



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Evaluierung verschiedener Methoden zur Antigenbeladung von dendritischen Zellen

Autor: Katharina Wiest
Institut / Klinik: Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie
Doktorvater: Prof. Dr. med. D. Schadendorf

Die Entwicklung und Evaluierung antigenspezifischer Immunisierungsstrategien erfordert es Tumorantigene und deren Epitope zu charakterisieren. Dazu ist es notwendig, das Tumorantigen in dendritische Zellen zu transferieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Verfahren zum Transfer von Tumorantigenen in dendritische Zellen etabliert und charakterisiert werden.

Es wurde ein virales Vektorsystem für den Transfer des humanen TRP1 Melanomantigens in professionelle Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt. Die Inkubation dendritischer Zellen mit MVA-TRP1 ergab, daß das Virus sowohl unreife als auch reife dendritische Zellen infizieren konnte. Unreife dendritische Zellen waren mit höherer Effizienz durch das Virus infizierbar als reife. Für infizierte dendritische Zellen konnte eine höhere Empfindlichkeit gegenüber mechanischer Belastung, z.B. Zentrifugation, beobachtet werden. Die Analyse des Phänotyps in der Durchflußzytometrie ergab, daß infizierte dendritische Zellen (reife und unreife) im Vergleich zu nicht infizierten Zellen eine deutlich niedrigere Oberflächenexpression spezifischer Marker wie HLA-Klasse I und HLA-DR, CD14, CD40, CD54 und CD86 aufwiesen.

Unter Anwendung derselben Infektionsparameter konnte ebenfalls ein Virus-vermittelter TRP1 Antigentransfer in EBV-B Zellen nachgewiesen werden. Die quantitative Auswertung der TRP1 Expression nach MVA-TRP1 Infektion von EBV-B Zellen ergab, daß die Erhöhung des Verhältnisses von Virus zu EBV-B Zellen auch zu einem Anstieg der Infektionsrate führte. Das rekombinante MVA-TRP1 Virus zeigte sich daher geeignet um das TRP1 Antigen effizient in dendritische Zellen und EBV-B Zellen zu transferieren.

Neben dem viralen Antigentransfer wurde auch die Effizienz der Plasmid DNA-vermittelten Antigen-Beladung in Dendritische Zellen analysiert. Dazu wurde versucht Plasmid-DNA mittels Elektroporation in unreife und reife dendritische Zellen einzuschleusen. Trotz Anwendung verschiedenster Elektroporationsparameter konnte kein DNA Transfer in dendritische Zellen unabhängig von deren Reifungsgrad nachgewiesen werden. Auch EBV-B Zellen erwiesen sich als resistent gegenüber einem DNA Transfer mittels Elektroporation.

Eine Alternative zur DNA ist RNA, die nach in vitro Transkription zur Beladung von dendritischen Zellen eingesetzt werden kann. Spezifische rekombinante Plasmide, die das TRP1 bzw. das MART1 Differenzierungsgen unter der Kontrolle eines viralen Promoters tragen, wurden konstruiert. Diese Konstrukte wurden dann für die in vitro Transkription eingesetzt, so daß große Mengen an TRP1 bzw. MART1 spezifischer RNA synthetisiert wurden. Diese RNA kann nun zur Beladung der dendritischen Zellen eingesetzt werden.