

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen-Gesamtfakultät
der Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Annette Reitz
aus Seeheim-Jugenheim

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema

Analyse der T-Zellstimulation durch RNA-elektroporierte
dendritische Zellen

Gutacher: Prof. Dr. Harald Kropshofer
Prof. Dr. Lutz Gissmann

**"Auch das kleinste Ding hat seine Wurzel in der Unendlichkeit,
ist also nicht völlig zu ergründen"**

Zitat: Wilhelm Busch

Abstract (deu)

HINTERGRUND: Damit Tumorantigen-spezifische T-Zellen Tumorzellen spezifisch erkennen und zerstören können, müssen sie zuvor durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen, wie den Dendritischen Zellen (DC) aktiviert werden. Neuere Therapiekonzepte konzentrieren sich deshalb auf den Einsatz von Tumorantigen-beladenen DC als Vakzine. **ZIEL:** Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Elektroporation von DC mit RNA zu etablieren und die T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften RNA-elektroporierter DC zu analysieren. **METHODEN UND ERGEBNISSE:** Die RNA-Elektroporation wurde für dendritische Zellen, sowie für andere Antigen-präsentierende Zellen etabliert. Die Analyse der T-Zell-stimulatorischen Kapazität RNA-elektroporierter DC erfolgte nach Elektroporation von RNA, kodierend für das immunodominante pp65 Antigen des humanen Cytomegalievirus. Es konnte eine effiziente Stimulation pp65-spezifischer CD8⁺-T-Zellen erzielt werden. Die Fähigkeit, RNA-elektroporierter DC eine spezifische Stimulation von CD4⁺-T-Zellen zu vermitteln, wurde im Tumormodell untersucht. DC wurden mit der RNA des Tumorantigens Melanotransferrin (Mtf) elektroporiert und mit T-Zellen, spezifisch für das erst kürzlich identifizierte HLA-DRB1*0401-präsentierte Mtf₆₆₈₋₆₈₃-Epitop, inkubiert. Eine spezifische Stimulation der T-Zellen durch Mtf-RNA-elektroporierte DC konnte detektiert werden. Weiterhin wurde die Präsenz des Mtf₆₆₈₋₆₈₃-Epitops in gesunden Donoren und Melanompatienten analysiert. Dabei wurden Epitop-spezifische T-Zellen in beiden Gruppen nachgewiesen. Die erzielten Daten zeigen demnach, dass RNA-elektroporierte DC Antigen-spezifische T-Zellen effizient stimulieren können, so dass ihr Einsatz in Rahmen von Antigen-spezifischen Vakzinierungsstrategien denkbar ist.

Abstract (engl.)

BACKGROUND: Tumor-antigen specific T-cells need to be activated by Dendritic cells (DC) to gain the ability to recognise and destroy tumorcells efficiently. Therefore new strategies concentrate on the development of vaccines using DC loaded with tumor antigen. The aim of this study was to establish electroporation of DC with RNA thereby analysing the capability to stimulate antigen specific T-cells. **METHODS AND RESULTS:** RNA electroporation was established for DC as well as other antigen presenting cells. The capacity of RNA electroporated DC to stimulate antigen specific T-cells was analysed by electroporation of RNA encoding for the immunodominant Antigen pp65 of the human Cytomegalievirus. At this an efficient stimulation of pp65-specific CD8⁺-T-cells could be achieved. The ability of RNA electroporated DC to stimulate CD4⁺-T-cells was analysed by electroporation of DC with the tumor-antigen Melanotransferrin (Mtf). Those DC were then incubated with T-cells specific for the recently identified HLA-DRB1*0401 restricted Mtf₆₆₈₋₆₈₃-Epitope resulting in the detection of specific T-cell stimulation. Furthermore healthy individuals as well as melanoma patients were examined for the presence of the Mtf₆₆₈₋₆₈₃-Epitope. In both groups epitope specific T-cells were detected. In line with this results the proposition can be made, that RNA electroporated DC can efficiently stimulate antigen-specific T-cells. Hence the application in new vaccination trials is conceivable.

Inhaltsverzeichnis

A. EINLEITUNG.....	3
1. DAS MALIGNEN MELANOM.....	3
1.1. Epidemiologie und Ätiologie.....	3
1.2. Diagnose und Prognose.....	3
1.3. Therapieformen.....	5
2. DIE ROLLE DES IMMUNSYSTEMS.....	7
2.1. Die zelluläre Immunantwort.....	7
2.2. Antigen Präsentierende Zellen.....	8
(engl.: Antigen Presenting Cell, APC).....	8
2.3. HLA-Moleküle.....	10
2.4. T-Lymphozyten.....	13
2.5. Antigen-spezifische Aktivierung von Lymphozyten.....	15
2.6. Antigene.....	16
2.7. Suche nach T-Zellepitopen.....	20
2.8. Strategien des Transfers von Tumorantigenen in DC.....	21
3. ZIELSETZUNG.....	23
B. MATERIAL UND METHODEN.....	24
1. MATERIAL.....	24
1.1. Zellkultur-Medien.....	28
1.2. Komplexe Puffer und Lösungen.....	29
2. METHODEN.....	32
2.1. Methoden der Zellkultur.....	32
2.2. Generierung antigen-präsentierender Zellen.....	33
2.3. Beladung von APC mit Antigenen.....	35
2.4. Primäre Antigen-spezifische in vitro Aktivierung von CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ - T-Zellen.....	37
2.5. Inaktivierung der Zellen mit Mitomycin C.....	38
2.6. Isolierung von CD4 ⁺ /CD8 ⁺ - T-Zellen mittels MACS MicroBeads.....	38
2.7. FACS Analyse.....	39
2.8. Nachweis der IFN- γ Sekretion durch T-Zellen.....	40
2.9. Zytospin.....	42
2.10. Immunzytologie (ABC-Färbung).....	43
2.11. Mikrobielle Arbeitstechniken.....	44
2.12. Molekularbiologische Techniken.....	45
C ERGEBNISSE.....	47
1. RNA-ELEKTROPORATION.....	47
1.1. In vitro Transkription.....	47
1.2. Etablierung der RNA-Elektroporation und Analyse des Einflusses verschiedener Parameter auf die Transfektions-effizienz.....	48
1.3. Elektroporation verschiedener Zelllinien und primärer Zellen.....	51
1.4. RNA-Elektroporation von Dendritischen Zellen.....	56
1.5. Stimulation von in vivo aktivierten anti-viralen Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen mittels RNA elektroporierter DC.....	61
1.6. Elektroporation mit mRNA kodierend für Tumor assoziierte Antigene.....	66
1.7. Stimulation spezifischer CD8 ⁺ - T-Lymphozyten mit Melan-A- mRNA elektroporierten APC.....	68
2. CHARAKTERISIERUNG VON T-ZELL-ANTWORTEN SPEZIFISCH FÜR DAS DIFFERENZIERUNGSANTIGEN.....	70
MELANOTRANSFERRIN.....	70
2.1. Analyse der Immunogenität der HLA-DRB1*0401 präsentierter Peptide aus Melanotransferrin und Vimentin.....	71
2.2. Analyse der HLA-DRB1*0101 restringierten Immunogenität von Melanotransferrin ₆₆₈₋₆₈₃	73
2.3. Erkennung von Melanom-Zelllinien durch Melanotransferrin ₆₆₈₋₆₈₃ -spezifische T-Zellen.....	74
2.4. Nachweis Melanotransferrin ₆₆₈₋₆₈₃ -spezifischer T-Zellen im Blut von Melanom-Patienten.....	75
2.5. Stimulation spezifischer T-Lymphozyten mit Melanotransferrin- mRNA elektroporierten DC.....	77

D. DISKUSSION	80
1. RNA-ELEKTROPORATION	80
1.1. <i>Antigenbeladung mittels RNA-Elektroporation</i>	80
1.2. <i>Etablierung der RNA-Elektroporation und Analyse des Einflusses verschiedener Parameter auf die Transfektions-effizienz</i>	81
1.3. <i>Elektroporation primärer Zellen</i>	82
1.4. <i>Stimulation anti-viraler Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen mittels RNA elektroporierter DC</i>	83
1.5. <i>Stimulation Melan-A-spezifischer T-Zellen mittels mRNA elektroporierter APC</i>	85
2. CHARAKTERISIERUNG VON T-ZELL-ANTWORTEN SPEZIFISCH FÜR DAS DIFFERENZIERUNGSANTIGEN MELANOTRANSFERRIN	87
2.1. <i>Stimulation Melanotransferrin-spezifischer T-Zellen mittels mRNA elektroporierter APC</i>	88
3. AUSBLICK.....	90
E. ZUSAMMENFASSUNG.....	91
F. LITERATURVERZEICHNIS	93
G. ANHANG	109

A. Einleitung

1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, auch „schwarzer Hautkrebs“ genannt, ist ein bösartiger (maligner) Tumor, der von den Pigmentzellen der Oberhaut, den Melanozyten, ausgeht und überall auf der Haut entstehen kann. Da Melanozyten auch in den Hirn- und Schleimhäuten sowie im Auge zu finden sind, können dort in seltenen Fällen ebenfalls maligne Melanome auftreten [Hurst et al., 1999; Rahimi-Movaghar et al., 2003]. Das maligne Melanom weist außerdem eine hohe Tendenz zur lymphogenen und hämatogenen Metastasierung auf, da die Pigmentzellen nicht in einem Gewebeverband wachsen, sondern sich relativ frei in der Haut bewegen können. Diese Eigenschaft macht das maligne Melanom zu einer der gefährlichsten Krebsarten und folglich zu einem intensiv bearbeiteten Forschungsgebiet.

1.1. Epidemiologie und Ätiologie

Die Inzidenz des malignen Melanoms steigt weltweit an und hat sich allein in Europa seit 1970 mehr als verdoppelt [Grin-Jorgensen et al., 1992; Sober et al., 1991]. Personen mit heller Haut, mit rötlichen oder blonden Haaren, sowie mit einer Veranlagung zu Sommersprossen, weisen je nach Zusammensetzung der Risikofaktoren ein bis zu 100-fach erhöhtes Risiko auf, in ihrem Leben an einem malignen Melanom zu erkranken. Durchschnittswerte geben ein Erkrankungsalter zwischen 50-55 Jahren an, wobei immer häufiger auch junge Personen von einem malignen Melanom betroffen sind [Pearce et al., 2003; Jemal et al., 2001]. Die Ursache der steigenden Inzidenz ist dabei multifaktoriell bedingt. Genetische Dispositionen, immunsuppressive Faktoren, die Zahl erlittener Sonnenbrände und veränderte Reisegeohnheiten spielen unter anderem eine Rolle. Kontrovers dazu wird die Bedeutung endokriner, wie auch toxischer und medikamentöser Einflüsse diskutiert [Osterlind, 1992].

1.2. Diagnose und Prognose

Maligne Melanome können, trotz ihres häufig sehr unterschiedlichen Erscheinungsbildes in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen in Melanome, die sich überwiegend oberflächlich ausbreiten, zum anderen in solche, die hauptsächlich vertikal und in knotiger Form vorkommen. Bei der klinische Diagnosestellung eines malignen Melanoms ist die sogenannte A-B-C-D-(E)-Regel hilfreich (Tab. 1) [Nachbar et al., 1994].

A	Asymmetrie	Asymmetrisch, nicht rund oder oval
B	Begrenzung	Unregelmäßig oder unscharf
C	Color (Farbe)	unterschiedlich starke Pigmentierung
D	Durchmesser	> 5mm
E	Erhabenheit	neu entstanden auf sonst flachem Grund

Tab. 1 :Klinische Kriterien zur Differenzierung eines Melanoms

Sind drei der fünf Kriterien auffällig, handelt es sich zunächst um einen atypischen Nävus, auch Muttermal genannt. Besteht jedoch der Verdacht, dass sich hinter diesem Nävus ein malignes Melanom oder eine Vorstufe davon verbirgt, ist eine Indikation für eine vollständige Entfernung gegeben, nach welcher der Nävus einer histologischen Untersuchung unterzogen wird. Lautet dabei die Diagnose „malignes Melanom“, so wird dieses unter Berücksichtigung der Eindringtiefe des Tumors [Breslow et al., 1991], der TNM- Klassifikation, der Invasion in die Haut in Abhängigkeit von der anatomischen Schichtung (nach CLARK) und des Lymphknotenbefalls, sowie nach Tumorlokalisierung und Fernmetastasen weiter klassifiziert. Zusätzlich zu den genannten Kriterien unterscheidet man klinisch vier Subtypen des malignen Melanoms, die nach ihrem Aussehen und der Art des Wachstums eingeteilt werden (Tab. 2) [Reed et al., 1997].

Unterart	Häufigkeit
oberflächlich spreitendes Melanom (SSM)	65 %
noduläres Melanom (NMM)	20 %
Lentigo-maligna-Melanom (LMM)	10 %
akralentigiöses Melanom (ALM)	5 %
amelanotisches Melanom (AMM)	Selten oder <1 %

Tab. 2 :Klassifizierung des malignen Melanoms

Zu den prognostischen Faktoren bei malignen Melanomen ohne Metastasierung zählt auch das Geschlecht, wobei hier die Prognose für Männer signifikant schlechter ist als für Frauen [Lomuto et al., 2004; Mashiah et al., 2003]. Die 10-Jahres-Überlebensrate (der Anteil von Patienten, der 10 Jahre nach Feststellung der Krankheit noch lebt) ist abhängig vom Stadium

der Ausbreitung des Krebses. Hierbei unterscheidet man fünf Stadien und mehrere Substadien nach dem „American Joint Committee on cancer system“ [Balch et al., 2002].

1.3. Therapieformen

Trotz großer Fortschritte in der Melanomforschung in den letzten Jahren, sterben noch immer ca. 20 % der Patienten, die an einem Melanom erkrankt sind [Borok et al., 2003]. Diese Situation zu verbessern ist neben der Sicherung der ätiologischen Faktoren die entscheidende Herausforderung in der Melanomforschung. Verschiedene Therapieformen werden abhängig vom Krankheitsstadium des Patienten angewandt.

1.3.1. Operative Therapie

Die frühzeitige operative Entfernung des malignen Melanoms ist die erste und wichtigste Form der Therapie, bei welcher der Tumor immer als ganzes entfernt wird. Dabei wird ein ausreichender Sicherheitsbereich eingehalten und alle Hautschichten unter dem Tumor werden entfernt [Elder et al., 1983; Landthaler et al., 1989]. Um eine Streuung der Tumorzellen in die Blutbahn zu vermeiden, werden bei Verdacht auf ein malignes Melanom keine Biopsien entnommen.

1.3.2. Strahlentherapie

Eine Strahlentherapie [Perez et al., 1997] kann in Form einer Röntgen-Oberflächentherapie durchgeführt werden. Charakteristisch für das Melanom ist jedoch dessen Anlage zur Reparatur des erzeugten Strahlenschadens. Dies ist bei der Wahl einer geeigneten Therapie zu berücksichtigen. Weiterhin wird die Strahlentherapie palliativ bei Metastasen des ZNS oder frakturgefährdeten Skelettbefall eingesetzt [Sack et al., 1996]. Bei 95 % der Patienten kann hierdurch eine begrenzte zerebrale Kontrolle über den Tumor und eine Besserung der neurologischen Symptomatik erzielt werden [Burmeister et al., 1995].

1.3.3. Chemotherapie

Generell wird die Chemotherapie bei Patienten mit schlechtem Allgemeinzustand vorwiegend unter palliativen Gesichtspunkten angewandt. Bei Anwendung der Standardtherapie mit Dacarbazin liegt die Ansprechrate im Bereich von 14 bis 33 % und nur bei einem kleinen Teil dieser Patienten wird eine vollständige Remission erzielt [Huncharek et al., 2001]. Die Indikation für eine Chemotherapie ist beispielsweise bei Satelliten- und Intransitmetastasen im Bereiche der Extremitäten eines Patienten gegeben. Hierbei kann eine regionale Perfusion

mit Zytostatika, eventuell kombiniert mit Zytokinen, durchgeführt werden. Metastasen der Haut, Lunge, Weichteile und Lymphknoten („Limited Disease“) sprechen dabei besser auf eine Chemotherapie an als Skelett- oder Hirnmetastasen („Extensive Disease“) [Skarlos et al., 2001].

1.3.4. Immuntherapie und Immunochemotherapie

Trotz der Fülle an unterschiedlichen Therapieformen zeigten die konventionellen Behandlungsstrategien bislang keinen wesentlichen Einfluss auf die Heilungserfolge der betroffenen Patienten [Rockman et al., 2003; Lin 1995]. Dies hat seine Ursache in der ausgeprägten Therapieresistenz des malignen Melanoms im fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Dagegen belegen zahlreiche Beobachtungen, wie z.B. spontane Remissionen, aggressive Krankheitsverläufe bei Immunsupprimierten und das Auftreten von Vitiligo, den Einfluss immunologischer Faktoren bei der Entwicklung des malignen Melanoms [Bier et al., 1988; Hersey et al., 1994]. Aus diesem Grund zielen neuere Strategien darauf ab, das patienteneigene Immunsystem durch die Anwendung unspezifischer und/oder spezifischer immuntherapeutischer Maßnahmen gegen den Tumor zu mobilisieren und auf diesem Weg Therapieerfolge zu erzielen.

Zu diesen immuntherapeutischen Maßnahmen zählt die unspezifische Stimulation des Immunsystems durch den Einsatz von Bakterien oder Bakterienextrakten (z.B. BCG), mit welchen Kunze et al. bereits 1978 in einem von drei Patienten eine Regression des malignen Melanoms beobachten konnte [Kunze et al., 1978]. Aufgrund eines fehlenden Wirkungsnachweises in nachfolgenden randomisierten Studien wurde diese Form der Therapie jedoch für das maligne Melanom nicht weiter angewandt [Czarnetzki et al., 1993]. Ebenfalls starke Nebenwirkungen konnten bei der Aktivierung des Immunsystems durch verschiedene Zytokine wie z.B. Interleukine oder Interferone festgestellt werden [Atallah et al., 2005, Eisner et al., 2004; Buzaid et al., 1987]. Andererseits führte eine lokale Anwendung von Interleukin-2 in einigen Fällen zu einer Wachstumshemmung des malignen Melanoms [Panelli et al., 2004; Eton et al., 2002; Weinreich et al., 2002] und die Verabreichung von Interferonen bei der Behandlung von fernmetastasierten Melanompatienten (Stadium IV) zu Remissionsraten von etwa 15 % [Pehamberger et al., 2002].

Bei der sogenannten aktiven spezifischen Immunisierung werden u.a. Tumorzellen aber auch Dendritische Zellen (engl.: Dendritic Cells, DC) mit Hilfe geeigneter Vektoren (Retroviren und Adenoviren) oder auch durch Verwendung nackter DNA derart modifiziert, dass sie bestimmte Zytokine, Proteine, Peptide oder Glycolipide exprimieren [Schadendorf et al.,

2002; Mitchell et al., 2000]. Dieser gentherapeutische Ansatz ist allerdings durch mangelnde Effektivität, beispielsweise verursacht durch Tumor-Escape-Mechanismen, nur eingeschränkt nutzbar [Parmiani et al., 2003].

Ziel der adoptiven Immuntherapie ist die Isolierung, Expansion und Rückübertragung autologer Tumor reaktiver T-Lymphozyten [Parmiani et al., 2003]. Rosenberg et al. konnten mit dieser Form von Therapie in 50 % der behandelten Patienten eine Regression des Tumors nachweisen [Rosenberg et al., 2004].

Der als Antikörpertherapie bezeichnete Einsatz monoklonaler, tumorantigen-spezifischer Antikörper, führt zur Opsonierung der Tumorzelle und leitet dadurch die Lyse der Tumorzellen sowie die Aktivierung des Komplementsystems ein [Scott et al., 2005; Maguire et al., 1998].

2. Die Rolle des Immunsystems

Das Immunsystem besteht aus Zellen und löslichen Mediatoren, die in aufeinander abgestimmter Weise gegen unbekannt Substanzen im Körper reagieren. Seit langem weiß man, dass auch das maligne Melanom in seiner Entwicklung durch immunologische Faktoren beeinflusst wird. Bei einem fortgeschrittenen Tumorleiden ist das Immunsystem jedoch oft nicht in der Lage, das Tumorwachstum zu kontrollieren. Ursache hierfür sind unterschiedliche Regulationsmechanismen des Immunsystems wie z.B. Toleranz, Tumor-Escape-Mechanismen oder Immunsuppression. Es stellt demnach eine große Herausforderung dar, die Hintergründe dieser Mechanismen aufzuklären und sich in künftiger Forschung zu Nutze zu machen.

2.1. Die zelluläre Immunantwort

Die zelluläre Immunantwort wird von T-Lymphozyten ausgeführt, welche ca. 90 % der Lymphozyten des gesamten Körpers ausmachen. Sie stammen von pluripotenten Stammzellen ab, welche ab der 13. Entwicklungswoche in den Thymus einwandern. Hier finden Umlagerungen in den Keimbahngenen statt, wobei eine beliebige Verknüpfung von Genabschnitten als Grundlage für die Diversität der Antigenrezeptoren (T-Zell-Rezeptoren, engl.: T-Cell-Receptor, TCR) dient. Den sich nun anschließenden Selektionsprozess, der sich in positive und negative Selektion unterteilen lässt, überlebt jedoch nur ein Teil der anfänglich erzeugten Rezeptorspezifitäten. Die positive Selektion führt zur Anreicherung von Zellen,

deren T-Zell-Rezeptoren die körpereigenen HLA-Moleküle erkennen [Chidgey et al 2001]. Bei der negativen Selektion werden alle hoch affinen T-Zellen abgetötet, um alle autoreaktiven und daher für den Körper potentiell bedrohlichen Zellen zu eliminieren [Sprent et al., 2002]. Es wird angenommen, dass die positive Selektion zuerst, d. h. beim Eintritt der T-Zellen in die Thymusrinde (Kortex) durch Berührung mit den Epithelzellen, und die negative Selektion nachfolgend beim Durchqueren des Markes (Medulla) durch Kontakt mit Knochenmark-abhängigen Zellen stattfindet [Zamoyska et al., 2004]. Nach diesen Selektionsprozessen verlassen die daraus hervorgegangenen T-Zellen den Thymus und zirkulieren zwischen Blut und sekundären lymphatischen Organen, wie Milz, Lymphknoten und Peyerschen Plaques hin und her. Man spricht von naiven T-Zellen. Sie differenzieren erst dann zu einer proliferierenden, aktivierten T-Zelle, wenn sie das Antigen, gegen welches ihr T-Zell-Rezeptor gerichtet ist, auf der Oberfläche einer phagozytierenden Zellen in den sekundären lymphatischen Organe präsentiert bekommen (2.2.) [Cella et al., 1997]. Nach diesem Zusammentreffen verlassen sie die sekundären lymphatischen Organe über efferente Lymphbahnen und wandern über die Blutbahn in Gewebe, wo sie im günstigsten Fall auf Zellen treffen, die das entsprechende Antigen auf der Oberfläche präsentieren. Hierbei kann es unter anderem zur Erkennung von Tumorzellen kommen.

Unter den naiven T-Zellen befinden sich jedoch auch einige autoreaktive T-Zellen, die bei der negativen Selektion nicht eliminiert wurden. Sie werden jedoch normalerweise nach Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen in peripheren Bereichen des Körpers toleriert (sog. periphere Toleranz) [Ausubel et al., 2002; Redmond et al., 2005].

2.2. Antigen Präsentierende Zellen (engl.: Antigen Presenting Cell, APC)

Für die Aktivierung von T-Lymphozyten bedarf es also eines Antigens welches von phagozytierenden Zellen in sekundären lymphatischen Organen präsentiert wird. Bei diesen phagozytierenden Zellen handelt es sich um sogenannte professionelle Antigen präsentierende Zellen [Steinman, 1991], zu welchen Makrophagen, B-Lymphozyten und Dendritischen Zellen (DC) zählen. Diese werden nach Kontakt mit einem Pathogen oder einer inflammatorisch wirkenden Substanz (z.B. inflammatorische Zytokine) aktiviert [Reis e Sousa et al., 2004] und wandern in die T-Zell-Areale der regionalen Lymphknoten ein. Auf diesem Weg durchlaufen sie einen phänotypischen und funktionellen Wandel. Dieser auch als Reifung (engl.: Maturation) bezeichnete Prozess beinhaltet unter anderem die stabile Expression von HLA-Antigen-Komplexen, die Hochregulation verschiedener

kostimulatorischer Moleküle und die Produktion verschiedener Chemokine und Zytokine [Banchereau et al., 2000; Cella et al., 1997]. Weder Makrophagen noch B-Zellen exprimieren die kostimulatorischen Moleküle konstitutiv, sondern regulieren deren Expression nach Aktivierung hoch. Einzig DC exprimieren bereits im unreifen Zustand alle diese Moleküle in niedrigen Mengen konstitutiv [Banchereau et al., 1998].

2.2.1. Dendritische Zellen (engl.: Dendritic Cells, DC)

DC stammen von noch nicht genau charakterisierten Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben [Steinman et al., 1973]. Ihre Bezeichnung haben sie von ihren baumähnlichen, verzweigten Zellfortsätzen (griech.: dendron = Baum), die sie dazu befähigen kleinste Mengen von Fremdstoffen aufzunehmen. Mitte der 80-er Jahre erkannte man, dass DC und die bereits vor hundert Jahren von Paul Langerhans entdeckten und nach ihm benannten Langerhans-Zellen einem gemeinsamen Zellsystem angehören [Schmitt; 2001]. In vitro lassen sich DC mit einem Zytokin-Zusatz aus Monozyten herstellen, wobei sich sowohl unreife als auch reife DC generieren lassen. Diese beiden Grundzustände können anhand der Expression von Oberflächenmolekülen unterschieden werden. Unreife Zellen exprimieren geringe Mengen an CD80, CD86 und CD83. Bei reifen DC trifft dagegen verhält es sich umgekehrt.

2.3. HLA-Moleküle

Der Begriff MHC (major histocompatibility complex) bezeichnet eine Gruppe von Genen, welche die MHC-Moleküle kodieren. Die Bezeichnung beim Menschen lautet Human Leukocyte Antigen (HLA). Man unterscheidet prinzipiell zwei Klassen von HLA-Molekülen sowohl nach ihrer Funktion als auch nach ihrer Struktur.

2.3.1. HLA-Klasse-I Weg

HLA-Klasse-I Moleküle findet man auf allen kernhaltigen Zellen (Abb. 1). Es handelt sich um Heterodimere, welche aus einer membran- gebundenen α -Kette bestehen, die sich extrazellulär aus drei Immunglobulin- ähnlichen Domänen zusammensetzt (α 1-3). Die Immunglobulin-Domänen α 1 und α 2 bilden die sogenannte Antigenbindungsgrube [Nojima et al., 2002]. Diese bindet Peptide einer Länge von ca. 8-10 Aminosäuren. Den drei Immunglobulin-Domänen schließt sich eine Transmembrandomäne und eine kurze zytosolische Domäne an. Der extra-

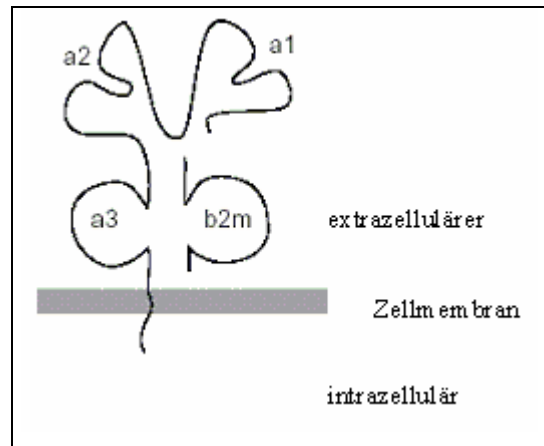


Abb. 1 : Schematische Abbildung des Heterodimers eines HLA-Klasse-I Moleküls, bestehend aus einer membran- gebundenen α -Kette und einer nichtkovalent gebundenen β -Kette, dem β 2-Mikroglobulin.

zelluläre Teil der α -Kette ist außerdem nicht-kovalent mit einer β -Kette, dem sogenannten β 2-Mikroglobulin verbunden [Peterson et al., 1977]. Peptide, die über HLA-Klasse-I Moleküle präsentiert werden, sind vor allem zytosolischen Ursprungs und gehen aus dem intrazellulären Abbau von Proteinen hervor. Cerundolo et al. konnten zeigen, dass dabei das Proteasom eine wichtige Rolle spielt, indem sie durch die Verwendung des Proteasom Inhibitors Lactacystin die HLA-Klasse I vermittelte Antigenpräsentation blockieren konnten [Cerundolo et al., 1997]. Die durch das Proteasom gebildeten Peptide gelangen über das Transportprotein TAP (Transporter associated with Antigen Processing) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) und binden dort mit Hilfe verschiedener Chaperone (Tapasin, ER60 und Calretikulin) an die Peptid-Bindungsgrube eines entsprechenden HLA-Klasse-I Moleküls [Cresswell et al., 1999]. Der Peptid-HLA-Klasse-I Komplex gelangt dann über den Exozytoseweg für Membranproteine in Vesikeln zur Zellmembran, wo die Peptid-HLA-Klasse-I-Komplexe zytotoxischen T-Zellen (engl.: Cytotoxic T-Cells, CTL) präsentiert werden. Auf gesunden Zellen sind demnach hauptsächlich Peptide zu finden, die von Proteinen des Cytosols

abstammen. Im Falle von Tumorzellen oder mit Virus- bzw. Bakterien infizierten Zellen werden auch körperfremde Peptide präsentiert.

2.3.2 HLA-Klasse-II-Weg

HLA-Klasse-II Moleküle (Abb. 2) findet man hauptsächlich auf spezialisierten APC. Es handelt sich um Heterodimere, welche aus einer α - und einer β -Kette bestehen, die sich jeweils aus zwei extrazellulären Immunglobulin-, einer Transmembran- und einer zytosolischen- Domäne zusammensetzen. Über die extrazellulären Domänen sind die beiden Ketten durch Wasserstoffbrücken nichtkovalent miteinander verbunden. Die $\alpha 1$ und $\beta 1$ Domänen bilden zusammen eine an den Enden offene Peptidbindungsgrube, die Peptide variabler Länge

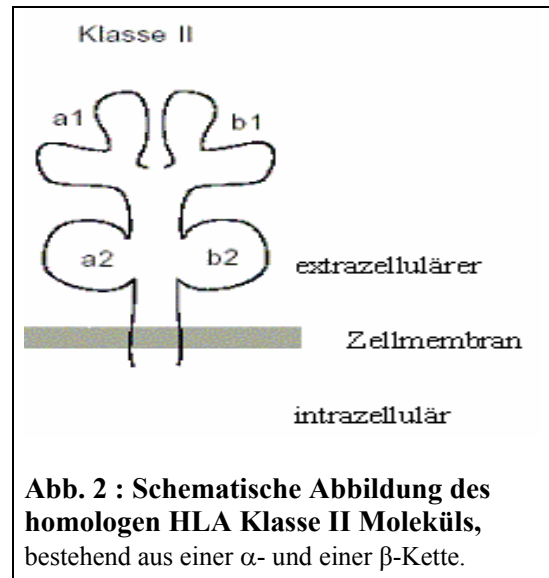
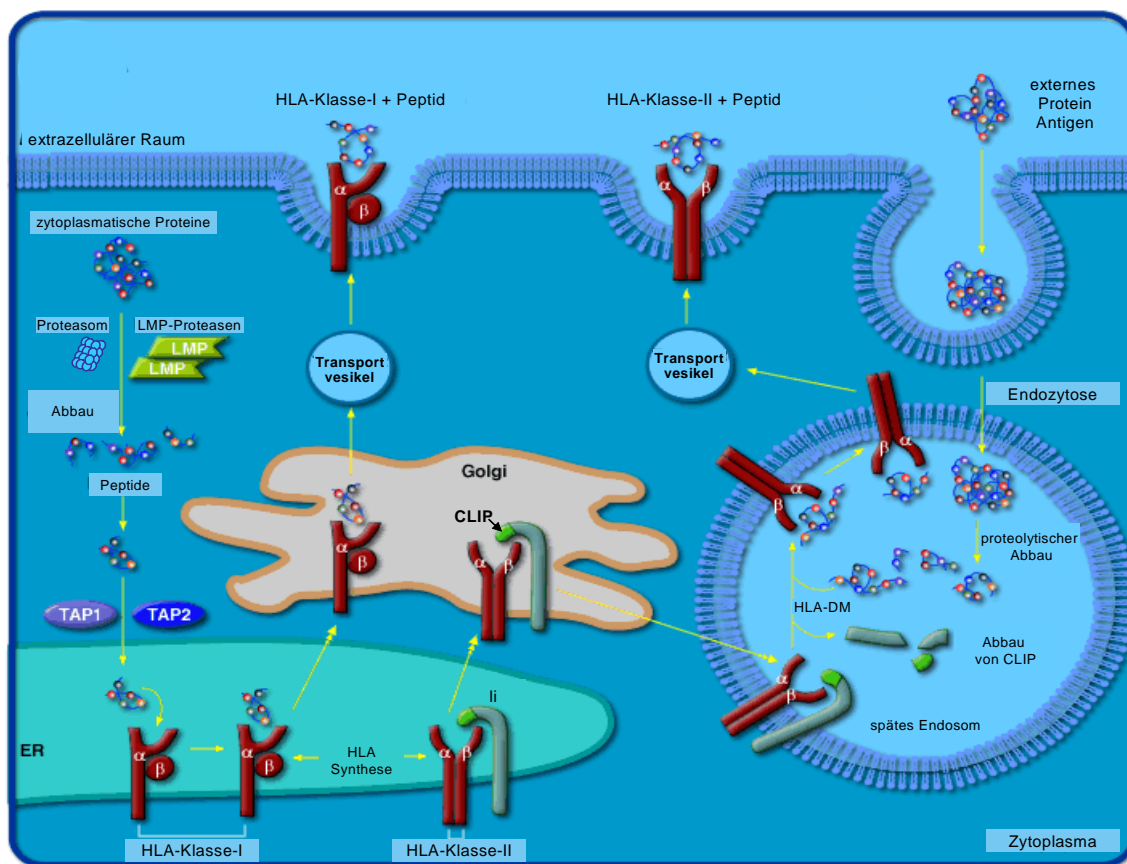


Abb. 2 : Schematische Abbildung des homologen HLA Klasse II Moleküls, bestehend aus einer α - und einer β -Kette.

aufnehmen kann (zwischen 9 und 16 Aminosäuren). Von diesen Molekülen präsentierte Peptide stammen aus Proteinen, welche in das endosomal-lysosomale Kompartiment der Zelle gelangt sind. Dabei kann es sich um Membran- und zytosolische- Proteine, aber auch um Proteine aus dem extrazellulären Raum, wie Mikroorganismen oder Bruchstücke nekrotischer Gewebe handeln, welche durch rezeptorvermittelte Endozytose [Jiang et al.,1995; Sallusto et al.,1995] oder aber über Phagozytose [Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993] in die Zelle aufgenommen wurden (Abb. 3).Durch eine Reihe von Proteasen findet dann in drei ineinander übergehenden sauren Kompartimenten (frühes Endosom, spätes Endosom, Lysosom) die Prozessierung in Peptide und deren Beladung auf HLA-Klasse-II Moleküle statt [Cresswell 1994]. Letztere werden nach ihrer Synthese noch im ER mit der sogenannten invarianten Kette Ii (engl.: invariant chain) verbunden und gelangen mit deren Hilfe in das endosomal-lysosomale Kompartiment [Stumptner et al., 1997]. Dort wird Ii bis auf einen kleinen in der Peptidbindungsgrube des HLA-Moleküls verbleibenden Rest abgebaut. Dieses „Reststück“ wird als CLIP (engl.: class II associated invariant chain peptide) bezeichnet und löst sich schließlich durch den immer saurer werdenden pH-Wert des endosomal-lysosomalen Kompartiments von den HLA-Molekülen ab und wird durch hoch affine Peptide substituiert. Der Prozess der Peptidsubstitution wird dabei durch das HLA-DM Molekül katalysiert [Kropshofer et al., 1997]. Abschließend wird der Peptid-HLA-Klasse-II-Komplex in Vesikeln

zur Zellmembran transportiert, wo die Peptide den CD4⁺-T-Helfer-Zellen präsentiert werden (Abb. 3).

Da innerhalb der Peptidbindungsgrube nur bestimmte Aminosäuren die Bindung zwischen Peptid und HLA-Molekül vermitteln (Anker motive), besteht sowohl für HLA-Klasse-I als auch für HLA-Klasse-II Moleküle eine große Variabilität, die eine Präsentation verschiedenster Peptide gestattet [Appella et al., 1995].



entnommen aus :www.biocarta.com/pathfiles/h_mhcPathway.asp

Abb. 3 : Darstellung der HLA-Klasse-I und HLA-Klasse-II Antigenprozessierungswege

Intrazelluläre Proteine werden vom Proteasom und intrazellulären Proteasen in Peptide gespalten und über den Peptidtransporter TAP in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort werden die Peptide auf HLA-Klasse-I-Komplexe geladen und über den Golgi-Apparat in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert. Proteine aus dem extrazellulären Raum werden mittels Endozytose aufgenommen und anschließend durch Proteasen in Peptide abgebaut. Diese werden dann auf HLA-Klasse-II Moleküle geladen. Die HLA-Klasse-II Moleküle assoziieren nach ihrer Synthese im ER mit der invarianten Kette Ii und werden dann von dieser in das endosomal-lysosomale Kompartiment transportiert. Dort wird Ii durch Proteasen abgebaut, wobei das dabei entstehende class II associated invariant chain peptide (CLIP) verbleibt für kurze Zeit in der Peptidbindungsgrube und wird dann durch das Molekül HLA-DM gegen andere hoch affine Peptide substituiert. Die Peptid-HLA-Klasse-II Komplexe verlassen schließlich das endosomal-lysosomale Kompartiment und werden an die Oberfläche der Zelle transportiert.

Im menschlichen Körper werden sterbende Zellen von APC mittels Endozytose bzw. Phagozytose aufgenommen. Demnach müssten die von den endozytierten Zellen abstammenden durch Prozessierung entstandenen Peptide nur auf HLA-Klasse-II-Komplexen

nachzuweisen sein. Mittlerweile konnte aber in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden, dass einige exogene Proteine auch in den endogenen HLA-Klasse-I Weg gelangen können. Diese sogenannte Kreuzpräsentation (engl.: Cross-presentation) [Brode et al., 2004; Ackerman et al 2005] ermöglicht die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort gegen Viren, die nach Infektion von phagozytierenden Zellen in diesen persistieren, aber auch gegen Tumorzellen, die auf ihrer Oberfläche tumor-spezifische Antigene exprimieren [Maranon et al., 2004; Nouri-Shirazi et al., 2000].

2.4. T-Lymphozyten

Aufgrund unterschiedlicher Aufgaben bei der Beseitigung von Erregern lassen sich T-Lymphozyten in spezifische funktionelle Klassen einteilen, die man anhand charakteristischer Expressionsmuster von Oberflächenmolekülen unterscheiden kann.

2.4.1. Zytotoxische CD8⁺-T-Lymphozyten

Zytotoxische T-Zellen erkennen und vernichten körpereigene Zellen, die beispielsweise durch eine Mutation oder nach einer Infektion durch einen Virus als fremd erkannt werden. Um diese Funktionen ausführen zu können, müssen die T-Lymphozyten zuvor aktiviert werden (2.5.). Hierbei übermittelt der TCR nach Bindung an seinen spezifischen Peptid-HLA Komplex das wichtigste Signal. Er assoziiert mit dem CD3-Proteinkomplex, welcher nach Aktivierung des TCR eine Signalkaskade in das Innere der Zelle weiterleitet, die zur Aktivierung der zytotoxischen T-Zelle beiträgt [Bocko et al., 2003]. Für eine vollständige T-Zell Aktivierung sind jedoch noch weitere Oberflächenmoleküle notwendig. Das wichtigste für die zytotoxischen T-Zellen ist dabei das CD8 Molekül. Es wirkt als Ko-Rezeptor und trägt, durch die direkte Bindung an HLA-Klasse-I Moleküle, zu einer spezifischen Erkennung bei (Abb. 4). Man spricht von einer HLA-Klasse-I restringierten Antigenerkennung durch CTL.

2.4.2. T-Helfer-Zellen

T-Helfer-Zellen (Th-Zellen) spielen eine Rolle bei der Initiation der humoralen Immunantwort sowie bei der Aktivierung anderer Immunzellen (z.B. CTL und Natürlicher Killer-Zellen (NK)), wobei auch hier der TCR eine entscheidende Rolle spielt. Als zusätzliches Signal für eine vollständige Aktivierung exprimieren die Th-Zellen den sogenannten CD4-Ko-Rezeptor (Abb. 4). Dieser bindet an HLA-Klasse-II Moleküle, weshalb man von einer HLA-Klasse-II restringierten Antigenerkennung spricht. Die Th-Zellen werden

anhand der Zytokine, die sie sezernieren, in zwei Untergruppen gegliedert, die bereits 1986 von T. Mosman und R. Coffman auf Grund von Beobachtungen am Mausmodell beschrieben wurden [Mosman et al., 1986]. 1991 konnten diese Beobachtungen auch auf das humane System übertragen werden [Romagnani, 1991]. Die sogenannten Th1-Zellen vermitteln eine zelluläre Immunität indem sie die Proliferation und Differenzierung von CTL durch Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IFN- γ , IL-2 und TNF- α unterstützen. Th2-Zellen hingegen unterstützen eine humorale Immunantwort, da sie B-Zellen durch anti-inflammatorische Zytokine wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 und IL-13 aktivieren aber CTL durch Zytokine wie IL-10 und TNF- β inhibieren. Einige CD4⁺-T-Zellen sekretieren jedoch sowohl Th1- als auch Th2-Cytokine, weshalb die Einteilung nicht immer streng spezifisch ist [Bucy et al., 1994].

2.4.3. T-Supressor-Zellen (regulatorische T-Zellen)

Regulatorische T-Zellen üben eine wichtige Funktion bei der Unterdrückung autoreaktiver T-Zellklone in der Peripherie aus, wodurch Autoimmunreaktion und Allergien verhindert, sowie Transplantatabstoßungen reguliert werden können. In der Literatur sind sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen mit immunsuppressorischer Funktion beschrieben [Filaci et al., 2004; Alard et al., 2004], welche durch unterschiedliche Faktoren induziert werden und verschiedene Muster an Zytokinen sezernieren [von Herrath et al., 2003].

2.4.4. Gedächtniszellen (engl.: Memory cells)

Gedächtniszellen entwickeln sich aus Teilen aktivierter T-Zellen und können bei einer sekundären Infektion mit demselben Krankheitserreger, diesen schneller eliminieren. In der Literatur sind sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺- T-Gedächtnis-Zellen beschrieben worden, welche jeweils in zwei Untergruppen aufgeteilt werden konnten: Zentrale- und Effektor- T-Gedächtniszellen. Die zeitliche Entwicklung dieser beiden Untergruppen während einer Infektion ist nicht eindeutig geklärt. Neuere Studien postulieren jedoch eine Differenzierung von Effektor- zu Zentraler- Gedächtniszelle [Northrop et al., 2004]. Beide Gruppen zeigen, verglichen mit naiven Zellen, niedrigere Anforderungen bei der Aktivierung, da sie unter anderem nicht auf kostimulatorische Signale angewiesen sind [Schmidt et al., 2002]. So kann es beispielsweise zur Aktivierung von Gedächtniszellen durch Tumorzellen kommen, welche zwar tumor-spezifische Antigene, aber keine kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren [Beckhove et al., 2004].

2.5. Antigen-spezifische Aktivierung von Lymphozyten

Naive $CD4^+$ - sowie naive $CD8^+$ - T-Lymphozyten binden nach Erreichen der T-Zell-Areale des Lymphknotens vorübergehend an jede zur Verfügung stehende APC, ein Mechanismus der durch die Interaktion der Adhäsionsmoleküle LFA-1 und CD2 auf der T-Zelle mit ICAM-1, -2 und -3 und LFA-3 auf der APC vermittelt wird [Guinan et al., 1994]. Im Falle einer Erkennung des für die T-Zelle spezifischen HLA-Peptid-Komplexes, verstärkt sich die Bindung durch Zusammenlagerung des CD3-Rezeptors mit den entsprechenden Ko-Rezeptoren (CD4, CD8, CD45). Zusätzlich ist noch ein weiteres Signal notwendig. Dieses entsteht durch die Interaktion des kostimulatorischen Moleküls B7 (CD80 und CD86) auf APC mit CD28 auf den naiven T-Zellen (Abb. 4). Eine Antigenerkennung ohne diese Interaktion der Moleküle führt bei den Lymphozyten zu der sogenannten Anergie. Unter diesem Begriff versteht man einen Zustand fehlender Reaktivität, was bedeutet, dass T-Zellen selbst bei optimaler Stimulierung nicht auf ihr spezifisches Antigen reagieren [Appleman et al., 2003]. Nach Aktivierung führt die Sekretion von großen Mengen an IL-2 durch $CD4^+$ -T-Zellen zur vollständigen Differenzierung der $CD8^+$ -T-Zellen, welche IL-2 durch den ebenfalls nach Aktivierung hochregulierten IL-2-Rezeptor erkennen. Die nun aktivierten CTL verlassen die lymphatischen Organe und wandern in die Peripherie ein, wo sie nach erneutem Kontakt mit ihrem Antigen die Zielzelle vernichten [Henkart 1985].

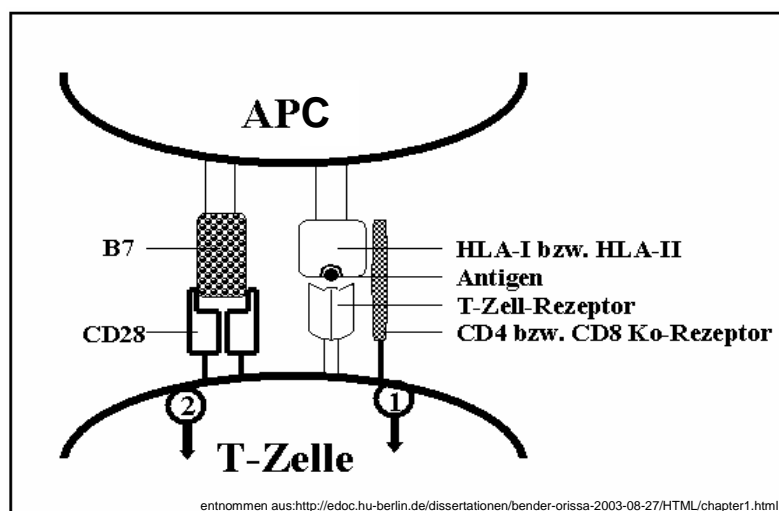


Abb. 4: Antigen-spezifische Aktivierung von T Lymphozyten.

Durch die Bindung des T-Zell-Rezeptors an einen spezifischen Peptid-HLA-Komplex, wird ein erstes Signal in einer ruhenden, naiven T-Zelle ausgelöst (1). Für eine vollständige funktionelle Aktivierung wird jedoch ein weiteres kostimulatorisches Signal benötigt, dass über die Bindung des B7-Moleküls an den CD28 Rezeptor auf der Oberfläche der T-Zellen

vermittelt wird (2) [Alegre et al., 2001]. Fehlt dieses Signal führt die Erkennung des HLA-Moleküls über den TCR zu einer Anergie [Appleman et al., 2003].

2.6. Antigene

Jede Substanz, die in der Lage ist eine Immunantwort auszulösen, wird als Antigen bezeichnet. Folglich versteht man unter Antigenität sowohl die Fähigkeit zur Induktion einer Immunantwort als auch das Vermögen mit den Bestandteilen des Immunsystems, den Immunglobulinen, oder Lymphozyten, spezifisch zu interagieren. Unter der Spezifität eines Antigens versteht man die Eigenschaft, den Bestandteilen der Immunantwort eine bestimmte Spezifität zu verleihen. Zudem werden die Bereiche eines Antigens, welche die Spezifität der Antikörper und die der Lymphozyten bestimmen, Epitope genannt.

2.6.1. Virale Antigene

Die Infektion eines Organismus durch einen Virus erzeugt meist eine starke Immunantwort. Diese umfasst die Produktion von Antikörpern, welche gegen Antigene auf der Virusoberfläche gerichtet sind, und die Aktivierung von CTL gegen HLA-Klasse-I gebundene virale antigene Strukturen, die durch virusinfizierte Zellen präsentiert werden. Da eine Virusinfektion auch zu einer malignen Transformation von gesunden Zellen führen kann, wie beispielsweise im Falle von Gebärmutterhalskrebs, der von humanen Pappilomviren hervorgerufen wird, spielen virale Antigene, wie E6 und E7 des Pappilomvirus, auch bei der Bekämpfung von Tumoren eine entscheidende Rolle [Furumoto et al., 2002].

2.6.2. Tumorantigene

Das adaptive Immunsystem ist in der Lage aufgrund unterschiedlicher Protein-Expressionsmuster zwischen gesunden und Tumor- Gewebszellen zu differenzieren. Die für diese Entscheidung relevanten Strukturen werden als Tumorantigene bezeichnet. Prinzipiell kann man zwischen Tumor-spezifischem und Tumor-assoziierten Antigenen unterscheiden. Tumor-spezifische Antigene werden nur von Tumorzellen als Folge ihrer Pathophysiologie, Tumor-assoziierte Antigene dagegen auch in gesunden Geweben exprimiert. Eine zusammenfassende Übersicht über humane Tumorantigene und deren T-Zellepitope wurde von Renkvist et al. in der SYFPEITHI-Datenbank veröffentlicht [Renkvist et al., 2001]. Weiterhin sind zusätzliche aktuelle Datenbanken im World Wide Web unter <http://www.cancerimmunity.org> zu finden.

Aufgrund ihres Expressionsmusters unterscheidet man verschiedene Gruppen von Tumorantigenen für das maligne Melanom.

2.6.3. Mutierte Antigene

Durch Mutationen bedingte Aminosäuresubstitutionen können in einigen Fällen zu neuen tumor-spezifischen HLA-Liganden führen [Anichini et al., 1996]. Aufgrund ihres seltenen, individuellen Vorkommens sind sie jedoch für die klinische Praxis weniger attraktive Kandidaten. Ausnahmen mit etwas höherer Frequenz beim malignen Melanom sind Mutationen des Zellzyklusregulators CDK4 (3 % der Fälle) und die des β -Catenin-Gens (10 % der Fälle) [Wolfel et al., 1995; Rubinfeld et al., 1997].

2.6.4. Cancer/Testis Antigene

Diese werden von Genen kodiert, die mit Ausnahme von Zellen der männlichen Keimbahn (Hoden), in gesunden adulten Geweben nicht exprimiert werden. Da jedoch im Hoden (Testis) keine HLA-Klasse-I Moleküle exprimiert werden, kommt es auch zu keiner Antigenpräsentation der dort exprimierten Proteine. Folglich ist eine Immunantwort gegen Cancer Testis Antigene tumor-spezifisch. Heute kennt man eine Vielzahl von Cancer Testis Antigenen. Dazu gehören unter anderem Proteine die von der MAGE (Melanoma Antigen Genes) Genfamilie kodiert werden und NY-ESO-1 [Eichmüller et al., 2003; Scanlan et al., 2002].

2.6.5. Überexprimierte Antigene

Genetische Modifikationen können zur Überexpression von Proteinen führen, die dadurch als Zielstrukturen der Immunantwort relevant werden können. Beispiele für diesen Mechanismus sind das Onkoprotein HER-2/neu, welches in 30 % der Brust- und Ovarialkarzinome überexprimiert wird und das Tumorsuppressorgen p53, welches in mehr als 50% aller neu auftretenden Krebsfälle eine Rolle spielt [Kiessling et al., 2002; Harris et al., 1996].

Melanotransferrin (p97)

p97 wurde erstmals als ein Oberflächenmarker des malignen Melanoms identifiziert und ist beispielsweise auf SK-MEL 28-Zellen in hohen Konzentrationen zu detektieren [Brown et al., 1981]. Später wurde es aufgrund seiner hohen Homologie von 37-39 % zu Lactoferrin und Serum Transferrin in Melanotransferrin umbenannt [Brown et al., 1982]. Kahn et al. konnten 1991 nachweisen, dass in Mäusen CD4⁺-T-Zell Antworten gegen mindestens drei

verschiedene p97-Epitope nach Immunisierung mit p97-Gesamt-Protein generiert werden können [Kahn et al., 1991]. Bislang gibt es nur wenige Daten zur Immunogenität Melanotransferrins im humanen System [Dissertation Till Alexander Röhn, 2004].

2.6.6. Melanom-assoziierte Differenzierungsantigene

Bei den Differenzierungsantigenen handelt es sich um Proteine, die auch im Ursprungsgewebe der Tumoren synthetisiert werden, wie beispielsweise Tyrosinase in Melanozyten und Melanomzellen. Zu den bekanntesten Melanom-assoziierten Differenzierungsantigenen zählen außer dem Enzym Tyrosinase (Brichard et al., 1993) das Tyrosinase-verwandte-Protein TRP-1 (tyrosinase-related-protein, TRP-1) [Nishioka et al., 1999], Tyrosinase-verwandtes-Protein-2 (tyrosinase-related-protein, TRP-2) [Nishioka et al., 1999] sowie gp100/HMB-45 [Bakker et al., 1994] und MART-1 /Melan-A [Coulie et al., 1994]. Es handelt sich um gewebe-spezifische Antigene die normalerweise ausschließlich in Melanozyten der Haut oder der Retina exprimiert werden. Alle genannten Enzyme sind membrangebunden, in den Melanosomen lokalisiert und an der Synthese des Farbstoffes Melanin beteiligt. Die Tyrosinase katalysiert die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin zu den Melaninvorstufen DOPA (3,4-Dihydroxyphenylalanin) und Dopachinon [Körner und Pawelek, 1982]. Unter Einwirkung der Enzyme TRP-1 und TRP-2 entsteht anschließend das braun-schwarze Pigment Eumelanin. Aus L-Tyrosin kann unter Einwirkung des Enzyms Tyrosinase noch eine weitere Form des Melanins, das sogenannte Phaeomelanin, entstehen. Dieses bewirkt eine gelb-rötliche Färbung und benötigt zu seiner Synthese weder TRP-1 noch TRP-2.

Tyrosinase

Das Enzym Tyrosinase gehört zur Gruppe der Metalloenzyme, da es ein Kupferion als integralen Bestandteil aufweist. Weil in vitro die Reaktionen nach der Hydroxilierung der Aminosäure Tyrosin von selbst ablaufen können, wird die Tyrosinase auch als Schlüsselenzym der Melaninsynthese bezeichnet. In den letzten Jahren wurden verschiedene von der Tyrosinase abstammende Epitope identifiziert, gegen welche effiziente CTL Antworten generiert werden konnten [Kawakami et al., 1998; Kittlesen et al., 1998; Scheibenbogen et al., 2002].

Tyrosinase related protein 1 (TRP-1)

TRP-1, welches anfänglich als gp75 beschrieben wurde [Wang et al.,1995], gehört ebenfalls zur Gruppe der Metalloenzyme. Auch für TRP-1 konnten in den letzten Jahren CTL Antworten gegen verschiedene Epitope identifiziert werden [Wang und Rosenberg, 1996].

Tyrosinase related protein 2 (TRP-2)

Auch TRP-2 zählt zur Gruppe der Metalloenzyme. In Studien konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die mit TRP-2 transduzierten DC immunisiert wurden, eine Immunabwehr gegen B16 Melanomzellen entwickeln [Tuting et al., 1999]. Auch im humanen System konnten CTL-Antworten gegen Epitope aus TRP-2 nachgewiesen werden [Sun et al., 2000; Noppen et al., 2000; Castelli et al., 1999].

Melan-A

Melan-A auch MART-1 (engl.: Melanoma Antigen Recogniced by T-cells-1) genannt, ist ein für die Immuntherapie sehr bedeutendes Antigen, da es in 75-100% der Primärtumore und Metastasen gebildet wird [Hofbauer et al., 1998]. Es enthält ein durch HLA-A2 präsentierte immundominantes Peptid (Melan-A₂₆₋₃₅), gegen welches die Mehrheit an HLA-A2 positiven gesunden Individuen eine hohe Zahl an CD8⁺-T-Zellen aufweist. Das besondere daran ist, dass die hohe Zahl nicht durch die Expansion peripherer T-Zellen nach Antigenkontakt zustande kommt, sondern das im Thymus nach negativer und positiver Selektion (2.1) vorhandene Repertoire an naiven T-Zellen eines Menschen widerspiegelt [Zippelius et al., 2002]. Trotz dieser hohen Anzahl an Melan-A spezifischen naiven T-Zellen und obwohl in Patienten nach Immunisierung mit dem Melan-A₂₆₋₃₅ Peptid eine erhöhte Anzahl an spezifischen T-Zellen detektiert werden konnte, wurde keine Korrelation zur Regression des Tumors beobachtet [Cormier et al., 1997]. Dies wurde auf eine niedrige Affinität des Peptides dem HLA-A*0201-Molekül gegenüber zurückgeführt [Sette et al., 1994]. Versuche, in denen einzelne Aminosäuren des ursprünglichen Melan-A Peptides gegen besser bindende Aminosäuren ersetzt wurden, führten zu einer verstärkten Affinität des Peptides gegenüber dem HLA-Molekül und damit verbunden zu einer stärkeren T-Zell-Antwort [Valmori et al., 1998]. Die generierten T-Zellen erwiesen sich ebenfalls als Tumor-reaktiv [Abdel-Wahab et al., 2003].

Gp-100

Bei gp100 handelt es sich um ein intrazelluläres Transmembran-Glykoprotein von ungefähr 100kD [Bakker et al., 1994], welches von malignen Melanomzellen stark exprimiert wird. Bis heute konnten mehrere verschiedene von gp100 abstammende T-Zell-Epitope identifiziert werden, deren Einsatz in unterschiedlichen Studien zur Induktion einer antigen-spezifischen Immunantwort führte [Walker et al., 2004; Powell et al., 2004, Kawakami et al., 1995].

2.7. Suche nach T-Zellepitopen

Bedingung für den Erfolg verschiedenster Vakzinierungsstrategien ist die Identifizierung tumor-spezifischer oder tumor-assoziiertes Antigene bzw. Epitope, durch deren Einsatz, das Immunsystem des Patienten stimuliert werden kann. Während zu Beginn nur die Charakterisierung von Tumorantigenen/-epitopen möglich war, die durch in vivo aktivierte CTL erkannt wurden [Van den Eynde et al., 1989; Wolfel et al., 1993], ermöglichte die später entwickelte Strategie der "Reversen Immunologie" eine Identifizierung von Antigenepitopen mittels in vitro aktivierter CTL [Boon et al., 1997]. Dabei werden ausgehend von der Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Antigens potentielle Peptidepitope unter Berücksichtigung der Ankermotive für die HLA-Bindung vorhergesagt und synthetisiert. Die HLA-Bindungseigenschaften der Peptide werden anschließend untersucht und gute Binder zur Stimulation autologer T-Zellen eingesetzt. Führt ein Kandidatenpeptid zur T-Zellstimulation, so muss für dieses Peptid der Nachweis der Prozessierung erbracht werden. Folglich müssen die Zellen, die mit Antigen beladen werden (z.B. Protein-beladene DC) oder solche, die das Antigen selbst exprimieren (z.B. Tumorzellen), dasselbige derart prozessieren können, dass ein Peptidepitop entsprechend dem synthetischen Peptid entsteht, welches im HLA-Klasse-I Komplex an der Zelloberfläche präsentiert wird.

Eine alternative Methode, mit der Untersuchungen zur Epitopprozessierung vermieden werden können, beruht auf der Elution von Peptiden aus HLA-Molekülen und deren nachfolgender Analyse über Massenspektrometrie [Cox et al., 1994]. Die dabei identifizierten Peptide müssen im Anschluss in weiteren Versuchen auf ihre Immunogenität hin getestet werden.

Seit kurzem wird eine weitere Strategie zur Identifizierung neuer Epitope verfolgt: Dabei werden Tumorantigene in eine professionelle APC eingebracht, die dann zur in vitro Aktivierung autologer T-Zellen eingesetzt wird [Osman et al., 2003]. Die Epitopspezifität von T-Zellen, die auf Antigen-beladene APC reagieren, wird dann entweder mittels einer Auswahl vorhergesagter synthetischer Peptidepitope oder mit Hilfe einer Peptidreihe, bestehend aus

überlappenden Peptiden, die die Sequenz des gesamten Antigens abdecken, untersucht. Der Vorteil dieser Methode ist die Unabhängigkeit von einem bestimmten HLA-Allel, zudem ist je nach Art der Antigenbeladung eine Aktivierung von CD8⁺- wie auch von CD4⁺- Zellen möglich.

2.8. Strategien des Transfers von Tumorantigenens in DC

Dendritische Zellen als potenteste professionelle APC sind durch ihre Fähigkeit eine spezifische T-Zell-Antwort zu induzieren entscheidende Modulatoren einer Immunantwort. Diese Fähigkeit kann genutzt werden, um Immunantworten gegen ausgewählte Antigene eines Tumors zu generieren und diesen mit Hilfe des Immunsystems zu bekämpfen. Aus diesem Grund wurden verschiedenste Techniken entwickelt, mittels derer Tumorantigene in DC transferiert werden können. Zu diesen zählt die sehr effiziente Beladung von DC mit synthetischen sich aus Tumorantigenen ableitenden Peptidepitopen [Thurner et al., 1999], wodurch eine Stimulation von CD8⁺- wie auch von CD4⁺- Zellen möglich ist. Diese Methode beschränkt sich jedoch ausschließlich auf solche DC, für deren HLA-Allele bereits Tumorantigenepitope beschrieben wurden.

Als Alternative können DC mit rekombinanten Proteinen beladen werden, wodurch nach Prozessierung des Proteins, Epitope im Komplex mit verschiedenen HLA-Molekülen der APC präsentiert werden können. Eine Kenntnis der Epitopsequenzen ist dabei nicht notwendig [Santin et al., 1999]. Allerdings ist die Herstellung dieser rekombinanten Proteine sehr teuer und zeitaufwendig und die so erzeugten Immunantworten fallen oft nur sehr schwach aus. Zusätzlich ist dieser Ansatz, obwohl eine Stimulation von CD8⁺-T-Zellen über „Cross-presentation“ stattfinden kann, eher für die Stimulation von CD4⁺-T-Zellen geeignet.

Um die T-Zell-Antworten nicht nur auf ein Tumorantigen zu beschränken, können DC mit Tumor-Lysat beladen [Schott et al., 2000] oder eine Hybridzell-Linie bestehend aus Tumor- und Dendritischer- Zelle hergestellt werden [Kugler et al., 2000]. Diese Methoden sind jedoch sehr stark abhängig von der Menge des zur Verfügung stehenden Tumorgewebes.

Um Einschränkung wie diese zu umgehen wurden verschiedenste virale Gen-Transfer Methoden entwickelt [Kirk et al., 2000]. Hierbei besteht jedoch das Risiko, dass nicht nur Epitope aus Tumor-assoziierten Antigenen, sondern auch aus viralen Antigenen von der DC präsentiert werden. Dies kann dazu führen, dass hauptsächlich T-Zell-Antworten gegen immundominante virale Antigene ausgelöst werden, wohingegen Antworten gegen Tumor-assoziierte Epitope verdeckt oder sogar unterdrückt werden [Pion et al., 1999]. Außerdem

können DC die sowohl virale als auch Tumor-assoziierte Antigene präsentieren durch Virus-spezifische CTL erkannt und somit eliminiert werden.

Im Hinblick auf eine klinische Anwendung wurden deshalb neue Strategien entwickelt, zu denen beispielsweise der Gen-Transfer mittels DNA und RNA in DC zählt. In den meisten Fällen erwies sich jedoch die Transfektion von DNA in DC als sehr schwierig und wenig effizient. Dagegen konnten bei Verwendung der Technik der RNA-Elektroporation gute Transfektionseffizienzen erzielt werden und inzwischen belegen erste Arbeiten das Potential elektroporierter DC Antigen-spezifische T-Zellen zu aktivieren [Tuyaerts et al., 2003; Liao et al., 2004].

3. Zielsetzung

Antigen-spezifische CD8⁺-CTL sind in der Lage Tumorzellen zu zerstören. Induktion und Persistenz einer CTL Antwort sind jedoch abhängig von der Aktivität Antigen-spezifischer CD4⁺-Th-Zellen. Dendritische Zellen kontrollieren die Induktion Tumorantigen-spezifischer T-Zell-Antworten in vivo. Daher besteht ein großes Interesse an der Entwicklung von DC-Vakzinen, die nach entsprechender Manipulation in der Lage sind sowohl Antigen-spezifische CD4⁺- als auch CD8⁺- T-Zellen zu aktivieren. Dendritische Zellen, in die RNA kodierend für Tumorantigene transferiert wurde, stellen möglicherweise eine potente Vakzine dar. Mit der Etablierung der RNA-Elektroporation sollten demzufolge die Voraussetzungen für die klinische Anwendung einer solchen Vakzinierungsstrategie geschaffen werden. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war daher, die Technik des RNA-Transfers in DC mittels Elektroporation zu etablieren. Die Expression der RNA-kodierten Antigene sollte untersucht und RNA elektroporierte DC anschließend in Bezug auf die Fähigkeit analysiert werden, Antigen-spezifische CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen zu aktivieren. Weiterhin wurde das Vermögen zur Stimulation von CD8⁺-T-Zellen spezifisch für virale Antigene und Tumorantigene durch RNA elektroporierte DC eruiert. Die Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen sollte beispielhaft an T-Zellen spezifisch für das Antigen Melanotransferrin analysiert werden. Erst kürzlich wurde ein CD4⁺-T-Zellepitop aus Melanotransferrin beschrieben zu dessen Immunogenität in Melanompatienten keine Informationen vorlagen, so dass ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin bestand, diese zu analysieren.

B. Material und Methoden

1. Material

Chemikalien und Reagenzien	Firma
AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol)	Sigma
Cell-Gro [®] Medium	Cell Genix
Cyclosporin A	Sigma
3,3`-Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
Dimethyl Pyrocarbonate (DMPC)	Sigma
Essigsäure	Merck
FACS Flow	BD Biosciences-Pharmingen
FACS Safe	BD Biosciences-Pharmingen
FACS Rinse	BD Biosciences-Pharmingen
Fix & Perm [®]	Caltag Laboratories
Humanserum	PAA Laboratories GmbH
IMDM-Medium	Biochrom KG
Methanol	Riedel-de Hahn
2-Mercaptoethanol	Merck
Mitomycin C	Medac
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	Fluka
OPTI-MEM Medium	Gibco BRL
PBS	Biochrom KG
Penicillin /Streptomycin (100x)	PAA Laboratories
p-nitro-phenyl-phosphat	Sigma
Phytohämagglutinin (PHA)	Sigma
RNActive [™] your gene-RNA	CureVac
RNA-Marker	MoBiTec
RPMI-Medium	Biochrom KG
Streptavidin-ALP	MabTech
Streptomycin	Biochrom KG
Triton-X-100	Biochrom KG

Trypan Blau	Biochrom KG
Trypsin/EDTA	Biochrom KG
Tween-20	Gerbu
Vectastain Elite ABC Kit Standard	Vector Laboratories
Wasserstoffperoxid	Merck

Zytokine	Firma
rhIL-2	TEBU
rhIL-7	ImmunoTools
rhIL-12	R&D Systems
rhIL-6	R&D Systems
rhIL-4	R&D Systems
GM-CSF	Novartis
IL1- β	R&D Systems
TNF- α	Boehringer Ingelheim
MPG2	Pharmacia Upjohn
IFN- γ	R&D Systems

konjugierte-Antikörper	Firma
Anti-human CD4 PE	ImmunoTech
Anti-human CD4 FITC	ImmunoTech
Anti-human CD8 PE	ImmunoTech
Anti-human CD8 FITC	ImmunoTech
Anti-human HLA-KlasseI PE	BD Biosciences Pharmingen
Anti-human HLA-DR FITC	BD Biosciences Pharmingen
Anti-human IgG1 FITC	ImmunoTech
Anti-human IgG PE	ImmunoTech

Unkonjugierte-Antikörper	Firma
TA99	NovaCastra Laboratories Ltd.
Melan A	NovaCastra Laboratories Ltd.
1-D1K anti IFN- γ	Mabtech

Biotinylierte Zweitantikörper	Firma
Goat-anti-Mouse-IgG	Jackson Immuno-Research
7B61 anti IFN- γ	Mabtech

Plasmide	Ursprung
pCMV β -Melan A	Arbeitsgruppe Schadendorf
pCMV β -TRP-1	Arbeitsgruppe Schadendorf
pCMV β -TRP-2	Arbeitsgruppe Schadendorf
pREP8 HLA-A2.1	R. Salter, Pittsburg
Melanotransferrin Plasmid	H. Kropshofer, Roche, Basel

Verbrauchsmaterial und "Kits"	Firma
Einfrierröhrchen 2ml	Greiner Bio-one
Einweg-Plastikpipetten	Sarstedt
Elektroporationsküvetten 4mm	PeqLab
Elisa-Platten (Immunotech™ Plate)	Nunc
ELISpot-Platten	Millipore Corp.
Eppendorf Reaktionsgefäße (0,5;1,5 bzw. 2 ml)	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Amersham
Falcon Reaktionsgefäße (15 ml bzw. 50 ml)	Falcon
Gewebekulturflaschen (175cm ²)	Greiner Bio-one
Gewebekulturplatten (6, 24, 48 bzw. 96 Kavitäten)	Greiner Bio-one
Glaspipetten (1, 2, 5, 10 und 20 ml)	Hirschmann
MACS-Beads (CD4 ⁺ , CD8 ⁺)	Miltenyi Biotec
Objektträger	R. Langenbrinck
Petrischalen	Greiner Bio-one
Pipettenspitzen	Eppendorf
PopPen	Immunotech
Steritop-Filter (0,2 bzw. 0,4 μ m)	Schleicher & Schuell
Suspensionskulturflaschen 250 ml	Greiner
Spritzen (10 ml und 50 ml)	Terumo
Apparatur für RNA- und DNA Gele	Bio Rad

Autoklav HiClave HV-85	Hirayama
Biofuge Fresco	Heraeus
Brutschränke: US Uto Flow	Nuaire
DC500 Kamera im IM 50	Leica
Eismaschine Scotsman AF-10	Scotsman
ELISA-Reader Anthos 2010	Anthos Labtec
Gene Pulser II [®]	Bio Rad
FACSscan mit Software Cellquest	Beckton Dickinson
Kühlschränke (4 °C, -20 °C)	Liebherr
Magnetrührer MR 3002, Vortexer REAX 2000	Heidolph
Mikroskop DMIL	Leica
Mikroskop DMLS Leica	Leica
Neubauer Zählkammer	Brand
Pipettierhilfe accu-jet [®]	Brand
pH-Meter MP 220	Mettler Toledo
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotec
Pulse Controller Plus	Bio Rad
Schüttelwasserbad SW20	Julabo
Sorvall [®] Super T 21	Kendro
Sterilbank: SterilGard Class II Type A / B3	Baker Company
Stickstofftank Chronos Biosafe	Messer Griesheim
Reinstwasser-Anlage Seralpur Delta UV/UF	USF Seral
Research Pipetten 10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf
Thermomixer Compact 5436	Eppendorf
Varifuge3.OR, Multifuge 3 S-R	Heraeus
Waage BP 210 S	Sartorius
Waage BP 3100 P	Sartorius
Wasserbad Medigen W6	Medigen
Zentrifuge Universal 30F	Hettich

Zelllinien	Ursprung
B95-8 Lymphozytenlinie	EBV sezernierende B-Zelllinie
COS 7	Affennierenzellen
COS 7-A2	Mit HLA-A2 stabil transfizierte COS-7-Zellen
K562	Menschliche Erythroleukämie Zellen
T2	T-und B-Zell Hybrid
T2.DR4	Mit HLA-DR4 stabil transfizierte T2-Zellen

Peptid	Sequenz	Restriktion
TRP-2 ₁₈₀₋₁₈₈	SVYDFFVWL	HLA-A*0201
TRP-2 ₄₅₅₋₄₆₃	Y AIDL PVS V	HLA-A*0201
Melan-A ₂₆₋₃₅	ELAGIGILTV	HLA-A*0201
pp65 ₄₉₅₋₅₀₃	NLVPMVATV	HLA-A*0201
p97 ₆₅₅₋₆₉₅	siehe unten*	HLA-DRB1*0401
p97 ₆₆₈₋₆₈₃	GQDLLFKDATVRAVPVGH LA	DRB1*0401, *0101
Vimentin ₂₀₂₋₂₁₇	TLQSFRQDVDNASLAR	HLA-DRB1*0401
HIV ₁₇₁₋₁₉₀	FRKQNPDIVIYQYMMDDLYVG	HLA-DRB1*0401

* p97₆₅₅₋₆₉₅ = KNGFKMFDSSNYHGQDLLFKDATVRAVPVGEKTTYRGWLGLI

Alle Peptide wurden durch Herrn Dr. Rüdiger Pipkorn, DKFZ Heidelberg, synthetisiert, mit der Ausnahme von p97₆₆₈₋₆₈₃ und Vimentin₂₀₂₋₂₁₇. Dieses wurde von Herrn Dr. Harald Kropshofer, Roche Basel, zur Verfügung gestellt.

1.1. Zellkultur-Medien

Normalmedium

RPMI 164.....2 g/l NaHCO₃ , L-Glutamin
 FCS (hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56 °C).....10 % (w/v)
 Penicillin, Streptomycin (100.000 Einheiten/ml).....1 % (w/v)

Einfrier-Medium

FCS (hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56 °C).....	90 % (w/v)
DMSO.....	10 % (w/v)

Basismedium für T-Zellen (engl.: T-Cell-Medium; TCM)

IMDM.....	25 mM HEPES, L-Glutamin
HS (hitzeinaktiviert für 30 min. bei 56 °C).....	10 % (w/v)
Penicillin, Streptomycin (100.000 Einheiten/ml, 10 mg/ml).....	1 % (w/v)

1.2 Komplexe Puffer und Lösungen**1.2.1. Puffer für die DNA /RNA Analytik****DNA-Lade-Puffer**

Glycerin 100 % (v/v).....	5 ml/10 ml
SDS 10 % (w/v).....	1 ml/10 ml
Na ₂ EDTA 0,5 M (pH 8,5).....	2,5 ml/10 ml
Bromphenolblau.....	5 mg/10 ml
In VE-Wasser lösen, autoklavieren	

TAE-Puffer

Tris.....	4,84 g/l
Na ₂ EDTA 0,5 M (pH 8,5).....	0,74 ml/l
Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Essigsäure auf pH 8,5 eingestellt	

TE-Puffer

Tris.....	1,21 g/l
Na ₂ EDTA 0,5 M (pH 8,5).....	0,37 ml/l
Der pH-Wert wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 8,0 eingestellt	

DMPC-Wasser

DMPC 1,25 g/ml.....	0,01 (v/v)
In VE-Wasser lösen, autoklavieren	

10 x MOPS

MOPS.....	41,86 g/400 ml
Natriumacetat (2 M).....	25 ml
EDTA 0,5 M (pH 8).....	10ml
mit VE-Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren	

1.2.2. RNA-Proben Puffer

Formamid.....	2,5 ml
Formaldehyd 37 %.....	0,9 ml
10 x MOPS.....	0,5 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml).....	10 µl
Bromphenolblau.....	0,1 % (w/v)
In VE-Wasser lösen, autoklavieren	

1.2.3. Puffer und Lösungen für Zellkultur**MACS-Puffer**

NA2EDTA.....	2 mM
BSA.....	0,5 % (w/v)
in PBS	

FACS-Blockierungs-Lösung

BSA.....	0,1 % (w/v)
Natriumacit.....	0,1 % (w/v)
Humanserum.....	5 % (w/v)
in PBS	

1.2.4. Puffer und Lösungen für ELISpot und Elisa**PBS-Tween-Waschpuffer**

Tween-20.....	0,05 % (v/v)
in PBS	

Natrium-Tween-Waschpuffer

Tween-20.....	0,05 % (w/v)
NaCl.....	0,9 % (w/v)
in PBS	

Substrat-Lösung (AEC)

Lösung 1

Dimethylformamid.....	2,5 ml
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC).....	1 Tablette

Lösung 2

Aqua dest.	35,6 ml
Natriumacetat (0,2 N).....	8,4 ml
Essigsäure (0,2 N).....	3,5 ml
Lösung 1 mit Lösung 2 vermischen und 25 µl H ₂ O ₂ zugeben, steril filtrieren.	

1.2.5. Lösungen für Immunzytologie***PBS-Triton-X-100 (0,2 %)***

Triton-X-100.....	0,2 % (v/v)
in PBS	

PBS-Triton-X-100 (0,1 %)

Triton-X-100.....	0,1 % (v/v)
in PBS	

PBS-Triton-X-100-Milchpulver

Triton-X-100.....	0,1 % (v/v)
Milchpulver.....	0,5 % (w/v)
in PBS	

2. Methoden

2.1. Methoden der Zellkultur

2.1.1. Kultivierung von Zelllinien

Um Kontaminationen mit Bakterien, Pilzen oder Hefen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten unter einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder sterilisierten Lösungen und Geräten durchgeführt. Alle Zelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO₂ in gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert.

2.1.2. Passagieren von Zellen

Suspensionszellen

Alle Suspensionszellen wurden in Zellkulturflaschen kultiviert. Sobald das Medium sich gelblich verfärbte, wurde 90 % der Zellsuspension abgenommen und verworfen. Die verbleibenden 10 % wurden mit frischem Medium versetzt.

Adherente Zellen

Zum Ablösen adhärenter Zellen von der Zellkulturflasche wird die Protease Trypsin verwendet. Bei dieser handelt es sich um eine Endopeptidase, welche Peptidbindungen neben den Aminosäureresten Lysin und Arginin spalten kann. Bei Anwendung in der Zellkultur kommt es hierdurch zu einer Störung der Oberflächen-Zellwand-Wechselwirkungen, wodurch sich die Zellen nach einer Einwirkungszeit von 3-5 min. ablösen lassen. Da die Wirkung von Trypsin durch die Anwesenheit von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen inhibiert wird, müssen vor Verwendung alle Mediumreste durch Waschen mit PBS entfernt werden. Durch das zu Trypsin hinzugegebene EDTA werden restliche vorhandene Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen gebunden, was eine optimale Funktion des Trypsins garantiert. Im Folgenden wurde das Medium aus den Zellkulturflaschen entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2-3 ml (pro 175 cm² Zellkulturflasche) Trypsin/EDTA zu den Zellen gegeben und bei Raumtemperatur solange inkubiert, bis sich die Zellen ablösten. Die Reaktion wurde durch Aufnahme der abgelösten Zellen in 10 ml Medium gestoppt, welche dann für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert wurden. Abschließend wurden die Zellen gezählt und in eine neue Zellkulturflasche in gewünschter Dichte ausgesät.

2.1.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen gezählt, für 10 min. bei 1200 rpm zentrifugiert und in einer Konzentration von 1×10^7 - $2,5 \times 10^7$ Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen. Jeweils 2 ml dieser Zellsuspension wurden dann in Kryo-Röhrchen überführt, welche wiederum für 24h in mit Isopropanol gefüllten Kryo-Einfrierboxen bei -80 °C gelagert wurden. Danach wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37 °C und zwar nur so lange, bis der Eiskern sich von der Wand des Kryo-Röhrchens ablöst. Darauf folgend wurden die Zellen in 10 ml Normalmedium überführt, abzentrifugiert und in dem für die nachfolgenden Versuche entsprechendem Medium aufgenommen.

2.1.4. Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit einer Pipette entnommen und mit der gleichen Menge an 0,5 % igem Trypanblau vermischt. Die Mischung wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer überführt und die Zellzahl in allen vier Großkammern der Kammer bestimmt. Aus dem Mittelwert der lebenden (nicht blau gefärbten) Zellen ergab sich die Zellzahl pro ml durch Multiplikation mit 1×10^4 und dem Verdünnungsfaktor.

2.2. Generierung antigen-präsentierender Zellen

2.2.1. Isolierung mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Menschliche Lymphozyten lassen sich aus peripherem Blut mittels einer Ficoll-Dichtezentrifugation isolieren. Die von der Abteilung Transfusionsmedizin der Blutbank Mannheim erhaltenen Präparate wurden hierzu in einem ersten Schritt mit einer dem Blut entsprechenden Menge an PBS verdünnt. Diese Mischung wurde dann ganz langsam und vorsichtig in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, in welche bereits je 15 ml Ficoll-Hypaque vorgelegt wurden. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation des Röhrchens bei 1800 rpm, die ohne Bremse durchgeführt wurde, ließen sich deutlich verschiedene Phasen unterscheiden. Am Boden des Röhrchens befanden sich rote Blutkörperchen, polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten, weiter oben an der Phasengrenze waren Lymphozyten und Monozyten (mononukleäre Zellen = PBMC) angereichert, die vorsichtig abgenommen wurden. Um Ficoll-Reste und zurückgebliebene rote Blutzellen zu beseitigen, mussten die abgenommenen Zellen noch dreimal mit PBS gewaschen werden (1200 rpm, 10 min.).

2.2.2. Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten

DC wurden aus Monozyten des Blutes nach einem modifizierten Protokoll von Romani generiert [Romani et al., 1990]. Hierbei wurde die Fähigkeit der Monozyten an Plastik zu adhären ausgenutzt. Die aus dem peripheren Blut isolierten mononukleären Zellen wurden an Tag 0 in einer Konzentration von $5 \times 10^7 - 1 \times 10^8 / 15$ ml Normalmedium in 175 cm^2 Zellkulturflaschen überführt und für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die nicht adhären Zellen durch vorsichtiges Schwenken gelöst, zusammen mit dem Überstand abgenommen und nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 1200 rpm in Einfriermedium aufgenommen und eingefroren (2.1.3.). Die adhären Zellen wurden noch zweimal mit PBS gewaschen und schließlich in Cell-Gro[®] Medium für 24 h inkubiert. Danach wurde die Hälfte des Mediums durch neues ersetzt, welches mit Interleukin-4 (IL-4, 1000 U/ml) und mit dem Granulocyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF, 800 U/ml) supplementiert wurde. GM-CSF ist hierbei für die Differenzierung der Monozyten in DC verantwortlich, während IL-4 die Differenzierung in Makrophagen unterdrückt. Nach Zugabe der Zytokine wurden die Zellen für 5 Tage im Inkubator inkubiert, wobei an Tag 3 und 5 erneut GM-CSF und IL-4 hinzugegeben wurden. Je nach Verwendungszweck wurden die DC dann an Tag 6 entweder geerntet und im unreifen Zustand für weitere Versuche eingesetzt oder durch Zugabe eines Reifungscocktails in reife DC ausdifferenziert. Der verwendete Reifungscocktail bestand aus GM-CSF (800 U/ml), IL-4 (1000 U/ml), Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α , 10 ng/ml), Interleukin-1 β (IL-1 β , 10 ng/ml), Interleukin-6 (IL-6, 1000 U/ml) und Prostaglandin2 (PGE2, 1 $\mu\text{g/ml}$). Zur Ausreifung wurden die Zellen für 2 Tage mit dem Reifungscocktail inkubiert, dann geerntet und für weitere Versuche verwendet.

2.2.3. Generierung von EBV-B-Zellen

Bei EBV-B-Zellen handelt es sich um immortalisierte, durch Epstein-Bar-Virus (EBV) transformierte, B-Zellen [Redchenko et al., 1999]. Zur Generierung wurden 4×10^5 PBMC in die Vertiefung einer 96 Well Platte in 100 μl RPMI-Medium gegeben, welches mit 600 ng/ml Cyclosporin-A versetzt wurde. Letzteres verhindert die Aktivierung und Proliferation der T-Zellen. Pro well wurden dann 100 μl Kulturüberstand der Zelllinie B95 hinzugegeben, die nach Transfektion mit dem Epstein-Barr-Virus in der Lage ist, das Virus in den Überstand zu sekretieren. Anschließend wurde die 96 Well Platte für 2-3 Wochen bei 37°C inkubiert, wobei alle 4-5 Tage das verbrauchte Medium durch neues ersetzt wurde. Unter der Voraussetzung, dass die Zellen gut proliferieren erfolgte die weitere Kultivierung ohne Cyclosporin A. Die Zellen wurden zu diesem Zeitpunkt für weitere Versuche eingesetzt.

2.3. Beladung von APC mit Antigenen

2.3.1. Beladung der APC mit Peptid

Dendritischer Zellen

Zur Beladung von DC mit Peptid wurden reife DC verwendet. Diese wurden geerntet, gezählt und in einer Konzentration von $2,5 \times 10^5$ Zellen in 250 μ l Cell-Gro[®] Medium an den Rand einer 6 Well Platte gegeben. Die Zellen wurden dann zusammen mit 10 μ g Peptid pro 250 μ l für mindestens 2 h inkubiert, wobei die Platte im Inkubator etwas schräg gestellt wurde, damit alle Zellen mit Medium bedeckt blieben. Anschließend wurden 1×10^7 autologe PBL (aufgetaut) in 5 ml TCM zu den DC gegeben.

PBMC

Um spezifische T-Zell-Antworten zu stimulieren, wurden in einigen Fällen auch autologe PBMC verwendet, die mit Peptid beladen wurden. Hierbei geht man davon aus, dass sich unter den PBMC APC befinden, die in der Lage sind, den T-Zellen das Peptid zu präsentieren. Zur Beladung wurden PBMC aufgetaut, gezählt und in einer Konzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml mit 10 μ g/ml Peptid in einer 24 Well Platte inkubiert. Abhängig vom Verwendungszweck wurden die PBMC mit Mitomycin C inaktiviert (2.5.).

andere APC

In der vorliegenden Arbeit wurden auch andere APC, wie COS-7-Zellen oder T2-Zellen mit Peptid beladen. Das Ziel hierbei war die Antigen-beladenen APC zur Stimulation von spezifischen T-Zellen einzusetzen und nachfolgend die Aktivierung der T-Zellen anhand der Freisetzung von Cytokinen im ELISpot-Assay (2.8.1) oder ELISA (2.8.2.) zu messen. Aus diesem Grund erfolgte die Beladung immer in einer 96 Well Platte.

2.3.2. Transfektion APC mit Plasmid-DNA

Unter Transfektion versteht man das Einschleusen fremder Nukleinsäuren in eukaryotische Zellen. Dazu wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen/ 6 well Platte ausgesät und für 24 h inkubiert. Anschließend erfolgt die Transfektion mit Plasmid-DNA unter Verwendung des FuGENE Reagenz. Dabei handelt es sich um ein nicht liposomales, aber lipidhaltiges Transfektionsreagenz, von welchem in einem

ersten Schritt 3 μl mit 100 μl serumfreien Medium für 5 min. bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurden. Darauf folgend wurde 1 μg der zu transfizierenden DNA zu dem Ansatz gegeben, gut gemischt und für weitere 15 min. bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden die zu transfizierenden Zellen vorbereitet, indem sie zunächst vorsichtig mit PBS gewaschen und dann mit frischem Medium versorgt wurden. Zu diesen wurde nach Ablauf der 15 min. die DNA-FuGENE Mischung hinzugegeben, woraufhin die Platte für weitere 48 h bei 37 °C inkubiert wurde. Als negative Kontrolle wurde ein Transfektionsansatz mit Wasser anstelle von DNA angesetzt.

2.3.3. Transfektion von APC mit RNA mittels Elektroporation

Als Elektroporation bezeichnet man die Verwendung von kurzen elektrischen Impulsen zum Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen. Dabei hängt die Effizienz der Elektroporation von verschiedenen Faktoren ab. Die Stärke des angelegten elektrischen Feldes, die Dauer des elektrischen Impulses, die Temperatur, das verwendete Elektroporationsmediums und die eingesetzte RNA Konzentration spielen hierbei eine Rolle. Um maximale Elektroporationseffizienzen zu erreichen, müssen alle diese Parameter für den jeweiligen Zelltyp optimal eingestellt werden [Wolf et al. 1994]. Um die Elektroporation durchzuführen, wurden die DC an Tag 6 im unreifen Zustand geerntet. Da die DC zu diesem Zeitpunkt noch sehr stark am Boden haften, wurden sie durch mehrmaliges Waschen mit PBS und Inkubation bei unterschiedlichen Temperaturen (4 °C, 10 min. und 37 °C, 10 min.) abgelöst. Zur Beseitigung aller Serumreste, welche die Elektroporation negativ beeinflussen würden, wurden die Zellen dreimal mit serumfreien OptiMEM-Medium gewaschen und in einer Konzentration von $1\text{-}2 \times 10^6$ Zellen/200 μl in OptiMEM-Medium aufgenommen. 200 μl der Zellsuspension wurden dann in eine 4 mm Küvette überführt, in welche 5-10 μg RNA vorgelegt wurden. Nach sorgfältigem Mischen der Zellsuspension wurde die Küvette in die Elektroporationsvorrichtung des Elektroporators geschoben. Für DC hat sich ein Impuls von 400 V und 150 μF als ideal erwiesen. Alle anderen Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 300 V und 150 μF elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen aus der Küvette in eine 6 Well Platte überführt, in welche 3 ml Cell-Gro[®] Medium vorgelegt wurden. Im Falle der Elektroporation von DC wurde das Medium nach der Elektroporation mit Reifungszytokinen versetzt. Durch mehrmaliges Ausspülen der Küvette wurde verhindert, dass zu viele Zellen verloren gehen. Die Zellen wurden dann für 24 h inkubiert und anschließend in weitere Versuche eingesetzt.

Beim Arbeiten mit RNA muss darauf geachtet werden, dass keine Kontaminationen in Form von RNAsen auftreten, welche die RNA abbauen würden. Deshalb wurden alle Arbeiten mit Handschuhen und sterilen gestopften Pipettenspitzen durchgeführt. Weiterhin sollten alle Schritte mit RNA so schnell wie möglich durchgeführt werden. Die RNA-Zellsuspension sollte sich beispielsweise nicht länger als 1 min. in der Küvette befinden. Zwischen den einzelnen Versuchen wurde die RNA immer wieder in einem Agarosegel auf ihre Integrität hin überprüft.

2.4. Primäre Antigen-spezifische in vitro Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen

Im Lymphknoten interagieren DC mit verschiedenen Lymphozytenpopulationen (2.4.). Dabei tasten T-Lymphozyten die Oberfläche von DC ab, und werden, falls es zu einer Erkennung des Antigens durch den T-Zell Rezeptor kommt, aktiviert. Dieser zentrale Vorgang, der sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺- T-Zellen betrifft wird als „Priming“ bezeichnet und kann in vitro nachvollzogen werden.

2.4.1. Antigen-spezifische in vitro Aktivierung von CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen

Dazu wurden 1×10^7 PBMC, $2,5 \times 10^5$ DC (20:1) und 10-20 μg des entsprechenden Peptids in T-Zell-Medium (engl.: T-cell-medium, TCM), versetzt mit IL-6 (5 ng/ml) und IL-12 (0,4 ng/ml), für 10-14 Tage inkubiert, wobei an jedem dritten Tag die Hälfte des Mediums abgenommen und durch neues Medium, versetzt mit Zytokinen, ersetzt wurde. Da nach Ablauf dieser Zeit die Frequenz an Antigen-spezifischen T-Zellen meistens noch sehr gering und somit kaum detektierbar war, wiederholt man den Vorgang der in vitro Stimulation, wobei das Verhältnis von T-Zellen zu DC auf 40:1 und die Menge an Peptid auf 5-10 μg herabgesetzt wurde. Da hierbei bereits spezifische T-Zellen einen neuen Stimulus erhalten, bezeichnet man diesen Vorgang als „Restimulierung“. Für diese wurden neben Peptid beladenen DC auch mit DNA bzw. RNA transfizierte DC eingesetzt. In manchen Fällen erfolgt die Restimulierung auch mit autologen Peptid-beladenen PBMCs. Letztere wurden vor Verwendung mit Mitomycin C inaktiviert und in einem Verhältnis von 1:1 eingesetzt. Nach der Restimulierung wurden die Zellen in TCM für 10-14 Tage inkubiert, welches die Zytokine IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) enthielt. Abhängig von dem Antigen, gegen welches spezifische T-Zellen generiert werden sollen, mussten die Zellen noch mehrere Male restimuliert werden. Eine zwischenzeitliche Analyse der Zellen durch einen ELISpot oder

Elisa kann jedoch Aufschluss über die Spezifität der T-Zell-Population geben (2.8.1. und 2.8.2.).

2.4.2. Stimulation in vivo aktivierter CD4⁺- und CD8⁺- T-Zellen

In vivo aktivierte T-Zellen, die bereits Kontakt zu ihrem spezifischen Antigen hatten, können in vitro durch einen einfachen Stimulus zur Zytokinsekretion und zur Expansion angeregt werden. Hierzu wurden 6×10^6 PBMC mit $10 \mu\text{g}$ des relevanten Peptides in Gegenwart von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) für 10-14 Tage inkubiert und anschließend im ELISpot oder ELISA analysiert (2.8.1. und 2.8.2.). Dabei wurde ebenfalls an jedem dritten Tag die Hälfte des Mediums abgenommen und durch neues Medium, versetzt mit Zytokinen, ersetzt.

2.5. Inaktivierung der Zellen mit Mitomycin C

PBMC, aber auch andere Zellen, müssen für eine Restimulierung inaktiviert werden. Dazu wurden sie in einer Konzentration von maximal 1×10^7 Zellen in 1,8 ml Medium aufgenommen und mit $200 \mu\text{l}$ Mitomycin C für 30-45 min. bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Mitomycin C lagert sich in der Zelle zwischen Guanin-Cytosin-Basenpaaren ein, was zur Folge hat, dass die DNA-Helikase die beiden Basenpaare nicht mehr trennen kann, wodurch die Replikation der DNA unterbunden wird. Um alle Reste von Mitomycins C zu beseitigen, wurden die Zellen anschließend dreimal mit PBS gewaschen und dann für weitere Versuche verwendet.

2.6. Isolierung von CD4⁺-/CD8⁺- T-Zellen mittels MACS MicroBeads

Mit Hilfe des MACS MicroBeads Systems können Zellpopulationen zu einem hohen Reinheitsgrad separiert werden. Das System basiert auf magnetischen MicroBeads, die an hoch spezifische Antikörper gekoppelt vorliegen. Sie werden eingesetzt, um die Target-Zell-Population magnetisch zu markieren und diese dann mit Hilfe eines starken Magneten aus der Gesamt-Zell-Population zu isolieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen geerntet, in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen in $80 \mu\text{l}$ kaltem MACS-Puffer aufgenommen und mit $20 \mu\text{l}$ der MACS CD4⁺- bzw. CD8⁺- MicroBeads versetzt. Es folgte eine 15minütige Inkubation bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$, wobei die Zellen nach der Hälfte der Zeit leicht aufgeschüttelt wurden. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 50 ml MACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert, in $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer aufgenommen und anschließend auf die zuvor einmal mit $500 \mu\text{l}$ MACS-Puffer equilibrierte MACS-Separations-Säule geladen, welche in eine Magnet-Halterung eingespannt wurde. Bei der Wahl der Säule war zu beachten, dass die vorgeschriebene Lade-Kapazität nicht überschritten wird (MS-Säulen = 10^7 Bead-markierte

Zellen bzw. 2×10^8 Gesamtzellen; LS-Säulen = 10^8 Bead-markierte Zellen bzw. 2×10^9 Gesamtzellen). Nachdem die Zellsuspension durch die Säule getropft war, wurde diese dreimal mit MACS-Puffer gewaschen, dann aus dem Magneten herausgenommen. Die daran gebundenen Zellen wurden mit 2 ml MACS-Puffer durch festes Drücken mit einem Stempel (wird mit der Säule geliefert) eluiert.

2.7. FACS Analyse

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen [Tung et al. 2004]. Sie bietet die Möglichkeit, mittels Laser-Anregung verschiedene Zellparameter wie Lichtbrechung, Lichtdurchlässigkeit und Fluoreszenz an einer großen Anzahl einzelner Zellen zu messen. Der Methode zugrunde liegt eine Antigen-Antikörper-Reaktion, welche mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Antikörpern durchgeführt wird. Hierdurch können wichtige Schlussfolgerungen über das Expressionsmuster spezifischer Antigene getroffen werden. Auch lassen sich Rückschlüsse auf die Menge der gebundenen Fluoreszenz markierten Antikörper und somit auf die Expressionsstärke der Antigene schließen.

Die zu untersuchenden Zellen werden während der Messung als Einzel-Zell-Suspension an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung werden die Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes dabei auf ein höheres Energieniveau gehoben, von welchem sie, unter Abgabe von Energie, auf ihr Ursprungsniveau zurückfallen. Dabei werden die emittierten Photonen durch einen Photodetektor registriert. Zusätzlich lassen Lichtbeugung und Lichtstreuung Rückschlüsse auf die Größe (Forward Scatter) und Granularität (Sideward Scatter) der Zellen zu.

Bei der FACS-Analyse ist ein Einsatz unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe möglich, da diese sich bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, jedoch über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen. Während der Durchführung dieser Arbeit wurden die zwei Fluoreszenzfarbstoffe Phycoerythrin (PE, Emission bei 578nm, FL-2 Height) und Fluoreszeinisothiozyanat (FITC, Emission bei 525nm, FL-1 Height) verwendet.

2.7.1. FACS-Analyse von Antigenen auf der Zelloberfläche

Für jeden einzelnen zu messenden Ansatz wurden 1×10^5 Zellen in jeweils 200 μ l FACS-Puffer (PBS mit 10 % FCS) aufgenommen und in eine 96 Well Platte überführt. Die gesamte Platte wurde dann bei 1500 rpm für drei Minuten abzentrifugiert und der Überstand mit einer

einmaligen schnellen Bewegung abgeschüttet. Die Platte wurde, um überschüssige Flüssigkeit abzusaugen, für 5 sek. mit der Öffnung nach unten auf ein Tuch gelegt. Danach wurden die jeweiligen Antikörper in die einzelnen Wells verteilt, wobei die eingesetzte Menge von dem einzelnen Antikörper selbst abhing. Soweit nicht anders beschrieben wurde je 1 µl Antikörperlösung eingesetzt. Die Platte wurde dann für 30 min. auf Eis gestellt und langsam geschüttelt, wobei jeglicher Lichteinfall auf die Platte unterbunden wurde, um die Funktionalität des Fluoreszenzfarbstoffs nicht zu beeinträchtigen. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen, dann entweder in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und im FACS-Calibur-Durchflußzytometer analysiert oder aber mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Welcher Weg eingeschlagen wurde, hängt von dem Antikörper selbst ab. Handelt es sich bei dem ersten Antikörper um einen unkonjugierten Primäantikörper, so mussten die Zellen noch mit einem zweiten FITC oder PE gekoppelten sekundären Antikörper für 30 min. inkubiert werden. Wurde jedoch ein konjugierter Antikörper als Primäantikörper verwendet, so konnte die Messung direkt nach der Antikörper-Inkubation durchgeführt werden. Die aus einer unspezifischen Bindung resultierende Fluoreszenz wurde mittels Kontroll-Antikörper ermittelt und von der spezifischen Fluoreszenz abgezogen (Negativkontrolle). Nach erfolgreicher Markierung wurden die Zellen fixiert, indem sie mit 500 µl einer Formalin Lösung (4 % in PBS + 5 % FCS) bei 4 °C für mindestens 15 min. lichtgeschützt inkubiert wurden.

Die Analyse der Daten wurde mit Hilfe der Cellquest Research Software (Becton-Dickinson) durchgeführt, wobei entweder eindimensionale Histogramme oder zweidimensionale „Punkt-Bilder“ ("Dot-Plots") verwendet wurden. Durch das Setzen von Analysefenstern konnten Zellpopulationen selektiv analysiert werden. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm WinMDI auf einem PC.

2.8. Nachweis der IFN- γ Sekretion durch T-Zellen

2.8.1. ELISpot-Analyse

Die ELISpot Technik erlaubt es, zytokinproduzierende T-Zellen zu detektieren. Dazu wurde eine spezielle 96 Well Platte, welche einen Nitrozelluloseboden aufweist, mit einem monoklonalen Antikörper, der gegen das zu detektierende Zytokin gerichtet ist, beschichtet. Die Stimulation der T-Zellen erfolgt dann direkt auf der Platte. Hierzu wurden die zu untersuchenden T-Zellen mit dem spezifischen Antigen stimuliert, welches von zusätzlich hinzugegebenen APC (Targetzellen) präsentiert wurde. Das als Reaktion auf die Stimulation

der T-Zellen ausgeschüttete Zytokin wurde von den Antikörpern am Ort der Entstehung gebunden. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit gewaschen, worauf eine Detektionsreaktion für das jeweilige Zytokin mit einem zweiten biotinylierten Antikörper erfolgt. Durch Zugabe eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes und darauf folgend dem Substrat 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC) wurden dann die Stellen auf der 96 Well Platte als "Spots" sichtbar, an denen sich aktivierte Lymphozyten befanden. Diese Spots werden mit Hilfe eines ELISpot-READERs ausgezählt und konnten als Maß für die Reaktivität der T-Zellen auf einen bestimmten Stimulus interpretiert werden.

Im vorliegenden Fall sollte die Konzentration von IFN- γ bestimmt werden. Hierzu wurde eine 96 Well Platte mit 10 $\mu\text{g/ml}$ des monoklonalen anti-IFN- γ mAb (1-D1K verdünnt in PBS, 75 $\mu\text{l/well}$) für 24 h bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurde die Platte unter sterilen Bedingungen dreimal mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen und dann für 1 h mit 200 μl TCM inkubiert. Im Folgenden wurden abhängig von der Affinität und der Anzahl an spezifischen Zellen 1×10^4 - 1×10^5 T-Zellen, in einem Volumen von 100 μl in die 96 Well Platte gegeben und mit 2×10^4 Targetzellen (50 μl TCM) und 10 $\mu\text{g/ml}$ Peptid (50 μl TCM) bei 37 °C für 24 h inkubiert. Um anschließend alle Zellen aus den wells zu entfernen, wurde die Platte sechsmal mit PBS-Tween-Waschpuffer gewaschen, woraufhin 1 $\mu\text{g/ml}$ des biotinylierten monoklonalen zweiten mAb (7-B6-1 verdünnt in PBS+ 0,5 %BSA, 75 $\mu\text{l/well}$) für 2 h hinzugegeben wurde (bei 37 °C). Nach erneutem sechsmaligem Waschen mit PBS-Tween-Waschpuffer wurden 100 μl eines Streptavidin-Peroxidase-Komplexes, welcher an das Biotin des zweiten Antikörpers binden kann, auf die Platte gegeben. Diese wurde dann für 1 h bei RT inkubiert. Der Streptavidin-Peroxidase-Komplexe wurde zuvor durch eine 30 min. lange Inkubation von 1 Tropfen der Lösung A und 1 Tropfen der Lösung B des Elite ABC Standard Kits der Firma Vectastain in 10 ml PBS-Tween-Waschpuffer angesetzt. Die Platte wurde dann erneut sechsmal gewaschen, wobei die ersten drei Waschschrte mit PBS-Tween-Waschpuffer und die letzten drei Waschschrte mit PBS ausgeführt wurden. Anschließend erfolgte der letzte Schritt, in welchem 100 μl der Substratlösung (AEC) in die einzelnen Wells gegeben wurde. Die Reaktion wurde mit dem Auge beobachtet und noch vor dem Auftreten von zuviel Hintergrund bzw. spätestens nach 10 min. Inkubationszeit mit Leitungswasser gestoppt.

2.8.2. ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

Als ELISA bezeichnet man ein immunologisches Verfahren zum quantitativen Nachweis bestimmter von Zellen sezernierter Produkte wie zum Beispiel Zytokine. Dazu wurden die zu

testenden Zellen in gleichen Zell- und Peptid-Mengen wie im ELISpot (2.8.1.) über Nacht in einer 96 Well Platte inkubiert, worauf am nächsten Tag ein Teil des Kulturmediums abgenommen und analysiert wurde. Im vorliegenden Fall sollte die IFN- γ Konzentration im Medium gemessen werden. Dazu wurden 96 Well Platten mit flachem Boden mit anti-IFN- γ mAb (1-D1K, Endkonzentration 5 $\mu\text{g/ml}$), der in sterilem PBS verdünnt wurde, pro well beschichtet (75 μl) und 24 h bei 4 °C inkubiert. Danach wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen und dann für eine Stunde bei RT mit 200 μl PBS-Tween-Waschpuffer inkubiert. Anschließend erfolgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 200 μl Natrium-Tween-Waschpuffer. Dann wurden jeweils 50 μl des Mediums bzw. 50 μl des IFN- γ -Standards, welcher in unterschiedlicher Konzentration in PBS-Tween-Waschpuffer angesetzt wurde (25 U; 6,25 U; 1,56 U und 0,39 U), pro well pipettiert. Die Inkubation der Überstände und des Standards erfolgte für 1-2 Stunden bei RT. In dieser Zeit kann das vorhandene IFN- γ an den ersten Antikörper binden. Durch einen darauf folgenden Waschschrte mit PBS-Tween-Waschpuffer wurden dann alle weiteren ungebundenen Moleküle gewaschen, so dass der nun zugegebene anti-IFN- γ mAb (7-B6-1, Endkonzentration 1 $\mu\text{g/ml}$), der in PBS-Tween-Waschpuffer verdünnt wurde, nur noch an den Komplex aus erstem Antikörper und IFN- γ binden konnte (1h Inkubation). Da dieser zweite Antikörper biotinyliert vorliegt, wurde nun im nächsten Schritt eine Streptavidin-Alkalische Phosphatase-PQ (ALP-PQ) in einer Verdünnung von 1:1000 (PBS-Tween-Waschpuffer) zugegeben, die an das Biotin binden kann und dessen Reste nach einer Stunde durch 5faches Waschen mit PBS-Tween-Waschpuffer wieder entfernt wurden. Diese ALP kann nun das im nächsten Schritt hinzugefügte chromogene Substrat p-nitro-phenyl-phosphat (1 mg/ml in 10 % diethanol amine Puffer mit 0,5 mM MgCl₂, pH 9,8) in ein farbiges Produkt umwandeln, das photometrisch bei 405 nm nach 30-60 min quantifiziert werden kann. Die Menge des Produkts ist proportional zur Menge des gebundenen Zielmoleküls.

2.9. Zytospin

Durch einen Zytospin können Zellen auf einem Objektträger fixiert werden. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml aufgenommen. In der Zwischenzeit wurde eine so genannte Zytospin-Kammer vorbereitet. Dabei handelt es sich um einen Objektträger, auf dem eine Probenkammer fixiert wurde. Dazwischen wurde ein saugfähiges Papier gelegt, welches in der Mitte einen kreisrunden Ausschnitt von ca. 1 cm Durchmesser frei lässt. Daraufhin wurden 500 μl der Zellsuspension in die Probenkammer gegeben, welche dann in einer speziell dafür geeigneten

Zentrifuge für 3 min. bei 1500 rpm zentrifugiert wurde. Um die verbleibende Flüssigkeit zu entfernen, wurde die Probenkammer abgenommen und der Objektträger noch mal für 1 min. bei 3000 rpm zentrifugiert. Die Objektträger mit den sich darauf befindenden Zellen wurden dann zur Fixierung in 3,7 %igen Formaldehyd bei 4 °C für mindestens 15 Minuten gelagert.

2.10. Immunzytologie (ABC-Färbung)

Die Methode der Immunzytologie ermöglicht die Anfärbung intrazellulärer Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Dazu wurden die durch Zytospin auf Objektträgern fixierten Zellen einmal mit PBS gewaschen, dann für 1-2 min. in PBS + 0,2 % Triton-X-100 inkubiert und schließlich nochmals mit PBS gewaschen (2x). Nachdem die Flüssigkeit abgelaufen war, wurden die Zellen mit einem Fettstift (PopPen) umrandet, um zu verhindern, dass zugegebene Flüssigkeit ablaufen kann. Um unspezifische Antikörper-Bindungen zu vermeiden, wurden die Zellen für 20 min. bei RT mit PBS + 2 % Normalserum inkubiert. Dabei wurde die Lösung vorsichtig tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach Ablauf der Zeit wurden die Objektträger schräg aufgestellt, um das Serum ablaufen zu lassen. Anschließend wurde der in PBS-Triton-X-100-Milchpulver verdünnte Erstantikörper für 0 min. bei RT zu den Zellen gegeben. Um später bei der Auswertung unspezifische Hintergrund-Reaktionen, die durch den Erstantikörper verursacht wurden, ausschließen zu können, wurden von jeder zu testenden Zellart zwei Ansätze durchgeführt. Auf einen dieser Ansätze wurde kein Erstantikörper gegeben. Nach 30 min. Inkubation wurde die Antikörperlösung durch einmaliges Waschen mit PBS-Triton-X-100 0,1 % und einen darauf folgenden Waschschrift mit PBS-Triton-X-100-Milchpulver entfernt. Anschließend wurde der biotinylierte Zweitantikörper (α -Maus-Antikörper aus Vectastain Elite ABC Kit Standard, Verdünnung 1:500), ebenfalls in PBS-Triton-X-100-Milchpulver verdünnt, hinzugegeben (30min., RT). In dieser Zeit wurden 1 Tropfen der Lösung A und 1 Tropfen der Lösung B (Streptavidin-Peroxidase-Komplex; Vectastain Elite ABC Kit Standard) zu 10 ml PBS-Triton-X-100 gegeben und ebenfalls für 30 min. bei RT inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-Triton-X-100 0,1% und PBS-Triton-X-100-Milchpulver wurde diese ABC Lösung für 30min. zu den Zellen pipettiert. In einem letzten Schritt wurde dann nach abermaligem Waschen das Substrat 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) hinzugegeben. Zur Herstellung der Substratlösung wurde das Produkt Sigma Fast™ Diaminobenzidin bestehend aus zwei Tabletten eingesetzt, von welchen zuerst die silbernen, dann die goldene in 1 ml Wasser gelöst und eingesetzt wurden. Durch die Verwendung dieses Substrates bildet sich genau an der Stelle ein farbiger Niederschlag, an der das Enzym über Biotin, Sekundär- und Primärantikörper an das gesuchte

Antigen gebunden ist. Die Färbung kann durch Mikroskop detektiert und mittels DC500 Kamera (Leica) dokumentiert werden.

2.11. Mikrobielle Arbeitstechniken

Im Rahmen der Arbeit wurde ausschließlich der Bakterienstamm E.coli XL-2 Blue verwendet.

2.11.1. Herstellung transformationskompetenter Bakterien

E.coli Bakterien können durch Behandlung mit Calciumchlorid bei niedriger Temperatur in die Lage versetzt werden, freie DNA aus dem Medium aufzunehmen (Transformation). Zur Herstellung transformationskompetenter Zellen wurden 3 ml LB-Medium ohne Ampicillin mit Bakterien des Stammes XL-2-Blue angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die hochgewachsenen Bakterien in LB-Medium verdünnt (1:50) und so lange geschüttelt, bis die Kultur eine OD von 600 nm erreicht (ca. 2,5 h). Anschließend wurden alle Bakterien bei 3400 rpm für 10 min. abzentrifugiert und in 20 ml kaltem CaCl₂ resuspendiert. Der Ansatz wurde dann für mindestens 30 min. auf Eis inkubiert und anschließend erneut abzentrifugiert (3400 rpm für 10 min). Das Pellet wurde in 4 ml CaCl₂ resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden dann 500 µl mit 250 µl sterilem Glycerin vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Werden die Zellen nicht sofort benötigt, können sie bei -80 °C gelagert werden.

2.11.2. Transformation von Escherichia coli mit Plasmid-DNA

Für die Transformation wurden 200 µl des bei -80 °C gelagerten transformationskompetenten E.coli Stammes XL-2 Blue auf Eis aufgetaut und anschließend eine kleine Menge des zu vermehrenden Plasmids (DNA = 1 µg) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 60 min., während welcher die DNA an die Bakterienzellwände adsorbieren kann. Die Bakterien wurden dann für 45 sek einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und direkt im Anschluss für zwei weitere Minuten auf Eis inkubiert. Durch das Einwirken von Hitze und der darauf folgenden Kälte werden die Bakterienzellwände für kurze Zeit permeabel, so dass die eingesetzte DNA in die Zelle eindringen kann. Damit die Bakterienzellen das plasmidkodierte Antibiotika-Resistenzgen exprimieren können, wurde zu dem Ansatz 1 ml LB-Medium ohne Selektionsagens hinzugegeben und die Suspension für mindestens 1 h bei 37 °C geschüttelt. 100 µl der Bakteriensuspension wurden dann auf eine Antibiotika-haltige Agarplatte ausgestrichen. Folglich können auf dieser Platte nur die Bakterien wachsen, die

das Plasmid während der Transformation aufgenommen haben. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.12. Molekularbiologische Techniken

2.12.1. Präparation bakterieller Plasmid-DNA

Diese Methode wird angewandt, um die durch Transformation in Bakterienzellen eingebrachte und durch die Bakterien vervielfältigte Plasmid-DNA zu isolieren. Abhängig von der erwünschten zu isolierenden Plasmid-DNA-Menge folgt die Präparation den im Handbuch zur Plasmidpräparation für kleine Plasmid-DNA-Mengen (Mini-Präp) bzw. für große Plasmid-DNA-Mengen (Midi-Präp; Maxi-Präp) gemachten Angaben der Firma Qiagen. Die Methode beruht auf einer alkalischen Lyse der Zellen, welcher die Adsorption der nun freien Plasmid-DNA an eine Silica Membran folgt. RNA, Proteine und andere Verunreinigungen werden mit einem Waschpuffer gewaschen.

2.12.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Um unbekannte DNA-Konzentrationen zu bestimmen, kann man sich folgende Eigenschaften zunutze machen. DNA besitzt aufgrund seiner Purin/Pyrimidin-Struktur der Nukleotide ein Absorptionsmaximum von 260 nm, wodurch unter Einsatz eines Photometers eine genaue Konzentrationsbestimmung möglich ist. Dazu wurden 2 µl der DNA in 98 µl DMPC Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette (10 mm Schichtdicke) überführt. Diese wurde dann in das Photometer gestellt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Eine OD₂₆₀ nm von 1 entspricht dabei ungefähr einer Konzentration von 40 µg/ml DNA. Als negativen Vergleichswert wurde DMPC Wasser verwendet. Da Proteine ihr Absorptionsspektrum bei 280 nm haben, gibt der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ die Reinheit der Präparation an. Der Quotient sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Auf die gleiche Weise kann auch die Konzentration von RNA bestimmt werden.

2.12.3. Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme gehören zu der Gruppe der Endonukleasen und spalten DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung. Die Effizienz einer Restriktionsspaltung ist abhängig von den Reaktionsbedingungen. Für jede Restriktionsendonuklease gibt es optimale Inkubationstemperaturen und Reaktionspuffer. Außerdem muss darauf geachtet werden, dass die Glycerinkonzentration im Reaktionsansatz unter 5 % liegt, damit es nicht zu einem

Verlust der Hydrolyseaktivität oder zu unspezifischen Spaltungen kommt. Da die Glycerinkonzentration im Lagerungspuffer der Enzyme meistens 50 % beträgt, muss die eingesetzte Enzymmenge weniger als 1/10 des Gesamtvolumens des Restriktionsansatzes betragen. Eine Enzymeinheit (1 Unit) entspricht der Enzymmenge, die nötig ist, um 1 µg einer Kontroll-DNA, in der Regel handelt es sich um λ-Phagen-DNA, in 1 h vollständig zu spalten. Für die enzymatische Spaltung wird meist ein 5-10 facher Überschuss eingesetzt. Die Ansätze werden ca. 2 h bei der vom Hersteller der Enzyme angegebenen optimalen Temperatur inkubiert. Soll eine Restriktion mit zwei oder mehr Endonukleasen gleichzeitig durchgeführt werden, muss darauf geachtet werden, dass die Reaktionspuffer übereinstimmen und alle bei der gleichen Temperatur ihr Spaltungsmaximum aufweisen. Ist dies nicht der Fall, kann die Spaltung mit dem sogenannten One-Phor-All Puffer durchgeführt werden. Im Anschluss daran erfolgte bei Bedarf eine Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym im Reaktionsansatz (10 bzw. 30 min. bei 65 °C). Der Restriktionsansatz kann danach für Gelelektrophoresen oder Klonierungen verwendet werden.

2.12.4. Agarose-Gel-Elektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese ist ein Verfahren zur Trennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Technik zur Auftrennung von unterschiedlich großen DNA bzw. RNA Molekülen verwendet. Das Wanderungsverhalten der Moleküle ist dabei abhängig von Größe und Stärke des angelegten elektrischen Feldes sowie von der Ionenstärke, Porengröße und der Temperatur der verwendeten Matrix. Agarosegele wirken aufgrund ihrer Porenstruktur wie ein Sieb, wobei die Porengröße über die Agarose-Konzentration determiniert ist. Das heißt, dass zur Trennung von Fragmenten kleiner als 500 bp 1,4-1,7 %ige Gele für größere Fragmente 0,8- 1,2 %ige Gele verwendet werden. Zur Herstellung von Agarose-Gelen wurde trockene Agarose in entsprechendem Volumen TAE-Puffer (1.2.) in einem Mikrowellengerät aufgeköcht, bis eine homogene, viskose Lösung entsteht. Diese Lösung wurde mit 1 µl Ethidiumbromid versetzt, welches in die DNA bzw. RNA interkalieren und durch die vorhandene Eigenfluoreszenz unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde das Gel in die entsprechende Apparatur gegossen und ein Taschenformer eingeschoben. Nach der Polymerisierung wurden die Proben in 1x DNA-Puffer bzw. 1x RNA-Puffer aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 100 V. Zur späteren Bestimmung der Größe der DNA- bzw. RNA-Moleküle wurde ein Marker eingesetzt, der verschiedene DNA- bzw. RNA Moleküle definierter Größe enthält.

C. Ergebnisse

1. RNA-Elektroporation

Zum Einbringen fremder genetischer Informationen in eukaryontische Zellen stehen mittlerweile diverse Techniken zur Verfügung. Die Entscheidung für eine bestimmte Gen-Transfer-Methode ist abhängig von den Zielzellen und von dem Verwendungszweck der transfizierten Zellen. In der vorliegenden Arbeit sollte die Methode der RNA-Elektroporation als Lieferant antigener Strukturen in professionelle APC etabliert und diese zur Stimulation von CD8⁺-CTL und CD4⁺-T-Helfer Zellen eingesetzt werden. Damit sollten die Voraussetzungen für eine mögliche klinische Anwendung einer RNA-DC Vakzine geschaffen werden. Die T-Zellstimulatorischen Eigenschaften RNA elektroporierter DC sollten anhand der Aktivierung von T-Zelllinien spezifisch für virale Antigene und Tumorantigene im Falle der CD8⁺-T-Zellen überprüft werden. Die Analysen zur CD4⁺-T-Zellstimulation sollten sich auf das bislang in Bezug auf seine Immunogenität wenig charakterisierte Melanotransferrin Antigen beschränken.

1.1. *In vitro* Transkription

In vitro transkribierte RNA sollte vom eGFP Gen sowie von der cDNA verschiedener Differenzierungsantigene wie Melan-A/MART-1, TRP-1 und TRP-2 hergestellt werden. Die Produktion der RNA erfolgte durch CureVac[®]. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen in ein Plasmid, unter die Kontrolle des T7 Promotors eingebracht und in vitro mittels T7 Polymerase transkribiert. Die Transkripte wurden mit einer Cap-Struktur am 5'-Ende für die Initiation der Translation und einem Poly-A-Signal am 3'-Ende versehen. Sowohl das Poly-A-Signal, als auch die am 5'- und 3'-Ende vorhandenen untranslatierten Bereiche der Globin Gene, wurden zur Stabilisierung der RNA eingefügt (Abb. 5A). Die Integrität der in vitro Transkripte wurde in einem Agarosegel überprüft. Dargestellt ist beispielhaft die Analyse von TRP-1-RNA, eGFP-RNA und TRP-2-RNA (Abb. 5B). Alle anderen in dieser Arbeit eingesetzten RNA-Moleküle wurden ebenfalls im Agarosegel analysiert (Daten nicht gezeigt).

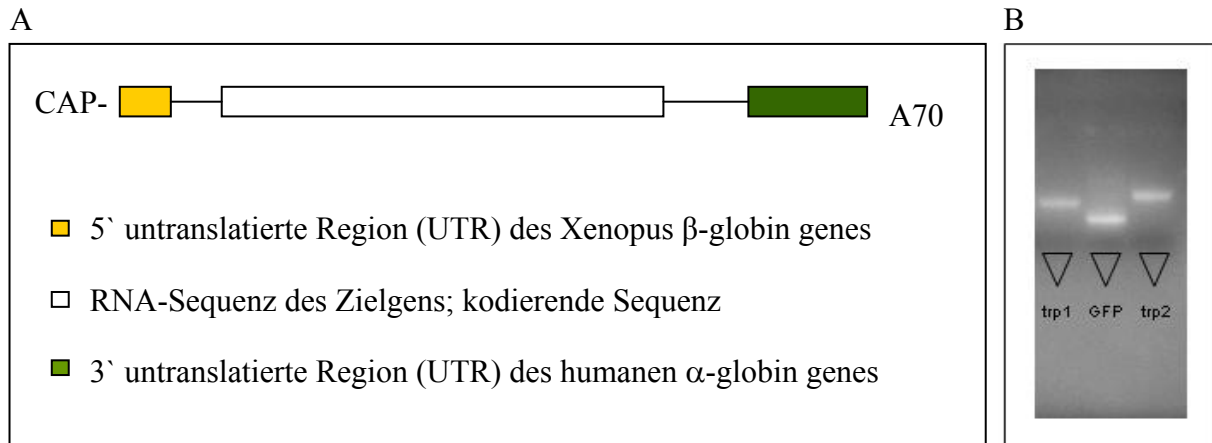


Abb. 5 : Schematische Darstellung und Gelanalyse der in vitro transkribierten RNA-Moleküle

(A) An die 5'- beziehungsweise 3'-Bereiche der kodierenden Sequenz schließen sich untranslatierte Regionen (UTR) des Xenopus β -globin und des humanen α -globin Gens an. Das 5'-Ende des Moleküls wird von einer 5'-5'-verknüpften Methylguanosisin-Kappe (CAP) gebildet, während das Molekül am 3'-Ende einen Poly-Adenin-Schwanz (A70) aufweist. (B) Analyse der RNA Moleküle. Dargestellt ist beispielhaft die Analyse von RNA kodierend für TRP-1, eGFP und TRP-2 in einem Agarosegel.

1.2. Etablierung der RNA-Elektroporation und Analyse des Einflusses verschiedener Parameter auf die Transfektions-effizienz

Die RNA Transfektion mittels Elektroporation sollte zunächst an erythroleukämischen K562 Zellen unter Austestung verschiedenster Parameter etabliert und optimiert werden. Als Modell wurde dazu die RNA des durch seine Eigen-Fluoreszenz leicht detektierbaren Green Fluorescent Protein (eGFP) verwendet, dessen Expressionskinetik mittels Durchflusszytometrie (FACS) ermittelt werden kann.

1.2.1. Die elektrische Feldstärke

Die elektrische Feldstärke E des eingesetzten Pulses ergibt sich aus dem Quotienten der Spannung V und der Fläche in cm ($E = V/\text{cm}$). Da bei der Elektroporation durch Verwendung von 4mm^2 Küvetten die Fläche immer konstant ist, können Veränderungen der Feldstärke nur durch Veränderungen der Spannung erzielt werden.

Die elektrische Feldstärke bestimmt maßgeblich die Überlebens- wie auch die Transfektionseffizienz der eingesetzten Zellen. Erreicht sie einen für die Zelle charakteristischen Grenzwert, so kommt es zu einer reversiblen Porenbildung in der Zellmembran. Diese sogenannte Durchbruchspannung ist im Wesentlichen abhängig vom Durchmesser der Zellen und der Temperatur, bei der die Elektroporation erfolgt. Generell gilt, je kleiner die Zelle desto größer die einzusetzende Feldstärke. Allerdings sinkt mit steigender Feldstärke auch die Vitalität und Transfektionseffizienz der Zellen. Somit stellt die optimale Feldstärke einen Kompromiss unter Berücksichtigung dieser beiden Effekte dar.

Ein Richtwert für die Elektroporation von K562-Zellen lag zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente bei ca. 300 V und 150 μF [van Tendeloo et al., 2001]. Die optimale Transfektionseffizienz wird jedoch in Abhängigkeit vom verwendeten Zelltyp oft erst bei sehr viel höheren Spannungen erreicht. Deshalb wurde im Folgenden der Einfluss unterschiedlicher Spannungen und, daraus resultierend, unterschiedlicher Feldstärken auf die Transfektionseffizienz bestimmt. Gleichzeitig sollte die Auswirkung der Elektroporation auf den „physiologischen Zustand“ der Zelle anhand der Oberflächenexpression von HLA-C Molekülen untersucht werden. Dementsprechend wurden K562 Zellen mit jeweils 10 μg eGFP-RNA bzw. 10 μg einer Kontroll-RNA (β -Gal-RNA) elektroporiert und die eGFP- bzw. HLA-C Expression durchflusscytometrisch bestimmt (Abb. 6).

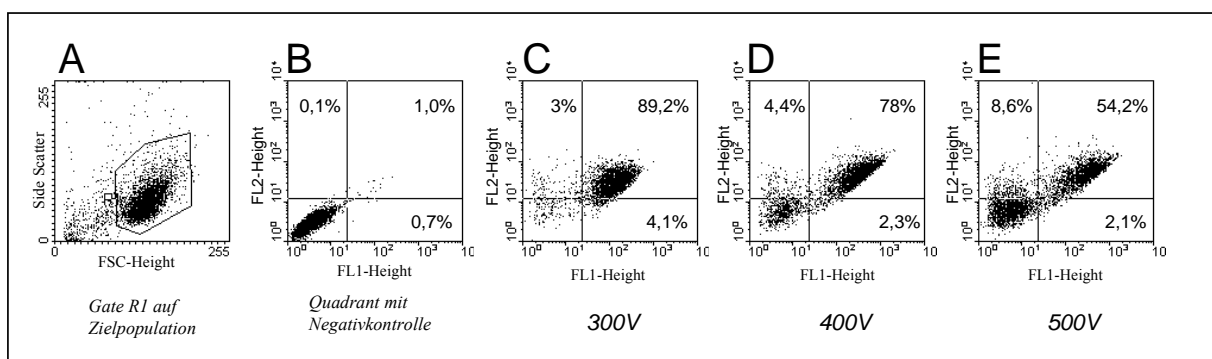


Abb. 6 : Einfluss der Feldstärke auf die Transfektionseffizienz und HLA-Klasse-C Expression von K562-Zellen.

K562-Zellen wurden mit eGFP-RNA unter Variation des Spannungsparameters bei 150 μF elektroporiert. K562 Kontrollzellen wurden mit β -Gal-RNA elektroporiert (300 V, 150 μF). Nach 18 h wurden die Zellen geerntet und zum Nachweis der HLA-C Oberflächenexpression mit einem anti-HLA-A, -B, -C mAb gefärbt. Die eGFP- und HLA-C- Expression wurde im Durchflußcytometer analysiert. (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1), um fehlerhafte Signale durch Zellbruchstücke und tote Zellen auszuschließen. (B-E) Dot-Plot Darstellung der eGFP-Fluoreszenz (FL1-Height) und HLA-C Expression (FL2-Height); (B) Elektroporation von K562 Zellen mit 10 μg β -Gal-RNA (negative Kontrolle); (C-E) Elektroporation von K562 Zellen mit 10 μg eGFP-RNA unter Variation der Spannung.

Die Ergebnisse aus Abb. 6 bestätigen die Aussage, dass mit steigender Feldstärke die Transfektionseffizienz der Zellen sinkt: bei einer Spannung von 300 V exprimieren 89 % der Zellen das eGFP, während es bei 400 V nur 78 % und bei 500 V nur noch 54 % sind. Dass dies mit einer Verschlechterung des Zustandes der K562-Zellen korreliert, kann an der zur eGFP Expression proportionalen Expression von HLA-Klasse-I Molekülen nachgewiesen werden. Während bei 300 V noch 92 % der Zellen HLA-Klasse-I exprimieren, fällt die Rate bei 400 V auf 82 % und bei 500 V auf 62 % ab. In den nachfolgenden Experimenten wurden

deshalb, sofern nicht anders beschrieben, Elektroporationsbedingungen von 300 V und 150 μ F gewählt.

1.2.2. Einfluss der RNA-Konzentration auf die Transfektionseffizienz und die Stärke der eGFP Expression

Die Transfektionseffizienz der Elektroporation kann durch die Konzentration und die Reinheit der eingesetzten RNA-Moleküle beeinflusst werden. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch der Einsatz niedrigerer eGFP-RNA Mengen zu einer hohen Transfektionsrate führen kann. Um den Einfluss der Elektroporation auf die Transfektion zu untersuchen, wurden als negative Kontrolle nicht elektroporiert bzw. ohne RNA elektroporierte K562-Zellen eingesetzt (Abb. 7).

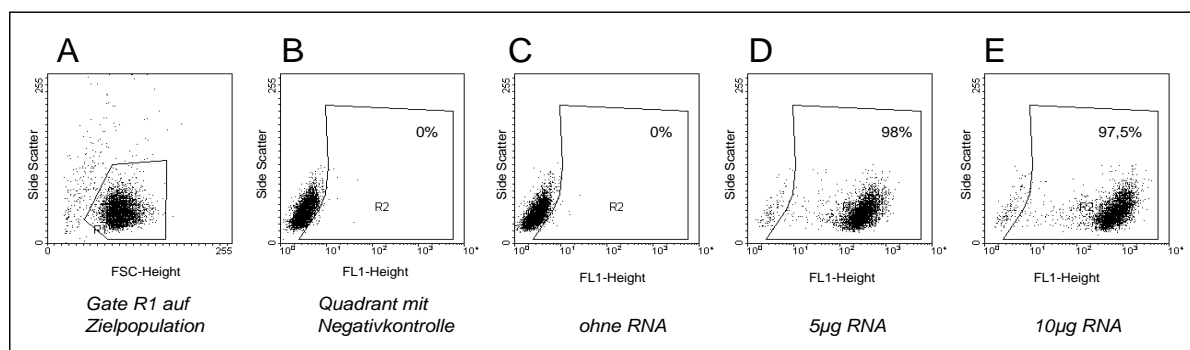


Abb. 7 : Einfluss der RNA-Konzentration auf die Transfektionseffizienz.

Die Elektroporation von K562-Zellen wurde bei 300 V und 150 μ F, unter Verwendung unterschiedlicher RNA-Konzentrationen durchgeführt. Nach 18 h wurden die Zellen in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusscytometer analysiert (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1). (B-E) Die Region R2 wurde definiert, um im Dot-Plot nicht fluoreszierende Zellen von eGFP-exprimierenden Zellen abzugrenzen. (B) unbehandelte K562-Zellen (Negativkontrolle); (C) Elektroporation von K562-Zellen in Abwesenheit von RNA (Negativkontrolle). (D, E) Elektroporation von K562-Zellen mit 5 μ g bzw. 10 μ g eGFP-RNA (FL1-Height = eGFP-Fluoreszenz). Gezeigt ist ein Versuch von Zweien mit vergleichbaren Ergebnissen.

Die Durchführung der Elektroporation hatte, wie aus Abb. 7 hervorgeht, keinen detektierbaren Einfluss auf die Größe/Granularität und die Eigenfluoreszenz der eingesetzten Zellen, was der Vergleich der nicht-elektroporierten Zellen mit den elektroporierten Zellen im Hinblick auf die Lichtstreuung (Side Scatter/ForwardScatter; Daten nicht gezeigt) und auf die im Kanal 1 gemessene grüne Fluoreszenz (FL1-Height; Abb. A, B) zeigt. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Verwendung unterschiedlicher RNA-Konzentrationen nicht zu einer Erhöhung der Transfektionseffizienz führt. Diese liegt sowohl für 5 μ g als auch für 10 μ g eingesetzter RNA bei einer maximalen Transfektionseffizienz von ca. 98 %. Im Gegensatz dazu hat die eingesetzte Konzentration an RNA einen entscheidenden Einfluss auf die Fluoreszenzintensität, d.h. auf die Stärke der eGFP Expression. Bei Verwendung von 10 μ g

RNA ist die Intensität der Fluoreszenz (FL1-Height) deutlich höher als bei der Verwendung von 5 µg RNA. Dies lässt sich durch eine größere Menge an RNA-Molekülen erklären, die während der kurzzeitigen Porenöffnung in die Zelle eindringen und somit auch exprimiert werden können. Für die nachfolgenden Experimente wurden, sofern nicht anders beschrieben, 10 µg RNA zur Elektroporation eingesetzt.

Auch andere Parameter wie die Temperatur der Zellsuspension, die Dauer und Anzahl der Feldpulse, das verwendete Elektroporationsmedium und die Zelldichte tragen zu einer erfolgreichen Elektroporation bei. Da für K562-Zellen jedoch bei Einstellungen von 300 V, 150 µF und 10 µg bereits Ergebnisse erzielt werden konnten, die eine hohe Transfektionseffizienz verbunden mit einer hohen Vitalität der Zellen bedingen, wurden diese Einstellungen als optimale Bedingungen für die Elektroporation von K562-Zellen festgesetzt und im folgenden auf andere Zellarten übertragen.

1.3. Elektroporation verschiedener Zelllinien und primärer Zellen

In der Zellkultur unterscheidet man zwischen primären Zellen und permanenten Zelllinien. Primäre Zellen werden direkt aus dem Organismus gewonnen und sind nur begrenzt kultivierbar. Permanente Zelllinien dagegen werden meist aus Tumorgewebe angelegt und können sich unbegrenzt teilen. Man spricht von immortalisierten Zellen.

1.3.1. RNA-Elektroporation von Zelllinien

Die am weitesten verbreitete Technik zur Transfektion von Zelllinien ist die Lipofektion, welche schon seit 1989 zum Einschleusen von RNA in Zelllinien verwendet wird [Malone et al., 1989]. Ein Nachteil dieser Methode liegt jedoch in der Einschränkung auf adhärente Zelllinien, da sich Suspensionszellkulturen analog zur DNA-Transfektion nur schlecht durch Lipofektion mit RNA transfizieren lassen [Flechsler et al., 1998, Keller et al., 1999]. Deshalb sollte im Folgenden die Technik der RNA-Elektroporation an verschiedenen Zelllinien und primären Zellen etabliert werden, die im Rahmen von Analysen zur Antigenpräsentation Verwendung finden.

Elektroporation von EBV-B-Zellen

Bei EBV-B-Zellen handelt es sich um primäre B-Zellen die durch das Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert und immortalisiert wurden. Sie können sowohl für die Analyse der HLA-Klasse-II Antigenpräsentation, als auch nach Transfektion für die Analyse der HLA-Klasse-I abhängigen Antigenpräsentation eingesetzt werden [Topalian et al., 1994]. Angaben in der

Literatur zu Folge konnten EBV-B-Zellen bei ca. 250 V und 960 μF erfolgreich mit DNA elektroporiert werden [Ten Bosch et al., 1999]. Diese Angaben wurden für die Elektroporation mit RNA übernommen.

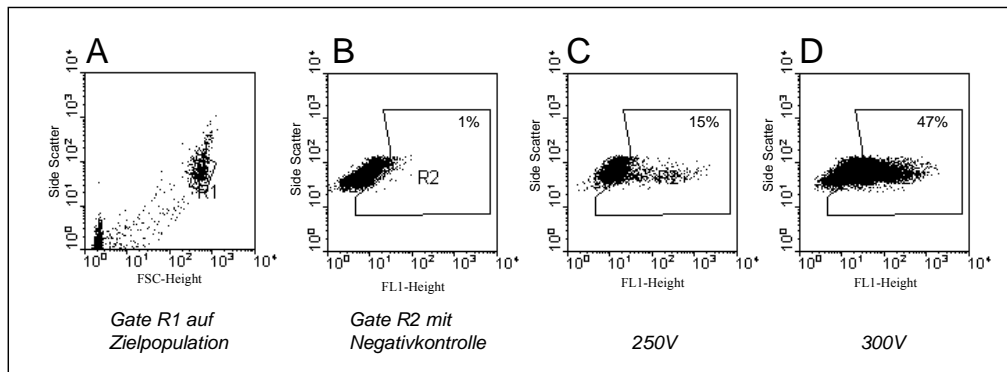


Abb. 8 :Analyse der Transfektionseffizienzen von EBV-B-Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Feldstärken.

EBV-B-Zellen wurden mit eGFP-RNA unter Variation des Spannungsparameters bei 150 μF elektroporiert. EBV-B Kontrollzellen wurden mit β -Gal-RNA elektroporiert (300 V, 150 μF). Nach 18 h wurden die Zellen in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusscytometer analysiert. (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1). (B-D) Die Region R2 wurde definiert, um im Dot-Plot nicht fluoreszierende Zellen von eGFP-exprimierenden Zellen abzugrenzen. (B) Elektroporation von EBV-B-Zellen mit β -Gal-RNA (Negativkontrolle) (C, D) Elektroporation von EBV-B-Zellen mit 10 μg eGFP-RNA unter Variation der Spannung. (FL1-Height = eGFP-Fluoreszenz). Gezeigt ist ein Versuch von Zweien mit vergleichbaren Ergebnissen.

Wie aus Abb. 8 hervorgeht wurden EBV-B-Zellen mit 10 μg eGFP-RNA durch Variationen der Spannung bei unterschiedlichen Feldstärken elektroporiert. Der Einfluss einer höheren Feldstärke lässt sich dabei in einer sichtbar erhöhten Transfektionseffizienz erkennen. Diese liegt für eine Spannung von 300 V bei 47 % und bei einer Spannung von 250 V bei 15 %. Auch hier ist die Intensität der Expression sehr unterschiedlich, was sich an der sehr heterogenen eGFP-Fluoreszenz erkennen lässt (FL1-Height). Versuche EBV-B-Zellen anderer Donoren zu elektroporieren zeigten, dass die erzielten Transfektionseffizienzen oftmals geringer waren (Daten nicht gezeigt). Hieraus lässt sich schließen, dass für jede individuelle EBV-B-Zelllinie die optimalen Elektroporationsbedingungen ausgetestet werden müssen.

Elektroporation von T2.DR4-Zellen

Bei T2-Zellen handelt es sich um eine humane Hybridzelllinie, hervorgegangen aus einer lymphoblastoiden T-Zelllinie und einer lymphoblastoiden B-Zelllinie, die keine HLA-Klasse II Moleküle aufgrund entsprechender Deletionen im Genom exprimieren kann [Salter et al., 1986]. Damit dennoch eine Antigenpräsentation auf HLA-Klasse-II Molekülen möglich ist,

wurden diese Zellen stabil mit HLA-DRB1*0401 (HLA-Klasse-II-Molekül) transfiziert. Das heißt, die Transfektante exprimiert nur ein HLA-Klasse-II Allel, sodass sie für die Analyse spezifischer CD4⁺-T-Zell-Antworten sehr geeignet ist. Prinzipiell ist aber auch eine stabile Transfektion mit anderen HLA-Molekülen möglich. Eine weitere Besonderheit dieser Zelllinie stellt eine Deletion in den Genen des Transporter associated with antigen processing (TAP) dar, wodurch die TAP abhängige interne Beladung von HLA-Klasse-I Molekülen mit Peptid verhindert wird. Folglich kann an dieser Modell-Zelllinie die TAP-Abhängigkeit der Präsentation von HLA-Klasse-I Epitopen analysiert werden kann. Die Angaben zur DNA-Elektroporation von T2-Zellen in der Literatur sind sehr unterschiedlich. So konnten die Zellen durch Groettrup et al. bei 260 V und 960 µF und durch Daumke et al. bei 270 V und 500 µF erfolgreich elektroporiert werden [Groettrup et al., 1997; Daumke et al., 2001]. In der vorliegenden Arbeit wurden für die Elektroporation von T2.DR4-Zellen die für K562-Zellen etablierten Standardbedingungen angewandt, wobei zusätzlich der Einfluss unterschiedlicher Feldstärken auf die Transfektionseffizienz untersucht wurde (Abb. 9).

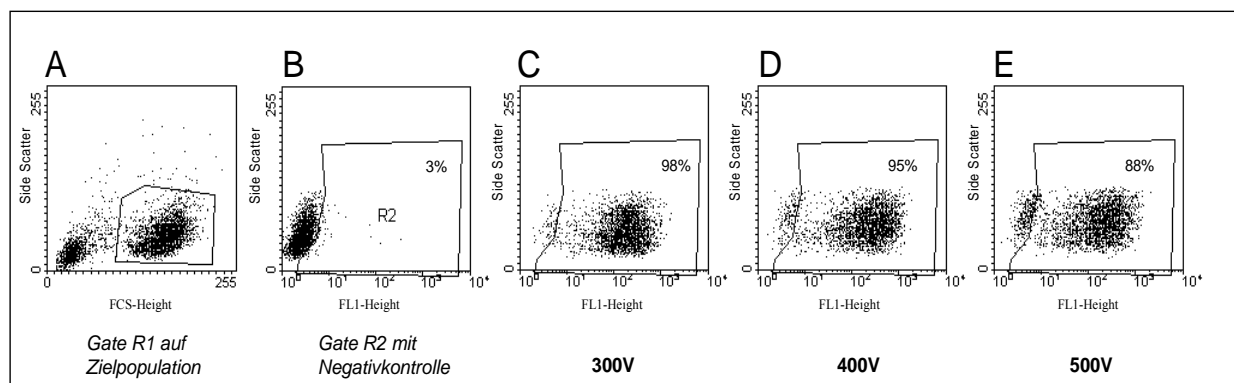


Abb. 9 : Analyse der Transfektionseffizienz von T2.DR4-Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Feldstärken.

T2.DR4-Zellen wurden mit eGFP-RNA unter Variation des Spannungsparameters bei 150 µF elektroporiert. T2.DR4-Kontrollzellen wurden mit TRP-1-RNA elektroporiert (300 V, 150 µF). Nach 18 h wurden die Zellen in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusscytometer analysiert. (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1). (B-E) Die Region R2 wurde definiert, um im Dot-Plot nicht fluoreszierende Zellen von eGFP-exprimierenden Zellen abzugrenzen. (B) Elektroporation von T2.DR4-Zellen mit TRP-1-RNA (Negativkontrolle) (C-E) Elektroporation von T2.DR4-Zellen mit 10 µg eGFP-RNA unter Variation der Spannung. (FL1-Height = eGFP-Fluoreszenz). Gezeigt ist ein Versuch von Zweien mit vergleichbaren Ergebnissen.

Wie aus Abb. 9 hervorgeht wurden T2-DR4-Zellen mit 10 µg eGFP-RNA durch Variationen der Spannung bei unterschiedlichen Feldstärken erfolgreich elektroporiert. Dabei konnten durch die eingesetzte Spannung von 300 V bzw. 400 V bis zu 96 %, bei einer Spannung von 500 V dagegen nur 88 % der Zellen transfiziert werden. Diese zwar nur geringe Abnahme der Fluoreszenz-Intensität (FL1-Height) könnte auf einen „schlechteren“ physiologischen Zustand

der Zellen zurückzuführen sein. In den nachfolgenden Experimenten wurden deshalb, wenn nicht anders beschrieben Elektroporationsbedingungen von 300 V und 150 μ F gewählt. Aufgrund der in diesen Versuchen demonstrierten hohen Transfektionseffizienz und eGFP-Expression ist davon auszugehen, dass RNA elektroporierte T2-DR4-Zellen für die Analyse verschiedener Fragestellungen der HLA-Klasse-I und -Klasse-II Antigenpräsentation sehr geeignet sind.

Elektroporation von COS-7-Zellen

Bei COS-7-Zellen handelt es sich um Nierenepithelzellen des afrikanischen Grünaffen (African Green Monkey), die mit einer Mutante des Simian Virus 40 stabil transfiziert und dadurch immortalisiert wurden [Gluzman et al., 1981]. In Untersuchungen zur Antigenpräsentation wurden COS-7-Zellen, die mit Expressionsplasmiden kodierend für ein humanes HLA-Molekül und einem Kandidatenantigen transfiziert wurden, zur Analyse der HLA-Klasse-I-abhängigen Antigenprozessierung und -präsentation eingesetzt. Angaben in der Literatur zufolge können COS-7-Zellen erfolgreich bei 290 V und 960 μ F mit DNA elektroporiert werden [Melkonyan et al., 1996]. In der vorliegenden Arbeit wurden jedoch zuerst die für K562-Zellen etablierten Bedingungen angewandt (Abb. 10).

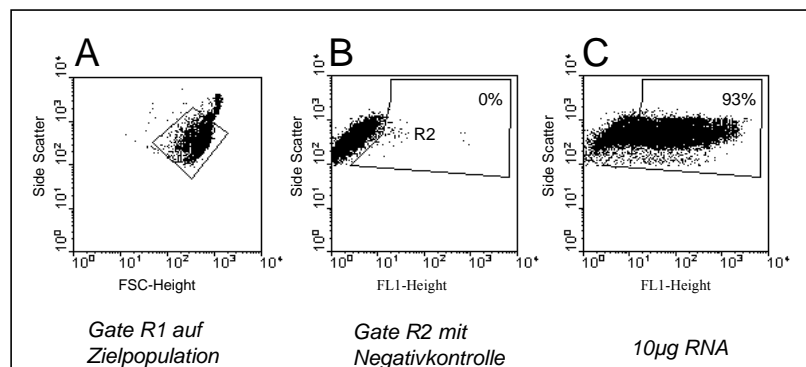


Abb. 10 : Analyse der Transfektionseffizienz von COS-7-Zellen

Die Elektroporation von COS-7-Zellen wurde bei 300 V und 150 μ F durchgeführt. Nach 18 h wurden die Zellen in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusscytometer analysiert. (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1). (B-C) Die Region R2 wurde definiert, um im Dot-Plot nicht fluoreszierende Zellen von eGFP-exprimierenden Zellen abzugrenzen. (B) Elektroporation von COS-7 Zellen mit β -Gal-RNA (Negativkontrolle) (C) Elektroporation von COS-7 Zellen mit 10 μ g eGFP-RNA (FL1-Height = eGFP-Fluoreszenz). Gezeigt ist ein Versuch von Zweien mit vergleichbaren Ergebnissen.

Basierend auf den gewählten Elektroporationsbedingungen lassen sich für COS-7-Zellen Transfektionseffizienzen von bis zu 93 % erzielen. Dabei ist die eGFP-Expressionsstärke sehr unterschiedlich was sich an der heterogenen Fluoreszenz-Intensität erkennen lässt (FL1-Height). Aufgrund der hohen Transfektionsrate und der effizienten Expression RNA-kodierender

Proteine ist anzunehmen, dass auch RNA elektroporierte COS-7-Zellen zur Analyse der Antigenpräsentation sehr geeignet sind.

1.3.2. RNA-Elektroporation primärer Zellen

Bisher konnte ein effizienter DNA-Genstransfer in Primärzellen nur mit Hilfe von rekombinanten Viren erzielt werden, deren Anwendung allerdings große Sicherheitsrisiken birgt [Gust et al., 2004]. Die gängigen nicht-viralen Methoden waren für den DNA-Genstransfer in Primärzellen nicht geeignet, da sie, um erfolgreich angewandt werden zu können, eine häufig stattfindende Zellteilung erfordern. Da sich primäre Zellen in der Regel jedoch nur sehr langsam oder überhaupt nicht teilen, konnten nur in wenigen Fällen ausreichende Transfektionseffizienzen erzielt werden [Gresch et al., 2004; Elmadbouh et al., 2004]. Im Gegensatz dazu ist eine hohe Zellteilungsrate keine Voraussetzung für eine effiziente Elektroporation mit RNA, da die RNA nur das Zytoplasma erreichen muss, um dort in Protein translatiert zu werden. Aus diesem Grund sollte die Methode der RNA Elektroporation im Folgenden für verschiedene primäre Zellen etabliert werden, die wiederum von besonderem Interesse im Rahmen der Analysen zur Antigenpräsentation sind.

Elektroporation CD40L-aktivierter B-Zellen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten B-Zellen handelt es sich um CD40L-aktivierte B-Zellen [Schultze et al., 2004]. In der Literatur konnten B-Zell-Lymphom-Linien unter Verwendung eines BioRad Elektroporators mit DNA bei 240 V und 960 μF erfolgreich elektroporiert werden [Pai et al., 2002]. Im Folgenden sollten diese Parameter auf die Elektroporation mit RNA übertragen werden.

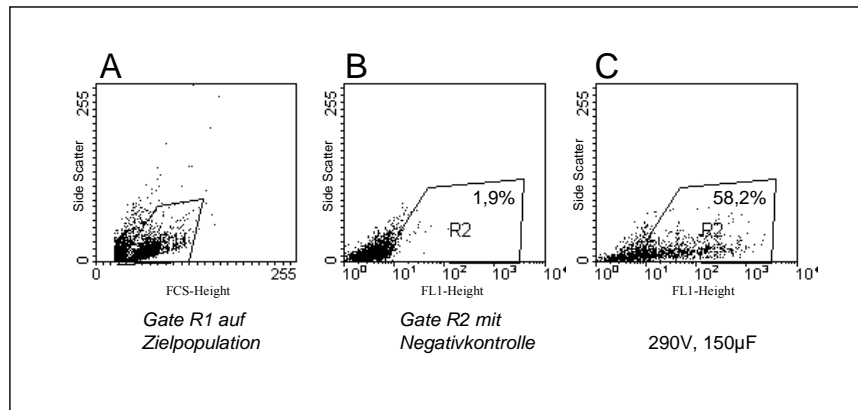


Abb. 11 : Analyse der Transfektionseffizienzen von CD40L-aktivierten B-Zellen

Die Elektroporation von CD40L-aktivierten B-Zellen wurde bei 290 V und 950 μF durchgeführt. Nach 18 h wurden die Zellen in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusscytometer analysiert. (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1). (B, C) Die Region R2 wurde definiert, um im Dot-Plot nicht fluoreszierende Zellen von eGFP-exprimierenden Zellen abzugrenzen. (B) unbehandelte CD40L-aktivierte B-Zellen (Negativkontrolle). (C) Elektroporation von CD40L-aktivierten B-Zellen mit 10 μg eGFP-RNA (FL1-Height = eGFP-Fluoreszenz). Der dargestellte Versuch wurde einmal durchgeführt.

Aus Abb. 11 geht hervor, dass sich ca. 22 % der CD40L-aktivierten B-Zellen mit eGFP transfizieren lassen. Allerdings exprimieren auch hier nicht alle Zellen gleiche Mengen an eGFP, was an der unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensität (FL1-Height) der Zellen zu erkennen ist. Für die Elektroporation von EBV-B-Zellen konnte gezeigt werden, dass mit steigender Feldstärke auch die Transfektionseffizienz zunimmt (1.3.1.). Dass dies auch für CD40L-aktivierte-B-Zellen gelten könnte wäre vorstellbar, sollte aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden, da mit diesem Versuch nur überprüft werden sollte, ob eine Elektroporation dieser Zellen prinzipiell möglich ist.

1.4. RNA-Elektroporation von Dendritischen Zellen

Die erste Veröffentlichung in denen DC durch Elektroporation mit RNA transfiziert wurden stammen von Van Tendeloo et al. und beschreiben die erfolgreiche Elektroporation von DC bei 300 V und 150 μF unter Verwendung eines Easyject Plus Elektroporators (EquiBio). Bei

vergleichenden Experimenten zwischen unreifen und reifen DC wurde für reife DC eine herabgesetzte Transfektionseffizienz beobachtet [Van Tendeloo et al., 2001].

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die RNA-Elektroporation von unreifen DC etabliert werden. Zur Generierung wurden Monozyten des peripheren Blutes gesunder Donoren über einen Adhärenzschritt auf Plastik angereichert, und dann mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF im Verlauf von 5-6 Tagen zu unreifen DC differenziert. Diese wurden bei 300 V und 150 μ F mit eGFP-RNA elektroporiert, für weitere 18 h inkubiert und anschließend in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusszytometer analysiert. Im Folgenden sollten verschiedene Faktoren untersucht werden, die Einfluss auf die RNA-Elektroporation von DC haben könnten.

1.4.1. Analyse des Einflusses der Zelldichte auf die Elektroporationseffizienz

In den vorangegangenen Experimenten wurden für jede Elektroporation 2×10^6 Zellen eingesetzt. Da jedoch bei hohen Zelldichten homogene Feldbedingungen oft nicht mehr gewährleistet werden können d.h. die Zellen dem elektrischen Feld nicht mehr gleichmäßig ausgesetzt sind, sollte nachfolgend untersucht werden, ob eine Elektroporation der DC bei hoher Dichte zu anderen Transfektionsraten führt als die Elektroporation einer verdünnten Suspension.

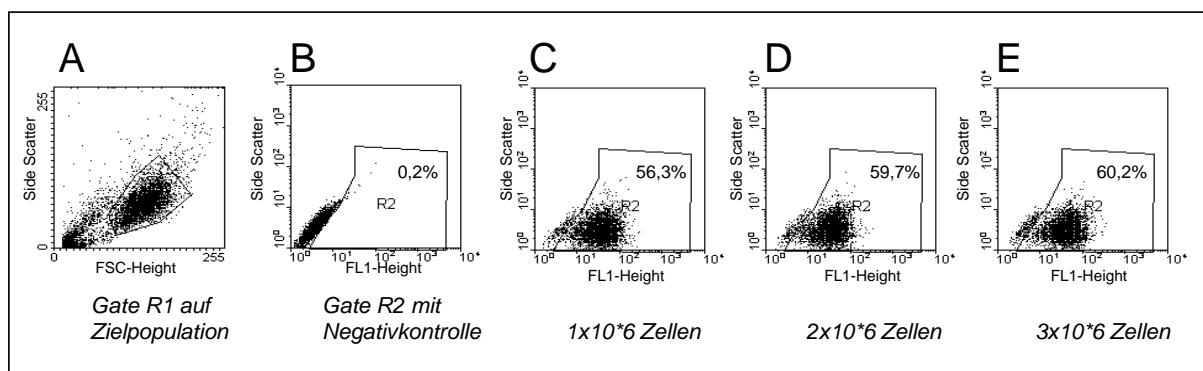


Abb. 12 : Analyse des Einflusses unterschiedlicher Zelldichten auf die Transfektionseffizienzen von DC

Die Elektroporation wurde durchgeführt wie im „Material und Methoden-Teil“ beschrieben, jedoch bei unterschiedlichen Zelldichten: (A) mit pp65-RNA elektroporierte DC dienen als Negativkontrolle. Um vorhandene Zellbruchstücke auszuschließen wurde das Gate R1 auf die Zielpopulation gesetzt. (B) Die Abbildung zeigt dieselben Zellen wie in (A) und bezieht sich auf das dort gesetzte Gate R1. Gate R2 wurde gesetzt um die negativen Bereiche zu definieren. (C-E) Die DC wurden mit eGFP-RNA elektroporiert wobei Zelldichten von 1×10^6 (C), 2×10^6 (D) und 3×10^6 (E) gewählt wurden. 18 h nach Elektroporation werden die Zellen mittels Durchflusszytometrie im Hinblick auf die Expression von eGFP analysiert. (FL1-Height = eGFP-Fluoreszenz).

Die unterschiedlich eingesetzten Zelldichten bewirken, wie aus Abb. 12 hervorgeht, keine wesentliche Änderung in der Transfektionseffizienz, welche zwischen 56-60 % liegt. Dies ist

von Vorteil für alle weiteren Versuche da nicht von jedem Donor große Mengen an DC zur Verfügung stehen. Zur Standardisierung des Protokolls wurden in den nachfolgenden Experimenten, sofern nicht anders erwähnt, 2×10^6 Zellen zur Elektroporation eingesetzt.

1.4.2. Analyse des Einflusses der Feldstärke auf die Elektroporationseffizienz

Wie bereits für K562-Zellen soll nun auch für DC der Einfluss unterschiedlicher Spannungen und daraus resultierender unterschiedlicher Feldstärken auf die Elektroporationseffizienz untersucht werden.

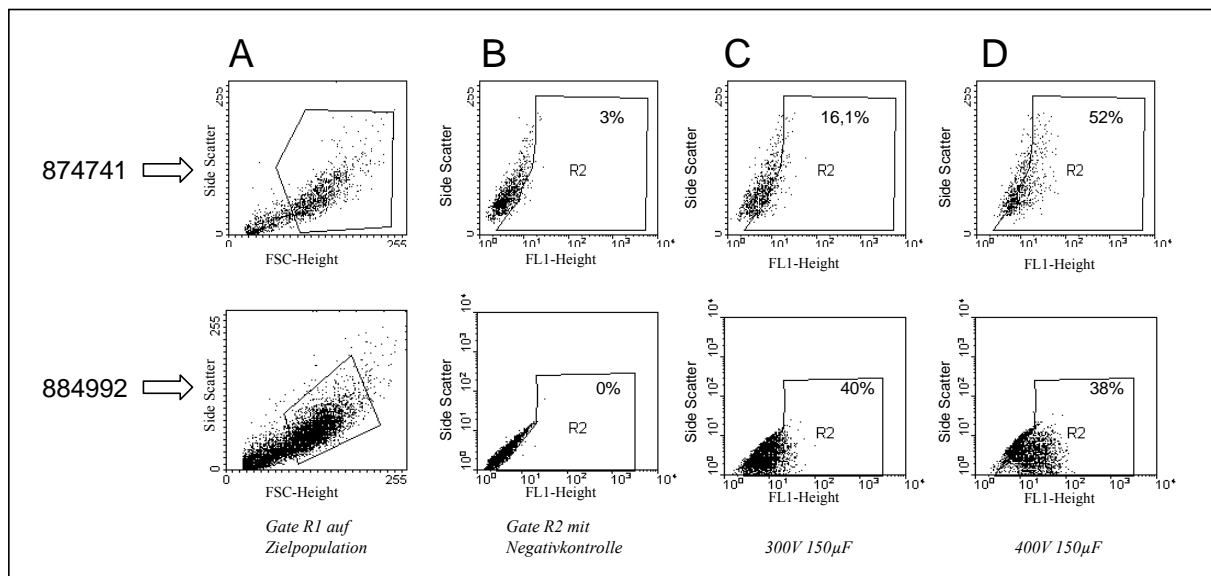


Abb. 13 : Analyse des Einflusses unterschiedlicher Feldstärken auf die Transfektionseffizienzen von DC.

DC wurden mit eGFP-RNA unter Variation des Spannungsparameters bei $150 \mu\text{F}$ elektroporiert. DC Kontrollzellen wurden mit pp65-RNA elektroporiert (300 V , $150 \mu\text{F}$). Nach 18 h wurden die Zellen in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusscytometer analysiert. (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1). (B-D) Die Region R2 wurde definiert, um im Dot-Plot nicht fluoreszierende Zellen von eGFP-exprimierenden Zellen abzugrenzen. (B) Elektroporation von DC mit pp65-RNA (Negativkontrolle). (C, D) Elektroporation von DC mit $10 \mu\text{g}$ eGFP-RNA unter Variation der Spannung. (FL1-Height = eGFP-Fluoreszenz). Gezeigt sind die Ergebnisse der Elektroporation der DC der Donoren 874741 (oben) und 884992 (unten).

Aus Abb. 13 geht hervor, dass die Transfektionseffizienz des Donors 884992 bei 300 V und 400 V vergleichbar ist, das jedoch bei 400 V eine deutlich höhere Fluoreszenz-Intensität (FL1-Height) detektiert werden kann. Bei Donor 874741 liegen sowohl die Transfektionseffizienz als auch die Fluoreszenz-Intensität bei 400 V und $150 \mu\text{F}$ höher als bei 300 V und $150 \mu\text{F}$. Damit liegen die besten Einstellungen für die Elektroporation von DC nicht wie in der Literatur beschrieben bei 300 V und $150 \mu\text{F}$, sondern bei etwas höheren Spannungen von 400 V und $150 \mu\text{F}$. Ursache dafür können unterschiedliche Versuchsbedingungen sein, die sich aus verwendetem Medium, der Temperatur, eingesetztem

Elektroporator, Reifungsgrad der Zellen, Zelldichte und weiteren Komponenten zusammensetzen. Vieles hängt auch von der Qualität der DC Kultur ab, welche sich über die Expression spezifischer Oberflächenflächenmarker, die Sekretion spezifischer Zytokine, oder wie in dieser Arbeit hauptsächlich praktiziert, über die Analyse im Lichtmikroskop definiert.

1.4.3. Veränderungen im DC Generierungsprotokoll beeinflussen die Effizienz der RNA Transfektion

Die Qualität einer DC Kultur wird entscheidend durch eine Reihe verschiedener Faktoren beeinflusst. Beispielsweise führen unterschiedliche Methoden bei der Gewinnung humaner Monozyten zu unterschiedlichen Zytokin-Expressionsmustern [Elkord et al., 2005]. Bei der Generierung von DC aus Monozyten bewirkt die Zugabe unterschiedlicher Zytokine eine Veränderung des Phänotyps und der Funktion der DC [Zou et al., 2002].

Dass auch die Wahl des Mediums einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der DC und damit auf die Effizienz der RNA-Elektroporation haben kann, wurde im Folgenden gezeigt. Die Generierung der DC aus den Monocyten eines Donors erfolgte dazu parallel unter Verwendung zweier unterschiedlicher serumfreier Medien. Beide DC Kulturen wurden dann mit RNA elektroporiert.

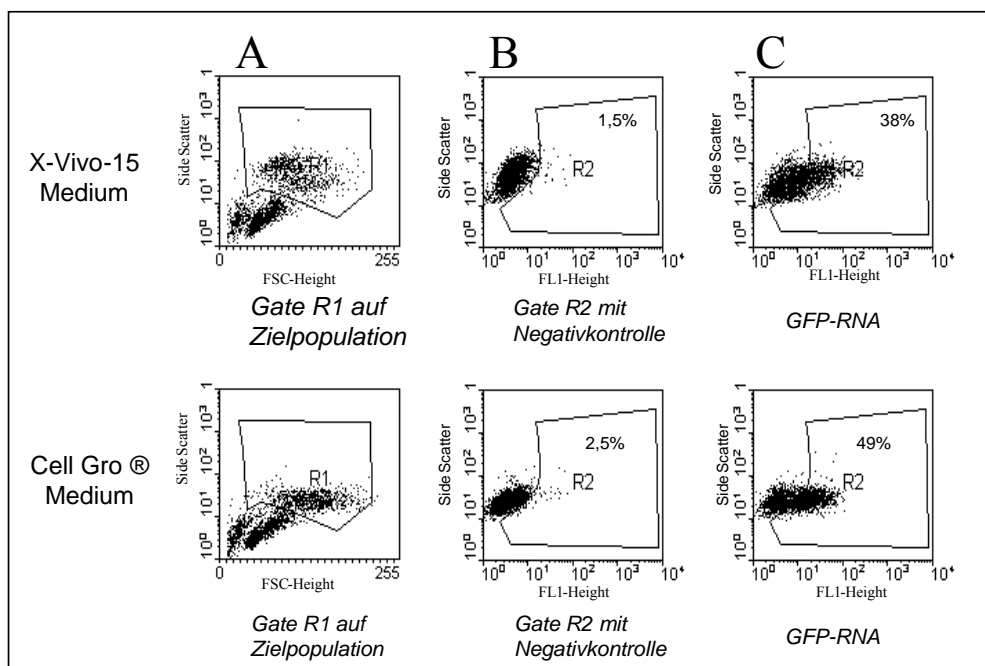


Abb. 14 : Analyse des Einflusses verschiedener Zellkultur-Medien auf die Transfektionseffizienzen der DC

Die Elektroporation von DC wurde bei 400 V und 150 μ F durchgeführt. Nach 18 h wurden die Zellen in Bezug auf ihre eGFP-Expression im Durchflusscytometer analysiert. Ein Vergleich des Einflusses der Zell-Kultur-Medien X-Vivo-15 (obere Reihe) und Cell-Gro® (untere Reihe) wurde durchgeführt. (A) Basierend auf der Lichtstreuung (Forward Scatter/Side Scatter) erfolgte die Eingrenzung der zu analysierenden Zellpopulation (R1). (B-C) Die Region R2 wurde definiert, um im Dot-Plot nicht fluoreszierende Zellen von eGFP-exprimierenden Zellen abzugrenzen. (B) Elektroporation von DC mit pp65-RNA (Negativkontrolle). (C) Elektroporation von DC mit 10 μ g eGFP-RNA (FL1-Height = eGFP Fluoreszenz). Gezeigt ist ein Versuch von Zweien mit vergleichbaren Ergebnissen.

Der Einfluss der beiden Medien, die zur Generierung der DC verwendet wurden, spiegelt sich in unterschiedlichen Transfektionseffizienzen wieder. DC desselben Donors, die in Cell-Gro® Medium generiert wurden, weisen eine Transfektionseffizienz von 46,5 % auf, für DC, die in X-Vivo-15 Medium inkubiert wurden, konnten dagegen nur Effizienzen von 36,5 % erzielt werden (Abb. 14). Auch im Hinblick auf die Granularität der Zellen lässt sich anhand des Seitwärtsstreulichtes (Side Scatter) ein Unterschied der Zell-Populationen erkennen. Das Seitwärtsstreulicht hängt neben der Größe auch sehr stark von dem Zustand einer Zelle ab. Wie aus Abb. 14 hervorgeht erzeugen die in X-Vivo-15 Medium generierten DC ein stärkeres Seitwärtsstreulicht, als die in Cell-Gro® Medium kultivierten Zellen, was auf unterschiedliche intrazelluläre Strukturen innerhalb der Zelle hinweisen könnte. Aufgrund der höheren erzielten Transfektionseffizienz wird in den folgenden Versuchen für die Generierung DC Cell-Gro® Medium verwendet.

Die vorangehenden Untersuchungen zeigten, dass DC sehr effizient mit RNA elektroporiert werden konnten, so dass nachfolgend die T-Zellstimulatorischen Eigenschaften der RNA-Transfektanten analysiert werden sollten.

1.5. Stimulation von in vivo aktivierten anti-viralen Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen mittels RNA elektroporierter DC

DC als professionelle antigenpräsentierende Zellen sind durch ihre Fähigkeit spezifische T-Zell-Antworten zu induzieren die entscheidenden Modulatoren der Immunantwort. In den nachfolgenden Experimenten sollten nun die stimulatorischen Eigenschaften RNA elektroporierter DC anhand der Aktivierung anti-viraler T-Zellen spezifisch für das humane Cytomegalie Virus (hCMV) untersucht werden. Die Infektion mit dem hCMV induziert eine starke zelluläre Immunantwort und führt zur Bildung von spezifischen anti-viralen Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen [Lanzavecchia und Sallusto, 2005; Harari et al., 2004; Villacres et al., 2004]. Vor allem gegen das virale Matrix Protein pp65 konnten starke T-Zell-Antworten nachgewiesen werden, die im Falle HLA-A2 positiver Donoren gegen ein immundominantes Epitop gerichtet sind, welches 1994 von McLaughin-Taylor et al. identifiziert werden konnte (pp65₄₉₅₋₅₀₃ NLVPMVATV) [McLaughin-Taylor et al., 1994; Wills et al., 1996].

1.5.1. Stimulation pp65-spezifischer T-Lymphozyten durch mRNA elektroporierte DC

Gegen das von McLaughin-Taylor identifiziert Epitop pp65₄₉₅₋₅₀₃ können in vitro, durch Stimulation mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid beladenen APC spezifische T-Zelllinien generiert werden [Foster et al., 2004]. Um solche Zelllinien anzulegen, wurden in der vorliegenden Arbeit PBMC aus dem peripheren Blut HLA-A2-positiver, hCMV-infizierter Donoren für 14 Tage mit dem immundominanten Peptidepitop pp65₄₉₅₋₅₀₃ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die T-Zellen dann auf ihre Peptid-spezifische Reaktivität hin im ELISpot analysiert. Die ELISpot Methode erlaubt die Quantifizierung INF- γ -freisetzender Antigen-spezifischer Zellen mittels automatischer Bildanalyse.

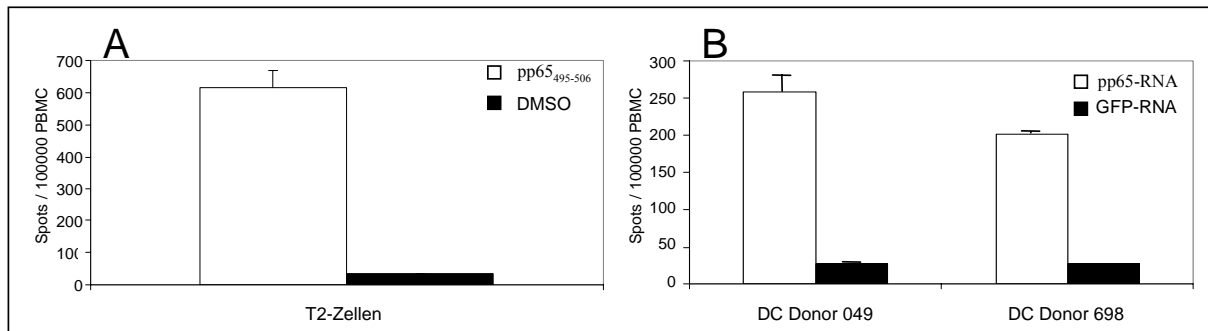


Abb. 15 : Analyse der T Zell-stimulatorischen Eigenschaften von pp65-RNA elektroporierten DC

Zur Generierung pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer T-Zelllinien wurden PBMC aus HLA-A2⁺, hCVM⁺ Donoren mit 10 µg pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid/ml für 14 Tage unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) inkubiert. Mittels ELISpot wurde die Spezifität der T-Zelllinien bestimmt (A), die dann wiederum zur Analyse des stimulatorischen Potentials pp65-RNA elektroporierter DC eingesetzt wurden (B). A: Zur Analyse ihrer Spezifität wurden die T-Zellen mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid (10 µg/µl)-beladenen bzw. unbeladenen (DMSO) T2-Stimulatorzellen koinkubiert. (B): pp65-spezifische T-Zellen wurden mit pp65-RNA elektroporierten DC bzw. mit eGFP-RNA elektroporierten DC zweier verschiedener Donoren inkubiert und die Zahl der IFN-γ sezernierenden Zellen wurde im ELISpot quantifiziert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus Einzelwerten. Die Standardabweichung wurde nach $\sqrt{(x - \bar{x})^2 / n - 1}$ berechnet.

Aus Abb. 15A geht hervor, dass durch die mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid-beladenen T2-Zellen ca. 600 spezifische T-Zellen aktiviert werden konnten, was einer Zahl von 0,6 % entspricht. Die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen wurden anschließend verwendet, um die stimulatorischen Eigenschaften von DC, die mit pp65-RNA elektroporiert wurden, im ELISpot zu analysieren. Dazu wurden die T-Zellen über Nacht mit pp65-RNA elektroporierten DC koinkubiert und die Freisetzung von IFN-γ bestimmt. Parallel dazu erfolgte eine Koinkubation mit eGFP-RNA elektroporierten DC. Wie in Abb. 15B dargestellt, sind pp65-RNA elektroporierte DC, im Gegensatz zu eGFP-RNA elektroporierten DC, in der Lage pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen zu stimulieren und demnach das Protein pp65 zu synthetisieren, zu prozessieren und das Epitop pp65₄₉₅₋₅₀₃ gebunden an HLA-A2 Moleküle zu präsentieren. Folglich verursacht die Durchführung der Elektroporation keinen Defekt in der Antigenpräsentation. Die Frequenz IFN-γ sezernierender pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer T-Zellen nach Koinkubation mit pp65-RNA elektroporierten DC liegt zwischen 0,2-0,25 % und ist somit deutlich niedriger als die Frequenz nach Koinkubation mit Peptid-beladenen T2 Zellen. Ursache hierfür könnte eine geringere Dichte pp65₄₉₅₋₅₀₃-präsentierender HLA-A2 Moleküle auf der Oberfläche der DC sein. Demnach kann die Aussage getroffen werden, dass elektroporierte DC in der Lage sind aktivierte anti-virale Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen zu stimulieren und zur Sekretion von IFN-γ anzuregen.

1.5.2. Stimulation pp65-spezifischer T-Lymphozyten durch mRNA elektroporierte DC in Abhängigkeit der Zeit

Nach Elektroporation von DC mit RNA sind die Zellen in der Lage das Antigen zu exprimieren, zu prozessieren und daraus resultierende Peptide auf der Oberfläche den T-Zellen zu präsentieren. Wie lange die DC jedoch ein Protein exprimieren, sowie ein daraus resultierendes Peptid präsentieren können, hängt von unterschiedlichen Parametern ab. Beispielsweise spielt die Stabilität des Proteins [Thai et al., 2004], aber auch der Reifungsgrad der DC [Zehn et al., 2004], oder die Sequenz des präsentierten Peptids [Vertuani et al., 2004] eine wichtige Rolle. Im Folgenden sollten deshalb DC mit pp65- sowie eGFP-RNA elektroporiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Elektroporation mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen inkubiert. Die Fähigkeit der DC die T-Zellen zur IFN- γ Sekretion zu stimulieren wurde im ELISA überprüft.

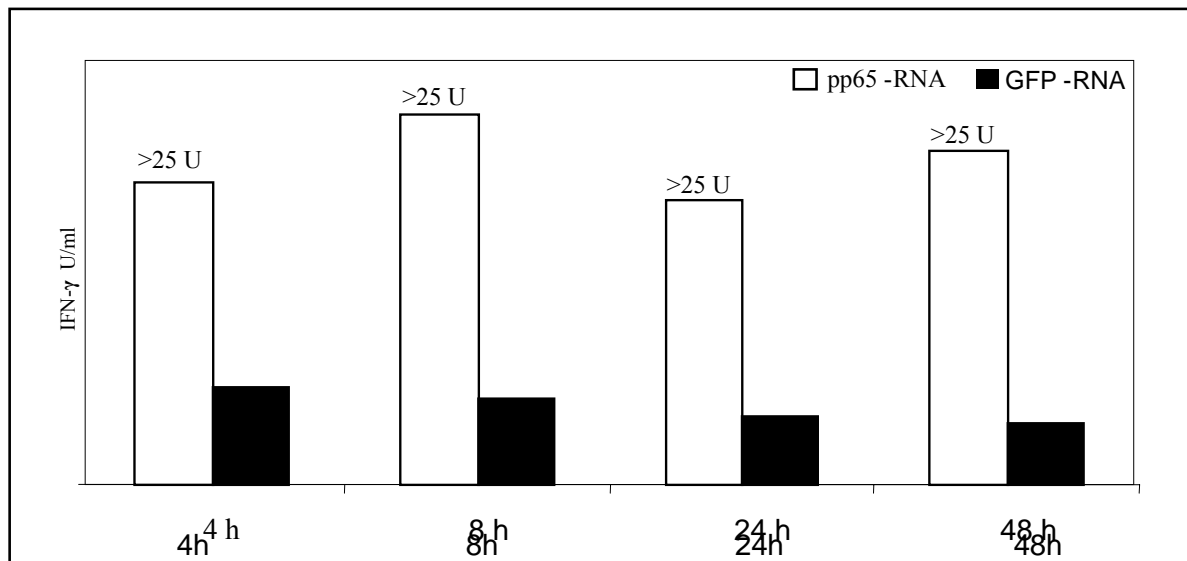


Abb. 16 : Analyse der stimulatorischen Eigenschaften von pp65-RNA elektroporierten DC in Abhängigkeit von der Zeit

Zur Generierung einer pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zelllinie wurden PBMC des HLA-A2⁺, hCVM⁺ Donors 510002 mit 10 µg pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid/ml für 14 Tage unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) inkubiert. Zur Analyse der stimulatorischen Eigenschaften von pp65-RNA elektroporierten DC in Abhängigkeit von der Zeit, wurden die T-Zellen mit pp65-RNA- bzw. eGFP-RNA elektroporierten DC des Donors 602314 zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Elektroporation koinkubiert (4 h, 8 h, 24 h und 48 h) und der Überstand auf IFN-γ im ELISA untersucht. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren ein-well-Bestimmungen. Der Versuch wurde einmal mit zwei verschiedenen T-Zelllinien und zwei verschiedenen DC Donoren durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen vergleichbare Resultate.

Pp65-RNA elektroporierte DC sind in der Lage, pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Elektroporation zur IFN-γ Sekretion zu stimulieren (Abb. 16). So sind DC bereits vier Stunden nach Elektroporation in der Lage die pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen effizient zu stimulieren, ebenso wie nach 48 h. Im Vergleich dazu beläuft sich die Menge an IFN-γ nach Stimulation mit eGFP-RNA elektroporierten DC auf einen gleichbleibenden niedrigen Hintergrundwert. Es ist demnach anzunehmen, dass die stimulatorische Kapazität der DC auch nach 48 h noch ausreichend hoch ist, um pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen zur Sekretion von IFN- γ zu stimulieren.

1.5.3. Stimulation spezifischer T-Lymphozyten mit pp65-mRNA elektroporierten DC

In Abschnitt 1.5.1. konnte gezeigt werden dass pp65-RNA elektroporierte DC in der Lage sind eine pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zelllinie zu stimulieren. Ob sie aber auch in der Lage sind anti-virale Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen ex vivo zu stimulieren, sollte in folgendem Experiment untersucht werden. Dazu wurden DC aus den Monozyten des Blutes HLA-A2-positiver, CMV-positiver Donoren generiert, die an Tag 6 des Generierungsprotokolls mit pp65-RNA bzw. eGFP-RNA elektroporiert, für 24 h inkubiert und anschließend zur Stimulation autologer

PBMC eingesetzt wurden. In einem weiteren Kontrollansatz wurden PBMC derselben Donoren, wie im vorangehenden Kapitel beschrieben, mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid inkubiert. Nach 14 tägiger Inkubation wurden die T-Zellen der einzelnen Ansätze in Bezug auf ihre Spezifität im ELISpot analysiert.

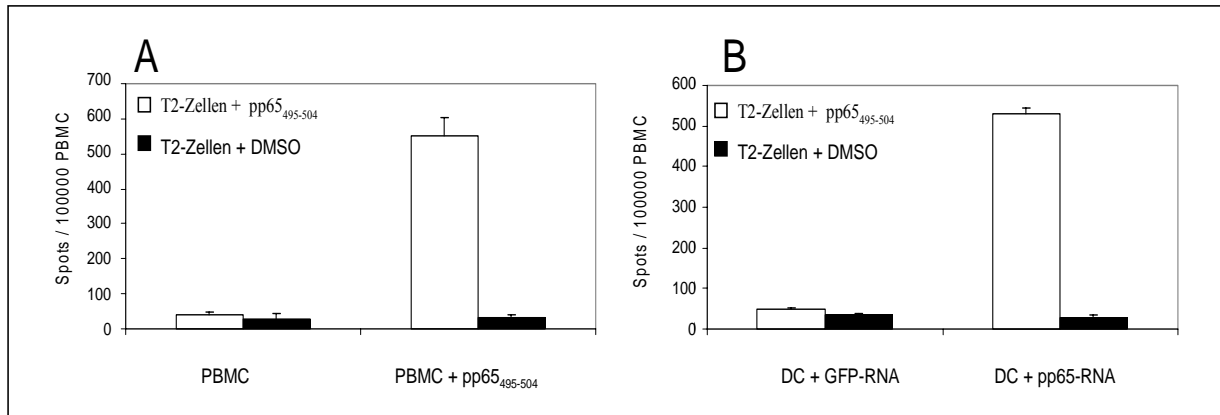


Abb. 17 : Ex vivo Aktivierung pp65-spezifischer T Zellen durch RNA elektroporierte DC

Zur Generierung pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer T-Zelllinien wurden (A) PBMC von HLA-A2⁺, hCVM⁺ Donoren ohne Peptid sowie mit 10 µg pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid/ml unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) für 14 Tage inkubiert. (B) Unreife DC von HLA-A2⁺, hCVM⁺ Donoren mit pp65-RNA bzw. mit eGFP-RNA elektroporiert, für 24 h mit Reifungszytokinen inkubiert und anschließend unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) für 14 Tage mit autologen PBMC inkubiert. Mittels ELISpot wurde die Spezifität der T-Zelllinien bestimmt. (A, B) Zur Analyse ihrer Spezifität wurden die T-Zellen mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid (10 µg/µl)-beladenen bzw. unbeladenen (DMSO) T2-Stimulatorzellen koinkubiert und die Zahl der IFN-γ sezernierenden Zellen wurde im ELISpot quantifiziert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert einer 4-Fachbestimmung. Die Standardabweichung wurde nach $\sqrt{(x - \bar{x})^2 / n - 1}$ berechnet.

In Abbildung Abb. 17A ist zu sehen, dass die Inkubation von PBMC mit pp65₄₉₅₋₅₀₃ Peptid in Gegenwart der Zytokine IL-2 und IL-7 zur Proliferation pp65-spezifischer T-Lymphozyten führt, wohingegen die Inkubation von PBMC mit Zytokinen in Abwesenheit des Peptids keine Aktivierung bewirkt. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Aktivierung der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Lymphozyten auf eine unspezifische Wirkung der Zytokine zurückzuführen ist. Die in Abb. 17b durch Einsatz pp65-RNA elektroporierter DC erhaltenen T-Zell-Antworten können folglich auf eine spezifische Aktivierung von pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Lymphozyten zurückgeführt werden, zumal die mit eGFP-RNA elektroporierten DC keine Aktivierung von T-Zellen hervorrufen. Somit sind die in dieser Arbeit verwendeten RNA elektroporierten DC in der Lage anti-virale Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen spezifisch und effektiv zu aktivieren.

1.6. Elektroporation mit mRNA kodierend für Tumor assoziierte Antigene

Die theoretische und experimentelle Immunologie hat gezeigt, dass sich Tumorzellen von normalen Körperzellen nicht nur funktionell, sondern auch phänotypisch unterscheiden, z.B. durch die Expression Tumor assoziierter Antigene. Gegen diese konnten, wie unter anderem für das MM gezeigt, in einer großen Zahl von Patienten zirkulierende tumor-reaktive zytotoxische T-Lymphozyten nachgewiesen werden [Valmori et al., 2002; D'Souza et al., 1998]. Die in vitro Kultivierung dieser Zellen führt zur Proliferation und Sekretion von IFN- γ , unter der Voraussetzung, dass die Zellen einen entsprechenden spezifischen Stimulus erhalten. Auch aus dem Blut gesunder Donoren können tumor-antigen-reaktive zytotoxische T-Lymphozyten, nach mehrfacher Stimulation von PBMC mit Tumorantigen- bzw. Peptid-beladenen APC, generiert werden [Paschen et al., 2004; Sun et al., 2000].

Da in Abschnitt 1.5. gezeigt werden konnte, dass RNA elektroporierte DC in der Lage sind anti-virale T-Zellen zu stimulieren, sollte im Folgenden untersucht werden, ob APC, die Tumorantigene nach RNA-Elektroporation exprimieren, ebenfalls in der Lage sind tumor-antigen-reaktive T-Lymphozyten effizient zu aktivieren. Die Wahl der Zielantigene fiel dabei auf die Melanom-assoziierten Differenzierungsantigene Melan-A, TRP-1 und TRP-2, welche bereits als Zielstrukturen einer Antigen-spezifischen T-Zellantwort identifiziert werden konnten [Pittet et al., 1999; Touloukian et al., 2002; Sun et al., 2000].

1.6.1. Überprüfung der Funktionalität der verwendeten Tumor-Antigen RNA

Ausgehend von Expressionsplasmiden der Antigene Melan-A, TRP-1 und TRP-2 wurden durch die Firma CureVac[®] entsprechende Plasmide hergestellt, welche für die in vitro Transkription der Antigen-kodierenden RNA verwendet wurden (1.1.). Die daraus resultierenden RNA-Moleküle wurden auf ihre Funktionalität hin untersucht, wobei zunächst überprüft werden sollte, ob RNA elektroporierte Zellen die betreffenden Antigene synthetisieren. Dazu wurden K562-Zellen mit Melan-A-RNA, sowie mit TRP-1-RNA elektroporiert und anschließend immunzytologisch analysiert. Entsprechende Untersuchungen konnten für TRP-2-RNA nicht durchgeführt werden, da ein spezifischer Antikörper nicht erhältlich war. Hierfür wurde deshalb nur eine Analyse mittels Gel-Elektrophorese angewandt (2.12.4.).

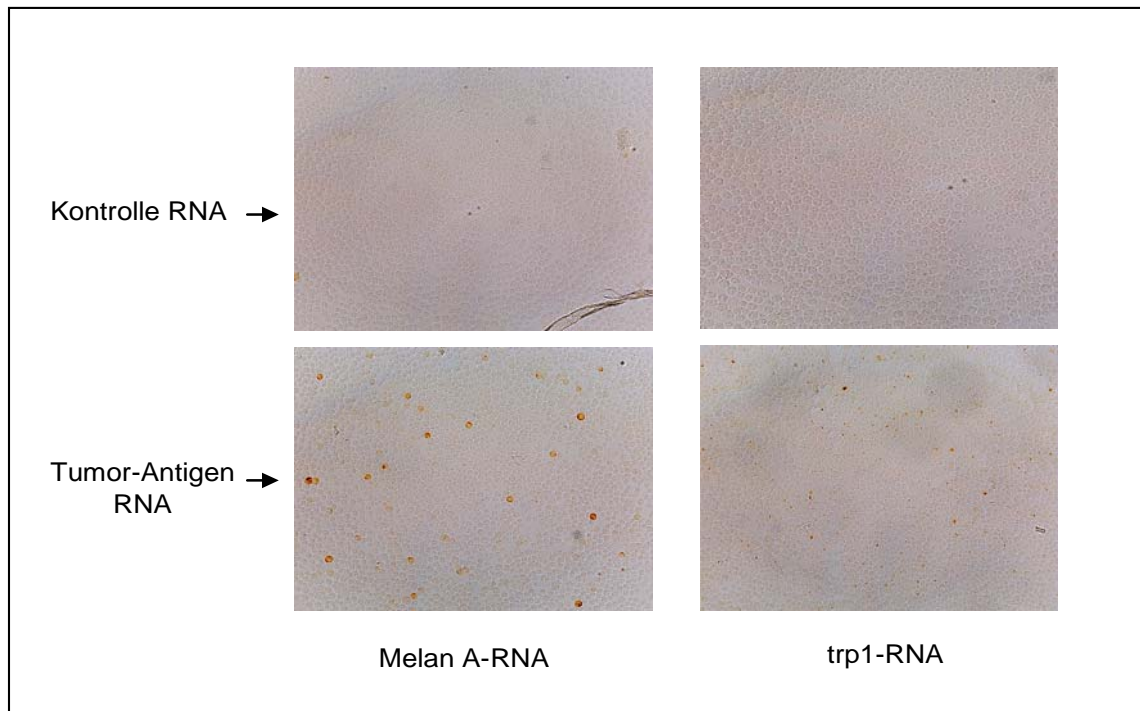


Abb. 18 : Expression der Antigene Melan-A und TRP-1 nach RNA Elektroporation

Um die Integrität der RNA zu überprüfen wurden 2×10^6 K562-Zellen mit jeweils $10 \mu\text{g}$ Melan-A bzw. TRP-1-RNA sowie mit $10 \mu\text{g}$ eGFP-RNA (negative Kontrolle) elektroporiert und für 24 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mittels Zytospin auf Objektträgern fixiert und immunzytologisch analysiert. Die mit (A) Melan-A-RNA elektroporierten Zellen wurden dazu mit einem Melan-A-spezifischen Erstantikörper (1:2000) und die (B) TRP-1-RNA elektroporierten Zellen mit einem TRP-1-spezifischen Erstantikörper (1:5000) inkubiert (TA99). Als zweiter Antikörper wurde ein biotinylierter anti-Maus IgG Antikörper (1:500) eingesetzt. Über eine Enzym Substrat Reaktion konnten dann die erfolgreich transfizierten Zellen sichtbar gemacht werden. Von den mit eGFP-RNA elektroporierten Kontrollzellen wurden zwei Objektträger angelegt, welche den mit Melan-A bzw. TRP-1 RNA elektroporierten K562-Zellen entsprechend behandelt wurden.

Sowohl die Elektroporation der Melan-A-RNA als auch die der TRP1-RNA in K562-Zellen führt zu einer Expression der beiden Proteine, wobei die Lokalisation der Proteine in der Zelle eine unterschiedliche zu sein scheint (Abb. 18). Melan-A ist ubiquitär in der Zelle verteilt wohingegen TRP-1 auf ein bestimmtes Kompartiment in der Zelle beschränkt vorliegt. Weiterhin ist zu erkennen, dass nicht alle Zellen gleiche Mengen an Protein exprimieren, was man sehr wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Zahl von RNA-Molekülen in der jeweiligen Zelle zurückführen kann. Prinzipiell kann jedoch die Aussage getroffen werden, dass sowohl die Melan-A-RNA als auch die TRP1-RNA funktionsfähig und folglich für die weiteren Versuche verwendbar sind.

1.7. Stimulation spezifischer CD8⁺- T-Lymphozyten mit Melan-A-mRNA elektroporierten APC

Unter den Melanom-assoziierten antigenen Strukturen die von HLA-Klasse-I restringierten T-Zellen erkannt werden, findet sich ein von Melan-A abstammendes Epitop (Melan-A₂₆₋₃₅, ELAGIGILTV). Für dieses können im peripheren Blut von HLA-A*0201 positiven Melanompatienten und gesunden Donoren Melan-A₂₆₋₃₅-spezifische T-Zellen detektiert werden [Romero et al., 1997; Rivoltini et al., 1995, Rivoltini et al., 1999]. Allerdings führte ein Austausch der Aminosäure Arginin gegen Leucin an Position 2 des Peptides zu einer höheren Affinität gegenüber dem HLA-Molekül und damit verbunden zu einer stärkeren T-Zell-Antwort [Valmori et al., 1998]. Im Folgenden sollte unter Verwendung Melan-A-spezifischer T-Zellen der Nachweis erbracht werden, dass elektroporierte APC nicht nur in der Lage sind anti-virale Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen, sondern auch gegen Tumor assoziierte Antigene gerichtete T-Zellen zu aktivieren. Für die Generierung einer Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zelllinie wurden demzufolge T-Zellen eines HLA-A*0201 positiven Donors in vitro mit Peptid-beladenen autologen DC aktiviert. Zur Stimulation wurde die oben beschriebene Peptidvariante eingesetzt, die nachfolgend wie das ursprüngliche Peptid als Melan-A₂₆₋₃₅ bezeichnet wird. Die Melan-A-spezifische T-Zelllinie wurde dann zur Analyse der Epitopräsentation durch Melan-A-RNA elektroporierte APC verwendet. Es sollten zum einen die stimulatorischen Eigenschaften HLA-A2 positiver RNA elektroporierter COS-7-Zellen (COS-7-A2-Zellen) analysiert werden, da diese im Labor nach DNA-Transfektion bereits routinemäßig zur Stimulation Melan-A-spezifischer T-Zellen eingesetzt werden. Zum anderen sollten die stimulatorischen Eigenschaften RNA elektroporierter DC untersucht werden. Um zu zeigen, dass die gewählten Versuchsbedingungen prinzipiell eine Stimulation von T-Zellen zulassen, wurden DC parallel zur Elektroporation mit Melan-A-RNA auch mit CMV-RNA elektroporiert und anschließend zur Stimulation Melan-A-spezifischer T-Zellen sowie CMV-spezifischer T-Zellen eingesetzt.

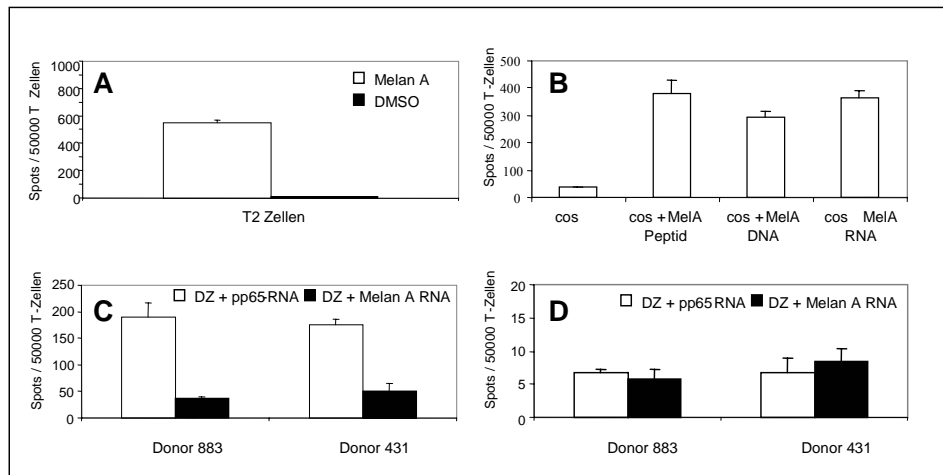


Abb. 19 : Analyse der stimulatorischen Eigenschaften Melan-A-RNA elektroporierter APC im ELISpot

Generierung Melan-A₂₇₋₃₅-spezifischer T-Zellen durch Priming und anschließender Restimulation mit Peptid-beladenen autologen DC bzw. PBMC. (A) Testung der T-Zell-Spezifität im ELISpot durch Inkubation der T-Zellen mit T2-Zellen, die mit Melan-A₂₆₋₃₅ Peptid bzw. DMSO (Negativkontrolle) beladen wurden. (B) Testung der stimulatorischen Eigenschaften von COS-7-Zellen, die mit Melan-A-RNA elektroporiert bzw. mit Melan-A DNA transfiziert wurden. (C, D) Testung der stimulatorischen Eigenschaften von DC, welche mit Melan-A-RNA bzw. pp65-RNA elektroporiert wurden. (B, D) Überprüfung der Expression des jeweiligen Antigenes mit Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen. (C) Überprüfung der Expression des jeweiligen Antigenes mit pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen. Eingesetzt wurden 5×10^4 T-Zellen und 2×10^4 APC. Die Zahl der IFN- γ sezernierenden Zellen wurde im ELISpot quantifiziert. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen. Die Standardabweichung wurde nach $\sqrt{(x - \bar{x})^2 / n - 1}$ berechnet.

Aus Abb. 19A geht hervor, dass die in vitro generierten Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen in einer hohen Frequenz vorliegen. Etwa 1 % der eingesetzten T-Zellen sind gegen das Melan-A₂₆₋₃₅ Epitope gerichtet. Durch eine anschließende Peptid-Titration konnte nachgewiesen werden, dass auch geringe Peptidmengen von 10 ng/ml zu einer Stimulation der Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen führen, was auf eine starke Affinität der T-Lymphozyten zum Peptid/HLA-A*0201 Komplex schließen lässt (Daten nicht gezeigt). Auch mit Melan-A₂₆₋₃₅-Peptid beladene COS-7-A2-Zellen sowie COS-7-A2-Transfektanten, die durch Elektroporation mit Melan-A-RNA bzw. Transfektion von Melan-A-DNA hergestellt wurden, sind in der Lage eine effiziente Stimulation Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischer T-Zellen zu bedingen. Die Stärke der T-Zell-Stimulation ist in allen Fällen vergleichbar (Abb. 19B). Mit Melan-A-RNA elektroporierte COS-7-A2-Zellen besitzen demnach die Fähigkeit antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren. Ob dazu auch elektroporierte DC in der Lage sind, sollte nachfolgend untersucht werden. Hierfür wurden DC mit Melan-A-RNA und zur Kontrolle mit pp65-RNA elektroporiert und dann zur Stimulation Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischer T-Zellen eingesetzt. Wie jedoch aus Abb. 19D hervorgeht, konnte keine spezifische Aktivierung der T-Zellen erzielt werden. Um auszuschließen, dass ein Fehler bei der Elektroporation Ursache für die nicht

vorhandene T-Zell-Stimulation ist, wurden parallel pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zellen generiert, welche auf den selben DC getestet wurden wie zuvor die Melan-A-spezifischen T-Zellen (Abb. 19C). Hierbei konnte eine pp65-spezifische T-Zell-Aktivierung gemessen werden, was darauf schließen lässt, dass die DC im vorliegenden Fall zwar in der Lage sind das pp95₆₅₄₋₅₀₃ Epitop aber nicht das Melan-A₂₆₋₃₅ Epitop zu präsentieren. Ursache hierfür könnte die in der Literatur beschriebene schlechte Prozessierung des Melan-A-Antigens durch das sogenannte Immunoproteasom sein [Morel et al 2000]. Diese These wird jedoch bis heute kontrovers diskutiert [Chapatte et al. 2004].

In weiteren Versuchen wurden auf dieselbe Weise, wie für Melan-A beschrieben, die stimulatorischen Eigenschaften von TRP-2-RNA elektroporierten DC untersucht. Allerdings konnte auch hier keine Stimulation TRP-2-spezifischer T-Zellen erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

2. Charakterisierung von T-Zell-Antworten spezifisch für das Differenzierungsantigen Melanotransferrin

Für die Induktion einer optimalen lang anhaltenden anti-Tumor Immunantwort sind nicht nur CD8⁺-CTL sondern auch CD4⁺-T-Helfer Zellen unerlässlich. Bisher sind jedoch kaum T-Helfer-Epitope aus Tumorantigenen verfügbar. Till A. Röhn identifizierte im Rahmen seiner Doktorarbeit ein Peptid aus Melanotransferrin (Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃), das durch HLA-DRB1*0401 auf Melanomzellen und auf Tumorlysat-beladenen DC präsentiert wird. Melanotransferrin, dessen Funktion bis heute noch nicht genau geklärt werden konnte, gehört zur Gruppe der eisenbindenden Proteine und wird neben dem Melanom auch in anderen Tumoren, z.B. Lungen- und Kolontumoren überexprimiert. In Bezug auf Melanotransferrin-spezifische T-Zell-Antworten liegen für gesunde Donoren nur begrenzte [Dissertation Till Alexander Röhn, 2004] bzw. für Melanopatienten gar keine Informationen vor. Deshalb sollte im Folgenden die Frage geklärt werden, ob in gesunden Donoren sowie in Melanopatienten Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zell-Antworten generiert werden können. Ein weiteres Peptid, welches ebenfalls durch Till A. Röhn als Ligand von HLA-DRB1*0401 Molekülen identifiziert werden konnte, stammt aus dem Protein Vimentin (Vimentin₍₂₀₂₋₂₁₇₎) und wurde in die Untersuchungen mit eingeschlossen. Vimentin gehört zur Familie der Intermediärfilamente die zur Stabilität des Zytoskelettes beitragen und in mesenchymalen Zellen einschließlich Fibroblasten, Chondrozyten, Osteozyten, Endothelien und weißen Blutkörperchen zu finden sind [Hay, 1989]. Vimentin wird generell in Sarkomen

gebildet und dort als übergeordneter Marker für Weichgewebstumoren eingesetzt [Reid-Nicholson et al., 2004; Gaertner et al., 2001].

2.1. Analyse der Immunogenität der HLA-DRB1*0401 präsentierter Peptide aus Melanotransferrin und Vimentin

Till Alexander Röhn konnte im Rahmen seiner Promotionsarbeit zeigen, dass die von Vimentin und Melanotransferrin abstammenden Peptide durch HLA-DRB1*0401-Moleküle präsentiert werden [Dissertation Till Alexander Röhn, 2004]. Im Folgenden sollte auf dieser Beobachtung basierend die Immunogenität der beiden Peptide vergleichend analysiert werden. Zur Induktion Peptid spezifischer T-Zell-Antworten wurden die DC verschiedener HLA-DRB1*0401-positive Donoren mit den Peptiden beladen und anschließend mit autologen PBMC inkubiert. Nach 10 Tagen wurde die Präsenz Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₄ bzw. Vimentin₂₀₂₋₂₁₇-spezifischer T-Zellen untersucht. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde Melanotransferrin in den Abbildungen mit seinem ursprünglichen Namen „p97“ bezeichnet.

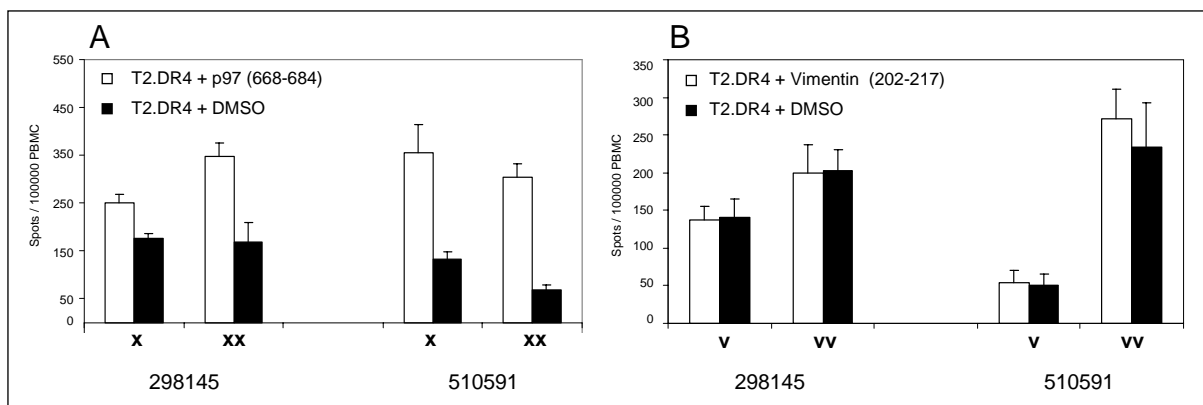


Abb. 20 : Analyse der HLA-DRB1*0401-abhängigen T-Zellaktivierung durch Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ und Vimentin₂₀₂₋₂₁₇

Reife DC der HLA-DRB1*0401-positiven Donoren 510591 und 298145 wurden mit 10 µg/ml Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ bzw. Vimentin₂₀₂₋₂₁₇ beladen und anschließend mit autologen PBMC unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) inkubiert. Die Beladung der DC mit Peptid erfolgte dabei entweder von Tag 6-8 der DC-Generierung, wobei an Tag 8 nochmals für 2 h Peptid hinzugegeben wurde (xx bzw. vv) oder aber ausschließlich an Tag 8 für 2 h (x bzw. v). Nach 10-tägiger Inkubation erfolgte die Analyse der T-Zell-Spezifität im ELISpot durch Inkubation der PBMC mit T2.DR4-Zellen, welche mit (A) Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ bzw. (B) Vimentin₂₀₂₋₂₁₇ beladen oder nur mit DMSO (Negativkontrolle) inkubiert wurden. Die Quantifizierung IFN- γ sezernierender Zellen erfolgte im ELISpot. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus vier Einzelwerten, unter Angabe der Standardabweichung.

Bereits 10 Tage nach der Stimulation autologer T-Zellen mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ beladenen DC konnten in zwei von vier Donoren Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zellen in einer Frequenz von 0,15-0,25% im ELISpot nachgewiesen werden (Abb. 20A und Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation autologer T-Zellen mittels

Vimentin₂₀₂₋₂₁₇ beladener DC in keinem der untersuchten Donoren zu einer spezifischen Stimulation der T-Zellen (Abb. 20B und Daten nicht gezeigt). Eine Vimentin₂₀₂₋₂₁₇-Spezifität der T-Zellen konnte auch nach einer weiteren Restimulierung mit autologen DC nicht induziert werden (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass es sich bei Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ in gesunden Donoren um ein sehr immunogenes Epitop handelt.

Im Folgenden wurde die Affinität der Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen zu dem HLA-Peptid Komplex durch eine Peptidtitration analysiert.

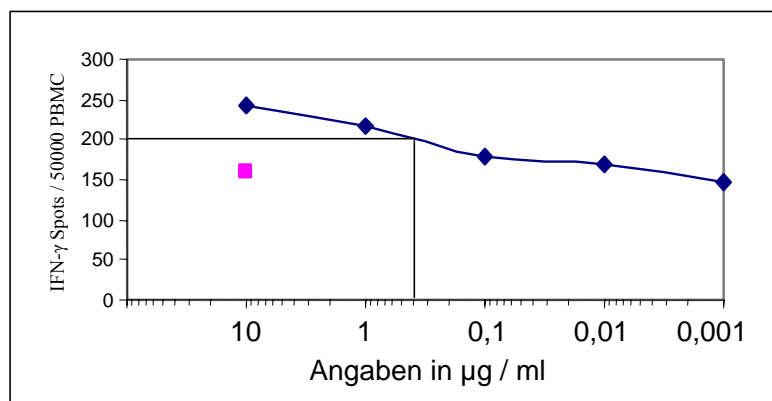


Abb. 21 : Analyse der Affinität Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zellen

Jeweils die gleiche Menge an Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen des Donors 298145 wurde mit T2.DR4-Zellen inkubiert, welche mit unterschiedlichen Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Peptidmengen beladen wurden (blaue Punkte). Als Kontrolle wurden 10 µg/ml eines von HIV abstammenden CD4⁺- T-Helfer-Epitopes (HIV₁₇₁₋₁₉₀) eingesetzt (rosa Punkt). Die Quantifizierung IFN-γ sezernierender Zellen erfolgte im ELISpot. Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert aus zwei Messungen.

Die Menge an Peptid, die benötigt wird um 50 % der spezifischen T-Zellen zur Sekretion von IFN-γ anzuregen, wird als Maß festgelegt, welches die sogenannte "halbmaximale Affinität" der T-Zellen zum HLA-Peptid-Komplex determiniert. Es wurde davon ausgegangen, dass 10 µg/ml des Peptids zu einer maximalen T-Zellstimulation führen. Zur Bestimmung der unspezifischen T-Zellstimulation wurde ein von HIV abstammendes CD4⁺- T-Helfer-Epitope eingesetzt (HIV₁₇₁₋₁₉₀). Dieses stammt aus der HIV-1 reversen Transkriptase und wurde von Van der Burg et al. als Th-Epitop beschrieben, welches an fünf verschiedene HLA-DR Moleküle, darunter auch das HLA-DR4 Molekül, binden kann, und gegen welches peptidspezifische CD4⁺- T-Zellen generiert werden konnten [Van der Burg et al., 1999]. Aus Abb. 21 geht hervor, dass die "halbmaximale Affinität" der Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen bei ca. 400 ng/ml liegt, was einer molaren Menge von ca. 230 nM entspricht.

2.2 Analyse der HLA-DRB1*0101 restringierten Immunogenität von Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃

Da Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₄ ebenfalls an HLA-DRB1*0101-Moleküle binden kann [Dissertation Till Alexander Röhn, 2004], wurde auch für diesen HLA-Typ untersucht, ob durch die Inkubation Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₄-beladener DC mit autologen PBMC, Peptid-spezifische T-Zell-Antworten induzieren werden können.

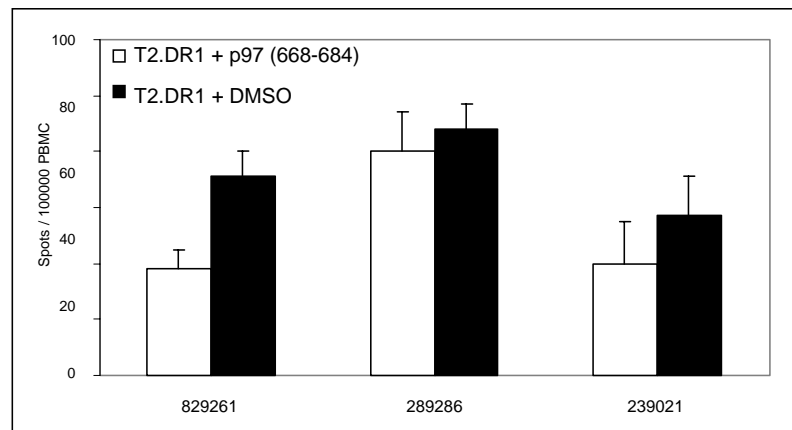


Abb. 22 : Analyse HLA-DRB1*0101-abhängigen T-Zellaktivierung durch Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃

Reife DC HLA-DRB1*0101 positiver Donoren (829261, 289286, 239021) wurden mit 10 µg/ml Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ beladen und anschließend mit autologen PBMC unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) inkubiert. Nach 10-tägiger Inkubation erfolgte die Analyse der T-Zell-Spezifität im ELISpot durch Inkubation der PBMC mit T2.DR1-Zellen, welche mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ sowie DMSO (Negativkontrolle) beladen wurden. Die Quantifikation der IFN-γ sezernierenden Zellen erfolgte im ELISpot. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen, unter Angabe der Standardabweichung.

Ausgehend von den T-Zellen fünf verschiedener HLA-DRB1*0101 positiver Donoren konnten keine Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zelllinien generiert werden. Versuche die Zellen weiter zu restimulieren hatten keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt).

2.3 Erkennung von Melanom-Zelllinien durch Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zellen

Melanotransferrin wird in malignen Melanomen stark exprimiert. Deshalb ist anzunehmen, dass Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zellen Melanomzellen, die Melanotransferrin nachweislich exprimieren und zudem aus einem HLA-DRB1*0401 positiven Donor stammen, erkennen und spezifisch darauf reagieren. Im Folgenden sollte deshalb untersucht werden, ob die HLA-DRB1*0401 positive Melanom-Zelllinie UKRV-Mel-17, die das Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Epitop nachgewiesenermaßen präsentiert [Dissertation Till Röhn], von Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen erkannt wird. Die in Abb. 23 verwendeten Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen wurden vor ihrem Einsatz durch Inkubation mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-Peptid bzw. DMSO beladenen DC auf ihre Spezifität getestet (Daten nicht gezeigt).

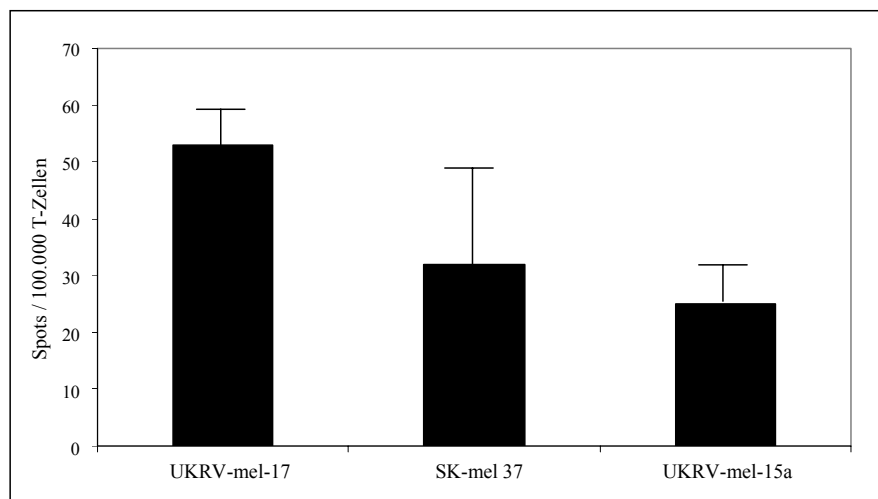


Abb. 23 : Testung Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zellen auf verschiedenen Melanom-Zell-Linien

Reife DC des HLA-DRB1*0401 positiver Donors 210591 wurden mit 10 µg/ml Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ beladen und anschließend mit autologen PBMC unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) inkubiert. Die Testung der T-Zell-Spezifität erfolgte im ELISpot nach 10 Tagen (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig wurden drei unterschiedliche Melanom-Zell-Linien (UKRV-Mel-17 = HLA-DRB1*0401 positiv, SK-Mel-37 = HLA-DRB1*0401 negativ, UKRV-Mel-15a = HLA-DRB1*DRB1*0401 negativ) mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen im ELISpot inkubiert. Die Zahl der IFN-γ sezernierenden Zellen wurde im ELISpot quantifiziert. Jeder Balken steht für einen Durchschnittswert bestehende aus drei Messungen. Gezeigt ist eines von 2 unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten.

Aus den in Abb. 23 gezeigten Daten geht hervor, dass die HLA-DRB1*0401 positive Melanom-Zelllinie UKRV-Mel-17 in der Lage ist eine Aktivierung Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zellen zu induzieren. Diese Aktivierung erweist sich als deutlich erhöht gegenüber der Hintergrundstimulation, die durch Inkubation mit HLA-DRB1*0401 negativen Melanom-Zellen hervorgerufen wurde. Dies unterstützt den Befund, dass UKRV-Mel-17

Zellen in der Lage sind das Epitop Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ zu präsentieren, wengleich nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann, dass auch nicht-spezifische T-Zellen durch UKRV-Mel-17-Zellen aktiviert werden.

2.4. Nachweis Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zellen im Blut von Melanom-Patienten

Basierend auf der starken in vitro Immunogenität des Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Epitops in gesunden Donoren, stellte sich die Frage, ob Epitop-reaktive T-Zellen auch in Melanompatienten detektierbar sind, die möglicherweise bereits einmal Kontakt zu ihrem Antigen hatten und folglich durch einen erneuten Stimulus leicht zur reaktivieren sind. Im Hinblick auf eine immuntherapeutische Applikation von Melanotransferrin als Tumor assoziiertes Antigen, sollte im Folgenden das Vorhandensein Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zellen im Blut HLA-DRB1*0401 positiver Melanom-Patienten untersucht werden. Wie zuvor erwähnt könnte bereits in vivo ein Kontakt der T-Zellen zu ihrem Antigen stattgefunden haben, so dass es sich bei einer in vitro Stimulation um einen sekundären Antigen-Kontakt handelt. Aus diesen Grund wurden die Stimulierungsbedingungen geändert: autologe PBMC als Quelle für T-Zellen und APC wurden mit dem Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Peptid inkubiert. Um zu zeigen, dass Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ auch auf natürlichem Wege durch Prozessierungsvorgänge in den APC entstehen kann, wurden PBMC analog zur Beladung mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ mit einer längeren Peptidvariante Melanotransferrin₆₅₅₋₆₉₆ beladen. Zusätzlich wurden auch gesunde Donoren in die Untersuchungen mit einbezogen.

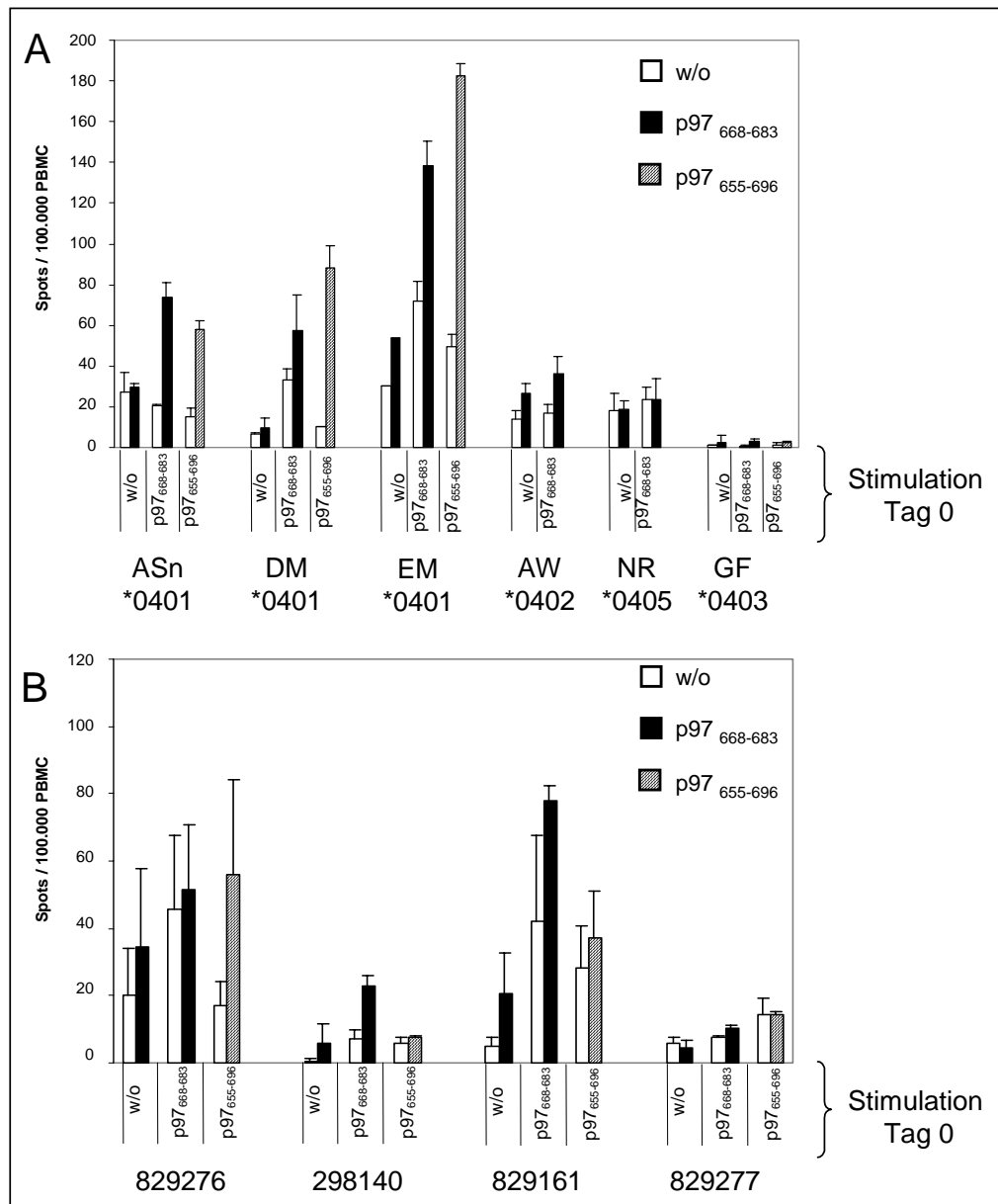


Abb. 24 : Stimulation Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zellen aus PBMC von Melanompatienten und gesunden Donoren

Zur Generierung Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zelllinien wurden PBMC von verschiedenen Donoren mit 10 µg Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ bzw. Melanotransferrin₆₅₅₋₆₉₆ sowie als Negativkontrolle mit DMSO für 14 Tage unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) inkubiert. Mittels ELISpot wurde die Spezifität der erhaltenen T-Zelllinien der (A) Melanompatienten und (B) gesunden Donoren (alle HLA-DRB1*0401 positiv) nach 14 Tagen bestimmt. Dabei wurden T2.DR4-Zellen als Targetzellen eingesetzt, welche mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ (■), Melanotransferrin₆₅₅₋₆₉₆ (▨) und mit DMSO beladen wurden (Negativkontrolle) (□). Die Quantifizierung der IFN-γ sezernierenden Zellen erfolgte im ELISpot. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus zwei Messungen unter Angabe der Standardabweichung.

Aus Abb. 24A lässt sich klar erkennen, dass im Blut HLA-DRB1*0401 positiver Melanom-Patienten Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zellen vorliegen. In allen drei Donoren (ASn, DM und EM) zeigt die durch Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ stimulierte Zellpopulation eine höhere IFN-γ Sekretion nach erneuter Stimulation durch Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ beladene T2-DR4

Zellen, als die nur mit DMSO inkubierten T2-DR4 Zellen. Auch eine Stimulation mit dem längeren Peptid Melanotransferrin₆₅₅₋₆₉₆ führt zur spezifischen Sekretion von IFN- γ . Weiterhin sieht es so aus, als ob sich die Zahl der Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen Zellen vervielfacht. Dies lässt sich aus dem Vergleich der an Tag 0 mit DMSO stimulierten Zellpopulation zu der mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ stimulierten Population ableiten. In Zahlen ausgedrückt bedeutet dies für den Donor EM, dass nach 14 tägiger Inkubation der PBMC ohne Peptid ca. 30 Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische Zellen vorliegen, während die Inkubation mit dem Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Peptid die Zahl auf ca. 60 spezifische Zellen ansteigen lässt. Auch für die Donoren ASn und DM ist ein Unterschied in der Zahl der IFN- γ sekretierenden Zellen zu erkennen.

Im Falle der Donoren AW, NR und GF, welche ein anderes HLA-DRB1*04 Allel als HLA-DRB1*0401 exprimieren konnte keine Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zell Aktivierung detektiert werden.

Auch im Blut der gesunden Donoren lassen sich Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zellen nach diesem Stimulationsprotokoll nachweisen. Dies gilt vor allem für den Donor 298140, für welchen das Ergebnis reproduziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Allerdings konnte für diesen Donor keine T-Zell Stimulation durch die längere Peptidvariante Melanotransferrin₆₅₅₋₆₉₆ erzielt werden (Abb. 24). Im Fall der anderen drei gesunden Donoren konnte keine eindeutige Spezifität nachgewiesen werden. Demnach scheint auch in gesunden Donoren vereinzelt eine hohe Zahl an Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen Vorläuferzellen vorzuliegen.

2.5. Stimulation spezifischer T-Lymphozyten mit Melanotransferrin-mRNA elektroporierten DC

Wie in den vorangehenden Abschnitten gezeigt wurde, konnten gegen Melanotransferrin in vitro, durch Stimulation mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-Peptid beladenen APC innerhalb von 8 Tagen, spezifische T-Zelllinien generiert werden. Diese wurden im folgenden Versuch eingesetzt, um die stimulatorischen Eigenschaften Melanotransferrin-RNA elektroporierter DC, zu untersuchen. Dabei sollte zusätzlich der Einfluss unterschiedlicher DC-Reifungszustände ermittelt werden, so dass die DC entweder vor der Reifung durch Zytokine elektroporiert, für 24h ausgereift und anschließend verwendet oder im reifen Zustand elektroporiert und zwei Stunden später eingesetzt wurden.

Zur Spezifitätsanalyse wurden die T-Zellen sowohl mit Melanotransferrin-RNA elektroporierten DC als auch mit eGFP-RNA elektroporierten DC koinkubiert. In einem zusätzlichen Kontrollansatz wurden die T-Zellen mit Peptid-beladenen (nicht elektroporierten) DC bzw. T2.DR4 Zellen kokultiviert.

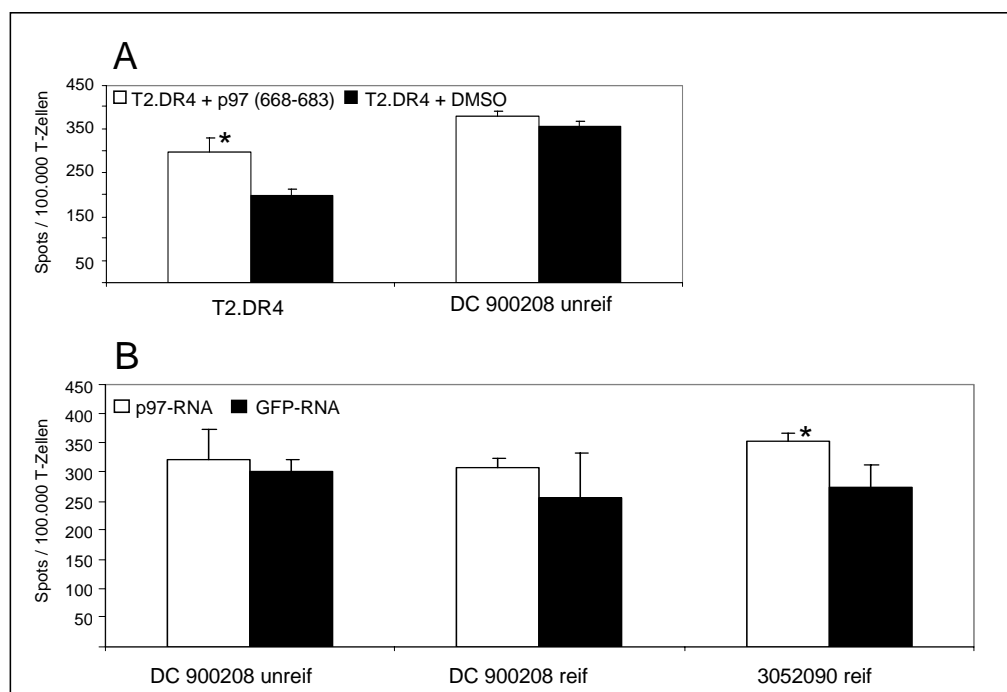


Abb. 25 :Analyse der stimulatorischen Eigenschaften von Melanotransferrin-RNA elektroporierten DC im ELISpot

Zur Generierung einer Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zelllinie wurden PBMC des HLA-DRB1*0401⁺ Donors EM mit 10 µg Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Peptid/ml für 8 Tage unter Zugabe von IL-2 (20 U/ml) und IL-7 (10 ng/ml) inkubiert. Mittels ELISpot wurde die Spezifität der T-Zelllinie bestimmt (A), die dann wiederum zur Analyse des stimulatorischen Potentials Melanotransferrin-RNA elektroporierter DC eingesetzt wurden (B). A: Zur Analyse ihrer Spezifität wurden die T-Zellen mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ (Peptid (10 µg/ml)-beladenen bzw. unbeladene (DMSO) T2.DR4 Stimulatorzellen sowie nicht elektroporierten DC koinkubiert. B: Melanotransferrin-spezifische T-Zellen wurden mit reifen sowie unreifen Melanotransferrin-RNA elektroporierten DC bzw. mit eGFP-RNA elektroporierten DC zweier verschiedener Donoren inkubiert und die Zahl der IFN-γ sezernierenden Zellen wurde im ELISpot bestimmt. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert aus drei Messungen. Gezeigt ist eines von 2 unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Resultaten. Die Signifikanz der Werte wurde durch den Unpaired t-test evaluiert. Der two tailed P value in Abb. A beträgt 0,0072 der in Abb. B 0,0291. Die Standardabweichung wurde nach $\sqrt{(x - \bar{x})^2 / n - 1}$ berechnet.

Die Abb. 25A legt dar, dass eine Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zelllinie aus den Zellen des Donors EM angelegt werden konnte. Infolge der Koinkubation der T-Zellen mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-Peptid beladenen T2.DR4-Zellen können ca. 100 spezifische T-Zellen detektiert werden, was einer Frequenz von 0,1% entspricht. Im Gegensatz dazu induzieren sowohl Peptid-beladene als auch nicht-beladene DC eine starke Stimulation der T-Zellen, so dass die Peptidspezifität aufgrund der hohen Hintergrundstimulation nicht erkennbar ist.

Die Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zelllinie wurde anschließend genutzt (Abb. 25B), um die stimulatorischen Eigenschaften von DC, die mit Melanotransferrin-RNA bzw. mit

eGFP-RNA elektroportiert wurden, im ELISpot zu analysieren. Trotz der hohen Hintergrundstimulation scheinen die Melanotransferrin-RNA elektroportierten DC des Donors 3052090 im Vergleich zu den eGFP-RNA elektroportierten DC zu einer signifikant erhöhten Stimulation der Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zelllinie zu führen. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Präsentation des Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Epitops durch die RNA elektroportierten DC stattfinden könnte. Um diese Daten zu untermauern wäre die Verwendung eines T-Zellklons empfehlenswert, der jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr generiert werden konnte.

D. Diskussion

1. RNA-Elektroporation

1.1. Antigenbeladung mittels RNA-Elektroporation

Die Stimulierung Tumorantigen-spezifischer T-Zellen mittels einer DC Vakzine erfordert die Anwendung effizienter *in vitro* Antigenbeladungsstrategien. Beispielsweise können DC effizient mit synthetischen Peptidepitopen beladen werden. Jedoch ist die Anwendung einer solchen Vakzine abhängig von der Kenntnis solcher Epitope und vom HLA-Genotyp des zu vakzinierenden Patienten. Diese Einschränkung kann durch die Verwendung viraler Vektoren zur Transfektion von DC umgangen werden. Allerdings wurde bei der Verwendung solcher DC häufig die Induktion einer Immunantwort gegen virale Antigene beobachtet, wohingegen Antworten gegen Tumor-assoziierte Epitope verdeckt oder sogar unterdrückt wurden [Robbins et al., 1998; Humrich et al., 2003].

Das Einschleusen nicht-viraler DNA-Vektoren in DC erwies sich dagegen in den meisten Fällen als sehr ineffizient. So konnte mittels Lipofektion oder Elektroporation kaum eine Stimulation spezifischer T-Zell-Antworten erzielt werden [Lohmann et al., 2000; Strobel et al., 2000]. Hierzu trägt die Tatsache bei, dass die DNA für die Transkription in den Nukleus gelangen muss. Da sich DC jedoch nicht teilen, findet in diesen Zellen nur eine sehr geringe Transkription statt, und der Transport von Molekülen in den Nukleus läuft eher eingeschränkt ab [Luo et al., 2000].

Demgegenüber bietet die Verwendung von RNA eine interessante Alternative, da sie nach Transfektion im Cytoplasma verbleibt, wodurch auch ausgeschlossen werden kann, dass eine Integration in das Genom der Wirtszelle stattfindet. Weiterhin kann, durch die Möglichkeit mehrere RNA-Moleküle gleichzeitig in die DC einzuschleusen, der gesamte RNA-Gehalte einer Tumorzelle isoliert und anschließend auf die DC geladen werden. So konnten Gilboa et al. zeigen, dass eine passive Beladung von DC mit gesamt Tumor-RNA zu der Induktion einer Antigen-spezifischen Immunantwort führt, was später in klinischen Studien mit Nierenkrebs- sowie Prostatakrebs- Patienten belegt werden konnte [Boczkowski et al., 1996; Heiser et al., 2002]. Dennoch erwies sich die Antigenexpression nach passiver Beladung der DC mit RNA oft als sehr niedrig.

Nachfolgende Arbeiten hatten deshalb zum Ziel die Effizienz der Antigenexpression zu erhöhen. Dabei zeigte sich, dass sowohl die Technik der passiven Beladung, als auch die der

Lipofektion in ihrem Potential effiziente T-Zell-Antworten zu induzieren, dem Verfahren der RNA-Elektroporation unterlegen waren [Kalady et al., 2000].

Das Ziel dieser Arbeit lag deshalb in der Etablierung der RNA-Elektroporation von DC, sowie der anschließenden Analyse der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften dieser elektroporierten DC.

1.2. Etablierung der RNA-Elektroporation und Analyse des Einflusses verschiedener Parameter auf die Transfektions-effizienz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte ein Protokoll zur RNA-Elektroporation von DC etabliert und optimiert werden. Da es sich bei DC um primäre Zellen handelt, deren Generierung aufwendig und sehr kostenintensiv ist, wurde die Technik zunächst an erythroleukämischen K562 Zellen etabliert. Dazu wurden die ersten Versuche mit eGFP-RNA durchgeführt, um die erzielten Transfektionseffizienzen genau quantifizieren zu können.

Es wurden zunächst folgende Parameter gewählt: 300V, 400V und 500V sowie 150 μ F. Dabei zeigte sich, dass die Verwendung ansteigender Feldstärken, durch Erhöhung der Spannung, zu einer Verminderung der Transfektionseffizienz führt, verbunden mit einem schlechteren Zustand der Zellen, sichtbar durch eine Reduktion der HLA-Klasse-I Oberflächenexpression. Unter allen getesteten Bedingungen führten Einstellungen von 300V kombiniert mit einer Kapazität von 150 μ F zu den besten Transfektionseffizienzen in Verbindung mit einer hohen Vitalität der Zellen (1.2.1.). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen von Van Tendeloo, welcher für K562-Zellen ebenfalls die beschriebenen Elektroporationsbedingungen zur Erzielung optimaler Transfektionseffizienzen eruieren konnte [Van Tendeloo et al., 2001].

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die RNA-Konzentration auf die Transfektionseffizienz ausübt (Einsatz von 5 μ g und 10 μ g RNA, siehe 1.2.2.). Dabei führt schon die Verwendung von 5 μ g RNA zur Transfektion von nahezu 100% der Zellen. Demzufolge hat eine weitere Erhöhung der RNA-Konzentration keinen Einfluss auf die Transfektionseffizienz, aber wie ersichtlich auf die Stärke der GFP-Expression. Diese Beobachtungen entsprechen denen von Tuyaeerts et al. bestätigt, welche noch bei Verwendung von 50 μ g RNA eine Verstärkung der Fluoreszenzintensität nachweisen konnten [Tuyaeerts et al. 2003].

Die Technik der RNA-Elektroporation konnte demzufolge an K562 Zellen, die unter Anwendung der Parameter 300V und 150 μ F sehr effizient mit RNA elektroporiert werden konnten, erfolgreich etabliert werden. Die Elektroporationsparameter wurden deshalb

nachfolgend auch auf andere Zelllinien übertragen, die für in vitro Analysen der Antigenprozessierung und – präsentation von Bedeutung sind; wie T2.DR4, EBV-B-Zellen und COS-7-Zellen (1.3.1.).

Dabei zeigte sich für T2.DR4-Zellen, dass die Verwendung verschiedener Feldstärken bei der Elektroporation keinen Unterschied in der Transfektionseffizienz bewirkt. Allerdings konnte eine geringe Abnahme der Fluoreszenz-Intensität bei der Verwendung höherer Feldstärken beobachtet werden. Für EBV-B Zellen spiegelte sich, zumindest im Vergleich der Spannungen 250V und 300V der Einfluss einer höheren Feldstärke in einer sichtbar erhöhten Transfektionseffizienz wieder. Versuche EBV-B-Zellen anderer Donoren zu elektroporieren zeigten, dass die erzielten Transfektionseffizienzen bei höheren Feldstärken oftmals geringer waren. Auch die Elektroporation von COS-7-Zellen, bei denen es sich im Gegensatz zu allen anderen Zelllinien um eine adhärente Zelllinie handelt, erwies sich mit einer Transfektionseffizienz von 93 % als erfolgreich. Die Varianz der optimalen Feldstärken zwischen den einzelnen Zelltypen kann hauptsächlich auf deren unterschiedliche Größe zurückgeführt werden. Generell gilt bei konstanter Temperatur: „ Je kleiner die Zelle ist, desto höhere Feldstärken müssen eingesetzt werden, um einen Membrandurchbruch zu erreichen“. Demnach muss die Feldstärke für jede einzelne Zelllinie erneut optimiert werden.

1.3. Elektroporation primärer Zellen

Im Anschluss an die RNA-Elektroporation verschiedener Zelllinien wurde das Protokoll auf primäre professionelle Antigen-präsentierende Zellen (DC, CD40L aktivierte B Zellen) übertragen. Von besonderem Interesse für die vorliegende Arbeit, aber auch für weiterführende Arbeiten in der Abteilung, war die Elektroporation der DC.

In zurückliegenden Arbeiten konnten Van Tendeloo et al. zeigen, dass bei 300V und 150 μ F elektroporierte, unreife DC ein größeres Potential besitzen spezifische T-Zellen zu aktivieren als reife elektroporierte DC [Van Tendeloo et al., 2001]. Dies wurde auf eine verminderte Transfektionseffizienz der reifen DC zurückgeführt. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit unreife DC elektroporiert, wobei auch hier im Vergleich der Spannungen 300V und 400V für die höheren Einstellungen eine bessere Transfektionseffizienz erzielt werden konnte. Diese variierte jedoch zwischen den einzelnen Donoren. Ferner zeigte sich, dass der Einfluss unterschiedlicher Zelldichten im Bereich zwischen 1×10^6 und 3×10^6 DC keine Auswirkungen auf die Elektroporationseffizienz hat. Dies ist vor allem deshalb von Bedeutung, da das Material zur Generierung von DC in der Regel limitiert ist und die Menge an eingesetzten DC somit möglichst niedrig gehalten werden kann.

Weiterhin zeigte sich, dass die Verwendung unterschiedlicher Zell-Kultur-Medien bei der Generierung von DC aus Monozyten einen Einfluss auf die Elektroporationseffizienz hat. Neben DC konnten auch CD40L-aktivierte B-Zellen eine weitere Gruppe professioneller APC bei 290V und 150 μ F effizient mit RNA elektroporiert werden (1.3.2.). So sind nach Coughlin et al. MART-1-RNA elektroporierte CD40L-aktivierte B-Zellen in der Lage MART-1-spezifische T-Zellen zu aktivieren, welche dann wiederum MART-1 exprimierende Tumorzellen erkennen und lysieren können [Coughlin et al., 2004]. Ein Vorteil der Verwendung von CD40L-aktivierten B-Zellen ist dabei der relativ geringe Aufwand ihrer Herstellung und Vermehrung. Obwohl es noch keine Angaben gibt, wie viele CD40L-aktivierte B-Zellen benötigt werden, um die Funktion einer DC zu substituieren, sind nur etwa 4-8 ml Blut erforderlich um 1×10^8 CD40L-aktivierte B-Zellen zu erhalten. Für die gleiche Menge an DC würde man ca. einen Liter Blut benötigen. Dies ist vor allem für die Behandlung von Kindern unter 5 Jahren von großer Bedeutung, da man bei ihnen nur über ein sehr kleineres Volumen an Blut verfügen kann.

1.4. Stimulation anti-viraler Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen mittels RNA elektroporierter DC

Eines der Ziele dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob elektroporierte DC zur Stimulation einer spezifischen T-Zell-Antwort eingesetzt werden können. Dies sollte zunächst anhand der Stimulation pp65-spezifischer T-Zellen untersucht werden. Bei pp65 handelte es sich um ein Phosphoprotein, welches von einem Mitglied der Familie der b-Herpesviren, nämlich dem humanen Cytomegalie Virus abstammt [Roizman et al., 1981; Stinski et al., 1983], dessen Durchseuchungsrate in den westlichen Industrieländern zwischen 50-80% liegt. Pp65 wurde als Hauptantigen einer gegen hCMV gerichteten spezifischen CTL-Antwort identifiziert [Wills et al., 1996; Lacey et al., 2003; Mc Laughling Tayler et al., 1994]. Aus diesem Antigen konnten inzwischen eine Reihe von T-Zell Peptid-Epitopen charakterisiert werden, die mittels Klonierungs-Technik [Wills et al., 1996; Longmate et al., 2001] oder HLA-Klasse-I Epitop-Vorhersagen [Solache et al., 1999] identifiziert wurden. Wie auch das Epstein-Barr-Virus, ist das hCMV in der Lage auf Lebenszeit im menschlichen Körper zu verweilen, wobei es sich um eine symptomlose latente Infektion handelt [Pass et al., 1985; Mokarsky et al., 1993]. Hierbei umgeht das Virus die Immunantwort und entzieht sich auf diese Weise einer Vernichtung durch anti-virale Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen, welche bei der primären Infektion gebildet wurden [Bailey et al., 1995].

In der vorliegenden Arbeit wurden pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zelllinien aus dem peripheren Blut hCMV-seropositiver, HLA-A2 positiver Donoren angelegt. Parallel dazu wurden allogene unreife DC generiert und 18 h nach Elektroporation mit den pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen T-Zellen inkubiert. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigten zum einen, dass pp65-RNA elektroporierte DC in der Lage waren eine etablierte pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische T-Zelllinie zu stimulieren (1.5.1.), zum anderen konnte durch pp65-RNA elektroporierte DC auch eine effiziente ex vivo Stimulation pp65-spezifischer T-Zellen erzielt werden (1.5.3.). Der Vergleich der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften von pp65-RNA elektroporierten DC mit Peptid-beladenen T2-Zellen ergab, dass die Frequenz IFN- γ sezernierender pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer T-Zellen nach Koinkubation mit den DC deutlich niedriger war als nach Koinkubation mit Peptid-beladenen T2-Zellen. Dies ist darauf zurückzuführen, dass T2-Zellen leere HLA-A2 Moleküle, an ihrer Zelloberfläche exprimieren, was durch eine Deletion des Transporter associated with antigen processing (TAP) verursacht wird [Armandola et al., 1996]. Die leeren HLA-A2 Moleküle binden exogene Peptide sehr effizient, so dass Peptid-beladene T2-Zellen als sehr gute Stimulatoren Epitop-spezifischer T-Zellen Verwendung finden. Während zu erwarten ist, dass nahezu 100 % der T2-Zellen nach entsprechender Inkubation das exogene Peptidepitop präsentieren, ist eine 100 %ige Transfektionsrate der DC nach RNA-Elektroporation auszuschließen. Diese geringere Transfektionsrate und die Tatsache, dass in pp65 exprimierenden DC das pp65₄₉₅₋₅₀₃-Epitop mit anderen intrazellulären Peptiden um die HLA-A2 Bindung und Präsentation konkurriert, haben zur Folge, dass die Zahl der pp65₄₉₅₋₅₀₃ HLA-A2 Oberflächenkomplexe auf den DC geringer ist als auf Peptid-beladenen T2-Zellen. Die zeitabhängige Analyse der T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften pp65-RNA elektroporierter DC zeigte, dass bereits nach 4 h eine sehr starke T-Zell-Stimulation erzielt werden konnte, ebenso wie nach 48 h (1.5.2.). Dies stellt einen Vorteil gegenüber der Peptid-Beladung von DC dar und ist auf das über eine längere Zeitspanne anhaltende intrazelluläre Angebot an prozessiertem Peptid nach der RNA-Elektroporation zurückzuführen [Liao et al., 2004].

Da es sich bei der Stimulation der pp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen um eine Restimulierung handelt, und die Frequenz dieser Zellen recht hoch ist, ist anzunehmen, dass bereits durch eine äußerst geringe Menge an präsentiertem Antigen eine Aktivierung und somit eine Expansion der spezifischen T-Zellen möglich ist. Demnach kann zwar die Schlussfolgerung getroffen werden, dass elektroporierte DC in der Lage sind eine Stimulation dieser Effektor-/Gedächtnis-T-Zellen zu bewirken, doch kann zu diesem Zeitpunkt noch keine

Aussage gemacht werden, ob sie auch imstande sind Tumorantigen spezifische T-Zellen, die häufig eine geringere Affinität zum HLA-Peptid-Komplex aufweisen, zu stimulieren.

1.5. Stimulation Melan-A-spezifischer T-Zellen mittels mRNA elektroporierter APC

Die Untersuchungen in denen Melan-A-RNA elektroporierte DC zur Stimulation Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischer T-Zelllinien eingesetzt wurden zeigten, dass keine Aktivierung der T-Zellen erzielt werden konnte (1.7). Entsprechend dem pp65-RNA Elektroporationsprotokoll wurden die DC im unreifen Zustand elektroporiert, für 18 h mit einem Cytokincocktail zur Ausreifung inkubiert und erst dann zur T-Zellstimulation eingesetzt. Das Ausbleiben der Stimulation Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischer T-Zellen war nicht auf einen schlechten Zustand der DC bzw. auf einen Fehler bei der Elektroporation zurückzuführen, da zeitgleich pp65-RNA elektroporierte DC desselben DC-Generierungsansatzes erfolgreich zur Stimulation pp65-spezifischer T-Zellen eingesetzt werden konnten.

Aus unterschiedlichen Literaturquellen geht hervor, dass die Mehrheit an CTL, die durch in vitro Priming mittels Peptid beladener DC generiert werden, durch eine niedrige Affinität ihres T-Zell Rezeptors zum Peptid/MHC Komplex gekennzeichnet sind. Häufig sind solche T-Zellen nicht reaktiv gegenüber Tumoren sowie Transfektanten. Ursächlich für die Akkumulation niedrig affiner T-Zellen könnte die sehr große Dichte an präsentiertem Antigen auf der DC nach Peptidbeladung sein, welche zur Deletion der hoch affinen CTL führt [Miller et al., 1996; Yee et al., 1999]. Dass jedoch eine niedrige Affinität der Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zelllinie nicht der Grund für das Ausbleiben einer Stimulation durch RNA elektroporierte DC ist, konnte durch Verwendung Melan-A-RNA elektroporierter COS-7-A2 Transfektanten gezeigt werden. Diese konnten erfolgreich zur Stimulation der Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zelllinien eingesetzt werden. Zusätzlich deuteten Peptid-Titrationsanalysen auf eine hohe Affinität der Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zelllinie zum Peptid-MHC Komplex hin. Analysen zur Prozessierung des Melan-A₂₆₋₃₅ Epitops von Morel et al. ergaben, dass das Immunoproteasom eine Reihe von Tumorantigen Epitopen, zu denen auch Melan-A₂₆₋₃₅ zählt, nicht generiert [Morel et al., 2000]. Andere Studien zur Analyse der Präsenz von Standard- und Immunoproteasom in reifen und unreifen DC zeigten, dass während der Reifung DC die Untereinheiten des Immunoproteasoms zwar vermehrt exprimiert werden, jedoch auch das Standardproteasom in reifen DC detektierbar ist [Macagno et al., 2001]. Demzufolge sollten sowohl reife als auch unreife DC in der Lage sein, das Melan-A₂₆₋₃₅ Epitop zu präsentieren. So konnte Van Tendeloo et al. die Präsentation des Melan-A₂₆₋₃₅ Epitops durch DC, die nach

Elektroporation für 24 h ausgereift wurden, belegen. Die dabei zur Reifung verwendeten Cytokine entsprechen jedoch nicht den in dieser Arbeit verwendeten [Van Tendeloo et al., 2001].

Auch Schaft et al. konnte Melan-A-RNA elektroporierte DC erfolgreich zur Stimulation Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischer T-Zellen einsetzen, wobei die DC im reifen Zustand elektroporiert und direkt im Anschluss zur Stimulation der T-Zellen eingesetzt wurden. Im unreifen Zustand konnte durch Schaft et al. dagegen kaum eine Stimulation der Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden [Schaft et al., 2005].

Weiterhin ist anzuführen, dass in der Arbeit von Schaft et al. die Expression von Melan-A 4 h nach Elektroporation ein Maximum erreicht, um dann innerhalb von 24 h wieder auf ein Hintergrundniveau abzusinken [Schaft et al., 2005]. Es wäre also denkbar, dass auch im Rahmen der Experimente der vorliegenden Arbeit die Expression des Proteins wieder auf ein Hintergrundniveau abgesunken sein könnte. Allerdings wurde aus diesem Grund stabilisierte RNA für die Elektroporation verwendet (1.1), so, dass eine längere Expression des Proteins gewährleistet sein müsste. Außerdem wurden in der vorliegenden Arbeit die mit Melan-A-RNA elektroporierten COS-7-A2 Transfektanten ebenfalls erst 24 h nach Elektroporation zur Stimulation der Melan-A₂₆₋₃₅-spezifischen T-Zellen eingesetzt.

Demnach ist wahrscheinlich eine Kombination mehrerer Faktoren dafür verantwortlich, dass im vorliegenden Falle Melan-A-RNA elektroporierte DC nicht in der Lage sind Melan-A₂₆₋₃₅-spezifische T-Zellen zur Sekretion von IFN- γ zu aktivieren. Ebenfalls zu berücksichtigen sind die Versuchsbedingungen (1.2.), Elektroporationsparameter und Unterschiede zwischen den einzelnen DC Donoren, die von Arbeitsgruppe zu Arbeitsgruppe variieren; somit zu unterschiedlichen Ergebnissen führen können.

2. Charakterisierung von T-Zell-Antworten spezifisch für das Differenzierungsantigen Melanotransferrin

In der vorliegenden Arbeit sollte die Immunogenität eines T-Helfer-Epitopes untersucht werden, welches sich von Melanotransferrin (p97) ableitet (Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃). Bei Melanotransferrin handelt es sich um ein in verschiedenen Tumoren überexprimiertes Antigen [Dissertation Till Alexander Röhn, 2004]. Neben Tumoren kann eine schwache Expression auch in Schweißdrüsenkanälen [Rose et al., 1986], Leberendothel Zellen [Kalady et al., 2002] und in Endothelzellen des Gehirnes [Baker et al., 1992] sowie eine starke Expression in fötalem Gewebe [Woodbury et al., 1980] nachgewiesen werden.

Die Analyse der Immunogenität des Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Epitops ergab, dass bereits 10 Tage nach Stimulation autologer T-Zellen mit Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₄-beladenen DC in zwei von vier HLA-DRB1*0401 positiven Donoren Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₄-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden konnten (2.1.). Dies deutet drauf hin, dass sich im Blut der Donoren eine größere Menge an Vorläufer-Zellen befindet. Allerdings kann nicht völlig ausgeschlossen werden, dass sich die Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₄-spezifischen T-Zellen nach Aktivierung sehr stark teilen und somit zu einer hohen Frequenz Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₄-spezifischer T-Zellen nach 10 Tagen Inkubation führen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zelllinie durch HLA-DRB1*0401 positive, Melanotransferrin exprimierende UKRV-Mel-17 Melanomzellen aktiviert werden kann (2.3.). Dies bestätigt die von Till Röhn mittels Massenspektrometrie erhaltenen Daten zur Expression des Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-Epitops auf der Oberfläche von UKRV-Mel-17 Zellen und weist darauf hin, dass die Affinität der Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen zum HLA-Peptid Komplex hoch genug ist, um die von der Tumorzelle präsentierten Peptidmengen zu erkennen.

Demzufolge und basierend auf dem Ergebnis, dass Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zellen im Blut HLA-DRB1*0401 positiver Melanom-Patienten sowie im Blut gesunder Donoren nachgewiesen wurden (2.4.), könnte Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ von besonderem Interesse für den Einsatz als Peptidvakzine sein. Die Daten lassen vermuten, dass auch in Patienten, die sich in einem späten Krankheitsstadium befinden, noch eine T-Zell-Antwort gegen Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ induzierbar sein sollte.

Im Gegensatz dazu konnte gegen das ebenfalls in dieser Arbeit auf seine Immunogenität hin getestete Peptid Vimentin₂₀₂₋₂₁₇ keine spezifische T-Zelllinie generiert werden (2.2.). Es ist denkbar, dass aufgrund der ubiquitären Expression von Vimentin als Intermediärfilament in Normalgeweben eine Toleranz für dieses Antigen besteht

[Pugliese, 2004]. Demzufolge würden zwar von Vimentin abstammende Epitope auf der Oberfläche der DC präsentiert werden, doch wären die entsprechenden T-Zellen entweder während der Entwicklung im Thymus eliminiert (zentrale Toleranz) oder bei Antigenkontakt in peripheren Bereichen des Körpers nicht aktiviert, sondern anergisiert worden (periphere Toleranz).

Basierend auf diesen Daten wäre die Verwendung des Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ Peptids im Rahmen einer Vakzinierung durchaus denkbar. Interessanterweise bindet das Peptidepitop nicht nur an HLA-DRB1*0401 Moleküle sondern auch an HLA-DRB1*0101 [Dissertation Till Alexander Röhn, 2004]. Trotzdem konnten in fünf getesteten HLA-DRB1*0101 positiven Donoren nach Stimulation mit Peptidbeladenen DC keine Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellen generiert werden. Dies liegt vermutlich daran, dass die Bindungseigenschaften von Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ zum HLA-DRB1*0101-Molekül im Vergleich zum HLA-DRB1*0401-Molekül wesentlich schwächer sind [Dissertation Till Alexander Röhn, 2004]. Doch ist es denkbar, dass sich diese Situation in vivo anders verhält als in vitro, so dass Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifische T-Zellen auch in HLA-DRB1*0101 positiven Donoren generiert werden könnten.

2.1. Stimulation Melanotransferrin-spezifischer T-Zellen mittels mRNA elektroporierter APC

Im ersten Kapitel dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass DC, die mit mRNA elektroporiert wurden, in der Lage sind das Protein zu exprimieren, zu prozessieren und daraus resultierende Peptide auf der Oberfläche den CD8⁺- T-Zellen zu präsentieren. Im zweiten Kapitel wurde der Nachweis erbracht, dass es sich bei Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃ um ein immunogenes Epitop handelt, gegen welches sich T-Zellen sowohl in gesunden Donoren als auch in Patienten detektieren lassen.

Hier wurde nun eine Verbindung dieser beiden Themengebiete erzielt, indem DC mit Melanotransferrin mRNA elektroporiert und anschließend zur Stimulation einer Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zelllinie eingesetzt wurden (2.5.). Dabei zeigte sich, dass bereits DC, die mit einer Kontroll-RNA elektroporiert wurden, eine starke Stimulation der T-Zellen induzierten, was die Aussage über eine spezifische Aktivierung erschwerte. Das

Problem der hohen Hintergrundstimulation könnte durch die Verwendung eines Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen T-Zellklons in den Untersuchungen umgangen werden, der jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr generiert werden konnte.

Im Gegensatz zum T-Zellklon sind in einer T-Zelllinie neben der Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischen Aktivität viele weitere Spezifitäten vorhanden, die durch die DC stimuliert werden können. Dennoch deuten die Daten darauf hin, dass Melanotransferrin-RNA elektroporierte DC sehr wahrscheinlich eine Antigen-spezifische Aktivierung der T-Zellen vermitteln können.

In dieser Arbeit konnten demnach durch RNA elektroporierte DC eine Antigen-spezifische Stimulation von CD8⁺- und CD4⁺- T-Zellen stimuliert werden. Das jedoch auch eine gleichzeitige Stimulation von CD8⁺- und CD4⁺- T-Zellen nach Elektroporation der DC mit der RNA nur eines Antigenes möglich ist, konnte von Bonehill et al. gezeigt werden. Durch Elektroporation von DC mit MAGE-A3-RNA, welche mit der Signalsequenz der lysosomalen und endosomalen Proteine LMP-1 bzw. der invarianten Kette li fusioniert wurde, konnte dabei eine simultane Präsentation antigener Peptide auf HLA-I und HLA-II Molekülen erzielt werden [Bonehill et al., 2004]. Der Vorteil dabei liegt in der unterstützenden Funktion der CD4⁺- T-Zellen, welche für eine vollständige Funktion, Proliferation und Memory-Funktion der CTL verantwortlich sind, sowie durch CD40-Ligand Interaktion zur Konditionierung der DC beitragen [Ridge et al., 1998].

In Hinblick auf eine klinische Applikation RNA elektroporierter DC, ist es jedoch denkbar, dass die Verwendung von nur einem Antigen zu einem gewissen Selektionsdruck auf die Tumorzellen führt, wodurch es zum Verlust des relevanten Antigenes kommen könnte. Als Alternative wäre der Einsatz von DC denkbar, die mit der RNA von mehreren verschiedenen Antigenen elektroporiert wurden. Beispielsweise konnten Schaft et al eine gleichermaßen starke intrazelluläre Expression dreier Antigene (MAGE-3, Melan-A, Survivin) nach gleichzeitiger RNA-Elektroporation in DC nachweisen. Dabei wurde die Fähigkeit der elektroporierten DC Epitope von MAGE-3 und Melan-A zu generieren, nicht beeinträchtigt [Schaft et al., 2005].

Demnach müssen die stimulatorischen Eigenschaften elektroporierter DC weiterhin untersucht und verbessert werden. Es gilt die besten Bedingungen für die Transfektion verschiedener Tumor-Antigene zu finden, um auf diese Weise die Stimulation von CD8⁺- und CD4⁺- T-Zellen unterschiedlicher Spezifitäten zu erzielen. Der Grundstein hierfür wurde in dieser Arbeit gelegt.

3. Ausblick

Im Rahmen der immuntherapeutischen Behandlung von Melanompatienten wird derzeit in zahlreichen klinischen Studien die Wirksamkeit von DC Vakzinen getestet. Es wird geprüft, ob in vitro generierte, mit Tumorantigenen beladene DC Vakzine in der Lage sind, die häufig auftretende Toleranz der T-Zellen gegenüber einem Tumor zu durchbrechen und somit eine effiziente anti-Tumor Immunantwort in den Patienten zu induzieren. In dieser Arbeit wurde gezeigt dass die Beladung von DC mit Antigenen durch RNA-Elektroporation eine sehr effiziente Methode des Antigentransfers darstellt und dass solche RNA-elektroporierten DC in der Lage sind anigen-sezifische T Zellen effizient zu stimulieren, so dass hiermit eine einfache und sichere Technik zur Verfügung steht, deren klinischer Einsatz in zukünftigen Studien zu untersuchen bleibt.

Demzufolge könnte auch das in dieser Arbeit als in Melanompatienten immunogen verifizierte Tumorantigen Melanotransferrin durch RNA-Elektroporation in DC eingeschleust werden und möglicherweise zur in vivo Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort gegen den Tumor beitragen. Dazu sind jedoch in vitro und in vivo Analysen erforderlich, die im Rahmen künftiger Untersuchungen durchzuführen sind.

E. Zusammenfassung

In den vergangenen Jahren ist es gelungen mehrere Melanom-assoziierte Tumorantigene zu identifizieren. Diese können von Tumorantigen-spezifischen T-Zellen erkannt werden, welche als Folge der Erkennung die Tumorzellen zerstören. Allerdings bedarf es zuvor einer Aktivierung der Tumorantigen-spezifischen T-Zellen. Diese kann beispielsweise durch Dendritische Zellen (DC) vermittelt werden, welche den T-Zellen das Antigen präsentieren und gleichzeitig alle kostimulatorischen Signale liefern. Neuere Therapiekonzepte konzentrieren sich deshalb auf den Einsatz von DC als Vakzine zu Aktivierung der T-Zellen. Hierbei wurden unterschiedliche Strategien zur Antigenbeladung von DC verfolgt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Elektroporation Dendritischer Zellen mit RNA zu etablieren und die T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften RNA-elektroporierter DC zu analysieren. Als RNA Quelle wurde *in vitro* transkribierte, stabilisierte RNA eingesetzt.

Die RNA-Elektroporation wurde zunächst an K562-Zellen, unter Verwendung von eGFP-RNA und Austestung verschiedener Parameter etabliert. Verschiedene Zelllinien (z.B. T2-, COS-7/-Zellen), und primäre Zellen (CD40L-aktivierte B-Zellen, Dendritische Zellen) die im Rahmen von Untersuchungen zur Antigenprozessierung und -präsentation von Bedeutung sind, konnten erfolgreich mit RNA elektroporiert werden. Die Analyse der T-Zell-stimulatorischen Kapazität RNA-elektroporierter Dendritischer Zellen erfolgte im Infektionsmodell des humanen Cytomegalievirus unter Verwendung von RNA kodierend für das immunodominante pp65 Antigen. Pp65-RNA elektroporierte DC konnten sowohl etablierte pp65-spezifische CD8⁺- T-Zelllinien effizient stimulieren als auch eine potente *ex vivo* Aktivierung pp65-spezifischer T-Zellen vermitteln

Die Fähigkeit RNA-elektroporierter DC eine spezifische Stimulation von CD4⁺- T-Zellen zu vermitteln, wurde im Tumormodell unter Verwendung von Melanotransferrin-RNA untersucht. Melanotransferrin ist ein im Melanom und verschiedenen anderen Tumoren überexprimiertes Antigen. Zunächst wurden die Präsenz von T-Zellen spezifisch für das erst kürzlich identifizierte HLA-DRB1*0401-präsentierte Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-Epitop in gesunden Donoren und Melanompatienten analysiert, über dessen Immunogenität bislang nur sehr begrenzte Informationen vorlagen. Epitop-spezifische T-Zellen wurden in beiden Gruppen nachgewiesen. In Melanompatienten konnten diese bereits nach Kurzzeitstimulation detektiert werden, was auf eine mögliche *in vivo* Aktivierung der T-Zellen hindeutet. Eine

spezifische Stimulation Melanotransferrin₆₆₈₋₆₈₃-spezifischer T-Zellen durch Melanotransferrin-elektroporierte DC konnte detektiert werden.

Die im Rahmen der Arbeit erzielten Daten zeigen demnach, dass RNA-elektroporierte DC Antigen-spezifische T-Zellen effizient stimulieren können. Sie stellen demzufolge ein ideales Werkzeug zur Vakzinierung von Tumorpatienten dar; beispielsweise durch die Verwendung Melanotransferrin elektroporierter DC, aber möglicherweise auch durch Einsatz bei Infektionskrankheiten.

F. Literaturverzeichnis

Abdel-Wahab, Z., et al., *Induction of anti-melanoma CTL response using DC transfected with mutated mRNA encoding full-length Melan-A/MART-1 antigen with an A27L amino acid substitution.* Cell Immunol, **2003**. 224(2): p. 86-97.

Ackerman, A.L., et al., *Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells.* Nat Immunol, **2005**. 6 (1): p. 107-13.

Alard, P., S.L. Clark, and M.M. Kosiewicz, *Mechanisms of tolerance induced by TGF beta-treated APC: CD4 regulatory T cells prevent the induction of the immune response possibly through a mechanism involving TGF beta.* Eur J Immunol, **2004**. 34(4): p. 1021-30.

Alegre, M.L., K.A. Frauwirth, and C.B. Thompson, *T-cell regulation by CD28 and CTLA-4.* Nat Rev Immunol, **2001**. 1(3): p. 220-8.

Anichini, A., et al., *Cytotoxic T cells directed to tumor antigens not expressed on normal melanocytes dominate HLA-A2.1-restricted immune repertoire to melanoma.* J Immunol, **1996**. 156(1): p. 208-17.

Appella, E., E.A. Padlan, and D.F. Hunt, *Analysis of the structure of naturally processed peptides bound by class I and class II major histocompatibility complex molecules.* Exs, **1995**. 73: p. 105-19.

Appleman, L.J. and V.A. Boussiotis, *T cell anergy and costimulation.* Immunol Rev, **2003**. 192: p. 161-80.

Armandola, E.A., et al., *A point mutation in the human transporter associated with antigen processing (TAP2) alters the peptide transport specificity.* Eur J Immunol, **1996**. 26(8): p. 1748-55.

Atallah, E. and L. Flaherty, *Treatment of metastatic malignant melanoma.* Curr Treat Options Oncol, **2005**. 6(3): p. 185-93.

Ausubel, L.J., et al., *Functional tolerance is maintained despite proliferation of CD4 T cells after encounter with tissue-derived antigen.* Dev Immunol, **2002**. 9(3): p. 173-6.

Bailey, T.C., et al., *Quantitative analysis of cytomegalovirus viremia in lung transplant recipients.* J Infect Dis, **1995**. 171(4): p. 1006-10.

Baker, E.N., et al., *Human melanotransferrin (p97) has only one functional iron binding site.* FEBS Lett, **1992**. 298(2-3): p. 215-8.

Bakker, A.B., et al., *Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes.* J Exp Med, **1994**. 179(3): p. 1005-9.

Balch, C.M., *Surgical margins for melanoma: is 2 cm too much?* ANZ J Surg, **2002**. 72(4): p. 251-2.

- Banchereau, J.**, et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, **2000**. 18: p. 767-811.
- Banchereau, J.** and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. *Nature*, **1998**. 392(6673): p. 245-52.
- Baum, C.**, et al., *An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines*. *Biotechniques*, **1994**. 17(6): p. 1058-62.
- Beckhove, P.**, et al., *Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors*. *J Clin Invest*, **2004**. 114(1): p. 67-76.
- Bier, J.** and E. Macher, *[Spontaneous remission of malignant melanomas]*. *Fortschr Kiefer Gesichtschir*, **1988**. 33: p. 171-2.
- Bocko, D.** and I. Frydecka, *[Structure and function of lymphocyte TCR/CD3 complex]*. *Postepy Hig Med Dosw*, **2003**. 57(5): p. 519-29.
- Boczkowski, D.**, et al., *Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo*. *J Exp Med*, **1996**. 184(2): p. 465-72.
- Bonehill, A.**, et al., *Efficient presentation of known HLA class II-restricted MAGE-A3 epitopes by dendritic cells electroporated with messenger RNA encoding an invariant chain with genetic exchange of class II-associated invariant chain peptide*. *Cancer Res*, **2003**. 63(17): p. 5587-94.
- Boon, T.**, P.G. Coulie, and B. Van den Eynde, *Tumor antigens recognized by T cells*. *Immunol Today*, **1997**. 18(6): p. 267-8.
- Brenner, B.**, et al., *Older age and second skin cancer as prognostic factors in localized malignant melanomas*. *Oncol Rep*, **2003**. 10(6): p. 2051-7.
- Breslow, N.**, et al., *Prognostic factors in nonmetastatic, favorable histology Wilms' tumor. Results of the Third National Wilms' Tumor Study*. *Cancer*, **1991**. 68(11): p. 2345-53.
- Brichard, V.**, et al., *The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. *J Exp Med*, **1993**. 178(2): p. 489-95.
- Brode, S.** and P.A. Macary, *Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew!* *Immunology*, **2004**. 112(3): p. 345-51.
- Brown, J.P.**, et al., *Human melanoma-associated antigen p97 is structurally and functionally related to transferrin*. *Nature*, **1982**. 296(5853): p. 171-3.
- Brown, J.P.**, et al., *Quantitative analysis of melanoma-associated antigen p97 in normal and neoplastic tissues*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1981**. 78(1): p. 539-43.
- Bucy, R.P.**, et al., *Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations*. *J Exp Med*, **1994**. 180(4): p. 1251-62.

- Burmeister, B.H.**, et al., *Radiation therapy for nodal disease in malignant melanoma*. World J Surg, **1995**. 19(3): p. 369-71.
- Buzaid, A.C.**, et al., *Phase II study of interferon alfa-2a, recombinant (Roferon-A) in metastatic renal cell carcinoma*. J Clin Oncol, **1987**. 5(7): p. 1083-9.
- Castelli, C.**, et al., *T-cell recognition of melanoma-associated antigens*. J Cell Physiol, **2000**. 182(3): p. 323-31.
- Castelli, C.**, et al., *Novel HLA-Cw8-restricted T cell epitopes derived from tyrosinase-related protein-2 and gp100 melanoma antigens*. J Immunol, **1999**. 162(3): p. 1739-48.
- Cella, D.** and K. Webster, *Linking outcomes management to quality-of-life measurement*. Oncology (Williston Park), **1997**. 11(11A): p. 232-5.
- Cella, M.**, et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells*. Nature, **1997**. 388(6644): p. 782-7.
- Cella, M.**, F. Sallusto, and A. Lanzavecchia, *Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells*. Curr Opin Immunol, **1997**. 9(1): p. 10-6.
- Cerundolo, V.**, et al., *The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells*. Eur J Immunol, **1997**. 27(1): p. 336-41.
- Chapatte, L.**, et al., *Final antigenic Melan-A peptides produced directly by the proteasomes are preferentially selected for presentation by HLA-A*0201 in melanoma cells*. J Immunol, **2004**. 173(10): p. 6033-40.
- Chidgey, A.P.** and R.L. Boyd, *Thymic stromal cells and positive selection*. Apms, **2001**. 109(7-8): p. 481-92.
- Cohen, B.D.**, et al., *Regulation of follitropin receptor cell surface residency by the ubiquitin-proteasome pathway*. Endocrinology, **2003**. 144(10): p. 4393-402.
- Cormier, J.N.**, et al., *Enhancement of cellular immunity in melanoma patients immunized with a peptide from MART-1/Melan A*. Cancer J Sci Am, **1997**. 3(1): p. 37-44.
- Coughlin, C.M.**, et al., *RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy*. Blood, **2004**. 103(6): p. 2046-54.
- Coulie, P.G.**, et al., *A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. J Exp Med, **1994**. 180(1): p. 35-42.
- Cox, A.L.**, et al., *Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines*. Science, **1994**. 264(5159): p. 716-9.
- Cresswell, P.**, *Antigen presentation. Getting peptides into MHC class II molecules*. Curr Biol, **1994**. 4(6): p. 541-3.

- Cresswell, P.**, et al., *The nature of the MHC class I peptide loading complex*. Immunol Rev, **1999**. 172: p. 21-8.
- Czarnetzki, B.M.**, et al., *Current status of melanoma chemotherapy and immunotherapy*. Recent Results Cancer Res, **1982**. 80: p. 264-8.
- Daumke, O.** and M.R. Knittler, *Functional asymmetry of the ATP-binding-cassettes of the ABC transporter TAP is determined by intrinsic properties of the nucleotide binding domains*. Eur J Biochem, **2001**. 268(17): p. 4776-86.
- Dietz, A.B.** and S. Vuk-Pavlovic, *High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells*. Blood, **1998**. 91(2): p. 392-8.
- D'Souza, S.**, et al., *Circulating Melan-A/Mart-1 specific cytolytic T lymphocyte precursors in HLA-A2+ melanoma patients have a memory phenotype*. Int J Cancer, **1998**. 78(6): p. 699-706.
- Eichmuller, S.**, et al., *Tumor-specific antigens in cutaneous T-cell lymphoma: expression and sero-reactivity*. Int J Cancer, **2003**. 104(4): p. 482-7.
- Eisner, R.M.**, A. Husain, and J.I. Clark, *Case report and brief review: IL-2-induced myocarditis*. Cancer Invest, **2004**. 22(3): p. 401-4.
- Elder, D.E.**, et al., *Optimal resection margin for cutaneous malignant melanoma*. Plast Reconstr Surg, **1983**. 71(1): p. 66-72.
- Elkord, E.**, et al., *Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells*. Immunology, **2005**. 114(2): p. 204-12.
- Elmadbouh, I.**, et al., *Optimization of in vitro vascular cell transfection with non-viral vectors for in vivo applications*. J Gene Med, **2004**. 6(10): p. 1112-24.
- Eton, O.**, et al., *Phase I trial of subcutaneous recombinant human interleukin-2 in patients with metastatic melanoma*. Cancer, **2002**. 95(1): p. 127-34.
- Filaci, G.**, et al., *Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes*. Clin Exp Med, **2004**. 4(2): p. 86-92.
- Flechsler, I.**, et al., *Comparison of antisense vectors and antisense oligonucleotides delivered by means of the new cationic lipids unifectin and maxifectin*. Adv Exp Med Biol, **1998**. 451: p. 469-72.
- Foster, A.E.**, et al., *Large-scale expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells in suspension culture*. Biotechnol Bioeng, **2004**. 85(2): p. 138-46.
- Furumoto, H.** and M. Irahara, *Human papilloma virus (HPV) and cervical cancer*. J Med Invest, **2002**. 49(3-4): p. 124-33.
- Gaertner, E.M.**, et al., *Interdigitating dendritic cell sarcoma. A report of four cases and review of the literature*. Am J Clin Pathol, **2001**. 115(4): p. 589-97.

- Gilboa, E.,** S.K. Nair, and H.K. Lysterly, *Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines*. *Cancer Immunol Immunother*, **1998**. 46(2): p. 82-7.
- Gluzman, Y.,** *SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants*. *Cell*, **1981**. 23(1): p. 175-82.
- Goodnow, C.C.,** et al., *Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity*. *Nature*, **2005**. 435(7042): p. 590-7.
- Gordillo, G.M.,** et al., *Gene therapy in transplantation: pathological consequences of unavoidable plasmid contamination with lipopolysaccharide*. *Transpl Immunol*, **1999**. 7(2): p. 83-94.
- Gresch, O.,** et al., *New non-viral method for gene transfer into primary cells*. *Methods*, **2004**. 33(2): p. 151-63.
- Grin-Jorgensen, C.,** A. Berke, and M. Grin, *Ocular melanoma*. *Dermatol Clin*, **1992**. 10(4): p. 663-8.
- Groettrup, M.,** et al., *The subunits MECL-1 and LMP2 are mutually required for incorporation into the 20S proteasome*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **1997**. 94(17): p. 8970-5.
- Guinan, E.C.,** et al., *Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity*. *Blood*, **1994**. 84(10): p. 3261-82.
- Gust, T.C.,** et al., *RNA-containing adenovirus/polyethylenimine transfer complexes effectively transduce dendritic cells and induce antigen-specific T cell responses*. *J Gene Med*, **2004**. 6(4): p. 464-70.
- Harari, A.,** S.C. Zimmerli, and G. Pantaleo, *Cytomegalovirus (CMV)-specific cellular immune responses*. *Hum Immunol*, **2004**. 65(5): p. 500-6.
- Harris, C.C.,** *Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology, and human risk assessment*. *Prev Med*, **1996**. 25(1): p. 10-2.
- Hay, E.D.,** *Extracellular matrix, cell skeletons, and embryonic development*. *Am J Med Genet*, **1989**. 34(1): p. 14-29.
- Heiser, A.,** et al., *Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors*. *J Clin Invest*, **2002**. 109(3): p. 409-17.
- Henkart, P.A.,** *Mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity*. *Annu Rev Immunol*, **1985**. 3: p. 31-58.
- Hersey, P.,** et al., *Expression of the co-stimulatory molecule B7 on melanoma cells*. *Int J Cancer*, **1994**. 58(4): p. 527-32.
- Hofbauer, G.F.,** et al., *Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution*. *Melanoma Res*, **1998**. 8(4): p. 337-43.

- Hultenschmidt, B.**, et al., *Results of radiotherapy for 230 patients with stage I-II seminomas*. *Strahlenther Onkol*, **1996**. 172(4): p. 186-92.
- Humrich, J.** and L. Jenne, *Viral vectors for dendritic cell-based immunotherapy*. *Curr Top Microbiol Immunol*, **2003**. 276: p. 241-59.
- Huncharek, M.** and B. Kupelnick, *Chemotherapeutic prophylaxis of superficial bladder tumors*. *Oncology (Williston Park)*, **2001**. 15(9): p. 1106.
- Hurst, R.**, et al., *Brain metastasis after immunotherapy in patients with metastatic melanoma or renal cell cancer: is craniotomy indicated?* *J Immunother*, **1999**. 22(4): p. 356-62.
- Inaba, K.**, et al., *Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo*. *J Exp Med*, **1993**. 178(2): p. 479-88.
- Jemal, A.**, et al., *Recent trends in cutaneous melanoma incidence among whites in the United States*. *J Natl Cancer Inst*, **2001**. 93(9): p. 678-83.
- Jiang, H.R.**, et al., *Secretion of interleukin-10 or interleukin-12 by LPS-activated dendritic cells is critically dependent on time of stimulus relative to initiation of purified DC culture*. *J Leukoc Biol*, **2002**. 72(5): p. 978-85.
- Jiang, W.**, et al., *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing*. *Nature*, **1995**. 375(6527): p. 151-5.
- Kahn, M.**, et al., *CD4+ T cell clones specific for the human p97 melanoma-associated antigen can eradicate pulmonary metastases from a murine tumor expressing the p97 antigen*. *J Immunol*, **1991**. 146(9): p. 3235-41.
- Kalady, M.F.**, et al., *Enhanced dendritic cell antigen presentation in RNA-based immunotherapy*. *J Surg Res*, **2002**. 105(1): p. 17-24.
- Kawakami, Y.**, et al., *Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-infiltrating T lymphocytes associated with in vivo tumor regression*. *J Immunol*, **1995**. 154(8): p. 3961-8.
- Kawakami, Y.**, P.F. Robbins, and S.A. Rosenberg, *Human melanoma antigens recognized by T lymphocytes*. *Keio J Med*, **1996**. 45(2): p. 100-8.
- Kawakami, Y.**, et al., *Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, -A2, and -A3 alleles*. *J Immunol*, **1998**. 161(12): p. 6985-92.
- Kennard, M.L.**, et al., *A novel iron uptake mechanism mediated by GPI-anchored human p97*. *Embo J*, **1995**. 14(17): p. 4178-86.
- Kiessling, R.**, et al., *Cellular immunity to the Her-2/neu protooncogene*. *Adv Cancer Res*, **2002**. 85: p. 101-44.

- Kirk, C.J.** and J.J. Mule, *Gene-modified dendritic cells for use in tumor vaccines*. Hum Gene Ther, **2000**. 11(6): p. 797-806.
- Kirkin, A.F.**, K. Dzhandzhugazyan, and J. Zeuthen, *The immunogenic properties of melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes*. Exp Clin Immunogenet, **1998**. 15(1): p. 19-32.
- Kittlesen, D.J.**, et al., *Human melanoma patients recognize an HLA-A1-restricted CTL epitope from tyrosinase containing two cysteine residues: implications for tumor vaccine development*. J Immunol, **1998**. 160(5): p. 2099-106.
- Korner, A.** and J. Pawelek, *Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin*. Science, **1982**. 217(4565): p. 1163-5.
- Kropshofer, H.**, et al., *HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH*. Immunity, **1997**. 6(3): p. 293-302.
- Kropshofer, H.**, G.J. Hammerling, and A.B. Vogt, *How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest?* Immunol Today, **1997**. 18(2): p. 77-82.
- Kruger, T.**, et al., *Lessons to be learned from primary renal cell carcinomas: novel tumor antigens and HLA ligands for immunotherapy*. Cancer Immunol Immunother, **2005**. 54(9): p. 826-36.
- Kugler, A.**, et al., *Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids*. Nat Med, **2000**. 6(3): p. 332-6.
- Kunze, J.**, et al., *[Intrafocal BCG therapy of metastasizing malignant melanoma]*. Hautarzt, **1978**. 29(11): p. 597-600.
- Lacey, S.F.**, et al., *Relative dominance of HLA-B*07 restricted CD8+ T-lymphocyte immune responses to human cytomegalovirus pp65 in persons sharing HLA-A*02 and HLA-B*07 alleles*. Hum Immunol, **2003**. 64(4): p. 440-52.
- Landthaler, M.**, et al., *Excisional biopsy as the first therapeutic procedure versus primary wide excision of malignant melanoma*. Cancer, **1989**. 64(8): p. 1612-6.
- Liao, S.C.**, et al., *IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients*. J Immunol, **2004**. 173(11): p. 6712-8.
- Liao, X.**, et al., *Transfection of RNA encoding tumor antigens following maturation of dendritic cells leads to prolonged presentation of antigen and the generation of high-affinity tumor-reactive cytotoxic T lymphocytes*. Mol Ther, **2004**. 9(5): p. 757-64.
- Lin, H.S.**, *Adaptation and cross-resistance: an explanation for the existence of different radiosensitivities among malignant melanoma cells*. Med Hypotheses, **1995**. 44(1): p. 73-6.
- Lohmann, S.**, et al., *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, **2000**. 7(4): p. 605-14.

- Lomuto, M.**, P. Calabrese, and A. Giuliani, *Prognostic signs in melanoma: state of the art*. J Eur Acad Dermatol Venereol, **2004**. 18(3): p. 291-300.
- Luo, D.** and W.M. Saltzman, *Synthetic DNA delivery systems*. Nat Biotechnol, **2000**. 18(1): p. 33-7.
- Macagno, A.**, et al., *Pronounced up-regulation of the PA28alpha/beta proteasome regulator but little increase in the steady-state content of immunoproteasome during dendritic cell maturation*. Eur J Immunol, **2001**. 31(11): p. 3271-80.
- Maguire, H.C.**, Jr., et al., *Phase I study of R24 in patients with metastatic melanoma including evaluation of immunologic parameters*. Cancer Biother Radiopharm, **1998**. 13(1): p. 13-23.
- Malone, R.W.**, P.L. Felgner, and I.M. Verma, *Cationic liposome-mediated RNA transfection*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1989**. 86(16): p. 6077-81.
- Manici, S.**, et al., *Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11*. J Exp Med, **1999**. 189(5): p. 871-6.
- Maranon, C.**, et al., *Dendritic cells cross-present HIV antigens from live as well as apoptotic infected CD4+ T lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2004**. 101(16): p. 6092-7.
- Marchand, M.**, et al., *Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1*. Int J Cancer, **1999**. 80(2): p. 219-30.
- Marks, R.**, *An overview of skin cancers. Incidence and causation*. Cancer, **1995**. 75(2 Suppl): p. 607-12.
- Martinez, X.**, et al., *CD8+ T Cell Tolerance in Nonobese Diabetic Mice Is Restored by Insulin-Dependent Diabetes Resistance Alleles*. J Immunol, **2005**. 175(3): p. 1677-85.
- Mashiah, J.** and S. Brenner, *Malignant melanoma: it pays to be a woman*. Skinmed, **2003**. 2(3): p. 183-7.
- Mathis, D.** and C. Benoist, *Back to central tolerance*. Immunity, **2004**. 20(5): p. 509-16.
- McLaughlin-Taylor, E.**, et al., *Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes*. J Med Virol, **1994**. 43(1): p. 103-10.
- Melkonyan, H.**, C. Sorg, and M. Klempt, *Electroporation efficiency in mammalian cells is increased by dimethyl sulfoxide (DMSO)*. Nucleic Acids Res, **1996**. 24(21): p. 4356-7.
- Miller, J.F.** and A. Basten, *Mechanisms of tolerance to self*. Curr Opin Immunol, **1996**. 8(6): p. 815-21.
- Mitchell, D.A.** and S.K. Nair, *RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy*. J Clin Invest, **2000**. 106(9): p. 1065-9.

- Moll, H.**, *Experimental cutaneous leishmaniasis: Langerhans cells internalize Leishmania major and induce an antigen-specific T-cell response.* Adv Exp Med Biol, **1993**. 329: p. 587-92.
- Morel, S.**, et al., *Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells.* Immunity, **2000**. 12(1): p. 107-17.
- Mosmann, T.R.**, et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* J Immunol, **1986**. 136(7): p. 2348-57.
- Nachbar, F.**, et al., *The ABCD rule of dermatoscopy. High prospective value in the diagnosis of doubtful melanocytic skin lesions.* J Am Acad Dermatol, **1994**. 30(4): p. 551-9.
- Nestle, F.O.**, et al., *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells.* Nat Med, **1998**. 4(3): p. 328-32.
- Nishioka, E.**, et al., *Expression of tyrosinase, TRP-1 and TRP-2 in ultraviolet-irradiated human melanomas and melanocytes: TRP-2 protects melanoma cells from ultraviolet B induced apoptosis.* Melanoma Res, **1999**. 9(5): p. 433-43.
- Nojima, H.**, et al., *Dynamic characteristics of a peptide-binding groove of human HLA-A2 class I MHC molecules: normal mode analysis of the antigen peptide-class I MHC complex.* Chem Pharm Bull (Tokyo), **2002**. 50(9): p. 1209-14.
- Noppen, C.**, et al., *Naturally processed and concealed HLA-A2.1-restricted epitopes from tumor-associated antigen tyrosinase-related protein-2.* Int J Cancer, **2000**. 87(2): p. 241-6.
- Northrop, J.K.** and H. Shen, *CD8+ T-cell memory: only the good ones last.* Curr Opin Immunol, **2004**. 16(4): p. 451-5.
- Nouri-Shirazi, M.**, et al., *Dendritic cells capture killed tumor cells and present their antigens to elicit tumor-specific immune responses.* J Immunol, **2000**. 165(7): p. 3797-803.
- Osman, Y.**, et al., *Generation of Ag-specific cytotoxic T lymphocytes by DC transfected with in vitro transcribed influenza virus matrix protein (M1) mRNA.* Cytotherapy, **2003**. 5(2): p. 161-8.
- Ossendorp, F.**, et al., *Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors.* J Exp Med, **1998**. 187(5): p. 693-702.
- Osterlind, A.**, *Hormonal and reproductive factors in melanoma risk.* Clin Dermatol, **1992**. 10(1): p. 75-8.
- Pai, S.**, et al., *RelB nuclear translocation mediated by C-terminal activator regions of Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 and its effect on antigen-presenting function in B cells.* J Virol, **2002**. 76(4): p. 1914-21.

- Panelli, M.C.**, et al., *A genomic- and proteomic-based hypothesis on the eclectic effects of systemic interleukin-2 administration in the context of melanoma-specific immunization*. *Cells Tissues Organs*, **2004**. 177(3): p. 124-31.
- Pardoll, D.**, *Does the immune system see tumors as foreign or self?* *Annu Rev Immunol*, **2003**. 21: p. 807-39.
- Pardoll, D.M.** and S.L. Topalian, *The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity*. *Curr Opin Immunol*, **1998**. 10(5): p. 588-94.
- Parmiani, G.**, *Melanoma antigens and their recognition by T cells*. *Keio J Med*, **2001**. 50(2): p. 86-90.
- Parmiani, G.**, et al., *Immunotherapy of melanoma*. *Semin Cancer Biol*, **2003**. 13(6): p. 391-400.
- Paschen, A.**, S. Eichmuller, and D. Schadendorf, *Identification of tumor antigens and T-cell epitopes, and its clinical application*. *Cancer Immunol Immunother*, **2004**. 53(3): p. 196-203.
- Pass, R.F.**, *Epidemiology and transmission of cytomegalovirus*. *J Infect Dis*, **1985**. 152(2): p. 243-8.
- Pearce, M.S.**, et al., *Skin cancer in children and young adults: 28 years' experience from the Northern Region Young Person's Malignant Disease Registry, UK*. *Melanoma Res*, **2003**. 13(4): p. 421-6.
- Pehamberger, H.**, *Perspectives of pegylated interferon use in dermatological oncology*. *Recent Results Cancer Res*, **2002**. 160: p. 158-64.
- Perez, M.**, *Advances in dermatologic surgery*. *Dermatol Clin*, **1997**. 15(1): p. 9-18.
- Peterson, P.A.**, et al., *Structural studies of beta2-microglobulin-associated and other MHC antigens*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **1977**. 41 Pt 1: p. 331-9.
- Pion, S.**, et al., *Shaping the repertoire of cytotoxic T-lymphocyte responses: explanation for the immunodominance effect whereby cytotoxic T lymphocytes specific for immunodominant antigens prevent recognition of nondominant antigens*. *Blood*, **1999**. 93(3): p. 952-62.
- Pittet, M.J.**, et al., *High frequencies of naive Melan-A/MART-1-specific CD8(+) T cells in a large proportion of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 individuals*. *J Exp Med*, **1999**. 190(5): p. 705-15.
- Powell, D.J.**, Jr. and S.A. Rosenberg, *Phenotypic and functional maturation of tumor antigen-reactive CD8+ T lymphocytes in patients undergoing multiple course peptide vaccination*. *J Immunother*, **2004**. 27(1): p. 36-47.
- Pugliese, A.**, *Central and peripheral autoantigen presentation in immune tolerance*. *Immunology*, **2004**. 111(2): p. 138-46.

- Rahimi-Movaghar, V.** and M. Karimi, *Meningeal melanocytoma of the brain and oculodermal melanocytosis (nevus of Ota): case report and literature review*. Surg Neurol, **2003**. 59(3): p. 200-10.
- Redchenko, I.V.** and A.B. Rickinson, *Assessing Epstein-Barr virus-specific T-cell memory with peptide-loaded dendritic cells*. J Virol, **1999**. 73(1): p. 334-42.
- Redmond, W.L.** and L.A. Sherman, *Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes*. Immunity, **2005**. 22(3): p. 275-84.
- Reed, R.J.** and P. Martin, *Variants of melanoma*. Semin Cutan Med Surg, 1997. 16(2): p. 137-58.
- Reid-Nicholson, M.**, et al., *Sarcomatoid carcinoma of the small intestine: a case report and review of the literature*. Arch Pathol Lab Med, **2004**. 128(8): p. 918-21.
- Reis e Sousa, C.**, *Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls*. Semin Immunol, **2004**. 16(1): p. 27-34.
- Renkvist, N.**, et al., *A listing of human tumor antigens recognized by T cells*. Cancer Immunol Immunother, **2001**. 50(1): p. 3-15.
- Richardson, D.R.**, *The role of the membrane-bound tumour antigen, melanotransferrin (p97), in iron uptake by the human malignant melanoma cell*. Eur J Biochem, **2000**. 267(5): p. 1290-8.
- Ridge, J.P.**, F. Di Rosa, and P. Matzinger, *A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell*. Nature, **1998**. 393(6684): p. 474-8.
- Rivoltini, L.**, et al., *Induction of tumor-reactive CTL from peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes of melanoma patients by in vitro stimulation with an immunodominant peptide of the human melanoma antigen MART-1*. J Immunol, **1995**. 154(5): p. 2257-65.
- Rivoltini, L.**, et al., *A superagonist variant of peptide MART1/Melan A27-35 elicits anti-melanoma CD8+ T cells with enhanced functional characteristics: implication for more effective immunotherapy*. Cancer Res, 1999. 59(2): p. 301-6. Robbins, P.D., H. Tahara, and S.C. Ghivizzani, *Viral vectors for gene therapy*. Trends Biotechnol, **1998**. 16(1): p. 35-40.
- Roizman, B.**, et al., *Herpesviridae. Definition, provisional nomenclature, and taxonomy*. The Herpesvirus Study Group, the International Committee on Taxonomy of Viruses. Intervirology, **1981**. 16(4): p. 201-17.
- Röhn, T.A.** *Inaugural-Dissertation, Endogene und tumorassoziierte MHC Klasse II-Liganden in humanen dendritischen Zellen*, Publikationsdatum 13.05.2004 <http://w210.ub.uni-tuebingen.de/dbt/volltexte/2004/1222/>
- Romagnani, S.**, *Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease*. Int J Clin Lab Res, **1991**. 21(2): p. 152-8.

- Romani, N.**, et al., *Dendritic cell production of cytokines and responses to cytokines*. Int Rev Immunol, **1990**. 6(2-3): p. 151-61.
- Romero, P.**, et al., *Cytolytic T lymphocyte recognition of the immunodominant HLA-A*0201-restricted Melan-A/MART-1 antigenic peptide in melanoma*. J Immunol, **1997**. 159(5): p. 2366-74.
- Rose, T.M.**, et al., *Primary structure of the human melanoma-associated antigen p97 (melanotransferrin) deduced from the mRNA sequence*. Proc Natl Acad Sci U S A, **1986**. 83(5): p. 1261-5.
- Rosenberg, S.A.** and M.E. Dudley, *Cancer regression in patients with metastatic melanoma after the transfer of autologous antitumor lymphocytes*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2004**. 101 Suppl 2: p. 14639-45.
- Rubinfeld, B.**, et al., *Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines*. Science, **1997**. 275(5307): p. 1790-2.
- Sack, H.**, [*Is radiotherapy curative for stage-I and -II low-grade follicular lymphomas? The results a long-term follow-up study of patients treated at Stanford University*]. Strahlenther Onkol, **1996**. 172(12): p. 691-3.
- Sallusto, F.**, et al., *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, **1995**. 182(2): p. 389-400.
- Salter, R.D.** and P. Cresswell, *Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid*. Embo J, **1986**. 5(5): p. 943-9.
- Santin, A.D.**, et al., *Expression of surface antigens during the differentiation of human dendritic cells vs macrophages from blood monocytes in vitro*. Immunobiology, **1999**. 200(2): p. 187-204.
- Scanlan, M.J.**, et al., *Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy*. Immunol Rev, **2002**. 188: p. 22-32.
- Schadendorf, D.**, *Gene-based therapy of malignant melanoma*. Semin Oncol, **2002**. 29(5): p. 503-12.
- Schaft, N.**, et al., *Generation of an optimized polyvalent monocyte-derived dendritic cell vaccine by transfecting defined RNAs after rather than before maturation*. J Immunol, **2005**. 174(5): p. 3087-97.
- Scheibenbogen, C.**, et al., *Identification of known and novel immunogenic T-cell epitopes from tumor antigens recognized by peripheral blood T cells from patients responding to IL-2-based treatment*. Int J Cancer, **2002**. 98(3): p. 409-14.
- Schmidt, C.S.** and M.F. Mescher, *Peptide antigen priming of naive, but not memory, CD8 T cells requires a third signal that can be provided by IL-12*. J Immunol, **2002**. 168(11): p. 5521-9.

- Schmitt, D.**, [The Langerhans cell: from in vitro production to use in cellular immunotherapy]. *J Soc Biol*, **2001**. 195(1): p. 69-74.
- Schott, M.**, et al., *Induction of cellular immunity in a parathyroid carcinoma treated with tumor lysate-pulsed dendritic cells*. *Eur J Endocrinol*, **2000**. 142(3): p. 300-6.
- Schultze, J.L.**, S. Grabbe, and M.S. von Bergwelt-Baildon, *DCs and CD40-activated B cells: current and future avenues to cellular cancer immunotherapy*. *Trends Immunol*, **2004**. 25(12): p. 659-64.
- Sciot, R.**, et al., *In situ localization of melanotransferrin (melanoma-associated antigen P97) in human liver. A light- and electronmicroscopic immunohistochemical study*. *Liver*, **1989**. 9(2): p. 110-9.
- Scott, A.M.**, et al., *Immunological effects of chimeric anti-GD3 monoclonal antibody KM871 in patients with metastatic melanoma*. *Cancer Immun*, **2005**. 5: p. 3.
- Sette, A.**, et al., *The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes*. *J Immunol*, **1994**. 153(12): p. 5586-92.
- Skarlos, D.V.**, et al., *Randomized comparison of early versus late hyperfractionated thoracic irradiation concurrently with chemotherapy in limited disease small-cell lung cancer: a randomized phase II study of the Hellenic Cooperative Oncology Group (HeCOG)*. *Ann Oncol*, **2001**. 12(9): p. 1231-8.
- Sober, A.J.**, et al., *Epidemiology of cutaneous melanoma. An update*. *Dermatol Clin*, **1991**. 9(4): p. 617-29.
- Sprent, J.** and H. Kishimoto, *The thymus and negative selection*. *Immunol Rev*, **2002**. 185: p. 126-35.
- Steinman, R.M.**, *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. *Annu Rev Immunol*, **1991**. 9: p. 271-96.
- Steinman, R.M.** and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. *J Exp Med*, **1973**. 137(5): p. 1142-62.
- Stinski, M.F.**, et al., *Organization and expression of the immediate early genes of human cytomegalovirus*. *J Virol*, **1983**. 46(1): p. 1-14
- Strobel, I.**, et al., *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*, **2000**. 7(23): p. 2028-35.
- Stumptner, P.** and P. Benaroch, *Interaction of MHC class II molecules with the invariant chain: role of the invariant chain (81-90) region*. *Embo J*, **1997**. 16(19): p. 5807-18.
- Sun, Y.**, et al., *Identification of a new HLA-A(*)0201-restricted T-cell epitope from the tyrosinase-related protein 2 (TRP2) melanoma antigen*. *Int J Cancer*, **2000**. 87(3): p. 399-404.

ten Bosch, G.J., et al., *A BCR-ABL oncoprotein p210b2a2 fusion region sequence is recognized by HLA-DR2a restricted cytotoxic T lymphocytes and presented by HLA-DR matched cells transfected with an Ii(b2a2) construct.* Blood, **1999**. 94(3): p. 1038-45.

Thai, R., et al., *Antigen stability controls antigen presentation.* J Biol Chem, **2004**. 279(48): p. 50257-66.

Turner, B., et al., *Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma.* J Exp Med, **1999**. 190(11): p. 1669-78.

Topalian, S.L., *MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy.* Curr Opin Immunol, **1994**. 6(5): p. 741-5.

Topalian, S.L., et al., *Melanoma-specific CD4+ T lymphocytes recognize human melanoma antigens processed and presented by Epstein-Barr virus-transformed B cells.* Int J Cancer, **1994**. 58(1): p. 69-79.

Touloukian, C.E., et al., *Expression of a "self-"antigen by human tumor cells enhances tumor antigen-specific CD4(+) T-cell function.* Cancer Res, **2002**. 62(18): p. 5144-7.

Tung, J.W., et al., *New approaches to fluorescence compensation and visualization of FACS data.* Clin Immunol, **2004**. 110(3): p. 277-83.

Tuting, T., et al., *Induction of tumor antigen-specific immunity using plasmid DNA immunization in mice.* Cancer Gene Ther, **1999**. 6(1): p. 73-80.

Tuyaerts, S., et al., *Induction of Influenza Matrix Protein 1 and MelanA-specific T lymphocytes in vitro using mRNA-electroporated dendritic cells.* Cancer Gene Ther, **2003**. 10(9): p. 696-706.

Usener, D., et al., *Seroreactivity against MAGE-A and LAGE-1 proteins in melanoma patients.* Br J Dermatol, **2003**. 149(2): p. 282-8.

Valmori, D., et al., *Enhanced generation of specific tumor-reactive CTL in vitro by selected Melan-A/MART-1 immunodominant peptide analogues.* J Immunol, **1998**. 160(4): p. 1750-8.

Valmori, D., et al., *Circulating Tumor-reactive CD8(+) T cells in melanoma patients contain a CD45RA(+)CCR7(-) effector subset exerting ex vivo tumor-specific cytolytic activity.* Cancer Res, **2002**. 62(6): p. 1743-50.

Van den Eynde, B., et al., *Presence on a human melanoma of multiple antigens recognized by autologous CTL.* Int J Cancer, **1989**. 44(4): p. 634-40.

van der Burg, S.H., et al., *Identification of a conserved universal Th epitope in HIV-1 reverse transcriptase that is processed and presented to HIV-specific CD4+ T cells by at least four unrelated HLA-DR molecules.* J Immunol, **1999**. 162(1): p. 152-60.

Van Tendeloo, V.F., et al., *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, **2001**. 98(1): p. 49-56.

Vertuani, S., et al., *Improved immunogenicity of an immunodominant epitope of the HER-2/neu protooncogene by alterations of MHC contact residues.* J Immunol, **2004**. 172(6): p. 3501-8.

Villacres, M.C., et al., *Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion.* Hum Immunol, **2004**. 65(5): p. 476-85.

von Herrath, M.G. and L.C. Harrison, *Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity.* Nat Rev Immunol, **2003**. 3(3): p. 223-32.

Walker, E.B., et al., *gp100(209-2M) peptide immunization of human lymphocyte antigen-A2+ stage I-III melanoma patients induces significant increase in antigen-specific effector and long-term memory CD8+ T cells.* Clin Cancer Res, **2004**. 10(2): p. 668-80.

Wang, R.F., et al., *Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes.* J Exp Med, **1995**. 181(2): p. 799-804.

Wang, R.F. and S.A. Rosenberg, *Human tumor antigens recognized by T lymphocytes: implications for cancer therapy.* J Leukoc Biol, **1996**. 60(3): p. 296-309.

Weinreich, D.M. and S.A. Rosenberg, *Response rates of patients with metastatic melanoma to high-dose intravenous interleukin-2 after prior exposure to alpha-interferon or low-dose interleukin-2.* J Immunother, **2002**. 25(2): p. 185-7.

Wills, M.R., et al., *The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL.* J Virol, **1996**. 70(11): p. 7569-79.

Wolf, H., et al., *Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells.* Biophys J, **1994**. 66(2 Pt 1): p. 524-31.

Wolfel, T., et al., *Analysis of antigens recognized on human melanoma cells by A2-restricted cytolytic T lymphocytes (CTL).* Int J Cancer, **1993**. 55(2): p. 237-44.

Wolfel, T., et al., *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma.* Science, **1995**. 269(5228): p. 1281-4.

Woodbury, R.G., et al., *Identification of a cell surface protein, p97, in human melanomas and certain other neoplasms.* Proc Natl Acad Sci U S A, **1980**. 77(4): p. 2183-7.

Yee, C., et al., *Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers.* J Immunol, **1999**. 162(4): p. 2227-34.

Zamoyska, R. and M. Lovatt, *Signalling in T-lymphocyte development: integration of signalling pathways is the key.* Curr Opin Immunol, **2004**. 16(2): p. 191-6.

Zehn, D., et al., *Extended presentation of specific MHC-peptide complexes by mature dendritic cells compared to other types of antigen-presenting cells.* Eur J Immunol, **2004**. 34(6): p. 1551-60.

Zippelius, A., et al., *Thymic selection generates a large T cell pool recognizing a self-peptide in humans.* J Exp Med, **2002**. 195(4): p. 485-94.

Zou, G.M. and Y.K. Tam, *Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances.* Eur Cytokine Netw, **2002**. 13(2): p. 186-99.

G. Anhang

Veröffentlichungen

Publikationen

Röhn T.A., Reitz A., Paschen A., Nguyen X.D., Schadendorf D., Vogt A., Kropshofer H.
"A novel strategy for the discovery of MHC II-restricted tumor antigens: identification of a melanotransferrin helper T cell epitope", Cancer Research, 2005, *in press*

Vorträge

"Identification of T-cell epitopes from melanoma associated antigens by electroporation of dendritic cells with RNA", 8th Graduat Seminar des DKFZ, Weil der Stadt; Mai 2004

Posterpräsentation

"Identification of T-cell epitopes from melanoma associated antigens by electroporation of dendritic cells with RNA", Posterausstellung der Doktoranden des DKFZ, Heidelberg; Januar 2004

Danksagung

Hiermit möchte ich allen Danken, die an dieser Arbeit teil hatten und mir bei der Durchführung helfend zur Seite standen. Folgende Personen sind hierbei besonders zu erwähnen:

PD Dr. Harald Kropshofer, der mir als Betreuer und Gutachter erst die Möglichkeit zur Durchführung dieser externen Arbeit gegeben hat.

Professor Dirk Schadendorf für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die Unterstützung der Durchführung der Arbeit.

Dr. Annette Paschen für die exzellente und kompetente Anleitung meiner Arbeit, ihre stete Unterstützung und Hilfsbereitschaft sowie ihren inspirierenden und motivierenden Einfluss. Ich weiß nicht, ob ich ohne sie heute dort wäre wo ich jetzt bin. DANKE.

Für technische, wissenschaftliche und private Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Dr. Axel Heiser, in dessen Labor ich die Methode der RNA-Elektroporation lernen durfte.

Dr. med. Xuan-Duc Nguyen, der durch die Lieferung der Buffys immer dafür sorgte, dass mir nicht die Zellen ausgingen.

Dr. Jan Müller-Berghaus, der auf alles eine Antwort wusste und durch seine Anregungen oftmals zum Gelingen meiner Experimente beigetragen hat.

Antje Sucker und ihrem TA-Team, die mir viele Arbeiten abgenommen haben und für eine freundschaftliche Arbeitsatmosphäre im Labor gesorgt haben. Besonders Claudia Sterzig, die mich durch die gesamte Zeit begleitet hat und mit der ich viel Spaß hatte.

Tanja, Song, Nicole und Dani meinen Mitstreiterinnen, die das "Leben" im Labor fröhlicher gemacht haben, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen und ohne die es einfach keine so schöne Zeit gewesen wäre. Danke Mädels!

Meiner Familie, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und den Rückhalt den sie mir in meinem gesamten Leben geboten haben. Meine Dankbarkeit hierfür kann man nicht in Worten ausdrücken.

Meinen Freunden, welche die gesamte Zeit mit mir gefiebert haben, durch Höhen und Tiefen gegangen sind und durch ihr Engagement dazu beigetragen haben, dass ich es schließlich geschafft habe.

Meinem Daniel, der mir durch seine Art die Dinge anzugehen gezeigt hat, dass man im Leben was riskieren muss und nicht vor jeder verschlossenen Tür umkehren darf.

Danke für Deine Unterstützung.