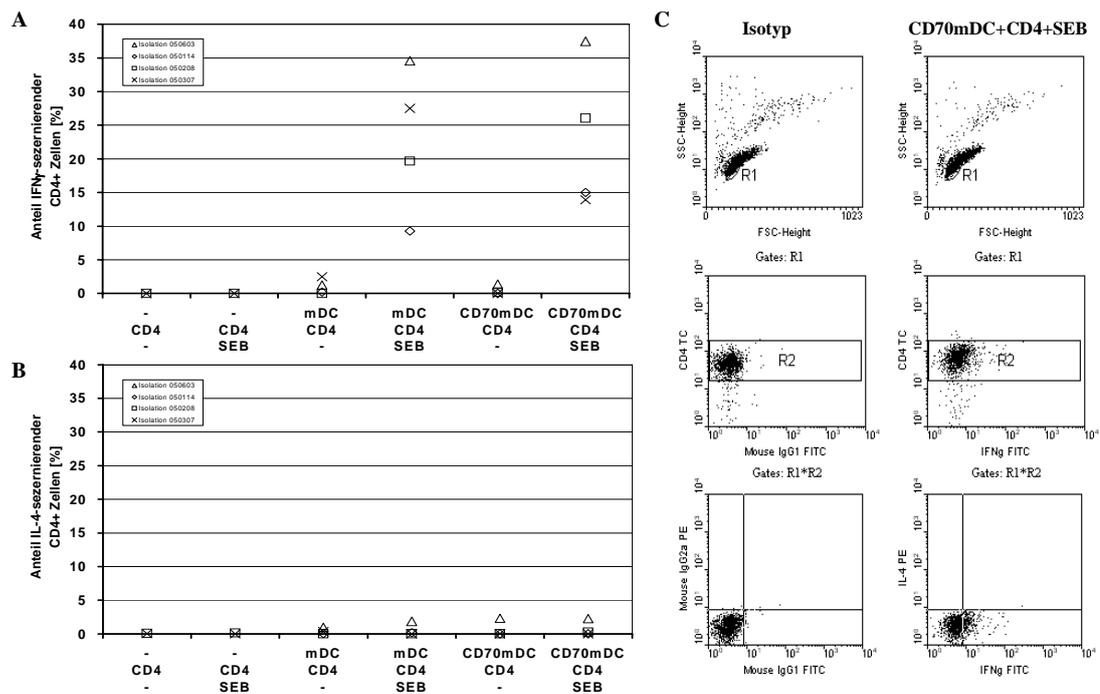


Abbildung 19: Induktion einer Th1-Antwort durch SEB-vermittelten MHCII/TCR-Kontakt.

1×10^5 zytokinmaturierte Dendritische Zellen wurden mit CD70-mRNA transfiziert (CD70mDC) oder unbehandelt gelassen (mDC) und nachfolgend mit $7,5 \times 10^5$ CD4-T-Zellen für 24 Stunden in An- und Abwesenheit von SEB inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen und nach Beladung mit IFN γ - und IL-4-Catchantikörpern (1:1) eine einstündige Sekretionsphase angeschlossen. Die gebundenen Zytokine wurden mit einem Detektions-Antikörper angefärbt und die Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Zur Auswertung wurde der Anteil an IFN γ - und IL-4-sezierenden CD4-T-Zellen berücksichtigt (C). Gezeigt sind die Ergebnisse der IFN γ -Sekretion (A) und der IL-4 Sekretion (B) aus vier unabhängigen Versuchen.

Um den Einfluss der CD70-Expression auf die IFN γ -Sekretion zu untersuchen, wurde CD70 durch Zusatz eines spezifischen anti-CD70-Antikörpers während der 24stündigen Kokulturphase blockiert und nachfolgend die Zytokinsekretion erneut mittels Zytokinsekretionsassay untersucht.

Die Ergebnisse der Einzelversuche sind in **Abb. 20** dargestellt. In beiden Ansätzen sinkt der Anteil an IFN γ -sezernierenden CD4-T-Zellen nach CD70-Blockierung. Während in Anwesenheit des Isoantikörpers im Mittel $21,5\% \pm 8,6\%$ der CD4-T-Zellen IFN γ sezernierten, waren nach Blockierung durch den anti-CD70-Antikörper nur $7,1\% \pm 5,2\%$ CD4-T-Zellen IFN γ -positiv. Eine IFN γ -Sekretion erfolgte nicht in den Kontrollansätzen, also weder nach SEB-Aktivierung von CD4-T-Zellen noch in Abwesenheit von SEB (Daten nicht gezeigt). Nicht transfizierte DC (mDC) wurden nicht untersucht.

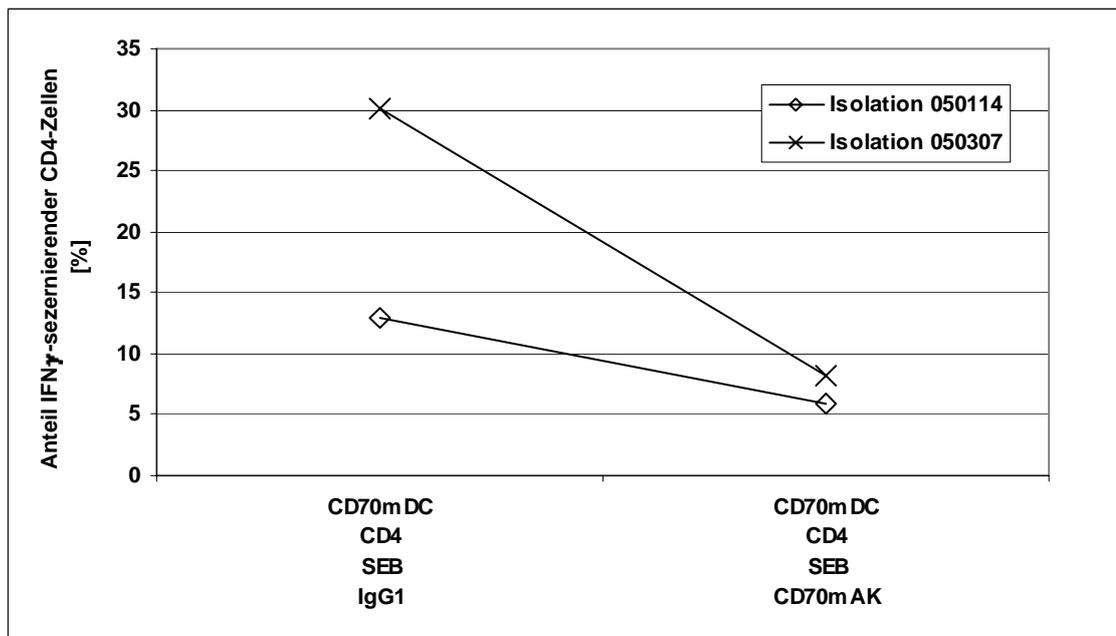


Abbildung 20: Blockierung von CD70 auf CD70-mRNA transfizierten, zytokinmaturierten Dendritischen Zellen führt zu einer verminderten Freisetzung des Th1-Zytokins IFN γ .

1×10^5 zytokinmaturierte Dendritische Zellen wurden mit CD70-mRNA transfiziert (CD70mDC) und mit $7,5 \times 10^5$ autologen CD4-T-Zellen in An- oder Abwesenheit von SEB und nach Zusatz von $1,25 \mu\text{g/ml}$ Maus IgG1 bzw. anti-CD70-mAK inkubiert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und im Zytokinsekretionsassay untersucht. Für die Auswertung wurden der Anteil an IFN γ - bzw. IL-4-sezernierenden CD4-T-Zellen berücksichtigt. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Experimenten.

3.4.3 IL-12p70- und IL-10-Sekretion nach kognitivem Kontakt

Der Polarisation der CD4-T-Zellen geht eine Polarisation der DC voraus. So wurde beschrieben, dass durch DC freigesetztes IL-12p70 die Th1-Polarisation von CD4-T-Zellen fördert⁷⁸. Es wurde jedoch ebenfalls beschrieben, dass DC nach Aktivierungszeiten >8 Stunden in einen „erschöpften Zustand“ übergehen, in welchem sie hauptsächlich Th2-Zytokine, z.B. IL-10, sezernieren, bevor die Zytokinsekretion 24 Stunden nach DC-Aktivierung versiegt⁷⁸.

Für die Entwicklung einer DC-Vakzine ist es interessant zu wissen, ob DC, die bereits durch einen Zytokincocktail für 16-20 Stunden aktiviert wurden, um eine hohe Expression von kostimulatorischen Molekülen zu erreichen, bei kognitivem Kontakt mit CD4-T-Zellen noch zur Sekretion von IL-12p70 in der Lage sind.

Um dies zu untersuchen, wurden durch einen Zytokincocktail aktivierte, nicht transfizierte bzw. CD70-mRNA-transfizierte DC mit autologen CD4-T-Zellen in An- und Abwesenheit von SEB für 24 Stunden kultiviert. Die Konzentrationen der Zytokine IL-12p70 und IL-10 wurden nachfolgend mittels ELISA aus dem Überstand bestimmt.

Die Zytokine IL-12p70 und IL-10 wurden nur in Kokulturen nachgewiesen, in denen SEB vorlag (**Abb. 21**). Sowohl Kokulturen, die ohne SEB inkubiert wurden als auch CD4-T-Zellen, die allein oder in Abwesenheit von SEB kultiviert wurden, sezernierten die untersuchten Zytokine dagegen nicht.

IL-12p70 wurde sowohl von nicht transfizierten wie CD70-mRNA transfizierten DC sezerniert. Jedoch waren die IL-12p70-Konzentrationen mit 500pg/ml niedrig (**Abb. 21A**). Lediglich die Zellen der Isolation 050603, die im vorangegangenen Versuch ebenfalls eine hohe IFN γ -Sekretion nach SEB-Stimulation zeigten, exprimierten in Anwesenheit von SEB auch hohe IL-12p70-Mengen. In den Überständen von CD70-mRNA-transfizierte DC dieser Isolation wurden dabei höhere IL-12p70-Konzentrationen nachgewiesen als in den Überständen der nicht transfizierten DC.

IL-10 wurde in Analogie zu IL-12p70 ebenfalls nur nach SEB-vermitteltem kognitivem Kontakt sowohl von nicht transfizierten als auch transfizierten DC sezerniert (**Abb. 21B**). Bis auf die Zellen der Isolation 050603 sezernierten nicht transfizierte DC aller Isolationen höhere Konzentrationen an IL-10 als an IL-12p70.

Wurden transfizierte DC in die Kokkultur eingesetzt, so erhöhte sich die IL-10 Sekretion in drei von fünf Fällen.

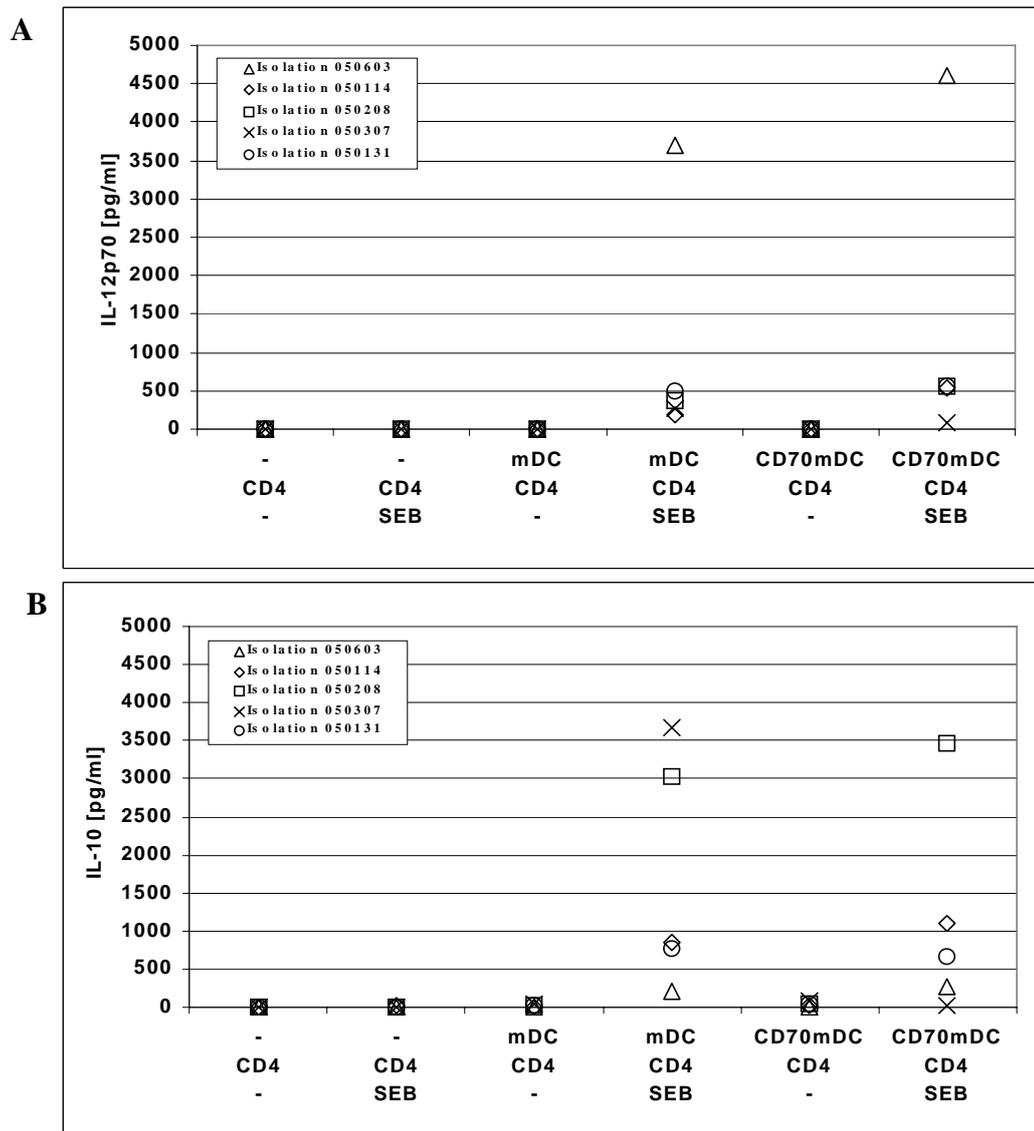


Abbildung 21: IL-12p70- und IL10-Sekretion von zytokinmaturierten DC nach SEB- vermitteltem kognitivem Kontakt.

1×10^5 CD70mDC bzw. mDC wurden mit $7,5 \times 10^5$ autologen CD4-T-Zellen in An- oder Abwesenheit von SEB inkubiert. Nach 24 Stunden wurde die IL-12p70-Konzentration (A) und die IL-10-Konzentration (B) im Überstand mittels ELISA bestimmt (n=5).

3.4.4 Expression von endogenem CD70 auf humanen Dendritischen Zellen nach SEB-vermitteltem MHCII/TCR-Kontakt

In den Versuchen zur IFN γ -Sekretion wurde gezeigt, dass die Höhe der IFN γ -Sekretion durch die Expression von CD70 abhängig ist. IFN γ wurde jedoch ebenfalls von nicht transfizierten mDC in vergleichbaren Konzentrationen zu CD70-mRNA transfizierten mDC sezerniert.

Um zu untersuchen, ob dies auf die Expression von endogenem CD70 auf DC während der Kokultur zurückzuführen ist, wurden immature und zytokinmaturierte Dendritische Zellen allein oder in Anwesenheit von autologen CD4-T-Zellen bzw. SEB für 24 Stunden kultiviert und die CD70-Expression nachfolgend durchflusszytometrisch untersucht. **Abb.22** zeigt die Ergebnisse der Untersuchung.

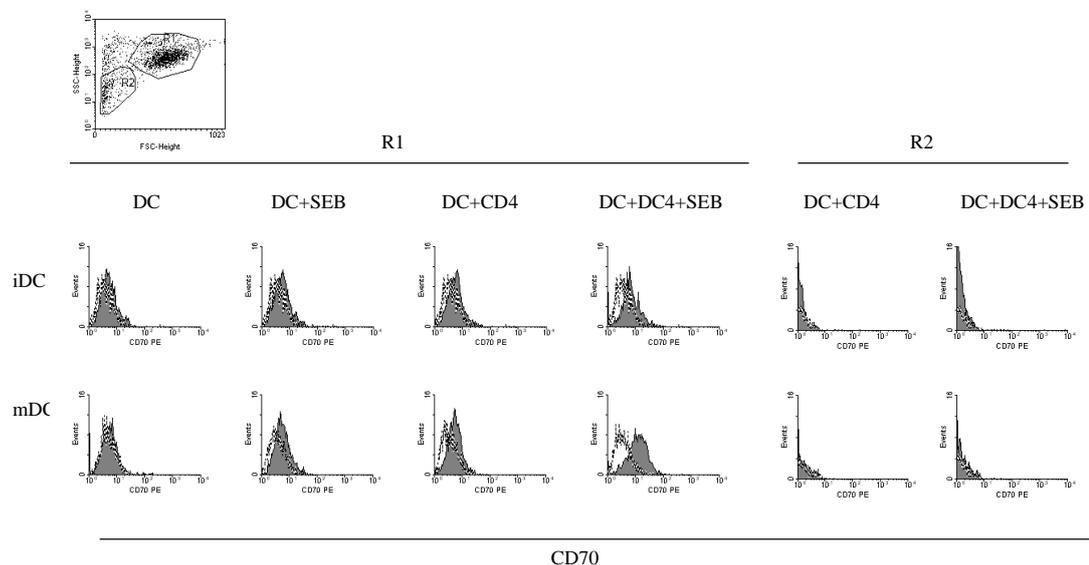


Abbildung 22: Expression von endogenem CD70 auf humanen Dendritischen Zellen nach kognitivem, SEB-vermitteltem MHCII/TCR-Kontakt.

Zytokinmaturierte Dendritische Zellen wurden allein oder in Kokultur zusammen mit autologen CD4 T-Zellen in An- oder Abwesenheit von SEB 24 Stunden kultiviert und nachfolgend die Expression von endogenem CD70 auf Dendritischen Zellen durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt sind die Ergebnisse einer repräsentativen Untersuchungen aus drei Experimenten. Für die Auswertung wurden basierend auf der Größe/Granularitäts-Verteilung große Zellen in Region 1 (R1) als DC-Fraktion, kleine Zellen in Region 2 (R2) als T-Zellfraktion definiert.

Wurden immature DC allein oder in Anwesenheit von SEB kultiviert, so führte dies nicht zu einer endogenen CD70-Expression auf DC. Wurden autologen CD4-T-Zellen mit iDC kokultiviert, so führte dies zu einer geringen endogenen CD70-Expression auf iDC, die sich verstärkte, wenn zusätzlich SEB im Kokulturansatz vorhanden war.

Mature DC zeigten sowohl bei Kontakt zu SEB als auch zu autologen CD4-T-Zellen eine geringe CD70-Expression. Kognitiver SEB-vermittelter MHCII/TCR-Kontakt führte zu einer verstärkten CD70-Expression. Die endogene CD70-Expression nach kognitivem Kontakt fiel dabei stärker aus, wenn mature DC in die Kokulturen eingesetzt wurden.

T-Zellen, die in An- oder Abwesenheit von SEB kultiviert wurden, zeigten dagegen zu keinem Zeitpunkt eine endogene CD70-Expression. Weitere Untersuchungen, bei denen PBMC für 24 Stunden mit SEB aktiviert und auf eine CD70-Expression auf CD3-positiven T-Zellen untersucht wurden, waren ebenfalls negativ (Daten nicht gezeigt).

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Zuge der Herstellung einer DC-basierten Tumorstoffimpfung die exogene Expression von CD70 in humanen Dendritischen Zellen durch Elektroporation von CD70-mRNA zu erreichen und nachfolgend die Auswirkung der CD70-Expression auf die Th1-Zytokinantwort durch Kokultivierung der transfizierten DC mit autologen CD4-T-Zellen zu untersuchen.

4.1 Optimierung der Elektroporationsparameter zur mRNA-Transfektion von Dendritischen Zellen

Für die Herstellung einer DC-basierten Vakzine, die durch Elektroporation von mRNA mit Antigen beladen werden soll, sollten die Elektroporationsparameter Feldstärke und Pulszeit sowie der benötigten mRNA-Konzentration dergestalt optimiert werden, dass hohe Transfektionsraten und, bezogen auf die Zellausbeuten, hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden können.

Die Transfektion von mRNA in immature Dendritischen Zellen mittels Elektroporation wurde bereits mit guten Transfektionsraten beschrieben⁶² und war Grundlage für die in dieser Arbeit durchgeführte Optimierung des Elektroporationsprotokolls. Die Optimierung bei Van Tendeloo erfolgte dabei an K562-Zellen, die mittels Entladungspuls elektroporiert wurden. Die gefundenen Parameter wurden nachfolgend auf iDC übertragen. Es wurde eine maximale Transfektionsrate von $63\% \pm 9\%$ mit einer Viabilität von 85% bei einer Feldstärke von 0,75kV/cm und 150µF (ca. 9ms) beschrieben, wobei eine mRNA-Konzentration von 100µg/ml im Transfektionsansatz eingesetzt wurde⁶².

In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch sukzessive Optimierung der Feldstärke, der Pulszeit und der mRNA-Konzentration sowie der direkten Optimierung der Elektroporationsparameter an DC eine im Vergleich zum Van Tendeloo-Protokoll um 10% verbesserte Transfektionsrate ($73,0\% \pm 1,3\%$ (n=5)) bei vergleichbarer Viabilität ($83,1\% \pm 3,9\%$ (n=5)) erreicht werden. Die für eine maximale Transfektion erforderliche mRNA-Konzentration konnte zudem von 100µg/ml auf 15µg/ml herabgesetzt werden. Diese verbesserten Transfektionsparameter wurden durch Elektroporation bei erniedrigter Feldstärke von 0,6kV/cm und deutlich verlängerter Pulszeit von 16ms mit dem Rechteckpuls erreicht.

Mit Blick auf die Transfektionseffizienz, definiert als die Ausbeute an transfizierten Zellen nach Elektroporation, wurde zudem deutlich, dass durch die Elektroporation

ein Großteil der Zellen unter- bzw. verlorengelht. So lag die Transfektionseffizienz bei optimierten Parametern bei nur $33,3\% \pm 4,8\%$ ($n=5$). Dies muss berücksichtigt werden, wenn große Mengen an Dendritischen Zellen in klinischen Studien nach Antigen-Beladung mittels mRNA-Elektroporation eingesetzt werden sollen.

Bei der Optimierung der Feldstärke wurden für die Zellen beider untersuchten Isolationen die maximale Transfektionsrate bei einer Feldstärke von $0,5\text{kV/cm}$ erreicht. Im Gegensatz zu den Zellen aus Isolation 021111, die nach Elektroporation bei Feldstärken $>0,5\text{kV/cm}$ weiterhin eine hohe Viabilität zeigten, fiel die Viabilität und, daraus resultierend, die Transfektionsrate bei Zellen der Isolation 021026 nach Elektroporation bei Feldstärken $>0,5\text{kV/cm}$ ab. Konsequenterweise waren die Zellausbeuten nach Elektroporation bei Zellen der Isolation 021026 niedrig. Dies führte bei der nachfolgenden Errechnung der Transfektionseffizienzen durch Multiplikation der Transfektionsrate mit der Zellausbeute und der Mittelung der Ergebnisse beider Isolationen zu einer erhöhten, auf die Transfektionseffizienz bezogenen optimalen Feldstärke von $0,6\text{kV/cm}$.

Grund für die hohe Viabilität der Zellen auch bei Elektroporation mit hohen Feldstärken kann neben isolationsbedingten Unterschieden in der Ausgangsviabilität das verbesserte Protokoll bei der Durchführung der Elektroporation der Zellen aus Isolation 021111 sein. Für die Erzeugung von Poren in der Zellmembran ist es erforderlich, die Zellen während der Elektroporation in ein hypotones Medium aufzunehmen. Diese Lösung besitzt einen hohen elektrischen Widerstand, so dass hohe Spannungen erreicht und damit verbunden ein starkes elektrisches Feld aufgebaut werden kann, das Voraussetzung für die Porenbildung in der Membran ist.

Die Porenbildung in der Zellmembran verläuft nach einem von Thielemann et al.⁷⁹ vorgestellten Modell in mehreren Schritten ab. Durch das angelegte elektrische Feld wird die Membran gekrümmt, wodurch die Lipidschicht aufgelockert und Wassermoleküle aufgrund ihres Dipolcharakters von beiden Seiten in die aufgelockerte Lipidschicht drückt werden können. Diese Wassereinlagerung verstärkt sich, je länger das elektrische Feld aufrechterhalten wird, und erzwingt schließlich eine Umorientierung der polaren Kopfgruppen der Phospholipide. Treffen sich Wassereinlagerungen, die von beiden Seiten in die Lipidschicht ragen, so wird eine hydrophile Pore gebildet, die über Millisekunden stabil ist. Über diese hydrophilen Poren können nachfolgend Nukleinsäuren durch gerichtete Diffusion in das Zytoplasma der Zellen gelangen⁸⁰.

Durch die Verwendung hypotoner Medien zur Elektroporation werden die Zellen jedoch einem hohen osmotischen Stress ausgesetzt, der Ursache für einen erhöhten Viabilitätsverlust sein kann. Dieser fällt schwächer aus, je kürzer die Zellen in dem hypotonem Medium verbleiben. Für die Durchführung der Elektroporation der Zellen aus Isolation 021111 wurden die Zellen daher erst unmittelbar vor Elektroporation in hypotonem Medium OptiMEM aufgenommen und unmittelbar nach elektrischem Puls isotones Kulturmedium zugesetzt, um den Salzgehalt des Mediums zu erhöhen. Dies führte vermutlich zu einer verbesserten Rekonstitution der Zellen nach Elektroporation und zum Erhalt der Viabilität.

Die Pulszeit hat neben der Feldstärke ebenfalls Einfluss auf die Bildung und Größe der Poren in der Zellmembran. Während der Dauer der Pulszeit wandern Ionen entsprechend ihrer Ladung im elektrischen Feld. Treffen diese auf Zellen, so werden sie an der Zellmembran aufgehalten. Dies führt zum Aufbau eines Transmembranpotentials über der Membran (s. 2.5.7). Erreicht die durch das elektrische Feld induzierte Transmembrananspannung einen kritischen Wert, so kommt es zur Einlagerung von Wasser in die Membran und es bilden sich Poren, die umso größer werden, je länger das elektrische Feld aufrecht erhalten wird^{79, 81}.

Bei der Optimierung der Pulszeit wurde festgestellt, dass die MFI als Maß für die in die Zelle aufgenommene und translatierte Anzahl an mRNA-Molekülen mit steigender Pulszeit linear ansteigt. Für die Festsetzung der optimalen Pulszeit wurde die Proportionalität der MFI mit der Pulszeit durch Transportprozesse im Medium erklärt. Da sich nach dem *Stokes'sches Gesetz*

mit
$$v = \frac{Q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

die Wanderungsgeschwindigkeit v eines sphärischen Partikels im elektrischen Feld proportional zur Ladung dieses Partikels Q und zur Stärke des elektrischen Feldes E und umgekehrt proportional zur erzeugten Reibungskraft $6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta$ verhält, wurde angenommen, dass annähernd jedes mRNA-Molekül, das im elektrischen Feld wandert und auf eine Zelle trifft, auch in die Zelle aufgenommen wird.

Die starke Zunahme der MFI bei Pulszeiten $>16\text{ms}$, die weiterhin linear verläuft, kann jedoch nicht allein auf die bei Medienerwärmung eintretenden geänderten Transportprozesse im Medium zurückgeführt werden. Dies würde voraussetzen, dass

sich die Viskosität eines wäßrigen Mediums bei kontinuierlicher Erwärmung nicht kontinuierlich, sondern sprunghaft ändert.

Die Annahme, dass jedes mRNA-Molekül, das an die Zellmembran transportiert wurde, auch in die Zelle aufgenommen wird, ist jedoch vorstellbar. mRNA-Moleküle könnten aufgrund ihrer Eigenladung die Bildung von Poren an der Stelle induzieren, an der sie auf der Plasmamembran aufliegen. Durch ihre negative Ladung würden sie die Transmembranspannung an der Kontaktstelle der mRNA mit der Membran erhöhen und damit erhöht sich ebenfalls die Wahrscheinlichkeit der Porenbildung an dieser Stelle. Diese Vorstellung erinnert an das von Hristova et al. vorgeschlagene Elektrodifusionsmodell, bei der kationische Sphingosine den elektrodifusiven Transport von Nucleinsäure in die Zelle ermöglichen⁸²(**Abb. 23**).

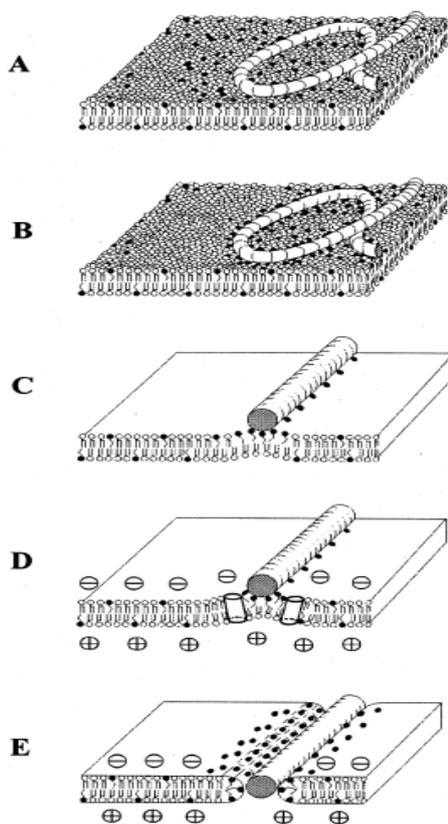


Abbildung 23: Elektrodifusionsmodell nach Hristova et al.⁸²

Dabei adsorbiert die negativ geladene Nucleinsäure an die Membran durch Wechselwirkung mit kationischen Sphingosinen, die in der Membran verteilt vorliegen (A). Die adsorbierte Nucleinsäure induziert nachfolgend die Ansammlung weiterer Sphingosine an der Kontaktzone (B). Da Monoalkyllayer eine Tendenz zur Mizellenbildung haben, kommt es zu einer Aufwölbung der Membran an der Adsorptionsstelle (C). Schließlich führt das Anlegen einer niedrigen elektrischen Spannung zur Bildung kleiner Poren in den aufgewölbten Bereichen entlang des aufgelagerten Nucleinsäure-Fadens (D), die sich zu einer hydrophilen, verlängerten Pore vereinen und die Passage der

Nucleinsäure durch die Lipidschicht ermöglichen. Die Nucleinsäure blockiert dabei das Austreten von Ionen aus dem Zytoplasma in die Umgebung (E).

Eine stärkere, jedoch weiterhin linear ansteigende MFI bei Pulszeiten >16ms wäre mit dem Elektrodifusionsmodell erklärbar. So kann angenommen werden, dass durch die

Medienerwärmung die Fluidität der Membran erhöht und hierdurch die für die Diffusion erforderliche Beweglichkeit und Umorientierung der kationischen Sphingosine und Phospholipide erleichtert wird. Auch die temperaturbedingte Erhöhung der Enzymaktivität der für die Aufrechterhaltung der Asymmetrie der Zellmembran beteiligten Enzyme könnte die verstärkte Zunahme der MFI bei langen Pulszeiten erklären.

Eine Entscheidung darüber, ob die mRNA durch gerichtete Diffusion über hydrophile Poren oder durch Elektrodifffusion in die Zelle gelangt, kann durch weitere Versuche geklärt werden. Unter der Annahme, dass die Elektrodifffusion einem carriergestützten Transmembrantransport ähnelt, sollte die MFI bei Elektroporation mit steigender mRNA-Konzentrationen zunächst konzentrationsabhängig steigen, sich für hohen mRNA-Konzentrationen jedoch konzentrationsunabhängig verhalten.

In diesem Sättigungsbereich würde die Aufnahme von mRNA durch die Anzahl der zur Verfügung stehenden Sphingosinmoleküle begrenzt. So ist vorstellbar, dass die kationischen Sphingosine, die als „Carrier“ die mRNA durch die Zellmembran in das Zytoplasma transportiert haben, erst durch enzymatische Beteiligung, z.B. durch Flipasen, wieder in den äußeren Lipidschicht der Membran transportiert werden müssen. Würde die mRNA jedoch durch gerichtete Diffusion über hydrophile Poren in die Zelle aufgenommen, so würde die MFI auch für hohe mRNA-Konzentrationen linear ansteigen.

4.2 Charakterisierung der ELUTRA-Dendritischen Zellen

In dieser Arbeit wurde eine ungewöhnlich lange Kultivierungszeit für die Generierung von DC aus Monozyten gewählt. Grund hierfür war die geringe Expression von CD83 auf murenen Adhärenz-DC, das als Markermolekül für den „voll-maturen“ Zustand der DC angesehen wird⁷⁶. So war es in unseren Händen nicht möglich, bereits nach 7-tägiger Kultivierung eine starke CD83-Expression durch Zytokinmaturierung zu erreichen.

Immaturen Adhärenz-DC zeigten jedoch nach 11-tägiger Kultivierung in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF bereits eine starke Expression von CD40, CD86 und MHCII, die auf einen murenen Zustand der Zellen hindeuten. Jedoch wurde nur durch Zusatz der Maturationszytokine eine CD83-Expression auf Adhärenz-DC induziert (**Abb. 14**).

ELUTRA-DC zeigten im Vergleich zu Adhärenz-DC eine geringere Expressionsstärke der Oberflächenmarker CD40 und MHCII, jedoch war auch hier nach 11-tägiger Kultivierung in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF eine erhöhte CD86-Expression zu verzeichnen. Der Zusatz des Zytokincocktails zur Maturation bewirkte hier keine verstärkte Expression von CD83 oder der anderen Oberflächenmarker (**Abb. 14**).

Wurden ELUTRA-mDC jedoch durch die Ernte einem Waschstress ausgesetzt und für einen weiteren Tag in Abwesenheit von GM-CSF und IL-4 kultiviert, wie bei den Kontrollzellen zur Untersuchung der Expression der Kostimulatoren nach CD70-mRNA Transfektion geschehen, so führte dies zu einer verstärkten Expression von CD40, CD83, CD86 sowie MHCII auf ELUTRA-DC (**Abb. 16**). CD70 wurde in Übereinstimmung mit Literaturdaten nach Zytokinmaturation jedoch nicht exprimiert^{34, 33}.

4.3 Abhängigkeit der Transfektionsrate vom Maturationszustand der Dendritischen Zellen

Frühere Arbeiten zur Abhängigkeit der Transfektionsrate von dem Maturationszustand der Dendritischen Zellen zeigten widersprüchliche Ergebnisse. So waren nach Elektroporation von EGFP-mRNA in mature Dendritische Zellen 33% ± 8% der Zellen EGFP-positive Zellen, während nach Transfektion von immaturren Dendritischen Zellen der Anteil an EGFP-positiven Zellen doppelt so hoch lag⁶². Andere Arbeiten zur Elektroporation von mRNA zeigen dagegen keine Abhängigkeit der Transfektionsrate vom Maturationszustand der Dendritischen Zellen^{83, 84}.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Transfektionsrate vom Maturationszustand der Zelle unabhängig ist, wenn die Zelle durch Elektroporation transfiziert wurde. So konnten nach Transfektion von EGFP-mRNA in mature Dendritische Zellen vergleichbar hohe Transfektionsraten und Expressionsstärken gefunden werden (**Abb. 15**), wie sie nach Transfektion in immature Dendritische Zellen gefunden wurden (**Abb. 9**).

Diese Ergebnisse sind für die Transfektion mittels Elektroporation theoretisch zu erwarten. Während die mRNA bei Elektroporation direkt in das Zytoplasma der Zelle eingebracht wird, muss bei alternativen, nicht viralen Transfektionsmethoden, wie z.B. Calciumphosphat-Präzipitation oder Lipofektion, die mRNA über Phagozytose in die Zelle aufgenommen werden. Dabei wird sie in Endosomen teilweise oder ganz

abgebaut, woraus eine niedrigere Expression des Proteins und niedrigere Transfektionsraten als nach Elektroporation gemessen werden⁷⁰.

Für Dendritische Zellen ist zudem bekannt, dass die Phagozytoseleistung vom Maturationszustand der Zelle abhängig ist. So wurde gezeigt, dass die Phagozytose, messbar durch die Aufnahme von Fluorescein-Isothiocyant (FITC)-Dextran in die Zelle, nach Maturation von Dendritischen Zellen mittels LPS, TNF α oder CD40-Ligation herabgesetzt war⁹. Für nicht virale, alternative Transfektionsmethoden bedeutet dies eine deutliche Verminderung der Transfektionsraten. Nicht zuletzt ist es wichtig, dass die in primäre Zellen zu transfizierende mRNA sowohl gecapt als auch polyadenyliert vorliegt, um hohe Transfektionsraten zu erreichen⁶¹.

Da sich die Abhängigkeit der Transfektionsrate von dem Maturationszustand der Dendritischen Zellen bei Elektroporation nicht zeigte und zudem hohe Transfektionsraten nach Elektroporation erreicht wurden, ist im Hinblick auf den Einsatz der Dendritischen Zellen als Tumorstoffimpfung die Elektroporation die Methode der Wahl zur Antigenbeladung von Dendritischen Zellen.

4.4 Einfluss der Elektroporation auf die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf zytokinmaturierten Dendritischen Zellen

Neben dem kognitiven Kontakt über MHC-TCR-Ligation wird die Ligation der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf maturaen Dendritischen Zellen mit CD28 auf der T-Zelle benötigt, um die Sekretion von IL-2 und eine erste Proliferationsphase der T-Zellen zu induzieren²⁸. Weiteres Kennzeichen für den maturaen Zustand der Dendritischen Zellen ist die starke Expression der Oberflächenmoleküle CD83 und CD40^{85, 86}. Um die Wirkung von exogenem CD70 auf die Th1-Antwort untersuchen zu können, durfte die Expression der oben genannten Maturationsmarker durch die Elektroporation nicht beeinträchtigt werden.

Die für die Untersuchungen eingesetzten ELUTRA-DC zeigten nach Zytokinmaturierung nur eine niedrige Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD83 (**Abb. 14**). Jedoch stieg die Expression nach Kultivierung in Abwesenheit von IL-4 und GM-CSF für weitere 24 Stunden an (**Abb. 16**). Wurde während dieser Phase die Transfektion von CD70-mRNA vorgenommen, so wurde hierdurch die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle nicht erniedrigt. Auch der Entzug von Maturationszytokinen bei der Kultivierung der Zellen nach Elektroporation hatte keine Erniedrigung der Expressionsstärke der

Oberflächenmarker zur Folge. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen^{62, 83, 69}.

Lediglich der Maturationsmarker CD83 wurde nach Elektroporation verstärkt exprimiert. Da nicht transfizierte mDC, die lediglich geerntet und gewaschen, jedoch nicht elektroporiert wurden, eine erniedrigte CD83 Expression zeigten als elektroporierte DC, muss geschlossen werden, dass CD83 durch den Stress während der Elektroporation induziert wurde.

Im Gegensatz hierzu wurde eine endogene CD70-Expression weder durch Elektroporation noch nach IL-4-Entzug gemessen. So waren nach Her2/neu-mRNA Transfektion nur 2,9% der transfizierten mDC CD70-positiv (**Abb. 17**). Dies steht im Widerspruch zu Literaturdaten, in denen eine CD70-Expression nach Waschstress und gleichzeitigem IL-4-Entzug beschrieben wurde³⁴. Die auf mDC nach CD70-mRNA-Transfektion nachgewiesene CD70-Expression ist daher hauptsächlich durch in die Zelle transfizierte, exogene CD70-mRNA hervorgerufen worden.

4.5 Auswirkung der CD70-Expression auf die Th1-Immunantwort

Zur Untersuchung der Auswirkung der CD70-Expression auf die CD4-Th1-Immunantwort wurden zytokinmaturierte Dendritische Zellen zunächst mit CD70-mRNA transfiziert und nachfolgend mit autologen CD4-T-Zellen in einer Kokultur kultiviert. Als Antigen wurde hierbei das Superantigen Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) eingesetzt, das durch simultane Bindung der α -Domäne des MHCII-Moleküls auf Dendritischen Zellen und der V- β -Domäne des T-Zellrezeptors (TCR) eine funktionelle Zellinteraktion zwischen APC und T-Zelle induzieren kann⁸⁷. Da beschrieben wurde, dass eine Th1-Polarisation der CD4-T-Zellen nach starken MHCII/TCR-Signal^{88, 89} oder hohen Antigenmengen induziert wird^{78, 90}, sollte der Einsatz von SEB als Antigen zur Induktion einer Th1-Immunantwort, gekennzeichnet durch die Sekretion von IFN γ , eingesetzt werden. Der Einfluss von CD70 auf die sezernierten Zytokine IFN γ und IL-4 kann in diesem Modell durch Blockierung mithilfe eines spezifischen anti-CD70-Antikörpers untersucht werden.

In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die CD70-Expression auf Dendritischen Zellen bereits 3 Stunden nach CD70-mRNA-Transfektion auftritt und über die Länge der Kokultur exprimiert wird. So war CD70 auch 27 Stunden nach Transfektion auf 82% der transfizierten DC nachweisbar (**Abb. 18**). Diese Ergebnisse sind in Einklang mit Daten anderer Arbeitsgruppen, in denen eine schnelle und nachhaltige Expression

des Proteins nach mRNA-Transfektion beschrieben wurde^{62, 91}. Daher wurden in dieser Arbeit transfizierte DC drei Stunden nach Transfektion in die Kokultur eingesetzt.

Die Untersuchungen zeigen, dass eine Th1-Polarisation, gekennzeichnet durch die Sekretion von IFN γ , lediglich nach SEB-vermitteltem MHCII/TCR-Kontakt erfolgte. Das Th2-Zytokin IL-4 wurde ebenfalls nur in Anwesenheit von SEB sezerniert, jedoch waren nur wenige IL-4-sezernierenden CD4-T-Zellen nachweisbar (**Abb. 19**).

In CD70-Blockierungsversuchen konnte gezeigt werden, dass die IFN γ -Sekretion hauptsächlich auf die CD70-CD27-Ligation zwischen Dendritischer Zelle und CD4-T-Zelle zurückgeführt werden kann. So lag der Anteil IFN γ -sezernierender CD4-T-Zellen ohne CD70-Blockierung im Mittel bei $21,5\% \pm 8,6\%$, während nach Zusatz eines CD70-spezifischen Antikörpers nur $7,1\% \pm 5,2\%$ IFN γ -sezernierende CD4-T-Zellen nachweisbar waren (**Abb. 20**).

Die Wirkung der CD70-Blockierung auf die IFN γ -Sekretion aus CD4-T-Zellen wird in der Literatur gegensätzlich diskutiert. So zeigen *in vivo* Daten, dass die Bildung spezifischer IFN γ -positiver CD4-T-Zellen und CD8-T-Zellen nach adoptivem Transfer durch die Gabe von anti-CD70-Antikörper eingeschränkt wird⁹⁸. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten bestätigen dies.

Andererseits wurde eine eingeschränkte IFN γ -Sekretion nur in CD8-T-Zellen beschrieben, während die CD70-Blockierung keinen Einfluss auf die IFN γ -Sekretion aus CD4-T-Zellen hatte³⁴. Hier muss jedoch beachtet werden, dass die in das allogene *in vitro*-Kokultursystem eingesetzten CD70-DC nur mit anti-CD70-Antikörper vorbehandelt wurden, während bei den *in vivo*-Untersuchungen anti-CD70-Antikörper über die Stimulationsdauer hinweg vorlag. Eine Aufhebung der CD70-Blockierung könnte daher durch die Expression von CD70 auf T-Zellen³⁶ und die verstärkte endogene Expression von CD70 auf DC nach MHCII/TCR-Signal (**Abb. 22**) in Verbindung mit einer im Vergleich zu CD8-T-Zellen doppelt so hohe CD4-T-Zellproliferation während der Kokultur³⁴ erfolgt sein.

Die eingeschränkte IFN γ -Sekretion bei CD70-Blockierung mittels anti-CD70-Antikörper könnte durch einen T-Zellverlust während der Kultivierung verursacht worden sein. So wurde beschrieben, dass durch CD27-Ligation die Expression von anti-apoptischen Molekülen, wie Bcl-2 und Bcl-xL induziert wird³⁰, deren Expression bei fehlender CD27-Ligation möglicherweise unterbleibt.

Gleichzeitig wurde ebenfalls beschrieben, dass eine Signalgebung durch CD27 in die T-Zelle in Anwesenheit von CD3-Antikörper und einer konstitutiv CD70 exprimierenden B-Zelllinie die Expression von CD95 (Fas) auf T-Zellen induzieren kann⁹². Fas gehört zu den Todesdomänen enthaltenden Molekülen der TNF-Rezeptorfamilie, die durch Aktivierung von Caspasen Apoptose induzieren können^{93,94}.

Diese gegensätzlich ausgerichteten Wirkungen könnten bei der Regulation der T-T-Zellkommunikation eine Rolle spielen.

Bei dem Fas-induzierten Zelltod wird FADD (*Fas-associated protein with a death domain*) an die Todesdomäne (DD: *death domain*) des Rezeptors rekrutiert. An FADD bindet die Effektordomäne DED (*death effector domain*), die den DISC (*death-inducing signaling complex*)-Komplex vervollständigt. Procaspase 8 kann an den DISC, genauer die Effektordomäne DED, rekrutiert und hierdurch aktiviert werden. Die Aktivierung von Caspase 3 durch Caspase 8 führt schließlich zur Induktion von Apoptose. Durch Interaktion von c-FlipL (*Fas-associated death domain-like interleukin-1 β -converting enzyme (FLICE) inhibitory protein, long*) mit der DED und dem Adaptermolekül FADD kann die zyklische Rekrutierung und Aktivierung von Procaspase 8 blockiert werden⁹⁴.

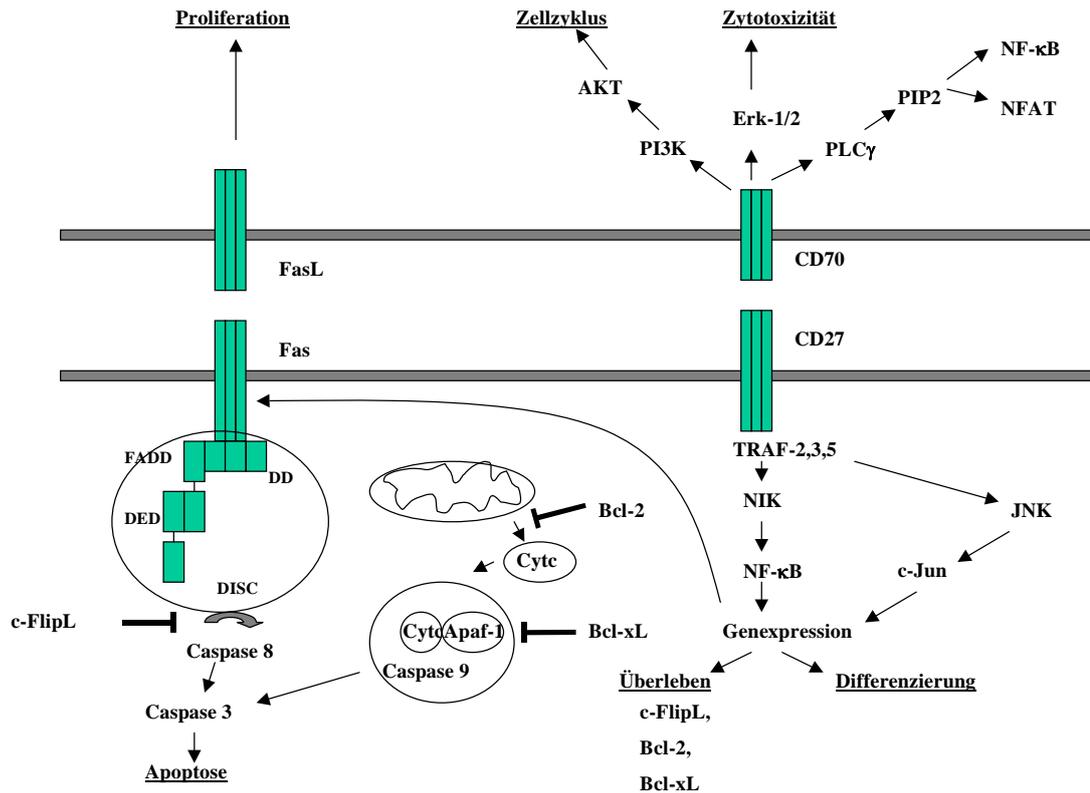


Abbildung 24: Signaltransduktionswege und zelluläre Antwort unter Kontrolle von CD27 und CD70 bei T-T-Zellkontakt^{30, 94} verändert.

CD27-Ligation führt zur Aktivierung des NF-κB- und JNK-Signalweges, die in die Expression von Proteinen für die Zelldifferenzierung und das Überleben sowie die Expression von Fas münden. Fas kann über den Disc-Komplex Caspase 8 und nachfolgend Caspase 3 aktivieren und hierdurch Apoptose induzieren. c-FlipL verhindert dies durch Interaktion mit FADD, wodurch die Rekrutierung von Procaspase 8 in den Disc-Komplex verhindert wird. Die anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-XL hemmen den mitochondrien-abhängigen Zelltod. Bei Hemmung der Apoptose kann Fas als kostimulatorisches Signal fungieren. Die retrograde Signalgebung durch CD70 in die T-Zelle führt durch Aktivierung von PI3K und Erk-1/2 zur Aktivierung, Zellteilung und Ausbildung der Zytotoxizität. (Weitere Erläuterung siehe Text).

Der mitochondrien-abhängige Zelltod kann über Fas ebenfalls aktiviert werden, wenn nur geringe Mengen an aktivem Caspase 8 vorliegen. Caspase 8 induziert in diesem Fall die proteolytische Spaltung von Bid, das sich als Kanalprotein in die Mitochondrienmembran einlagert und die Freisetzung von Cytochrom C (CytC) bewirkt. Cytochrom C aktiviert nach Komplexbildung mit Procaspase 9 und Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor*) Caspase 9, die hierauf Caspase 3 aktiviert und Apoptose induziert⁹⁴.

Der mitochondrien-abhängige Zelltod kann durch die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL verhindert werden^{95, 96}, deren Expression bei CD27-Ligation induziert wird. Unter diesen Bedingungen könnte Fas als kostimulatorisches Molekül wirken.

So wurde gezeigt, dass TCR α/β -transgene, Antigen-spezifische CD8-T-Zellen nach adoptivem Transfer in eine Fas-positive Mäuse stark expandierten, während eine T-Zellproliferation in Fas-negativen Mäusen nur moderat ausfiel. Umgekehrt proliferierten T-Zellen, die für Fas-Ligand positiv waren, stärker als Fas-Ligand negative T-Zellen⁹⁷.

Auch über CD70 kann eine retrograde Signalgebung in die T-Zelle erfolgen, die bei T-T-Kommunikation eine Rolle spielen könnte. So wurde gezeigt, dass CD70 sowohl PI3K als auch die MAP (*mitogen activated* protein)-Kinase Erk (extracellular signal-regulated kinase)-1/2 aktiviert und hierdurch sowohl die Zellteilung als auch die Ausbildung von Zytotoxizität regulieren kann³⁰.

CD27-induziertes Fas und die Signalgebung durch CD70 könnten damit sowohl bei der Proliferation als auch bei der Kontraktion des T-Zellpools zum Ende der Immunantwort und damit bei der Homöostase der T-Zellen eine Rolle spielen.

4.6 IL-12p70 und IL-10-Sekretion nach SEB-vermitteltem kognitivem Kontakt

Der Polarisation der T-Zellen, die durch die Sekretion von IFN γ oder IL-4 gekennzeichnet ist, geht die Polarisation der DC voraus. So unterstützt die Freisetzung von IL-12p70 aus Dendritischen Zellen die Polarisation von CD4-T-Zelle zu Th1-Zellen, während die Sekretion von IL-10 die Produktion von IL-12 hemmt⁹⁹ und die Bildung von Th2-Zellen fördert^{100, 101}.

IL-12p70 ist ein Homodimer, das von einer 35kDa leichten Kette (p35) und einer 49kDa (p40) schweren Kette gebildet wird. Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und DC sezernieren die biologisch aktive Form IL-12p70 nach Kontakt über Toll-like Rezeptoren (TLR) zu Pathogenen oder nach CD40-Ligation⁹⁹. Es wurde beschrieben, dass DC 8 Stunden nach LPS-Stimulation eine starke Bildung von IL-12p35- und IL-12p40-mRNA zeigen, die in der Sekretion des biologisch aktiven IL-12p70-Moleküls in hohen Konzentrationen 12 Stunden nach LPS-Stimulierung mündet. Dagegen fand eine vermehrte Bildung von IL-10-mRNA 18 Stunden nach LPS-Aktivierung statt, während zu diesem Zeitpunkt IL-12-mRNA beider Isotypen nicht mehr gebildet wurde. 24 Stunden nach Aktivierung sezernierten DC weder IL-12p70 noch IL-10. Die Zytokinsekretion konnte auch durch CD40-Ligation nicht wieder induziert werden. Dieser Zustand, in dem die Zytokinproduktion nach DC-Aktivierung eingestellt wird, wurde als „erschöpfter Zustand“ der DC definiert⁷⁸.

Physiologisch betrachtet maturieren DC während ihrer Wanderung in den Lymphknoten. Die Sekretion der T-Zell-polarisierenden Zytokine macht in diesem Zusammenhang nur bei Kontakt der DC zu T-Zellen Sinn. Es stellt sich daher die Frage, ob zuvor durch einen Zytokincocktail für 16-20 Stunden maturierte DC durch den kognitiven Kontakt mit CD4-T-Zellen erneut in die Lage kommen, IL-12p70 zu sezernieren.

Dies hat Bedeutung für DC, die als Vakzine eingesetzt werden sollen. So muss gewährleistet sein, dass DC eine hohe Anzahl von kostimulatorischen Molekülen zeigen, um T-Zellen optimal zu stimulieren. Dies wird durch Maturation der DC erreicht. Sollte die Zytokinsekretion zeitabhängig und nicht T-Zell-kontaktabhängig erfolgen, so muss der Zeitpunkt der DC-Gabe in den Patienten mit der Maturation der DC abgestimmt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass zytokinmaturierte DC, die in Abwesenheit von Antigen mit autologen T-Zellen kultiviert wurden, weder IL-12p70 noch IL-10 sezernieren (**Abb. 21**). Dies entspricht dem von Langenkamp et al. definierten „erschöpften Zustand“ der DC. Dagegen wurde bei SEB-vermitteltem kognitivem Kontakt sowohl IL-12p70 als auch IL-10 sezerniert (**Abb. 21**). Somit sind DC auch nach langer Aktivierung mittels Zytokinen grundsätzlich zur Sekretion von Zytokinen in der Lage. Da die IL-10-Konzentration in der Regel die IL-12p70-Konzentration übersteigt, muss jedoch geschlossen werden, dass diese DC eine Th2-Polarisation fördern.

Diese Annahme steht nicht im Widerspruch zu den Ergebnissen zur IFN γ -Sekretion. So reicht ein starkes TCR-Signal zusammen mit einem CD28-kostimulatorischem Signal aus, um Th1-Zellen zu induzieren^{102,103}. Bei schwachen MHC/TCR-Signalen müssen jedoch zusätzliche kostimulatorische Faktoren, wie die Sekretion von IL-12p70 hinzukommen, um die Th1-Polarisation zu erreichen. So zeigen eigene Untersuchungen, in denen FluM1-Peptid beladene, zytokinmaturierten DC mit autologen CD4-T-Zellen kokultiviert wurden, keine Sekretion von IL-12p70 oder IL-10 (Daten nicht gezeigt).

Die Transfektion von DC erhöhte in vier von fünf Fällen die IL-12p70-Sekretion und in drei von fünf Fällen die IL-10-Sekretion. Nur Zellen der Isolation 050603 zeigten eine Th1-Polarisation mit hoher IL-12p70- und geringer IL-10-Sekretion. Die IL-12p70-Konzentration stieg bei den Zellen dieser Isolation nach Transfektion an. Zusammenfassend kann daraus geschlossen werden, dass die Elektroporation die Polarisation der DC nicht beeinflusst, jedoch einen maturierenden Effekt auf die DC

hat, der zu einer verstärkten Freisetzung von Zytokinen führt. Der maturierende Effekt der Elektroporation wurde zuvor schon in einer erhöhten Expression von CD83 deutlich (**Abb. 16**).

Dendritische Zellen werden durch Ligation von Toll-like Rezeptoren mit PAMPs zur Induktion von CD4-T-Effektorzellen befähigt. Dagegen induzierten indirekt über Zytokine aktivierte DC zwar die Proliferation von CD4-T-Zellen, diese waren jedoch IFN γ -negativ⁵³. Ob diese IFN γ -negativen CD4-T-Zellen T-Regulatorzellen (Tregs) sind ist offen. Es wurde jedoch ebenfalls beschrieben, dass mature DC, die mit niedrigen LPS-Konzentrationen von 50ng/ml maturiert wurden, die Antigen-abhängige Induktion von Tregs induzieren können⁴⁸.

Physiologisch betrachtet treten nicht lizenzierte DC im Gewebe zum Ende einer Infektion auf. Zu diesem Zeitpunkt liegen wenige Pathogene vor und die Konzentration der inflammatorischen Zytokine ist hoch. Es ist vorstellbar, dass die durch nicht lizenzierte DC zur Proliferation angeregten IFN γ -negativen CD4-T-Zellen durch Konkurrenz mit Effektorzellen die Immunantwort im Gewebe abschwächen könnten. Würden Tregs induziert, so könnte durch Antigen-spezifische Interaktion der Tregs mit den Effektorzellen die Immunantwort abgeschaltet werden.

Zusammenfassend sind die in den Untersuchungen eingesetzten DC sowohl aufgrund der zu langen Maturationszeit als auch aufgrund der indirekten Zytokinmaturierung nicht für den Einsatz als DC-Vakzine geeignet. Zur weiteren Entwicklung der DC-Vakzine sollen Untersuchungen mit PAMPs-stimulierten oder CD40-Ligand aktivierten DC durchgeführt, und die Maturationszeit bei weniger als 8 Stunden gehalten werden. Zusätzliches Waschen der Zellen nach PAMPs-Stimulation wurde als förderlich sowohl für die IL-12p70-Sekretion⁷⁸ als auch für die Expression von endogenem CD70 auf Dendritischen Zellen beschrieben³⁴.

4.7 Expression von endogenem CD70 auf humanen Dendritischen Zellen

Erstmals konnte gezeigt werden, dass durch einen kognitiven, SEB-vermittelten MHCII/TCR-Kontakt die endogene Expression von CD70 auf humanen Dendritischen Zellen induziert werden kann. So waren nach 24-stündiger SEB-Stimulation in Anwesenheit von CD4-T-Zellen 19,5% \pm 9,7% der Dendritischen Zellen CD70-positiv, wenn immature Dendritische Zellen eingesetzt wurden. Wurden dagegen mature Dendritische Zellen in die Kokultur eingesetzt, so waren nach 24-stündiger Inkubation in Anwesenheit von CD4-T-Zellen 44,1% \pm 14,6% der Zellen

CD70-positiv (**Abb. 22**). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen^{34, 33} trat dagegen keine CD70-Expression durch Aktivierung von Dendritischen Zellen mittels eines Zytokincocktails auf.

Im murinen Modell wurde eine endogene Expression von CD70 auf Dendritischen Zellen sowohl nach CD40-Ligation, als auch nach Aktivierung mittels PAMPs beschrieben³³. Die Stärke der CD70-Expression schien dabei an das verwendete Stimulationsagens gekoppelt zu sein. So wurde nach Poly I:C-Stimulation nur eine geringe CD70-Expression gefunden, während nach LPS- oder CpG-Stimulation bis zu 50% der Zellen CD70 auf ihrer Oberfläche exprimierten. Lediglich nach CD154 (CD40L)-Stimulation war CD70 auf 86% der Zellen nachweisbar³³. Auf humanen Dendritischen Zellen wurde die endogene Expression von CD70 nach Stimulation mit hohen LPS-Konzentrationen erst kürzlich beschrieben³⁴. Die CD70-Expression trat hier jedoch nur auf, wenn IL-4 durch Waschen entfernt wurde.

Auffällig an diesen Daten ist, dass sowohl im murinen als auch im humanen Modell die endogene CD70-Expression erst spät erfolgt. So war CD70 erst nach 48-stündiger Aktivierung mit PAMPs nachweisbar, während nach CD40-Ligation eine CD70-Expression bereits nach 24 Stunden auftrat³³. Im humanen System wurde eine endogene CD70-Expression nach 24 Stunden auf 11,9% der DC gefunden. Nach weiteren 48 Stunden waren 42,0% der DC CD70-positiv³⁴.

Die in den eigenen Versuchen beobachtete endogene CD70-Expression trat dagegen schnell, also bereits 24 Stunden nach SEB-vermitteltem MHCII/TCR-Kontakt, auf und verstärkte sich, wenn in die Kokultur bereits maturierte Dendritische Zellen eingesetzt wurden. Endogenes CD70 wurde in diesem Fall auf 44,1% ± 14,6% der Zellen nachgewiesen. Die Anzahl der CD70-exprimierenden Zellen erreichte damit in etwa die von Iwamoto et al. beschriebenen Werte 48 Stunden nach Maturation, liegen jedoch unter den nach CD40-Ligation beschriebenen Expressionswerten.

Die in eigenen Untersuchungen gesehene Beteiligung des TCR sowie die Abhängigkeit vom Maturationszustand der DC lassen darauf schließen, dass die endogene CD70-Expression T-Zell-abhängig erfolgt. Die CD40-Ligation auf Dendritischen Zellen führte nachweislich zu einer CD70-Expression auf Dendritischen Zellen³². Die von Bullock und Yagita beschriebene Abhängigkeit der CD70-Expression von dem verwendeten PAMPs kann dadurch erklärt werden, dass Dendritische Zellen je nach Stimulationsagens unterschiedlich starke CD154 (CD40L)-Expression auf CD4-T-Zellen induzieren und hierüber die CD70-

Expression auf DC steuern. Da die dort eingesetzten DC MHCII-defizient waren, könnte die CD40L-Expression auf T-Zellen durch Stimulation der T-Zellen über das CD1-System erfolgt sein. So ist theoretisch die Präsentation von LPS im CD1 möglich¹⁰⁴.

Die Annahme, dass die CD70-Expression ausschließlich T-Zell-abhängig erfolgt, ist biologisch sinnvoll. CD70 steuert durch Ligation mit CD27 die IFN γ -Sekretion aus T-Zellen. Diese Sekretion sollte jedoch nur bei kognitivem Kontakt erfolgen, um zu gewährleisten, dass das freigesetzte Zytokin über kurze Distanzen und mit hohen Konzentrationen auf die spezifisch auf das vorliegende Pathogen wirkende Effektorzelle wirken kann. Andererseits sollte die alleinige Ligation von CD70 mit CD27 auf unspezifischen T-Zellen nicht zu einer IFN γ -Freisetzung führen. Diese T-Zellen blieben also ruhend. Damit beeinflusst CD70-Expression über den beschriebenen Mechanismus allein spezifisch gebundene T-Zellen, die hierdurch Signale für Proliferation, Differenzierung und Überleben erhalten⁹⁸.

Um zu untersuchen, ob die CD70-Expression allein T-Zell-abhängig erfolgt, kann die Blockierung der CD40-Ligation zwischen DC und T-Zelle bei gleichzeitiger TLR-Stimulation durchgeführt und nachfolgend die CD70-Expression auf Dendritischen Zellen erneut untersucht werden. Die endogene CD70-Expression sollte in diesem Fall unterbleiben.

Die Expression von CD70 hat weitreichende Folgen für die T-Zellantwort. So wird der CD70-CD27-Ligation eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben¹⁰⁵. Dabei scheinen CD27 mit CD28 synergistisch zu wirken^{39, 106}. Während CD28 durch die Induktion von IL-2 den Eintritt der T-Zelle in den Zellzyklus unterstützt¹⁰⁷, können Mitglieder der TNFR-Familie, zu denen CD27 gehört, die Expression anti-apoptotischer Proteine, wie Bcl-x_L induzieren¹⁰⁸. CD27 fördert daher das Überleben von aktivierten T-Zellen^{106, 109}. Sowohl CD28 als auch CD27 bestimmen demnach die Größe des T-Zellpools. So zeigte sich in CD27^{-/-}-defizienten Mäusen eine verminderte Bildung von spezifischen T-Zellen⁴². Dagegen wurde in CD70-transgenen Mäusen eine verstärkte T-Zellproliferation beschrieben^{43, 44}. Auch die T-Zellkontaktsphase war in CD70-transgenen Mäusen reduziert. Somit führt die CD70-CD27-Ligation zu einer Erhöhung der Anzahl von Gedächtniszellen und zu einer verstärkten Sekundärantwort^{109, 41}.

Zusammenfassend kann durch die exogene Expression von CD70 auf Dendritische Zellen eine verbesserte Tumorstoffe hergestellt werden, die eine verstärkte CD8-T-Zellproliferation und die Bildung von Gedächtniszellen induzieren kann. Die CD70-Expression erfolgt dabei T-Helferzell-abhängig. Jedoch muss beachtet werden, dass durch die T-Zellhilfe weitere Mitglieder der kostimulatorischen TNFR-Ligandenfamilie, wie 4-1BBL oder OX40L, induziert werden, die ebenfalls Auswirkungen auf die Bildung der Immunantwort haben^{110, 111, 112, 113}.

4.8 Ausblick

Weitere Untersuchungen sollten sich mit der Induktion von spezifischen CTL nach Antigen-Beladung mittels Elektroporation von CD70mDC beschäftigen. Dabei sollten DC eingesetzt werden, die weniger als 8 Stunden mit CD40-Ligand oder PAMPs aktiviert wurden. Die Auswirkung der exogenen CD70-Expression auf die Anzahl an gebildete spezifischen T-Zellen und die Bildung von Gedächtniszellen sollten nachfolgend untersucht werden. Auch die Beteiligung der übrigen Mitglieder der kostimulatorischen TNFR-Familienmitglieder ist in diesem Zusammenhang interessant.

Um abzuklären, ob eine endogene CD70-Expression allein T-Zell-abhängig, aber TLR-unabhängig erfolgt, kann eine Blockierung der CD40-CD40L-Ligation bei gleichzeitiger TLR-Stimulation von DC durchgeführt und die CD70-Expression auf DC nachfolgend untersucht werden. Eine endogene CD70-Expression sollte in diesem Fall unterbleiben.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten, dass die Blockierung der CD70-CD27-Ligation zu einer verminderten IFN γ -Freisetzung aus T-Zellen führte. Hier muss durch Überprüfung der Proliferation ausgeschlossen werden, dass die erniedrigten IFN γ -Werte durch Apoptose der T-Zellen verursacht wurde.

Schließlich könnten weitere Untersuchungen zur Elektroporation durchgeführt werden, um zu klären, ob mRNA durch gerichtete Diffusion über hydrophile Poren oder durch Elektrodifusion in die Zelle gelangt. Unter der Annahme, dass die Elektrodifusion einem carriergestützten Transmembrantransport ähnelt, sollte sich die MFI mit steigender mRNA-Konzentrationen zunächst konzentrationsabhängig, für hohen mRNA-Konzentrationen jedoch konzentrationsunabhängig, verhalten.

5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind wegen ihrer Fähigkeit zur Antigen-Prozessierung und Antigen-Präsentation und wegen der hohen Anzahl an kostimulatorischen Molekülen gute Induktoren einer zellulären Immunantwort und werden deshalb als Vakzine für die Therapie von Tumoren diskutiert. Klinischen Studien zeigten jedoch, dass nur wenige Patienten auf diese DC-basierte Vakzine ansprachen. Grund hierfür kann die Verwendung von nicht lizenzierten DC sein. Eine Lizenzierung von DC kann durch PAMPs-Simulation oder CD40-Ligation erreicht werden und führt u.a. zur Expression weiterer kostimulatorischer Moleküle. CD70, ein Mitglied der TNFR-Familie könnte ein solches kostimulatorisches Molekül sein.

Als erster Schritt zur Herstellung einer verbesserten DC-basierten Vakzine sollte in dieser Arbeit die exogene Expression von CD70 in humanen zytokinmaturierten DC durch Elektroporation von CD70-mRNA erreicht werden und nachfolgend die Auswirkung der CD70-Expression auf die Zytokinantwort untersucht werden.

Die Transfektion von immaturren DC zeigte nach Optimierung des Elektroporationsprozesses eine Transfektionsrate von $73,0\% \pm 1,3\%$ und einer Viabilität von $83,1\% \pm 3,9\%$. Die Transfektionseffizienz, definiert als die Ausbeute an transfizierten Zellen nach Elektroporation, betrug dagegen nur $33,3\% \pm 4,8\%$, was bei der Herstellung von Antigen-beladenen DC für klinische Studien berücksichtigt werden sollte. Jedoch wurde durch die Elektroporation die Expressionsstärke der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD83, CD86 sowie MHCII nicht erniedrigt.

Die Blockierung von CD70 führte zu einer starken Abnahme der $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion aus autologen CD4-T-Zellen, was den Einfluss von CD70 auf die Th1-Polarisation unterstreicht. Es wurde ebenfalls deutlich, dass bereits maturierte DC nach kognitivem Kontakt zu autologen CD4-T-Zellen die Zytokine IL-12p70 und zu einem größeren Teil IL-10 freisetzen, und daher Th2-polarisiert vorliegen.

Erstmals konnte außerdem gezeigt werden, dass humane Dendritische Zellen, die mit autologen T-Zellen kultiviert wurden, bereits nach 24 Stunden und abhängig vom Maturationsgrad der eingesetzten DC im hohen Maße endogenes CD70 exprimieren, wodurch deutlich wird, dass die CD70-Expression T-Zell-abhängig erfolgt.

Die vorliegende Arbeit liefert neben einem optimierten Elektroporationsprotokoll zur Antigenbeladung von DC auch neue Anhaltspunkte für die Entwicklung einer verbesserten DC-basierten Tumorstoffimpfung.

Summary

Due to their ability to process and present antigen and to present a wide range of costimulatory molecules, dendritic cells (DC) are thought to be good inducers of the cellular immune response. Therefore they are used as cellular vaccines in tumor therapy. Clinical studies, however, showed only weak response rates to these DC-vaccines. The reason for this may be the use of non-licensed DC. Licensing can be achieved by PAMPs or CD40-Ligation and induces additional costimulatory molecules to B7-costimulatory molecules. CD70, a member of the TNFR-family, may be one of these costimulatory molecules.

In order to develop an improved tumor vaccine, exogenous CD70 was expressed in human cytokine-matured DC by mRNA-electroporation and the effect of CD70-expression on cytokine secretion of CD4-T-cells was examined.

Electroporation of immature DC with a rectangular pulse showed a transfection rate of $73\% \pm 1,3\%$ and a viability of $83,1\% \pm 3,9\%$. However, the transfection efficiency, defined as the transfection rate referring to cell yield, was only $33,3\% \pm 4,8\%$. Nevertheless, electroporation did not decrease the expression of CD40, CD83, CD86 and MHCII.

Blocking CD70 decreased the release of IFN γ from autologous CD4-T-cells, showing that CD70-expression has an impact on the secretion of IFN γ from CD4-T-cells and therefore on Th1-polarisation. However, upon cognitive contact to T-cells DC released IL-12p70 and to a greater extent IL-10, showing the Th2-phenotype of these DC. What is more, when cocultured with autologous T-cells for 24 hours endogenous CD70 was expressed depending on the maturation state of the DC used, showing that CD70-expression requires cognitive contact to T-cells.

In conclusion, this work describes an optimized electroporation protocol for an effective antigen-loading of human DC and gives new indications to the usage of these DC in immunotherapy.

Literaturverzeichnis

1. Tosi, M. F. 2005. Innate immune responses to infection. *J.Allergy Clin.Immunol.* 116:241-249.
2. Knutson, K. L. and M. L. Disis. 2005. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol.Immunother.* 54:721-728.
3. de Jong, E. C., H. H. Smits, and M. L. Kapsenberg. 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin.Immunopathol.* 26:289-307.
4. Suzue, K., T. Asai, T. Takeuchi, and S. Koyasu. 2003. In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur.J.Immunol.* 33:2666-2675.
5. Andersson, A., W. J. Dai, J. P. Di Santo, and F. Brombacher. 1998. Early IFN-gamma production and innate immunity during *Listeria monocytogenes* infection in the absence of NK cells. *J.Immunol.* 161:5600-5606.
6. Sproul, T. W., P. C. Cheng, M. L. Dykstra, and S. K. Pierce. 2000. A role for MHC class II antigen processing in B cell development. *Int.Rev.Immunol.* 19:139-155.
7. Cunningham, A. F., K. Serre, E. Mohr, M. Khan, and K. M. Toellner. 2004. Loss of CD154 impairs the Th2 extrafollicular plasma cell response but not early T cell proliferation and interleukin-4 induction. *Immunology* 113:187-193.
8. Rossi, M. and J. W. Young. 2005. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J.Immunol.* 175:1373-1381.
9. Sallusto, F., M. Cella, C. Danieli, and A. Lanzavecchia. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J.Exp.Med.* 182:389-400.
10. Steinman, R. M., D. Hawiger, and M. C. Nussenzweig. 2003. Tolerogenic dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.* 21:685-711.
11. Bonifaz, L., D. Bonnyay, K. Mahnke, M. Rivera, M. C. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2002. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J.Exp.Med.* 196:1627-1638.
12. Mahnke, K., M. Guo, S. Lee, H. Sepulveda, S. L. Swain, M. Nussenzweig, and R. M. Steinman. 2000. The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J.Cell Biol.* 151:673-684.
13. Brittingham, K. C., G. Ruthel, R. G. Panchal, C. L. Fuller, W. J. Ribot, T. A. Hoover, H. A. Young, A. O. Anderson, and S. Bavari. 2005. Dendritic cells endocytose *Bacillus anthracis* spores: implications for anthrax pathogenesis. *J.Immunol.* 174:5545-5552.
14. Albert, M. L., S. F. Pearce, L. M. Francisco, B. Sauter, P. Roy, R. L. Silverstein, and N. Bhardwaj. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphaVbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J.Exp.Med.* 188:1359-1368.
15. Iyoda, T., S. Shimoyama, K. Liu, Y. Omatsu, Y. Akiyama, Y. Maeda, K. Takahara, R. M. Steinman, and K. Inaba. 2002. The CD8+ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J.Exp.Med.* 195:1289-1302.

Literaturverzeichnis

16. Heath, W. R. and F. R. Carbone. 2001. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu.Rev.Immunol.* 19:47-64.
17. Janeway, C. A., Jr. and R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. *Annu.Rev.Immunol.* 20:197-216.
18. Underhill, D. M. and A. Ozinsky. 2002. Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr.Opin.Immunol.* 14:103-110.
19. Jonuleit, H., U. Kuhn, G. Muller, K. Steinbrink, L. Paragnik, E. Schmitt, J. Knop, and A. H. Enk. 1997. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur.J.Immunol.* 27:3135-3142.
20. Lee, A. W., T. Truong, K. Bickham, J. F. Fonteneau, M. Larsson, S. Da, I, S. Somersan, E. K. Thomas, and N. Bhardwaj. 2002. A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4:A8-A22.
21. Caux, C., C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Kooten, I. Durand, and J. Banchereau. 1994. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J.Exp.Med.* 180:1263-1272.
22. Wurtzen, P. A., M. H. Nissen, and M. H. Claesson. 2001. Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scand.J.Immunol.* 53:579-587.
23. Banchereau, J. and A. K. Palucka. 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nat.Rev.Immunol.* 5:296-306.
24. Randolph, G. J., V. Angeli, and M. A. Swartz. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat.Rev.Immunol.* 5:617-628.
25. Steinman, R. M. 2001. Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation. *Mt.Sinai J.Med.* 68:160-166.
26. Janeway, C. A. jr. and W. M. S. M. Travers P. *Immunologie*. Spektrum-Akademischer Verlag.
27. Iijima, N., Y. Yanagawa, J. M. Clingan, and K. Onoe. 2005. CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int.Immunol.* 17:1201-1212.
28. Watts, T. H. 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu.Rev.Immunol.* 23:23-68.
29. Croft, M. 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat.Rev.Immunol.* 3:609-620.
30. Borst, J., J. Hendriks, and Y. Xiao. 2005. CD27 and CD70 in T cell and B cell activation. *Curr.Opin.Immunol.* 17:275-281.
31. Gruss, H. J. and S. K. Dower. 1995. Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85:3378-3404.
32. Taraban, V. Y., T. F. Rowley, and A. Al Shamkhani. 2004. Cutting edge: a critical role for CD70 in CD8 T cell priming by CD40-licensed APCs. *J.Immunol.* 173:6542-6546.

33. Bullock, T. N. and H. Yagita. 2005. Induction of CD70 on dendritic cells through CD40 or TLR stimulation contributes to the development of CD8+ T cell responses in the absence of CD4+ T cells. *J.Immunol.* 174:710-717.
34. Iwamoto, S., M. Ishida, K. Takahashi, K. Takeda, and A. Miyazaki. 2005. Lipopolysaccharide stimulation converts vigorously washed dendritic cells (DCs) to nonexhausted DCs expressing CD70 and evoking long-lasting type 1 T cell responses. *J.Leukoc.Biol.* 78:383-392.
35. Tesselaar, K., Y. Xiao, R. Arens, G. M. van Schijndel, D. H. Schuurhuis, R. E. Mebius, J. Borst, and R. A. van Lier. 2003. Expression of the murine CD27 ligand CD70 in vitro and in vivo. *J.Immunol.* 170:33-40.
36. Stuhler, G., A. Zobywalski, F. Grunebach, P. Brossart, V. L. Reichardt, H. Barth, S. Stevanovic, W. Brugger, L. Kanz, and S. F. Schlossman. 1999. Immune regulatory loops determine productive interactions within human T lymphocyte-dendritic cell clusters. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96:1532-1535.
37. Watts, A. D., N. H. Hunt, Y. Wanigasekara, G. Bloomfield, D. Wallach, B. D. Roufogalis, and G. Chaudhri. 1999. A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J.* 18:2119-2126.
38. Yamada, S., K. Shinozaki, and K. Agematsu. 2002. Involvement of CD27/CD70 interactions in antigen-specific cytotoxic T-lymphocyte (CTL) activity by perforin-mediated cytotoxicity. *Clin.Exp.Immunol.* 130:424-430.
39. Hintzen, R. Q., S. M. Lens, K. Lammers, H. Kuiper, M. P. Beckmann, and R. A. van Lier. 1995. Engagement of CD27 with its ligand CD70 provides a second signal for T cell activation. *J.Immunol.* 154:2612-2623.
40. Iwamoto, S., M. Ishida, S. Tamaoki, T. Hagiwara, H. Sueki, and A. Miyazaki. 2004. A human Langerhans cell-like cell line, ELD-1, promotes CD8 T cells to produce IFN-gamma through CD70-dependent alternative pathway. *Cell Immunol.* 232:49-56.
41. Rowley, T. F. and A. Al Shamkhani. 2004. Stimulation by soluble CD70 promotes strong primary and secondary CD8+ cytotoxic T cell responses in vivo. *J.Immunol.* 172:6039-6046.
42. Hendriks, J., L. A. Gravestien, K. Tesselaar, R. A. van Lier, T. N. Schumacher, and J. Borst. 2000. CD27 is required for generation and long-term maintenance of T cell immunity. *Nat.Immunol.* 1:433-440.
43. Arens, R., K. Tesselaar, P. A. Baars, G. M. van Schijndel, J. Hendriks, S. T. Pals, P. Krimpenfort, J. Borst, M. H. van Oers, and R. A. van Lier. 2001. Constitutive CD27/CD70 interaction induces expansion of effector-type T cells and results in IFN-gamma-mediated B cell depletion. *Immunity.* 15:801-812.
44. Tesselaar, K., R. Arens, G. M. van Schijndel, P. A. Baars, M. A. van der Valk, J. Borst, M. H. van Oers, and R. A. van Lier. 2003. Lethal T cell immunodeficiency induced by chronic costimulation via CD27-CD70 interactions. *Nat.Immunol.* 4:49-54.
45. Moser, M. 2003. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity.* 19:5-8.
46. Steinman, R. M. and M. C. Nussenzweig. 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 99:351-358.
47. Steinman, R. M., D. Hawiger, K. Liu, L. Bonifaz, D. Bonnyay, K. Mahnke, T. Iyoda, J. Ravetch, M. Dhodapkar, K. Inaba, and M. Nussenzweig. 2003. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 987:15-25.

Literaturverzeichnis

48. Yamazaki, S., T. Iyoda, K. Tarbell, K. Olson, K. Velinzon, K. Inaba, and R. M. Steinman. 2003. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J.Exp.Med.* 198:235-247.
49. Onji, M. and S. M. Akbar. 2005. On dendritic cell-based therapy for cancers. *J.Zhejiang.Univ.Sci.B* 6:1-3.
50. Gilboa, E. 2001. The risk of autoimmunity associated with tumor immunotherapy. *Nat.Immunol.* 2:789-792.
51. Botti, C., E. Seregini, L. Ferrari, A. Martinetti, and E. Bombardieri. 1998. Immunosuppressive factors: role in cancer development and progression. *Int.J.Biol.Markers* 13:51-69.
52. Rosenberg, S. A., J. C. Yang, and N. P. Restifo. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat.Med.* 10:909-915.
53. Sporri, R. and Reis e Sousa. 2005. Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4⁺ T cell populations lacking helper function. *Nat.Immunol.* 6:163-170.
54. Heath, W. R. and J. A. Villadangos. 2005. No driving without a license. *Nat.Immunol.* 6:125-126.
55. Ridge, J. P., F. Di Rosa, and P. Matzinger. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393:474-478.
56. Behrens, G., M. Li, C. M. Smith, G. T. Belz, J. Mintern, F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2004. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol.Cell Biol.* 82:84-90.
57. Smith, C. M., N. S. Wilson, J. Waithman, J. A. Villadangos, F. R. Carbone, W. R. Heath, and G. T. Belz. 2004. Cognate CD4(+) T cell licensing of dendritic cells in CD8(+) T cell immunity. *Nat.Immunol.* 5:1143-1148.
58. Schoenberger, S. P., R. E. Toes, E. I. van der Voort, R. Offringa, and C. J. Melief. 1998. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393:480-483.
59. Curiel, T. J., G. Coukos, L. Zou, X. Alvarez, P. Cheng, P. Mottram, M. Evdemon-Hogan, J. R. Conejo-Garcia, L. Zhang, M. Burow, Y. Zhu, S. Wei, I. Kryczek, B. Daniel, A. Gordon, L. Myers, A. Lackner, M. L. Disis, K. L. Knutson, L. Chen, and W. Zou. 2004. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat.Med.* 10:942-949.
60. Heemels, M. T. and H. Ploegh. 1995. Generation, translocation, and presentation of MHC class I-restricted peptides. *Annu.Rev.Biochem.* 64:463-491.
61. Saeboe-Larssen, S., E. Fossberg, and G. Gaudernack. 2002. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J.Immunol.Methods* 259:191-203.
62. Van Tendeloo, V. F., P. Ponsaerts, F. Lardon, G. Nijs, M. Lenjou, C. Van Broeckhoven, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman. 2001. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98:49-56.

63. Ponsaerts, P., B. G. Van den, N. Cools, A. Van Driessche, G. Nijs, M. Lenjou, F. Lardon, C. Van Broeckhoven, D. R. Van Bockstaele, Z. N. Berneman, and V. F. Van Tendeloo. 2002. Messenger RNA electroporation of human monocytes, followed by rapid in vitro differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells. *J.Immunol.* 169:1669-1675.
64. Irvine, A. S., P. K. Trinder, D. L. Laughton, H. Ketteringham, R. H. McDermott, S. C. Reid, A. M. Haines, A. Amir, R. Husain, R. Doshi, L. S. Young, and A. Mountain. 2000. Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization. *Nat.Biotechnol.* 18:1273-1278.
65. Strobel, I., S. Berchtold, A. Gotze, U. Schulze, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 2000. Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes. *Gene Ther.* 7:2028-2035.
66. Heil, F., H. Hemmi, H. Hochrein, F. Ampenberger, C. Kirschning, S. Akira, G. Lipford, H. Wagner, and S. Bauer. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303:1526-1529.
67. Heiser, A., M. A. Maurice, D. R. Yancey, D. M. Coleman, P. Dahm, and J. Vieweg. 2001. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res.* 61:3388-3393.
68. Heiser, A., M. A. Maurice, D. R. Yancey, N. Z. Wu, P. Dahm, S. K. Pruitt, D. Boczkowski, S. K. Nair, M. S. Ballo, E. Gilboa, and J. Vieweg. 2001. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J.Immunol.* 166:2953-2960.
69. Lohmann, S., K. Galle, J. Knop, and A. H. Enk. 2000. CD83+ human dendritic cells transfected with tumor peptide cDNA by electroporation induce specific T-cell responses: A potential tool for gene immunotherapy. *Cancer Gene Ther.* 7:605-614.
70. Chang, D. C., P. Q. Gao, and B. L. Maxwell. 1991. High efficiency gene transfection by electroporation using a radio-frequency electric field. *Biochim.Biophys.Acta* 1092:153-160.
71. Sambrook and Russell. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
72. Steinmann, J. *T-Lymphozytenfunktion und klinische Transplantation In vitro-Untersuchungen an humanen alloreaktiven T-Lymphozyten*, Vol. 16. Wolfgang Pabst Verlag, Lengerich, Berlin, Riga, Wien, Zagreb.
73. Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang, and P. H. Hofschneider. 1982. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J.* 1:841-845.
74. Zschörnig, O. *Elektroporation von Erythrozyten und Erythrozytenghosts*. Prof.Dr.K.Arnold. Internet . 2001. Universität Leipzig, Institut für Medizinische Physik und Biophysik. Ref Type: Electronic Citation
75. Mangus, D. A., M. C. Evans, and A. Jacobson. 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.* 4:223.
76. Lutz, M. B. and G. Schuler. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23:445-449.
77. Berger, T. G., B. Feuerstein, E. Strasser, U. Hirsch, D. Schreiner, G. Schuler, and B. Schuler-Thurner. 2002. Large-scale generation of mature monocyte-derived dendritic cells for clinical application in cell factories. *J.Immunol.Methods* 268:131-140.

78. Langenkamp, A., M. Messi, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto. 2000. Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat.Immunol.* 1:311-316.
79. Tieleman, D. P. 2004. The molecular basis of electroporation. *BMC.Biochem.* 5:10.
80. Neumann, E., S. Kakorin, and K. Toensing. 1999. Fundamentals of electroporative delivery of drugs and genes. *Bioelectrochem.Bioenerg.* 48:3-16.
81. Chang, D. C. and T. S. Reese. 1990. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophys.J.* 58:1-12.
82. Hristova, N. I., I. Tsoneva, and E. Neumann. 1997. Sphingosine-mediated electroporative DNA transfer through lipid bilayers. *FEBS Lett.* 415:81-86.
83. Ponsaerts, P., V. F. Van Tendeloo, N. Cools, A. Van Driessche, F. Lardon, G. Nijs, M. Lenjou, G. Mertens, C. Van Broeckhoven, D. R. Van Bockstaele, and Z. N. Berneman. 2002. mRNA-electroporated mature dendritic cells retain transgene expression, phenotypical properties and stimulatory capacity after cryopreservation. *Leukemia* 16:1324-1330.
84. Michiels, A., S. Tuyaerts, A. Bonehill, J. Corthals, K. Breckpot, C. Heirman, S. Van Meirvenne, M. Dullaers, S. Allard, F. Brasseur, B. P. van der, and K. Thielemans. 2005. Electroporation of immature and mature dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. *Gene Ther.* 12:772-782.
85. Zhou, L. J. and T. F. Tedder. 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:2588-2592.
86. Berchtold, S., P. Muhl-Zurbes, C. Heufler, P. Winklehner, G. Schuler, and A. Steinkasserer. 1999. Cloning, recombinant expression and biochemical characterization of the murine CD83 molecule which is specifically upregulated during dendritic cell maturation. *FEBS Lett.* 461:211-216.
87. Deckhut, A. M., Y. Chien, M. A. Blackman, and D. L. Woodland. 1994. Evidence for a functional interaction between the beta chain of major histocompatibility complex class II and the T cell receptor alpha chain during recognition of a bacterial superantigen. *J.Exp.Med.* 180:1931-1935.
88. Leitenberg, D. and K. Bottomly. 1999. Regulation of naive T cell differentiation by varying the potency of TCR signal transduction. *Semin.Immunol.* 11:283-292.
89. Badou, A., M. Savignac, M. Moreau, C. Leclerc, G. Foucras, G. Cassar, P. Paulet, D. Lagrange, P. Druet, J. C. Guery, and L. Pelletier. 2001. Weak TCR stimulation induces a calcium signal that triggers IL-4 synthesis, stronger TCR stimulation induces MAP kinases that control IFN-gamma production. *Eur.J.Immunol.* 31:2487-2496.
90. Rothoef, T., A. Gonschorek, H. Bartz, O. Anhenh, and U. Schauer. 2003. Antigen dose, type of antigen-presenting cell and time of differentiation contribute to the T helper 1/T helper 2 polarization of naive T cells. *Immunology* 110:430-439.
91. Dorfel, D., S. Appel, F. Grunebach, M. M. Weck, M. R. Muller, A. Heine, and P. Brossart. 2005. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105:3199-3205.
92. Arens, R., P. A. Baars, M. Jak, K. Tesselaar, d. van, V, M. H. van Oers, and R. A. van Lier. 2005. Cutting edge: CD95 maintains effector T cell homeostasis in chronic immune activation. *J.Immunol.* 174:5915-5920.

Literaturverzeichnis

93. Singh, A., J. Ni, and B. B. Aggarwal. 1998. Death domain receptors and their role in cell demise. *J.Interferon Cytokine Res.* 18:439-450.
94. Gansneder, Bettina. Die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins c-FlipL verhindert die CD95-vermittelte Abtötung von T-Zellen durch Tumorzellen mit konstitutiver CD95L-Expression. 18-4-2001. Ludwig-Maximilian-Universität München.
Ref Type: Thesis/Dissertation
95. Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94:481-490.
96. Kostanova-Poliakova, D. and L. Sabova. 2005. Anti-apoptotic proteins-targets for chemosensitization of tumor cells and cancer treatment. *Neoplasma* 52:441-449.
97. Suzuki, I., S. Martin, T. E. Boursalian, C. Beers, and P. J. Fink. 2000. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8+ T cells. *J.Immunol.* 165:5537-5543.
98. Laouar, A., V. Haridas, D. Vargas, X. Zhinan, D. Chaplin, R. A. van Lier, and N. Manjunath. 2005. CD70+ antigen-presenting cells control the proliferation and differentiation of T cells in the intestinal mucosa. *Nat.Immunol.* 6:698-706.
99. Trinchieri, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat.Rev.Immunol.* 3:133-146.
100. Liu, L., B. E. Rich, J. Inobe, W. Chen, and H. L. Weiner. 1998. Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Int.Immunol.* 10:1017-1026.
101. De Smedt, T., M. Van Mechelen, G. De Becker, J. Urbain, O. Leo, and M. Moser. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur.J.Immunol.* 27:1229-1235.
102. Baroja, M. L., K. Lorre, F. Van Vaeck, and J. L. Ceuppens. 1989. The anti-T cell monoclonal antibody 9.3 (anti-CD28) provides a helper signal and bypasses the need for accessory cells in T cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens. *Cell Immunol.* 120:205-217.
103. Turka, L. A., J. A. Ledbetter, K. Lee, C. H. June, and C. B. Thompson. 1990. CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J.Immunol.* 144:1646-1653.
104. Porcelli, S. A. and R. L. Modlin. 1999. The CD1 system: antigen-presenting molecules for T cell recognition of lipids and glycolipids. *Annu.Rev.Immunol.* 17:297-329.
105. Ochsenbein, A. F., S. R. Riddell, M. Brown, L. Corey, G. M. Baerlocher, P. M. Lansdorp, and P. D. Greenberg. 2004. CD27 expression promotes long-term survival of functional effector-memory CD8+ cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients. *J.Exp.Med.* 200:1407-1417.
106. Hendriks, J., Y. Xiao, and J. Borst. 2003. CD27 promotes survival of activated T cells and complements CD28 in generation and establishment of the effector T cell pool. *J.Exp.Med.* 198:1369-1380.
107. June, C. H., J. A. Ledbetter, M. M. Gillespie, T. Lindsten, and C. B. Thompson. 1987. T-cell proliferation involving the CD28 pathway is associated with cyclosporine-resistant interleukin 2 gene expression. *Mol.Cell Biol.* 7:4472-4481.
108. Rogers, P. R., J. Song, I. Gramaglia, N. Killeen, and M. Croft. 2001. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity.* 15:445-455.

Literaturverzeichnis

109. Hendriks, J., Y. Xiao, J. W. Rossen, K. F. van der Sluijs, K. Sugamura, N. Ishii, and J. Borst. 2005. During viral infection of the respiratory tract, CD27, 4-1BB, and OX40 collectively determine formation of CD8+ memory T cells and their capacity for secondary expansion. *J.Immunol.* 175:1665-1676.
110. Bansal-Pakala, P., B. S. Halteman, M. H. Cheng, and M. Croft. 2004. Costimulation of CD8 T cell responses by OX40. *J.Immunol.* 172:4821-4825.
111. Cannons, J. L., P. Lau, B. Ghumman, M. A. DeBenedette, H. Yagita, K. Okumura, and T. H. Watts. 2001. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J.Immunol.* 167:1313-1324.
112. Akiba, H., H. Oshima, K. Takeda, M. Atsuta, H. Nakano, A. Nakajima, C. Nohara, H. Yagita, and K. Okumura. 1999. CD28-independent costimulation of T cells by OX40 ligand and CD70 on activated B cells. *J.Immunol.* 162:7058-7066.
113. Saoulli, K., S. Y. Lee, J. L. Cannons, W. C. Yeh, A. Santana, M. D. Goldstein, N. Bangia, M. A. DeBenedette, T. W. Mak, Y. Choi, and T. H. Watts. 1998. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J.Exp.Med.* 187:1849-1862.

Danksagung

Danksagung

Für die Übernahme des Referats und des Koreferats meiner Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus sowie bei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Frank Kempken bedanken.

Herrn Prof. Dr. Dietrich Kabelitz, dem Direktor des Instituts für Immunologie, Kiel, danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Finanzierung der Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Axel Heiser bedanke ich mich herzlich für die gute Betreuung der Arbeit, die fortwährende Diskussionsbereitschaft und die Unterstützung und die Ermutigung zur eigenen wissenschaftlichen Arbeit. Außerdem möchte ich mich bei Dr. Matthias Marget und vor allem bei Parvin Davarnia für die Unterstützung bei den molekularbiologischen Arbeiten bedanken.

Casimir Malanda und Ivonne Suckstorff aus meiner Arbeitsgruppe danke ich sehr für die gute Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei den Laborarbeiten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Schwester Karin für die schnelle Korrektur dieses wieder einmal nicht poetischen Textes danken, aus dem tragischerweise viele „Cocktails“ gestrichen werden mussten.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Ute Weingartz
Anschrift: Holstenstr. 56, 24103 Kiel
Geburtsdatum: 13.10.1968
Geburtsort: Marl
Nationalität: deutsch

Beruflicher Werdegang:

1988: Allgemeine Hochschulreife
Gymnasium Remigianum in Borken/Westfalen

1998-1991: Ausbildung zur MTA/L
Westfälischen Wilhelms-Universität zu Münster

1991-1993: MTA/L
St. Franziskus-Hospital in Münster

1993-1999: Studium der Biotechnologie
Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

1999-2001: Diplom-Biotechnologin
in den Leibnitz Forschungslaboratorien für Biotechnologie und
künstliche Organe (LEBAO) der Medizinische Hochschule Hannover

2001-2005: wissenschaftliche Angestellte
am Institut für Immunologie
des Universitätskrankenhauses Schleswig-Holstein Kiel

Erklärung

Erklärung

Hiermit erkläre ich gemäß §10 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis und, abgesehen vom der Beratung durch den Betueuer, ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Kiel, den 25.09.2006

(Ute Weingartz)