

**RNA-Transfektion von dendritischen Zellen zur Induktion
von antigenspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2005

vorgelegt

von

Martin Rudolf Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 20. April 2005

Dekan: Prof. Dr. S. Laufer

1. Berichtstatter: Prof. Dr. H.-G. Rammensee

2. Berichtstatter: PD Dr. P. Brossart

Die vorgelegte Dissertationsschrift entstand aufbauend auf der von mir durchgeführten Diplomarbeit und medizinischen Doktorarbeit, welche ebenfalls im Labor von PD Dr. Brossart durchgeführt wurden. Die in 4.7 und 4.8 dargestellten Experimente entstanden im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes mit Frau Cand. med. Garyfalia Tsakou. Die Experimente wurden gemeinsam durchgeführt und mit geteilter Erstautorenschaft publiziert.

Teile der vorgelegten Arbeit wurden publiziert in:

F. Grünebach*, M.R. Müller*, A. Nencioni, P. Brossart. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther.* 2003;10(5):367-374.

A. Nencioni*, M.R. Müller*, F. Grünebach*, A. Garuti, M.C. Mingari, F. Patrone, A. Ballestero, P. Brossart. Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther.* 2003;10(3):209-214.

M.R. Müller*, G. Tsakou*, F. Grünebach, S.M. Schmidt, P. Brossart. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood.* 2004;103(5):1763-1769.

* Gleichberichtigte Erstautorenschaft (contributed equally)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Dendritische Zellen.....	1
1.1.1 Allgemeine Aspekte	1
1.1.2 Funktionelle Stadien der dendritischen Zellen.....	4
1.1.3 <i>Ex-vivo</i> -Generierung von dendritischen Zellen.....	6
1.2 Tumormunologie.....	7
1.2.1 Die Immunsurveillance-Hypothese	7
1.2.2 Angeborene Tumormunität	8
1.2.3 Tumor Escape – Mechanismen	9
1.2.4 Tumorantigene.....	10
1.2.5 Immuntherapie von malignen Erkrankungen	11
1.3 RNA.....	15
1.3.1 Evolution der RNA	15
1.3.2 Biologische Aufgaben der RNA	16
1.3.3 Struktur und Stabilität von eukaryontischer mRNA.....	18
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2. Material.....	22
2.1 Tumorzelllinien	22
2.2 Bakterienstamm.....	22
2.3 Geräte.....	22
2.4 Chemikalien und Biochemikalien.....	24

2.5 Zellkulturmedien	25
2.6 Puffer und Lösungen	26
2.7 Antikörper	27
2.8 Zytokine	27
2.9 Kits.....	28
2.10 Plasmide	28
2.11 Enzyme.....	28
2.12 Peptide	28
3. Methoden	29
3.1 Zellkulturmethoden	29
3.1.1 Kultivierung von Tumorzelllinien	29
3.1.2 Kryokonservierung von Tumorzellen	29
3.1.3 Bestimmung der Zellzahl	30
3.1.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMNC)	30
3.1.5 <i>Ex-vivo</i> -Generierung von dendritischen Zellen aus PBMNC	31
3.1.6 Kryokonservierung von dendritischen Zellen.....	32
3.2 Molekularbiologische Methoden	32
3.2.1 Plasmidtransformation in <i>E.coli</i>	32
3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA	33
3.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA.....	34
3.2.4 <i>In vitro</i> -Transkription von EGFP mRNA.....	35
3.2.5 Isolation von Total RNA aus Tumorzellen.....	37
3.2.6 Isolation von mRNA aus Total RNA.....	38
3.2.7 Unspezifische Amplifikation von mRNA.....	39
3.2.8 Agarosegelelektrophorese von RNA.....	40
3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen.....	41

3.3 Methoden zur RNA-Transfektion von dendritischen Zellen	42
3.3.1 Lipofektion mit Unifectin M	42
3.3.2 Elektroporation.....	43
3.3.3 Transferrinrezeptor (CD71)-vermittelte Endozytose	44
3.4 Durchflußzytometrie (FACS).....	45
3.5 CTL-Induktion mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen.....	46
3.6 ⁵¹ [Cr]-Freisetzungstest.....	46
3.7 IFN- γ ELISPOT	47
3.8 T-Helferzell-Induktion mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen	49
3.9 ³ [H]-Thymidin-Proliferationstest	49
4. Ergebnisse	50
4.1 Expression von EGFP in dendritischen Zellen nach Transfektion mit EGFP- <i>in vitro</i> -Transkript (EGFP-IVT) unter Anwendung verschiedener RNA-Transfektionsmethoden	50
4.2 CTL-Induktion durch mittels verschiedener Methoden RNA-transfizierte dendritische Zellen.....	52
4.3 CTL-Induktion durch mit Total Tumor RNA oder mit Tumor mRNA transfizierte dendritische Zellen.....	54
4.4 Unspezifische Amplifikation von Gesamttumor mRNA.....	56
4.5 CTL-Induktion durch mit nativer Tumor mRNA oder amplifizierter Tumor mRNA transfizierte dendritische Zellen.....	60
4.6 Induktion von tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Colonicarcinom-Zelllinien	61
4.7 Induktion von CLL-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten im autologen System	63
4.8 Induktion von CLL-spezifischen T-Helferzellen im autologen System.....	73

5. Diskussion	75
5.1 RNA-Transfektion von dendritischen Zellen zur Induktion von tumor- spezifischen T-Zell-Antworten	75
5.2 Induktion von CLL-spezifischen T-Zell-Antworten im autologen System.....	81
5.3 Ausblick	86
6. Zusammenfassung.....	87
7. Literatur	89
8. Danksagung.....	109
9. Liste der akademischen Lehrer.....	111
10. Lebenslauf	112
11. Publikationsverzeichnis	114

Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
ATP	Adenosintriphosphat
Bq	Becquerel
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
C	Kapazität
CD	Cluster of differentiation
Ci	Curie
CLL	Chronisch-lymphatische Leukämie
CML	Chronisch-myeloische Leukämie
CTP	Cytosintriphosphat
DC	Dendritische Zelle(n)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DFA	Desferrioxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Enhanced green fluorescent protein
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Farad
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FCS	Fötale Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor
GTP	Guanosintriphosphat
HLA	Humanes Leukozytenantigen
hnRNA	Heteronukleäre RNA
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IVT	<i>In vitro</i> -Transkript
KIR	Killing inhibitory receptor
LD-PCR	Long distance PCR
LFA	Leukocyte functional antigen
3-MA	3-Methyladenin
MHC	Major histocompatibility complex
MICA	MCH class I chain-related A
MICB	MCH class I chain-related B
mRNA	Messenger RNA
NBT	Nitroblautetrazolium
NHL	Non-Hodgkin Lymphom
NK	Natural killer cells
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMNC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

Abkürzungsverzeichnis

PE	Phycoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PRR	Pattern recognition receptors
R	Widerstand
RAG	Recombination activating gene
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
rRNA	Ribosomale RNA
S	Svedberg
SCF	Stem cell factor
snRNA	Small nuclear RNA
STATs	Signal transducers and activators of transcription
t	Zeit
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
tRNA	Transfer RNA
U	Spannung, unit
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt

1 Einleitung

1.1 Dendritische Zellen

1.1.1 Allgemeine Aspekte

Steinman und Cohn entdeckten im Jahre 1973 bei ihren Untersuchungen an sekundären lymphatischen Organen eine neue Zellgruppe (Steinman *et* Cohn, 1973) mit eindrucksvollem morphologischem Erscheinungsbild. Typisch sind viele Zytoplasmafortsätze unterschiedlicher Länge, die sich über Stunden zusammenziehen und wieder ausbreiten können, was zu ihrer Benennung mit dem Namen „dendritische“ Zellen (griech. δένδρον = Baum) führte.

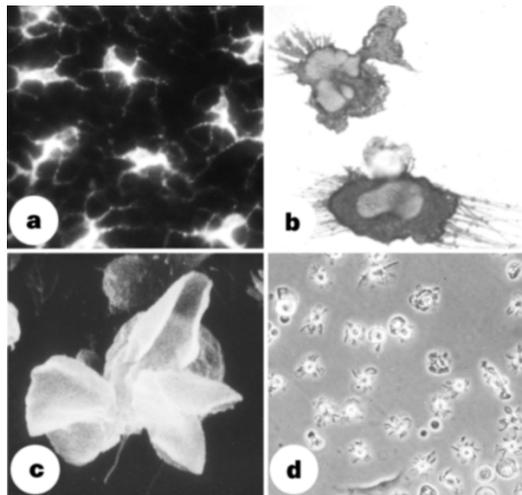


Abb. 1.1: Die ungewöhnliche Gestalt der dendritischen Zellen (DC)
a. DC in der Epidermis (Färbung auf MHC II)
b. DC im Zytospinpräparat (Färbung auf Oberflächen-MHC II)
c. DC dargestellt durch Rasterelektronenmikroskopie
d. DC dargestellt durch Phasenkontrastmikroskopie
(modifiziert nach Banchereau *et* Steinman, 1998)

In den folgenden Jahren wurden diese Zellen in allen menschlichen Organen außer im Gehirn gefunden (Daar *et al.*, 1983; Hancock *et* Atkins, 1984; Hart *et* McKenzie, 1988; Hart *et al.*, 1989).

Dendritische Zellen (DC) haben innerhalb der antigenpräsentierenden Zellen (APC) eine besondere Rolle. Während Makrophagen und B-Zellen neben der Antigenpräsentation auch wichtige Effektorfunktionen bei der Immunabwehr übernehmen, sind DC ausschließlich auf die T-Zell-Aktivierung spezialisiert. Nur durch sie können naive T-Zellen aktiviert werden, da sie eine besonders starke Expression kostimulatorischer Moleküle (z.B. B7.1=CD80 und B7.2=CD86) aufweisen. Man spricht daher hier auch von professionellen APC.

Die T-Zell-Aktivierung verläuft in zwei Schritten. Durch Adhäsionsmoleküle wird der erste Kontakt hergestellt. Dabei binden LFA-3 (=CD58), ICAM-1(=CD54), ICAM-2 (=CD102) und ICAM-3(=CD50) der dendritischen Zelle an die korrespondierenden Oberflächenrezeptoren der T-Zelle. Diese Bindung erfolgt zunächst reversibel und kann ohne Effekt wieder gelöst werden. (Dustin *et al.*, 1989; Hahn *et al.*, 1992; Shimizu *et al.*, 1990). Kommt es jedoch zur Antigenerkennung über den T-Zell-Rezeptor (TCR=CD3) und den MHC-Peptid-Komplex, so kommt es zur Stabilisierung der o.g. Bindung (Romani *et al.*, 1989; Vedel *et al.*, 1992). Für die klonale Expansion der naiven T-Zelle ist nun das zweite, B7-vermittelte Signal nötig, das über CD28 die Synthese von IL-2 und dessen Rezeptor in der T-Zelle einleitet (Lanzavecchia *et al.*, 1993; Larsen *et al.*, 1992 ; Young *et al.*, 1992). Über einen autokrinen Mechanismus induziert IL-2 die Proliferation und Differenzierung der naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen (Fraser *et al.*, 1991).

Aktivierte T-Zellen exprimieren zusätzlich den Rezeptor CTLA-4 (CD152), der mit einer höheren Affinität als CD28 an die kostimulatorischen Moleküle der DC bindet, wodurch die T-Zelle für die Stimulation durch B7 noch empfindlicher wird. Eine erhöhte Expression der kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) wird außerdem durch die Bindung des CD40-Rezeptors der APC an seinen Liganden p39 (CD40L) auf der T-Zelle erreicht (Caux *et al.*, 1994; Cayabyab *et al.*, 1994; McLellan *et al.*, 1996). Fehlt der zweite Schritt der T-Zell-Aktivierung, d.h. bleibt das Signal der kostimulatorischen Moleküle der APC

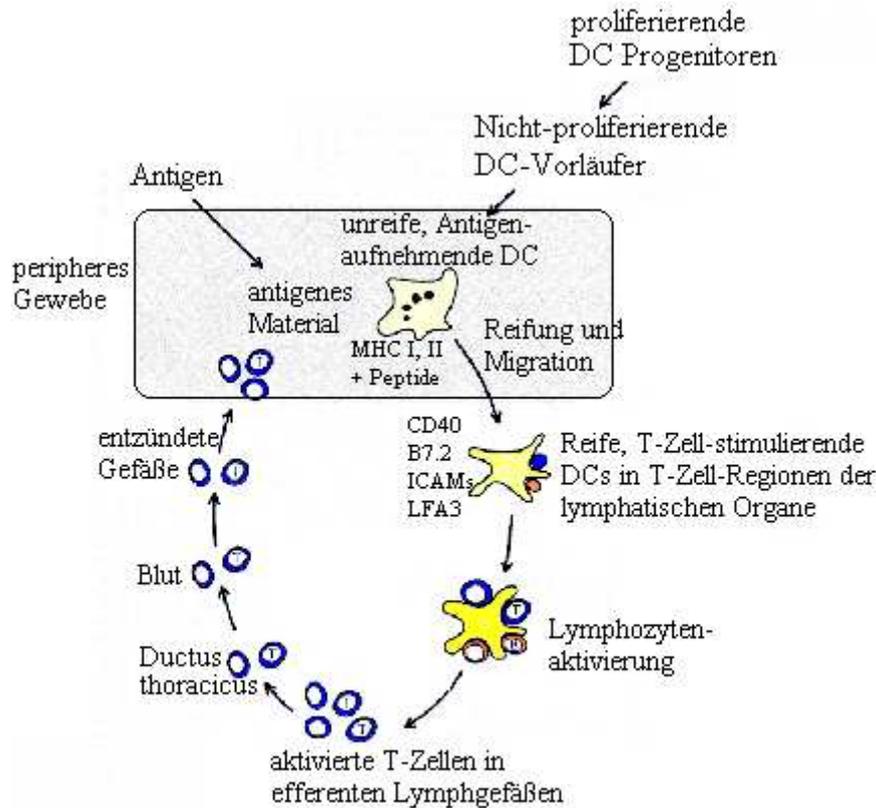


Abb. 1.2: Die verschiedenen Stadien der T-Zellaktivierung durch DC (modifiziert nach Banchereau *et al.* Steinman , 1998)

aus, so kommt es zur Anergie der T-Zellen. Diese können dann nicht mehr auf ihr spezifisches Antigen reagieren und bleiben funktionslos (Schwartz *et al.*, 1990). Die kostimulatorische Aktivität ist also für eine erfolgreiche T-Zell-Aktivierung unabdingbar.

Sowohl Defekte in den beschriebenen Mechanismen der Antigenprozessierung und -präsentation (z.B. defekter MHC-Komplex, Fehlen von Adhäsionsmolekülen oder von kostimulatorischen Molekülen) also auch die Sekretion immunsuppressiver Zytokine wie TGF- β oder IL-10 behindern eine korrekte Aktivierung der T-Zelle und ihre klonale Expansion. Bei Tumorpatienten ist dies mit ein Grund für das Ausbleiben einer produktiven Immunantwort (Boussiotis *et al.*, 1996; Guinan *et al.*, 1994).

1.1.2 Funktionelle Stadien der dendritischen Zellen (DC)

Dendritische Zellen haben bei Infektionen die Aufgabe, naive T-Zellen zu aktivieren. Hierzu sind die unreifen DC, die unter den meisten Oberflächenepithelien und in den meisten Organen gefunden werden, jedoch noch nicht in der Lage. DC entstehen aus myeloischen Vorläuferzellen im Knochenmark und wandern dann über den Blutkreislauf in die Peripherie, wo sie ihren charakteristischen unreifen Phänotyp besitzen, der durch eine niedrige MHC-Präsenz auf der Zelloberfläche bei gleichzeitig hohem intrazellulärem MHC-Spiegel und das Fehlen der kostimulatorischen B7-Moleküle gekennzeichnet ist.

Unreife DC können in diesem Stadium noch keine naiven T-Zellen stimulieren, besitzen aber eine hohe Potenz zur Antigenaufnahme, die teilweise als rezeptorvermittelte Phagozytose über Rezeptoren wie z.B. DEC205 und als unspezifische Makropinozytose abläuft (Banchereau *et al.* Steinman, 1998).

Diese unreifen DC verweilen unterschiedlich lange in den peripheren Geweben. Durch Infektionen werden sie zur Migration in die lokalen lymphatischen Gewebe über die Lymphgefäße stimuliert, dort werden sie zu den sogenannten lymphatischen DC und weisen einen stark veränderten Phänotyp auf. Die Fähigkeit zur Phagozytose und Makropinozytose geht verloren. Die MHC-Präsenz auf der Zelloberfläche nimmt stark zu, was die Fähigkeit zur Antigenpräsentation stark verbessert. Zusätzlich werden große Mengen von Adhäsionsmolekülen und kostimulatorischen B7-Molekülen exprimiert. Außerdem wird von den nun reifen DC ein spezielles chemotaktisches Chemokin (DC-CK) sezerniert, das naive T-Lymphozyten anlockt (Sallusto *et al.*, 1994; Banchereau *et al.*, 1998).

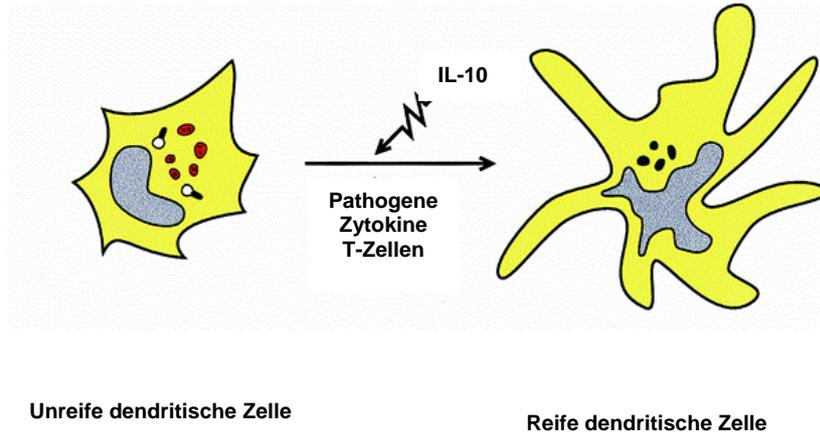


Abb.1.3: Reifung der dendritischen Zellen (modifiziert nach Banchereau *et* Steinman, 1998)

Eigenschaft	Unreife DC	Reife DC
MHC II	Intrazellulär hoch	An der Zelloberfläche hoch
Fähigkeit zur Phagozytose	Ausgeprägt	Sehr niedrig
ICAM-1 (=CD 54)	Niedrig	Hoch
ICAM-2 (=CD102)	Niedrig	Hoch
ICAM-3 (=CD50)	Niedrig	Hoch
LFA-3 (=CD58)	Niedrig	Hoch
B 7.1 (CD80)	Niedrig	Hoch
B 7.2 (CD 86)	Niedrig	Hoch
p55	Niedrig	Hoch
Actinfasern	Vorhanden	Nicht vorhanden
HLA-DR	Niedrig	Sehr hoch
CD1a	Sehr hoch	Hoch
CD14	Negativ	Negativ
CD40	Hoch	Hoch
CD25	Niedrig	Hoch
CD83	Niedrig	Sehr hoch

Tab. 1.1: Charakteristische Eigenschaften von DC in verschiedenen Reifestadien (Banchereau J. *et* Steinman R., 1998, Brugger W. *et al.*, 1999)

1.1.3 *Ex vivo*-Generierung von dendritischen Zellen

DC stammen wie alle CD45⁺ Zellen von hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks ab, was 1979 erstmals über Transplantationsstudien an Mäusen nachgewiesen wurde. Drei Wochen nach einer allogenen Knochenmarktransplantation befanden sich in der Haut des Empfängers die Langerhanszellen des Donors (Katz *et al.*, 1979). In den folgenden Jahren zeigten verschiedene Arbeitsgruppen, daß DC *in vitro* aus humanen CD34⁺ Vorläuferzellen des Knochenmarks, des Nabelschnurblutes und des peripheren Blutes generiert werden können. Für ihre Entwicklung zu DC war die Zugabe verschiedener Zytokine notwendig, darunter besonders GM-CSF, SCF, IL-4 und TNF- α (Bernhard *et al.*, 1995; Caux *et al.*, 1992; Caux *et al.*, 1997; Cella *et al.*, 1997; Fisch *et al.*, 1996; Young *et al.*, 1996). Langezeit wurde die Hypothese vertreten, daß es sich bei Monozyten/Makrophagen und DC um zwei verschiedene Entwicklungslinien handelt. Es ergaben sich jedoch im Laufe der Zeit immer mehr Hinweise, daß beide Zellfamilien sehr eng verwandt sind. So gelang es bereits 1990 eine gemeinsame Vorläuferkolonie von Monozyten/Makrophagen und DC zu identifizieren (Reid *et al.*, 1990). Später gelang dann die Generierung von DC aus CD14⁺ Monozyten unter der Stimulation mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 (Chapius *et al.*, 1997; Peters *et al.*, 1993; Peters *et al.*, 1996; Romani *et al.*, 1996; Zhou *et al.*, 1996). Die auf diese Weise generierten DC weisen eine hohe Expression der MHC-Klasse-I/II-Moleküle sowie der Oberflächenantigene CD1a, CD80, CD86, CD40 und CD54 auf. Bei zusätzlicher Stimulation mit TNF- α oder CD40L erhält man außerdem hohe Konzentrationen an CD83, was einem reifen DC-Phänotyp entspricht (Zhou *et al.*, 1996). Vor kurzem konnte gezeigt werden, daß reife DC auch aus peripheren CD14⁺ Blutmonozyten in Abwesenheit der o.g. Zytokine bei ausschließlicher Stimulation mit CD40L generiert werden können (Brossart *et al.*, 1998).

1.2 Tumورimmunologie

1.2.1 Die Immunsurveillance-Hypothese

Paul Ehrlich postulierte bereits im Jahre 1909, daß das Immunsystem bei der Erkennung und Bekämpfung von Tumoren im Organismus eine entscheidende Rolle spielt (Ehrlich, 1909). Sir Mac Farlane Burnet (Burnet, 1957 und 1967) und Lewis Thomas (Thomas, 1959) stellten später die Hypothese der Überwachung von Tumoren durch das Immunsystem auf (cancer immunosurveillance hypothesis, Immunsurveillance-Hypothese). Diese postuliert, daß das körpereigene Immunsystem maligne transformierte Zellen erkennen und abtöten kann. Progredientes Tumorstadium stellt diesbezüglich also das eher seltene Resultat einer den Kontrollmechanismen des Immunsystems entkommenen Tumorzelle dar (immune escape). Schreiber und Kollegen (Dunn *et al.*, 2002) integrieren diese Hypothese in ein Modell, welches sie Cancer Immunoediting nennen. Dieses weist dem Immunsystem nicht nur eine tumorbekämpfende, sondern auch eine aktiv den Phänotyp des Tumors verändernde Rolle zu (Immunologic Sculpting bzw. Immunologic Shaping). Weiter wird von ihnen eine Phase des Gleichgewicht zwischen Tumorzelleliminierung und Tumorescape angenommen. Tumorzellvarianten werden durch angeborene und adaptive Immunmechanismen abgetötet. Gleichzeitig entstehen allerdings bedingt durch die enorme genetische Instabilität in Tumorzellen fortwährend neue Varianten. Nach dem Darwinschen Prinzip führt der immunologische Druck zu einer Selektion gewisser Subklone, welche mit optimalen Eigenschaften ausgestattet sind, um den Angriff durch das Immunsystem zu überstehen. Indirekte Unterstützung für die Immunsurveillance-Hypothese kam von den kürzlich an RAG-Knockout-Mäusen (Lymphozytendefizienz) sowie an STAT1-Knockout-Mäusen (Defizienz in IFN- γ vermittelten Signaltransduktionswegen) gemachten Beobachtungen. Es konnte diesbezüglich gezeigt werden, daß diese Tiere eine signifikant höhere Inzidenz an karzinogeninduzierten Sarkomen sowie an spontanen Karzinomen als die korrespondierenden Wildtyp-Mäuse aufwiesen (Shankaran *et al.*, 2001).

Es bestehen heute wenig Zweifel, daß das körpereigene Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Unterdrückung von Tumorwachstum spielen kann (Pardoll, 1998; Smyth *et al.*, 2001). Jedoch scheinen die Interaktionen von Immunsystem und Tumoren insgesamt komplizierter als durch die ursprüngliche Immunosurveillance-Hypothese formuliert. Eine prinzipielle Hürde für die Erkennung von Tumoren durch das körpereigene Immunsystem wird durch zwei neuere Modelle formuliert. Das von Matzinger postulierte Danger-Modell (Matzinger, 1998) sieht in der Aussendung von sogenannten Gefahrensignalen durch die transformierte Zelle (danger signals) eine notwendige Voraussetzung für die Induktion einer Immunantwort. Nach dem Modell von Medzhitov und Janeway (Medzhitov *et al.*, 1998) sind Zellen des angeborenen Immunsystems, welche über sogenannte pattern recognition receptors (PRR) bestimmte Muster wie z.B. PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) auf Zielzellen erkennen und daraufhin eine Immunantwort induzieren, ausschlaggebend. Nach beiden Theorien sollten Tumoren nicht immunogen sein, da sie sich aus gesunden proliferierenden Zellen entwickeln und normalerweise weder danger signals aussenden noch mikrobielle Strukturen an ihrer Oberfläche tragen.

1.2.2 Angeborene Tumorimmunität

Möglicherweise wird die frühe immunologische Überwachung von transformierten Zellen durch Bestandteile des angeborenen Immunsystems ausgeführt. Die sogenannte angeborene Immunität umfaßt zahlreiche Komponenten wie Natürliche Killer (NK)-Zellen, Makrophagen sowie das Komplementsystem. NK-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche inhibitorische und stimulatorische Rezeptoren, durch welche ihre Funktion reguliert wird. Die inhibitorischen Rezeptoren der KIR-(killing inhibitory receptors)- und CD94-NKG2A-Familien erkennen MHC-Klasse I-Moleküle, wodurch eine Lyse von Zellen mit geringer oder ganz fehlender MHC-Klasse I-Expression auf der Zelloberfläche durch NK-Zellen verursacht wird (Lanier, 1998; Lopez-Botet *et al.*, 2000). Der zu den Stimulatoren gerechnete Rezeptor-Komplex NKG2D/DAP10 (Wu *et al.*, 1999) wird unter anderem von NK-Zellen, Makrophagen sowie

von γ,δ -T-Zellen exprimiert und erkennt die nichtklassischen MHC-Klasse I-Moleküle MICA und MICB (MCH class I chain-related A, B), die durch zellulären Stress induziert und auf der Oberfläche verschiedener Tumorzellen exprimiert werden (Bauer *et al.*, 1999; Diefenbach *et al.*, 2000; Groh *et al.*, 1998, 1999, 2001; Salih *et al.* 2003; Steinle *et al.*, 1998). Es wird postuliert, daß die durch Ligation von NKG2D/DAP10 ausgelöste Aktivierung eine Schlüsselrolle bei der Früherkennung von transformierten Zellen spielt.

1.2.3 Tumor Escape – Mechanismen

Das Immunsystem von Tumorpatienten ist offensichtlich nicht in der Lage, Tumorzellen effektiv zu erkennen und zu bekämpfen. Für das Versagen der Immunantwort gibt es eine Reihe von Gründen. Man spricht von sogenannten „Immunescape“-Mechanismen. Viele Tumorzellen weisen gewisse Defekte in der Antigenprozessierung auf wie beispielsweise Mutationen im TAP-(transporter associated with antigen processing)-Molekül. Bei TAP-defizienten Tumorzellen können die im Zytosol durch proteosomalen Abbau entstandenen Peptide nicht ins ER gelangen und somit nicht an MHC-Moleküle binden. Bei vielen Tumoren sind die MHC-Klasse-I-Moleküle an der Zelloberfläche stark reduziert oder fehlen völlig (Bodmer *et al.*, 1993; Möller *et al.*, 1992). Durch all diese Mechanismen wird die Antigenpräsentation stark beeinträchtigt. Darüberhinaus sind Tumorzellen keine professionellen antigenpräsentierenden Zellen, da ihnen die zur T-Zell-Aktivierung notwendigen kostimulatorischen Moleküle wie B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) fehlen. Ohne Kostimulation führt die Präsentation eines Tumorpeptids über den MHC-TCR-Komplex zur Anergie und Toleranz (Bodmer *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1990). Um der Immunantwort zu entgehen, stellen manche Tumorzellen die Synthese des Tumorantigens ein oder produzieren immunsuppressive Substanzen wie z.B. IL-6, IL-10 und TGF- β (Brown *et al.*, 2001; Cook *et al.*, 1999; Torre Amione *et al.*, 1990; Tada *et al.*, 1991). IL-6 kann zudem die Resistenz von Tumorzellen gegen Apoptose verursachen, die Aktivierung und Differenzierung von DC hemmen und die T_H1 -

Polarisation negativ beeinflussen (Frassanito *et al.*, 1998; 2001). Durch Sekretion von Ceramiden oder die Expression von FasL durch Tumorzellen kann außerdem die Apoptose von Effektorzellen und APC des Immunsystems induziert werden (Cappello *et al.*, 2002; Kanto *et al.*, 2001).

1.2.4 Tumorantigene

Tumorantigene sind Proteine, welche ausschließlich oder vermehrt in Tumorzellen exprimiert werden und eine Immunantwort gegen den Tumor induzieren können. Diese Immunantwort kann sowohl T-Zell- als auch Antikörper-vermittelt sein. Tumorantigene können in verschiedene Klassen eingeteilt werden (Boon *et van der Bruggen*, 1996; Boon *et al.*, 1997).

Produkte stillgelegter Gene (Cancer testis-Antigene)

Hierzu gehören z.B. die Genfamilien MAGE, GAGE und BAGE, die im gesunden Gewebe (außer Testes) nicht exprimiert werden.

Gewebsspezifische Antigene (Differenzierungsantigene)

Für Melanome existieren beispielsweise eine Reihe gewebsspezifischer Antigene, wie z.B. MelanA/MART, gp75, Tyrosinase u.a., welche ausschließlich in Melanozyten exprimiert werden und deswegen auch als gewebsspezifische Differenzierungsantigene bezeichnet werden.

Mutationen, die zu Überexpression führen

Mutationen, die zur Überexpression von manchen Genen führen und somit die Zelle in ihrer Proliferation entgleisen lassen. Beispiele: Tumorsuppressorprotein p53, Protoonkogen ras, bcr-abl.

Individuelle Antigene

Hierzu gehört beispielsweise das Idiotyp-Immunglobulin beim B-NHL und beim Multiplen Myelom.

Überexprimierte Tumorantigene

Diese Antigene werden in manchen Tumoren überexprimiert und stellen die größte Gruppe bislang definierter tumorassoziierter Antigene dar. Her-2/neu wird z.B. in 30% aller Mamma- und Ovarialkarzinome in hohem Maße überexprimiert. Weitere Beispiele: Muc1, Telomerase, Survivin .

Antigene aus onkogenen Viren

Gegen mit dem humanen Papillomavirus 16 (HPV16) assoziierte Proteine konnte eine spezifische CTL-Antwort gefunden werden (De Bruijn *et al.*, 1998). Das Epstein-Barr-Virus (EBV) spielt bei der Pathogenese des M. Hodgkin und des Burkitt-NHL eine entscheidende Rolle. Zudem scheint es für die Entstehung von lymphoproliferativen Erkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation verantwortlich zu sein. Auch hier konnten antigenspezifische CTL-Antworten gegen EBV-assoziierte Proteine detektiert werden.

1.2.5 Immuntherapie von malignen Erkrankungen

Bereits Ende des neunzehnten Jahrhunderts begann der amerikanische Chirurg William Coley, Patienten autologe Tumorzelllysate zu injizieren, um dadurch eine antitumorale Immunantwort hervorzurufen (Coley, 1891; Wiemann *et Starnes*, 1994). Die alleinige Verwendung unmodifizierter Tumorzellen führte allerdings nicht zu wesentlichen Erfolgen. So wurde bald versucht durch die Gabe von Adjuvanzen (Bacille Calmette-Guérin, Corynebacterium parvum, Newcastle Disease Virus) die Immunantwort unspezifisch zu steigern, in der Hoffnung, dadurch die tumorspezifische Immunantwort verstärken zu können (Koh *et al.*, 1985; Storch *et al.*, 1986).

In den letzten Jahren wurden verstärkt Versuche unternommen, Tumorzellen oder professionelle antigenpräsentierende Zellen durch Gentransfer gezielt zu modifizieren, um so eine effektive T-Zell-Immunantwort induzieren zu können. Durch Einschleusen zytokinkodierender Gene (IL-2, IL-4, IL-7 und GM-CSF) in die Tumorzellen sollen diese zur Sekretion dieser Zytokine befähigt werden. Durch die lokale Aktivierung von T-Zellen und dendritischen Zellen durch diese Faktoren hofft man tumorspezifische T-Zellen induzieren zu können (Hellstrom *et al.*, 1997; Pardoll, 1995; Pardoll, 1998; Ragnhammar *et al.*, 1996). Auch unter idealen Bedingungen, sofern nämlich die Tumorzellen den T-Zellen ein Tumorantigen präsentieren, kann man nicht von einer ausreichenden Anti-Tumor-Immunantwort ausgehen, da den Tumorzellen die kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2, die für eine T-Zell-Aktivierung unabdingbar sind, fehlen. Als Konsequenz wurden Versuche unternommen, Tumorzellen mit dem B7-Gen zu transfizieren, um die Immunogenität der Tumoren zu erhöhen. Hierbei gelang es mit den B7-transgenen Tumorzellen T-Zellen zu aktivieren, die Anti-Tumor-Aktivität gegen die Tumorzellen unabhängig vom Vorhandensein der B7-Moleküle aufwiesen (Li *et al.*, 1996).

Eine weitere Möglichkeit, eine Immunantwort gegen wenig immunogene Tumoren zu induzieren, besteht darin, Tumorantigene nicht von den Tumorzellen, sondern von professionellen antigenpräsentierenden Zellen präsentieren zu lassen. Diese verfügen über sämtliche wichtigen kostimulatorischen Moleküle, die für die Induktion einer effektiven T-Zell-Antwort notwendig sind. So können die MHC-Moleküle von *ex vivo* generierten dendritischen Zellen auf verschiedene Weise mit tumorspezifischen Peptiden beladen werden. Ist das Peptidbindungsmotiv eines HLA-Typs bekannt, so können potentiell bindende Peptide aus der Sequenz des betrachteten Tumorantigens vorhergesagt und synthetisiert werden (Falk *et al.*, 1991; Melief *et al.*, 1996; Rotzschke *et al.*, 1990).

Mit diesen kann man nun die *ex vivo* generierten dendritischen Zellen beladen, was auch als „pulsen“ bezeichnet wird. Normalerweise ist ein kleiner Teil der an der Oberfläche präsentierten MHC-Moleküle noch nicht mit Peptid beladen. Darüberhinaus können Peptide mit höherer Affinität zum HLA-Molekül solche mit niedrigerer Affinität verdrängen. Eine weitere Möglichkeit, unbeladene MHC-Moleküle auf der Oberfläche zu erhalten, besteht darin, die intrazelluläre Beladung der MHC-Moleküle mit Peptid zu inhibieren, z.B. durch eine Hemmung des TAP-Transporters (Hellstrom *et al.*, 1997; Melief *et al.*, 1996; Pardoll, 1998).

Eine alternative Möglichkeit zur Beladung der MHC-Moleküle der dendritischen Zellen mit tumorspezifischen Peptiden besteht in deren Transfektion mit bestimmten tumorantigenkodierenden Genen. Das Genmaterial der Tumorzelle wird dann in den transgenen DC exprimiert und durchläuft die einzelnen Schritte der Antigenprozessierung und wird schließlich als Peptid-MHC-Komplex auf der Oberfläche exprimiert. Über physikalische Transfektionsmethoden (Elektroporation, Lipofektion und CaPO₄-Präzipitation) ließen sich bei DC nur vergleichsweise niedrige Transfektionseffizienzen erreichen. Vielversprechend waren allerdings Versuche mit einem rekombinanten adenoviralen Vektorsystem, mit dem hohe Transfektionseffizienzen erreicht werden konnten. (Brossart *et al.*, 1997; Leitner *et al.*, 1999; Arthur *et al.*, 1997; Pardoll, 1998).

Nachteile der Methode des „Pulsens“ von DC mit Tumorpeptid sind ihre Beschränktheit auf charakterisierte T-Zellepitope und ihre HLA-Abhängigkeit. Die Transfektion mit Vektoren, in die die cDNA eines bestimmten Tumorantigens inkloniert wurde, ist ebenfalls nur für bereits bekannte Tumorantigene anwendbar. Darüberhinaus treten in vielen Tumoren durch Selektionsmechanismen sogenannte „antigen-loss“-Varianten auf, die ein bestimmtes Antigen nicht mehr auf ihrer Oberfläche tragen, was eine Vakzinierung gegen ein einziges Tumorantigen nicht sehr sinnvoll erscheinen läßt.

Einen eleganten Ausweg aus diesem Dilemma scheint die Beladung von dendritischen Zellen mit RNA aus Tumorzellen oder mit phagozytierten, apoptotischen Tumorzellfragmenten (apoptotic bodies) darzustellen. Durch Isolierung der gesamten RNA bzw. mRNA aus Tumorzellen und deren Einschleusung in DC kann beispielsweise das gesamte Proteinrepertoire (Transkriptom) der Tumorzelle einschließlich aller potentieller Tumorantigene in den antigenpräsentierenden Zellen exprimiert, prozessiert und präsentiert werden. Eine Anreicherung der Tumor RNA kann durch Subtraktion von RNA aus gesunden Zellen erreicht werden. Inzwischen konnte die Induktion einer effektiven Antitumorimmunität durch mit Tumor RNA transfizierte, autologe DC für mehrere Tumoren gezeigt werden (Ashley *et al.*, 1997; Boczkowski *et al.*, 1996; Gilboa *et al.*, 1998; Hoerr *et al.*, 2000; Leitner *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1999).

Die Vakzinierung mit Tumor RNA bietet also gegenüber der Peptidvakzinierung eine Reihe von potentiellen Vorteilen. So müssen die Tumorantigene, gegen die vakziniert werden soll, nicht charakterisiert sein. Durch die gleichzeitige Vakzinierung gegen multiple Antigene wird das Risiko eines Immun-Escapes durch antigennegative Tumorzellmutanten möglicherweise signifikant vermindert. Kürzlich konnte von uns darüber hinaus gezeigt werden, daß mit Gesamttumor-RNA-transfizierten dendritischen Zellen auch CD4+ T-Helferzell-Antworten induziert werden können (Müller *et al.*, 2003). Ein weiterer Vorteil besteht in der Möglichkeit, aus Tumoren isolierte RNA *in vitro* zu amplifizieren, so daß dieses Verfahren auch für Patienten mit geringer Tumorlast oder bei minimaler Resterkrankung zur Verfügung stehen könnte. Ferner ist diese Vakzinierungsstrategie unabhängig vom HLA-Typ der zu behandelnden Patienten applikabel, während sich die aus bestimmten Tumorantigenen abgeleiteten Peptide für Patienten mit unterschiedlichem HLA-Typ in ihrer Sequenz unterscheiden.

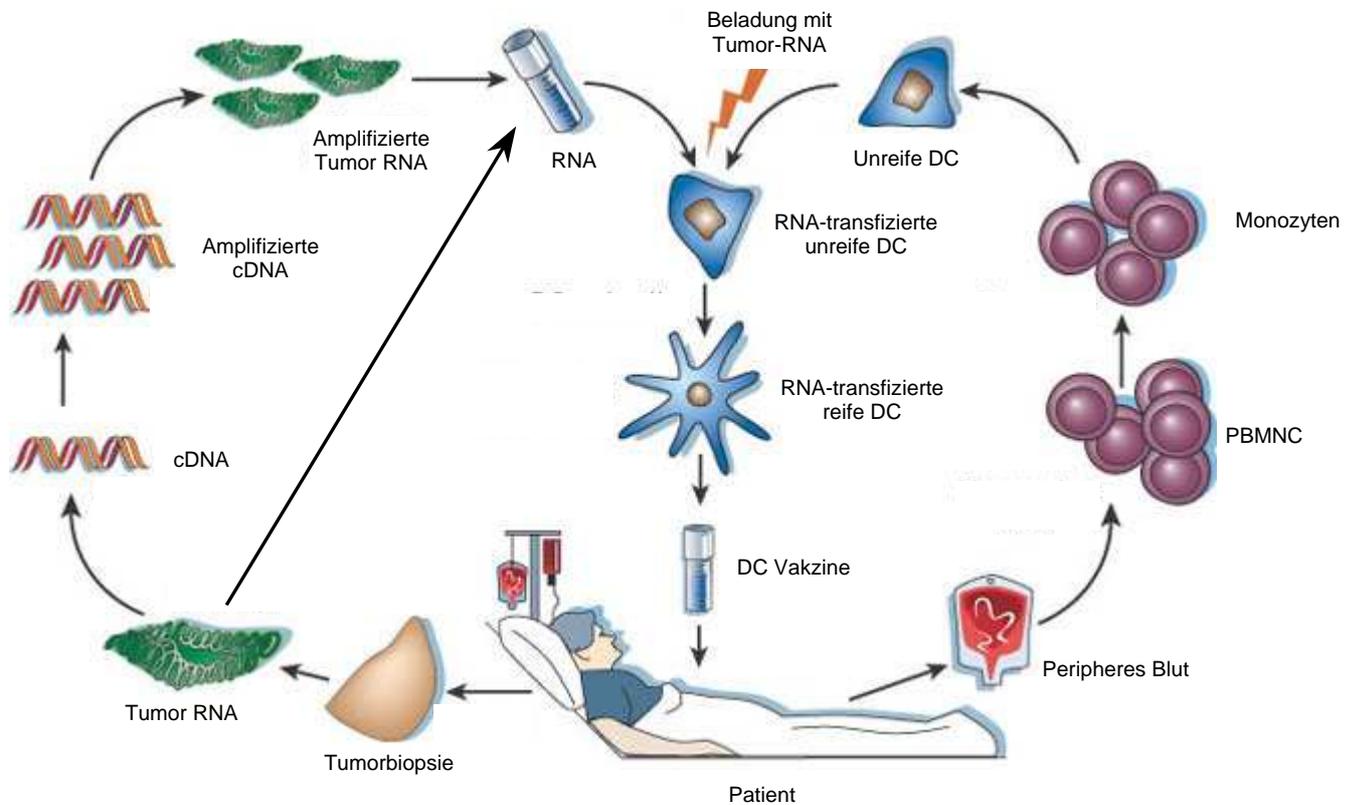


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der Vakzinierung eines Tumorpatienten mit autologen mit Gesamttumor-RNA transfizierten dendritischen Zellen. Die verwendete RNA wird aus einer Tumorbiose isoliert und ggf. in vitro amplifiziert (modifiziert nach Sullenger et Gilboa, 2002).

1.3 RNA

1.3.1 Evolution der RNA

Lebende Zellen sind vermutlich auf der Erde vor rund 3,5 Milliarden Jahren durch spontane Reaktionen zwischen verschiedenen Molekülen in einer Umgebung entstanden, die weit ab von einem chemischen Gleichgewicht stand (Dickerson *et al.*, 1978; Schopf *et al.*, 1978). Aus dem Wissen, das man von heutigen Organismen besitzt, scheint es wahrscheinlich, daß die Entwicklung autokatalytischer Mechanismen mit der Evolution von RNA-Familien begann, die ihre eigene Replikation katalysieren konnten. Im Laufe der Zeit entwickelten sich

aus einer dieser Familien RNA-Moleküle mit enzymatischer Aktivität (Ribozyme), die in der Lage waren, die Synthese von Peptiden zu katalysieren. Die Entwicklung von Proteinen mit katalytischer Aktivität (Enzyme) erfolgte in der Evolution also nach der Entstehung von katalytisch aktiven RNA-Molekülen (Ribozymen). Durch das langsame Entstehen immer komplexerer Zellen ersetzte schließlich die DNA-Doppelhelix als wesentlich stabileres Molekül die RNA zur Speicherung der zunehmenden Menge an genetischer Information (Bendal *et al.*, 1983).

1.3.2 Biologische Aufgaben der RNA

Die zentrale Rolle der RNA besteht in ihrer Beteiligung am Fluß der genetischen Information von der DNA zum Protein. Bei der sogenannten Transkription wird am kodierenden Strang der DNA-Doppelhelix ein zum Genabschnitt komplementäres RNA-Molekül synthetisiert. (Brachet, 1987; Brenner *et al.*, 1960; Crick, 1970; Jacob *et Monod*, 1961). Dieses RNA-Molekül enthält sowohl den Introns als auch den Exons entsprechende Bereiche und wird als heteronukleäre RNA (hnRNA) bezeichnet. Die hnRNA durchläuft noch im Kern mehrere Prozessierungsschritte, wobei die in ihr vorhandenen nicht kodierenden Abschnitte (Introns) exzidiert werden und an beiden Enden des Moleküles Modifikationen (5'-Capping, 3'-Polyadenylierung) stattfinden (Banerjee, 1980; Birnstiel *et al.*, 1985; Breathnach *et Chambon*, 1981; Darnell, 1983; Humphrey *et Proudfoot*, 1988; Littauer *et Soreq*, 1982; Sharp, 1987). Aus der hnRNA wird durch dieses sogenannte „RNA-Prozessing“ die messengerRNA (mRNA), die dann durch die Kernmembran ins Zytosol gelangt. Bei der Exzision der Introns, was auch als Spleißen bezeichnet wird, spielt eine weitere RNA-Art eine wichtige Rolle, die sogenannte „small nuclear RNA“ (snRNA) (Guthrie *et Patterson*, 1988; Maniatis *et Reed*, 1987; Steitz, 1988). Diese sind relativ kleine uracilreiche RNAs, die mit sieben bis zehn verschiedenen Proteinen Ribonukleoproteinpartikel („small nuclear ribonucleoproteins“, snRNPs, ausgesprochen „snurps“) bilden, an denen der eigentliche Spleißprozess abläuft.

Im Zytosol wird die mRNA-Sequenz an den Ribosomen in die entsprechende Aminosäuresequenz des zu synthetisierenden Proteins übersetzt. Der Antransport der jeweiligen Aminosäuren erfolgt über die sogenannte „transfer RNA“ (tRNA). Für jede der 20 proteinogenen Aminosäuren existiert eine spezifische tRNA und eine spezifische Aminoacyl-tRNA-Synthetase, die die Knüpfung der Esterbindung zwischen dem 3'-Ende der jeweiligen tRNA und der Carboxylgruppe der entsprechenden Aminosäure katalysiert. Die beladene tRNA erkennt dann mit ihrem Antikodon das komplementäre Kodon auf der sich an den Ribosomen befindenden mRNA. Auf diese Weise wird die Übersetzung der Nukleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz der Proteine gewährleistet. (Blow *et* Brick, 1985; Crick, 1966; Nirenberg *et* Leder, 1964; Schimmel, 1987).

Auch am Aufbau der Ribosomen hat RNA neben verschiedenen Proteinen einen wesentlichen Anteil. Man bezeichnet diese als ribosomale RNA (rRNA). Sowohl das prokaryontische wie auch das eukaryontische Ribosom bestehen aus einer großen und einer kleinen Untereinheit. Die kleine Untereinheit enthält bei Prokaryonten eine 16S-rRNA, während die große Untereinheit eine 5S- sowie eine 23S-rRNA aufweist. Bei Eukaryonten besitzt die kleine Untereinheit eine 18S-rRNA, während die große Untereinheit rRNAs mit Sedimentationskoeffizienten von 5S, 5.8S und und 28S beinhaltet (Bielka, 1982; Dahlberg, 1989; Lake, 1981; Moore, 1988; Nierhaus, 1982; Noller, 1984).

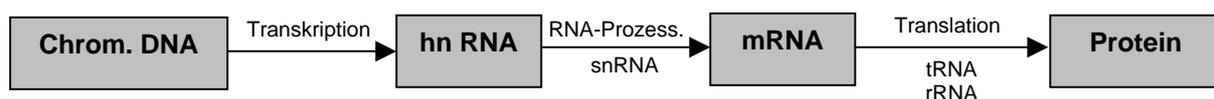


Abb.1.7: Aufgaben der verschiedenen RNA-Moleküle bei der Proteinbiosynthese

RNA	Länge [Ribonucleotide]
hnRNA, mRNA	Einige hundert bis über zehntausend
snRNA	100-220
tRNA	80-90
Prokaryont. rRNA	5S:120 16S:1542 23S:2904
Eukaryont. rRNA	5S:120 5.8S:160 18S:1874 28S:4718

Tab.1.2: Länge der verschiedenen RNA-Moleküle

1.3.3 Struktur und Stabilität von eukaryontischer mRNA

Die typische eukaryontische mRNA trägt am 5'-Ende eine „Kappe“ (cap). Hierbei handelt es sich um einen 7-Methylguanosin-Rest, der über eine Triphosphat-Brücke mit der 5'-OH-Gruppe des nächstfolgenden Nukleotids verknüpft ist. Diese und das dritte Nukleotid in der Reihe sind meist ebenfalls modifiziert, und zwar je durch eine Methylgruppe am 2'-OH der Ribose. Darauf folgt ein 5'-Nichtkodierungsbereich, der im Standardfall aus 50-100 Nukleotiden besteht. Die typische mRNA ist monocistronisch. Sie enthält eine Kodierungssequenz, welche auf der 5'-Seite von dem universellen Initiationskodon AUG und auf der 3'-Seite von einem der drei Stopkodons (UAA, UAG, UGA) eingefasst wird. Hinter dem Stopkodon befindet sich eine 3'-Nichtkodierungssequenz meist mit einer Länge von einigen hundert Nukleotiden. Das Ende der meisten eukaryontischen mRNAs ist der sogenannte poly(A)-Schwanz, eine monotone Folge von 100-200 Adenylatresten.

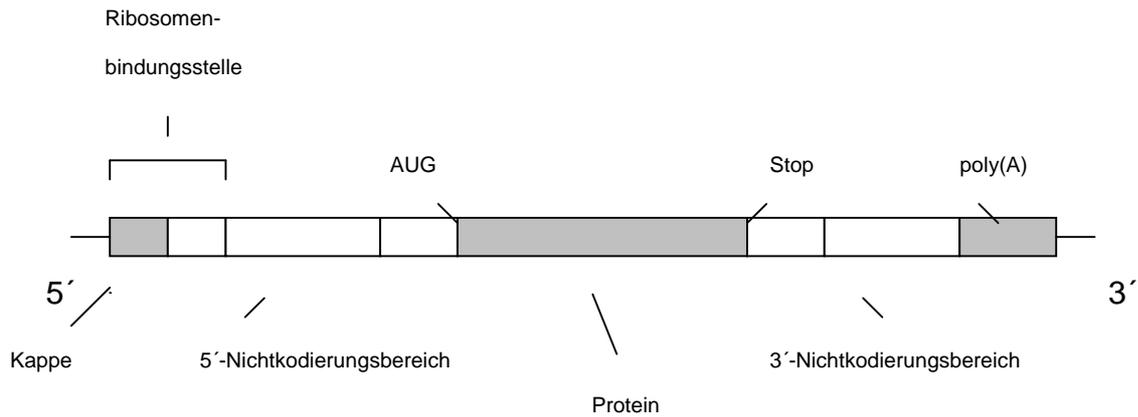


Abb. 1.8: Struktur einer eukaryontischen mRNA

RNasen sind spezifische Enzyme, die RNA angreifen und aus ihr Mono- und Oligoribonukleotide abspalten. Sie sind weit verbreitet und äußerst stabil. Die in den Ribonukleotiden im Gegensatz zu den Desoxyribonukleotiden vorhandene 2'-OH-Gruppe erlaubt die Ausbildung zyklischer Diester bei der Spaltung von Internukleotidbindungen und hat zur Folge, daß RNA bei alkalischem pH-Wert vollständig zu Ribonukleotiden hydrolysiert wird (Deutscher, 1988).

Einige eukaryontische mRNAs haben eine Halbwertszeit von mehr als 10 h (z.B. β -Globin), andere haben eine Halbwertszeit von nur 30 min. oder weniger. Gerade diese weniger stabilen mRNAs kodieren häufig für Regulationsproteine, deren Verfügbarkeit in den Zellen rasch verändert werden muß. Viele dieser mRNAs weisen deswegen eine geringere Stabilität auf, weil sie spezifische Sequenzen enthalten, die ihren Abbau fördern. Beispielsweise besitzen manche relativ instabile mRNAs in ihrem 3'-nichtkodierenden Abschnitt Erkennungsstellen für spezifische Endonukleasen, die diese mRNAs zu zerschneiden vermögen. Die Stabilität einer mRNA kann auch als Antwort auf ein extrazelluläres Signal verändert werden. In diesem Sinne beeinflussen Steroidhormone Zellen nicht nur durch ihren Einfluß auf die Expression bestimmter Gene, sondern auch durch eine Modulation der Stabilität verschiedener mRNAs, die von diesen Genen kodiert werden. Durch Eisengabe kann die Stabilität der

Transferrin-Rezeptor-mRNA erniedrigt werden, was zur Folge hat, daß dieser Rezeptor in geringerem Maße synthetisiert wird und somit weniger mit Eisen beladenes Transferrin in die Zelle aufgenommen wird (Brown, 1981).

Neben den bereits beschriebenen tragen noch weitere Strukturelemente zur Stabilität der RNA bei. Die Polyadenylierung am 3'-Ende findet im Zellkern offensichtlich bei nahezu allen eukaryontischen mRNA-Vorläufern mit Ausnahme der Histon-mRNAs statt. Nach ihrer Wanderung ins Zytosol wird der ca. 200 Nukleotide umfassende poly-(A)-Schwanz im Verlauf von Tagen schrittweise verkürzt. Da keine Schwänze mit einer Länge von weniger als 30 Nukleotiden entdeckt werden konnten, nimmt man an, daß es sich hierbei um die minimale poly-(A)-Schwanz-Länge handelt, die für eine hinreichende mRNA-Stabilität benötigt wird. Die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA vermittelt deren Export vom Kern ins Zytosol und trägt ebenfalls erheblich zur Stabilität bei. In der vorliegende Arbeit wurden die stabilisierenden Sequenzmotive des β -Globins sowie der Effekt der 5'-Cap-Struktur zur Stabilisierung von zur Transfektion verwendeten *in-vitro*-Transkripten eingesetzt.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Etablierung eines Systems zur Transfektion von *ex vivo* generierten dendritischen Zellen mit Gesamttumor-RNA, um diese später für die Induktion tumorspezifischer zytotoxischer T-Zellen verwenden zu können. In der von mir vor dieser Dissertation angefertigten Diplomarbeit (M. R. Müller, RNA-Transfektion von dendritischen Zellen, 2000) gelang uns die RNA-Transfektion von HeLa-Zellen mit den kationischen Lipofektionsagenzien Unifectin und Unifectin M, wobei wir eine Transfektionseffizienz von 15-20 % erzielen konnten. Hierbei erwies sich das Agens Unifectin M dem Unifectin überlegen. In der nun durchgeführten Dissertation sollten zunächst weitere Transfektionsmethoden auf ihre Applikabilität für die RNA-Transfektion von dendritischen Zellen evaluiert werden. Diesbezüglich war geplant, die Methoden Lipofektion mit Unifectin M, Transferrinrezeptor-(CD71)-vermittelte Endozytose sowie Elektroporation hinsichtlich ihrer Effizienz bei der RNA-Transfektion von dendritischen Zellen zu vergleichen. Hierfür sollte *in vitro*-transkribierte EGFP mRNA aus dem Plasmid pSP64 Poly(A) EGFP II als zu transfizierende RNA eingesetzt werden. Ferner war geplant, mit unterschiedlichen Methoden mit Gesamttumor-RNA transfizierte dendritische Zellen auf ihre Potenz hinsichtlich der Induktion von tumorspezifischen T-Lymphozyten zu untersuchen. Darüberhinaus waren die Bestimmung der Expressionskinetik von in unreife dendritische Zellen transfizierter Gesamttumor-RNA sowie die Etablierung eines Protokolles zur *in-vitro*-Amplifikation von Gesamttumor-RNA Gegenstand der durchgeführten Untersuchungen.

2 Material

2.1 Tumorzelllinien

Name	Herkunft	HLA-Typ	Referenz
N43 EGFP	RCC stabil transfiziert mit dem DNA-Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) Kultur in Selektionsmedium mit G418 Grüne Fluoreszenz	HLA-A1/-	L. Behnke, Universität Tübingen (1999)
A498	RCC	HLA-A2/-; B8/-	ATCC # HTB-44
MZ1257	RCC	HLA-A2/-	H. Bernhard, TU München (1994)
HCT116	Kolonkarzinom	HLA-A2/-	ATCC # CCL-247
Croft	EBV-immortalisierte B-Zell-Linie	HLA-A2/-; B7/8; Cw7/-	O.J. Finn, Pittsburgh, PA, USA
SK-OV-3	Ovarialkarzinom	HLA-A3/68; B18/35	ATCC # HTB-77
ACHN	RCC	HLA-A26/-	ATCC # CRL-1611
SW480	Kolonkarzinom	HLA-A2/-;B8/17	ATCC # CCL-228

2.2 Bakterienstamm

Name	Genotyp	Hersteller	Referenz
One Shot™ Top 10 Competent Cells (E. coli INVαF')	F-,mcrAΔ(mrr-hsdRMSmcrBC) φ80lacZΔM15ΔlacX74deoRrecA1araD139Δ (ara-leu)7697galUgalKrrpsL(Str ^R)endA1nupG {P3:Kan ^R , Amp ^R (amber), Tet ^R (amber)}	Invitrogen	Grant <i>et al.</i> (1990)

2.3 Geräte

Elektrophoreseapparatur

Elektrophoresekammer Mini-Large 410000	Polymehr, Paderborn
Elektrophoresekammer Horizontal-Midi 420000	Polymehr, Paderborn
Elektrophoresekammer Sunrise SL	Life Technologies, Heidelberg
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Pharmacia, Pfizer Corp., Karlsruhe

Kunststoff- und Kleinmaterial

VIVASPIN 4mL Concentrotor with tubes	VIVASCIENCE, Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen, steril, 15 mL	Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen BlueMax™, steril, 50 mL	BD FALCON, Heidelberg

Polystyrol-Gewebekulturröhrchen, steril, 10 mL	Greiner, Frickenhausen
Polystyrol-Rundbodenröhrchen, steril, 5 mL	BD FALCON, Heidelberg
Spritze, steril, 50 mL	BD FALCON, Heidelberg
Spritze, steril, 20 mL	Braun, Melsungen
Spritze, steril, 10 mL	Braun, Melsungen
Sterilfilter Minisart 0.20 µm	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Minisart 0.45 µm	Sartorius, Göttingen
Zellkulturflasche NUNCOLON™, 175 cm ² , 800 mL	NUNC, Wiesbaden
Zellkulturflasche 250 mL, Polystyrol, pyrogenfrei	BD FALCON, Heidelberg
Zellkulturflasche 70 mL, Polystyrol, pyrogenfrei	BD FALCON, Heidelberg
6-Well-Zellkulturplatte	BD FALCON, Heidelberg
24-Well-Zellkulturplatte	Greiner, Frickenhausen
96-Well-Zellkulturplatte	Greiner, Frickenhausen
Combitips plus 2.5 mL	Eppendorf, Hamburg
Combitips plus 5.0 mL	Eppendorf, Hamburg
Gebekulturschalen, d:10 cm, pyrogenfrei	BD FALCON, Heidelberg
Einmal-Pipetten, Polystyrol, 2 mL, steril	BD FALCON, Heidelberg
Einmal-Pipetten, Polystyrol, 5 mL, steril	Greiner, Frickenhausen
Einmal-Pipetten, Polystyrol, 10 mL, steril	Greiner, Frickenhausen
Einmal-Pipetten, Polystyrol, 25 mL, steril	Greiner, Frickenhausen
Einmal-Pipetten, Polystyrol, 50 mL, steril	Greiner, Frickenhausen
Safeseal-Tips bis 10 µL	Biozym, Hessisch Oldendorf
Safeseal-Tips bis 20 µL	Biozym, Hessisch Oldendorf
Safeseal-Tips bis 100 µL	Biozym, Hessisch Oldendorf
Safeseal-Tips bis 200 µL	Biozym, Hessisch Oldendorf
Safeseal-Tips bis 1000 µL	Biozym, Hessisch Oldendorf
Einmal-Kanüle 100 StericanR 0.90 x 70 mm, 20 G x 2 4/5“	Braun, Melsungen
Luer Lock	

Optische Geräte

Spektrophotometer GeneQUANT™ II	Pharmacia, Pfizer Corp., Karlsruhe
Lichtmikroskop Axiovert 25	ZEISS, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135	ZEISS, Oberkochen
Spiegelreflexkamera KR-10M	RICOH, Düsseldorf
Geldokumentationsanlage BioDoc Analyze	Whatman Biometra, Göttingen

Thermische Geräte und Kühlgeräte

Wasserbad mit Schlauchanschluss 1002	GFLmbH, Burgwedel
Hybridisierungsöfen Hybi 8-1996	Bachofer, Reutlingen
Varioklav 500 E	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Kühl-Gefrier-Kombination Premium KGT 3946	Liebherr, Biberach
-80°C-Schrank UF 300	NAPCO, Winchester, Virginia, USA
Water-Jacketed US Autoflow Automatic CO ₂ - Inkubator OM0069 (T: 37.0°C; [CO ₂] = 5.0%)	NuAire, Fernwald

Zellkultur

Sterile Werkbank HLB 2472 GS	Heraeus Inst., Hanau
Zählkammer nach Neubauer Improved	Assistent, Sondheim

Zentrifugen

Centrifuge 5417R
 Megafuge 1.0 R
 RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge (Rotor SS34)
 Eppendorf Zentrifuge 5417R

Eppendorf, Hamburg
 Heraeus Inst., Hanau
 Sorvall, Bad Homburg
 Eppendorf, Hamburg

Durchflusszytometer

FACSCalibur

Becton-Dickinson, Heidelberg

Elektroporationsgerät

Easyject Plus
 Kunststoffküvetten 4 mm

Peqleb, Erlangen
 Peqleb, Erlangen

Radioaktivitätsmessgeräte

MicroBeta 1450 TriLux
 Liquid Scintillation Counter LKB

Wallac-ADL, Freiburg
 Wallac-ADL, Freiburg

ELISPOT-Counter

Immunospot Analyzer

CTL Analyzers LLC,
 Cleveland, Ohio, USA

2.4 Chemikalien und Biochemikalien

Agarose
 Ampuwa Wasser
 Biocoll Trennlösung (Ficoll)
 Borsäure

 Bromphenolblau
 BSA

 Coomassie Brilliant Blue R-250
 Cap-Scribe-Puffer
 DEPC
 DMSO
 DNA-Längenstandards VIII (19-1114 bp)
 EDTA
 Eisessig
 Ethanol absolut
 Ethidiumbromid
 FCS

 Formaldehyd
 Formamid
 GeneRuler™ DNA Ladder Mix (100-10000 bp)
 Geneticin

 HEPES
 [³H]-Thymidin

Roth, Karlsruhe
 Fesenius Kabi, Bad Homburg
 Biochrom KG, Berlin
 Gibco, Invitrogen Corp.,
 Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Boehringer Ingelheim,
 Ingelheim
 Bio-Rad, München
 Roche, Mannheim
 Roth, Karlsruhe
 Serva, Heidelberg
 Roche, Mannheim
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Merck, Darmstadt
 Roth, Karlsruhe
 Gibco, Invitrogen Corp.,
 Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Roche, Mannheim
 Gibco, Invitrogen Corp.,
 Karlsruhe
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Amersham Pharmacia
 Biosciences, Freiburg

ImMedia™ Amp Blue	Invitrogen Corp., Karlsruhe
ImMedia™ Amp Liquid	Invitrogen Corp., Karlsruhe
ImMedia™ Kan Blue	Invitrogen Corp., Karlsruhe
ImMedia™ Kan Liquid	Invitrogen Corp., Karlsruhe
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
MOPS	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natrium-[⁵¹ Cr]-chromat	Amersham Pharmacia Biosciences, Freiburg
PBS	Gibco, Invitrogen Corp., Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Invitrogen Corp., Karlsruhe
PMA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protamin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Restriktionsendonucleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA Millennium Markers (0.5-9 kb)	Ambion
RNA Century Markers (0.1-1 kb)	Ambion
RPMI 1640 mit Glutamax I	Gibco, Invitrogen Corp., Karlsruhe
Saccharose	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS	Sigma-Aldrich, Steinheim
SOC-Medium	Gibco, Invitrogen Corp., Karlsruhe
Tris-HCl	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X 100	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA	Gibco, Invitrogen Corp., Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ultrapure Water	Biochrom KG, Berlin
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe
X-VIVO 20	BioWhittaker, Taufkirchen

2.5 Zellkulturmedien

RP10 (Standardmedium zur Kultivierung von Tumorzelllinien)

RPMI 1640 mit Glutamax I
FCS 10% (v/v) nach Hitzeinaktivierung
Penicillin-Streptomycin 2% (v/v)

Selektionsmedium zur Kultivierung der Zelllinie N43 EGFP

Standardmedium (s.o) + Geneticin (Endkonz. 0.5 mg/mL)

Einfriermedium

FCS nach Hitzeinaktivierung
DMSO 10% (v/v)

2.6 Puffer und Lösungen

10x TE-Puffer pH 8.0

100 mM Tris-HCl
10 mM EDTA pH 8.0

10x TBE-Puffer pH 8.4

890 mM Tris
890 mM Borsäure
20 mM EDTA pH 8.0

DNA-Laufpuffer

250 mL 10x TBE-Puffer
2250 mL ddH₂O
20 mM EDTA pH 8.0
0.1 mL Ethidiumbromid 1% (1 mg/mL)

10x DNA-Ladepuffer pH 8.0

80% (w/v) Saccharose
0.5% (w/v) Bromphenolblau
0.2% (w/v) SDS
100 mM Tris/HCl

10 x RNA-Laufpuffer

0.2 M MOPS pH 7.0
40 mM Natriumacetat
5 mM EDTA pH 8.0

RNA-Ladepuffer

250 µL Formamid
83 µL Formaldehyd
50 µL 10 x RNA-Laufpuffer
Bromphenolblau (Endkonzentration 0.01%)

FACS-Puffer

PBS
0.5% (w/v) BSA

MACS-Puffer

PBS
0.5% (w/v) BSA
2 mM EDTA

Transfektionspuffer (Unifectin) pH 7.4

10 mM HEPES
150 mM NaCl

HBS-Puffer pH 7.3

20 mM HEPES
150 mM NaCl

ELISPOT-Waschpuffer

PBS

0.05% (v/v) Tween 20

Entfärbelösung

30% (v/v) Ethanol

10% (v/v) Eisessig

DEPC-Wasser

1000 mL Ultrapure Water

1 mL DEPC

2.7 Antikörper

Durchflusszytometrie

Maus IgG

Becton-Dickinson, Heidelberg

FITC-Maus IgG

Becton-Dickinson, Heidelberg

FITC-antiCD1a

Pellicluster, Amsterdam

FITC-antiCD3

Becton-Dickinson, Heidelberg

FITC-antiCD4

Becton-Dickinson, Heidelberg

FITC-antiCD5

Becton-Dickinson, Heidelberg

FITC-antiCD14

Becton-Dickinson, Heidelberg

FITC-antiCD19

Becton-Dickinson, Heidelberg

FITC-antiCD86

Becton-Dickinson, Heidelberg

PE-Maus IgG

Becton-Dickinson, Heidelberg

PE-antiCD3

Becton-Dickinson, Heidelberg

PE-antiCD8

Becton-Dickinson, Heidelberg

PE-antiCD80

Becton-Dickinson, Heidelberg

PE-antiCD83

Immunotech, Hamburg

PE-antiHLA-DR

Becton-Dickinson, Heidelberg

Blockierungsexperimente

W6/32 (antiHLA-Klasse I)

Prof. S. Stevanovic, Tübingen

Tü39 (antiHLA-Klasse II)

Müller *et al.*, 1985

ELISPOT

mAb 1-D1K (Anti human IFN- γ)

Mabtech, Hamburg

Biotinylierter mAb 7-B6-1 (Anti human IFN- γ)

Mabtech, Hamburg

2.8 Zytokine

IL-2

R&D Systems, Wiesbaden

IL-4

R&D Systems, Wiesbaden

GM-CSF (Leukomax)

Essex Pharma, München

TNF- α

R&D Systems, Wiesbaden

2.9 Kits

RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden
RNeasy Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAQuick PCR Purification Kit	QIAGEN, Hilden
µMACS mRNA Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
B Cell Isolation Kit Human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD4+ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
AntiFITC MultiSort Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
SMART PCR cDNA Synthesis Kit	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
mMessage mMachine T7 Kit	Ambion, Huntingdon, UK
DuoFect™ Transfection Kit	Quantum Appligene, Carlsbad, CA, USA

2.10 Plasmide

pEGFP-N1	BD Biosciences Clontech, Heidelberg
pSP64 poly(A)EGFP II	Prof. Z. Berneman, Antwerpen, Belgien

2.11 Enzyme

Nde I	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SP6 RNA Polymerase	Roche, Mannheim

2.12 Peptide

ELTLGEFLKL aus Survivin	Prof. S. Stevanovic, Tübingen
SVASTITGV aus Adipohilin	Prof. S. Stevanovic, Tübingen
ILAKFLHWL aus Telomerase	Prof. S. Stevanovic, Tübingen
LLLLTVLTV aus Muc1	Prof. S. Stevanovic, Tübingen

3 Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

3.1.1 Kultivierung von Tumorzelllinien

Tumorzellen wurden in RP10-Kulturmedium in 70 mL-, 250 mL- oder 800 mL- Gewebekulturflaschen bei 37.0°C und 5.0% CO₂ kultiviert. Zur Kultivierung der mit dem Vektor pEGFP-N1 transfizierten Nierenzellkarzinom-Zelllinie N43 EGFP wurde ein Selektionsmedium mit G418 (RP10 mit 0.5 mg/mL Geneticin) verwendet. Die Zelldichte wurde je nach Zelltyp zwischen 3 x 10⁵ und 1 x 10⁶ Zellen/mL gehalten und das Kulturmedium alle 2-3 Tage ersetzt. Zur Ablösung adhärenter Zellen vom Flaschenboden wurde das Medium zunächst vollständig abgesaugt, dann 3mL Trypsin-EDTA zugegeben und die Kulturflasche für 5 min. in den Inkubator (37.0°C, 5.0 % CO₂) gestellt. Nach Zugabe von etwa 5 mL FCS-haltigem Medium zur Neutralisation des Trypsins wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Medium in eine neue Kulturflasche überführt.

3.1.2 Kryokonservierung von Tumorzellen

Zur Aufbewahrung wurden die Tumorzellen auf Eis in Einfriermedium suspendiert (1-2.5 x 10⁷/mL) und in Aliquots zu jeweils 1 mL in Kryoröhrchen bei -80.0°C gelagert. Aufgetaut wurden die Zellen bei 37.0°C im Wasserbad. Anschließend wurde sofort warmes Medium hinzugegeben. Dann wurden die Zellen für 5 min. bei 1500 rpm zentrifugiert und gewaschen. Die Zeit für das Einfrieren und Auftauen der Zellen wurde unter einer Zeit von 5 min. gehalten, da DMSO bei Raumtemperatur toxisch für die Zellen ist. Tumorzellen wurden nach dem Auftauen zunächst in 70 mL-Kulturflaschen in hoher Zellkonzentration gehalten und dann langsam auf größere Volumina adaptiert. Die für eine spätere RNA-Präparation bestimmten Tumorzellen wurden als Pellets von jeweils 3 x 10⁸ Zellen bei -80.0°C konserviert. Hierzu wurde das entsprechende Volumen der ausgezählten Zellsuspension in ein frisches Poly-

propylenröhrchen (50 mL) überführt und für 6 min. bei 1400 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Nach Absaugung des Überstandes erfolgte dann die Lagerung bei -80.0°C bis zur späteren Aufarbeitung.

3.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer nach Neubauer bestimmt. Die Zellen wurden in zwei bzw. vier Großquadraten ausgezählt und die Zellzahl anschließend gemittelt.

Formel zur Berechnung der Zellzahl:

$$\text{Zellzahl in einem Großquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/mL}$$

Mit der Bestimmung der Zellzahl verknüpft wurde stets eine Färbung der Zellen mit Trypanblau, um den Anteil an toten Zellen bestimmen zu können. Tote Zellen nehmen aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit Trypanblau auf und erscheinen somit unter dem Mikroskop blau.

3.1.4 Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMNC)

Zur Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut wurden Buffy-Coat-Präparationen von gesunden Spendern der Blutbank der Universität Tübingen verwendet. Buffy Coat wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt. Mit jeweils 25 mL der Buffy Coat/PBS-Verdünnung wurden 13 mL Ficoll (Dichte 1.077 g/mL) in einem 50 mL Röhrchen vorsichtig überschichtet, so daß sich eine klar auszumachende Grenzschicht bildete. Anschließend folgte eine Zentrifugation bei 1900 rpm ohne Bremse für 13 min. bei Raumtemperatur. Nach Abnahme und Verwerfung von etwa der Hälfte des Überstandes folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 1900 rpm für 12 min. bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Abnahme der PBMNC-Schicht (Grenzschicht zwischen Ficoll und Serum) mit einer sterilen Einweg-

Pasteurpipette und deren Überführung in ein frisches 50 mL Röhrchen. In der PBMNC-Schicht befinden sich hauptsächlich Lymphozyten und Monozyten, welche gemeinsam als mononukleäre Zellen bezeichnet werden, während Erythrozyten und Granulozyten aufgrund ihrer höheren Dichte durch das Ficoll hindurch an den Boden des Röhrchens zentrifugiert werden. Nach zweimaligem Waschen der PBMNC in 40 mL PBS mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 1400 rpm mit Bremse für 10 min. bei Raumtemperatur erfolgte zur Entfernung der Thrombozyten ein weiterer Waschschriff mit 50 mL PBS mit nachfolgender Zentrifugation bei 800 rpm ohne Bremse für 15 min. bei Raumtemperatur. Anschließend erfolgte die Aufnahme des Pellets in 10 mL RP10-Medium und die Bestimmung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer.

3.1.5 *Ex-vivo*-Generierung von dendritischen Zellen aus PBMNC

Aus Buffy Coat isolierte PBMNC wurden in 6-Well-Platten in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/well und jeweils 3 mL RP10-Medium ausplattiert und für 2 h bei 37.0°C und 5% CO₂ inkubiert. Monozyten adhärieren dabei an den Plastikboden der Zellkulturplatte. Alle nichtadhärenten Zellen wurden anschließend vorsichtig zweimal mit jeweils 2 mL PBS abgespült. Für die Weiterkultur bei 37°C und 5% CO₂ wurde in jedes Well 3 mL frisches RP10-Medium gegeben und 20 ng/mL IL-4 sowie 100 ng/mL GM-CSF zugesetzt (Tag 0). An den Tagen 2, 4 und 6 wurden die Zytokine IL-4 und GM-CSF in den o.g. Konzentrationen erneut zugegeben. Die Ernte von unreifen dendritischen Zellen erfolgte jeweils am Tag 6. Zur Generierung von reifen dendritischen Zellen wurde am Tag 6 zusätzlich TNF- α in einer Konzentration von 10 ng/mL zugegeben. Die Ernte der reifen dendritischen Zellen erfolgte dann nach einer Inkubationsdauer von 24 h bei 37.0°C und 5.0% CO₂ am Tag 7. Zur Ernte wurden die DC mit PBS gründlich aus der Platte gespült und in RP10-Medium aufgenommen.

3.1.6 Kryokonservierung von dendritischen Zellen

Für spätere autologe Restimulationen wurden unreife dendritische Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/mL in FCS suspendiert, dann wurde auf Eis 10 % DMSO zugesetzt und die Zellen wurden bei -80.0°C asserviert. Die Kryokonservierung erfolgte in der Regel in Aliquots zu jeweils 1 mL (10^6 DC, 900 μL FCS, 100 μL DMSO). Aufgetaut wurden die DC jeweils 1 Tag vor der geplanten Restimulation bei 37.0°C im Wasserbad. Es folgte die sofortige Zugabe von warmem RP10-Medium und eine anschließende Zentrifugation für 5 min. bei 1400 rpm und Raumtemperatur. Die Weiterkultur bis zur geplanten Restimulation am folgenden Tag erfolgte in 24-Well-Platten (5×10^5 DC/well) in jeweils 1 mL RP10-Medium unter Zugabe von 20 ng/mL IL-4, 100 ng/mL GM-CSF sowie 10 ng/mL TNF- α . Eine etwaige Elektroporation wurde 3-6 h nach dem Auftauen durchgeführt. Anschließend wurden die elektroporierten DC wie oben beschrieben bis zur Restimulation am nächsten Tag weiterkultiviert.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Plasmidtransformation in E. coli

Zur Vermehrung wurden die verwendeten Plasmide in den Bakterienstamm E. coli INV α F' (Invitrogen, Karlsruhe) transformiert. Ein Aliquot der chemisch kompetenten Bakterien (OneShot[®], Invitrogen, 50 μL /Aliquot) wurde auf Eis aufgetaut und vorsichtig resuspendiert. Das zu vermehrende Plasmid wurde mit TE-Puffer auf eine Endkonzentration von 10 ng/ μL eingestellt, dann erfolgte die Zugabe von 5 ng (5 μL) zu den resuspendierten kompetenten Zellen. Nach einer Inkubationsperiode von 30 min. auf Eis erfolgte eine Hitzeschock bei 42.0°C im Wasserbad und anschließend eine abermalige Inkubation für 5 min. auf Eis. Daraufhin wurden dem Ansatz 500 μL SOC-Medium (Invitrogen) zugegeben und das Röhrchen dann bei 37.0°C und 225 rpm im Inkubator geschüttelt. Anschließend wurden 20 μL des

Transformationsansatzes unter sterilen Bedingungen auf einer je nach Antibiotikaresistenzgen des zu vermehrenden Plasmides mit Ampicillin oder Kanamycin versetzten LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37.0°C inkubiert.

3.2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Für die Plasmidpräparation wurde der Plasmid Maxi Kit von QIAGEN nach folgendem Protokoll verwendet. Einzelbakterienkolonien wurden über Nacht in 100 mL mit Ampicillin bzw. Kanamycin versetztem LB-Medium bei 37.0°C und 225 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen erfolgte die Überführung der LB-Übernachtskultur in vier Ultrazentrifugenröhrchen (35 mL) und eine anschließende Zentrifugation bei 6000 rpm für 15 min. bei 4.0°C in der Ultrazentrifuge Sorvall RC-5 (Rotor SS34). Anschließend erfolgte das vorsichtige Abdekantieren der Überstände, die Zugabe von jeweils 5 mL Resuspensionspuffer P1 zu den vier Bakterienzellpellets, die gründliche Resuspension der Pellets und die Vereinigung der Suspension in einem einzigen Ultrazentrifugenröhrchen (35 mL). Nach Zugabe von 10 mL des Lysepuffers P2 und anschließendem Durchmischen erfolgte eine Inkubationsperiode von 5 min. bei Raumtemperatur zur Lyse der Bakterienzellen. Hierauf folgte die Zugabe von 10 mL des auf Eis vorgekühlten Neutralisationspuffers P3 und eine weitere Inkubation für 15 min. auf Eis. Nach mehrmaligem gründlichem Durchmischen des Bakterienlysates erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 rpm für 30 min. bei 4.0°C in der Ultrazentrifuge Sorvall RC-5. Anschließend erfolgte die vorsichtige Abnahme des die Plasmid-DNA enthaltenden Überstandes, seine Überführung in ein frisches autoklaviertes Ultrazentrifugenröhrchen (35 mL) und nachfolgende Zentrifugation bei 20000 rpm für 15 min. bei 4.0°C. Während dieses Arbeitsschrittes erfolgte parallel die Äquilibration einer Plasmidpräparationssäule QIAGEN-tip 500 durch Zugabe von 10 mL des Äquilibrationpuffers QBT. Nach Beendigung der Zentrifugation erfolgte das Auftragen des die Plasmid-DNA enthaltenden Überstandes auf die äquilibrierte Präparationssäule. Anschließend wurde die jetzt mit Plasmid-DNA beladene Säule mit jeweils 30

mL des Waschpuffers QC gewaschen. Die nachfolgende Elution der Plasmid-DNA erfolgte mit 15 mL des Elutionspuffers QF. Nach Zugabe von 10.5 mL Isopropanol zum Eluat zur Präzipitation der Plasmid-DNA erfolgte nach gutem Durchmischen eine weitere Zentrifugation bei 11000 rpm für 30 min. bei 4.0°C in der Ultrazentrifuge Sorvall RC-5. Nach vorsichtigem Abdekantieren des Überstandes und anschließender Aufnahme des DNA-Pellets in 70%igem Ethanol wurde dann erneut bei 11000 rpm für 30 min. bei 4.0°C zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Abdekantierung des Überstandes unter maximaler Schonung des DNA-Pellets. Da das transparente Pellet nur schwer zu erkennen ist, empfiehlt es sich, bereits vor der Ultrazentrifugation die Außenseite des Röhrchens entsprechend zu markieren. Nach Lufttrocknung des Pellets erfolgte die Aufnahme in 500 µL TE-Puffer sowie die anschließende spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung und Lagerung des Plasmids bei -20.0°C.

3.2.3 Agarosegelelektrophorese von DNA

Für die Auftrennung und Visualisierung von DNA-Fragmenten wurde ein 1%iges Agarosegel verwendet. Zum Gießen des Gels wurden 300 mg Agarose in einem autoklavierten Erlenmeyerkolben in 30 mL DNA-Laufpuffer suspendiert und dann im Mikrowellenherd bis zum Entstehen einer homogenen Lösung aufgeköcht. Anschließend wurde die vorbereitete Agaroselösung in den mit einem Taschenkamm versehenen Schlitten der verwendeten Gelkammer gegossen. Nach Aushärtung des Gels erfolgte die vorsichtige Entfernung des Taschenkamms und der Transfer des Schlittens in die mit DNA-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer. Zur Auftrennung wurden jeweils 0.5 µg Probe bzw. DNA-Marker pro Tasche eingesetzt. Vor der Beladung erfolgte die Zugabe von entsprechenden Volumina an 10x DNA-Ladepuffer und aqua bidest. zu den Proben und Markern, um eine Verdünnung des DNA-Ladepuffers zu erreichen. Anschließend erfolgte das vorsichtige Pipettieren der Proben und Marker in die vorgesehenen Taschen des zuvor gegossenen Gels. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in der Anfangsphase ($t=5\text{min.}$) bei einer Spannung von $U=150\text{ V}$, um die

DNA möglichst schnell in das Gel gelangen zu lassen und die Verluste an eingesetzter DNA durch Diffusionsphänomene möglichst gering zu halten. Nach dieser Anfangsphase erfolgte die Trennung bei einer Spannung von $U=50\text{ V}$ bis sich die Laufmittelfront (Bromphenolblau-bande) ungefähr am Ende des zweiten Drittels des Gels befand. Anschließend wurde das Gel in der Dokumentationsanlage unter UV-Illumination betrachtet.

3.2.4 *In vitro*-Transkription von EGFP mRNA

Eine intronfreie DNA-Sequenz, z.B. cDNA, wird in Transkriptionsorientierung in einen Transkriptionsvektor mit T7- oder SP6-Promotor kloniert. Diese DNA kann nun mit entsprechenden RNA-Polymerasen *in vitro* transkribiert werden. Superspiralisierte (supercoiled) Plasmid-DNA kann zwar direkt in die Transkription eingesetzt werden. Man erhält auf diese Weise allerdings deutlich geringere Ausbeuten als beim Einsatz von zuvor linearisierter DNA. Zur Linearisierung wird der Transkriptionsvektor an einer singulären Schnittstelle etwa 50-200 Basenpaare upstream vom Terminationscodon mit der entsprechenden Restriktionsendonuklease geschnitten. Die DNA wird dann über dann über ein säulenchromatographisches Verfahren (QIAQuick PCR Purification Kit) gereinigt und in die *In vitro*-Transkription eingesetzt. Die *In vitro*-Transkription wird durch Zugabe von Cap-Scribe-Puffer und der entsprechenden RNA-Polymerase gestartet. Der Cap-Scribe-Puffer enthält optimierte Konzentrationen der Ribonukleosidtriphosphate ATP, GTP, CTP und UTP sowie des Cap-Nucleotids $P^1\text{-}5'\text{-(7-Methyl)-Guanosin-P}^3\text{-}5'\text{-Guanosintriphosphat}$, welches eine effektive Produktion von gecappter mRNA garantiert (Sambrook et al., 1989).

Für die *In vitro*-Transkription der in den Transfektionsexperimenten verwendeten EGFP mRNA wurde das Plasmid pSP64 Poly (A) EGFP II (Z. Berneman, Antwerpen) eingesetzt. Zunächst wurden 5 μg des Plasmids mit 25 U der Restriktionsendonuklease Nde I für 3 h bei 37.0°C und 5.0% CO_2 geschnitten. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Linearisierung er-

folgte anschließend eine elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel. Bei quantitativer Linearisierung wurden nun die Aufreinigung des linearisierten Plasmids durchgeführt. Nach Zugabe von 250 μL Puffer PB wurde der Ansatz auf ein zuvor in einem RNase-freien Eppendorf-Reaktionsgefäß (2.0 mL) platzierten QIAQuick Spin-Säulchen aufgetragen und anschließend mit 13000 rpm bei Raumtemperatur für 60 s in der Eppendorf Zentrifuge 5417R zentrifugiert. Nach Verwerfung des Durchlaufs wurde das Säulchen mit 750 μL Waschpuffer PE gewaschen und anschließend abermals für 60s bei Raumtemperatur und 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde erneut verworfen und das gewaschene Säulchen durch einen erneuten Zentrifugationschritt unter den o.g. Bedingungen getrocknet. Die nachfolgende Elution der DNA erfolgte durch Gabe von 50 μL RNase-freien Wassers direkt auf die Membran des Säulchens, einminütige Inkubation bei Raumtemperatur und nachfolgende Zentrifugation für 60 s bei 13000 rpm und Raumtemperatur. Nach erfolgter Konzentrationsbestimmung im Spektrophotometer wurde das linearisierte, aufgereinigte Plasmid entweder bei -20.0°C gelagert oder direkt in die *In vitro*-Transkription eingesetzt.

Für die eigentliche *In vitro*-Transkription wurde dann auf Eis unter RNase-freien Bedingungen der folgende Ansatz in ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß (1.5 mL) pipettiert:

4.0 μL 5x Cap-Scribe-Puffer
x μL Linearisierte pSP64 poly (A) EGFPII DNA (0.5 μg)
14.0 μL - x μL RNase-freies Wasser
2.0 μL SP6-RNA-Polymerase (20 U)
<hr/>
20.0 μL Endvolumen

Nach kurzem Anzentrifugieren des Ansatzes wurde dieser dann für 2 h im Brutschrank bei 37.0°C und 5.0% CO_2 inkubiert. Anschließend wurde die Transkriptionsreaktion durch Zu-

gabe von 2.0 µL 0.2 M EDTA (pH 8.0) auf Eis abgestoppt. Für die anschließende Aufreinigung der generierten RNA-Transkripte wurde der abgestoppte Reaktionsansatz zunächst mit RNase-freiem Wasser auf ein Endvolumen von 100 µL aufgefüllt. Dann erfolgte die Zugabe von 350 µL Lysepuffer RLT und nach gründlichem Durchmischen die weitere Zugabe von 250 µL Ethanol. Nach erneutem guten Durchmischen wurde der Ansatz nun auf ein RNeasy Mini Spin-Säulchen pipettiert und dann für 15 s bei 4.0°C und 12000 rpm in der Eppendorf Tischzentrifuge 5417R zentrifugiert. Anschließend erfolgte der Transfer des beladenen Säulchens in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß (2.0 mL), nachfolgendes zweimaliges Waschen des Säulchens mit 500 µL Waschpuffer RPE und anschließende Trocknung der Membran durch einen weiteren Zentrifugationsschritt für 2 min. bei 4°C und 12000 rpm. Zur Elution der RNA wurde das Säulchen in ein neues RNase-freies Eppendorf-Reaktionsgefäß (1.5 mL) überführt. Es folgte das vorsichtige Pipettieren von 30 µL RNase-freien Wassers direkt auf die Membran und die anschließende Zentrifugation für 1 min. bei 4°C und 10000 rpm. Abschließend erfolgte die spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung sowie die Charakterisierung im denaturierenden RNA-Gel. Die erhaltene EGFP mRNA wurde entweder direkt in Transfektionsexperimenten eingesetzt oder bei –80.0°C gelagert.

3.2.5 Isolation von Total RNA aus Tumorzellen

Die Isolierung von Total RNA aus Tumorzellen erfolgte mit dem RNeasy Maxi Kit (QIAGEN, Hilden) nach dem Protokoll „Isolation von Total RNA aus tierischen Zellen“ (RNeasy Maxi Handbook, QIAGEN, Hilden). Das Prinzip dieser Methode beruht auf den selektiven Bindungseigenschaften der aus einem Silicagel bestehenden Membran der RNeasy-Säulen (Säulenchromatographie). Die eingesetzten Tumorzellen werden im Verlauf der Durchführung des o.g. Protokolles zunächst unter stark denaturierenden Bedingungen lysiert und homogenisiert, was zur unmittelbaren Inaktivierung vorhandener RNAsen führt.

Zunächst erfolgte das schonende Auftauen der bei -80.0°C kryokonservierten Zellpellets auf Eis und die anschließende Zugabe von 15.0 mL Lysepuffer RLT. Anschließend wurde das Zelllysat durch zehnmaliges Aufziehen in einer 20.0 mL Spritze mit einer 20G-Kanüle weiter homogenisiert. Danach erfolgte die Zugabe von 15.0 mL 70% Ethanol zum Zellhomogenisat und nachfolgende gründliche Durchmischung. Dann erfolgte das sukzessive Beladen der RNeasy-Säule mit dem Zellhomogenisat in Portionen von 15.0 mL und anschließende Zentrifugieren bei 4300 rpm und 4.0°C für 5 min. Nach Verwerfung des Zentrifugats wurde die Säule zunächst mit 15.0 mL Waschpuffer RW1 gewaschen und für 5 min. bei den o.g. Bedingungen zentrifugiert. Hierauf folgte ein Waschschrift mit 10.0 mL Waschpuffer RPE und anschließender Zentrifugation für 2 min. bei 4300 rpm und 4.0°C . Nach Verwerfung des Durchlaufs wurde die Säule erneut mit 10.0 mL Waschpuffer RPE gewaschen. Diesmal wurde allerdings im Anschluß zur Trocknung der Membran für 10 min. bei 4300 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfung der Zentrifugate wurde die Säule in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß (50 mL) transferiert. Die Elution der RNA erfolgte durch zweimalige Zugabe von jeweils 800 μL RNase-freien Wassers direkt auf die Silicagel-Membran, Inkubation für 1 min. bei Raumtemperatur und anschließende Zentrifugation für 3 min. mit 4300 rpm bei 4.0°C . Abschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung der erhaltenen RNA-Lösung im Spektrophotometer sowie ihre Charakterisierung durch Agarosegel-Elektrophorese. Die erhaltene RNA wurde anschließend mit dem Konzentratorsystem VivaSpin 4 (Vivascience) auf eine Endkonzentration von 3 mg/mL eingeeengt und dann entweder zur weiteren Isolierung von mRNA eingesetzt oder direkt bei -80.0°C kryokonserviert.

3.2.6 Isolation von mRNA aus Total RNA

Die Präparation von mRNA aus Total RNA wurde mit dem μMACS mRNA Isolation Kit (Miltenyi, Bergisch Gladbach) durchgeführt. Bis auf wenige Ausnahmen werden alle eukaryontischen mRNAs posttranskriptionell am 3'-Ende polyadenyliert. Diese Poly-(A)-Schwänze wei-

sen initial eine Länge von etwa 200 Nucleotiden auf und verkürzen sich während der Existenz der mRNA auf Längen von 40-65 Adenylatresten. Diese für die mRNA spezifische posttranskriptionale Modifikation erlaubt ihre Separation von den nicht polyadenylierten RNA-Spezies rRNA und tRNA. Die hier zum Einsatz gebrachte Methode beruht auf der spezifischen Basenpaarung zwischen den Adenylatresten der mRNA und den Oligodesoxythymidinresten der Oligo(dT)-gekoppelten Magnetpartikel.

Zur Isolierung von mRNA wurde die entweder frisch isolierte oder bei -80.0°C asservierte Gesamttumor-RNA (Total RNA) zunächst für 3 min. im Hybridisierungssofen bei 65.0°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Verdünnung der Total RNA-Lösung mit auf Raumtemperatur gebrachtem Lysis/Binding-Puffer im Verhältnis 1:1 wurden dann pro 100 μg Total RNA 25 μg Oligo(dT) Micro Beads hinzupipettiert. Nach guter Durchmischung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde die Lösung schließlich auf eine zuvor mit 250 μL Lysis/Binding-Puffer äquilibrierten MACS-Säule Type M im passenden MACS-Separationsmagneten aufgetragen. Anschließend wurde die Säule einmal mit 250 μL Lysis/Binding-Puffer und anschließend fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Elution der mRNA wurde dann 200 μL auf 65.0°C vortemperierter Elutionspuffer auf die Säule gegeben. Die auf diese Weise isolierte mRNA wurde anschließend spektrophotometrisch vermessen und im denaturierenden Agarosegel charakterisiert. Die Aufbewahrung der mRNA erfolgte bis zur späteren Verwendung bei -80.0°C .

3.2.7 Unspezifische Amplifikation von mRNA

Die unspezifische Amplifikation von mRNA wurde abgesehen von wenigen unten ausgeführten Modifikationen nach der von Boczkowski (Boczkowski *et al.*, 2000) beschriebenen Methode durchgeführt. Für die First-Strand-cDNA-Synthese und die Long-Distance-(LD)-PCR wurde der SMART PCR cDNA Synthesis Kit (BD Biosciences Clontech, Heidelberg) benutzt. Abweichend von dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll wurde ein den Bakteriophagen-

genpromotor T7 enthaltendes Oligonucleotid als Template-Switch-Oligo verwendet (5'-CGCGCGCGCTAATACGACTCACTATAGGGG-3'). Pro Reaktionsansatz wurde 1 µg Total RNA für die cDNA-Synthese eingesetzt. Nach Reaktionsende wurden die First-Strand-cDNA enthaltenden Ansätze durch Zugabe von 90 µL TE Puffer verdünnt und dann in die LD-PCR zur Amplifikation eingesetzt. Die 100 µL-Reaktionsansätze enthielten 10 µL der verdünnten First-Strand-cDNA, 20 pmol des vom Hersteller mit dem Kit gelieferten CDS-PCR-Primers sowie 20 pmol des selbst entworfenen T7-PCR-Primers (5'-GCGCGCGCTAATACGACTCACTAT-3'). Die LD-PCR wurde entsprechend dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll mit folgendem Temperaturprofil durchgeführt: initiale Denaturierung bei 95°C, 20 Zyklen bei 95°C für 15 s, 60°C für 30 s, 68°C für 7 min., Schlussexension bei 68°C für 10 min. Das LD-PCR-Produkt wurde anschließend mit dem QIAQuick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden) nach dem vom Hersteller mitgelieferten Protokoll aufgereinigt. Für die nachfolgende *In-vitro*-Transkription des LD-PCR-Produktes wurde der mMESSAGING mRNA-Kit (Ambion, Huntingdon, UK) verwendet.

3.2.8 Agarosegelelektrophorese von RNA

Die Auftrennung und Visualisierung von RNA-Fragmenten erfolgte im 1%igen denaturierenden Agarosegel. Zum Gießen des Geles wurden 0.2 g Agarose in einen autoklavierten Erlenmeyerkolben eingewogen, 2 mL 10x RNA-Laufpuffer sowie 14.7 mL DEPC-behandeltes Wasser zugegeben und die Suspension dann bis zum Entstehen einer homogenen Lösung im Mikrowellenherd aufgeköcht. Nach Abkühlung der Lösung auf unter 60.0°C erfolgte die Zugabe von 3.3 mL Formaldehyd (37%) unter dem Abzug und das sofortige Gießen des Gels in den mit Taschenkamm versehenen Schlitten der RNA-Elektrophoresekammer. Nach Aushärtung des Gels wurde dieses in die mit 1x RNA-Laufpuffer befüllte Elektrophoresekammer gestellt. Der Stand des Laufpuffers sollte dabei so hoch sein, daß die Taschen noch nicht mit Puffer bedeckt sind. Anschließend wurden 1 Volumenteil des verwendeten RNA-Markers bzw. der RNA-Proben mit 3 Volumenteil des RNA-Laufpuffers gemischt. Nach

kurzem Anzentrifugieren in der Tischzentrifuge erfolgte dann für 15 min. die Denaturierung bei 65.0°C im Hybridisierungssofen. Anschliessend wurde die so vorbereiteten Proben in die jeweiligen Taschen des Gels pipettiert.und wie für DANN beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.9 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Die Messung der Absorption bei 260 bzw. 280 nm ist eine schnelle und einfach durchzuführende Methode zur Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen. Hierbei macht man sich die Tatsache zunutze, daß in den Biomolekülen bestimmte Chromophore Licht bei bestimmten Wellenlängen absorbieren. So absorbieren die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren Histidin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin Licht der Wellenlänge 280 nm, wohingegen die heterozyklischen Purin- und Pyrimidinsysteme der Nukleinsäuren Licht bei 260 nm absorbieren.

Die Konzentration einer bestimmten Probe errechnet sich nach einer Modifikation des LAMBERT-BEERSchen Gesetzes aus dem Absorptionswert bei 260 bzw. 280 nm, der Schichtdicke der verwendeten Quarzküvette, dem Verdünnungsfaktor und einem für die Art der Probe spezifischen Faktor (50 für doppelsträngige DNA, 40 für RNA, 37 für einzelsträngige DNA und 20 für einzelsträngige Oligonukleotide).

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung ergibt sich aus dem Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$. Eine reine d.h. proteinfreie Lösung weist demnach einen Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ von 1.8 bis 2.0 auf. Wichtig ist hierbei zu berücksichtigen, dass die vom Gerät errechneten Werte stark vom pH und Salzgehalt des bei den Messungen verwendeten Wassers abhängen können. Es wurde diesbezüglich darauf geachtet, daß die zu vermessenden Nukleinsäurelösungen stets mit demselben RNase-freien Wasser eluiert bzw. verdünnt wurden.

Wichtig ist bei dieser Methode weiterhin zu berücksichtigen, daß eine zuverlässige Messung des Photometers nur im linearen Bereich des LAMBERT-BEERschen Gesetzes (0-1 OD) gewährleistet ist. Die zu bestimmenden Proben wurden also vor der Messung derart verdünnt, daß die gemessenen Absorptionswerte in diesem Intervall lagen.

Sämtliche Messungen wurden mit dem speziell für diese Anwendung ausgestatteten Spektrophotometer GeneQuant II (Pharmacia) durchgeführt. Diese gibt nach der Messung direkt die Werte $A_{260\text{nm}}$ und $A_{280\text{nm}}$ sowie die hieraus ermittelte Nukleinsäurekonzentration und den Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ an.

3.3 Methoden zur RNA-Transfektion von dendritischen Zellen

3.3.1 Lipofektion mit Unifectin M

Bei Unifectin und Unifectin M handelt es sich um zwei von A. Surovoy in der Arbeitsgruppe von G.Jung am Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen entwickelte kationische Lipide (Surovoy *et al.*, 1998; Flechsler *et al.*, 1998). Die Unifectine bestehen aus Diethanolamin, das über das sekundäre Stickstoffatom an die Carboxylgruppe von Lysin gekuppelt und an den beiden Hydroxylgruppen mit ungesättigten C₁₈ – bzw. C₁₄-Fettsäuren verestert ist. Unifectin bzw. Unifectin-M kann in Kombination mit einem peptidischen „Enhancer“ (Protamin) angewendet werden, der in der Lage ist, DNA bzw. RNA zu kondensieren, wodurch die Liposomengenerierung erleichtert wird. Dies zeigt sich in deutlich verbesserten Transfektionseffizienzen. Unifectin mit dem Zusatz des kationischen Polyamins Protamin wird als Maxifectin bezeichnet.

12 h vor der geplanten Lipofektion am Tag 6 wurden die unreifen dendritischen Zellen in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/1mL RP10-Medium/Well in 6-Well-Platten ausplattiert. Die für die Transfektion verwendete RNA-Lösung wurde mit RNase-freiem Wasser auf eine Konzentration von 5 mg/mL eingestellt. Zur Vorbereitung des Transfektionscocktails wurde zu-

nächst in einem sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäß ein entsprechendes Volumen an Transfektionspuffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.4) vorgelegt, so daß nach Zugabe von RNA und Protamin ein Endvolumen von 100 µL entstand. In einem zweiten Eppendorfreaktionsgefäß wurde die zu lipofizierende RNA vorgelegt. Anschließend erfolgte die Zugabe von Protamin in einem Massenverhältnis RNA:Protamin von 1:1. Nach gründlichem Durchmischen auf dem Minishaker erfolgte eine Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur. Unifectin M wurde in dem von uns angewendeten Protokol zur RNA-Transfektion von dendritischen Zellen in einem Masseneverhältnis von RNA:Unifectin M von 1:3 eingesetzt. Zur Vorbereitung des Lipofektionsagenzes wurde nun ein entsprechendes Volumen an Transfektionspuffer in ein separates Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt, so daß nach Zugabe des Unifectin M ein Endvolumen von 100 µL erzielt wurde. Danach erfolgte die Zugabe der erforderlichen Menge an Unifectin M direkt in den vorgelegten Transfektionspuffer ohne dabei die Wand des Reaktionsgefäßes mit der Pipettenspitze zu berühren. Nach Aufklopfen des Reaktionsgefäßes auf dem Labortisch zur Mischung der Lösung und anschließender Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur erfolgte dann die tropfenweise Zugabe der Unifectin M-Lösung zur RNA-Enhancer-Lösung. Nach erneutem Durchmischen durch Aufklopfen des Reaktionsgefäßes auf dem Labortisch und einer abermaligen Inkubationsperiode von 10 min. bei Raumtemperatur wurde die fertige Transfektionslösung dann tropfenweise zu den zu lipofizierenden dendritischen Zellen hinzugegeben. Nach guter Durchmischung durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren der Zellsuspension erfolgte anschließend die weitere Inkubation bei 37.0°C und 5.0% CO₂ im Brutschrank.

3.3.2 Elektroporation

Vor der Elektroporation am Tag 6 wurden die unreifen dendritischen Zellen zunächst zweimal mit serumfreiem X-VIVO 20-Medium gewaschen und schließlich in einer Dichte von 2×10^7 Zellen/mL resuspendiert. Anschließend wurden 200 µL der vorbereiteten Zellsuspension in eine 4 mm-Küvette gegeben und 10 µg der zu transfizierenden Gesamttumor-RNA zupipettiert. Für die

unmittelbar danach durchgeführte Elektroporation wurde das Gerät Easyject Plus (Peqlab, Erlangen) mit der nachfolgend genannten Einstellung verwendet: $U = 300 \text{ V}$, $C = 150 \text{ }\mu\text{F}$, $R = 1540 \text{ }\Omega$ u, $t = 231 \text{ ms}$. Nach der Elektroporation wurden die dendritischen Zellen unverzüglich wieder in RP10-Medium transferiert und in den Inkubator verbracht. Die Viabilität der Zellen nach der Elektroporation betrug nach den Ergebnissen der durchgeführten Propidiumiodidfärbungen mehr als 80%.

3.3.3 Transferrinrezeptor (CD71)-vermittelte Endozytose

Die Transduktion von dendritischen Zellen über Transferrinrezeptor (CD71)-vermittelte Endozytose wurde mit Duofect™ (QUANTUM Appligene, Carlsbad, CA, USA) durchgeführt. Bei dieser Methode kondensiert die zu transfizierende RNA mit dem polykationischen Carrier Polyethylenimin (PEI) zu stabilen, kompakten RNA-PEI-Komplexen. Humanes Transferrin ist kovalent an das PEI-Molekül gebunden, so dass die gebildeten Partikel an die Oberfläche von Zellen binden, die den Transferrinrezeptor (CD71) exprimieren und schließlich endozytiert werden (Boussif *et al.*, 1995; Curiel *et al.*, 1991; Cotten *et al.*, 1990; Kircheis *et al.*, 1997; Wagner *et al.*, 1990; Wagner *et al.*, 1991; Zenke *et al.*, 1990).

24 h vor der geplanten Transfektion am Tag 6 wurden die unreifen dendritischen Zellen geerntet, gezählt und in 50 μM Desferrioxamin und ggf. 10 ng/mL TNF- α enthaltendem RP10-Medium resuspendiert. Unmittelbar vor der Transfektion am Tag 6 wurden die Zellen dann abermals gezählt und dann in einer Dichte von $5 \times 10^5 \text{ DC}/1.5 \text{ mL}$ RP-10 (incl. Desferrioxamin, IL-4, GM-CSF und TNF- α) auf 6-Well-Platten ausgesät. Zur Bildung der RNA-PEI-Komplexe wurde die zu transfizierende RNA zunächst mit RNase-freiem HBS-Puffer (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, pH 7.3) auf ein Endvolumen von 250 μL verdünnt. Anschließend wurden 246.0 μL HBS-Puffer in einem sterilen Eppendorfreaktionsgefäß vorgelegt und 4.0 μL DuoFect™ (1 mg/mL) entsprechend einem N:P-Verhältnis von 3.2 (molares Verhältnis

von Stickstoff aus PEI und Phosphatgruppen aus RNA) zugegeben ohne dabei den Rand des Gefäßes mit der Pipettenspitze zu berühren. Danach wurde dann die vorbereitete RNA-Lösung tropfenweise zur PEI-Lösung gegeben. Nach mehrmaliger Aspiration zur Durchmischung des Transfektionscocktails und einer folgenden Inkubationsperiode von 20 min bei Raumtemperatur wurde dieser dann tropfenweise zu den unreifen bzw. reifen dendritischen Zellen gegeben. Nach einer Inkubationsperiode von 4 h bei 37.0°C wurden die dendritischen Zellen zweimal zur Entfernung des Transfektionsmediums in RP10-Medium gewaschen und dann in RP10-Medium supplementiert mit den entsprechenden Zytokinen bei 37.0°C weiterkultiviert.

3.4 Durchflußzytometrie (FACS)

In der Durchflußzytometrie werden durch Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper gegen bestimmte Zelloberflächenantigene markierte Einzelzellen erkannt und quantifiziert. Außerdem erfolgt eine Darstellung gemäß der Granularität und Größe der Zellen. Die zu charakterisierenden Zellen wurden in einem 13 mL Zentrifugenröhrchen mit FACS-Puffer gewaschen, der Überstand nach der Zentrifugation verworfen und die Zellen im Restpuffer resuspendiert. Zur Verhinderung unspezifischer Bindungen wurden 10 µL Maus IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, USA) in einer Konzentration von 0.2 mg/mL zur Zellsuspension gegeben und für 15 min. bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS-Puffer verdünnt und auf verschiedene FACS-Röhrchen verteilt. Pro Messung werden etwa $1-2 \times 10^5$ Zellen benötigt. Nach Zentrifugation für 3 min. bei 1500 rpm wurde erneut der Überstand verworfen und die Zellen durch Vortexen im Restpuffer resuspendiert. Es wurde meist eine Zweifachfärbung durchgeführt, d.h. die Zellen wurden mit einem PE- und einem FITC-konjugierten Antikörper (jeweils 10 µL) inkubiert. Die Röhrchen wurden hierzu entweder für 30 min. im Dunklen auf Eis gestellt oder für 15 min. im Dunklen bei Raumtemperatur belassen. Nach einem Waschschrift mit 1 mL FACS-Puffer pro Röhrchen wurden die Zellen in 100 µL FACS-Puffer resuspendiert und anschließend im Durchflußzytometer (FACSCalibur,

Beckton Dickinson) gemessen. War eine sofortige Messung nicht möglich, so wurden die Zellen in 100 μL 2% Formalinlösung fixiert, nach 3 min. mit 100 μL FACS-Puffer verdünnt und bis zur Messung für bis zu 7 Tagen im Kühlschrank bei 4° C gelagert. Pro Messung wurden in der Regel 10000 Zellen ausgezählt. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der Software CellQuest (Becton Dickinson).

3.5 CTL-Induktion mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen

Unreife dendritische Zellen wurden am Tag 6 wie oben beschrieben mit Gesamttumor-RNA elektroporiert. Nach der Transfektion wurden die dendritischen Zellen für 24 h in RP10-Medium supplementiert mit 10 ng/mL TNF- α zur Ausreifung inkubiert. Für die Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten wurden 5×10^5 mit RNA-transfizierte dendritische Zellen mit 2.5×10^6 autologen PBMNC in 1mL RP10-Medium/Well inkubiert. Ein Teil der elektroporierten dendritischen Zellen wurde für spätere Restimulationen oder für die Verwendung als Targetzellen bei -80.0° C aufbewahrt. Nach sieben Tagen erfolgte eine Restimulation mit 5×10^5 transfizierten autologen dendritischen Zellen. Anschließend wurde am Tag 1, 3 und 5 IL-2 in einer Konzentration von 1 ng/mL hinzugegeben. Die zytotoxische Aktivität der induzierten T-Lymphozyten wurde fünf Tage nach der Restimulation in einem Standard- ^{51}Cr -Release-Assay untersucht.

3.6 ^{51}Cr -Freisetzungstest

Der ^{51}Cr -Freisetzungstest ist eine Methode, mit der man das Ausmaß der Lyse von bestimmten Targetzellen durch Effektorzellen über die Freisetzung von radioaktivem Chrom bestimmen kann. Bei den durchgeführten Tests wurden in eine 96-Well-Rundbodenplatte in jede Vertiefung 1×10^4 Targetzellen als feste Größe gegeben und die Effektorzellen in unterschiedlichen Konzentrationen hinzutitriert. Ausgehend von einem Effektor- zu Targetzellen-Verhältnis von 100:1 oder 30:1 wurde die Effektorzellzahl absteigend in fünf Stufen jeweils gedrittelt. Konkret wurden pro Vertiefung 100 μL Effektorzellen vorgelegt und dann 100 μL

der mit radioaktivem Chrom beladenen Targetzellen hinzupipettiert. 5×10^5 Targetzellen wurden in einem 12 mL Röhrchen abzentrifugiert und nach der Abnahme des Überstandes im Restmedium resuspendiert. Für die Beladung mit Chrom wurden 10 μL Natrium- ^{51}Cr -chromat (370 MBq/670 μL) in die Zellsuspension pipettiert und diese dann bei 37°C und 5.0% CO_2 für 1 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 mL RP10-Medium gewaschen, in 5 mL frischem RP10-Medium resuspendiert und dann auf die vorbereitete, bereits die Effektorzellen enthaltende Platte verteilt. Danach wurde die Platte für 4 h bei 37.0°C und 5.0% CO_2 inkubiert. Nach den 4 h wurden aus jeder Vertiefung 50 μL des das freigesetzte ^{51}Cr enthaltenden Überstandes auf eine Luma-Platte übertragen und diese dann über Nacht getrocknet. Die Messung der Platte wurde in einem Beta-Lumineszenz-Zähler (MicroBeta 1450 TriLux) durchgeführt. Für die Berechnung der durch die Effektorzellen verursachten Lyse muß zusätzlich die spontane und die maximale ^{51}Cr -Freisetzung der Targetzellen bestimmt werden. Hierzu wurden die Targetzellen ohne Effektorzellen entweder mit 100 μL RP10-Medium (spontane Lyse) oder mit 100 μL Triton-X100 (maximale Lyse) kultiviert und dann jeweils die Mittelwerte aus Fünffachbestimmungen gebildet.

Die Berechnung der prozentualen spezifischen Lyse erfolgte nach der folgenden Formel:

$$\% \text{ Spezifische Lyse} = \frac{\text{Lyse der Probe} - \text{Spontane Lyse}}{\text{Maximale Lyse} - \text{Spontane Lyse}} \times 100$$

3.7 IFN- γ ELISPOT

Im ELISPOT wird die IFN- γ -Sekretion einer einzelnen Zelle sichtbar gemacht. Die Methode beruht auf dem Prinzip des einfachen Sandwich-ELISA mit dem Unterschied, daß anstatt einer flüssigen Probe lebende Zellen auf eine mit anti-IFN- γ -Antikörper („coating“-Antikörper)

beschichtete Oberfläche gegeben und so für kurze Zeit kultiviert werden. Wird von den eingesetzten Zellen nun IFN- γ sezerniert, so bindet dieses an die o.g. Antikörper und kann später durch Zugabe eines sekundären, biotinylierten anti-IFN- γ -Antikörpers sichtbar gemacht werden. Die anschließend zugegebene Streptavidin-Alkalische Phosphatase bindet an das Biotin und führt nach Zugabe des Substrates BCIP/NBT zu einer Farbreaktion. Eine IFN- γ -sezernierende Zelle wird somit als blauer Punkt („spot“) auf der Oberfläche sichtbar.

Zur Vorbereitung des Assays wurde zunächst eine 96-Well-ELISPOT-Platte über Nacht mit 50 μ L/well „coating“-Antikörper 1-D1K (Verdünnung mit PBS 1:1000) bei -4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte sechs mal mit jeweils 200 μ L PBS/Well gewaschen. Zur Ab-sättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde vor Zugabe der zu untersuchenden Zellen 100 μ L RP10-Kulturmedium in jedes Well gegeben und die Platte anschließend für 1 h bei 37°C inkubiert. Da die Effektorzellen auf dem Membranboden der ELISPOT-Platte eine Einzelschicht bilden sollen, wurden maximal 2×10^5 Zellen in 200 μ L RP10 pro Well eingesetzt. Anschließend wurde die Platte für 40h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte durch sechsmaliges Eintauchen in ein Gefäß mit 4L Waschpuffer und anschließendes Abdekantieren der Flüssigkeit gewaschen. Nachfolgend wurde in jedes Well 100 μ L des biotinylierten, sekundären Antikörpers 7-B6-1 (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pipettiert und anschließend erneut für 2 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach abermaligem sechsmaligem Waschen wurde dann pro Well 100 μ L Streptavidin-Alkalische Phosphatase zugegeben (Endkonzentration 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten drei mal mit Waschpuffer und anschließend noch drei mal mit PBS gewaschen. Dann wurde zur Entwicklung der Platte 100 μ L PCIP/NBT pro Well als Substrat zugegeben. Nach 15 min. wurde die Platte unter fließendem

Wasser abgewaschen und bis zur Auswertung im ELISPOT-Counter im Kühlschrank aufbewahrt.

3.8 T-Helferzell-Induktion mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen

Zur Induktion von T-Helferzellen wurden zunächst die CD4⁺ T-Lymphozyten (aus PBMNC von Patienten) immunomagnetisch unter Zuhilfenahme des CD4⁺ T Cell Isolation Kits (Miltenyi Biotec) isoliert. Die Reinheit der isolierten Zellpopulation wurde anschließend durchflusszytometrisch bestimmt. Autologe, unreife dendritische Zellen wurden an Tag 6 mit RNA elektroporiert und anschließend für weitere 24 h mit TNF- α inkubiert. Zur Induktion von antigenspezifischen T-Helferzellen wurden an Tag 7 2.5×10^6 CD4⁺ T-Zellen mit 5×10^5 autologen, RNA-transfizierten DC koinkubiert. Zwei Restimulationen mit ebenfalls 5×10^5 DC erfolgten an Tag 7 und Tag 14 nach der Induktion. IL-2 wurde ab der ersten Restimulation jeden zweiten Tag in einer Konzentration von 2 ng/mL supplementiert. Die Analyse der induzierten Immunantwort erfolgte an Tag 20 nach der Induktion durch einen ³[H]-Proliferations-test.

3.9 ³[H]-Thymidin-Proliferationstest

2×10^5 Responderzellen (CD4⁺ T-Zellen)/Well wurden mit jeweils 1×10^5 Stimulationszellen (DC) in einer 96-Well-Platte koinkubiert. Die Stimulation der CD4⁺ T-Zellen mit PMA/Ionomycin diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden zum einen unstimulierte CD4⁺ T-Zellen und zum anderen durch mit irrelevanter EGFP RNA transfizierter DC stimulierter CD4⁺ T-Zellen eingesetzt. Die Thymidin-Inkorporation wurde am Tag 5 nach einer 16-stündigen Inkubation mit ³[H]-Thymidin (1 μ Ci/Well) im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Expression von EGFP in dendritischen Zellen nach Transfektion mit EGFP-*in vitro*-Transkript (EGFP-IVT) unter Anwendung verschiedener RNA-Transfektionsmethoden

In der zunächst dargestellten Reihe von Experimenten evaluierten wir verschiedene Methoden zur RNA-Transfektion von dendritischen Zellen hinsichtlich ihrer Effizienz. Diesbezüglich wurden die Methoden Elektroporation, Lipofektion und CD71-(Transferrinrezeptor)-vermittelte Endozytose einer genaueren Untersuchung unterzogen. Wie in Abb. 4.1 dargestellt zeigen zuvor mit dem Eisenkomplexbildner Desferrioxamin inkubierte, unreife dendritische Zellen eine deutliche Expression von CD71 von ca. 20%, welche sich durch Ausreifung der dendritischen Zellen mit TNF- α auf ca. 45% steigern lässt.

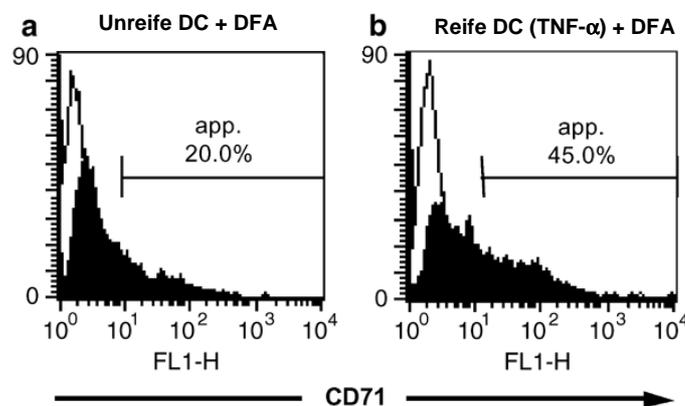


Abb. 4.1: CD71-Expression auf unreifen und reifen dendritischen Zellen. Unreife (Tag6) und reife (Tag 7, nach 24 h Inkubation mit TNF- α) dendritische Zellen wurden nach vorheriger Supplementierung des Mediums mit 50 μ M Desferrioxamin für 24 h geerntet, mit einem FITC-markierten CD71-Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (geschlossene Histogramme). Entsprechende Maus-IgG Isotyp-Antikörper wurden als Kontrollen eingesetzt (offene Histogramme).

Elektroporation und Lipofektion wurden mit am Tag 6 geernteten unreifen dendritischen Zellen durchgeführt, während die Methode „CD71-vermittelte“ Endozytose sowohl mit unreifen als auch mit reifen dendritischen Zellen untersucht wurde. Zunächst wurden ansteigende

Mengen an EGFP-*In vitro*-Transkript (EGFP-IVT: 2.5-20 $\mu\text{g}/10^6$ DC) für die Transfektionsexperimente eingesetzt, um einen möglichen Einfluß der verwendeten RNA-Menge auf die beobachtete Transfektionseffizienz zu untersuchen. Wie in Abb. 4.2 dargestellt, erwies sich die Elektroporation als die bei weitem effektivste Methode zur RNA-Transduktion von dendritischen Zellen mit einer erzielten Transfektionseffizienz von ca. 29% (s. Abb. 4.2a). Dieses Ergebnis konnte bereits mit der geringsten eingesetzten RNA-Menge von 2.5 $\mu\text{g}/10^6$ DC erzielt werden und war durch die Verwendung von größeren RNA-Mengen nicht signifikant zu steigern.

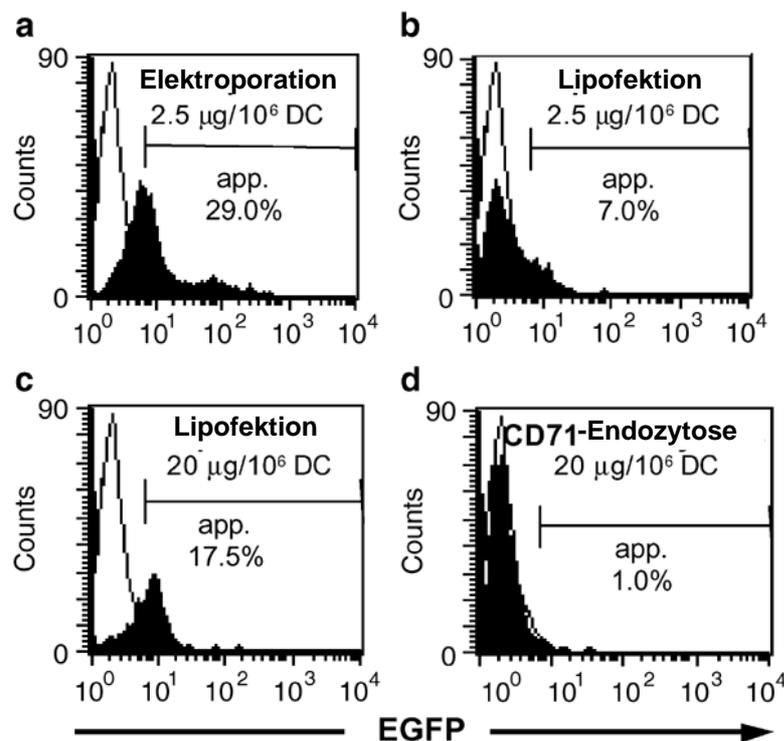


Abb. 4.2: EGFP-Expression nach der Transfektion von unreifen (a-c) bzw. reifen dendritischen Zellen (d) mit EGFP-IVT durch verschiedenen Transfektionsmethoden. Dendritische Zellen wurden an Tag 6 mit den angegebenen EGFP-Mengen und unter Applikation der angegebenen Methode transfiziert. Die Expression von EGFP wurde 40h post transfectionem durchflußzytometrisch gemessen (geschlossene Histogramme). Ohne Zugabe von RNA, aber ansonsten identische behandelte dendritische Zellen dienten als korrespondierende Negativkontrollen (offene Histogramme).

Die Lipofektion mit dem kationischen Lipid Unifectin M erwies sich ebenfalls als praktikable Methode zur RNA-Transfektion von dendritischen Zellen, welche sich allerdings sowohl in Bezug auf die Transfektionseffizienz als auch hinsichtlich des experimentellen Aufwands als der Elektroporation deutlich unterlegen erwies. Bei Einsatz von $2.5 \mu\text{g}$ EGFP-IVT/ 10^6 DC ließ sich eine Expression von EGFP in etwa 7% der Zellen nachweisen (s. Abb. 4.2b). Der Anteil der EGFP-positiven Zellen war durch die Verwendung von größeren RNA-Mengen bis auf ca. 17.5% steigerbar, was suggeriert, daß hier eine positive Korrelation zwischen der eingesetzten RNA-Menge und der Transfektionseffizienz existieren könnte (s. Abb. 4.2c). Die CD71-vermittelte Endozytose erwies sich sowohl hinsichtlich der sehr niedrigen Transfektionseffizienzen als auch aufgrund des hohen experimentellen Aufwandes als den übrigen Methoden deutlich unterlegen. Bei der Verwendung von unreifen dendritischen Zellen konnte auch unter Verwendung der höchsten RNA-Menge von $20 \mu\text{g}$ EGFP-IVT/ 10^6 DC keine signifikante EGFP-Expression nach 40 h detektiert werden. Unter Verwendung von für 24 h mit TNF- α inkubierten dendritischen Zellen mit reifem Phänotyp, welche wie in Abb. 4.1 dargestellt eine erhöhte CD71-Expression aufweisen, konnte bei Verwendung der höchsten RNA-Menge von $20 \mu\text{g}$ EGFP-IVT/ 10^6 DC eine kleine positive Population von ca. 1% detektiert werden. Dies gelang hingegen nicht beim Einsatz von kleineren RNA-Mengen.

4.2 CTL-Induktion durch mittels verschiedener Methoden RNA-transfizierte dendritischen Zellen

In den nun folgenden Experimenten verglichen wir die mit unterschiedlichen Methoden RNA-transfizierten dendritischen Zellen in Bezug auf ihre Potenz zur Induktion von antigenspezifischen zytotoxischen T-Zellen (CTL). Hierbei wurden für die Induktion von dendritischen Zellen periphere Blutmonozyten von gesunden HLA-A2+ Blutspendern (Abteilung für Transfusionsmedizin, Universitätsklinikum Tübingen) eingesetzt. Die für die Transfektion verwendete

mRNA wurde aus der HLA-A2+ Nierenzellcarcinomzelllinie A498 über die im Methodenteil ausführlich beschriebenen Verfahren isoliert.

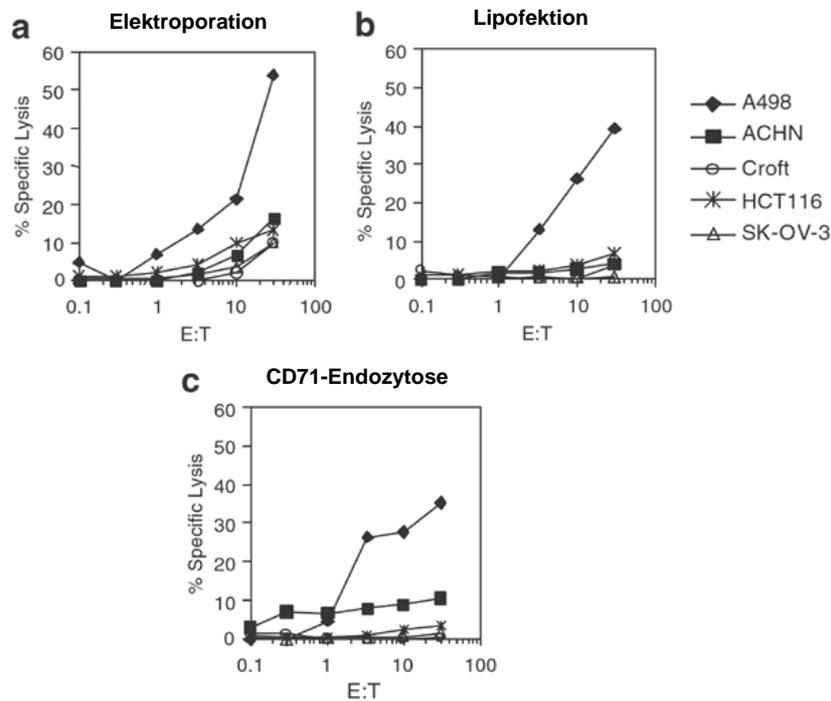


Abb. 4.3: CTL-Induktion mit durch verschiedene Methoden RNA-transfizierten dendritischen Zellen. Dendritische Zellen wurden mit $2.5 \mu\text{g}$ A498 mRNA/ 10^6 DC durch Elektroporation (a), Lipofektion (b) oder CD71-vermittelte Endozytose (c) transfiziert. Unreife DC wurden in (a) und (b) eingesetzt, während in (c) reife DC verwendet wurden. Nach Elektroporation bzw. Lipofektion wurden die DC für 24 h mit 10 ng/mL TNF- α zur Erlangung des reifen Phänotyps inkubiert und anschließend als antigenpräsentierende Zellen für die CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation mit auf die gleiche Weise transfizierten DC wurde nach 7 Tagen durchgeführt. Die zytotoxische Aktivität der induzierten CTL wurde am Tag 5 nach der Restimulation in einem Standard- ^{51}Cr -Freisetzungstest bestimmt. Die Zelllinien ACHN, Croft, HCT116 und SK-OV-3 dienten hierbei als Kontrollen.

Unreife dendritische Zellen wurden in den gezeigten Experimenten am Tag 6 nach der Induktion entweder durch Elektroporation (s. Abb.4.3a) oder Lipofektion (s. Abb. 4.3b) mit $2.5 \mu\text{g}$ A498 mRNA/ 10^6 DC transfiziert. Im Anschluss wurden die transfizierten dendritischen Zellen für 24 h mit TNF- α inkubiert und danach für die CTL-Induktion eingesetzt. Für die Transfektion über CD71-vermittelte Endozytose wurden dendritische Zellen mit reifem Phänotyp nach vorheriger Inkubation in Desferrioxamin-haltigem Medium verwendet (s. Abb. 4.3c). Anschließend wurden die auf diese Weise transduzierten dendritischen Zellen eben-

falls als antigenpräsentierende Zellen eingesetzt. In allen drei Ansätzen wurde an Tag 7 nach der CTL-Induktion eine Restimulation mit den korrespondierenden Methoden RNA-transfizierten dendritischen Zellen durchgeführt. Die Bestimmung der antigenspezifischen Zytotoxizität der induzierten CTL erfolgte am Tag 5 nach der Restimulation durch einen Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest. Wie in Abb. 4.3 dargestellt, wiesen die RNA-transfizierten dendritischen Zellen unabhängig von der verwendeten Transfektionsmethode die Fähigkeit auf, als antigenpräsentierende Zellen eine spezifische CTL-Antwort gegen die Zelllinie A498 zu induzieren. Die zytotoxische Aktivität der CTL war spezifisch gegen die Zelllinie A498, aus welcher die mRNA für die Transfektionen isoliert worden war, gerichtet, während verschiedene Kontroll-Zelllinien mit anderem HLA-Haplotyp oder aus anderen Tumoren stammend nicht lysiert wurden. Diese Ergebnisse demonstrieren, daß offensichtlich keine eindeutige Korrelation zwischen der Expressionsstärke des verwendeten Reportergens EGFP und der biologischen Funktion der transfizierten dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen besteht und daß auch sehr geringe Transfektionsraten für die Induktion einer tumorspezifischen CTL-Antwort ausreichend sein können.

4.3 CTL-Induktion durch mit Total Tumor RNA oder mit Tumor mRNA transfizierte dendritische Zellen

Der Anteil an mRNA an der in einer eukaryontischen Zelle vorhandenen RNA (TotalRNA) beträgt nur 1-5%. Darüberhinaus ist die Isolation von mRNA aus TotalRNA ein aufwendiges Verfahren, daß mit zusätzlichen Manipulationen an dem sehr fragilen Molekül RNA verbunden ist und möglicherweise zu signifikanten Verlusten an biologischer Aktivität führen kann. Das Ziel der nun folgenden Experimente bestand in der Beantwortung der Frage, ob für die RNA-Transfektion zur CTL-Induktion anstatt reiner mRNA ohne Verlust an biologischer Aktivität auch TotalRNA eingesetzt werden kann. Zu diesem Zweck transfizierten wir unreife dendritische Zellen von gesunden HLA-A2+ Spendern am Tag 6 nach der Induktion entwe-

der mit 2.5 µg A498 TotalRNA/10⁶ DC oder 2.5 µg A498 mRNA/10⁶ DC durch Elektroporation (Abb. 4.4a). Nach 24h Inkubation mit TNF-α wurden die transfizierten DC für die Induktion von tumorspezifischen CTL eingesetzt. Eine Restimulation mit identisch vorbehandelten DC erfolgte 7 Tage nach der CTL-Induktion. Die zytotoxische Aktivität der induzierten CTL wurde am Tag 5 nach der Restimulation in einem Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest bestimmt. Um die Anwendbarkeit dieser Methode zu testen, führten wir korrespondierende Experimente auch mit aus der HLA-A2+ RCC-Zelllinie MZ1257 isolierter TotalRNA bzw. mRNA durch (Abb. 4.4b).

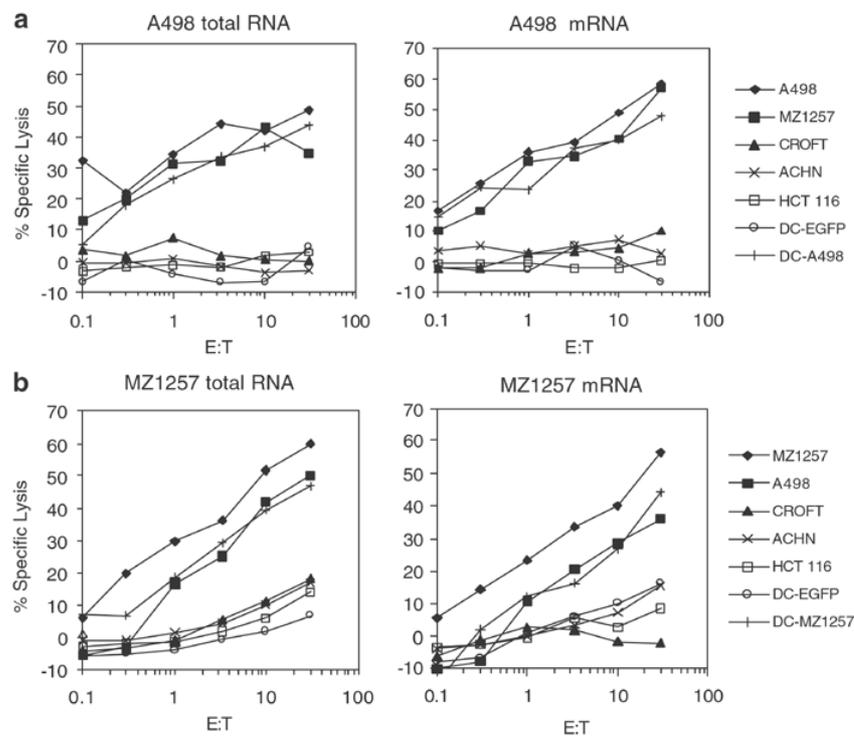


Abb.4.4: CTL-Induktion durch mit TotalRNA oder mRNA, isoliert aus den RCC-Zelllinien A498 (a) und MZ1257 (b), transfizierte DC. Unreife dendritische Zellen (Tag 6) wurden entweder mit 2.5 µg TotalRNA/10⁶ DC oder mit 2.5 µg mRNA/10⁶ DC elektroporiert und nach Inkubation für 24 h mit 10 ng/mL TNF-α für die CTL-Induktion eingesetzt. Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität erfolgte an Tag 5 nach der Restimulation durch einen Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest. Eingesetzte Targetzellen: ACHN, Croft, HCT116, autologe DC elektroporiert mit A498totalRNA, mit MZ1257 totalRNA oder mit irrelevanter EGFP mRNA (EGFP-IVT).

Wie in Abb. 4.4 dargestellt, waren sowohl die mit mRNA als auch die mit TotalRNA transfizierten DC in der Lage, eine tumorspezifische CTL-Antwort *in vitro* zu induzieren. Die Ver-

wendung von mRNA oder TotalRNA hatte keinen Einfluß auf die beobachtete zytolytische Aktivität der induzierten CTL. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß offensichtlich eine sehr geringe Menge an transkriptabler mRNA ausreicht, um eine tumorspezifische CTL-Antwort zu induzieren. Wie in Abb. 4.4 demonstriert, zeigten die induzierten CTL eine signifikante zytotoxische Aktivität sowohl gegen die Zelllinie, aus denen die für die Elektroporation verwendete RNA isoliert worden war, als auch gegen autologe mit der entsprechenden RNA transfizierte DC. Darüberhinaus war eine deutliche Kreuzreaktivität zwischen den mit A498 RNA und den mit MZ1257 RNA induzierten CTL erkennbar, was als Hinweis darauf verstanden werden kann, daß beiden Zelllinien gemeinsame Antigene auf ihrer Oberfläche tragen. Die induzierten CTL zeigten keine zytolytische Aktivität gegen die eingesetzten Kontrollzelllinien Croft, ACHN sowie HCT116 und auch nicht gegen autologe, mit irrelevanter EGFP-mRNA (EGFP-IVT) elektroporierte DC. Insgesamt zeigen die vorliegenden Experimente, daß sowohl mit aus Tumorzellen isolierter TotalRNA als auch mit mRNA effektive, antigenspezifische Immunantworten induziert werden können.

4.4 Unspezifische Amplifikation von Gesamttumor mRNA

Da die klinische Anwendbarkeit der untersuchten Vakzinierungsmethode in vielen potentiellen Situationen durch die Verfügbarkeit der TumorRNA limitiert ist, etablierten wir eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von Gesamttumor-mRNA, um diese unbegrenzt für Transfektionen von DC zur Verfügung zu haben (s. 3.2.7). Die Analyse hinsichtlich der Integrität und Größenverteilung der verschiedenen RNA-Moleküle erfolgte durch denaturierende Agarosegelelektrophorese mit Formaldehyd. Zur Evaluation der biologischen Aktivität der nach o.g. Methode *in vitro* amplifizierten mRNA entwickelten wir ein Modellsystem. Zunächst wurde die RCC-Zelllinie N43 stabil mit dem für EGFP kodierenden DNA-Vektor pEGFP-N1 transfiziert, was zur Expression von EGFP durch die Tumorzellen erkennbar an ihrer grünen Fluoreszenz führte. Aus dieser stabil transfizierten Zelllinie, im folgenden als N43 EGFP bezeich-

net, wurde nun mittels der im Methodenteil ausführlich beschriebenen Verfahren über die Gesamttumor-RNA (TotalRNA) die Gesamttumor-mRNA isoliert (native N43-EGFP mRNA). Die auf diese Weise isolierte mRNA wurde dann zur Herstellung von *in vitro* amplifizierter N43 EGFP mRNA nach dem oben beschriebenen Verfahren eingesetzt. Die *in vitro*-Amplifikationen von mRNA wurden von Herrn Dr. rer. nat. Frank Grünebach durchgeführt. In Abb. 4.5 ist das entsprechende denaturierende Agarosegel mit den verschiedenen RNA-Spezies N43 EGFP Total RNA, native N43 EGFP mRNA und amplifizierte N43 EGFP mRNA dargestellt. Die N43 EGFP Total RNA ist hierbei unschwer an den 18s- und 28S-Banden der ribosomalen RNA (rRNA) zu erkennen. Auch die native N43-EGFP mRNA weist wie im Gel zu erkennen noch deutliche Spuren an rRNA auf. Da das o.g. Verfahren ausschließlich zur Amplifikation der polyadenylierten mRNA führt, sind in der entsprechenden Spur der *in vitro* amplifizierten mRNA keine rRNA-typischen Banden bei 18S und 28S zu erkennen. Die amplifizierte N43 EGFP mRNA zeigt die für mRNA typische heterogene Größenverteilung („RNA-Schmier“). In der Spur der amplifizierten mRNA zeigt sich möglicherweise als Konsequenz aus verfrühten Syntheseabbrüchen während der Amplifikation eine Population an kürzeren RNA-Molekülen, welche in der nativen mRNA-Spur nicht detektierbar ist.

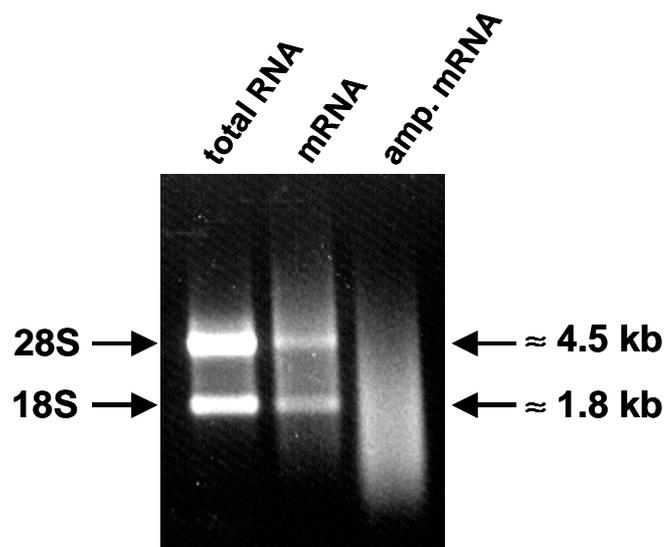


Abb. 4.5: Agarosegel der verschiedenen RNA-Spezies (Amp. mRNA von Dr. rer. nat. F. Grünebach)

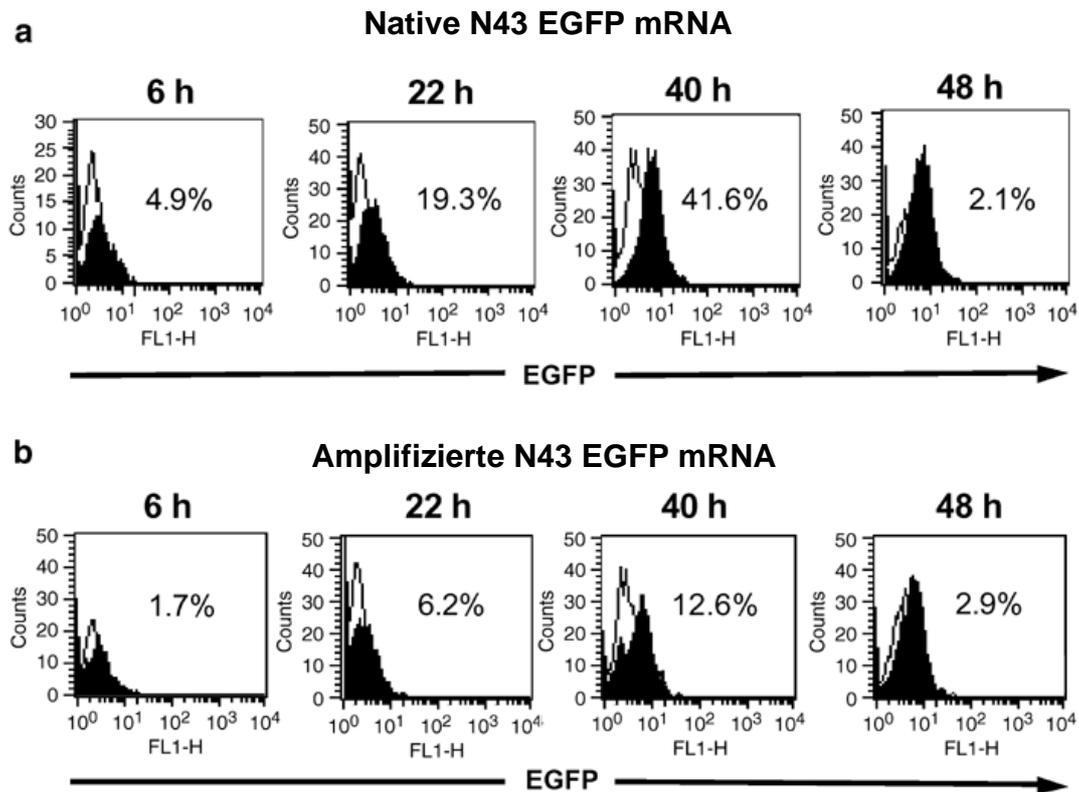


Abb. 4.6: Expression von EGFP in unreifen dendritischen Zellen nach Elektroporation mit nativer (a) oder amplifizierter N43 EGFP mRNA. Unreife dendritische Zellen wurden an Tag 6 nach der Induktion entweder mit 5 μg nativer N43 EGFP mRNA/ 10^6 DC oder mit 5 μg amplifizierter N43 EGFP mRNA/ 10^6 DC elektroporiert. Dargestellt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Bestimmung der EGFP-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten (6h, 22 h, 40 h und 48 h). Ohne RNA elektroporierte dendritische Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt.

Da die Geamtumor-mRNA die komplette transkriptionelle Information einer Tumorzelle beinhaltet, müsste diese nach Transfektion in eine andere Zellart auch dort zur Expression kommen. Zur Überprüfung dieser Hypothese und zum Vergleich von nativer und amplifizierter N43 EGFP mRNA hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität elektroporierten wir unreife dendritische Zellen am Tag 6 nach der Induktion entweder mit 5 μg nativer oder mit 5 μg amplifizierter N43 EGFP mRNA/ 10^6 DC. Die dendritischen Zellen wurden anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 22h, 40 h, 48 h, 72 h und 96 h) durchflußzytometrisch auf die Expression von EGFP untersucht.

Wie in Abb. 4.7 dargestellt kommt es bereits wenige Stunden nach der Transfektion von unreifen dendritischen Zellen mit nativer bzw. amplifizierter N43-EGFP mRNA zu einer detektierten Expression von EGFP. Die Expression erreichte sowohl für die native als auch für die *in vitro* amplifizierte mRNA nach etwa 40 Stunden ihr Maximum (s. auch Abb. 4.7). 48 Stunden nach der Elektroporation war die Expression von EGFP in den gezeigten Experimenten bereits wieder auf sehr niedrige Werte abgefallen, was wohl auf den natürlichen Abbau der mRNA in den dendritischen Zellen durch verschiedenste Mechanismen zurückzuführen ist. Nach 72 bzw. 96 Stunden war durchflußzytometrisch keinerlei EGFP-Expression mehr nachweisbar. Insgesamt zeigten die mit *in vitro* amplifizierter mRNA transfizierten dendritischen Zellen eine signifikant niedrigere Expression an EGFP als die mit nativer mRNA transfizierten dendritischen Zellen. Trotzdem konnte durch die durchgeführten Experimente gezeigt werden, daß *in vitro* amplifizierte Gesamttumor-mRNA grundsätzlich biologisch aktiv ist und zumindest zum Teil zur Expression gelangt.

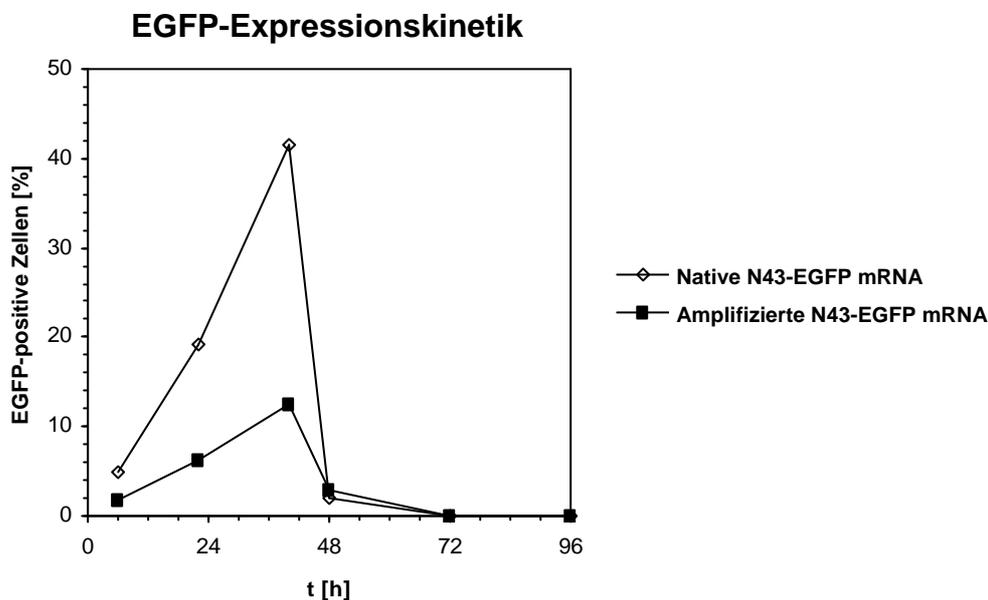


Abb. 4.7: Expressionskinetik von EGFP in unreifen dendritischen Zellen nach Elektroporation mit nativer oder amplifizierter N43-EGFP-mRNA.

4.5 CTL-Induktion durch mit nativer Tumor mRNA oder amplifizierter Tumor mRNA transfizierte dendritische Zellen

Das Ziel der im folgenden dargestellten Experimente bestand in der weiteren Evaluation der biologischen Aktivität von *in vitro* amplifizierter Gesamttumor-RNA. Um zu zeigen, daß mit amplifizierter Gesamttumor-mRNA transduzierte dendritische Zellen in der Lage sind, tumorspezifische CTL-Antworten zu induzieren, elektroporierten wir unreife dendritische Zellen am Tag 6 nach der Induktion entweder mit 2.5 µg nativer A498 mRNA/10⁶ DC oder mit 2.5 µg amplifizierter A498 mRNA/10⁶ DC. Nach weiteren 24 h Inkubation mit TNF-α wurden die dann reifen dendritischen Zellen zur Induktion von A498-spezifischen CTL eingesetzt. Eine Restimulation mit auf die gleiche Weise behandelten dendritischen Zellen wurde an Tag 7 durchgeführt. Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der induzierten CTL erfolgte am Tag 5 nach der Restimulation durch einen Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest.

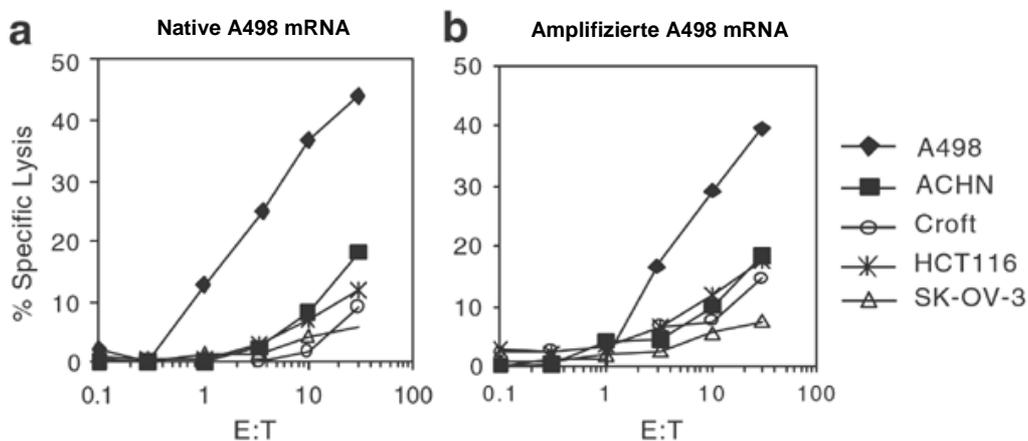


Abb. 4.8: CTL-Induktion durch mit nativer (a) oder amplifizierter (b) A498 Gesamttumor-mRNA transfizierte dendritische Zellen. Unreife dendritische Zellen (Tag 6) wurden entweder mit 2.5 µg nativer A498 mRNA/10⁶ DC oder mit 2.5 µg amplifizierter A498 mRNA/10⁶ DC elektroporiert und nach Inkubation für 24 h mit 10 ng/mL TNF-α für die CTL-Induktion eingesetzt. Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität erfolgte an Tag 5 nach einer mit identisch vorbehandelten dendritischen Zellen durchgeführten Restimulation durch einen Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest. Eingesetzte Targetzellen: A498, ACHN, Croft, HCT116, SK-OV-3.

Wie in Abb. 4.8 gezeigt waren sowohl die mit nativer als auch die mit *in vitro* amplifizierter A498 Gesamttumor-mRNA transfizierten dendritischen Zellen in der Lage, eine effektive, tumorspezifische CTL-Antwort zu induzieren. Die zytolytische Aktivität der induzierten CTL war spezifisch gegen die Ausgangszelllinie A498 gerichtet, während verschiedene Kontrollzelllinien mit anderem HLA-Typ und/oder aus anderen Tumoren nicht erkannt wurden. Bezüglich der Stärke der induzierten zytotoxischen T-Zellantwort zeigt sich für die Verwendung der amplifizierten RNA kein Unterschied im Vergleich zur nativen RNA. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß zur Induktion einer spezifischen T-Zellantwort möglicherweise wenige zur Expression und Prozessierung gelangende RNA-Moleküle ausreichend sind. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Experimente, daß *in vitro* amplifizierte mRNA biologisch aktiv ist und grundsätzlich für Vakzinierungszwecke eingesetzt werden kann.

4.6 Induktion von tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Colonicarcinom-Zelllinien

Zur Klärung der Frage, ob sich das Verfahren der Induktion von tumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten durch RNA-transfizierte dendritische Zellen auch auf andere Tumorarten übertragen läßt, führten wir weitere Experimente mit aus der HLA-A2+ Colonicarcinom-Zelllinie SW480 isolierter totalRNA durch. Unreife dendritische Zellen wurden auch hier an Tag 6 nach der Induktion mit 2.5 µg SW480 totalRNA/10⁶ DC elektroporiert und nach anschließender Inkubation für 24 h mit TNF-α für die CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation mit auf die gleiche Weise manipulierten dendritischen Zellen wurde an Tag 7 nach der CTL-Induktion durchgeführt. Die Analyse der zytolytischen Aktivität der induzierten CTL erfolgte an Tag 5 nach der Restimulation durch einen Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest.

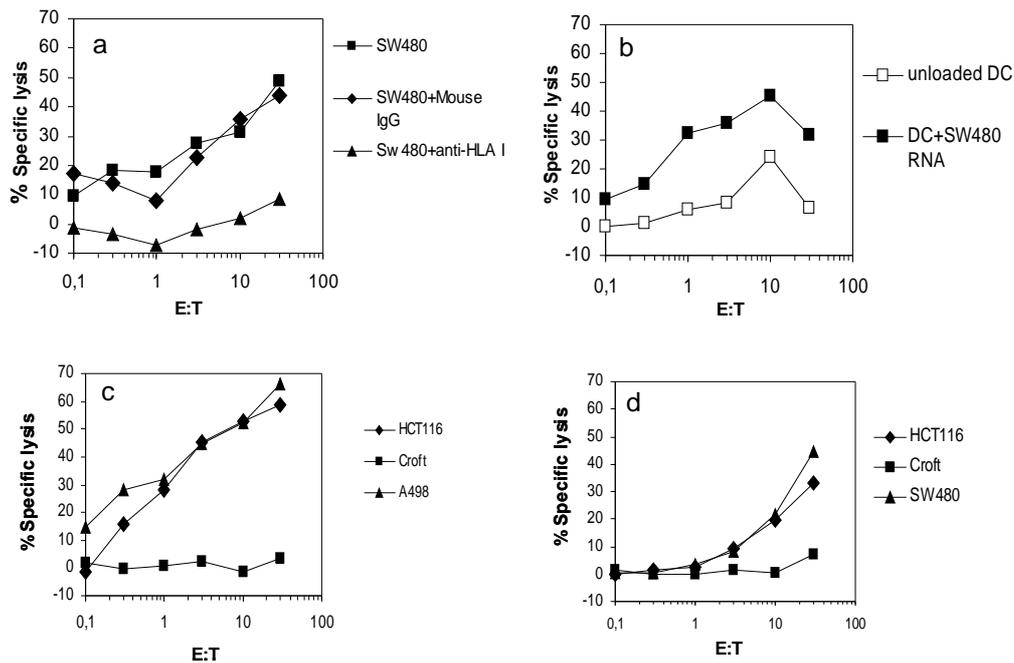


Abb. 4.9: Induktion von tumorspezifischen CTL gegen die Colocarcinom-Zelllinie SW480. Unreife dendritische Zellen von HLA-A2+ gesunden Spendern wurden an Tag 6 mit 2.5 µg SW480 totalRNA/106 DC elektroporiert und nach Ausreifung für 24 h mit TNF-α zur CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation mit identisch elektroporierten dendritischen Zellen erfolgte an Tag 7 nach der Induktion. Die Bestimmung der zytolytischen Aktivität der induzierten T-Zellen erfolgte an Tag 5 nach der Restimulation durch einen Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest. Eingesetzte Targetzellen: SW480, autologe DC, autologe DC (mit SW480 totalRNA elektroporiert), HCT116, Croft, A498.

Wie in Abb. 4.9 dargestellt zeigten die induzierten CTL eine signifikante zytolytische Aktivität gegen die Ausgangszelllinie SW480, aus welcher die für die Transfektion verwendete RNA isoliert worden war, und ebenfalls gegen mit SW480 TotalRNA elektroporierte autologe dendritische Zellen, während ohne RNA elektroporierte, autologe dendritische Zellen nicht lysiert wurden. Die zytolytische Aktivität der induzierten CTL konnte durch vorherige Zugabe eines anti-MHC Klasse I-Antikörpers zu den Targetzellen aber nicht durch Zugabe eines Kontrollantikörpers inhibiert werden, was die MHC Klasse I-Restriktion der induzierten T-Zellantwort verdeutlicht. Die induzierten CTL zeigten eine Kreuzreaktivität gegen die ebenfalls HLA-A2+ Zelllinien HCT116 (Colocarcinom) und A498 (Nierenzell-Carcinom), was darauf hindeutet, daß bei diesen Tumorzelllinien offensichtlich gemeinsame Antigene (sogenannte „Shared Antigens“) existieren. Sie zeigten jedoch keine detektierbare zytolytische

Aktivität gegen die ebenfalls als Kontrolle eingesetzten Croft-Zellen (EBV-immortalisierte B-Zelllinie, HLA-A2+). Insgesamt verdeutlichen die durchgeführten Experimente, daß das Konzept der CTL-Induktion mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen auch auf andere Tumorzellarten übertragen werden kann.

4.7 Induktion von CLL-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten im autologen System

Die in diesem Abschnitt dargestellten Experimente wurden gemeinsam mit Frau Cand. med. Garyfalia Tsakou durchgeführt. Da sämtliche bisher durchgeführten Experimente im Zellkultursystem durchgeführt wurden und daher bezüglich einer möglichen klinischen Anwendbarkeit nur von eingeschränkter Aussagekraft sind, bestand das Ziel in den nun folgenden Versuchen in der Übertragung des Konzeptes der CTL-Induktion mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen auf ein autologes System. Aus verschiedensten Gründen erwies sich die chronisch-lymphatische Leukämie (CLL) als geeignete Modellerkrankung für unsere Fragestellung. Zum einen können die für die RNA-Präparation benötigten Tumorzellen leicht aus dem peripheren Blut von betroffenen Patienten isoliert werden, zum andern handelt es sich bei der CLL auch weiterhin um eine von seltenen Ausnahmen abgesehen unheilbare Erkrankung, so dass ein hoher Bedarf an innovativen Therapieverfahren besteht. Bei der CLL handelt es sich im Gegensatz zu den akuten Leukämien um eine eher langsam fortschreitende maligne Erkrankung, so daß möglicherweise ausreichend Zeit zur Induktion von tumorspezifischen T-Zellantworten durch Vakzinierungsverfahren bleibt. Darüberhinaus konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, daß bei Patienten mit CLL trotz bestehender T-Zell-Defekte autologe, gegen die CLL-Zellen gerichtete T-Zellantworten induziert werden können. Außerdem gibt es seit kurzem Hinweise darauf, dass die CLL wohl ein gutes Target für einen nach allogener Stammzelltransplantation auftretenden „Graft-versus-Leukemia-Effekt“ darstellt.

Zur Klärung der Frage, ob sich unser Vakzinierungskonzept der CTL-Induktion mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen auch zur Induktion von CLL-spezifischen T-Zellantworten im autologen System anwenden lässt, isolierten über Ficoll-Zonengradientenzentrifugation und Plastikadhärenz die peripheren Blutmonozyten von CLL-Patienten und generierten aus diesen mit IL-4 und GM-CSF über 6 Tage dendritische Zellen vom unreifen Phänotyp (s. Abb.4.10).

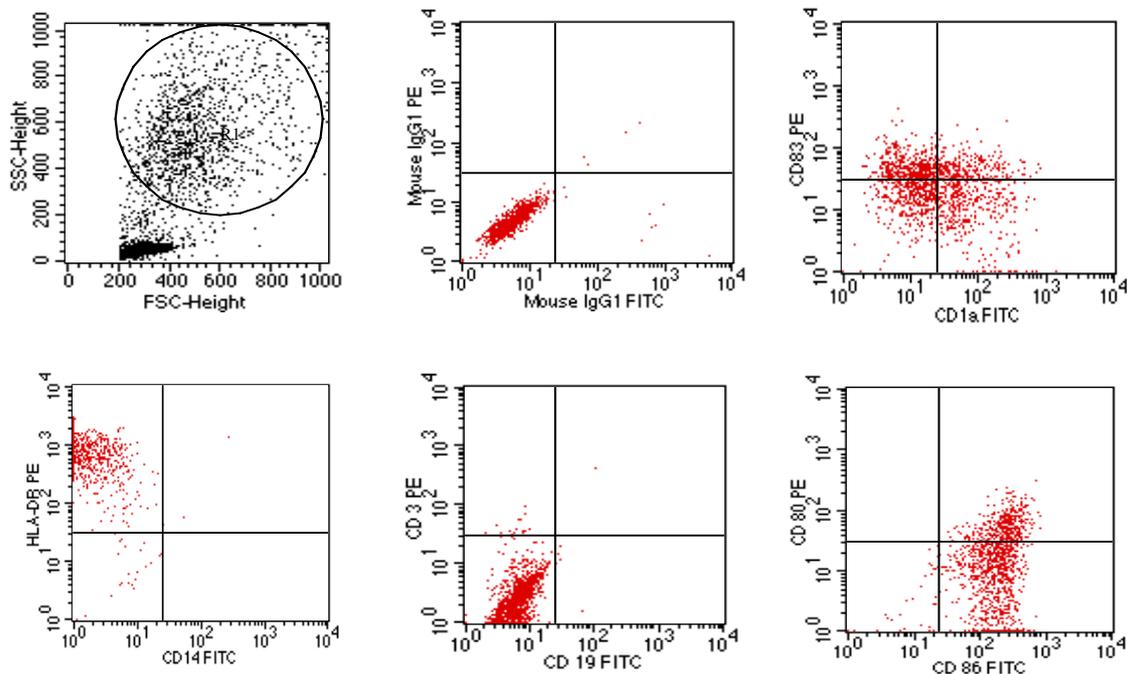


Abb. 4.10: Phänotyp der aus den peripheren Blutmonozyten von CLL-Patienten generierten dendritischen Zellen.

Zur Präparation von RNA aus CLL-Zellen isolierten wir zunächst immunomagnetisch unter Verwendung des B Cell Isolation Kits (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) die CD19⁺ B-Zellen aus dem peripheren Blut der Patienten. Diese Population wurde dann unter Zuhilfenahme des AntiFITC Multisort Kits (Miltenyi Biotec) nach vorheriger Färbung mit einem FITC-gekoppelten Anti-CD5 Antikörper in eine CD19⁺CD5⁺ Population (maligne CLL-Zellen) und eine CD19⁺CD5⁻ Population (aleukämische B-Zellen) immunomagnetisch getrennt. Die beiden Zellpopulationen wurden anschließend einer durchflusszytometrischen Analyse un-

terzogen. Abb. 4.11. zeigt das Ergebnis der durchgeführten FACS-Analyse. Die CD19+CD5+ wurden anschließend zur Isolation von CLL-Gesamttumor-RNA eingesetzt.

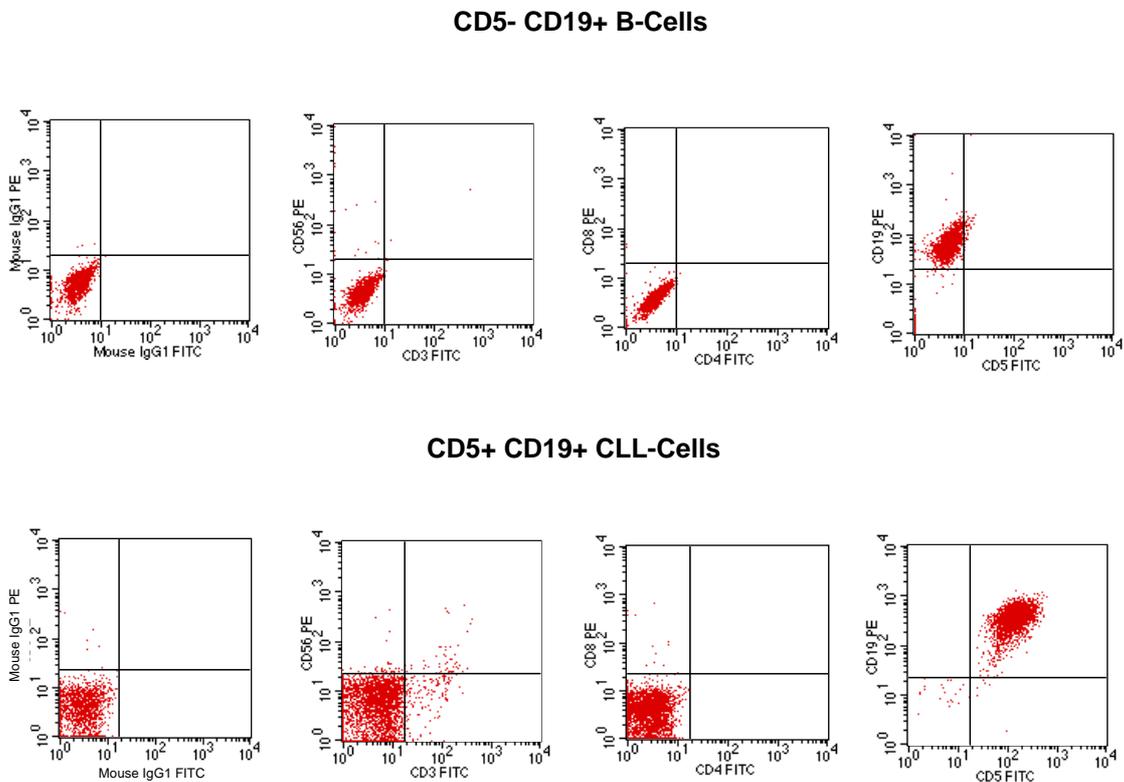


Abb. 4.11: FACS-Analyse der aufgetrennten CD5+ und CD5- B-Zellpopulationen eines CLL-Patienten.

Zur Induktion von CLL-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten wurden nun die aus peripherem Blutmonozyten von CLL-Patienten generierten DC am Tag 6 mit $2.5 \mu\text{g RNA}/10^6$ DC von der aus autologen CD19+CD5+ CLL-Zellen präparierten Total RNA elektroporiert. Nach Ausreifung für 24 h mit TNF- α wurden die auf diese Weise transfizierten dendritischen Zellen zur CTL-Induktion eingesetzt. Am Tag 7 nach der Induktion wurde eine Restimulation mit auf identische Weise mit CLL-RNA transfizierten dendritischen Zellen durchgeführt. Die Analyse der zytolytischen Aktivität der induzierten CTL erfolgte am Tag 5 nach der Restimulation über ein Standard- ^{51}Cr -Freisetzungstest. Abb. 4.12 zeigt die Ergebnisse der Induktion von CLL-spezifischen zytotoxischen T-Zellen bei zwei verschiedenen Patienten. Wie in Abb. 4.12 dar-

gestellt, zeigten die induzierten CTL bei beiden Patienten eine spezifisch gegen die CD5+ Leukämiezellen gerichtete Zytotoxizität. Die Lyse der CLL-Zellen war durch vorherige Blockierung mit dem Anti-HLA Klasse I-Antikörper W6/32 aber nicht durch Kontroll-Maus IgG inhibierbar, was die HLA Klasse I-Restriktion der induzierten CTL verdeutlicht. Zum Ausschluß eines signifikanten Beitrags von natürlichen Killerzellen an der beobachteten Zytotoxizität setzten wir zusätzlich K562 als Targetzellen ein.

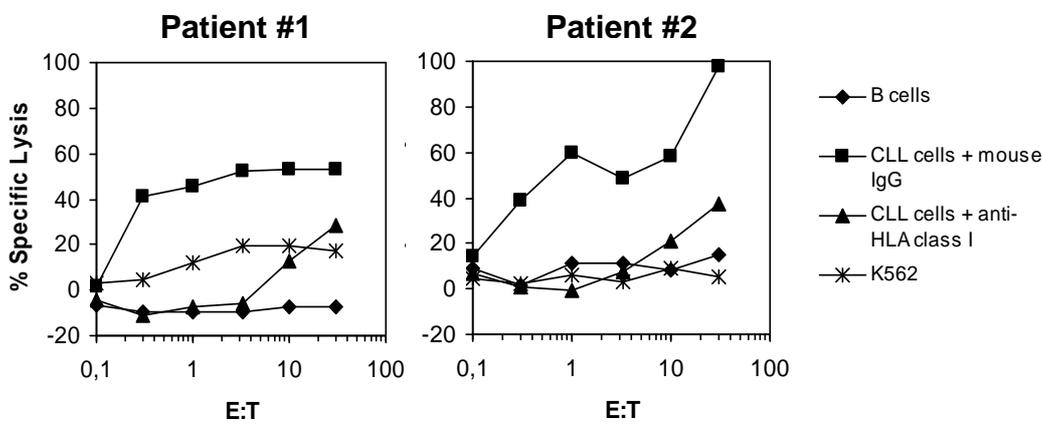


Abb. 4.12: Induktion von CLL-spezifischen CTL-Antworten im autologen System durch RNA-transfizierte dendritische Zellen. Aus dem peripheren Blut von zwei CLL-Patienten generierte unreife dendritische Zellen wurden am Tag 6 mit jeweils 2.5 µg CLL-RNA aus autologen CD5+ CLL-Zellen/10⁶ DC elektroporiert. Nach 24 h Ausreifung mit TNF-α wurden die so generierten dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen für die CTL-Induktion eingesetzt. Nach 7 Tagen erfolgte eine einmalige Restimulation mit auf identische Weise RNA-elektroporierten dendritischen Zellen. Die Bestimmung der zytotoxischen Aktivität der induzierten CTL erfolgte an Tag 5 nach der Restimulation durch einen Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest. Eingesetzte Targetzellen: autologe B-Zellen (CD19+CD5-), CLL-Zellen (CD19+CD5+), K562.

Zusätzlich führten wir zur weiteren Analyse der Spezifität der induzierten CTL-Antwort sogenannte „Cold Target Inhibition“-Assays durch. In Abb. 4.13 ist das Ergebnis eines solchen Assays von Patient 1 dargestellt. Die Lyse von autologen, mit ⁵¹Cr markierten CLL-Zellen (hot targets) durch die induzierten CTL konnte hier durch die Zugabe von unmarkierten, autologen CLL-Zellen (cold targets) aber nicht durch die Zugabe von unmarkierten, autologen PBMNC gehemmt werden. Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die induzierten zytotoxischen T-Zellen spezifisch gegen den malignen CLL-Klon gerichtet sind.

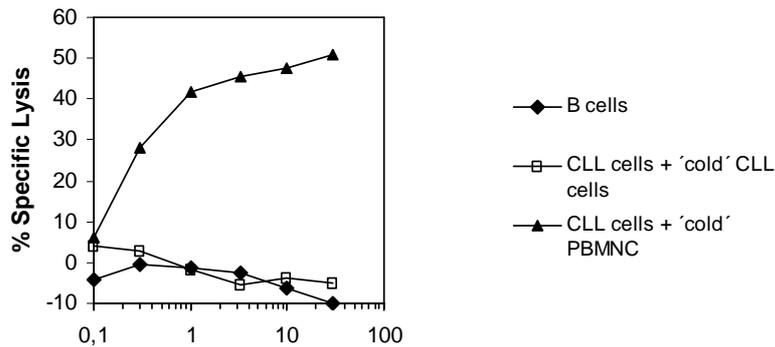


Abb. 4.13: „Cold Target Inhibition“-Assay mit den bei Patient 1 induzierten CLL-spezifischen CTL.

Zur Klärung der Frage, ob die von den bei Patient 1 induzierten CLL-spezifischen CTL erkannten Epitope auch in den leukämischen Zellen von anderen Patienten exprimiert und präsentiert werden, führten wir weitere Assays durch. Hierfür isolierten wir die Total RNA aus der leukämischen Zellpopulation von drei weiteren Patienten mit chronisch-lymphatischer Leukämie (CLL) und einem Patienten mit akuter akuter myeloischer Leukämie (AML). Die präparierten RNAs wurden anschliessend zur Elektroporation von dendritischen Zellen von Patient 1 verwendet. Diese mit allogener RNA transfizierten, autologen dendritischen Zellen wurden dann in dem durchgeführten Standard- ^{51}Cr -Freisetzungstest als Targetzellen eingesetzt (s. Abb. 4.14). Wie in Abb. 4.14 dargestellt erkannten die induzierten CTL auch in diesem Experiment die mit der korrespondierenden CLL-RNA transfizierten, autologen dendritischen Zellen, während mit irrelevanter EGFP RNA transfizierte, autologe dendritische Zellen nicht lysiert wurden. Darüberhinaus zeigten die CTL signifikante zytotoxische Aktivität gegen autologe dendritische Zellen, welche zuvor mit allogener Gesamttumor-RNA von drei CLL-Patienten bzw. von einem AML-Patienten transfiziert worden waren. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass unter diesen verschiedenen Leukämiezellen möglicherweise gemeinsame tumorassoziierte Antigene (sogenannte „shared tumor-associated antigens“) existieren.

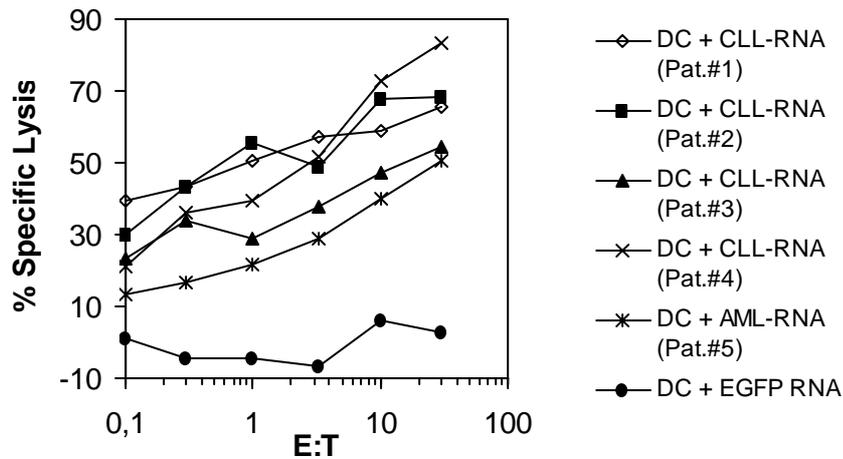


Abb. 4.14: Kreuzreaktivität der induzierten CTL. Unreife aus dem peripheren Blut von Patient 1 generierte unreife dendritische Zellen wurden an Tag 6 mit 2.5 µg TotalRNA aus autologen CLL-Zellen elektroporiert und nach Inkubation für 24 h mit TNF-α für die CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation wurde nach 7 Tagen mit identisch elektroporierten dendritischen Zellen durchgeführt. Die Durchführung des Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstests erfolgte am Tag 5 nach der Restimulation. Als Targetzellen wurden autologe dendritische Zellen, die zuvor mit TotalRNA aus den leukämischen Zellen von verschiedenen Patienten transfiziert worden waren, eingesetzt. Als Kontrolle wurden autologe, mit irrelevanter EGFP RNA transfizierte dendritische Zellen verwendet.

In einem weiteren Experiment setzten wir Gesamttumor-RNA aus den Leukämiezellen von drei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) und zwei Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) für die Elektroporation der Targetzellen ein. Abb. 4.15 zeigt das Ergebnis des am Tag 5 nach der Restimulation durchgeführten Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstests. Wie in Abb. 4.15 gezeigt, lysierten die induzierten CTL effektiv die mit AML-RNA von drei verschiedenen Patienten elektroporierten autologen dendritischen Zellen. Die mit ALL-RNA transfizierten dendritischen Zellen wurden ebenfalls bei einem von zwei untersuchten Patienten erkannt. Insgesamt weisen auch die Ergebnisse dieses Experimentes darauf hin, daß es offensichtlich unter den verschiedenen untersuchten Leukämiearten gemeinsame, relevante tumorassoziierte Antigene zu geben scheint. Eine mögliche Reaktivität der induzierten CTL gegen präsentierte Epitope von allo-MHC Molekülen konnte in die-

sem Experiment ebenfalls ausgeschlossen werden, da mit allogener PBMNC-RNA elektro-
porierte, autologe dendritische Zellen durch die CTL nicht erkannt wurden.

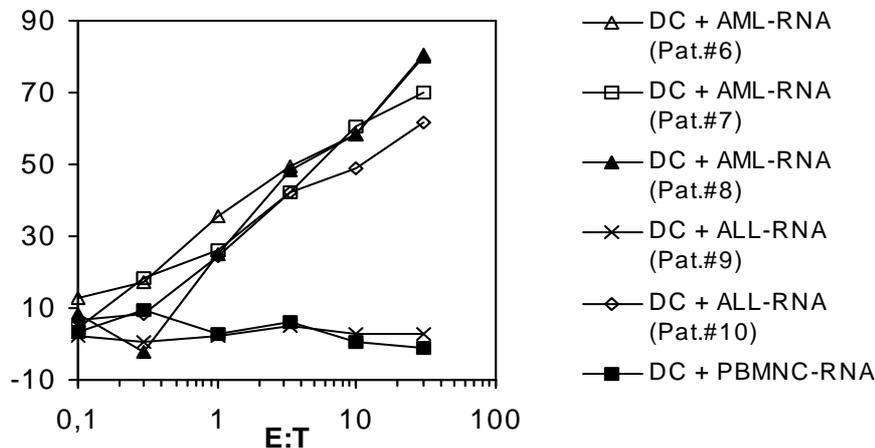


Abb. 4.15: Kreuzreaktivität der induzierten CTL. Unreife aus dem peripheren Blut von Patient 1 generierte dendritische Zellen wurden an Tag 6 mit 2.5 µg TotalRNA aus autologen CLL-Zellen elektroporiert und nach Inkubation für 24 h mit TNF-α für die CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation wurde nach 7 Tagen mit identisch elektroporierten dendritischen Zellen durchgeführt. Die Durchführung des Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstests erfolgte am Tag 5 nach der Restimulation. Als Targetzellen wurden autologe dendritische Zellen von Patient 1 eingesetzt, welche zuvor mit der Gesamttumor-RNA von drei AML-Patienten (Patienten 6-8) und zwei ALL-Patienten (Patienten 9 und 10) elektroporiert worden waren. Zum Ausschluß einer Reaktivität der induzierten CTL gegen allo-MHC Moleküle wurden außerdem mit aus allogenen PBMNC isolierter total RNA elektroporierte, autologe DC als Targets eingesetzt.

Das Ziel der nächsten Experimente bestand darin, mehr Informationen über die Spezifität der induzierten CTL zu erhalten. Zu diesem Zwecke elektroporierten wir unreife dendritische Zellen aus dem peripheren Blut eines HLA-A2+ CLL-Patienten am Tag 6 mit 2.5 µg autologer CLL-RNA/10⁶ DC. Nach Ausreifung für 24 h mit TNF-α wurden die so transfizierten dendritischen Zellen dann für die CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation mit auf die gleiche Weise vorbehandelten dendritischen Zellen erfolgte am Tag 7 nach der Induktion. Die Analyse der Spezifität der induzierten CTL-Antwort mittels Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstest wurde am Tag 5 nach der Restimulation durchgeführt. Zur genaueren Analyse der Epitopspezifität setzten wir bei diesem Assay autologe dendritische Zellen, welche zuvor mit aus

verschiedenen Tumorantigenen abgeleiteten, HLA-A2-bindenden Peptiden beladen worden waren, als Targetzellen ein. Diesbezüglich wurden Peptide aus den tumorassoziierten Antigenen Adipophilin, Survivin, MUC1 und Telomerase verwendet, von denen bekannt ist, daß sie bei der CLL und ebenfalls bei vielen anderen Krebserkrankungen von Relevanz sind.

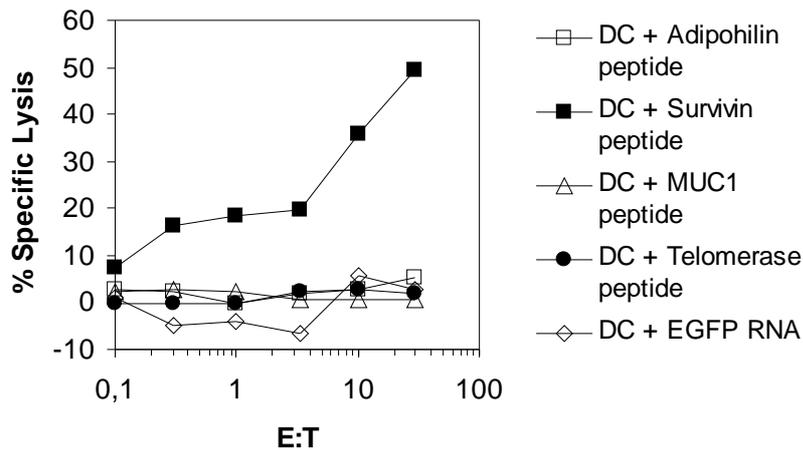


Abb. 4.16: Spezifität der mit CLL-RNA transfizierten dendritischen Zellen induzierten CTL-Antwort. Unreife, aus dem peripheren Blut eines HLA-A2+ CLL-Patienten generierte dendritische Zellen wurden an Tag 6 mit 2.5 µg TotalRNA aus autologen CLL-Zellen elektroporiert und nach Inkubation für 24 h mit TNF-α für die CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation wurde nach 7 Tagen mit identisch elektroporierten dendritischen Zellen durchgeführt. Die Durchführung des Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstests erfolgte am Tag 5 nach der Restimulation. Als Targetzellen wurden autologe, dendritische Zellen desselben Patienten eingesetzt, welche zuvor mit verschiedenen, aus tumor-assoziierten Antigenen abgeleiteten Peptiden beladen worden waren. Verwendete Peptide: ELTLGEFLKL aus Survivin, SVASTITGV aus Adipophilin, ILAKFLHWL aus Telomerase und LLLLTVLTV aus MUC1. Mit irrelevanter EGFP RNA transfizierte, autologe dendritische Zellen wurden als Negativkontrolle eingesetzt.

Wie in Abb. 4.16 dargestellt erkannten die induzierten CTL überraschenderweise die mit dem Survivin-Peptid beladenen Targetzellen, während gegen die mit den anderen Peptiden gepulsten Targetzellen keine signifikante Zytotoxizität detektierbar war. Diese Beobachtung suggeriert eine Beteiligung von Survivin an der beobachteten CTL-Antwort, während die übrigen getesteten Peptidepitope keine Rolle zu spielen scheinen. Passend zu den im ⁵¹Cr-Freisetzungstest gemachten Beobachtungen konnten wir auch im ELISPOT-Assay eine Expansion von Survivin-reaktiven T-Zellen detektieren (s. Abb. 4.17).

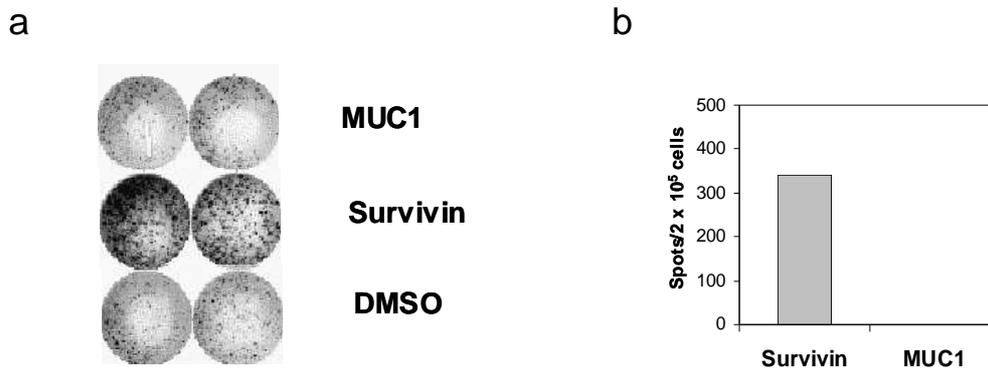


Abb. 4.17: Spezifität der mit CLL-RNA transfizierten dendritischen Zellen induzierten CTL-Antwort. Die mit CLL-RNA elektroporierten dendritischen Zellen *in vitro* induzierten CTL eines HLA-A2+ CLL-Patienten wurden in einer mit Anti-IFN- γ -Antikörper (mAb 1-D1K) beschichteten 96-Well-Platte mit autologen, bestrahlten PBMNC, die zuvor mit den HLA-A2-bindenden Peptiden ELTLGEFLKL (Survivin) und LLLLTVLTV (MUC1) gepulst worden waren, inkubiert. Für die Detektion der Spots wurde ein Biotin-markierter Anti-IFN- γ -Antikörper (mAb 7-B6-1) eingesetzt (a). Die Auszählung der Spots erfolgte nach einer Inkubation von 36 h in einem automatischen ELISPOT-Reader (b). Die in dem Diagramm aufgetragenen Werte repräsentieren die Anzahl der ausgezählten Spots pro 2×10^5 T-Zellen nach Abzug der in der DMSO-Kontrolle ausgezählten Spots.

Das nächste Experiment bestand in der Überprüfung der Hypothese, ob auch in unserem autologen CLL-Modell effektive CTL-Antworten mit *in vitro* amplifizierter RNA induziert werden können. Zu diesem Zwecke amplifizierten wir die aus den CD5+CD19+ Zellen eines CLL-Patienten isolierte Gesamttumor-RNA nach dem zuvor beschriebenen Verfahren. Aus dem peripheren Blut des Patienten generierte unreife dendritische Zellen wurden an Tag 6 entweder mit 2.5 μ g nativer CLL-RNA oder 2.5 μ g *in vitro* amplifizierter CLL-RNA/ 10^6 DC elektroporiert und nach 24 h Ausreifung mit TNF- α für die CTL-Induktion eingesetzt. Nach einer Restimulation an Tag 7 mit identisch vorbehandelten dendritischen Zellen erfolgte an Tag 12 die Analyse der CTL im ⁵¹Cr-Freisetzungstest. Sowohl die mit nativer als auch die mit amplifizierter RNA induzierten CTL waren in der Lage autologe CLL-Zellen und autologe, mit CLL-RNA elektroporierte dendritische Zellen zu lysieren, während gegen autologe CD5-B-Zellen und gegen autologe, mit irrelevanter EGFP-RNA elektroporierte dendritische Zellen keine signifikante Zytotoxizität detektiert werden konnte.

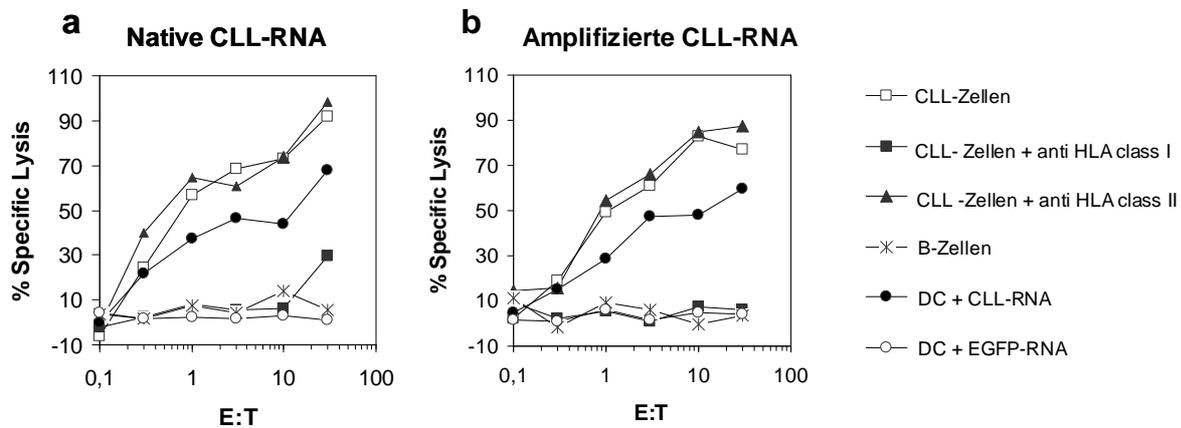


Abb. 4.18: Induktion von CLL-spezifischen CTL mit *in vitro* amplifizierter CLL-RNA. Unreife, aus dem peripheren Blut eines CLL-Patienten generierte dendritische Zellen wurden an Tag 6 entweder mit 2.5 µg nativer CLL-RNA/10⁶ DC oder mit 2.5 µg amplifizierter CLL-RNA/10⁶ DC t elektroporiert und nach Inkubation für 24 h mit TNF-α für die CTL-Induktion eingesetzt. Eine Restimulation wurde nach 7 Tagen mit identisch elektroporierten dendritischen Zellen durchgeführt. Die Durchführung des Standard-⁵¹Cr-Freisetzungstests erfolgte am Tag 5 nach der Restimulation. Eingesetzte Targetzellen: CD19+CD5+ CLL-Zellen, CD19+CD5- B-Zellen, autologe DC elektroporiert mit CLL-RNA, autologe DC elektroporiert mit irrelevanter EGFP-RNA. Für die Blockierungsexperimente wurden die Antikörper W6/32 (HLA Klasse I) und Tü39 (HLA Klasse II) verwendet. *In vitro* – Amplifikation von CLL mRNA durch Dr. rer. nat. F. Grünebach.

Die Lyse der CLL-Zellen war durch vorherige Zugabe von Antikörper gegen HLA Klasse I-Moleküle aber nicht durch Antikörper gegen HLA Klasse II-Moleküle inhibierbar, was die HLA Klasse I-Restriktion der induzierten CTL-Anwort verdeutlicht.

Das vorliegende Experiment zeigt, daß auch im autologen System mit *in vitro* amplifizierter RNA effektive, MHC Klasse I-restringierte und tumorspezifische CTL-Antworten induziert werden können.

4.8 Induktion von CLL-spezifischen T-Helferzellen im autologen System

Das Ziel des nun folgenden Experimentes, welches ebenfalls zusammen mit Frau Cand. med. Garyfalia Tsakou durchgeführt wurde, bestand in der Klärung der Frage, ob mit RNA-

transfizierte dendritische Zellen auch HLA-Klasse II-restringierte, tumorspezifische T-Helferzellen induziert werden können. Zu diesem Zweck isolierten wir zunächst immunomagnetisch aus dem peripheren Blut eines CLL-Patienten die CD4+ T-Lymphozyten unter Zuhilfenahme des CD4+ T Cell Isolation Kits (Miltenyi Biotec). Die Reinheit der isolierten Zellpopulation wurde anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Unreife, aus dem peripheren Blut desselben Patienten generierte dendritische Zellen wurden am Tag 6 nach der Induktion mit aus autologen CLL-Zellen isolierter Total RNA elektroporiert. Nach Ausreifung für 24 h mit TNF- α wurden die RNA-transfizierte dendritische Zellen dann als antigenpräsentierende Zellen für die Induktion von T-Helferzellen eingesetzt. Zwei Restimulation mit identisch vorbehandelten dendritischen Zellen wurden an Tag 7 und Tag 14 durchgeführt.

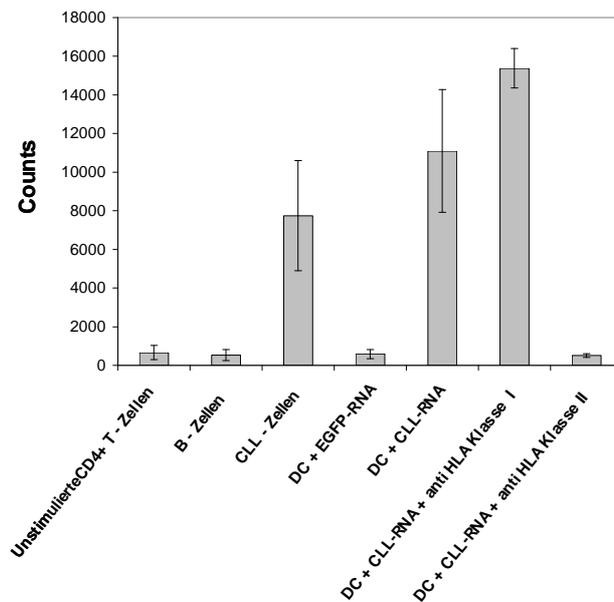


Abb. 4.19: Induktion einer proliferativen T-Helferzellantwort durch mit CLL-RNA-transfizierte dendritische Zellen. CD4+ T-Lymphozyten wurden immunomagnetisch aus dem peripheren Blut eines CLL-Patienten isoliert und mit dendritischen Zellen, welche zuvor mit 2.5 μ g CLL-RNA transfiziert worden waren, induziert. Restimulationen mit identisch transfizierten dendritischen Zellen erfolgten an Tag 7 und an Tag 14 nach der Induktion. Der dargestellte 3 H-Proliferationstest zur Analyse der induzierten Immunantwort wurde am Tag 20 nach der Induktion durchgeführt. Als Stimulationszellen wurden CLL-Zellen, B-Zellen, mit CLL-RNA elektroporierte, autologe dendritische Zellen und mit irrelevanter EGFP-RNA elektroporierte dendritische Zellen eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte CD4+ T-Zellen verwendet. Die Blockierung der HLA Moleküle wurde mit den Antikörpern W6/32 (HLA Klasse I) und Tü39 (HLA Klasse II) durchgeführt.

Die Spezifität der induzierten T-Zell-Antwort wurde schließlich am Tag 20 nach der Induktion durch einen ^3H -Proliferationstest analysiert. Wie in Abb. 4.19 dargestellt zeigten die induzierten T-Helferzellen im durchgeführten ^3H -Proliferationstest ein tumorspezifisches Proliferationsmuster. Die Stimulation mit autologen CLL-Zellen und mit CLL-RNA transfizierten, autologen dendritischen Zellen führte zu einer signifikanten Proliferation der T-Zellpopulation, während autologe B-Zellen und mit irrelevanter EGFP-RNA transfizierte, autologe dendritische Zellen nicht in der Lage waren, eine Proliferation auszulösen. Die Proliferation der T-Helferzellen konnte wie postuliert durch die vorherige Zugabe eines Antikörpers gegen HLA Klasse II-Moleküle, nicht aber durch die Zugabe eines Antikörpers gegen HLA Klasse I-Moleküle inhibiert werden, was die HLA Klasse II-Restriktion der induzierten Immunantwort unterstreicht.

Zusammenfassend konnte mit dem vorliegenden Experiment demonstriert werden, daß mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen auch tumorspezifische, HLA Klasse II-restringierte T-Helferzell-Antworten induziert werden können.

5 Diskussion

5.1 RNA-Transfektion von dendritischen Zellen zur Induktion von tumorspezifischen T-Zell-Antworten

Dendritische Zellen werden als die potentesten antigenpräsentierenden Zellen (APC) angesehen, welche die Fähigkeit besitzen, primäre Immunantworten zu induzieren und zu unterhalten (Banchereau *et al.*, 1998; Cella *et al.*, 1997). Seit vor einigen Jahren verschiedene Verfahren entwickelt wurden, um dendritische Zellen in ausreichender Menge zu isolieren bzw. zu generieren, wird ihre Anwendung in verschiedensten klinischen Studien zur Behandlung von Tumor- bzw. Infektionserkrankungen evaluiert (Bubenik *et al.*, 2001; Brossart *et al.*, 2001; Cerundolo *et al.*, 2004; Figdor *et al.*, 2004; Morse *et al.*, 1997; Morse *et al.*, 2003).

Die Anwendung von dendritischen Zellen für Vakzinierungszwecke ist allerdings in den meisten Fällen dadurch limitiert, daß bei der klassischen Beladung mit Peptiden die entsprechenden tumorassoziierten Antigene charakterisiert sein müssen. Darüberhinaus ist für die Applikation von Peptidvakzinen die Kenntnis des HLA-Haplotyp des Patienten notwendig. Die meisten bis dato durchgeführten klinischen Studien beschränkten sich auf Patienten mit Expression des MHC-Klasse I-Moleküles HLA-A2, für welches mittlerweile die meisten Peptiddepote charakterisiert sind. Dieses Allel tritt bei etwa 50% der in Europa und Nordamerika ansässigen Bevölkerung auf. Der gravierende Nachteil dieses Ansatzes besteht in dem Problem, daß für Patienten mit seltenerem HLA-Typ bis dato keine bzw. nur wenige charakterisierte und in klinischen Studien evaluierte Peptiddepote existieren (Bakker *et al.*, 1995; Brossart *et al.*, 2001; Celluzi *et al.*, 1996; Grünebach *et al.*, 2005; Mayordomo *et al.*, 1995; Nestle *et al.*, 1998; Paczesny *et al.*, 2004; Thurner *et al.*, 1999). Zudem ist zu befürchten, daß Vakzinen, welche lediglich gegen eines oder wenige Antigene gerichtet sind, zur Selektion

tion von Tumorzellen führen, welche diese Antigene nicht exprimieren, ohne längerfristig effektiv gegen den gesamten Tumor sein zu können.

Zur Lösung dieses Dilemmas wurden in den letzten Jahren verschiedene sogenannte Gesamttumorstrategien („whole tumor approaches“) entwickelt. Hierbei werden die dendritischen Zellen entweder mit apoptotischen Tumorzellen („apoptotic bodies“) oder mit RNA aus Tumorzellen beladen (Boczkowski *et al.*, 1996; Boczkowski *et al.*, 2000; Chang *et al.*, 2000; Heiser *et al.*, 2000; Heiser *et al.*, 2001; Heiser *et al.*, 2002; Herr *et al.*, 1996; Inaba *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1998; Nair *et al.*, 1999; 2000; 2002; Shaif-Muthana *et al.*, 2000; Van Tendeloo *et al.*, 2001). Außerdem wurden auch Versuche unternommen, Tumorzellen zur Antigenbeladung mit dendritischen Zellen zu fusionieren (Scott-Taylor *et al.*, 2000).

Die Gesamtzell-RNA-Vakzinierung, deren Untersuchung und Weiterentwicklung Gegenstand der vorgelegten Arbeit ist, bietet im Vergleich zu den klassischen Vakzinierungsansätzen eine Reihe von Vorteilen. In dem Verfahren wird das gesamte Transkriptom der Tumorzelle incl. aller auch nicht charakterisierten antigenen Eigenschaften in die dendritische Zelle transferiert. Dort erfolgt die Expression und Antigenprozessierung, des aus den Tumorzellen stammenden antigenen Materials auf natürlichem Wege, was zur Präsentation von multiplen, möglicherweise immundominanten Peptidepitopen auf den dendritischen Zellen führt. Die Vakzinierung setzt darüber hinaus weder das Vorhandensein eines bestimmten HLA-Typs noch die vorherige Charakterisierung der Antigene, gegen welche vakziniert werden soll, voraus. Vielmehr wird eine Immunantwort gegen multiple auf dem Tumor des Patienten vorhandene Antigene induziert, was das Risiko des Auftretens von sogenannten Tumor-Escape-Phänomenen deutlich reduzieren dürfte. Zusätzlich werden durch die Verwendung von RNA-transfizierten DC möglicherweise auch HLA-Klasse II-restringierte T-Helferzellen induziert, welche für die Induktion und Unterhaltung einer effektiven CTL-Antwort *in vivo* notwendig sind.

Die Arbeitsgruppe um Eli Gilboa (Duke University, Durham, NC, USA) konnte bereits 1996 zeigen, dass durch RNA-transfizierte dendritische Zellen antigenspezifische CTL *in vitro* und *in vivo* induziert werden können (Boczkowski *et al.*, 1996). Dendritische Zellen, welche zuvor via Lipofektion mit Total RNA bzw. Gesamttumor-mRNA aus Ovalbumin-exprimierenden Tumorzellen oder mit *in vitro* transkribierter Ovalbumin-mRNA transfiziert worden waren, waren ebenso zur Induktion einer antigenspezifischen CTL-Antwort in der Lage wie mit einem aus Ovalbumin abgeleitetem Peptid beladene dendritische Zellen. Mäuse, welche zuvor mit Ovalbumin-RNA transfizierten dendritischen Zellen vakziniert worden waren, waren resistent gegen die normalerweise lethal endende Transplantation von Ovalbumin-exprimierenden Tumoren. Seit den Pionierexperimenten von Boczkowski *et al.* konnte die Effektivität dieses Ansatzes zur Induktion von CTL-Antworten durch eine Vielzahl von Autoren bestätigt werden (Heiser *et al.*, 2000; Heiser *et al.*, 2001; Heiser *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 2003; Milazzo *et al.*, 2003; Nair *et al.*, 2000; Strobel *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003; Thornburg *et al.*, 2000; Ueno *et al.*, 2004; Weissman *et al.*, 2000).

In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir zunächst unterschiedliche Strategien zur RNA-Transfektion von dendritischen Zellen. Diesbezüglich wurden von uns die Methoden Lipofektion mit dem kationischen Lipid Unifectin M, Elektroporation und CD71-(Transferrinrezeptor)-vermittelte Endozytose einer genauen Evaluation unterzogen. Hierbei erwies sich die Elektroporation sowohl im Hinblick auf die erzielte Transfektionseffizienz von ca. 30% als auch bezüglich des experimentellen Aufwandes als die bei weitem überlegendste Methode. Mittels Lipofektion mit Unifectin M gelang die Transfektion von DC ebenfalls mit einer Effizienz von bis zu 17.5% bei Einsatz einer deutlich höheren RNA-Menge, während sich die Methode CD71-vermittelte Endozytose mit maximalen Transfektionseffizienzen von ca. 1% als unterlegen erwies. Diese Ergebnisse entsprechen im wesentlichen einer ähnlichen Untersuchung aus der Arbeitsgruppe von Z. Berneman (Universität Antwerpen, Belgien), bei welcher für

aus Monozyten generierte DC eine RNA-Transfektionseffizienz durch Elektroporation von bis zu 63% beschrieben wird (Van Tendeloo *et al.*, 2001). Für die RNA-Transfektion von aus CD34+ Progenitorzellen induzierten DC werden in der Literatur teilweise deutlich höhere Transfektionseffizienzen beschrieben. So beschreibt Van Tendeloo eine diesbezügliche Transfektionseffizienz 70-80%, während einer Arbeitsgruppe vom MD Anderson Cancer Center (Houston, Texas, USA) Transfektionseffizienzen von bis zu 96% beobachtet (Ueno *et al.*, 2004).

Interessanterweise ist die erzielte Transfektionseffizienz der antigenpräsentierenden Zellen (APC) allerdings nicht der entscheidende Parameter für die Induktion einer effektiven T-Zellantwort. So konnten wir in den durchgeführten Experimenten zeigen, daß selbst durch CD71-vermittelte Endozytose mit RNA transfizierte DC mit einer in vorausgegangenen Experimenten bestimmten Transfektionseffizienz von ca. 1% in der Lage waren, eine effektive tumorspezifische CTL-Antwort zu induzieren. Die beobachtete Zytotoxizität war hierbei unabhängig von der für die RNA-Transfektion eingesetzten Methode, was die Vermutung nahe legt, daß bereits die Aufnahme, Expression und Prozessierung von geringen Mengen an antigenem Material für die Induktion einer effektiven Immunantwort ausreichend sein kann. Passend zu diesen Beobachtungen wurde von der Arbeitsgruppe um Eli Gilboa beschrieben, daß sogar die passive Aufnahme von in das Kulturmedium gegebener RNA ohne spezielle Transfektion zur Induktion von spezifischen T-Zellantworten führen kann (Nair *et al.*, 1998). Zusätzlich werden durch die durchflusszytometrische Analyse möglicherweise zu niedrige Transfektionseffizienzen gemessen, da die Detektion des EGFP seine intakte und komplette Expression voraussetzt, während inkomplette Proteinfragmente nach Durchlaufen der Antigenprozessierung sehr wohl zur Präsentation von intakten Peptidpitopen auf den MHC-Molekülen führen können. Darüberhinaus ist die Geschwindigkeit der Expression der transfizierten RNA und der Umsatz der resultierenden Proteine möglicherweise von der verwend-

ten Methode abhängig, da die RNA abhängig von der verwendeten Methode in unterschiedliche Zellkompartimente gelangen könnte.

Ein Hauptproblem in Bezug auf die spätere klinische Anwendbarkeit dieser Vakzinierungsmethode stellt die Verfügbarkeit einer ausreichenden Menge an RNA dar. In der Arbeitsgruppe von Eli Gilboa wurde bereits 2000 eine PCR-basierte Methode zur unspezifischen *in vitro*-Amplifikation von Gesamttumor-mRNA entwickelt (Boczkowski et al., 2000). Diese Methode wurde von uns durch mehrere Modifikationen verfeinert (s. 3.2.7) und für verschiedene Experimente eingesetzt. Um die biologische Aktivität von amplifizierter mRNA zu evaluieren bedienten wir uns abermals eines EGFP-Modellsystems. Zu diesem Zwecke transfizierten wir die RCC-Zelllinie N43 stabil mit dem DNA-Plasmid pEGFP-N1 und erhielten somit eine konstitutiv EGFP-exprimierende Tumorzelllinie N43 EGFP. Aus dieser Zelllinie isolierten wir die gesamte zelluläre mRNA und führten diese dem o.g. Amplifikationsprotokoll zu. Anschließend transfizierten wir unreife DC entweder mit nativer oder mit *in vitro* amplifizierter Gesamttumor-mRNA. Die EGFP-Expression in den elektroporierten DC wurde anschließend zu verschiedenen Zeitpunkten durchflusszytometrisch gemessen. Hierbei zeigte sich als erste wichtige Erkenntnis, daß die aus der Zelllinie N43 EGFP isolierte mRNA (incl. der für EGFP kodierenden mRNA) nach Elektroporation in die DC tatsächlich zur Expression gelangt. Ferner konnten wir die Expressionskinetik der transfizierten RNA ermitteln und fanden eine maximale Expression von EGFP ca. 40 h nach erfolgter Elektroporation. 72 h nach der Elektroporation war die detektierte Proteinexpression bereits nicht mehr nachweisbar, was den transienten Charakter der RNA-Transfektion erneut unterstreicht. Mit *in vitro* amplifizierter N43 EGFP-mRNA transfizierte DC exprimierten das Protein in einem fast identischen Zeitfenster, zeigten aber ein signifikant niedrigeres EGFP-Expressionsniveau von ca. 12% im Vergleich zu den mit nativer mRNA transfizierten DC, bei denen die EGFP-Expression maximal 40% betrug. Insgesamt konnten wir durch diese Versuchsreihe zeigen, dass *in vitro* amplifizierte mRNA zumindest teilweise biologisch aktiv ist und potentiell für Vakzinierungszwecke eingesetzt werden kann.

Zur weiteren Evaluation von *in vitro* amplifizierter mRNA hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität führten wir entsprechende CTL-Induktionen durch. Zu diesem Zwecke isolierten wir Gesamttumor-mRNA aus der RCC-Zelllinie A498 und führten nach dem o.g. Protokoll eine *in vitro*-Amplifikation der mRNA durch. Anschließend wurden unreife DC entweder mit nativer oder mit amplifizierter mRNA elektroporiert und für die CTL-Induktion eingesetzt. Hierbei zeigte sich, daß die mit *in vitro* amplifizierter mRNA transfizierten DC ebenso wie die mit nativer mRNA transfizierten DC in der Lage waren, eine effektive A498-spezifische CTL-Antwort zu induzieren. Dies unterstreicht abermals die von uns gemachte Beobachtung, daß das erreichte Niveau der Proteinexpression in den transfizierten DC nicht entscheidend für die effektive Induktion einer CTL-Antwort ist.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der von uns durchgeführten Untersuchungen besteht in der beobachteten Kreuzreaktivität der mit durch Gesamttumor-RNA von verschiedenen RCC-Linien transfizierte DC induzierten CTL. So erkannten mit A498-RNA induzierte CTL sowohl die Ausgangstumorzelllinie A498 wie auch die ebenfalls HLA-A2+ RCC-Zelllinie MZ1257 sowie HLA-A2+, mit A498-RNA transfizierte DC als Targetzellen. Die mit MZ1257-RNA induzierten CTL erkannten andererseits MZ1257, A498 und mit MZ1257 transfizierte, HLA-A2+ DC. Die HLA-A2+ Colocarzinom-Zelllinie, die HLA-A3+ Ovarialcarcinom-Zelllinie SK-OV-3, die HLA-A26+ RCC-Zelllinie ACHN sowie die EBV-immortalisierte B-Zell-Linie Croft wurden allerdings von beiden CTL-Populationen nicht erkannt. Ebenso war keine gegen HLA-gematchte, mit irrelevanter EGFP-RNA elektroporierte DC gerichtete Zytotoxizität detektierbar. Die Ergebnisse diese Experimentes illustrieren die Tumorspezifität der mit RNA-transfizierten DC induzierten CTL-Antworten. Die beobachteten Kreuzreaktivitäten suggerieren, daß die beiden Tumorzelllinien A498 und MZ1257 offensichtlich gemeinsame Antigene (sogenannte „shared antigens“) besitzen.

Insgesamt konnten wir im ersten Teil der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die Elektroporation im Vergleich zur Lipofektion und zur CD71-vermittelten Endozytose die effektivste Methode für den RNA-Transfer in DC darstellt. Ferner gelang uns der Nachweis, daß mit RNA-transfizierten DC unabhängig von der verwendeten Methode und der daraus resultierenden Transfektionseffizienz effektive, tumorspezifische CTL induziert werden können. Darüberhinaus zeigten wir, daß für die Transfektion sowohl Gesamttumor-RNA als auch Gesamttumor-mRNA mit gleichen Ergebnissen hinsichtlich der induzierten CTL-Antwort eingesetzt werden kann. Auch konnten wir demonstrieren, daß *in vitro* amplifizierte mRNA eine ausreichende biologische Aktivität für die Induktion von tumorspezifischen CTL-Antworten besitzt.

5.2 Induktion von CLL-spezifischen T-Zell-Antworten im autologen System

Im zweiten Teil versuchten wir die in der Zellkultur gewonnenen Erkenntnisse auf ein humanes, autologes System zu übertragen. Hierfür wählten wir aus verschiedensten Gründen die chronisch-lymphatische Leukämie (CLL) als Modellerkrankung. Zum einen handelt es sich bei der CLL nach wie vor um eine unheilbare Erkrankung trotz bedeutender Fortschritte in Therapie und Verständnis ihrer pathophysiologischen Grundlagen in den letzten Jahren (Diehl *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 1982; Mauro *et al.*, 1999; O'Brien *et al.*, 1995). Neue Medikamente wie das Purinanalogon Fludarabin (Keating *et al.*, 1990; Keating *et al.*, 1998; Sorensen *et al.*, 1997) und die monoklonalen Antikörper Rituximab (McLaughlin *et al.*, 1998; Montserrat, 2003) und Alemtuzumab (Faderl *et al.*, 2003; Hale *et al.*, 1988; Osterborg *et al.*, 1996; Rai *et al.*, 2002) haben sich im Hinblick auf das Erreichen einer kompletten Remission und auf die Dauer der erreichten Remission als den konventionellen Chemotherapien überlegen erwiesen. Aggressivere Behandlungsverfahren mit kurativer Intention wie die Hochdosischemotherapie (Dreger *et al.*, 1998; Pavletic *et al.*, 1998; Sutton *et al.*, 1998; Gribben, 1997) und die nichtmyeloablative, allogene Stammzelltransplantation (Khouri *et al.*, 1996; Khouri *et al.*, 1998; Michallet *et al.*, 1996; Mehta *et al.*, 1996a) werden derzeit bei ausgewählten Hochrisikopatienten in randomisierten, klinischen Studien evaluiert. Nichtsdes-

totrotz werden ein Großteil der behandelten Patienten nach dem Erreichen einer kompletten klinischen und molekularen Remission irgendwann ein Rezidiv ihrer Erkrankung erleiden.

Es gibt nun mehrere Aspekte, welche die CLL zu einem attraktiven Kandidaten für die Anwendung von immuntherapeutischen Ansätzen werden lassen. Die CLL ist normalerweise ein sehr langsam wachsender Tumor, weswegen in vielen Fällen ausreichend Zeit zur Induktion von tumorspezifischen T-Zellantworten nach Vakzinierungen bestehen dürfte (Diehl *et al.*, 1999; Skinnider *et al.*, 1982; Mauro *et al.*, 1999). Obwohl in den T-Zellen von CLL-Patienten eine Reihe von Defekten beschrieben wurden (Rossi *et al.*, 1996; Veenstra *et al.*, 1996; Matutes *et al.*, 1981; Kneitz *et al.*, 1999), konnte kürzlich gezeigt werden, dass *in vitro* autologe zytotoxische und proliferative T-Zell-Antworten gegen CLL-Zellen generiert werden können und dass die induzierten CTL in der Lage sind, autologe CLL-Zellen zu lysieren (Krackhardt *et al.*, 2002a; Krackhardt *et al.*, 2002b). Es erscheint daher vorstellbar, daß durch einen potenten Stimulus durch professionelle, antigenpräsentierende Zellen die bei CLL-Patienten beobachteten Störungen der T-Zell-Immunität und Toleranzmechanismen kompensiert werden können. Darüberhinaus gibt es eine Reihe von Hinweisen darauf, daß die CLL ein gutes Target für einen sogenannten Graft-versus-Leukemia-Effekt nach allogener Stammzelltransplantation darstellt (Khouri *et al.*, 1998; Mehta *et al.*, 1996b; Rondon *et al.*, 1996), was Rückschlüsse darauf zuläßt, daß sie möglicherweise auch ein gutes Target für die Anwendung von zellulären Immuntherapien ist.

In den von uns durchgeführten Experimenten analysierten wir die Fähigkeit von RNA-transfizierten DC zur Induktion von autologen, CLL-spezifischen T-Zell-Antworten. DC wurden *in vitro* aus Monozyten generiert, welche zuvor aus dem peripheren Blut von CLL-Patienten isoliert worden waren. Anschließend wurden die DC mit aus den autologen malignen Zellen isolierter CLL-RNA transfiziert und als antigenpräsentierende Zellen für die Induktion von zytotoxischen und proliferative T-Zellantworten eingesetzt.

Wir konnten mit den vorgelegten Ergebnissen demonstrieren, daß mit CLL-RNA elektroporierte DC in der Lage sind, *in vitro* tumorspezifische HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-restringierte Immunantworten zu induzieren. Die Zytotoxizität der induzierten CTL war spezifisch gegen den malignen CD5+ Zellklon gerichtet, während autologe CD19+CD5-B-Lymphozyten und autologe DC nicht lysiert wurden. Die Spezifität der induzierten CTL-Antwort konnte darüberhinaus in sogenannten „Cold Target-Inhibition“-Assays bestätigt werden. Die Lyse der CLL-Zellen konnte durch Blockierung mit einem Anti-HLA Klasse I-Antikörper (W6/32) blockiert werden, was demonstriert, daß auf den CLL-Zellen präsentierte HLA Klasse I-restringierte Epitope durch die induzierten CTL erkannt werden.

In einer weiteren Versuchsreihe wendeten wir erneut die bereits im ersten Teil evaluierte Methode zur unspezifischen Amplifikation von Tumor-mRNA an (Boczkowski *et al.*, 2000). Auch im autologen System konnten wir zeigen, daß mit *in vitro* amplifizierter mRNA ebenso wie mit nativer RNA transfizierte DC in der Lage sind, CLL-spezifische CTL-Antworten zu induzieren.

Interessanterweise konnten wir in einem anderen Experiment zeigen, daß die mit CLL-RNA transfizierten DC induzierten CTL in der Lage sind, autologe DC, welche zuvor mit aus den leukämischen Zellpopulationen von anderen Patienten stammender Gesamttumor-RNA transfiziert worden waren, zu erkennen und zu lysieren. Hierbei wurde auch RNA aus den Blastenpopulationen von Patienten mit akuter lymphatischer Leukämie (ALL) sowie mit akuter myeloischer (AML) eingesetzt. Diese Ergebnisse zeigen, daß diese verschiedenen Leukämiearten zumindest teilweise gemeinsame Antigene besitzen, welche offensichtlich von Relevanz für die Erkennung der malignen Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) sind. Eine mögliche Reaktivität der induzierten CTL gegen fremde MHC-Moleküle konnte durch die Durchführung eines entsprechenden Kontrollexperimentes, bei welchem autologe DC als Targets eingesetzt wurden, die zuvor mit TotalRNA aus allogenen PBMNC transfiziert

worden waren, ausgeschlossen werden. Diese demonstriert, daß die induzierte CTL-Antwort spezifisch gegen die malignen Zellklone gerichtet ist.

In der nun folgenden Serie von Experimenten versuchten wir, mehr über die an der beobachteten Zytotoxizität beteiligten Antigene zu erfahren. Hierzu verwendeten wir CLL-RNA transfizierte DC eines HLA-A2+ CLL-Patienten zur Induktion von tumorspezifischen CTL. In dem durchgeführten ⁵¹Cr-Freisetzungstest setzten wir autologe DC als Targets ein, welche zuvor mit HLA-A2-bindenden, aus den tumorassoziierten Antigenen Adipophilin, Survivin, MUC1 and Telomerase abgeleiteten Peptiden beladen worden waren. Von diesen Antigenen ist bekannt, daß sie sowohl bei der CLL als auch bei einer Reihe von sonstigen Tumorerkrankungen von Relevanz sind. Überraschenderweise zeigte sich in diesem Experiment in reproduzierbarer Weise eine gegen das aus Survivin abgeleitete Peptidepitop gerichtete Zytotoxizität, während die mit den anderen Peptiden beladenen DC von den polyklonalen CTL nicht erkannt wurden. Zusätzlich konnten wir in den durchgeführten ELISPOT-Experimenten eine Survivin-spezifische Produktion von IFN- γ messen und die bei den zuvor durchgeführten Versuchen gemachten Beobachtungen bestätigen. Darüberhinaus konnte unsere Arbeitsgruppe vor kurzem zeigen, daß bei CLL-Patienten Survivin-spezifische CTL induziert werden können, welche in der Lage sind, autologe CLL-Zellen zu lysieren (Schmidt *et al.*, 2003).

Insgesamt demonstrieren die erhobenen Daten eine Bedeutung des tumorassoziierten Antigens Survivin bei der induzierten Immunantwort gegen CLL-Zellen und suggerieren, daß es sich bei diesem Antigen um einen interessanten Kandidaten für die Entwicklung von immuntherapeutischen Ansätzen zur klinischen Behandlung der CLL handeln könnte.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der von uns durchgeführten Untersuchungen besteht in der Demonstration, daß mit CLL-RNA transfizierte DC auch in der Lage sind, tumorspezifische HLA-

Klasse II-restringierte T-Helferzell-Antworten zu induzieren, welche für die Induktion und Unterhaltung einer primären Immunantwort *in vivo* von zentraler Bedeutung sind. Zuvor konnten wir bereits im Zellkultursystem zeigen, daß mit aus der Mammacarcinom-Zelllinie MCF-7 isolierter Gesamttumor-RNA tumorspezifische T-Helferzellen induziert werden können (Müller *et al.*, 2003). Mit den vorliegenden Experimenten konnten wir demonstrieren, daß dies auch im autologen System gelingt und vor allem auch bei CLL-Patienten mit den schwerwiegenden beschriebenen Störungen der T-Zell-Immunität möglich ist. Die Präsentation von zytosolischen Antigenen auf MHC-Klasse II-Molekülen widerspricht zwar in einem gewissen Sinn den klassischen Konzepten der Antigenprozessierung, konnte allerdings inzwischen von mehreren anderen Arbeitsgruppen ebenfalls beobachtet werden. So sind bis dato mehrere möglichen Pathways vorgeschlagen und untersucht worden. Die zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings immer noch spekulativ. Es konnte gezeigt werden, daß die MHC-Klasse II-Präsentation von endogenen Antigenen einerseits die Aktivität zytoplasmatischer Proteasen (incl. proteasomaler und nichtproteasomaler Proteolyse) voraussetzt, andererseits aber unabhängig von der endosomalen Azidifizierung ist (Lich *et al.*, 2000; Mukerjee *et al.*, 2001). Kürzlich konnte darüberhinaus ein Mechanismus für die MHC-Klasse II-Präsentation von zytosolischen Antigenen durch Autophagie vorgestellt werden (Nimmerjahn *et al.*, 2003). Dieser Präsentationsweg schließt die Aufnahme der Proteine in sogenannte Autophagosomen und ihre nachfolgende Prozessierung im lysosomalen bzw. endosomalen Kompartiment ein, in welchem der zytoplasmatische Abbau und der Umsatz von zellulären Proteinen durch Autophagie mit der HLA-Klasse II-restringierten Präsentation von Antigenen konvergieren. Darüberhinaus konnte unsere Arbeitsgruppe kürzlich ebenfalls zeigen, daß die effektive Präsentation von HLA-Klasse II-restringierten Epitopen sowohl die proteasomalen als auch die endosomalen/lysosomalen Kompartimente voraussetzt. So führte sowohl eine Inhibition des Proteasoms mit Lactacystin als auch eine Inhibition der lysosomalen Azidifizierung mit Chloroquin zu einer signifikanten Beeinträchtigung der HLA Klasse II-Präsentation (Dörfel *et al.*, 2004). Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit demonstriert werden, daß eine spezifische Blockade des zellulären Autophagie-

mechanismus in DC mit 3-MA oder Wortmannin zu einer deutlichen Reduzierung ihrer Fähigkeit zur Präsentation von HLA Klasse II-restringierten Peptiden führt.

Zusammenfassend konnten wir im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit zeigen, daß bei Patienten mit CLL trotz der beschriebenen Störungen der T-Zell-Funktion sowohl funktionell intakte DC als auch effektive, tumorspezifische T-Zell- Antworten induziert werden können.

5.3 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente stellen die Grundlage für ein weitergehenden Entwicklung von immuntherapeutischen Therapieansätzen bei Patienten mit CLL dar. In den nun folgenden Untersuchungen sollte zunächst die Effizienz der Methode bei einer größeren Patientenzahl untersucht werden. Darüberhinaus sollte eine genauere funktionelle und phänotypische Charakterisierung der induzierten T-Zellen durchgeführt werden. Diesbezüglich könnte einerseits versucht werden, MHC-Liganden von CLL-Zellen zu präparieren und durch massenspektrometrische Analyse zu charakterisieren. Andererseits erlauben entsprechende DNA-Microarray-Untersuchungen die Identifikation von potentiellen Antigenkandidaten, welche dann über funktionelle Experimente auf ihre Relevanz bei der beobachteten Immunreaktion untersucht werden könnten.

6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DC) sind professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC), die bei der Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort eine entscheidende Rolle spielen. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß mit aus Tumoren isolierter RNA transfizierte DC effektive T-Zell-Immunantworten *in vitro* und *in vivo* induzieren können. Der entscheidende Vorteil dieser Vakzinierungsmethode besteht darin, daß zu ihrer Anwendung weder ein charakterisiertes Tumorantigen noch ein bestimmter HLA-Typ des Patienten notwendig ist. Mögliche Nachteile dieser Strategie könnten in der Induktion von Immunantworten gegen körpereigene Gewebstrukturen (Autoimmunreaktionen) bestehen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit evaluierten wir drei verschiedene Methoden zur RNA-Transfektion von DC (Elektroporation, Lipofektion mit dem kationischen Lipid Unifectin M, Transferrinrezeptor-(CD71)-vermittelte Endozytose) hinsichtlich ihrer Effizienz. Bei Experimenten mit *in vitro* transkribierter EGFP mRNA zeigte sich eine deutliche Überlegenheit der Elektroporation mit einer erzielten Transfektionseffizienz von annähernd 30%, während die beiden anderen Methoden deutlich niedrigere Transfektionseffizienzen lieferten. Die Lipofektion mit Unifectin M ergab eine Transfektionseffizienz von ca. 17.5%, wenn deutlich höhere mRNA-Mengen eingesetzt wurden, während die CD71-vermittelte Endozytose lediglich eine EGFP-Expression in etwa 1% der DC zeigte. Wurden diese verschiedenen Methoden jedoch zur Antigenbeladung von DC vor CTL-Induktion *in vitro* eingesetzt, erwiesen sich alle drei Techniken als potent bezüglich der Induktion einer antigenspezifischen T-Zellantwort, was als Hinweis darauf verstanden werden kann, daß bereits sehr geringe Transfektionseffizienzen für eine ausreichende Antigenpräsentation durch die DC ausreichend sind. Wir konnten weiter zeigen, daß *in vitro* transkribierte mRNA zumindest teilweise biologische Aktivität besitzt und für Vakzinierungszwecke eingesetzt werden kann. Ebenso konnten wir mittels eines EGFP-Modellsystems die Expressionskinetik von nativer und *in vitro* amplifizierte EGFP mRNA in DC aufklären. Hierbei zeigte sich eine signifikante Expression des Proteins bereits

wenige Stunden nach erfolgter Elektroporation. Die Expression erreichte nach etwa 40 h ihr Maximum und war bereits nach 48 h wieder auf sehr niedrige Werte zurückgegangen. In den durchgeführten Experimenten konnten wir außerdem zeigen, daß die untersuchte Methode auch zur Induktion von Colocarzinom-spezifischen T-Zellen eingesetzt werden kann.

Im zweiten Teil wurde die erprobte Methode zur Induktion von antigenspezifischen CTL durch RNA-transfizierte Methode auf eine autologes humanes System übertragen, wobei hier die chronisch-lymphatische Leukämie (CLL) als Modellerkrankung ausgewählt wurde. Hierbei konnte gezeigt werden, daß bei Patienten mit B-CLL funktionelle DC aus PBMNC generiert werden können. Diese waren nach Transfektion mit aus Leukämiezellen isolierter RNA in der Lage zytotoxische und proliferative leukämiespezifische T-Zellantworten zu induzieren. In den durchgeführten ⁵¹Cr-Freisetzungstests zeigte sich eine spezifisch gegen die CD5+ CLL-Zellen und gegen mit CLL-RNA transfizierte autologe DC gerichtete HLA Klasse I-restringierte Zytotoxizität der CTL, während CD19+CD5- B-Zellen nicht lysiert wurden. In weiteren Experimenten konnten wir eine mögliche Beteiligung eines aus dem tumorassoziierten Antigen Survivin stammenden Peptidepitops an der beobachteten Zytotoxizität nachweisen. Ferner konnten wir auch zeigen, daß auch im autologen System mit RNA-transfizierten DC HLA Klasse II-restringierte T-Helferzellantworten induziert werden können.

7 Literatur

Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, Dubinett S, Glaspy J, McBride WH, Economou JS. A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* 1997;4(1):17-25.

Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med.* 1997;186(7):1177-1182.

Bakker AB, Marland G, de Boer AJ, Huijbens RJ, Danen EH, Adema GJ, Figdor CG. Generation of antimelanoma cytotoxic T lymphocytes from healthy donors after presentation of melanoma-associated antigen-derived epitopes by dendritic cells in vitro. *Cancer Res.* 1995;55(22):5330-5334.

Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392(6673):245-252.

Banerjee AK. 5'-terminal cap structure in eucaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol Rev.* 1980;44(2):175-205.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999;285(5428):727-729.

Bendall DS (editor). *Evolution from molecules to men.* Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1983.

Bernhard H, Disis ML, Heimfeld S, Hand S, Gralow JR, Cheever MA. Generation of immunostimulatory dendritic cells from human CD34+ hematopoietic progenitor cells of the bone marrow and peripheral blood. *Cancer Res.* 1995;55(5):1099-1104.

Bielka H (editor). *The eukaryotic ribosome.* Springer-Verlag, 1982.

Birnstiel ML, Busslinger M, Strub K. Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell.* 1985;41(2):349-359.

Blow DM, Brick P. Aminoacyl-tRNA-synthetases (in Jurnak FA and McPherson A. Biological Macromolecules and Assembly, Vol. 2: Nucleic Acids and Interactive Proteins), Wiley, 1985. pp.441-469.

Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. Dendritic cells pulsed with RNA are potent anti-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 1996;184(2):465-472.

Boczkowski D, Nair SK, Nam JH, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of tumor immunity and cytotoxic T lymphocyte responses using dendritic cells transfected with messenger RNA amplified from tumor cells. *Cancer Res.* 2000;60(4):1028-1034.

Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1993;690:42-49.

Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med.* 1996;183(3):725-729.

Boon T, Coulie PG, Van den Eynde B. Tumor antigens recognized by T cells. *Immunol Today.* 1997;18(6):267-268.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(16):7297-7301.

Boussiotis VA, Freeman GJ, Gribben JG, Nadler LM. The role of B7-1/B7-2:CD28/CLTA-4 pathways in the prevention of anergy, induction of productive immunity and down-regulation of the immune response. *Immunol Rev.* 1996;153:5-26.

Brachet, J. Reminiscences about nucleic acid cytochemistry and biochemistry. *Trends Biochem Sci.* 1987;12:244-246.

Breathnach R, Chambon P. Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Annu Rev Biochem.* 1981;50:349-83.

Brenner S, Jacob F, Meselson M. An unstable intermediate carrying information from genes to ribosomes for protein synthesis. *Nature.* 1960;190:576-581.

Brossart P, Goldrath AW, Butz EA, Martin S, Bevan MJ. Virus-mediated delivery of antigenic epitopes into dendritic cells as a means to induce CTL. *J Immunol.* 1997;158(7):3270-3276.

Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Mohle R, Kanz L, Brugger W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood.* 1998; 92(11):4238-4247.

Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol.* 2001;29(11):1247-1255.

Brown DD. Gene expression in eukaryotes. *Science.* 1981;211(4483):667-674.

Brown RD, Pope B, Murray A, Esdale W, Sze DM, Gibson J, Ho PJ, Hart D, Joshua D.: Dendritic cells from patients with myeloma are numerically normal but functionally defective as they fail to up-regulate CD80 (B7-1) expression after huCD40LT stimulation because of inhibition by transforming growth factor-beta1 and interleukin-10. *Blood.* 2001; 98(10): 2992-2998.

Brugger W, Brossart P, Scheduling S, Stuhler G, Heinrich K, Reichardt V, Grünebach F, Buhning HJ, Kanz L. Approaches to dendritic cell-based immunotherapy after peripheral blood stem cell transplantation. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;872:363-371.

Bubenik J. Genetically engineered dendritic cell-based cancer vaccines (review). *Int J Oncol.* 2001;18(3):475-478.

Burnet FM. Cancer-a biological approach. *Br Med J.* 1957;1:779-786.

Burnet FM. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet.* 1967;1:1171-1174.

Cappello P, Novelli F, Forni G, Giovarelli M. Death receptor ligands in tumors. *J Immunother.* 2002;25(1):1-15.

Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 1992;360(6401):258-261.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med.* 1994; 180(4): 1263-1272.

Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood.* 1997; 90(4):1458-1470.

Cayabyab M, Phillips JH, Lanier LL. CD40 preferentially costimulates activation of CD4+ T lymphocytes. *J Immunol.* 1994;152(4):1523-1531.

Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(1):10-16.

Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med.* 1996; 183(1):283-287.

Cerundolo V, Hermans IF, Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol.* 2004;5(1):7-10.

Chang JW, Peng M, Vaquerano JE, Zhou YM, Clinton RA, Hyun WC, Giedlin MA, Leong SP. Induction of Th1 response by dendritic cells pulsed with autologous melanoma apoptotic bodies. *Anticancer Res.* 2000;20(3A):1329-1336.

Chapuis F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol.* 1997;27(2):431-441.

Coley WB. Contribution to the knowledge of sarcoma. *Ann Surg.* 1891;14:199–220.

Cook G, Campbell JD. Immune regulation in multiple myeloma: the host-tumour conflict. *Blood Rev.* 1999;13(3):151-162.

Cotten M, Langle-Rouault F, Kirlappos H, Wagner E, Mechtler K, Zenke M, Beug H, Birnstiel ML: Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(11):4033-4037.

Crick FH. The genetic code. *Sci Am.* 1966;215(4):55-60.

Crick FH. Central dogma of molecular biology. *Nature.* 1970;227(5258):561-563.

Curiel DT, Agarwal S, Wagner E, Cotten M: Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(19):8850-8854.

Daar SA, Fuggle SV, Hart DNJ. Demonstration and phenotypic characterization of HLA-DR-positive interstitial dendritic cells widely distributed in human connective tissues. *Transplant. Proceed.* 1983;1:311-314.

Dahlberg AE. The functional role of ribosomal RNA in protein synthesis. *Cell.* 1989; 57(4): 525-529.

Darnell JE Jr. The processing of RNA. *Sci Am.* 1983;249(4):90-100.

De Bruijn ML, Schuurhuis DH, Vierboom MP, Vermeulen H, de Cock KA, Ooms ME, Rensing ME, Toebe M, Franken KL, Drijfhout JW, Ottenhoff TH, Offringa R, Melief CJ. Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res.* 1998;58(4):724-731.

Deutscher MP. The metabolic role of RNases. *Trends Biochem Sci.* 1988;13(4):136-139.

Dickerson RE. Chemical evolution and the origin of life. *Sci Am.* 1978;239(3):70-86.

Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol.* 2000;1(2):119-126.

Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer*. 1999; 86: 2684-2682.

Dörfel D, Appel S, Grünebach F, Weck MM, Müller MR, Heine A, Brossart P. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro transcribed MUC1 RNA. *Blood*. 2004 Dec 23; [Epub ahead of print].

Dreger P, von Neuhoff N, Kuse R, Sonnen R, Glass B, Uharek L, Schoch R, Löffler H, Schmitz N. Early stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: a chance for cure? *Br J Cancer*. 1998;77:2291-2297.

Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-998.

Dustin ML, Springer TA. T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature*. 1989;341(6243):619-624.

Ehrlich P. The collected papers of Paul Ehrlich. Himmelweit F, editor. II. Pergamon Press, London;1957.

Faderl S, Thomas DA, O'Brien S, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Giles FJ, Koller C, Ferrajoli A, Verstovsek S, Pro B, Andreeff M, Beran M, Cortes J, Wierda W, Tran N, Keating MJ. Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. *Blood*. 2003;101(9):3413-3415.

Falk K, Rotzschke O, Stevanovic S, Jung G, Rammensee HG. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*. 1991;351(6324):290-296.

Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med*. 2004;10(5):475-480.

Fisch P, Kohler G, Garbe A, Herbst B, Wider D, Kohler H, Schaefer HE, Mertelsmann R, Brugger W, Kanz L. Generation of antigen-presenting cells for soluble protein antigens ex vivo from peripheral blood CD34+ hematopoietic progenitor cells in cancer patients. *Eur J Immunol.* 1996;26(3):595-600.

Flechsler I, Surovoy A, Charisse K, Bayer E, Jung G. Comparison of antisense vectors and antisense oligonucleotides delivered by means of the new cationic lipids unifactin and maxifactin. *Adv Exp Med Biol.* 1998;451:469-472.

Fraser JD, Irving BA, Crabtree GR, Weiss A. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science.* 1991;251(4991):313-316.

Frassanito MA, Silvestris F, Silvestris N, Cafforio P, Camarda G, Iodice G, Dammacco F. Fas/Fas ligand (FasL)-deregulated apoptosis and IL-6 insensitivity in highly malignant myeloma cells. *Clin Exp Immunol.* 1998;114(2):179-188.

Frassanito MA, Cusmai A, Dammacco F. Deregulated cytokine network and defective Th1 immune response in multiple myeloma. *Clin Exp Immunol.* 2001;125(2):190-197.

Gilboa E, Nair SK, Lyerly HK. Immunotherapy of cancer with dendritic-cell-based vaccines. *Cancer Immunol Immunother.* 1998;46(2):82-87.

Gribben JG. Bone marrow transplantation for low-grade B-cell malignancies. *Curr Opin Oncol.* 1997;9:117-121.

Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma delta T cells. *Science.* 1998;279 (5357):1737-1740.

Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(12):6879-6884.

Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8alpha beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* 2001;2(3):255-260.

Grünebach F, Muller MR, Brossart P. New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother.* 2005 Jan 27; [Epub ahead of print].

Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood.* 1994;84(10):3261-3282.

Guthrie C, Patterson B. Spliceosomal snRNAs.. *Annu Rev Genet.* 1988;22:387-419.

Hahn WC, Rosenstein Y, Calvo V, Burakoff SJ, Bierer BE. A distinct cytoplasmic domain of CD2 regulates ligand avidity and T-cell responsiveness to antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(15):7179-7183.

Hale G, Dyer MJ, Clark MR, Phillips JM, Marcus R, Riechmann L, Winter G, Waldmann H. Remission induction in non-Hodgkin lymphoma with reshaped human monoclonal antibody CAMPATH-1H. *Lancet.* 1988;2:1394-1399.

Hancock WW, Atkins RC. Immunohistologic analysis of the cell surface antigens of human dendritic cells using monoclonal antibodies. *Transplant. Proceed.* 1984;16:963-970.

Hart DNJ, McKenzie JL. Isolation and characterization of human tonsil dendritic cells. *J Exp Med.* 1988;168:157-170.

Hart DNJ, Prickett TCR, McKenzie JL, Martin ML, Beard ME. Characterization of interstitial dendritic cells in human tissue. *Transplant. Proceed.* 1989;21:401-408.

Heiser A, Dahm P, Yancey DR, Maurice MA, Boczkowski D, Nair SK, Gilboa E, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses in vitro. *J Immunol.* 2000;164:5508–5514.

Heiser A, Maurice MA, Yancey DR, Wu NZ, Dahm P, Pruitt SK, Boczkowski D, Nair SK, Ballo MS, Gilboa E, Vieweg J. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol.* 2001;166:2953–2960.

Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice MA, Lallas CD, Dahm P, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors. *J Clin Invest.* 2002;109:409–417.

Herr W, Ranieri E, Olson W, Zarour H, Gesualdo L, Storkus WJ. Mature dendritic cells pulsed with freeze-thaw cell lysates define an effective in vitro vaccine designed to elicit EBV-specific CD4(+) and CD8(+) T lymphocyte responses. *Blood.* 2000;96:1857–1864.

Hellstrom KE, Gladstone P, Hellstrom I. Cancer vaccines: challenges and potential solutions. *Mol. Med. Today.* 1997;3:286-290.

Hoerr I, Obst R, Rammensee HG, Jung G. In vivo application of RNA leads to induction of specific cytotoxic T lymphocytes and antibodies. *Eur J Immunol.* 2000;30:1–7.

Humphrey T, Proudfoot NJ. A beginning to the biochemistry of polyadenylation. *Trends Genet.* 1988;4:223-245.

Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinman RM. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med.* 1998;188:2163–2173.

Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol.* 1961;3:318-356.

Kanto T, Kalinski P, Hunter OC, Lotze MT, Amoscato AA. Ceramide mediates tumor-induced dendritic cell apoptosis. *J Immunol.* 2001;167(7):3773-84.

Katz SI, Tamake K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature.* 1979;282:324-326.

Keating MJ. Fludarabine phosphate in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol.* 1990;17:49-62.

Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, Kantarjian H. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood*. 1998;92(4):1165-1171.

Khouri I, Champlin R. Allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia. *Ann Intern Med*. 1996;125(9):780.

Khouri IF, Keating M, Korbling M, Przepiorka D, Anderlini P, O'Brien S, Giralto S, Ippoliti C, von Wolff B, Gajewski J, Donato M, Claxton D, Ueno N, Andersson B, Gee A, Champlin R. Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *J Clin Oncol*. 1998;16(8):2817-2824.

Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, Wagner E. Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther*. 1997;4(5):409-418.

Kneitz C, Goller M, Wilhelm M, Mehringer C, Wohlleben G, Schimpl A, Tony HP. Inhibition of T cell/B cell interaction by B-CLL cells. *Leukemia*. 1999;13(1):98-104.

Kobayashi T, Yamanaka R, Homma J, Tsuchiya N, Yajima N, Yoshida S, Tanaka R. Tumor mRNA-loaded dendritic cells elicit tumor-specific CD8(+) cytotoxic T cells in patients with malignant glioma. *Cancer Immunol Immunother*. 2003;52:632-637.

Koh HK, Sober AJ, Harmon DC, Lew RA, Carey RW. Adjuvant therapy of cutaneous malignant melanoma: a critical review. *Med Pediatr Oncol*. 1985;13(5):244-260.

Krackhardt AM, Harig S, Witzens M, Broderick R, Barrett P, Gribben JG. T-cell responses against chronic lymphocytic leukemia cells: implications for immunotherapy. *Blood*. 2002; 100(1):167-173.

Krackhardt AM, Witzens M, Harig S, et al. Identification of tumor-associated antigens in chronic lymphocytic leukemia by SEREX. *Blood*. 2002; 100(6):2123-2131.

Lake JA. The ribosome. *Sci Am*. 1981;245(2):84-97.

Lanier LL. NK cell receptors. *Ann Rev Immunol*. 1998;16:359-393.

Lanzavecchia A. Receptor-mediated antigen uptake and its effect on antigen presentation to class II-restricted T lymphocytes. *Ann Rev Immunol.* 1993;8:773-777.

Larsen CP, Ritchie SC, Pearson TC. Functional expression of the costimulatory molecule B7/BB1 on murine dendritic cell populations. *J Exp Med.* 1992;176(4):1215-1220.

Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine.* 1999;18(9-10):765-777.

Li Y, Hellstrom KE, Newby SA, Chen L. Costimulation by CD48 and B7-1 induces immunity against poorly immunogenic tumors. *J Exp Med.* 1996;183:639-644.

Lich JD, Elliot JF, Blum JS. Cytoplasmic Processing Is a Prerequisite for Presentation of an Endogeneous Antigen by Major Histocompatibility Complex Class II Proteins. *J Exp Med.* 2000;191:1513-1523.

Littauer UZ, Soreq H. The regulatory function of poly(A) and adjacent 3' sequence in translated RNA. *Prog Nucleic Acid Res Biol.* 1982;27:53-83.

Liu MA, Fu TM, Donnelly JJ, Caulfield MJ, Ulmer JB. DNA vaccines. Mechanisms for generation of immune responses. *Adv Exp Med Biol.* 1998;452:187-191.

Lopez-Botet M, Llano M, Navarro F, Bellon T. NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol.* 2000;12(2):109-119.

Maniatis T, Reed R. The role of small ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. *Nature.* 1987;325:673-678.

Matutes E, Wechsler A, Gomez R, Cherchi M, Catovsky D. Unusual T-cell phenotype in advanced B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1981;49:635-642.

Matzinger P. An innate sense of danger. *Semin Immunol.* 1998;10(5):399-415.

Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, Sala R, Cerretti R, Mandelli F. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood.* 1999;94(2):448-454.

Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, Lotze MT. Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med.* 1995;1(12):1297-1302.

McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, Levy R, Czuczman MS, Williams ME, Heyman MR, Bence-Bruckler I, White CA, Cabanillas F, Jain V, Ho AD, Lister J, Wey K, Shen D, Dallaire BK. Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol.* 1998;16:2825-2833.

McLellan AD, Sorg RV, Williams LA. Human dendritic cells activate T lymphocytes via a CD40:CD40 ligand-dependant pathway. *Eur J Immunol.* 1996;26:1204-1211.

Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000;173:89-97.

Mehta J, Powles R, Singhal S, Iveson T, Treleaven J, Catovsky D. Clinical and hematologic response of chronic lymphocytic and prolymphocytic leukemia persisting after allogeneic bone marrow transplantation with the onset of acute graft-versus-host disease: possible role of graft-versus-leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17(3):371-375.

Mehta J, Powles R, Singhal S, Matthey F, Hamblin M, Middleton G, Prendiville J, Glynn P, Zomas A, Treleaven J, Catovsky D. T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation from a partially HLA-mismatched unrelated donor for progressive chronic lymphocytic leukemia and fludarabine-induced bone marrow failure. *Bone Marrow Transplant.* 1996;17:881-883.

Melief CJ, Offringa R, Toes RE, Kast WM. Peptide-based cancer vaccines. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:651-657.

Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, Rowlings PA, Deeg HJ, Gahrton G, Montserrat E, Rozman C, Gratwohl A, Gale RP. HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation and the International Bone Marrow Transplant Registry. *Ann Intern Med.* 1996;124(3):311-315.

Milazzo C, Reichardt VL, Müller MR, Grünebach F, Brossart P. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood*. 2003; 101: 977–982.

Möller P, Hämmerling GJ. The role of surface HLA-A,B,C molecules in tumor immunity. *Cancer Surv*. 1992;13:101-127.

Montserrat E. Rituximab in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol*. 2003; 30 (1 Suppl 2):34-39.

Moore PB. The ribosome returns. *Nature*. 1998;331:223-227.

Morse MA, Zhou LJ, Tedder TF, Lyerly HK, Smith C. Generation of dendritic cells in vitro from peripheral blood mononuclear cells with granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor, interleukin-4, and tumor necrosis factor-alpha for use in cancer immunotherapy. *Ann Surg*. 1997;226(1):6-16.

Morse MA, Nair SK, Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Deng Y, Boczkowski D, Proia A, Neidzwiecki D, Clavien PA, Hurwitz HI, Schlom J, Gilboa E, Lyerly HK. Immunotherapy with autologous, human dendritic cells transfected with carcinoembryonic antigen mRNA. *Cancer Invest*. 2003;21(3):341-349.

Mukherjee P, Dani A, Bhatia S, Singh N, Rudensky AY, George A, Bal V, Mayor S, Rath S. Efficient presentation of both cytosolic and endogenous transmembrane protein antigens on MHC class II is dependent on cytoplasmic proteolysis.. *J Immunol*. 2001;167:2632-2641.

Müller C, Ziegler A, Muller C, Hadam M, Waller HD, Wernet P, Müller G. Divergent expression of HLA-DC/MB, -DR, and -SB region products on normal and pathological tissues as detected by monoclonal antibodies. *Immunobiology*. 1985;169(3):228-249.

Müller, MR. RNA-Transfektion von dendritischen Zellen. Diplomarbeit. 2000.

Müller MR, Grünebach F, Nencioni A, Brossart P. Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J Immunol*. 2003;170:5892–5896.

Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming RI, Lyerly HK, Gilboa E. Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol.* 1998;16(4):364-369.

Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer.* 1999;82(1):121-124.

Nair SK, Heiser A, Boczkowski D, Majumdar A, Naoe M, Lebkowski JS, Vieweg J, Gilboa E. Induction of cytotoxic T cell responses and tumor immunity against unrelated tumors using telomerase reverse transcriptase RNA transfected dendritic cells. *Nat Med.* 2000;6:1011–1017.

Nair SK, Morse M, Boczkowski D, Cumming RI, Vasovic L, Gilboa E, Lyerly HK. Induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in cancer patients by autologous tumor RNA-transfected dendritic cells. *Ann Surg.* 2002;235:540–549.

Nestle FO, Aljagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 1998;4(3):328-332.

Nierhaus KH. Structure; function and assembly of ribosomes. *Curr Top Microbiol.* 1982;97: 81-155.

Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, Mautner J. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immun.* 2003;33:1250-1259.

Nirenberg M, Leder P. RNA code words and protein synthesis. *Science.* 1964; 145:1399-1407.

Noller HF. Structure of ribosomal RNA. *Ann Rev Biochem.* 1964;53:119-162.

O'Brien S, Del Giglio A, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1995;85(2):307-318.

Osterborg A, Fassas AS, Anagnostopoulos A, Dyer MJ, Catovsky D, Mellstedt H. Humanized CD52 monoclonal antibody Campath-1H as first-line treatment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol.* 1996;93(1):151-153.

Paczesny S, Banchereau J, Wittkowski KM, Saracino G, Fay J, Palucka AK. Expansion of melanoma-specific cytolytic CD8+ T cell precursors in patients with metastatic melanoma vaccinated with CD34+ progenitor-derived dendritic cells. *J Exp Med.* 2004;199(11):1503-1511.

Pardoll DM. Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Ann Rev Immunol.* 1995;13:399-415.

Pardoll DM. Cancer vaccines. *Nat Med.* 1998;4:525-531.

Pavletic ZS, Bierman PJ, Vose JM, Bishop MR, Wu CD, Pierson JL, Kollath JP, Weisenburger DD, Kessinger A, Armitage JO. High incidence of relapse after autologous stem-cell transplantation for B-cell chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma. *Ann Oncol.* 1998;9:1023-1026.

Peters JH, Xu H, Ruppert J, Ostermeider D, Friedrichs D, Gieseler RK. Signals required for differentiating dendritic cells from human monocytes in vitro. *Adv Exp Med Biol.* 1993; 329: 275-280.

Peters JH, Gieseler RK, Thiele B, Steinbach F. Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants. *Immunol Today.* 1996;17:273-275.

Ragnhammar P. Anti-tumoral effect of GM-CSF with or without cytokines and monoclonal antibodies in solid tumors. *Med Oncol.* 1996;13:167-176.

Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, Cooper MR, Mitchell BS, Stadtmauer EA, Santabarbara P, Wacker B, Brettman L. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *J Clin Oncol.* 2002;20:3891-3897.

Reid CDL, Fryer PR, Clifford C, Kirk A, Tikerpae J, Knight SC. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood.* 1990;76:1139-1146.

Romani N, Lenz A, Glassel H, Stossel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G. Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol.* 1989;93:600-608.

Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 1996;196(2):137-151.

Rondon G, Giralt S, Huh Y, Khouri I, Andersson B, Andreeff M, Champlin R. Graft-versus-leukemia effect after allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1996;18(3):669-672.

Rossi E, Matutes E, Morilla R, Owusu-Ankomah K, Heffernan AM, Catovsky D. Zeta chain and CD28 are poorly expressed on T lymphocytes from chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia.* 1996;10(3):494-497.

Rotzschke O, Falk K, Deres K, Schild H, Norda M, Metzger J, Jung G, Rammensee HG. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature.* 1990;348(6298):252-254.

Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood.* 2003;102(4):1389-1396.

Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin-4 and downregulated by tumor necrosis factor. *J Exp Med.* 1994;179:1109-1118.

Schimmel PR. Aminoacyl tRNA synthetases: general scheme of structure-function relationships in the polypeptides and recognition of transfer RNAs. *Ann Rev Biochem.* 1987;56: 125-158.

Schmidt SM, Schag K, Muller MR, Weck MM, Appel S, Kanz L, Grunebach F, Brossart P. Survivin is a shared tumor associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T-cells. *Blood.* 2003;102(2):571-576.

Schopf, JW. The evolution of the earliest cells. *Sci Am.* 1978;239(3):110-138.

Scott-Taylor TH, Pettengell R, Clarke I, Stuhler G, La Barthe MC, Walden P, Dalgleish AG. Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1500:265–279.

Sharp PA. Splicing of messenger RNA precursors. *Science*. 1987;235:766-771.

Schwartz RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*. 1990;248:1349-1353.

Shaif-Muthana M, McIntyre C, Sisley K, Rennie I, Murray A. Dead or alive: immunogenicity of human melanoma cells when presented by dendritic cells. *Cancer Res*. 2000;60:6441–6447.

Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD: IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001;410(6832):1107-1111.

Shimizu Y, van Seventer G, Horgan KJ, Shaw S. Roles of adhesion molecules in T-cell recognition: fundamental similarities between four integrins on resting human T cells (LFA-1, VLA-4, VLA-5, VLA-6) in expression, binding and co-stimulation. *Immunol Rev*. 1990;114:109-143.

Skinnider LF, Tan L, Schmidt J, Armitage G. Chronic lymphocytic leukemia. A review of 745 cases and assessment of clinical staging. *Cancer*. 1982;50:2951-2955.

Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol*. 2001;2(4):293-299.

Sorensen JM, Vena DA, Fallavollita A, Chun HG, Cheson BD. Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow-up report. *J Clin Oncol*. 1997;15:458-465.

Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J Exp Med*. 1973;137:1142-1147.

Steinle A, Groh V, Spies T. Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(21):12510-12515.

Steitz JA. „Snurps“. *Sci Am*. 1988;258(6):56-63.

Storch E, Kirchner H, Schirmacher V. Prolongation of survival of mice bearing the Eb and Esb lymphoma by treatment with interferon inducers alone or in combination with *Corynebacterium parvum*. *Cancer Immunol Immunother*. 1986;23(3):179-184.

Strobel I, Berchtold S, Gotze A, Schulze U, Schuler G, Steinkasserer A. 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;7:2028–2035.

Su Z, Vieweg J, Weizer AZ, Dahm P, Yancey D, Turaga V, Higgins J, Boczkowski D, Gilboa E, Dannull J. Enhanced induction of telomerase-specific CD4(+) T cells using dendritic cells transfected with RNA encoding a chimeric gene product. *Cancer Res*. 2000; 62:5041–5048.

Su Z, Dannull J, Heiser A, Yancey D, Pruitt S, Madden J, Coleman D, Niedzwiecki D, Gilboa E, Vieweg J. Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritic cells. *Cancer Res*. 2003;63:2127–2133.

Surovoy A, Flechsler I, Jung G. A novel series of serum-resistant lipoaminoacid compounds for cellular delivery of plasmid DNA. *Adv Exp Med Biol*. 1998;451:461-467.

Sutton L, Maloum K, Gonzalez H, Zouabi H, Azar N, Boccaccio C, Charlotte F, Cosset JM, Gabarre J, Leblond V, Merle-Beral H, Binet JL. Autologous hematopoietic stem cell transplantation as salvage treatment for advanced B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 1998;12(11):1699-1707.

Tada T, Ohzeki S, Utsumi K, Takiuchi H, Muramatsu M, Li XF, Shimizu J, Fujiwara H, Hamaoka T. Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *J Immunol*. 1991;146:1077-1082.

Thomas L. *Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States* (editor Lawrence HS), Hoeber-Harper, New York, 1959. pp. 529-532.

Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den DP, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. 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;190:1669-1678.

Thornburg C, Boczkowski D, Gilboa E, Nair SK. Induction of cytotoxic T lymphocytes with dendritic cells transfected with human papillomavirus E6 and E7 RNA: implications for cervical cancer immunotherapy. *J Immunother*. 2000;23:412-418.

Torre Amnion G, Beauchamp RD, Koeppen H, Park BH, Schreiber H, Moses HL, Rowley DA. A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:1486-1490.

Ueno H, Tcherepanova I, Reygrobellet O, Laughner E, Ventura C, Palucka AK, Banchereau J. Dendritic cell subsets generated from CD34(+) hematopoietic progenitors can be transfected with mRNA and induce antigen-specific cytotoxic T cell responses. *J Immunol Methods*. 2004;285:171-180.

Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. 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;98:49-56.

Vedel J, Vincendeau P, Beziau JH. Flow cytometry analysis of the adhesion molecules on human Langerhans cells. *Clin Exp Dermatol*. 1992;17:240-246.

Veenstra H, Jacobs P, Dowdle EB. Abnormal association between invariant chain and HLA class II alpha and beta chains in chronic lymphocytic leukemia. *Cell Immunol*. 1996;171(1):68-73.

Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;May;87(9):3410-3414.

Wagner E, Cotten M, Foisner R, Birnstiel ML. Transferrin-polycation-DNA complexes: the effect of polycations on the structure of the complex and DNA delivery to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(10):4255-4259.

Weissman D, Ni H, Scales D, Dude A, Capodici J, McGibney K, Abdool A, Isaacs SN, Cannon G, Kariko K. HIV gag mRNA transfection of dendritic cells (DC) delivers encoded antigen to MHC class I and II molecules, causes DC maturation, and induces a potent human in vitro primary immune response. *J Immunol*. 2000;165:4710–4717.

Wiemann B, Starnes CO. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol Ther*. 1994;64:529–64.

Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH: An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*. 1999;285(5428):730-732.

Young JW, Koulova L, Soergel SA, Clark EA, Steinman RM, Dupont B. The B7/BB-1 antigen provides one of several co-stimulatory signals for the activation of CD4+ T lymphocytes by human blood DC in vitro. *J Clin Invest*. 1992;90:229-237.

Young JW, Steinman RM. The hematopoietic development of dendritic cells: a distinct pathway for myeloid differentiation. *Stem Cells*. 1996;14:376-387.

Zenke M, Steinlein P, Wagner E, Cotten M, Beug H, Birnstiel ML. Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87(10):3655-3659.

Zhou,LJ, Tedder TF. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:2588-2565.

8 Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Rammensee bedanke mich ganz herzlich für die Vertretung dieser Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie sowie für viele wertvolle, ermutigende Anregungen und Ratschläge während ihrer Anfertigung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Brossart für die Überlassung des interessanten Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die stets kompetente Betreuung während der Anfertigung dieser Arbeit.

Ebenso zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn Dr. Frank Grünebach für die Einarbeitung in einen Großteil der bei der Erstellung dieser Arbeit angewendeten Methoden sowie für die wissenschaftliche Mitbetreuung.

Herrn Prof. Dr. Jung vom Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen danke ich ganz herzlich für das Zurverfügungstellen der Transfektionsreagenzien Unifectin und Unifectin M, welche in seinem Labor entwickelt wurden.

Bei Herrn Prof. Dr. Berneman von Institut für Experimentelle Hämatologie der Universität Antwerpen bedanke ich mich herzlich für das Überlassen des Plasmids pSP64 poly(A)EGFP_{II}.

Herrn Prof. Dr. Stevanovic danke ich herzlich für die Versorgung mit Blockierungsantikörpern und Peptiden.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Cand. med. Garyfalia Tsakou für die exzellente Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Stefan Wirths danke ich für viele wertvolle Diskussionen zu später Stunde im Labor sowie für die Zurverfügungstellung seiner Virtuosität am Computer sowie am Durchflußzytometer.

Bei Herrn Dr. Alessio Nencioni bedanke ich mich für viele wertvolle Tips während der Anfertigung dieser Arbeit.

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Frau Cand. med. Susanne M. Schmidt für ihre kontinuierliche Unterstützung.

Bei Frau Dr. Silke Appel und Herrn Dipl. Biochem. Markus Weck bedanke ich mich herzlich für viele praktische Anregungen und motivierende Gespräche.

Bei Sylvia Stephan, Brunhilde Schuster, Regina Heselmeier und Tina Hörnle bedanke ich mich herzlich für die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente.

Mein Dank gilt darüberhinaus allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Immuntherapie für das gute Arbeitsklima im Labor.

9 Liste der akademischen Lehrer

Prof. Dr. Jürgen Aplitz (Pädiatrie), Prof. Dr. Ernst Bayer (Organische Chemie), Prof. Dr. Horst-Dieter Becker (Chirurgie), Prof. Dr. Karl-Horst Bichler (Urologie), Prof. Dr. Niels Birbaumer (Medizinische Psychologie), Prof. Dr. Hans Bisswanger (Biochemie), Prof. Dr. Peter Bohley (Biochemie), PD Dr. Peter Brossart (Immunologie), Prof. Dr. Wolfram Brugger (Innere Medizin), Prof. Dr. Gerhard Buchkremer (Psychiatrie), Prof. Dr. Burkard Bültmann (Pathologie), Prof. Dr. Richard Champlin (Innere Medizin), Prof. Dr. Johannes Dichgans (Neurologie), Prof. Dr. Klaus Dietz (Biometrie), Prof. Dr. Karl Eisele (Biochemie), Prof. Dr. Gary Fleisher (Pädiatrie), Prof. Dr. Günter Gauglitz (Physikalische Chemie), Prof. Dr. Rolf Gebhardt (Biochemie), Prof. Dr. Michael Gregor (Innere Medizin), Prof. Dr. Holcombe Grier (Pädiatrie), Prof. Dr. Ernst Grote (Neurochirurgie), Prof. Dr. Günter Häfelinger (Organische Chemie), Prof. Dr. Hans-Ulrich Häring (Innere Medizin), Prof. Dr. Fredrick Hagemeister (Innere Medizin), Prof. Dr. Hanspaul Hagenmaier (Organische Chemie), Prof. Dr. Bernd Hamprecht (Biochemie), Prof. Dr. Michael Hanack (Organische Chemie), Prof. Dr. Hans Hirsch (Gynäkologie), Prof. Dr. Steven Itzkowitz (Innere Medizin), Prof. Dr. Gerhard Jahn (Medizinische Virologie), Prof. Dr. Günther Jung (Organische Chemie), Prof. Dr. Edwin Kaiserling (Pathologie), Prof. Dr. Lothar Kanz (Innere Medizin), Prof. Dr. Franz Konrad (Anästhesiologie und Intensivmedizin), Prof. Dr. Krägeloh-Mann (Pädiatrie), Prof. Dr. Wolfgang Küsswetter (Orthopädie), Prof. Dr. Florian Lang (Physiologie), Prof. Dr. Wolfgang Larbig (Medizinische Psychologie), Prof. Dr. Ekkehard Lindner (Anorganische Chemie), Prof. Dr. Dieter Mecke (Biochemie), Prof. Dr. Werner Nakel (Physik), Prof. Dr. Gerhard Niemann (Pädiatrie), Prof. Dr. Dietrich Niethammer (Pädiatrie), Prof. Dr. Helga Ninnemann (Chemische Pflanzenphysiologie), Prof. Dr. Heinz Oberhammer (Physikalische Chemie), Prof. Dr. Hartmut Oßwald (Pharmakologie), Prof. Dr. Antonio Perez-Atayde (Pathologie), Prof. Dr. Wolfgang Pfeiffer (Zoologie), Prof. Dr. Hansgeorg Probst (Biochemie), Prof. Dr. Ulrich Quast (Pharmakologie), Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee (Immunologie), Prof. Dr. Gernot Rassner (Dermatologie), Prof. Dr. Klaus Reutter (Anatomie), Prof. Dr. Martin Schöning (Pädiatrie), Prof. Dr. Paul Schweizer (Kinderchirurgie), Prof. Dr. Ludger Seipel (Innere Medizin), PD Dr. Karlheinz Seitz (Innere Medizin), Prof. Dr. Stefan Sell (Orthopädie), Prof. Dr. Stefan Stevanovič (Immunologie), Prof. Dr. Joachim Strähle (Anorganische Chemie), Prof. Dr. Klaus Unertl (Anästhesiologie und Intensivmedizin), Prof. Dr. Wolfgang Voelter (Physikalische Biochemie), Prof. Dr. Hans-Joachim Wagner (Anatomie), Prof. Dr. Diethelm Wallwiener (Gynäkologie), Prof. Dr. Klaus Wegmann (Botanik), Prof. Dr. Horst-Dieter Wehner (Gerichtsmedizin), Prof. Dr. Herbert Werner (Medizinische Mikrobiologie), Prof. Dr. Ulrich Weser (Anorganische Biochemie), Prof. Dr. Hans-Peter Zenner (HNO), Prof. Dr. Gerhard Ziemer (HTG-Chirurgie), Prof. Dr. Eberhard Zrenner (Augenheilkunde).

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Martin Rudolf Müller
Geburtsdatum: 13. Oktober 1971
Geburtsort: Sigmaringen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

09/1978-06/1982 Grundschole in Sigmaringendorf-Laucherthal
08/1982-06/1988 Hohenzollerngymnasium in Sigmaringen
08/1988-07/1989 Austauschschüler in Minneapolis, Minnesota, USA
Besuch einer Privatschule (The Blake School, Minneapolis)
06/1989 Erwerb der amerikanischen Hochschulzugangsberechtigung
09/1989-06/1992 Besuch der gymnasialen Oberstufe am Hohenzollern-
gymnasium in Sigmaringen
06/1992 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst:

07/1992-06/1993 Wehrdienst beim Sanitätsbataillon 10 in Horb a. N. und beim
Instandsetzungsbataillon 10 in Sigmaringen

Hochschulausbildung:

10/1993 Beginn des Studiums der Physiologischen Chemie und
Biochemie an der Universität Tübingen
10/1994 Erster Teil der Diplomvorprüfung in den Fächern Anatomie,
Physik, Botanik und Zoologie
Zusätzliche Immatrikulation für das Studienfach Humanmedizin
05/1996 Zweiter Teil der Diplomvorprüfung in den Fächern Anorganische
Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie und
Biochemie
08/1996 Ärztliche Vorprüfung
03/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/1999 Diplomhauptprüfung in den Fächern Organische Chemie,
Biochemie und Immunologie

06/1999-02/2000 Diplomarbeit „RNA-Transfektion von dendritischen Zellen“
Betreuung durch Prof. Dr. Rammensee, Interfakultäres
Institut für Zellbiologie der Universität Tübingen, Abteilung
Immunologie, sowie durch Prof. Dr. Brugger und PD Dr. Brossart,
Medizinische Klinik der Universität Tübingen, Abteilung für
Hämatologie, Onkologie, Immunologie und Rheumatologie

Seit 03/2000 Anfertigung der vorliegenden Dissertation unter Betreuung von
Prof. Dr. Rammensee und PD Dr. Brossart

09/2000 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

10/2000-09/2001 Praktisches Jahr

 Pädiatrie:
 Harvard Medical School
 Children´s Hospital
 Boston, Massachusetts, USA

 Innere Medizin:
 The University of Texas MD Anderson Cancer Center
 Houston, Texas, USA
 Mount Sinai School of Medicine
 Mount Sinai Hospital
 New York City, New York, USA

 Chirurgie:
 Kreiskrankenhaus Sigmaringen

03/2001 United States Medical License Examination Part I

05/2001 United States Medical License Examination Part II

11/2001 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

12/2001-05/2003 Arzt im Praktikum an der Medizinischen Klinik der Universität
Tübingen, Abteilung für Hämatologie, Onkologie, Immunologie
und Rheumatologie (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. Kanz)

Seit 06/2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in o.g. Abteilung

08/2004 Promotion zum Dr. med. mit der Arbeit „Induktion von CD4- und
CD8-vermittelten T-Zellantworten gegen Mammakarzinomzellen
mit RNA-transfizierten dendritischen Zellen und Untersuchungen
zur Immundominanz der präsentierten T-Zellepitope“
(Betreuung durch PD Dr. Brossart)

11 Publikationsverzeichnis

Grünebach F*, Kayser K*, Weck MM, **Müller MR**, Appel S, Brossart P. Cotransfection of dendritic cells with RNA coding for HER-2/neu and 4-1BBL increases the induction of tumor antigen specific cytotoxic T Lymphocytes. *Cancer Gene Ther.* 2005, in press.

Grünebach F, **Müller MR**, Brossart P. New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. *Cancer Immunol Immunother.* 2005;54(6):517 - 525.

Dörfel D*, Appel S*, Grünebach F, Weck MM, **Müller MR**, Heine A, Brossart P. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro transcribed MUC1 RNA. *Blood.* 2005;105:3199 - 3205.

Grünebach F, **Müller MR**, Brossart P. RNA transfection of dendritic cells. *Methods Mol Med.* 2005;109:47-54.

Schag K*, Schmidt SM*, **Müller MR**, Weinschenk T, Appel S, Weck MM, Grünebach F, Stevanovic S, Rammensee HG, Brossart P. Identification of C-met oncogene as a broadly expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T-lymphocytes. *Clin Cancer Res.* 2004;10(11):3658-3666.

Schmidt SM, Schag K, **Müller MR**, Weinschenk T, Appel S, Schoor O, Weck MM, Grünebach F, Kanz L, Stevanovic S, Rammensee HG, Brossart P. Induction of adipophilin-specific cytotoxic T lymphocytes using a novel HLA-A2-binding peptide that mediates tumor cell lysis. *Cancer Res.* 2004;64(3):1164-1170.

Müller MR*, Tsakou G*, Grünebach F, Schmidt SM, Brossart P. Induction of chronic lymphocytic leukemia (CLL)-specific CD4- and CD8-mediated T-cell responses using RNA-transfected dendritic cells. *Blood.* 2004;103(5):1763-1769.

Appel S*, Boehmler AM*, Grünebach F, **Müller MR**, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brümmendorf TH, Brossart P. Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood.* 2004;103(2):538-544.

Müller MR*, Grünebach F*, Kayser K, Vogel W, Nencioni A, Brugger W, Kanz L, Brossart P. Expression of her-2/neu on acute lymphoblastic leukemias: implications for the development of immunotherapeutic approaches. *Clin Cancer Res.* 2003;9(9):3448-3453.

Müller MR*, Grünebach F*, Nencioni A, Brossart P. Transfection of dendritic cells with RNA induces CD4- and CD8-mediated T cell immunity against breast carcinomas and reveals the immunodominance of presented T cell epitopes. *J Immunol.* 2003;170(12):5892-5896.

Nencioni A*, **Müller MR***, Grünebach F*, Garuti A, Mingari MC, Patrone F, Ballestrero A, Brossart P. Dendritic cells transfected with tumor RNA for the induction of antitumor CTL in colorectal cancer. *Cancer Gene Ther.* 2003;10(3):209-214.

Grünebach F*, **Müller MR***, Nencioni A, Brossart P. Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes. *Gene Ther.* 2003;10(5):367-74.

Schmidt SM, Schag K, **Müller MR**, Weck MM, Appel S, Kanz L, Grünebach F, Brossart P. Survivin is a shared tumor-associated antigen expressed in a broad variety of malignancies and recognized by specific cytotoxic T cells. *Blood.* 2003;102(2):571-576.

Milazzo C*, Reichardt VL*, **Müller MR**, Grünebach F, Brossart P. Induction of myeloma-specific cytotoxic T cells using dendritic cells transfected with tumor-derived RNA. *Blood.* 2003;101(3):977-982.

Müller MR, Brossart P. Dendritic cell-based cancer immunotherapy. *Mod Asp Immunobiol.* 2002; 2(3):141-144.

* Gleichberichtigte Erstautorenschaft (contributed equally)