

Boten-RNA-Transfektion in periphere mononukleäre
Blutzellen zur Induktion einer Gedächtnis-Immunantwort
in vitro

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Regina Teufel

aus Sindelfingen

Tübingen

2010

Tag der mündlichen Qualifikation: 08.03.2011

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

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

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Stevanovic

1. Einleitung	1
1.1. Immunologie	1
1.2. Das Immunsystem	2
1.2.1. Das angeborene Immunsystem	2
1.2.2. Das adaptive Immunsystem	3
1.2.3. Blutzellen	3
1.2.4. Antigenpräsentierende Zellen (APC)	10
1.3. RNA	14
1.3.1. Nukleinsäuren	14
1.3.2. Biologische Bedeutung der RNA	16
1.3.3. Eigenschaften der RNA	17
1.3.4. Synthese der RNA	17
1.4. Nukleinsäuren-basierte Impfstoffe	23
1.4.1. Therapeutische Anwendung von RNA	24
1.4.2. Immuntherapie mit mRNA	26
1.4.3. DCs und RNA	31
1.4.4. Die Immunologie der mRNA-Vakzine	34
1.5. Zielsetzung	37

2. Material	39
2.1. Geräte	39
2.2. Chemikalien und Biochemikalien	42
2.3. Tumorzelllinien	43
2.4. Zytokine	43
2.5. messenger RNA	44
2.5.1. RNactive®	44
2.5.2. Stabilisierte PUREmessenger™ RNA	45
2.6. Peptide	45
2.7. Antikörper	46
2.8. Kits	46
2.9. Puffer und Lösungen	47
2.9.1. Zellbiologie	47
2.9.2. Molekularbiologie	50
3. Methoden	51
3.1. Zellbiologische Methoden	51
3.1.1. Kultivierung von Tumorzellen	51
3.1.2. Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs)	51
3.1.3. Bestimmung der Zellzahl	52
3.1.4. Generierung von dendritischen Zellen aus PBMCs	52

Inhaltsverzeichnis

3.1.5.	Einfrieren von PBMCs	52
3.1.6.	Auftauen von PBMCs	53
3.1.7.	MACS [®] (magnetic cell sorting)	53
3.1.8.	CTL-Induktion mit mRNA-transfizierten Zellen	54
3.1.9.	CFSE-Markierung von PBMCs	55
3.1.10.	Test der Zellviabilität	56
3.1.11.	Intrazelluläre Zytokin-Färbung	57
3.1.12.	Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)	58
3.1.13.	Bestimmung der HBsAg-Konzentration im Zellkulturüberstand	59
3.1.14.	Messung der Luziferaseaktivität	59
3.1.15.	MHC-Klasse I-Tetramere	60
3.1.16.	Durchflusszytometrie	62
3.1.17.	Transfektion von mRNA	63
3.2.	Molekularbiologische Methoden	67
3.2.1.	Herstellung der mRNA	67
4.	Ergebnisse	71
4.1.	mRNA-Transfektion	71
4.1.1.	Test unterschiedlicher Transfektionsmethoden	71
4.2.	Untersuchung der transfizierten Zellpopulationen	79
4.2.1.	CTL-Kultur mit transfizierten Subpopulationen	79

Inhaltsverzeichnis

4.2.2.	Reportergenexpression in transfizierten PBMCs _____	80
4.3.	Optimierung der CTL-Kultur von elektroportierten PBMCs _____	82
4.3.1.	Test verschiedener Elektroporationsgeräte _____	82
4.3.2.	Vergleich verschiedener Aktivierungssignale der elektroportierten Zellen für die CTL-Kultur _____	85
4.3.3.	Vergleich der Elektroporation von frischen und aufgetauten PBMCs _____	87
4.4.	Können nur Gedächtnis-T-Zellen oder auch naive T-Zellen stimuliert werden? _____	89
4.5.	Untersuchung der Funktionalität der <i>in vitro</i> generierten CTLs _____	90
4.6.	Untersuchung der Viabilität der elektroportierten PBMCs _____	92
4.7.	Untersuchung der spezifischen Proliferation von T-Zellen nach Elektroporation mit mRNA _____	93
4.8.	Untersuchung der mRNA-Stabilität und Proteinexpression in unterschiedlichen Konstrukten _____	95
4.8.1.	Proteinexpression nach Elektroporation von BHK-Tumorzellen _____	97
4.8.2.	Proteinexpression nach Elektroporation von PBMCs _____	99
4.8.3.	Vergleich von GC-reicher und AG-reicher mRNA mit der Wildtyp-mRNA	103
5.	<i>Diskussion</i> _____	105
5.1.	RNA-Transfektion in Zellen _____	105
5.1.1.	Passive Pulsing _____	108
5.1.2.	Verwendung von PBMCs zur mRNA-Transfektion _____	109
5.2.	CD4+-T-Helferzellen bei der Tumorabwehr _____	111

5.3. mRNA-Stabilität	114
6. Lebenslauf	117
7. Publikationsverzeichnis	118

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AICD	<i>activation induced cell death</i> , aktivierungsinduzierter Zelltod
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APC	<i>Antigen presenting cell</i> , antigenpräsentierende Zellen
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BHK-21	<i>Babyhamster kidney cells</i> , Babyhamster-Nierenzellen
BSA	bovines Serumalbumin
C	<i>Capacitance</i> , Kapazität
CCR7	C-C-Chemokin-Rezeptor-7
CD	<i>cluster of differentiation</i> , Differenzierungsantigen
CFSE	5-6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
DC	dendritische Zelle(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleinacid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DriP	<i>defective ribosomal product</i>
Ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
F	Farad
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage-colony stimulating factor</i>
HBsAg	<i>Hepatitis-B surface antigen</i>
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure
HLA	humanes Leukozytenantigen
hnRNA	heteronukleäre RNA
i.d.	intradermal
i.p.	intraperitoneal

Abkürzungsverzeichnis

ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IL	Interleukin
LFA-1	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
NBT	Nitroblautetrazolium
NK	<i>Natural killer cells</i> , natürliche Killerzellen
OD	optische Dichte
PBMCs	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pDNA	Plasmid DNA
PE	Phycoerythrin
Poly I:C	<i>polyinosinic polycytidylic acid</i>
R	Resistance, Widerstand
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro minute
rRNA	ribosomale RNA
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
T	<i>Time</i> , Zeit
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
tRNA	Transfer-RNA
U	Spannung
V	Volt
W/v	Masse pro Volumen

Abkürzungsverzeichnis

W/w	Masse pro Masse
Ω	Ohm

1. Einleitung

1.1. Immunologie

Immunologie wird abgeleitet vom lateinischen Wort *immunis*. Was soviel heißt wie „Frei von Lasten“. Mit diesen Lasten konnte eine Steuer gemeint sein die Caesar auferlegt hatte, ein neues Gesetz oder eine Krankheit. Individuen werden als immun bezeichnet, wenn sie zwar mit dem Erreger infiziert sind, aber keine Krankheitssymptome zeigen.

Die Geschichte der Immunität beginnt 1796 mit der Entdeckung von Edward Jenner, dass Melkerinnen, die sich mit dem für den Menschen harmlos verlaufenden Kuhpockenvirus infiziert hatten, keine oder nur leichte Krankheitssymptome bei einer darauf folgenden Pockeninfektion zeigten. Daraufhin impfte er einen Jungen mit Gewebsflüssigkeit aus einer Pustel von einer mit Kuhpocken infizierten Melkerin und infizierte ihn daraufhin mit echten Pocken. Der Junge zeigte nur leichte Symptome einer Pockeninfektion. Edward Jenner gilt mit seiner Veröffentlichung „*An inquiry into the Causes and Effects of the Variolae Vaccinae*“ somit als Pionier der in der modernen Immunologie. Ihm war allerdings nicht bekannt, dass Infektionskrankheiten durch Mikroorganismen ausgelöst wurden. Dies wurde erst im 19. Jahrhundert von Robert Koch entdeckt. Ein weiterer Durchbruch stellte die Entdeckung der Antikörper im Jahre 1890 durch Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato (Nobelpreis für Medizin 1901) dar. Sie bezeichneten sie als Antitoxine und setzten sie zur Behandlung von Diphtherie ein. 1897 postulierte Paul Ehrlich, dass die Seitenketten auf der Oberfläche von phagozytierenden Zellen bakterielle Toxine binden und eliminieren können (Nobelpreis für Medizin 1908, zusammen mit Ilya Ilyich Mechnikov). Durch die Veröffentlichungen von Karl Landsteiner zur Struktur von Antigenen, wurde klar dass es eine fast unendlich große Anzahl von Strukturen geben muss die von Antikörpern erkannt werden können (Nobelpreis für Medizin 1930).

Anfang des 20. Jahrhunderts entwickelten sich zwei verschiedene Theorien: Die Humoralimmunologen (wie Paul Ehrlich und Emil von Behring) vertraten die Meinung, dass die Antitoxine für die Infektionsabwehr verantwortlich sind; die Zellularimmunologen (wie George Nuttall und Eli Metchnikoff) glaubten dass die

Immunabwehr auf zellulären Prozessen basiert. Wie sich später zeigen sollte, sind beide Aspekte gleichermaßen am Wirken des Immunsystems und an der Immunantwort beteiligt. 1937 wurden von Peter Gorer in Studien zur Transplantatabstoßung die H2-Antigene der Maus, und damit der erste Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC), entdeckt (Gorer, 1936). Ein weiterer Meilenstein stellte die Beschreibung der Theorie der klonalen Selektion als das zentrale Prinzip der adaptiven Immunität durch Burnet im Jahre 1956 dar (Nobelpreis für Medizin 1960) (Burnet, 1949). Ab den 60er Jahren des 20. Jahrhunderts wurden die Grundlagen der zellulären Immunologie aufgeklärt. Dieser Zeitpunkt wird somit als der Beginn der modernen Immunologie angesehen. So wurden z.B. die Differenzierung und Funktion von B- und T-Lymphozyten und die Struktur der Antikörper (Nobelpreis 1972 für Rodney Porter), sowie die MHC-Restriktion (Nobelpreis für Medizin 1996 für Zinkernagel und Doherty) (Zinkernagel und Doherty, 1974) entdeckt. 1985 wurden die Immunglobulin-Gene durch Tonegawa identifiziert (Nobelpreis für Medizin 1987) (Tonegawa et al., 1974).

1.2. Das Immunsystem

Jeder Organismus ist ständig mit körperfremden Einflüssen aus unserer Umwelt konfrontiert. Manche davon stellen eine Gefahr für die Gesundheit dar. Dazu gehört das Eindringen von Mikroorganismen wie Bakterien, Pilze, Viren und Parasiten sowie von fremden Proteinen (z.B. Prionen, Allergene). Diese werden vom Immunsystem erkannt und unschädlich gemacht. Das Immunsystem hat ebenso die Aufgabe entartete körpereigene Zellen (Tumorzellen) zu erkennen und zu eliminieren. Um dies effektiv zu gewährleisten hat sich in Vertebraten zusätzlich zur angeborenen Immunität das adaptive Immunsystem entwickelt.

1.2.1. Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt den phylogenetisch älteren Teil des Immunsystems dar. Es ist die erste Verteidigungslinie gegen Infektionen. Seine Wirksamkeit ist nicht von einem früheren Kontakt mit dem Erreger abhängig. Der angeborene Teil des Immunsystems ist die erste Barriere, welche pathogene Erreger überwinden müssen, um in den Körper zu gelangen bzw. um sich verbreiten zu können. Kann ein Erreger die Barriere, die durch die Haut und die Schleimhäute

gebildet wird überwinden, wird er durch phagozytierende Zellen wie neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen bekämpft. Zu den humoralen Faktoren, die die angeborene zelluläre Resistenz unterstützen, gehören Zytokine, Enzyme, Akute-Phase-Proteine sowie der alternative Weg der Komplementsystemaktivierung. Fremdkörper können agglutiniert werden, bakterizide und opsonierende Faktoren locken die Zellen der spezifischen Immunität zum Entzündungsherd.

1.2.2. Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem wird im Laufe des Lebens erworben und wird ständig angepasst. Es ist charakterisiert durch die Bildung von antigenspezifischen Gedächtniszellen, die eine schnellere und effektivere Immunantwort bei einer Reinfektion ermöglichen. Es gliedert sich in zwei Wirkmechanismen: die humorale und die zellvermittelte Immunität. Die humorale Immunität besteht in der Bildung von Antikörpern (Immunglobulinen) durch B-Lymphozyten. Die Antikörper zirkulieren sowohl im Blut als auch in anderen Körperflüssigkeiten. Sie binden spezifisch an Antigene und können so Viren und Toxine von Bakterien inaktivieren. Ihre Bindung an Mikroorganismen leitet eine Wirkungskaskade ein, die in deren Zerstörung resultiert.

Die zellvermittelte Immunität besteht in der Bildung von Zellen, die körperfremde Moleküle erkennen und durch Präsentation auf ihrer Oberfläche auf MHC-(*major histocompatibility complex*) Molekülen spezialisierte Zellen aktivieren. Diese „präsentierten“ Moleküle können durch T-Lymphozyten erkannt werden und die Zellen dann von diesen zerstört werden.

1.2.3. Blutzellen

Alle im Blut vorkommenden Zellen haben stammen von einer gemeinsamen Stammzelle im Knochenmark ab. Sie haben meist nur eine begrenzte Lebensdauer und müssen somit immer wieder neu gebildet werden. Die Blutzellen werden in Erythrozyten, die für den Sauerstoff- und Kohlendioxid-Transport im Blut verantwortlich sind, und Leukozyten, die für die Immunabwehr zuständig sind unterteilt. Im Blut sind zusätzlich Blutplättchen (Thrombozyten) zu finden. Diese sind

jedoch keine Zellen, sondern Zellfragmente, die bei der Blutgerinnung und Reparatur von Verletzungen eine Rolle spielen.

Die pluripotenten Stammzellen teilen sich und bilden Vorläuferzellen, die sich dann zu den unterschiedlichen Zellpopulationen ausdifferenzieren (Abbildung 1).

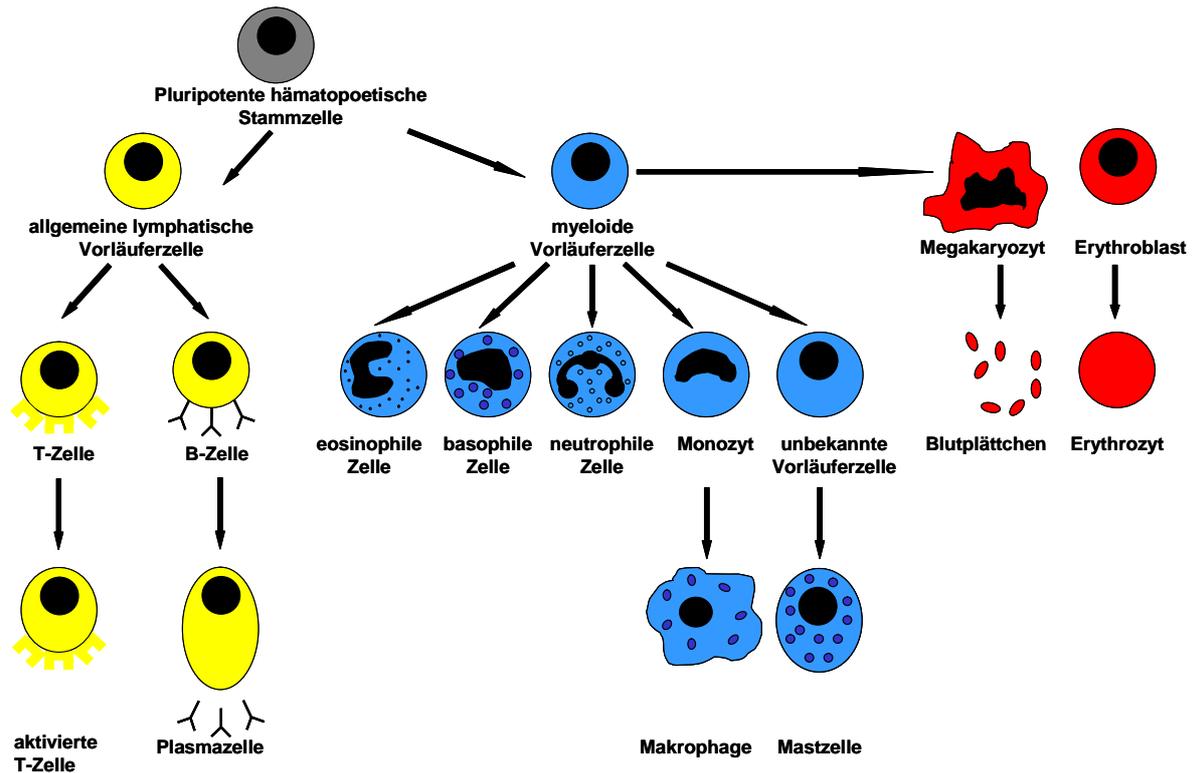


Abbildung 1 Entwicklung der Blutzellen.

Hämatopoetische Stammzellen im Knochenmark teilen sich in zwei verschiedene Arten von Stammzellen: allgemeine lymphatische Vorläuferzellen die sich zu T- und B-Lymphozyten entwickeln und myeloide Vorläuferzellen aus denen sich verschiedene Arten von Leukozyten und die Erythrozyten und die Megakaryozyten bilden. T- und B-Lymphozyten unterscheiden sich durch den Ort ihrer Differenzierung und durch ihre Antigenrezeptoren. So werden T-Lymphozyten im Thymus und B-Lymphozyten im Knochenmark ausdifferenziert. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entstehen Leukozyten, wie Monozyten, die basophilen, eosinophilen und neutrophilen Zellen. Diese Zellen werden als polymorphkernige Leukozyten oder Granulozyten bezeichnet. Die Monozyten können sich im Gewebe zu Makrophagen ausdifferenzieren, wo sie ihre phagozytierende Eigenschaft wahrnehmen. Die neutrophilen Zellen besitzen ebenso phagozytierende Eigenschaften. Sie verlassen das Blut jedoch nicht. Die eosinophilen Zellen befinden sich im Blut und sind an Entzündungsreaktionen beteiligt. Basophile Zellen ähneln den Mastzellen, stammen aber aus einer anderen Zelllinie. Mastzellen erfüllen ihre Funktion bei allergischen Reaktionen. Sie beenden ihre Entwicklung im Gewebe. (Abbildung nach (Janeway C.A. und Travers, 1997))

1.2.3.1. Lymphozyten

B-Lymphozyten

Die B-Zellen sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich. Ihre Reifung erfolgt im Knochenmark. Die Antikörper, die die Familie der Immunglobuline (Ig) bilden, stellen die sezernierte Form des B-Zell-Rezeptors dar. Die Funktion der Antikörper besteht darin das Molekül des Pathogens zu binden, das die Immunantwort ausgelöst hat, sowie Zellen oder das Komplementsystem zu aktivieren, die das Pathogen zerstören können wenn Antikörper daran gebunden haben.

Diese Funktionen sind innerhalb des Antikörpermoleküls strukturell voneinander getrennt. Alle Antikörpermoleküle bestehen aus vier Polypeptidketten; zwei leichten und zwei schweren Ketten. Die beiden schweren Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Jede leichte Kette ist ebenso über eine Disulfidbrücke mit einer schweren Kette verbunden. Man unterscheidet zwei verschiedene Typen von leichten Ketten: die Lambda (λ)-und die Kappa (κ)-Kette. Bei den schweren Ketten unterscheidet man fünf Isotypen, die die Funktion der Antikörpermoleküle bestimmen. Die Antikörper besitzen jeweils zwei Regionen. Die aminoterminalen Sequenzen sowohl der schweren, als auch der leichten Ketten unterscheiden sich erheblich voneinander. Sie bilden daher im Antikörpermolekül die variable Region, welche für die Bindung des spezifischen Antigens verantwortlich ist. Die carboxyterminalen Enden der leichten und schweren Ketten sind dagegen bei Immunglobulinketten des gleichen Isotyps konstant und bilden die konstante Region, die für die Funktion des Antikörpermoleküls verantwortlich ist. Man unterscheidet fünf Hauptisotypen der Antikörper: IgM, IgD, IgG, IgE und IgA. Der Subtyp der Immunglobuline wird durch die schwere Kette festgelegt. Die unterschiedlichen schweren Ketten werden mit den griechischen Buchstaben μ , δ , γ , ϵ und α bezeichnet. Die Vielfalt der V-Region der Ketten wird durch somatische Rekombination auf DNA-Ebene während der Entwicklung der B-Lymphozyten erreicht. So werden bei den leichten Ketten ein V-(*variable*) Gensegment und ein J-(*joining*) Gensegment miteinander verknüpft. Die durch ein separates Exon kodierte C-(*constant*) Region wird durch Spleißen mit dem J-Gensegment verknüpft. Bei den schweren Ketten besteht die V-Region aus einem V-, D-(*diversity*) und J-

Gensegment und ebenso einer C-Region. Die Gensegmente der variablen Regionen der Immunglobulinketten liegen in mehreren Kopien vor. Durch die Kombination dieser Segmente können viele verschiedene variable Regionen entstehen. Die Vielfalt der Antikörper wird zusätzlich durch die vielen Kombinationsmöglichkeiten von schweren und leichten Ketten erhöht. Diese kombinatorische Vielfalt könnte alleine schon theoretisch etwa $2,5 \times 10^6$ verschiedene Antikörpermoleküle hervorbringen. Diese Vielfalt wird durch zufälliges Einfügen von Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen der Gensegmente erhöht. Ein weiterer Mechanismus der zur Antikörpervielfalt beiträgt ist die somatische Hypermutation oder auch Affinitätsreifung genannt. Sie findet statt, wenn die B-Zelle durch Antigen und T-Helferzelle aktiviert wurde. Durch eine Ansammlung von Punktmutationen in den Sequenzen die für die V-Region kodieren, wird die Vielfalt der Antikörper zusätzlich erhöht.

T-Lymphozyten

T-Zellen sind spezifisch für Peptide, die von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden und tragen spezifische Rezeptoren, die T-Zell-Rezeptoren (TCR), die eine Bindung mit spezifischen Epitopen eingehen können. Sie unterscheiden sich von B-Zellen in mehreren Eigenschaften: Sie sind im Gegensatz zu B-Zellen auf Zellkontakte angewiesen; sie können Antigene nur dann erkennen, wenn sie an die Oberfläche von anderen Zellen gebunden sind; ihre Reifung erfolgt im Thymus.

Man unterscheidet zwei Klassen von T-Zellen: Zytotoxische T-Zellen (CTL) und T-Helferzellen (T_H).

T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche als Antigenrezeptor den T-Zell-Rezeptor. Er kommt nur membrangebunden vor und kann nicht sezerniert werden. Der T-Zell-Rezeptor ähnelt einem Fab-Fragment der Antikörper. Er besteht aus α - und β -Ketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Neben den $\alpha\beta$ -T-Zellen, existieren auch T-Zellen die auf ihrer Oberfläche $\gamma\delta$ -Heterodimere als T-Zell-Rezeptor tragen. Sie haben jedoch nur einen Anteil von 1-5% aller Lymphozyten im Blut. In den Epithelien jedoch stellen sie den Hauptanteil der Lymphozyten dar. Ihre Funktion ist bisher noch nicht vollständig aufgeklärt.

Jeder TCR verfügt über eine konstante (K-) und variable (V-) Region, wobei die V-Region die Antigenbindungsstelle darstellt. Die V-Region der α -Kette wird von ca. 100 V-(*variable*) und 50 J-(*joining*) Gensegmenten kodiert, die β -Kette von ca. 30 V-, zwei D-(*diversity*) und 50 J-Gensegmenten kodiert. Jeder TCR besteht aber aus jeweils nur einem dieser Gensegmente und entsteht durch somatische Rekombination während der Reifung der T-Zellen im Thymus. Der TCR ist auf der Oberfläche der Zelle mit anderen Molekülen assoziiert: mit dem mehrkettigen CD3 (*cluster of differentiation*)-Komplex, und je nach Differenzierung mit dem CD4- oder CD8-Molekül.

T-Zellen erkennen Antigene mit ihrem TCR nur, wenn sie ihnen auf einem MHC-Molekül präsentiert werden. Man unterscheidet zwei Arten von MHC: MHC-Klasse I-Moleküle (MHC I) sind auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden und binden Peptide aus 8-10 Aminosäuren, die von Proteinen stammen die im Zytosol abgebaut werden. Der MHC I-Peptid-Komplex auf der Oberfläche einer Zelle wird von zytotoxischen T-Zellen erkannt und die Zelle von dieser getötet. MHC I wird auch von Rezeptoren auf natürlichen Killerzellen erkannt, die daraufhin andere natürliche Killerzellen, NK-T-Zellen oder T-Zellen aktivieren oder inhibieren können. MHC-Klasse II-Moleküle (MHC II) findet man nur auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC), Zellen die durch Interferon- γ stimuliert wurden und aktivierten humanen T-Zellen. MHC-Klasse II präsentiert Peptide exogen aufgenommener Antigene, die in zellulären Vesikeln abgebaut werden. Die präsentierten Peptide weisen eine Länge von ca. 15 Aminosäuren auf. Der MHC-Klasse II-Peptid-Komplex wird von T-Helferzellen erkannt und kann diese aktivieren.

Die Gene die den MHC kodieren sind hochpolymorph. Eine T-Zelle kann ein Peptid nur dann erkennen, wenn es an eine bestimmte allele Form des MHC gebunden ist. Dies ist die so genannte MHC-Restriktion. Für die Entdeckung dieser MHC-Abhängigkeit des TCRs erhielten Rolf Zinkernagel und Peter Doherty 1996 den Nobelpreis.

Naive T-Zellen

Naive T-Zellen zirkulieren im Körper durch das Blut und wandern in den sogenannten postkapillären Venolen mit hohem Endothel in die Lymphknoten aus, in welchen sie mit den APCs in Kontakt treten. Über die efferenten Lymphgefäße gelangen sie wieder in den Blutkreislauf zurück. Erkennt eine naive T-Zelle ein Antigen auf einer antigenpräsentierenden Zelle, beendet sie ihre Wanderung und entwickelt sich zur Effektorzelle.

Naive T-Zellen tragen ein charakteristisches Muster an Oberflächenmarkern. So besitzen sie Rezeptoren wie z.B. L-Selektin (CD62L) und den Chemokinrezeptor 7 (CCR-7) (Butcher und Picker, 1996), die für das *Homing* in die Lymphknoten eine wichtige Funktion besitzen. Um mit antigenpräsentierenden Zellen interagieren zu können, exprimieren sie LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*) CD2 und ICAM-3 (*intracellular adhesion molecule 3*). Zur Kostimulation bei der Aktivierung durch APCs tragen sie das Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie CD28 auf ihrer Oberfläche. Das CD28 bindet an CD80 und CD86 auf der APC und liefert somit das zweite Signal zur Aktivierung der T-Zelle.

T-Effektorzellen

a. Zytotoxische T-Zellen

Zytotoxische T-Zellen (CTL) tragen auf ihrer Oberfläche den Korezeptor CD8. Sie haben die Aufgabe Zellen zu töten, die Antigenfragmente von zytosolischen Pathogenen an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden haben. Für diese Funktion produzieren die CTLs Zytotoxine (z.B. Perforine und Granzyme), die in lytischen Granula gespeichert werden. Erkennt sie eine infizierte Zielzelle, schüttet die Effektorzelle nach Reorganisation des Zytoskeletts zielgerichtet diese Zytotoxine aus.

b. T-Helferzellen

T-Helferzellen werden auch CD4⁺-T-Zellen genannt. Sie tragen auf ihrer Zellmembran den Korezeptor CD4 und erkennen Fragmente von Antigenen, die in Endosomen abgebaut wurden und an MHC-Klasse II-Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Es gibt zwei Subtypen von T-Helferzellen: T_H1-

Zellen und T_H2-Zellen. Welcher Subtyp sich während einer Immunantwort entwickelt, hängt von den produzierten Zytokinen ab. So wird eine T_H1-Antwort durch Anwesenheit von Interleukin-12, und eine T_H2-Antwort durch die Anwesenheit von Interleukin-4 und die Abwesenheit von Interleukin-12 (IL-12) gefördert.

- **T_H1-Zellen**

T_H1-Zellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen, die in Vesikeln eingeschlossen, von Makrophagen nicht abgetötet werden können und sich in diesen evtl. noch vermehren können. Die T_H1-Zellen können Makrophagen aktivieren um solche Pathogene zu eliminieren.

Peptide des Erregers werden auf den Makrophagen auf MHC II-Molekülen präsentiert. So kann eine naive T-Zelle aktiviert werden und sich zur T_H1-Zelle differenzieren. Die Aktivierung der T_H1-Zelle führt zur Sekretion von Interferon- γ (IFN- γ) und zur Expression des CD40-Liganden (CD40L). Dies aktiviert den Makrophagen die intrazellulären Bakterien zu zerstören. Die Expression des Fas-Liganden auf der Zellmembran führt zur Zerstörung von chronisch infizierten Makrophagen. Es werden somit Bakterien freigesetzt und von anderen Makrophagen aufgenommen und abgetötet. Das sekretierte Interleukin-2 (IL-2) aktiviert die T-Zell-Proliferation und steigert somit die Anzahl der Effektorzellen. Die Entstehung von neuen Makrophagen wird durch die Ausschüttung von GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) und IL-3 gefördert. Die Tumornekrosefaktoren (TNF)- α und - β machen die Epithelien durchlässig, so dass die Makrophagen ins Gewebe gelangen können. Der MCF (*macrophage chemotactic factor*) lockt neue Makrophagen an den Infektionsherd.

- **T_H2-Zellen**

T_H2-Zellen stellen die T-Zell-Hilfe zur Verfügung, die Bedingung für die Produktion spezifischer Antikörper ist. Die Polarisierung der Immunantwort in diese Richtung erfolgt, wenn bei der Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen IL-4, eventuell unterstützt von IL-6 vorhanden ist. Bei einer T_H2-Immunantwort wird von den Helferzellen vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 produziert.

Gedächtnis-T-Zellen

Wenn ein Pathogen aus dem Körper eliminiert wurde, sterben ungefähr 95% der spezifischen T-Zellen. Diese Zellen sterben durch aktivierungsinduzierten Zelltod (AICD, *activation induced cell death*), der vor allem in Leber und Milz stattfindet (Baumann et al., 2002, Green et al., 2003). Die überlebenden Zellen bilden das immunologische Gedächtnis. Nachdem die Infektion ausgeheilt ist, bleibt die Anzahl der CD8⁺-Gedächtniszellen relativ konstant (Murali-Krishna et al., 1998), während die Anzahl der CD4⁺-Gedächtniszellen ständig leicht abnimmt (Homann et al., 2001)

Gedächtnis-T-Zellen besitzen eine hohe Fähigkeit zur Proliferation, obwohl sie sehr lange in der Interphase der Zellteilung verharren. Im Gegensatz zu naiven T-Zellen können sie schneller durch Proliferation auf ein Antigen reagieren.

Man unterscheidet zwei Subpopulationen von Gedächtnis-T-Zellen:

Zentrale Gedächtniszellen besitzen eingeschränkte Effektorfunktion und wandern vor allem ins lymphatische Gewebe. Es wird angenommen, dass sich bei kurzer Stimulation des T-Zell-Antigenrezeptors und bei Abwesenheit von polarisierenden Zytokinen die entstehenden Gedächtniszellen zu zentralen Gedächtniszellen ausbilden. Sie exprimieren CD62-Ligand und CCR7 (C-C-Chemokin-Rezeptor-7) auf ihrer Zelloberfläche, was zur Diapedese in lymphatische Gewebe dient. Sie sekretieren bei *in vitro*-Stimulation IL-2, jedoch kein Interferon- γ , IL-4 und IL-5.

Effektor-Gedächtniszellen sind bereits zu T_H1- oder T_H2-Effektorzellen polarisiert, und können daher auch nicht ins lymphatische Gewebe einwandern. Sie exprimieren kein CD62-Ligand und kein CCR7 auf ihrer Zelloberfläche. Nach Stimulation *in vitro* sekretieren sie kein IL-2, jedoch Interferon- γ , IL-4 und IL-5 (Wahn, 2005).

1.2.4. Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Professionelle antigenpräsentierende Zellen präsentieren den zirkulierenden naiven T-Zellen Fragmente von Antigenen die sie in der Peripherie aufgenommen haben. So können die im Thymus gereiften naiven T-Zellen proliferieren (klonale Expansion) und sich zu bewaffneten Effektorzellen entwickeln. Um diese Entwicklung machen zu können benötigt eine naive T-Zelle zwei Aktivierungssignale. Das erste Signal ist die

Bindung des TCR mit seinen Korezeptoren CD4 und CD8 an einen Peptid:MHC-Komplex auf einer APC. Das zweite Signal zur Aktivierung ist eine Stimulation durch kostimulierende Moleküle auf APCs. Die am häufigsten untersuchten kostimulatorischen Moleküle werden CD80 und CD86 genannt. Sie binden an ihren Rezeptor CD28 auf der naiven T-Zelle und lösen die Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und dessen Rezeptor aus. IL-2 wirkt als autokrines Zytokin auf die Proliferation und Differenzierung zur Effektorzelle. Diese beiden Signale müssen von derselben Zelle übermittelt werden. Somit können nur APCs diese Aufgabe erfüllen, da nur sie die benötigten kostimulatorischen Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Dieser Mechanismus trägt dazu bei Autoimmunität zu verhindern. Autoreaktive T-Zellen können somit nicht durch eigenes Antigen aktiviert werden, das von Gewebszellen auf MHC präsentiert wird. Naive T-Zellen, die nur ein Signal von einem Peptid:MHC-Komplex erhalten, der Kostimulus aber fehlt, gehen in Anergie.

1.2.4.1. Makrophagen

Makrophagen sind die „Straßenkehrer des Körpers“. Sie besitzen eine Reihe von Rezeptoren, die Bestandteile von Bakterien erkennen. Dazu gehört der *scavenger* (Fress)-Rezeptor und der Mannoserezeptor. Die aufgenommenen Mikroorganismen werden in Endosomen und Lysosomen verdaut und auf MHC-Klasse II-Molekülen gebunden präsentiert. Durch die Rezeptoraktivierung werden die Makrophagen zu kostimulatorischer Aktivität angeregt und exprimieren mehr MHC-Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche.

1.2.4.2. B-Lymphozyten

Die Rezeptoren der B-Zellen sind membrangebundene monoklonale Antikörper. Diese können auch als lösliche Antikörper sezerniert werden. Über die Zelloberflächenimmunglobuline können lösliche Antigene, Toxine und Viren aufgenommen, prozessiert und dann an MHC-Moleküle gebunden naiven T-Zellen präsentiert werden. Die Antigenpräsentation von B-Zellen ist sehr effektiv, da sie eine gute Fähigkeit zur Antigenaufnahme besitzen und konstitutiv sehr viele MHC-Klasse II-Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Diese spezifische Antigenaufnahme führt zu einer B-Zell-Aktivierung und somit zu einer B-Zell-Antwort. Werden zusätzlich kostimulatorische Moleküle exprimiert, können naive T-Zellen aktiviert werden. B-

Zellen exprimieren die kostimulatorischen Moleküle nicht konstitutiv. Sie können jedoch durch mikrobielle Bestandteile dazu angeregt werden. B-Zellen sind aber auch in der Lage unspezifisch Antigen durch Endozytose oder Pinozytose aufzunehmen; d.h. ohne dass es an den membrangebundenen Antikörper bindet. Diese unspezifische Aufnahme führt jedoch nicht zu einer Aktivierung der B-Zell-Antwort.

1.2.4.3. Dendritische Zellen (DC)

Dendritische Zellen sind die potentesten antigenpräsentierenden Zellen. Sie wurden bereits 1864 von Langerhans entdeckt. Dieser ordnete ihnen jedoch eine Funktion als Nervenzellen der Haut zu. Erst 1973 erkannten Steinmann und Cohn, dass die dendritischen Zellen als antigenpräsentierende Zellen fungieren (Steinman und Cohn, 1973, Steinman et al., 1979). Die dendritischen Zellen sind eine heterogene Zellpopulation die aus hämatopoetischen Stammzellen (CD34⁺-Stammzellen) im Knochenmark hervorgeht. Sie besitzen lange zytoplasmatische Fortsätze, die ihnen eine Morphologie ähnlich von Nervenzellen verleihen. Diese Morphologie schafft eine große Zelloberfläche, die effektive Zell-Zell-Kontakte zu naiven Immunzellen und eine gute Aufnahmefähigkeit von Antigenen ermöglicht (Banchereau und Steinman, 1998). Daher auch die Namensgebung griech: *dendron* = Baum.

DCs sind die effektivsten Stimulatoren in einer allogenen gemischten Lymphozyten-Reaktion (*mixed leucocyte reaction*, MLR (Steinman und Inaba, 1985). Eine dendritische Zelle kann aufgrund der hohen Anzahl von MHC-Molekülen auf ihrer Oberfläche 100-3000 T-Zellen stimulieren. Diese Beobachtung ließ darauf schließen, dass dendritische Zellen APCs sind. Es wurde festgestellt, dass DCs B- und T-Zellen Antigene präsentieren und diese aktivieren (Steinman und Young, 1991).

Dendritische Zellen sind an den verschiedensten Stellen im Körper zu finden. So sind sie in den meisten peripheren Geweben, besonders in der Haut und der Mukosa, zu finden. Dort repräsentieren sie 1-2% der gesamten Zellen (Banchereau et al., 2000). Sie patroulieren durch das Blut, die peripheren Gewebe und die Organe des lymphatischen Systems. Im Gewebe können sie Antigene durch Makropinozytose, rezeptorvermittelte Endozytose und Phagozytose aufnehmen (sowohl Selbst-Antigene, als auch körperfremde Antigene). Die aufgenommenen Antigene werden

zu Peptiden prozessiert und auf MHC-Klasse I- und MHC-Klasse II-Molekülen auf der Oberfläche präsentiert. Periphere DCs können Antigene jedoch nur sehr ineffektiv präsentieren. Sie benötigen Signale von Pathogenen oder von Geweben die durch Pathogene geschädigt sind um zu reifen und damit zu potenten APCs zu werden und effektiv T-Zellen aktivieren zu können. Diese Reifungssignale, die von TLRs (*Toll-Like-Rezeptoren*) erkannt werden, können bakterielle Substanzen wie untermethylierte DNA, Flagellin und LPS (Lipopolysaccharid), Hyphen von Pilzen, virale Produkte wie doppelsträngige RNA (dsRNA), Zytokine, Moleküle auf T-Zellen (CD40-Ligand) und Moleküle von körpereigenen Zellen (Tumorzell-Lysate, Hitzeschockproteine) sein. Während der Reifung der DCs ist die Fähigkeit Antigen aufzunehmen verringert. Dagegen ist die Halbwertszeit der Peptid:MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche vergrößert. Ebenso werden vermehrt kostimulatorische Moleküle exprimiert und die Fähigkeit in die sekundären lymphatischen Organe zu wandern und dort T-Zellen zu aktivieren nimmt zu. Reife DCs sekretieren Zytokine (IL-12, IL-15, IL-18) die für die Entwicklung von zytotoxischen T-Lymphozyten und T-Helferzellen benötigt werden, sowie Chemokine (DC-CK) (Sallusto und Lanzavecchia, 1994, Banchereau und Steinman, 1998) die naive T-Zellen und Memory-T-Zellen anlocken.

Die Anzahl der zirkulierenden DCs ist sehr gering (<0,15% der mononukleären Zellen) (Steinman und Young, 1991). Für Immuntherapie werden jedoch größere Mengen benötigt. Es wurden deshalb mehrere Methoden entwickelt DCs *ex vivo* herzustellen. Als Ausgangsmaterialien können Knochenmark, Nabelschnurblut, Leukapherese-Produkte oder periphere mononucleäre Blutzellen (PBMCs) dienen. Die isolierten Blutzellen können dann depletiert oder angereichert werden. Für die *in vitro*-Generierung von DCs ist die Kultivierung der Zellen mit Zytokinen wie GM-CSF, SCF, IL-4 und TNF- α notwendig (Romani et al., 1996). Je nach der verwendeten Methode unterscheiden sich diese *ex vivo* generierten DCs in ihrem Phänotyp und in ihrer Funktion. Von Romani et al. wurde 1994 ein Protokoll veröffentlicht, welches die Herstellung von DCs aus PBMCs durch Kultivierung mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 beschreibt (Romani et al., 1996). Diese Methode bringt DCs hervor, die eine hohe MHC-Klasse I/II-Expression aufweisen, sowie die Oberflächenmarker CD1a, CD80, CD86, CD40 und CD54 aufweisen.

1.3. RNA

1.3.1. Nukleinsäuren

Alle Lebewesen haben die Gemeinsamkeit, dass DNA oder RNA die Träger ihrer Erbinformation sind. Diese Erbinformation wird in Proteine „übersetzt“, die die Lebensfunktionen der Organismen übernehmen. Die Informationsspeicherung und die Funktion werden von unterschiedlichen Molekülen erfüllt. Zum einen das Molekül DNA, das aus vier Standardnukleotiden besteht, und den Proteinen, die aus 20 Aminosäuren aufgebaut sind.

Heute wird davon ausgegangen, dass am Anfang des Lebens vor etwa 4,2 Milliarden Jahren nur RNA existierte. RNA ist eines der wenigen Moleküle, das Information speichern und katalytische Funktion übernehmen kann. In der RNA-Welt-Hypothese, die 1986 von Walter Gilbert aufgestellt wurde, wird davon ausgegangen, dass es zu Beginn des Lebens selbstreplizierende RNA-Moleküle gegeben hat, aus denen sich dann Ribozyme (RNA mit enzymatischer Aktivität) entwickelt haben, die in der Lage waren Proteine zu synthetisieren. Somit sind Enzyme (Proteine mit katalytischer Aktivität) in der Evolution erst nach den Ribozymen entstanden (Gilbert, 1986).

Die Geschichte der Nukleinsäuren geht bis auf das Jahr 1868 zurück, als der junge schweizer Wissenschaftler Friedrich Miescher (1844-1895) in der Küche des Tübinger Schlosses aus Zellkernen eine neue Substanz isolierte, die er Nukleinsäuren nannte. Alfred Hershey und Martha Chase konnten 1952 beweisen, dass diese als DNA bezeichnete Substanz für die Speicherung der genetischen Information verantwortlich ist. Im Jahre 1953 konnten James D. Watson und Francis Crick mittels Röntgenstrukturanalyse zeigen, dass die DNA in Form einer Doppelhelix vorliegt. Jede Kette besteht aus einer Kette von Nukleotiden, die durch Phosphodiesterbrücken zusammengehalten wird. Die Phosphatgruppen bilden dabei eine Brücke zwischen den OH-Gruppen zweier aufeinander folgender Zucker. Beide Ketten werden durch Wasserstoffbrücken, die jeweils zwischen einer Purin- und einer Pyrimidinbase ausgebildet werden, zusammengehalten. Einem Adenin steht dabei immer ein Thymin, einem Guanin ein Cytosin gegenüber. Zwischen Adenin und Thymin bilden sich zwei, zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrücken aus.

Die beiden Helices sind um eine gemeinsame Achse antiparallel umeinander gewunden.

Fast alle Zellen enthalten als informationstragende Moleküle DNA (Desoxyribonukleinsäure) und RNA (Ribonukleinsäure). Die DNA dient normalerweise als Speicher der genetischen Information. Gemäß dem zentralen Dogma der Molekularbiologie wird bei der Genexpression die in der DNA gespeicherte Information in RNA umgeschrieben (Transkription). Die RNA dient als Vorlage für die Proteinsynthese (Translation) (Abbildung 2). Früher gingen Wissenschaftler davon aus, dass die genetische Information nicht von der DNA zum Protein übertragen wird, da sich die DNA im Zellkern befindet, Proteine aber nur im Zytoplasma gebildet werden. Damals war nicht bekannt, dass die RNA als Zwischenträger fungiert. Durch radioaktive Markierung der RNA konnte festgestellt werden, dass die RNA zunächst im Zellkern gebildet wird und dann ins Zytoplasma transportiert wird.

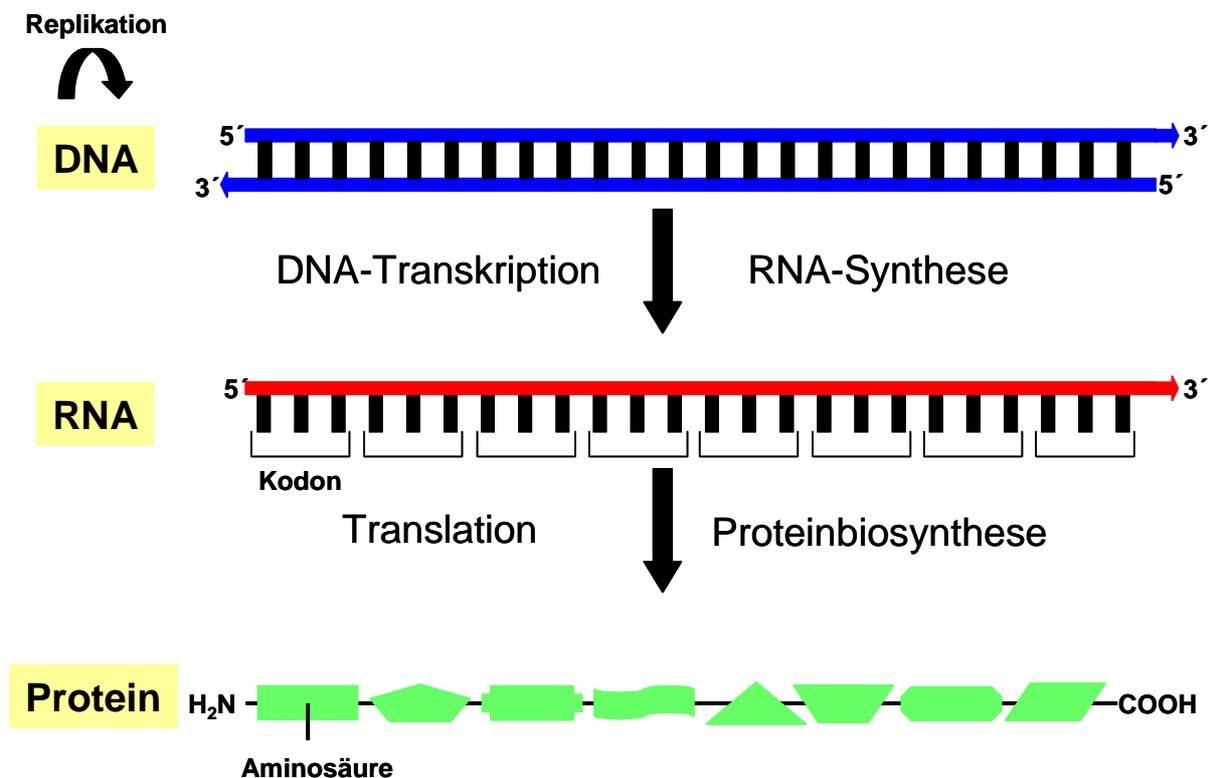


Abbildung 2 Zentrales Dogma der Molekularbiologie.

Die DNA trägt die Gesamtheit der genetischen Information in der Zelle. Durch ihre Replikation entstehen exakte Kopien. Durch die Transkription entsteht die „Gebrauchsform“ der genetischen Information, die messenger RNA. Im Zytosol werden aus ihr über den genetischen Kode die Proteine synthetisiert.

Die genetische Information liegt in einer Abfolge von Nukleotiden vor. Wovon immer drei ein Kodon bilden, das für eine bestimmte Aminosäure kodiert. Eine wichtige Eigenschaft des genetischen Codes ist seine Universalität. D.h. bestimmte Kodons stehen in den meisten Organismen für die gleiche Aminosäure. Ein zweites Merkmal ist seine Degeneration, was heißt, dass es für die meisten Aminosäuren mehrere synonyme Kodons gibt.

1.3.2. Biologische Bedeutung der RNA

Die RNA nimmt eine zentrale Rolle in allen biochemischen Prozessen ein. Sie besitzt die Aufgabe als Informationsüberträger (mRNA, *messenger* RNA), Adapter (tRNA, Transfer-RNA), Gerüstmolekül und Katalysator (tRNA und rRNA (ribosomale RNA)). Alle diese verschiedenen RNA-Moleküle sind an der Proteinbiosynthese beteiligt. Die genetische Information wird in *messenger* RNA transkribiert und zum Ribosom transportiert, an dem sie als Matrize für die Translation dient. Die Aminosäuren, die Bausteine der Proteine sind an tRNAs (Transfer-RNA) gebunden. tRNA sind kleine RNA-Moleküle aus 70-90 Nukleotiden, die mit ihrem Antikodon durch Basenpaarung bestimmte mRNA-Kodons erkennen. Die rRNA (ribosomale RNA) ist Bestandteil der Ribosomen. Sie stellt den größten Anteil der RNA in der Zelle. Sie wird im Nukleus durch Transkription aus DNA erzeugt und dort auch prozessiert und mit Proteinen zu Ribosomen-Untereinheiten zusammengebaut. snRNAs (*small nuclear* RNAs) sind am Spleißen der mRNA-Vorstufen beteiligt. Sie sind mit zahlreichen Proteinen zu Spleißosomen assoziiert. Micro RNAs (miRNA) sind hochkonservierte, nichtkodierende, kurze RNA-Moleküle (ca. 21 Nukleotide) die Expression von Genen auf der Stufe der Translation regulieren. Sie binden an teilweise komplementäre Sequenzen in der 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) von spezifischen mRNA und leiten die Degradierung dieser ein. miRNA werden als lange Primärtranskripte transkribiert, welches mehr als nur eine miRNA beinhalten kann. Diese Primärtranskripte werden im Nukleus zu einem oder mehreren Haarnadel-Vorläufer-Sequenzen prozessiert. Im Zytoplasma wird aus der Haarnadel-Sequenz durch das Enzym Dicer die reife miRNA.

1.3.3. Eigenschaften der RNA

RNA besitzt völlig andere Eigenschaften als DNA, obwohl sie ebenso ein langkettiges Nukleinsäuremolekül ist. So liegt die RNA nicht als Doppelhelix, sondern einzelsträngig vor. Dies erhöht die Möglichkeit für dreidimensionale Strukturen und erlaubt Reaktionen die der DNA nicht möglich sind. Im Gegensatz zu DNA enthält sie statt Desoxyribose den Zucker Ribose. Ribose ist eine Pentose: ein Zucker mit 5 C-Atomen. Diese Struktur macht die RNA bei basischem pH-Wert instabiler als die DNA. Im RNA-Molekül ist die Pyrimidin-Base Thymin als komplementäre Base zu Adenin durch Uracil ersetzt. Vermutlich nutzt RNA Uracil, da dieses energetisch weniger aufwändig herzustellen ist als Thymin.

1.3.4. Synthese der RNA

Die Transkription der RNA wird durch das Enzym RNA-Polymerase katalysiert. Die RNA-Polymerase bindet an der Promotor-Region. Wichtig für eine Bindung ist die so genannte TATA-Box, eine kurze A- und T-reiche Teilsequenz. Für diese Bindung sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren notwendig. Das Enzym trennt die Doppelhelix durch lösen der Wasserstoffbrücken. Am kodogenen Strang der DNA lagern sich durch komplementäre Basenpaarung Ribonukleotide an. Diese werden durch Phosphodiesterbindung miteinander verknüpft. Die Ableserichtung erfolgt vom 3'-Ende zum 5'-Ende der DNA, die Synthese der RNA somit vom 5'-Ende zum 3'-Ende. Die Synthese der RNA wird an einer Stop-Sequenz beendet.

Reifung der RNA

Bevor die nach der Transkription entstandene RNA den Kern eukaryontischer Zellen verlassen kann, muss sie noch mehrfach modifiziert werden.

Bei den meisten Wirbeltiergenen sind die kodierenden Sequenzen in Abschnitte, sogenannte Exons, aufgeteilt. Diese sind von Introns (nichtkodierende Sequenzen) unterbrochen. Das primäre RNA-Transkript enthält sowohl die Exons, als auch die Introns. Durch eine Reihe von Reaktionen, die Spleißen genannt werden, werden die Introns aus der RNA-Sequenz herausgeschnitten. Das Spleißen der RNA erfolgt an den Spleißstellen. Dies sind konservierte Nukleotidsequenzen, die die Exon-Intron-

Grenze bilden. Der Proteinkomplex der für das Spleißen verantwortlich ist wird Spleißosom genannt. Er besteht aus snRNA und Proteinen.

Die RNA-Transkripte erhalten bei ihrer Weiterverarbeitung noch weitere Modifikationen. Die erste ist das Capping. Schon kurz nach Beginn der Transkription wird das Ende der wachsenden RNA in mehreren Reaktionsschritten durch eine Struktur blockiert, die man als Cap bezeichnet. Bei hnRNAs besteht sie aus einem GTP-Rest, der an N-7 des Guanin-Rings methyliert ist. Der β -Phosphat-Rest des Cap ist über eine Ester-Bindung mit der freien 5'-OH-Gruppe der terminalen Ribose verknüpft. Das Cap hat die Funktion die RNA vor dem Abbau durch 5'→3'-Exonukleasen zu schützen und den Transport vom Kern ins Zytoplasma zu erleichtern. Die Cap-Struktur ermöglicht ebenso effizienteres Spleißen und spielt eine entscheidende Rolle bei der Bindung der 40S-Untereinheit der zytoplasmatischen Ribosomen an die mRNA.

Eine weitere Modifikation der mRNA ist die Polyadenylierung. Am freien 3'-Ende des Transkripts wird ein Polyadenylat-Schwanz aus bis zu mehreren hundert AMP-Bausteinen angefügt. Diese Reaktion wird durch eine spezielle Polyadenylat-Polymerase katalysiert. Erst dann verlässt die mRNA als Komplex mit RNA-bindenden Proteinen den Zellkern. Der Poly(A)-Schwanz der RNA stabilisiert die RNA und erleichtert die Translation.

1.3.4.1. mRNA-Stabilität und Abbau

Die Rate mit der ein eukaryontisches Gen exprimiert wird, hängt sowohl von der Translationseffizienz der mRNA, als auch von der Stabilität der mRNA in der Zelle ab. Unterschiedliche Gene haben z.T. sehr verschiedene Expressionsraten, da sich die Halbwertszeiten ihrer mRNAs stark voneinander unterscheiden. Dies können bis zu 100 fache Unterschiede, von ca. 15 min bis zu 24 h, sein (Beelman und Parker, 1995). Transkripte von stark exprimierten Genen (z.B. β -Globin (Russell et al., 1997)) oder von verzögert translatierten Genen (z.B. maternale Gene in Oozysten (Mattick, 2001)) sind sehr langlebig. Im Gegensatz dazu haben die mRNA-Transkripte von Genen die als eine schnelle Antwort auf Reize von außen exprimiert werden nur eine sehr geringe Halbwertszeit (Schiavi et al., 1992). Die Stabilität der mRNA ist somit

ein wichtiges Instrument zur posttranskriptionellen Genregulation. Die Stabilität der mRNA hängt von vielen verschiedenen *cis*- und *trans*-Stabilisierungsfaktoren ab.

mRNA-Abbau in Eukaryonten

Deadenylierungsabhängiger mRNA-Abbau

Die meisten eukaryontischen mRNAs sind polyadenyliert. Der Poly(A)-Schwanz wird durch das stark exprimierte Poly(A)-Bindungsprotein PABP gebunden. Dies verhindert den Abbau vom 3'- zum 5'-Ende *in vitro*. In Eukaryonten werden normale mRNA-Moleküle vom 5'- zum 3'-Ende abgebaut. Vor dem Abbau erfolgt ein Abbau des Poly(A)-Schwanzes (Deadenylierung) vom 3'-Ende her. Der Abbau der mRNA findet nur statt, wenn der Poly(A)-Schwanz entfernt oder zumindest stark verkürzt wird (Decker und Parker, 1993). Darauf folgt die enzymatische Abspaltung des ⁷Gppp-Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA (*Decapping*). Die ⁷Gppp-Cap-Struktur am 5'-Ende wird von der eIF4E-Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF4F gebunden. eIF4F bindet auch an das PABP, das am Poly(A)-Schwanz bindet (Gingras et al., 1999b). Dadurch nimmt die mRNA eine zirkuläre Form an, die ihre Deadenylierung und das *Decapping* verhindert und den Aufbau eines Translationsinitiationskomplexes am 5'-Cap bewirkt, der eine verstärkte Translation auslöst. Durch die PARN, eine Poly(A)-spezifische Nuklease wird Poly(A) am 3'-Ende abgebaut, was den eIF4F-Komplex destabilisiert, der RNA-Ring bricht auf und das *Decapping* kann stattfinden. Die Cap-Struktur wird durch den Dcp1p/Dcp2p-Komplex entfernt. Dcp2p hydrolysiert das m⁷-Cap an deadenylierter mRNA und setzt m⁷GDP frei. Die Bindung von Dcp1p/Dcp2p an die mRNA wird durch den Komplex aus Lsm-Proteinen 1-7 und den Pat/Mtr-Proteinen verstärkt. Dieser Komplex reagiert bevorzugt mit deadenylierter mRNA. Wenn die Cap-Struktur entfernt wurde, wird die restliche mRNA durch Xrn1p, einer Exonuklease, in 5'→3'-Richtung abgebaut (Abbildung 3).

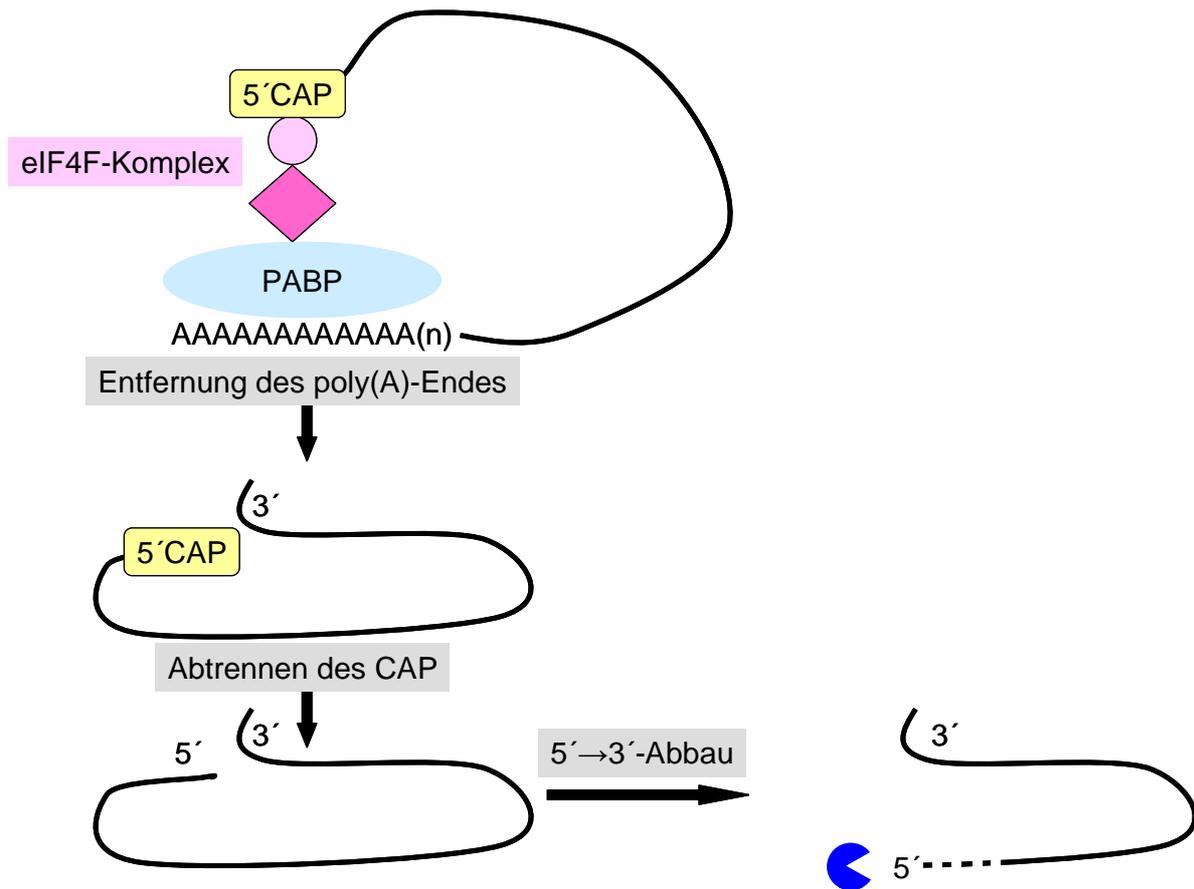


Abbildung 3 Deadenylierungsabhängiger Abbau der mRNA.

Der Abbau beginnt mit Entfernung des Poly(A)-Schwanzes. Dann wird die Cap-Struktur enzymatisch entfernt. Daraufhin erfolgt der Abbau durch Exonukleasen von 5' nach 3'.

Deadenylierungsunabhängiger mRNA-Abbau

Für einige eukaryontische mRNA-Moleküle wird der Abbau durch Endonukleasen initiiert. Dieser Abbauweg ist unabhängig von der Deadenylierung. Transkripte die auf diesem Wege abgebaut werden sind z.B. die mRNAs des Transferrin-Rezeptors (Binder et al., 1994), des *insulin-like growth factor II* (IGFII) (Scheper et al., 1995) oder die α -Globin-mRNA (Wang und Kiledjian, 2000a). Die gespaltene mRNA wird durch die Spaltung instabil und ist leicht zugänglich für weitere Exonukleasen, die an den entstandenen freien 3'- und 5'-Enden angreifen können.

RNA-Überwachung (Nonsense-mediated decay (NMD), RNA surveillance)

Der RNA-Abbau in eukaryontischen Zellen hat als eine wesentliche Funktion die Kontrolle für das richtige Transkribieren, Spleißen und Prozessieren von mRNA. Der *Nonsense-mediated-decay* (NMD) stellt eine Kontrollmöglichkeit der Zelle dar mRNAs zu zerstören, die ein vorzeitiges Stopkodon enthalten. 30% aller Genmutationen, die Ursache einer Krankheit sind, werden durch vorzeitige Termination der Translation verursacht. Durch den NMD werden fast nur Proteine translatiert, die die volle Länge besitzen. Der Abbau dieser mRNAs wird durch deadenylierungsunabhängiges Decapping initiiert. Dies wurde in Hefen, die eine mRNA die für PGK1 kodiert und ein Stopkodon nahe des 5'-Endes der mRNA besitzt, untersucht (Muhlrad und Parker, 1994). Ein Kriterium, ob eine mRNA durch NMD abgebaut wird, ist die Lage des Stopkodons relativ zum am weitesten 3'-gelegenen Intron. Natürliche Stopkodons liegen normalerweise im terminalen Exon, während vorzeitige Stopkodons weniger als 50 Nukleotide oberhalb der letzten Exon-Exon-Grenze liegen (Wagner und Lykke-Andersen, 2002). Nach dem Spleißen des letzten Exon/Exon am 3'-Ende, bleibt auf der prozessierten mRNA das Spleißprotein mRNP (*nuclear messenger ribonucleoprotein*, Upf3p) zurück. Dieses Protein wird während der Translation im Zytoplasma von den Ribosomen entfernt. Es stellt ein Signal für eine vollständige und intakte mRNA dar. Erreichen die Ribosomen das Upf3p-Protein auf der mRNA hingegen nicht, da sie vorher durch ein Stopkodon von der mRNA abgelöst werden, ist das noch vorhandene Upf3p-Protein auf der mRNA ein Signal, dass die RNA nicht vollständig ist. An das Upf3p können Ribonukleasen binden und die mRNA abbauen.

Regulation des mRNA-Abbaus-cis-Elemente und trans-Faktoren

Der mRNA-Abbau ist für verschiedene Transkripte unterschiedlich schnell. Er wird durch exogene und endogene Einflüsse gesteuert.

Für die unterschiedliche Lebensdauer unterschiedlicher mRNA-Moleküle sind Interaktionen zwischen Sequenzmotiven der mRNA (*cis*-Elemente) und daran bindenden Proteine (*trans*-Faktoren) verantwortlich. Diese Wechselwirkungen können eine schnelle mRNA-Degradation oder aber eine Stabilisierung der mRNA

bewirken (Mitchell und Tollervey, 2000). Die Stabilität einer mRNA kann an die Translation gekoppelt sein, oder unabhängig von ihr reguliert werden.

Elemente in der 3'-UTR

- **AU-reiche Elemente (ARE)**

Viele mRNAs mit kurzer Halbwertszeit (z.B. Zytokine, Lymphokine, Wachstumsfaktoren) haben in ihrer Sequenz in der 3'-UTR so genannte ARE (AU-reiche Elemente). Diese sind in der Lage die Deadenylierung zu unterstützen (Chen und Shyu, 1995). Die AREs werden gemäß ihrer Sequenz in drei Klassen unterteilt. In den meisten Klassen ist das Sequenzmotiv AUUUA in unterschiedlicher Anzahl und Anordnung vorhanden (Chen und Shyu, 1995, Xu et al., 1997). mRNA-Bindungsproteine die an die ARE binden, stabilisieren das Transkript dadurch dass sie die Erkennung oder den Abbau durch RNasen verhindern oder sie fördern den Abbau des Transkripts indem sie die Sekundärstruktur der RNA ändern oder RNasen anlocken.

Der ARE-vermittelte mRNA-Abbau wird mit der Entfernung des Poly(A)-Schwanzes eingeleitet. Nachdem eine kritische Poly(A)-Schwanzlänge (20-60 Nukleotide) erreicht ist, erfolgt der Abbau der mRNA.

- **Cytosin-reiche Elemente (CRE)**

Zu den mRNA-Molekülen die eine hohe Halbwertszeit besitzen, gehören die mRNA-Moleküle die u.a. für Kollagen- $\alpha 1$ (Stefanovic et al., 1997), Insulin (Tillmar und Welsh, 2002) und α -Globin (Wang et al., 1995) kodieren. Diese mRNA-Moleküle besitzen in ihrer 3'-UTR ein Cytosin-reiches Element (CRE). Mit dem CRE der α -Globin-mRNA bilden im Zytoplasma bis zu sieben Proteine einen sogenannten α -Komplex der mit PABP interagiert. Die Stabilität der α -Globin mRNA (Halbwertszeit 24-60 h) beruht auf der wechselseitigen Stabilisierung von Poly(A)-Schwanz und α -Komplex. Durch die CRE werden demnach sowohl der Abbauweg nach Abspaltung des Poly(A)-Schwanzes und die endonukleolytische Spaltung nach Ablösung des α -Komplexes reguliert.

- **Iron-responsive element (IRE)**

Zusätzlich zu der mRNA-Sequenz spielt auch die Struktur der mRNA eine Rolle bei der Wechselwirkung mit Proteinen. Beispiel für eine solche Struktur sind Haarnadelschleifen (*stem-loop*-Struktur). Solche mRNAs die z.B. für Proteine die am Eisenstoffwechsel beteiligt sind kodieren besitzen z.B. IREs (*Iron-responsive element*).

Die Transferrin-Rezeptor-mRNA kann in Abwesenheit von Eisen ein IRE (*iron response element*)-Bindeprotein binden, das die Halbwertszeit dieser mRNA verlängert. Für diese Regulation ist eine Sequenz von ca. 60 Nukleotiden im 3'-UTR der mRNA verantwortlich die bei Eisenmangel von IRE-regulierenden Proteinen (IRP1 und IRP2) gebunden werden. Die IRE Bindeproteine blockieren den Zugang zu Destabilisierungssequenzen, was den Abbau der Transferrin-Rezeptor mRNA verhindert. Die Transferrin-Rezeptor-mRNA wird somit länger translatiert und es wird vermehrt Transferrin-Rezeptor synthetisiert. Gibt es hingegen zuviel Eisen in der Zelle, ändert sich die Struktur und damit die Affinität der IRPs zu den IRES. Die Destabilisierungssequenzen werden frei und die Transferrin-Rezeptor-mRNA wird endonukleär abgebaut.

1.4. Nukleinsäuren-basierte Impfstoffe

Die Verwendung von Nukleinsäuren als Vakzin ist eine relativ neue Entwicklung. In den letzten 10 Jahren stieg das Interesse an Impfstoffen auf mRNA-Basis jedoch stark an. Anfang der 90er Jahre wurden die ersten Arbeiten über mRNA- und DNA-Vakzinierung veröffentlicht (Tang et al., 1992, Martinon et al., 1993, Martinon et al., 1993). Diese Arbeiten beruhen darauf dass aus den verabreichten Nukleinsäuren Proteine synthetisiert werden für die sie kodieren. Diese Proteine oder DriPs (*defective ribosomal products*) werden in der Zelle durch das Proteasom prozessiert und die entstandenen Peptide auf MHC-Klasse I-Molekülen präsentiert. Haben professionelle antigenpräsentierende Zellen die Nukleinsäuren oder das Protein über phagozytierte Zellen aufgenommen, können diese dann zytotoxische T-Zellen aktivieren. Die Präsentation kann auch über MHC-Klasse II-Moleküle erfolgen, wenn die Peptide in den Endosomen der APC von sauren Proteasen abgebaut werden. Dies kann eine T-Helfer-Zellen aktivieren. Gelangen die synthetisierten fremden

Proteine in die extrazelluläre Matrix, können sie von B-Zellen über ihren Antigen-Rezeptor erkannt und aufgenommen werden und somit spezifische B-Zellen aktivieren.

Das Interesse der Wissenschaft ging nach diesen Entdeckungen zunächst in die Weiterentwicklung der DNA-Vakzinierung. Die Verwendung von DNA-Plasmiden hat den Vorteil, dass man sie im Gegensatz zu Proteinen (die bisher für Vakzinierungen verwendet wurden) kostengünstig und einfach synthetisieren kann. Bald jedoch wurden Nebenwirkungen dieser Vakzinierungsmethode entdeckt. So können sich Sequenzen der fremden DNA in die Wirts-DNA integrieren und Onkogene bilden (Wurtele et al., 2003) oder Tumorsuppressorgene zerstören. Bei der Integration von DNA in das Wirtsgenom kann dies zu einer Disregulation der Proteinexpression führen. Ebenso wurde entdeckt, dass Anti-DNA-Antikörper gebildet werden können (Klinman et al., 1997) und damit Autoimmunkrankheiten wie *Lupus erythematoses* ausgelöst werden können. Verwendet man mRNA als Impfstoff kann man diese Nachteile umgehen. mRNA ist im Gegensatz zu DNA nicht immunogen. Sie löst somit keine unerwünschten Antikörperantworten aus. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Vakzinierung mit DNA ist die Tatsache, dass mRNA keinen viralen Promotor zur Expression benötigt.

1.4.1. Therapeutische Anwendung von RNA

Die natürlichen Eigenschaften und Charakteristika die RNA-Moleküle besitzen wurden in der Vergangenheit untersucht, um diese zur Therapie von Krankheiten auszunutzen. So nutzt die Therapie mit Aptameren die Möglichkeit der RNA dreidimensionale Strukturen zu bilden. Das Wort Aptamer leitet sich aus dem lateinischen Wort „*aptus*“ (passen) und dem griechischen Wort „*meros*“ (Teil) ab. Aptamere sind hochaffine RNA- und DNA-Oligonukleotide, die aufgrund ihrer räumlichen Struktur eine hohe Affinität zu einem Zielprotein besitzen. So können sie zelluläre Proteine inhibieren oder chemische Reaktionen beschleunigen (man spricht dann von „Ribozymen“). Sie können aus Gemischen von Billionen zufällig erzeugter Sequenzen über die feste Bindung an ihren Bindungspartner herausgesucht werden. Die Methode, genannt SELEX (*systematic evolution of ligands by exponential enrichment*) dazu wurde in den 90er Jahren von Jack Szostak und Larry Gold unabhängig voneinander entwickelt (Ellington und Szostak, 1990, Tuerk und Gold,

1990). In der Therapie wird sie zur Genregulation bei Tumorerkrankungen und Virusinfektionen angewendet.

Eine weitere Eigenschaft von RNA ist ihre immunstimulatorische Wirkung. Diese Wirkung beruht darauf, dass die RNA virustypische Strukturen darstellt. So kann doppelsträngige RNA mit einer Länge von mehr als 40 Basenpaaren wie sie bei der Replikation von Viren entsteht, und einzelsträngige stabilisierte RNA wie sie in RNA-Viren gefunden wird, zur Stimulation des Immunsystems eingesetzt werden (Pimm et al., 1976, Scheel et al., 2004). Die Wirkung beruht hierbei auf der Erkennung der RNA-Moleküle von den so genannten *Toll-like* Rezeptoren (TLRs) und der Aussendung eines Gefahrensignals für das Immunsystem.

Die Fähigkeit zur spezifischen Unterdrückung der Genexpression ist eine weitere Eigenschaft die in den letzten Jahren von vielen Forschergruppen auf klinische Anwendungsmöglichkeiten untersucht wird. Zum einen werden RNA-Moleküle verwendet, die komplementär zum Zieltranskript sind und mit ihm Basenpaare ausbilden, was die Translation dieser Sequenz unterbindet. Diese RNA-Moleküle werden Antisense-RNA genannt. Die mRNA entsteht am kodierenden Strang der DNA. Wird auch der komplementäre Strang abgelesen, entsteht eine zur mRNA komplementäre RNA: die Antisense-RNA. Verbinden sich Antisense-RNA und mRNA zu einem Doppelstrang, kann die mRNA an den Ribosomen nicht abgelesen werden und es wird kein Protein gebildet. Darüber hinaus wird die doppelsträngige RNA von den RNA-Interferenz-Mechanismen (RNAi) rasch abgebaut.

Die siRNA, *small interfering* RNA entsteht bei einem Signalweg der Zelle, der als RNAi (*RNA Interference*) zusammengefasst wird. Dabei wird dsRNA (doppelsträngige RNA) durch das Enzym Dicer in viele kleinere Fragmente von ca. 22 Nukleotiden Länge zerteilt (die siRNA's) und in den Enzymkomplex RISC (*RNA-induced silencing complex*) eingebaut. Mithilfe der inkorporierten RNA-Fragmente bindet RISC komplementär an DNA, z.B. Genbereiche, oder mRNA und kann diese damit "abschalten". Dies dient einerseits dem Abbau von Fremd-RNA, z.B. der von Viren, aber auch der zellinternen Regulation. siRNA's werden aktuell intensiv auf ihre Beteiligung an verschiedenen Zellvorgängen (Apoptose, Genregulation, Prionen, etc.) und Krankheiten wie Krebs erforscht. Die Forschung setzt synthetisch hergestellte siRNAs ein, um die Expression von spezifischen Zielgenen zu

verringern. Die siRNA werden in isolierte Zellen eingebracht (transfiziert) und die mRNA des Zielgens wird abgebaut. Die resultierende Verringerung der Genprodukte *Gene-Knockdown* ermöglicht es Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Genes zu erhalten.

Ein weiterer wichtiger Forschungsschwerpunkt der die proteinkodierende Eigenschaft der RNA ausnutzt, ist die Gentherapie und Vakzinierung mit mRNA.

1.4.2. Immuntherapie mit mRNA

Immuntherapie mit „nackter“ messengerRNA

Die Immuntherapie mit „nackter“ mRNA beruht auf den Eigenschaften der RNA genetische Informationen weiterzugeben und gleichzeitig auf deren immunstimulatorische Wirkung.

Im Jahre 1990 wurde der erste Versuch gemacht mRNA *in vivo* zur Genexpression zu verwenden. Es wurden mRNA und DNA die für die Reporterproteine Chloramphenicol Acetyl Transferase (CAT), Luziferase und β -Galaktosidase kodieren in den Muskel von Mäusen injiziert. Daraufhin konnte beobachtet werden, dass die entsprechenden Proteine *in vivo* synthetisiert wurden und die Menge an exprimiertem Protein sogar größer war, als bei der Injektion von Plasmid-DNA (Wolff et al., 1990). Dies war erstaunlich, da bis zu diesem Zeitpunkt vermutet wurde, dass RNA zu instabil zur Anwendung in der Gentherapie sei. Es konnte somit aber bewiesen werden, dass die mRNA von Zellen aufgenommen werden kann und das kodierte Protein in den Zellen synthetisiert wird. Dass durch die Injektion von mRNA *in vivo* eine Immunantwort gegen einen Tumors ausgelöst werden kann, wurde dann fünf Jahre später durch die Arbeitsgruppe von Conry veröffentlicht. Hierzu wurden Mäuse mit mRNA die für das *carcinoembryonic antigen* (CEA) kodiert wiederholt intramuskulär injiziert. Es konnte beobachtet werden dass diese Mäuse, im Gegensatz zu den Kontrollmäusen, Antikörper gegen CEA nach Gabe von CEA-exprimierenden Tumorzellen entwickeln. Erst fünf Jahre nach dieser Veröffentlichung wurde beschrieben, dass die intradermale Injektion von mRNA die für β -Galaktosidase kodiert *in vivo* sowohl eine spezifische zelluläre zytotoxische als auch humorale Immunantwort auslösen kann. Die RNA wurde stabilisiert mit dem

kationischen Peptid Protamin, ohne jegliche Stabilisierung und eingeschlossen in das kationische Liposom Unifectin, verabreicht. Für alle verwendeten Verabreichungsmethoden konnte eine Immunantwort nachgewiesen werden. Es wurde beschrieben, dass die Injektion einer mit Protamin stabilisierten mRNA-Bibliothek aus P815-Tumorzellen, die rekombinant für β -Galaktosidase sind, eine Immunantwort ausgelöst werden kann. Dieser Versuch zeigt, dass zum Auslösen einer Immunantwort nur sehr wenige mRNA-Moleküle in die Zellen aufgenommen werden müssen. Es wurden zusätzlich unterschiedliche Injektionsstellen miteinander verglichen: Es konnte in den Mäusen eine Immunantwort ausgelöst werden die die mRNA (in das Liposom Unifectin) eingeschlossen intradermal, intravenös oder subkutan injiziert bekamen. In den Mäusen mit intramuskulärer Injektion konnte jedoch keine Immunantwort nachgewiesen werden (Hoerr et al., 2000). Zur gleichen Zeit wurde veröffentlicht, dass die extrahierte mRNA aus S1509a-Tumorzellen, wenn sie intradermal in Mäuse gespritzt wird, vor der Entwicklung eines Tumors nach Gabe von S1509a-Tumorzellen schützen kann (Granstein et al., 2000). Erst kürzlich wurde dann gezeigt, dass die intradermale Injektion von mRNA in die Ohrmuschel von Mäusen eine T_H2 -polarisierte Immunantwort auslöst. Verabreicht man den Mäusen jedoch einen Tag nach Gabe der mRNA GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) als Adjuvant wird eine T_H1 -polarisierte Immunantwort ausgelöst (Carralot et al., 2004).

Immuntherapie mit mRNA und Liposomen

Erstmals wurde 1987 beschrieben dass kationische Liposomen als Transportmittel für Plasmid-DNA in Zellen verwendet werden können (Felgner et al., 1987). Daraufhin wurden viele kationische Liposomen hergestellt und für den Transfer von Nukleinsäuren in Zellen, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* verwendet (Dass, 2004). Diese Methode wurde sehr populär, da sie im Gegensatz zum viralen Gentransfer eine schnelle, einfache und ungefährlichere Transfektionsmethode darstellt. Es wurde jedoch bald festgestellt, dass sie aufgrund der toxischen Wirkung der Liposomen für *in vivo* Anwendungen nicht geeignet sind. Außerdem zeigen die Lipidkomplexe einen immunstimulatorischen Effekt. Dies kann in der Immuntherapie sowohl von Vorteil, als auch von Nachteil sein.

Die erste Veröffentlichung über die erfolgreiche Verwendung von mRNA als Vakzin stammt aus dem Jahre 1993 und wurde mit mRNA durchgeführt die in Liposomen eingeschlossen war. Martinon et al. beschrieben eine Immunantwort in vakzinierten Mäusen nach subkutaner und intravenöser Injektion von mRNA die für das Influenza Nukleoprotein kodiert. Es wurden identische zytotoxische T-Zellen nachgewiesen, wie sie bei einer Virusinfektion gebildet werden. Diese CTLs werden sowohl peptidbeladene, als auch virusinfizierte Zielzellen lysieren (Martinon et al., 1993). Diese Ergebnisse konnten von Zhou et al. und Hoerr et al. reproduziert werden. Zhou konnte 1994 β -Galaktosidase-Aktivität *in vivo* bis zu 10 Tage nach Injektion der in Liposomen eingeschlossenen selbstreplikativen mRNA nachweisen (Zhou et al., 1994). Bei der „nackten“ mRNA-Injektion, wie sie von Wolff et al. beschrieben wurde, konnte das Reporterprotein nur bis zu 60 h nach der Injektion detektiert werden (Wolff et al., 1990). Obwohl diese Ergebnisse viel versprechend zur Anwendung in der der Vakzinierung waren, gab es danach keine weiteren Arbeiten zu diesem Thema und damit auch keine klinischen Studien. Da die meisten Liposomen toxisch sind ist eine Anwendung in der Klinik auch sehr problematisch. Es werden jedoch zur Zeit neu Liposomen entwickelt, die keine toxische Wirkung auf Zellen zeigen (Pascolo, 2004).

Selbstreplikative mRNA

Eine weitere Vakzinierungsmethode mit mRNA stellt die Injektion von selbstreplizierenden mRNA-Molekülen dar. Diese selbstreplikative RNA wird aus Viren abgeleitet, die das Enzym RNA-Replikase synthetisieren. Dieser Ansatz wurde genutzt um die Immunogenität „nackter“ mRNA-Vakzinierung zu verstärken. So wurde mRNA die für β -Galaktosidase kodiert mit der mRNA die für eine virale Replikase gekoppelt (Rep- β Gal). Transfiziert man diese replikative mRNA in Tumorzellen, so kann bei den Zellen die mit Rep- β Gal transfiziert wurden, eine viel größere Menge an β -Galaktosidase detektiert werden, als bei Zellen die nur mit mRNA ohne Replikase transfiziert wurden. Bei *in vivo* Versuchen mit diesem mRNA-Konstrukt konnte festgestellt werden, dass nur mit Rep- β Gal (nicht mit der mRNA die nur für β -Galaktosidase kodiert) eine zytotoxische T-Zellantwort und die Bildung von Antikörpern ausgelöst werden kann (Ying et al., 1999). Es wurde vermutet, dass die erhöhte Immunogenität mit der höheren Menge an synthetisiertem Protein zusammenhängt. Da aber nur eine etwa 2,5-mal höhere Menge detektiert werden

konnte, kann dies nicht die alleinige Ursache darstellen. Es wurde beobachtet, dass Zellen die mit einer chimären mRNA für *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP) und Replikase transfiziert wurden, durch Apoptose sterben. Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit durch Apoptose sterbende Zellen sehr effektiv aufnehmen zu können und deren Proteine auf ihrer Oberfläche zu präsentieren (Albert et al., 1998). Da bei der Replikase-Aktivität doppelsträngige RNA entsteht und diese das Immunsystem mittels *Toll-Like-Rezeptor 3* (TLR-3) stimuliert, werden die transfizierten Zellen zur Apoptose angeregt (Alexopoulou et al., 2001). Die ersten *in vivo* Experimente mit selbstreplikativer mRNA wurden von der Arbeitsgruppe um Zhou gemacht (Zhou et al., 1994). Sie verwendeten den alpha-Virus Semliki Forest Virus als Vektor. Dieser Virus kodiert für das Influenza Nukleoprotein. Injiziert man diesen rekombinanten Virus in Mäuse, so kann eine starke zelluläre und humorale Immunantwort gegen das Influenza Nukleoprotein ausgelöst werden.

Diese Therapieansätze zeigen, dass die Injektion von selbstreplizierender mRNA sehr effektiv ist. Ein Nachteil besteht jedoch in der Tatsache, dass die Replikase ein körperfremdes Protein ist, das eventuell eine unerwünschte Immunantwort auslösen kann (Saenz-Badillos et al., 2001).

Gene-gun

Die Gene-Gun ist eine Apparatur um Zellen mit genetischer Information zu beladen. Sie wurde ursprünglich zur Verwendung bei Pflanzen entwickelt. Für diese Methode werden Nukleinsäuren auf mikroskopisch kleine Goldkugeln präzipitiert und in die Zellkerne geschossen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass die Vektoren direkt in den Zellkern gelangen. Es wurde gezeigt, dass mit dieser nadelfreien Injektionsmethode nur eine Menge im Nanogrammbereich der Nukleinsäure benötigt wird. Ein weiterer Vorteil besteht in der langen Lagerungsfähigkeit der mit RNA beladenen Goldpartikel. Bei 4°C können sie für 5 Wochen gelagert werden (Mandl et al., 1998). Die mit RNA beladenen Partikel gelangen durch diese Vakzinierungsmethode in ein großflächiges Areal der Epidermis, wo sich viele Langerhans-Zellen und dermale DCs befinden, die Antigene sehr effizient präsentieren können.

Die erste Studie zur RNA-Immunisierung mit RNA beladenen Goldpartikeln wurde 1996 veröffentlicht (Qiu et al., 1996). In Mäusen konnte eine Antikörperantwort gegen

das zur Vakzinierung verwendete α -1-Antitrypsin nachgewiesen werden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte in Rindern und Schafen eine Immunantwort gegen die bovine virale Diarrhöe auslösen (Vassilev et al., 2001).

Therapie mit DCs

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen mit starker kostimulatorischer Aktivität. Sie eignen sich daher gut um eine starke zytotoxische Immunantwort auszulösen, was bei einer Immuntherapie als vorherrschendes Ziel gilt.

Es wurden Methoden entwickelt, um dendritische Zellen zur Immuntherapie *in vitro* zu kultivieren. So besteht die Möglichkeit sie aus hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark zu gewinnen (Herbst et al., 1996). Eine einfachere Methode DCs für immuntherapeutische Zwecke zu generieren, ist ihre Herstellung aus Monozyten, die aus dem peripheren Blut des Patienten stammen. Hierzu werden die Monozyten mit IL-4 und GM-CSF kultiviert bis sie sich zu unreifen dendritischen Zellen ausdifferenziert haben (Romani et al., 1994). Diese dendritischen Zellen aus Blutmonozyten können in großer Anzahl erhalten werden. Werden *in vitro* generierte dendritische Zellen mit Tumorantigenen beladen und mit Gefahrensignalen wie TNF- α oder doppelsträngiger RNA (dsRNA) aktiviert, so ist es möglich dass sie die T-Zell-Toleranz gegen einen Tumor brechen können und eine zytotoxische T-Zell-Antwort gegen ihn auslösen können, wenn sie einem Tumorpatienten verabreicht werden.

Es wurden verschiedene Strategien entwickelt, um die dendritischen Zellen mit dem gewünschten Tumorantigen oder viralen Antigen zu beladen. Eine einfache und sehr effizient Methode ist die Beladung der Zellen mit einem immundominanten Peptid (Porgador und Gilboa, 1995). Dies ist möglich, da ein kleiner Teil der an der Zelloberfläche vorhandenen MHC-Moleküle nicht mit Peptid beladen ist. Des Weiteren können Peptide, die eine niedrigere Affinität zum MHC-Molekül besitzen von Peptiden verdrängt werden, die eine höhere Affinität besitzen. Jedoch können einige der hierzu verwendeten Peptide Toleranz auslösen, wenn sie „nackt“, d.h. das Peptid alleine ohne Beladung auf eine antigenpräsentierende Zelle verabreicht werden, nicht aber, wenn sie auf dendritische Zellen gebunden injiziert werden (Toes et al., 1996). Diese Methode besitzt jedoch den Nachteil, dass sie auf Epitope eines bestimmten HLA-Haplotyp und bekannte Antigene beschränkt ist.

Ebenso haben manche Tumoren eine „*Escape-Strategie*“ entwickelt, bei der einzelne Antigene nicht mehr auf der Oberfläche exprimiert werden. Eine Alternative stellt das „Pulsen“ mit rekombinantem Protein dar (Butch et al., 2001). Bei dieser Methode ist eine Immunantwort gegen alle immundominanten Epitope des verwendeten Proteins möglich. Die Herstellung von rekombinanten Proteinen ist jedoch sehr aufwändig und sehr teuer, vor allen unter *good manufacturing practices* (GMP)-Bedingungen. Bei den eben genannten Methoden wird die Immunantwort nur gegen ein bestimmtes Protein ausgelöst. Das „Pulsen“ der dendritischen Zellen mit Tumorlysat bietet hingegen den Vorteil, dass die Immunantwort gegen alle vom Tumor exprimierten Proteine ausgelöst werden kann (Schott et al., 2000). Diesen Vorteil bieten auch die Verwendung von DC-Tumor-Hybriden (Schott et al., 2000) oder mit aus dem Tumor isolierten Peptiden „gepulste“ DCs (Turner et al., 1999). Diese Methoden sind aber stark von der verfügbaren Menge an Tumorgewebe abhängig. Um dieses Problem zu umgehen wurden Methoden des viralen und nicht-viralen Gentransfers in DCs entwickelt. Das eingeschleuste Gen wird in der dendritischen Zelle exprimiert und über den Weg der Antigenprozessierung auf MHC-Molekülen auf der Oberfläche exprimiert. Der Gentransfer mit adenoviralen Vektoren besitzt eine hohe Transfektionseffizienz (Brossart et al., 1997). Physikalische Transfektion (Lipofektion, Elektroporation, CaPO₄-Präzipitation) zeigt dagegen nur eine geringe Transfektionseffizienz auf.

1.4.3. DCs und RNA

Transfektionsmethoden

Die Arbeitsgruppe von Gilboa veröffentlichte 1996 erstmals, dass murine DCs, die aus Knochenmarkszellen gewonnen wurden, durch Lipofektion mit kationischen Lipiden mit mRNA, die für Hühner-Ovalbumin kodiert eine *in vitro* zytotoxische T-Zell-Antwort auslösen können (Boczkowski et al., 1996). Dies wurde ebenso für humane DCs und mRNA die für verschiedene Antigene kodiert gezeigt. Die Transfektion mit kationischen Liposomen ist jedoch für die DCs toxisch und erfordert ein sehr sorgfältig optimiertes Durchführungsprotokoll. Für klinische Anwendungen sind mit Liposomen transfizierte Zellen somit nicht geeignet, da sie für den Patienten toxisch wirken können. Es wurde daraufhin gezeigt, dass alleine die Koinkubation von mRNA mit dendritischen Zellen ausreicht, um zytotoxische T-Lymphozyten zu generieren

(Heiser et al., 2000, Nair et al., 1998, Heiser et al., 2001a, Heiser et al., 2001b). Die Arbeitsgruppe von Eli Gilboa machte diese Entdeckung durch einen Zufall. Die geplante Negativkontrolle (mRNA ohne Liposom) zeigte unerwartet ein positives Versuchsergebnis (Gilboa und Vieweg, 2004). Obwohl die Effizienz dieser Methode ist sehr gering ist, und durch konventionelle Detektionsmethoden nicht nachzuweisen ist, reicht diese minimale Menge an exprimiertem Antigen aus um das Immunsystem zu stimulieren. Die erhaltene zytotoxische T-Zell-Antwort ist vergleichbar mit der durch DCs, die mit Liposomen transfiziert waren, erhalten wurde (Nair et al., 1998). Dieses Phänomen könnte dadurch erklärt werden, dass das Immunsystem nur eine sehr kleine Anzahl von MHC-Epitopen auf der Oberfläche von dendritischen Zellen benötigt um eine zytotoxische T-Zellantwort auszulösen. Dieser Ansatz des so genannten „*passive Pulsing*“ konnte jedoch bis heute von keiner anderen Arbeitsgruppe reproduziert werden. Es wurden bereits klinische Studien mit DCs durchgeführt, die mit mRNA, die für ein Tumorantigen kodiert. „gepulst“ wurden. So wurde gezeigt, dass Patienten die an Prostatakrebs erkrankt sind nach Verabreichung von DCs die mit der mRNA, die für das prostata-spezifische Antigen (PSA) kodiert, transfiziert wurden mit einer zytotoxischen T-Zellantwort auf dieses Antigen reagieren (Heiser et al., 2002).

Eine wesentlich höhere Transfektionseffizienz kann durch Elektroporation der DCs mit der mRNA erreicht werden (Van Tendeloo et al., 2001, Saeboe-Larssen et al., 2002). Diese sehr effektive und einfach durchzuführende Transfektionsmethode ist sehr gut für klinische Anwendungen geeignet, da bei dieser Methode keine zusätzlichen Reagenzien verwendet werden müssen. Es ist lediglich notwendig die Zellen nach erfolgter Transfektion sorgsam zu behandeln, da sie durch den elektrischen Puls fragil werden.

Werden die zytotoxischen T-Zellantworten der unterschiedlichen Transfektionsmethoden *in vitro* miteinander verglichen, so können kaum Unterschiede beobachtet werden (Grunebach et al., 2003). Vergleicht man jedoch die Transfektionseffizienz anhand der Transfektion von mRNA die für das Reporterprotein *Enhanced Green Fluorescent Protein* (EGFP), kann beobachtet werden, dass die Transfektionseffizienz bei der Elektroporation am höchsten ist, und dass bei der Transfektionsmethode des „*passive Pulsings*“ keine Genexpression zu detektieren ist. Somit ist es nicht von vorwiegender Bedeutung eine möglichst hohe

Transfektionseffizienz zum Auslösen einer spezifischen Immunantwort zu erhalten. Vielmehr kann eine große Anzahl von MHC-Peptid-Komplexen auf der Zelloberfläche von Nachteil sein, und bei Zellen den aktivierungsinduzierten Zelltod auslösen. Dies trifft dann vor allem die Zellen mit einer hohen Avidität zum Antigen und würde somit die T-Zellen mit einer niedrigen Avidität begünstigen. Eine bevorzugte Expansion von T-Zellen mit geringer Avidität durch eine hohe Antigendichte auf APCs wurde sowohl *in vitro* (Alexander-Miller et al., 1996, Zeh, III et al., 1999), als auch *in vivo* (Rees et al., 1999, Bullock et al., 2003) beobachtet.

Transfektion mit definierten Tumorantigenen

Werden die dendritischen Zellen zur Tumortherapie mit mRNA transfiziert, so ergeben sich gegenüber anderen „Antigenbeladungsmethoden“ folgende Vorteile: Es werden alle MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Epitope abgedeckt.

Ebenso ist keine Bestimmung des HLA-Haplotyps des Patienten notwendig und macht die Therapie somit einem breiteren Patientenkollektiv zugänglich.

Die Transfektion von DCs mit mRNA ist eine einfache, effiziente und leicht zu reproduzierende Methode. Ist eine Gensequenz bekannt, kann daraus die gewünschte mRNA mit geeigneten Primern und RT-PCR (*reverse transcriptase-polymerase chain reaction*) und darauf folgender *in vitro*-Transkription hergestellt werden.

Es wurde bereits für sehr viele Antigene gezeigt, dass eine Transfektion von DCs mit mRNA, die für dieses Antigen kodiert, zytotoxische T-Zellen *in vitro* generiert werden können, wenn diese mit PBMCs von gesunden Spendern und Krebspatienten koinkubiert werden. So werden virale Antigene wie das Influenza Matrix Protein, Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A, HPV E6 und E7, HIV (*human immunodeficiency virus*) gag-Protein und etliche weitere virale Proteine untersucht. Ebenso wird die Immunantwort für normale Antigene untersucht, die als Tumorantigene definiert wurden. Es wurde mit der Methode der mRNA-Transfektion in DCs eine zytotoxische T-Zellantwort für Tumorantigene wie PSA (*prostate-specific antigen*) (Heiser et al., 2002), TERT (*telomerase reverse transcriptase*) (Heiser et al., 2001a), Survivin (Zeis et al., 2003) und CEA (*carcinoembryonic antigen*) (Zeis et al., 2003) untersucht. Da es möglich ist eine Immunantwort gegen körpereigene Proteine herzustellen, kann die

Selektion von autoreaktiven Immunzellen nicht vollständig sein und transfizierte DCs besitzen das Potential auch T-Zellen mit geringer Avidität zum Antigen zu aktivieren (Gilboa und Vieweg, 2004). Neben der zytotoxischen T-Zellantwort konnte auch für viele Antigene eine CD4⁺ T-Zellantwort beobachtet werden (Fukui et al., 2006, Su et al., 2005).

Neben der Vakzinierung mit definierten Tumorantigenen, besteht die Möglichkeit autologe vom Tumor exprimierte Antigene zu verwenden. Diese Methode kann auch verwendet werden, wenn keine oder nur wenige Antigene für den Tumor charakterisiert sind, oder die Tumorantigene nur auf sehr wenigen Tumoren im Patientenkollektiv zu finden sind. Ebenso sind viele charakterisierte Tumorantigene zur Immuntherapie gegen Krebs nicht geeignet. Da die Menge an verfügbarem Tumormaterial oft beschränkt ist, ist die Isolierung der Tumor-RNA, Herstellung von cDNA und *in vitro*-Transkription eine sehr praktikable Methode zur Vakzinierung mit autologen Tumorantigenen. Es konnte gezeigt werden, dass Injektion von murinen DCs die mit mRNA aus B16-Melanomzelllinien transfiziert wurden eine Tumorregression in Mäusen beobachtet werden kann (Boczkowski et al., 2000).

1.4.4. Die Immunologie der mRNA-Vakzine

Es ist noch nicht vollständig aufgeklärt, wie mRNA-Impfstoffe das Immunsystem aktivieren kann, Tumorzellen anzugreifen.

Die Wirkung von mRNA-Vakzinen beruht darauf, dass Zellen *in vivo* durch Phagozytose, rezeptorvermittelte Endozytose oder direktes Eindringen durch die Zellmembran aufnehmen. Im Zytoplasma der Zellen wird die mRNA in das kodierte Protein translatiert.

Hat eine APC die mRNA oder Proteome von mRNA-transfizierten somatischen Zellen aufgenommen und translatiert, ist zusätzlich noch eine Aktivierung notwendig. Geschieht dies nicht, könnte Toleranz gegen das verwendete Antigen ausgelöst werden. Es wurde in Versuchen mit peptidbeladenen und mRNA-transfizierten DCs festgestellt, dass die optimale CTL-Antwort ausgelöst werden kann, wenn erst die reifen DCs mit Peptid beladen werden. Im Vergleich dazu war die CTL-Antwort bei mRNA-Transfektion in unreife DCs und anschließende Reifung effektiver (Morse et

al., 1998). Sind die APCs aktiviert, exprimieren sie kostimulatorische Moleküle (CD80, CD86), Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, ICAM2, ICAM-3, LFA-3) und eine große Anzahl von MHC auf ihrer Oberfläche.

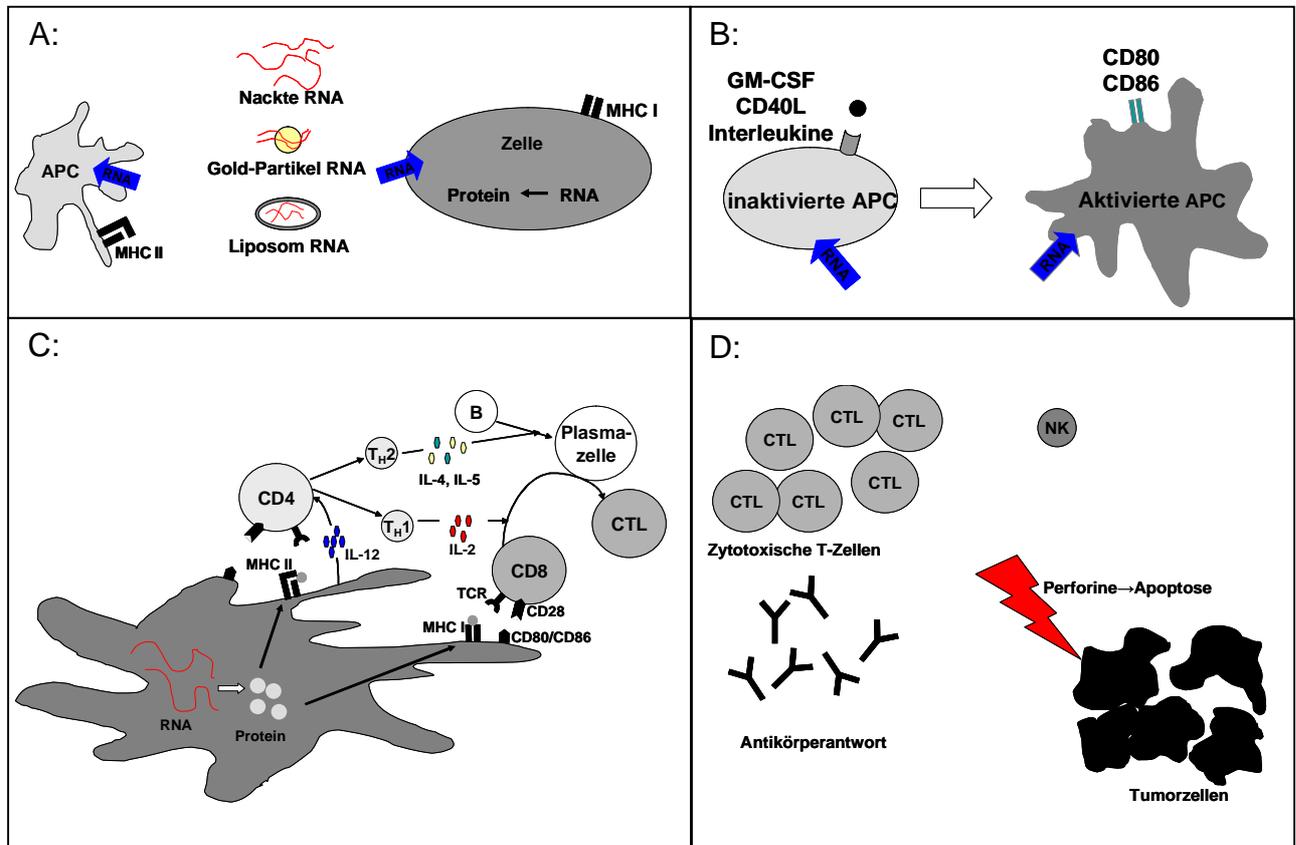


Abbildung 4 Theoretische Immunantwort gegen Tumore nach mRNA Vakzinierung.

A: Die mRNA wird von einer unreifen APC oder einer Nachbarzelle aufgenommen. **B:** Die unreife APC muss aktiviert werden. Im Falle der Vakzinierung mit DCs geschieht dies *in vitro* mit GM-CSF. Bei Vakzinierung mit nackter mRNA muss dies *in vivo* entweder mit verabreichten oder körpereigenen Zytokinen geschehen. **C:** Die mRNA muss zum Protein umgeschrieben werden. Das Protein wird prozessiert um auf MHC-Klasse I oder -Klasse II präsentiert zu werden. Dazu wandert die aktivierte APC in die Lymphknoten, um dort das Peptid zu präsentieren. Bei diesen Vorgängen spielen Zytokine wie IL-12 und IL-2 eine entscheidende Rolle. Daher kann die Immunantwort auf ein RNA-Vakzin durch Zugabe dieser Zytokine eventuell verstärkt werden. **D:** Schließlich töten die aktivierten T-Zellen die Tumorzellen. (Verändert nach (Saenz-Badillos et al., 2001))

Die von der Zelle aufgenommene mRNA muss im Zytosol translatiert werden und modifiziert werden. Im Gegensatz zu Vakzinen mit Plasmid-DNA muss die RNA nicht in den Zellkern transportiert werden und benötigt keine viralen Promotoren und untranslatierte Regionen.

Um T-Lymphozyten aktivieren zu können, muss die aktivierte Zelle zu den Lymphknoten wandern und dort ihr Antigen präsentieren. Dazu werden die aus der aufgenommenen mRNA translatierten Proteine ubiquitiniert, vom Proteasom abgebaut und über den TAP-Transporter ins endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort werden die entstandenen Peptide an MHC-Klasse I-Moleküle gebunden. Der MHC-Klasse I/Peptid-Komplex wird dann auf der Zelloberfläche präsentiert und kann $CD8^+$ -T-Lymphozyten gegen das von der mRNA kodierte Protein aktivieren. Die T-Zelle erkennt das Peptid über ihren T-Zell-Rezeptor. Diese Erkennung alleine reicht jedoch nicht aus, um die T-Zelle zu aktivieren. Um Anergie zu vermeiden ist ein kostimulatorisches Signal (Signal 2) der antigenpräsentierenden Zelle erforderlich. Um eine effektive zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen ist die Mitwirkung von $CD4^+$ -T-Lymphozyten erforderlich. T_H1 -Zellen sekretieren IL-2, welches zur Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten notwendig ist. Ebenso können die T_H1 -Zellen die DCs über CD40-CD40L-Interaktion zur Reifung anregen. Diese Interaktion spielt bei der Immunantwort gegen Tumoren eine wichtige Rolle. Makrophagen und dendritische Zellen werden dadurch zur Sekretion von IL-12 angeregt, was die Ausrichtung der Immunantwort in Richtung T_H1 -Antwort fördert. Die aktivierten T- und B-Lymphozyten müssen daraufhin zur Tumorzelle gelangen und diese abtöten (Abbildung 4).

1.5. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode entwickelt werden, mit der periphere mononukleäre Blutmonozyten (PBMCs) mit messenger RNA transfiziert werden können.

Es sollten verschiedene Transfektionsmethoden (Elektroporation, Lipofektion und passive Aufnahme der mRNA) untersucht werden. Anhand von messenger RNA die für die Reporterproteine EGFP oder Luziferase kodiert, soll festgestellt werden, ob die Zellen transfiziert werden können, und welche Zellpopulationen hauptsächlich in der Lage sind das kodierte Protein zu exprimieren.

Mit diesen transfizierten PBMCs sollte ein System etabliert werden, mit welchem die Induktion einer zytotoxischen T-Zellantwort *in vitro* ausgelöst werden kann.

Diese Methode der Transfektion von messenger RNA sollte so optimiert werden, dass sie zur Auswertung von klinischen Studien zur Vakzinierung mit messenger RNA von Tumorpatienten verwendet werden kann.

Es sollte sowohl die zytotoxische Antwort, als auch die T-Helferzell-Antwort, die *in vivo* in den Patienten durch die Vakzinierung ausgelöst wurde detektiert werden.

In einem zweiten Teilprojekt wurden unterschiedlich stabilisierte messenger RNA-Konstrukte, die für das gleiche Antigen kodieren hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Translation und Stabilität untersucht.

2. Material

2.1. Geräte

Kunststoff- und Kleinmaterialien

Reaktionsgefäß 0,5 ml, steril	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 ml, steril	Sarstedt, Nürmbrecht
Reaktionsgefäß 2,0 ml, steril	Sarstedt, Nürmbrecht
Pipettenspitzen weiß, 0,1-10 µl	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen gelb, 10-200 µl	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen blau, 100-1000 µl	Peqlab, Erlangen
Polypropylenröhrchen, steril, 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Polypropylenröhrchen, steril, 50 ml	BD FALCON, Heidelberg
Zellkulturflasche 75 cm ² NUNCLON™ surface	NUNC, Wiesbaden
Zellkulturflasche 25 cm ² NUNCLON™ surface	NUNC, Wiesbaden
Zellkulturflasche 175 cm ²	Sarstedt, Nürmbrecht
6-Well-Zellkulturplatte	NUNC, Wiesbaden
12-Well-Zellkulturplatte	Greiner, Frickenhausen
24-Well-Zellkulturplatte	NUNC, Wiesbaden
96-Well-Zellkulturplatte Nunclon™	NUNC, Wiesbaden
Petrischale	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmal-Pipette, Polystyrol, 2 ml, steril	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmal-Pipette Polystyrol, 5 ml, steril	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmal-Pipette Polystyrol, 10 ml, steril	Sarstedt, Nürmbrecht
Einmal-Pipette Polystyrol, 25 ml, steril	Sarstedt, Nürmbrecht
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
ELISA-Platte, Maxisorp	NUNC, Wiesbaden
Sterilfilter Steritop 0.22 µm, 500 ml	Millipore, Schwalbach
Sterilfilter Minisart 0.4 µm	Sartorius, Göttingen
Sterilfilter Minisart 0.2 µm	Sartorius, Göttingen

Spritze BD Plastipak 10 ml, steril, Luer-Lok™	BD, Heidelberg
Spritze BD Plastipak 30 ml, steril, Luer-Lok™	BD, Heidelberg
Spritze BD Plastipak 50 ml, steril, Luer-Lok™	BD, Heidelberg
Combitips plus 2.5 ml	Eppendorf, Hamburg
Combitips plus 5.0 ml	Eppendorf, Hamburg
Einfrierröhrchen 1,5 ml, Cryo.S, Cellstar	Greiner, Frickenhausen
Kunststoffküvetten 4 mm	Peqlab, Erlangen

Optische Geräte

Lichtmikroskop Optech XDS-1	Exacta + Optech, München
Geldokumentationsanlage Kodak EDAS 290	Fischer Scientific, Ulm
Luminometer LB9607	Berthold, Bad Wildbad
Spektrophotometer BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
ELISA-Spektrometer, TECAN Sunrise	TECAN, Crailsheim

Thermische Geräte

Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Hannover
Heizblock, HLC HBT130	MS Laborgeräte Schroeder, Wiesloch
Kühl-Gefrier-Kombination	Hanseatic

Waagen

Sartorius analytic	Sartorius, Göttingen
Kern KB	Fischer Scientific, Ulm

Zellkultur

Sterile Werkbank Kojair®	MS Laborgeräte Schroeder, Wiesloch
Zählkammer nach Neubauer Improved	Fischer Scientific, Ulm
Inkubator Hera Cell, Heraeus	Fischer Scientific, Ulm

Sonstige Geräte

Magnetrührer, Magnetic stirrer Velp Scientifica
pH-Meter, Multical pH 526

Velp Scientifica, Usmate, Italien
WTW, Weilheim

Zentrifugen

Hermle Z160M

Hermle Labortechnik, Wehingen

Hermle Z300K

Hermle Labortechnik, Wehingen

Heraeus Megafuge 1.0

Fischer Scientific, Ulm

Durchflusszytometer

FACSCalibur

BD Biosciences, Heidelberg

Luziferase-Meßgerät

Lumat LB 9507

Berthold Technologies, Bad
Wildbad

Wallace

Wallace Inc., Gaithersburg,
Maryland, USA

Elektroporationsgeräte

EasyjecT Plus

Peqlab, Erlangen

Gene Pulser[®] II

Bio-Rad Laboratories, München

EasyjecT Optima

Peqlab, Erlangen

Nucleofector[™]

Amaxa GmbH, Köln

Elektrophoreseapparatur

Powersupply BioRad Model 1000/500

Bio-Rad Laboratories, München

PerfectBlue[™] Gelsystem Mini M

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

PerfectBlue[™] Gelsystem Maxi M

Peqlab Biotechnologie, Erlangen

2.2. Chemikalien und Biochemikalien

7-AAD	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Peqlab, Erlangen
ATP	AppliChem, Darmstadt
BSA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cytofix/Cytoperm	BD Pharmingen, Heidelberg
CFSE	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
DMSO	AppliChem, Darmstadt
DTT	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DOTAP Liposomal Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
EDTA	AppliChem, Darmstadt
Ethanol absolut	AppliChem, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
FCS	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Ficoll	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Formaldehyd-Lösung 37%	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	AppliChem, Darmstadt
Glycylglycin	AppliChem, Darmstadt
GolgiStop	BD Pharmingen, Heidelberg
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ionomycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Lipopolysaccharid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Luziferin, freie Säure	AppliChem, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MOPS	Carl Roth, Karlsruhe
Natriumazid	AppliChem, Darmstadt
Natriumhydroxid	AppliChem, Darmstadt
Optimem	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
PBS	BioWhittaker, Apen
Penicillin-Streptomycin	BioWhittaker, Apen

Poly I:C	Amersham Pharmacia, Piscataway, USA
Protaminsulfat	Leo-Pharma, Neu-Isenburg
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot
RNA-Längenstandard	CureVac, Tübingen
RPMI 1640, mit 25 mM HEPES, mit L-Glutamin	BioWhittaker, Apen
Saponin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Streptavidin-APC	Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA
Streptavidin-PE	Molecular Probes, Eugene, Oregon
Tris HCl	AppliChem, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Unifektin	Inst. für org. Chemie, Uni Tübingen, Prof. Jung
X-Vivo 15	BioWhittaker, Apen
β-Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt

2.3. Tumorzelllinien

Name	Herkunft
BHK-21	Hamster, Niere
SKMel28	Human, Melanom
Hela	Human, Zervixkarzinom

2.4. Zytokine

GM-CSF, Leukomax	Novartis Pharma, Basel
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden
IL-2	R&D Systems, Wiesbaden
IL-7	R&D Systems, Wiesbaden
TNF-α	R&D Systems, Wiesbaden

2.5. messenger RNA

Die hier verwendete messenger RNA stammt aus der Produktion der Curevac GmbH, Tübingen (<http://www.curevac.de>). Alle mRNAs wurden mittels *in vitro* Transkription von Plasmid-Konstrukten mittels T7- oder SP6-Polymerase synthetisiert und anschließend chromatographisch aufgereinigt (PUREmessenger™).

2.5.1. RNactive®

Protein	Abkürzung	Grösse
Influenza Matrix M1 Protein	Flu M1	981 bp
MART-1/Melan-A	Melan-A	518 bp
Mucin-1	Mucin-1	
Hepatitis-B Oberflächen Antigen	HBsAg	1235 bp
Luziferase	Luziferase	1825 bp
EGFP	EGFP	876 bp

In den hier durchgeführten Versuchen wird ausschließlich RNactive® verwendet, außer es sind andere stabilisierende Sequenzen angegeben. (Struktur von RNactive® siehe Abbildung 8)

2.5.2. Stabilisierte PUREmessenger™ RNA

Protein	Abkürzung	5' und 3' UTR/Poly(A)
Influenza Matrix Protein	Flu WT β gl	β -Globin/A70
	Flu GC-reich	α -Globin/A70
	Flu GC-reich sekr	α -Globin/A70 + Leadersequenz zur Sekretion
	Flu AG-reich	α -Globin/A70
Hepatitis-B Oberflächen Antigen	HBsAg-A70	Keine /A70
	HBsAg- β gl-A70	β -Globin/A70
	HBsAg- β gl-A30C30	β -Globin/A30C30
Luziferase	Luzi- β -gl-A70	β -Globin/A70
	Luzi β -gl-A30C30	β -Globin/A30C30

2.6. Peptide

Protein	Peptidsequenz	Position
Influenza Matrix Protein	GILGFVFTL	58-66
CMV pp65	NLVPMVATV	495-503
MART-1/Melan-A	EAAGIGILTV	26-35

Die verwendeten Peptide stammen aus der Produktion der Arbeitsgruppe von Prof. S. Stevanovic, Universität Tübingen. Alle verwendeten Peptide sind HLA-A*0201 Epitope.

2.7. Antikörper

Maus-anti-human-CD8 PerCp (BD clone SK1)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human-CD4 FITC (BD clone RPA-T4)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human TNF- α -PE (BD clone MAb11)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD14-PE (BD clone M5E2)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD15-PE (BD clone HI98)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD19-PE (BD clone HIB19)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD3-PE (BD clone HIT3a)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD56-PE (BD clone B159)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD1a-PE (BD clone HU149)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD86-PE (BD clone 2331)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human HLA-DR-PE (BD clone Tü36)	BD Pharmingen, Heidelberg
Maus-anti-human CD11c-PE (BD clone B-ly6)	BD Pharmingen, Heidelberg

2.8. Kits

Monolisa HBs Ag Plus	BioRad Laboratories, München
Anti-PE MicroBeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
T7-Opti mRNA Kit (<i>capped in vitro transcription</i>);	Curevac, Tübingen
SP6-Opti mRNA Kit (<i>capped in vitro transcription</i>)	

2.9. Puffer und Lösungen

2.9.1. Zellbiologie

RPMI-Zellkulturmedium

RPMI 1640 mit

10% Penicillin-Streptomycin (v/v)

10% L-Glutamin (v/v)

10% FCS (v/v)

X-Vivo 15-Kulturmedium

X-Vivo-15 mit

10% Penicillin-Streptomycin (v/v)

10% L-Glutamin (v/v)

PBS

150 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

pH 7,4 mit 5 N NaOH einstellen

Bindepuffer für ELISA

15 mM Na₂CO₃

15 mM NaHCO₃

0,02% NaN₃

pH 9,6

Blockierungspuffer für ELISA

0,05% Tween-20

1% BSA

0,02% NaN₃

in PBS

PBS-Tween-Puffer

0,05% Tween-20
in PBS

ABTS-Substrat

150 mg 2,2'-Azido-bis[3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid]
500 ml 0,1 M Zitronensäure (pH 4,35)
Direkt vor Verwendung 10 µl H₂O₂ (30%) zu 11 ml ABTS-Substrat geben

PFEA-Puffer (Standard FCS-FACS-Puffer)

2% FCS
2mM EDTA
0,01% NaN₃
in PBS

PBEA (BSA-FACS-Puffer)

0,5% BSA
2 mM EDTA
0,01% NaN₃
in PBS

Tetramer-Puffer

50% PBS
50% FCS
2mM EDTA
0,01% NaN₃

Fixierungs-Puffer

2% FCS
2mM EDTA
0,01% NaN₃
1% Formaldehyd
in PBS

Intrazellular-Waschpuffer

0,5% BSA
0,1% Saponin
0,02% NaN_3
in PBS

Lysepuffer für Luziferase Aktivität

25 mM Tris HCl pH 7,8
2 mM EDTA
10% Glycerin (w/v)
1% Triton X-100 (w/v)
direkt vor Verwendung:
2 mM DTT

Messpuffer für Luziferase Aktivität

25 mM Glycylglycin, pH 7,8
15 mM MgSO_4
direkt vor Verwendung:
5 mM ATP (aus ATP-Lösung)

ATP-Lösung

100 mM ATP
200 mM Tris HCl
Aliquots bei -20°C lagern und nach dem Auftauen verwerfen

Luziferin-Lösung (100x)

25 mM Luziferin, freie Säure
25 mM NaOH
Diese Stammlösung wird in Wasser auf $250\ \mu\text{M}$ verdünnt. Lagerung bei -20°C , lichtgeschützt. Kann nach dem Auftauen wieder verwendet werden.

HBS-Puffer für Lipofektion

20 mM HEPES

150 mM NaCl

pH 7,4

2.9.2. Molekularbiologie

10x TBE-Puffer pH 8,4

890 mM Tris-HCL

890 mM Borsäure

20 mM EDTA pH 8,0

10x MOPS-Puffer

200 mM MOPS

50 mM Natriumacetat

10 Mm EDTA

pH 7,0 mit NaOH

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung von Tumorzellen

Die Tumorzellen werden in RPMI-Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert. Das Zellkulturmedium wird alle 2-3 Tage ersetzt. Sind die adhärennten Tumorzellen konfluent, werden sie passagiert. Dazu wird das Zellkulturmedium vollständig abgenommen und soviel Trypsin/EDTA zugegeben dass die Zellen vollständig bedeckt sind. Die Zellen werden damit für 5 min bei 37°C und 7,5% CO₂ inkubiert. Dann werden 10 ml RPMI-Zellkulturmedium zugegeben. Das darin enthaltene FCS inaktiviert das Trypsin. Die Zellen werden mit RPMI-Zellkulturmedium gewaschen und neu ausgesät oder zur Transfektion verwendet.

3.1.2. Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs)

Die Gewinnung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut aus Blut oder Buffy-Coat-Präparationen (Blutbank der Universität Tübingen) von gesunden Spendern erfolgt durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Trennlösung. Da die Dichte von Ficoll mit 1,077 g/ml identisch ist wie die von Lymphozyten und Monozyten, werden diese durch Zentrifugation in der Interphase angereichert und dort als weißer Ring sichtbar. Die Buffy-Coat-Präparationen wird vor Verwendung 1:2 mit PBS verdünnt. Zur Auftrennung mittels Dichtegradientenzentrifugation wird 20 ml Ficoll mit 30 ml Blut bzw. Buffy-Coat/PBS in einem 50 ml Röhrchen überschichtet. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 2000 rpm ohne Bremse für 20 min. Danach befinden sich die Erythrozyten und die Granulozyten im Sediment unterhalb des Ficolls, die mononukleären Zellen (hauptsächlich Monozyten und Lymphozyten) in der Interphase (Schicht zwischen Ficoll und Blutplasma). Diese Interphase wird mit einer sterilen 10 ml-Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues 50 ml Röhrchen überführt. Das Röhrchen wird mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Es erfolgt ein Zentrifugationsschritt bei 1800 rpm für 8 min. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in 50 ml PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 1500 rpm für 10 min wird erneut der Überstand verworfen und das Zellpellet in PBS resuspendiert.

Je nach Ausgangsmenge wird das Volumen so gewählt, dass eine Bestimmung der Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer möglich ist.

3.1.3. Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Zellzahl wird eine Zählkammer nach Neubauer verwendet. Die Zellsuspension wird 1:10 mit Trypanblau-Lösung verdünnt und in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Es werden die Zellen in einem Großquadrat ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgt nach folgender Formel:

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

3.1.4. Generierung von dendritischen Zellen aus PBMCs

Die hier verwendeten DCs werden aus CD14⁺-Blutmonozyten hergestellt. Die Monozyten aus den PBMCs werden über Adhärenz gewonnen.

Die PBMCs werden in X-Vivo 15-Kulturmedium in einer Konzentration von 10 Mio. Zellen/ml resuspendiert. Von dieser Zellsuspension werden jeweils 10 ml in eine liegende 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben und 45 min bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen werden anschließend vorsichtig mit warmem PBS von dem Boden der Zellkulturflasche gewaschen. Die adhärenen Zellen (die Monozyten) werden in 15 ml X-Vivo 15-Kulturmedium mit 100 ng/ml GM-CSF und 40 ng/ml IL-4 kultiviert. An Tag 6 werden die Zellen geerntet, gezählt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

3.1.5. Einfrieren von PBMCs

Viele Zellen können durch Gefrierkonservation fast unbegrenzt aufbewahrt werden. Dazu müssen die Zellen jedoch in dem Gefrierschutzmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) eingefroren werden. Dieses verhindert eine Schädigung der Zellen und die Bildung von intrazellulären Kristallen. Dazu werden die Zellen in einer eiskalten FCS/10%

DMSO-Lösung in einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml resuspendiert und jeweils 1 ml in ein Kryoröhrchen überführt. Dies soll möglichst schnell und auf Eis erfolgen, da DMSO bei Temperaturen über 4°C toxisch auf die Zellen wirkt. Die Kryoröhrchen werden in einem Kryocontainer (Nunc) für 6 h bei -80°C eingefroren und dann zur langfristigeren Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.1.6. Auftauen von PBMCs

Die Kryoröhrchen werden im 37°C warmen Wasserbad schnell aufgetaut und in ein Röhrchen mit 10 ml PBS überführt. Nach Zentrifugation bei 1400 rpm für 5 min werden die PBMCs in 37°C warmem Zellkulturmedium aufgenommen und entsprechend weiterverarbeitet.

3.1.7. MACS[®] (magnetic cell sorting)

Die MACS-Technologie stellt die Standardmethode zur Separation von unterschiedlichen Zellpopulationen dar. Sie basiert auf der Verwendung von MACS MicroBeads. Diese sind superparamagnetische Partikel mit einer Größe von ca. 50 nm, die an spezifische Antikörper gekoppelt sind. Diese markieren die Population der Zielzellen magnetisch. Diese magnetisch markierten Zellen werden auf eine MACS-Säule gegeben, die sich in einem starken Magnetfeld befindet. Die spezifisch magnetisch markierten Zellen werden in der Säule festgehalten, die unmarkierten Zellen fließen durch die Säule. Nach Entfernung des Magnetfelds können die magnetisch markierten Zellen eluiert werden. Mit der MACS-Technologie ist sowohl die positive Selektion von bestimmten Zellpopulationen, als auch die Depletion von Zellpopulationen möglich.

Es wird hier die Methode der positiven Selektion verwendet, um $\text{CD}19^{+}$ -, $\text{CD}14^{+}$ - und $\text{CD}3^{+}$ -Zellen aus PBMCs zu separieren. Es werden anti-PE MicroBeads verwendet. Dazu werden die Zellen zuerst mit dem für das Oberflächenantigen spezifischen mit dem Fluorochrom PE (R-Phycoerythrin) markierten Antikörper gefärbt. Anschließend werden die Zellen mit den anti-PE MicroBeads inkubiert. Diese binden spezifisch an das R-Phycoerythrin und markieren somit die zu separierenden Zellen magnetisch.

Die Auftrennung erfolgt nach dem Protokoll des Herstellers über MiniMACS-Säulen. Nach erfolgter Auftrennung wird die Zellzahl bestimmt und die Reinheit der Zellpopulation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hierbei kann die Fluoreszenz des bereits verwendeten R-Phycoerythrin (PE)-markierten Antikörpers, der bereits an die Zellen gebunden ist untersucht werden.

3.1.8. CTL-Induktion mit mRNA-transfizierten Zellen

Die elektroporierten PBMCs und unreifen DCs werden über Nacht in X-Vivo 15-Kulturmedium das 100 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) und 2,5 ng Tumor Nekrose-Faktor (TNF)-α aktiviert. Die Zellen werden dreimal mit X-Vivo 15-Kulturmedium gewaschen. Dann werden sie in X-Vivo 15-Kulturmedium in einer Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wird jeweils 1 ml/Well in einer 24-Well-Zellkulturplatte ausgesät. In jedes Well der Zellkulturplatte werden 2×10^6 aufgetaute autologe PBMCs in 0,5 ml Medium gegeben und schräg im Inkubator gelagert, um bessere Zell-Zell-Kontakte zu erreichen.

An Tag 4 wird vorsichtig 1 ml des Zellkulturüberstands abgenommen und für Zytokinbestimmungen durch ELISA bei -20°C eingefroren. Es wird 1 ml frisches vorgewärmtes X-Vivo 15-Kulturmedium und 10 Units/ml Interleukin-2 (IL-2) und 5 ng/ml Interleukin-7 (IL-7) zugegeben. Nun wird die Zellkulturplatte wieder flach im Inkubator gelagert. (Abbildung 5)

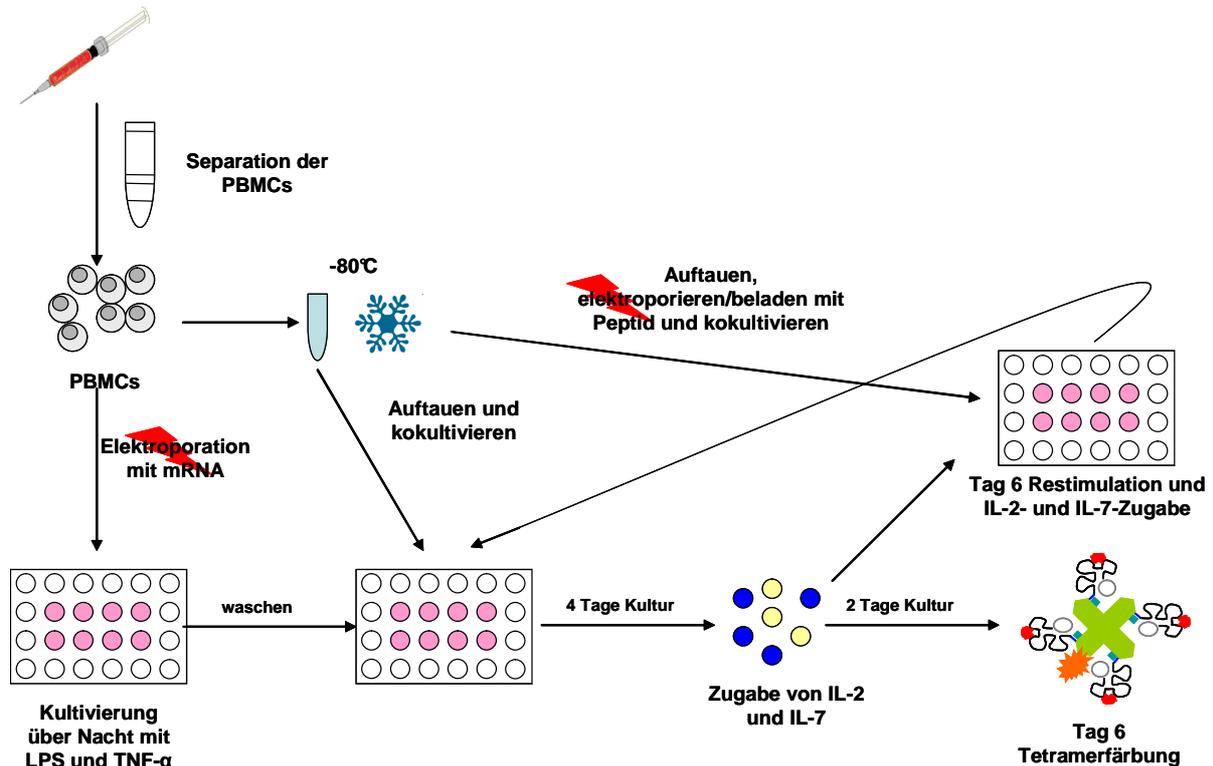


Abbildung 5 CTL-Induktion mit elektroporierten PBMCs.

Die PBMCs werden mittels Dichtegradientenzentrifugation gewonnen, mit mRNA elektroporiert, mit LPS und TNF- α über Nacht aktiviert, gewaschen und mit autologen aufgetauten PBMCs für 4 Tage kokultiviert. Dann werden IL-2 und IL-7 zugegeben. Nach 2 weiteren Tagen Kultur werden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert und gegebenenfalls mit peptidbeladenen autologen PBMCs restimuliert.

3.1.8.1. Restimulation

In einigen Experimenten werden die CTLs restimuliert, um die Population der Effektorzellen zu vergrößern. Dazu werden aufgetaute autologe PBMCs mit mRNA elektroporiert und an Tag 6 und an Tag 12 zu den Kulturansätzen gegeben. Dazu wird jeweils 1 ml des Zellkulturüberstands abgenommen und 2×10^6 elektroporierte PBMCs in 1 ml Kulturmedium und 10 Units/ml IL-2 und 5 ng/ml IL-7 zugegeben. An Tag 10 und Tag 16 erfolgt ein Mediumwechsel wie für Tag 4 beschrieben ist.

3.1.9. CFSE-Markierung von PBMCs

Zur Untersuchung der Proliferation von PBMCs nach der Elektroporation mit mRNA werden die PBMCs mit 5-6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) fluoreszent markiert.

CFSE ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch Modifikation der Carboxyl-Gruppen des Moleküls mit Acetomethyl-Estergruppen ein relativ ungeladenes Molekül darstellt. Dieser Farbstoff kann durch die Zellmembran hindurch ins Zytosol der Zellen gelangen. Durch endogene Esterasen in der Zelle werden die lipophilen Gruppen gespalten, was zur geladenen Form des Farbstoffes führt: Diese geladene Form wandert nur langsam aus der Zelle und kann kovalent an freie Aminogruppen von Proteinen in der Zelle gebunden werden. Die Mutterzelle ist somit fluoreszent markiert. Bei jeder Zellteilung wird der Farbstoff gleichmäßig auf die Tochterzellen verteilt, somit nimmt die Fluoreszenz der Zellen bei jeder Zellteilung kontinuierlich ab (Lyons und Parish, 1994).

Das CFSE-Pulver wird mit DMF (Dimethylformamid) so verdünnt damit eine 1000x Stammlösung in der Konzentration von 1 mM erhalten wird. Die Aliquots werden dunkel bei -80°C gelagert.

Zur Markierung werden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen. Dann werden die zu markierenden Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in PBS aufgenommen und die CFSE-Stammlösung unter leichtem Schütteln zugegeben (Endkonzentration 1 μ M). Die Zellen werden für 4 min im Dunkeln inkubiert und zwischendurch immer wieder durch leichtes Schütteln gemischt. Dann werden die Zellen mit 50 ml RPMI-Medium + 2% FCS gewaschen. Daraufhin erfolgen 2 weitere Waschschriffe mit jeweils 50 ml PBS. Die fluoreszent markierten Zellen werden dann im entsprechenden Zellkulturmedium aufgenommen und dunkel gelagert.

3.1.10. Test der Zellviabilität

Um feststellen zu können wie viele Zellen nach erfolgter Elektroporation nicht mehr funktionsfähig sind wird eine Bestimmung der Viabilität mit 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) durchgeführt. 7-AAD ist ein roter Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die DNA (bevorzugt an CG-Basenpaaren) einlagert, wenn Zellmembran nicht mehr intakt ist (z.B. bei toten oder fixierten Zellen). Er wird im dritten Fluoreszenzkanal (FACSCalibur) gemessen. Extinktion/Anregung: 488 nm; 546 nm (Maximum) Emission: 647 nm.

6 h nach Elektroporation werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. 1×10^5 Zellen werden in 150 μ l PBS + 1% FCS resuspendiert und sofort mit 3,2 μ l 7-AAD gefärbt. Direkt im Anschluss wird die Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen.

3.1.11. Intrazelluläre Zytokin-Färbung

Die intrazelluläre Zytokinfärbung basiert auf der Identifikation intrazellulärer Antigene durch monoklonale Antikörper. Durch die durchflusszytometrische Messung intrazellulärer Zytokine in den Zellen ist die Analyse individueller Zytokinproduzierender Zellen auf Einzellzellniveau bei gleichzeitiger Charakterisierung der Zelle möglich. Um ein im Durchflusszytometer messbares Fluoreszenzsignal zu erhalten, müssen die Zellen spezifisch zur Zytokinproduktion stimuliert werden und gleichzeitig die Sekretion des Zytokins zu inhibieren. Dies wird mit GolgiStop erreicht. Anschließend werden die Zellen fixiert und mit Saponin permeabilisiert. So akkumulieren sich die synthetisierten Zytokine im Golgi-Apparat und können durch fluorochrommarkierte Antikörper detektiert werden. Ein Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit einer Charakterisierung der zytokinsekretierenden Zellen durch gegen bestimmte Oberflächenmarker gerichtete weitere fluorochrommarkierte Antikörper. Mit Hilfe dieser Methode können Angaben über den Prozentsatz oder die Anzahl der zytokinproduzierenden Zellen eines bestimmten Zelltyps gemacht werden, jedoch nicht Angaben über die Menge des von der Zelle produzierten Zytokins.

An Tag 6 der CTL-Kultur werden die Zellen geerntet. Sie werden in 100 μ l X-Vivo 15-Kulturmedium mit 0,66 μ l/ml GolgiStop und 1 μ g/ml des zu untersuchenden Peptids resuspendiert und 5 h in einer 96-Well-Zellkulturplatten inkubiert. Die Zellkulturplatte wird 2 min bei 1700 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 100 μ l/Well Cytofix/Cytoperm resuspendiert. Es erfolgt eine Inkubation für 20 min bei 4°C. Bei diesem Schritt werden die Zellen fixiert und die Zellmembran wird durchlässig für die Antikörper, die in der darauf folgenden Antikörperfärbung zugegeben werden. Dann werden die Zellen dreimal mit 200 μ l/Well Intrazellular-Waschpuffer gewaschen und in 150 μ l/Well Intrazellular-Waschpuffer mit 10 μ l anti-human CD4-FITC-, 13 μ l anti-human CD8-PerCP- und 1 μ l anti-human TNF- α -PE-Antikörper resuspendiert. Die Zellen werden dann 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Dann werden sie dreimal mit 200 μ l/Well Intrazellular-Waschpuffer gewaschen und bis zur Analyse im Durchflusszytometer in Intrazellular-Waschpuffer im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt.

3.1.12. Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA)

Der *Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay* ist eine immunologische Standardmethode, bei der spezifische Antikörper mit ihrem Fc-Fragment an eine feste Oberfläche gebunden werden und Proteine spezifisch binden können. Die Menge an gebundenem Protein kann durch einen zweiten Antikörper bestimmt werden, der mit einem Enzym gekoppelt ist. Dieses Enzym löst bei Zugabe seines Substrats eine Farbreaktion aus, die mittels Photometrie quantitativ gemessen werden kann.

Für die Versuche werden Zellkulturüberstände verwendet, die bis zu ihrer Verwendung bei -20°C eingefroren wurden.

Die ELISA-Platten werden mit 50 µl/Well Bindepuffer mit 1 µg/ml des Fängerantikörpers über Nacht bei 4°C inkubiert. Dann erfolgt die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 200 µl/Well Blockierungs-Puffer. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wird die dreimal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. Dann werden 100 µl/Well des zu testenden Zellkulturüberstands zugegeben und 4 h bei 37°C inkubiert. Darauf wird 4 mal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen. Dann werden 100 µl/Well biotinylierter Detektions-Antikörper in Blockierungs-Puffer (0,5 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es wird viermal mit PBS-Tween-Puffer gewaschen und dann 100 µl/Well HRP (*Horse-Radish-Peroxidase*)-Streptavidin (1:1000 verdünnt in Blockierungs-Puffer) zugegeben und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3-maligem Waschen mit PBS-Tween-Puffer werden 100 µl/Well ABTS-Substrat zugegeben und die Extinktion sofort im Photometer bei 405 nm gemessen.

3.1.13. Bestimmung der HBsAg-Konzentration im Zellkulturüberstand

Zur Bestimmung der Proteinmenge im Zellkulturüberstand nach Transfektion mit mRNA die für HBsAg kodiert wird der MONOLISA[®] Ag HBs PLUS verwendet. Dieser Einschritt-Enzymimmunoassay vom Typ „Sandwich“ dient normalerweise dem Nachweis des Oberflächenantigens von Hepatitis B (HBsAg) in Humanserum und – plasma. Zur Durchführung wird das Protokoll des Herstellers verwendet.

3.1.14. Messung der Luziferaseaktivität

Zur Messung der Luziferase-Aktivität werden 4 Mio. PBMCs bzw. 2 Mio. BHK-21 mit 10 µg Luziferase-mRNA in 200 µl Optimem elektroporiert. Es werden die Standardelektroporationsparameter (300 V, 150 µF, 1540 Ω, 231 ms) verwendet. Die Zellen werden in RPMI-Zellkulturmedium (BHK-21) bzw. X-Vivo 15-Kulturmedium (PBMCs) so aufgenommen, dass man 16×10^5 PBMCs/ml bzw. 8×10^5 BHK-21/ml erhält. Von dieser Zellsuspension werden für jeden Zeitpunkt 200 µl/Well in 2 Wells einer 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Bis zum zu untersuchenden Zeitpunkt wurden die Zellen im Inkubator kultiviert. Dann wird der Zellkulturüberstand abgenommen und 50 µl Lysepuffer für Luziferase Aktivität zugegeben. Bis zur Messung der Luziferase-Aktivität wird das Zelllysate bei -20°C eingefroren. Zur Luziferase-Messung werden die Zelllysate auf Eis aufgetaut. Es werden 50 µl/Probe in ein Messröhrchen pipettiert. Am Luminometer werden die Vorratsbehälter für Messpuffer und Luziferin-Lösung angeschlossen. Am Luminometer werden folgende Parameter eingestellt: Injektion von 300 µl Messpuffer und dann von 100 µl Luziferin-Lösung, 2,2 sec Pause zwischen der Zugabe der zwei Lösungen, 2,15 sec Messung, ohne Hintergrundmessung, 1 Replikat, ohne Kinetik. Bis zur Messung werden die Proben auf Eis gelagert.

3.1.15. MHC-Klasse I-Tetramere

1997 wurde von Altmann eine Methode zur Identifizierung von antigenspezifischen T-Zellen durch tetramere MHC-Moleküle entwickelt (Altman et al., 1996). Hierfür werden lösliche MHC-Moleküle exprimiert, mit dem entsprechenden Peptid beladen, aufgereinigt und biotinyliert. Dann werden die einzelnen MHC-Moleküle mit Fluoreszenz markiertem Streptavidin tetramerisiert. Diese Tetramere können dann in der Zellanalyse durch Durchflusszytometrie eingesetzt werden. Die Färbung der spezifischen T-Zellen beruht auf der Bindung der tetrameren MHC-Peptid-Komplexe an den entsprechenden T-Zell-Rezeptor auf der T-Zelle. Diese Methode ist sehr sensitiv, trifft aber keine Aussage über die Funktionalität der gefärbten T-Zellen.

3.1.15.1. Herstellung von Tetrameren

Die peptidbeladenen MHC-Klasse I-Monomere stammen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Stevanovic (Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen). Die Monomere werden auf Eis aufgetaut und anzentrifugiert. Es wurden Tetramere mit Streptavidin hergestellt, das mit Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC) markiert war hergestellt. Zur Tetramerisierung von 50 µg MHC-Monomer werden 78 µl Streptavidin-PE und 43,5 µl Streptavidin-APC benötigt. Diese Menge wird in zehn Schritten zugegeben. Zwischen den einzelnen Schritten liegen 30 min Inkubation bei 4°C unter ständigem Drehen. Es werden also 10 mal 7,8 µl bzw. 4,35 µl Streptavidin zugegeben. Die Herstellung der Tetramere wird im Dunkeln und gekühlt ausgeführt (Abbildung 6).

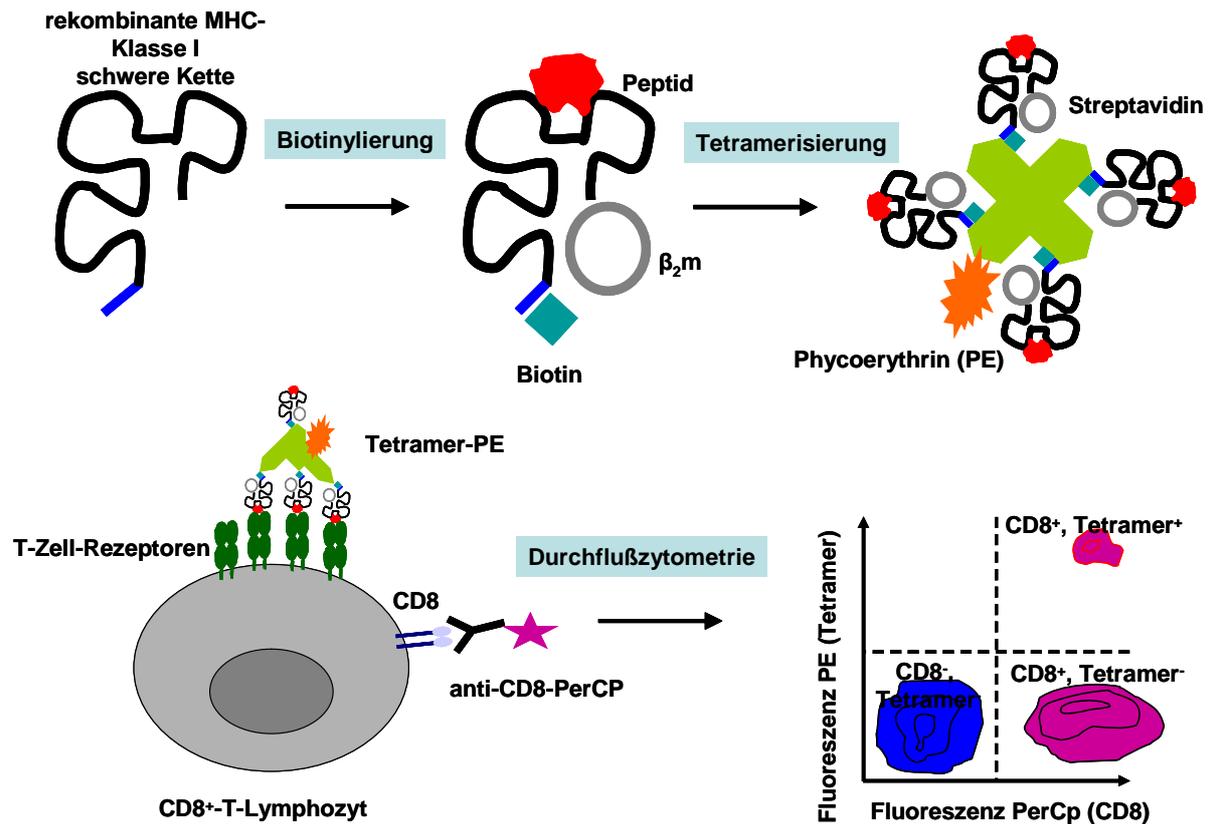


Abbildung 6 Herstellung von MHC-Klasse I-Tetrameren und Tetramer-Färbung.

Rekombinante MHC-Klasse I schwere Ketten werden biotinyliert und mit Peptid beladen. Dann werden sie mit Streptavidin, das fluoreszent markiert ist tetramerisiert. Die MHC-/Peptid-Komplexe binden an spezifische T-Zell-Rezeptoren und markieren diese fluoreszent. Diese markierten Zellen können im Durchflußzytometer ausgewertet werden.

3.1.15.2. Tetramer-Färbung

An Tag 6 werden die Zellen geerntet und mit HLA-A*0201-Tetrameren des entsprechenden immundominanten Peptids gefärbt. Die Zellen werden zunächst mit PFEA-Puffer gewaschen. Dann werden die Zellen in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen/150 μ l in PFEA-Puffer resuspendiert und jeweils 150 μ l dieser Zellsuspension in eine 96-Well-Zellkulturplatte pipettiert. Die Platte wird für 2 min bei 1800 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen dann in 150 μ l PBEA-Puffer mit den entsprechenden Antikörpern resuspendiert. Es wurden hier 10 μ l/Well anti-human-CD4 FITC und 14 μ l/Well anti-human CD8 PerCP verwendet. Die Platte wird 20 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen werden einmal mit 200 μ l/Well PFEA-Puffer gewaschen und dann in 150 μ l/Well Tetramer-Puffer mit den entsprechenden Tetrameren in einer Konzentration von 5 μ g/ml resuspendiert. Es

erfolgt ein weiterer Inkubationsschritt für 30 min, bei 4°C im Dunkeln. Dann werden die Zellen dreimal mit PFEA-Puffer gewaschen und das Pellet in 200 µl Fixierungspuffer resuspendiert. Diese fixierten Zellen können mehrere Tage bis zur Analyse im Durchflusszytometer bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

3.1.16. Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) können physikalische und biochemische Eigenschaften von Zellen auf der Grundlage von Emission und Lichtbrechung untersucht werden. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben (Antikörper, Rezeptoren, Streptavidin, usw.) Zellpopulationen zu charakterisieren.

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (FACS-Analyse) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert und ist proportional zur Anzahl der gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern auf der Zelle. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granularität des Zytoplasmas der Zellen gewonnen. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsspektren verfügen.

Die Grundlagen für die Durchflusszytometrie so wie wir sie heute kennen wurden 1949 von Wallace Coulter gelegt. Er beantragte ein Patent zur Zählung von gelösten Partikeln und erleichterte damit die Leukozytenzählung bei der Blutanalyse. Ein

weiterer Meilenstein war die Entdeckung des Prinzips der hydrodynamischen Fokussierung durch Van Dilla. Vorangetrieben durch die rasanten Entwicklungen in der Laser- und Computertechnik wurden Geräte entwickelt, wie wir sie heute als moderne Durchflusszytometer kennen. Diese leistungsfähigen Instrumente erlauben standardmäßig die Analyse und Sortierung von 5000 Partikeln pro Sekunde. Die Geschwindigkeit kann unter Umständen mit Zusatzausstattung auf 20.000 Partikel pro Sekunde und mehr gesteigert werden. Dabei können bis zu 7 Parameter gleichzeitig analysiert und verarbeitet werden. Neue Hochleistungs-Sorter bringen es bei 10 Parametern sogar auf 70.000 Partikel pro Sekunde.

3.1.17. Transfektion von mRNA

3.1.17.1. Passive Pulsing

Beim „*passive Pulsing*“ werden die PBMCs oder DCs Zellen ohne Transfektionsreagenz mit der mRNA koinkubiert. Die mRNA soll von der Zelle aufgenommen werden und das Protein exprimiert werden.

Es werden 1×10^5 Zellen/Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte in 100 μ l/Well X-Vivo 15 Kulturmedium gegeben. Die mRNA wird ohne Stabilisierung, mit Protamin oder mit dem RNase-Inhibitor RNasin versetzt zugegeben. Nach 24 h Inkubation werden die Zellen geerntet und analysiert.

3.1.17.2. Peptid-pulsing von DCs und PBMCs

Als Positivkontrolle zur Elektroporation mit mRNA werden die PBMCs und DCs von HLA-A*0201 positiven Spendern mit dem entsprechenden Peptid beladen. Dazu wird die benötigte Anzahl von Zellen in einer Konzentration von 10^6 Zellen/ml in X-Vivo 15-Kulturmedium resuspendiert und in einem 50 ml Röhrchen für 1 h mit 1 μ g/ml Peptid bei 37°C inkubiert. Dann werden die Zellen 3 mal mit warmem PBS gewaschen. Die Zellen werden in X-Vivo 15-Kulturmedium resuspendiert und dann ebenso wie die Zellen aus der Elektroporation mit zusammen mit autologen aufgetauten PBMCs kultiviert.

3.1.17.3. Lipofektion

Lipofektion mit Unifektin

Zur Transfektion werden 4×10^5 Tumorzellen/Well in eine 24-Well-Zellkulturplatte in 1 ml RPMI-Komplettmedium über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wird der Zellkulturüberstand abgenommen. Für die Transfektion von Primärzellen wird die Transfektion sofort durchgeführt.

Es wird folgender Liposomenmix unter RNase-freien Bedingungen vorbereitet: 1 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) und 1 μ g Protamin werden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gemischt. Es wird 5 μ l Unifektin und 50 μ l HBS-Puffer zugegeben und der Ansatz durch vorsichtiges auf und ab Pipettieren vermischt. Dieser Ansatz wird für ca. 15 min auf Eis inkubiert. Dann werden 200 μ l Optimem zugegeben und der Transfektionsmix tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Die Zellen werden 4 h bei 37°C und 7,5% CO₂ kultiviert. Dann wird 1 ml/Well RPMI-Komplettmedium (ohne Penicillin/Streptomycin) zugegeben und nochmals für 4 h inkubiert. Die Zellen werden geerntet und durchflusszytometrisch auf EGFP-Expression untersucht.

Lipofektion mit DOTAP

Zur Lipofektion mit dem Transfektionsreagent DOTAP werden 1×10^6 PBMCs oder DCs /Well in eine 6-Well-Zellkulturplatte in 3 ml X-Vivo 15-Kulturmedium (ohne Penicillin/Streptomycin) gegeben. Dann wird der Transfektionsmix unter RNase-freien Bedingungen hergestellt. Dazu werden 5 μ l mRNA (1 μ g/ μ l) mit 45 μ l HBS-Puffer gemischt. In einem weiteren Ansatz werden 30 μ l DOTAP mit 70 μ l HBS-Puffer durch auf und ab pipettieren vermischt. In diesen Ansatz wird das mRNA-Gemisch pipettiert und vorsichtig gemischt. Dieses Gemisch wird für 15 min auf Eis inkubiert. Dann wird 1 ml X-Vivo 15-Kulturmedium (ohne Penicillin/Streptomycin) zugegeben. Der RNA-Liposomen-Mix wird dann tropfenweise unter leichtem Schwenken der Zellkulturplatte zu den Zellen gegeben. Diese werden dann für 4 h bei 37°C, 7,5% CO₂ inkubiert. Das Medium wird abgenommen und 4 ml frisches, auf 37°C vorgewärmtes X-Vivo 15-Kulturmedium wird zugegeben. Die transfizierten Zellen werden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag zur Auswertung geerntet.

3.1.17.4. Elektroporation

Bereits im Jahre 1982 wurde die Elektroporation als Methode entwickelt um Makromoleküle in lebende Zellen einzuschleusen (Neumann et al., 1982). Diese Methode hat während der letzten Zeit in der Molekular- und Zellbiologie, der Pflanzengenetik und vielen weiteren Gebieten eine große Verbreitung gefunden. Die Elektroporation ist zu einer bewährten und einfachen Methode geworden um die verschiedensten Makromoleküle, darunter auch DNA und RNA in Zellen einzubringen. Sie basiert auf einer kurzen, schnell vorübergehenden Destabilisierung der Zellmembran durch elektrische Pulse. Während dieser kurzen Destabilisierung können durch die entstandenen Poren Moleküle in die Zelle aufgenommen werden. Der molekulare Mechanismus der Porenbildung ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist jedoch bekannt, dass ein von außen an die Zelle angelegtes elektrisches Feld ein porenbildendes Membranpotential induziert. Das elektrische Feld wird durch einen nur wenige Millisekunden dauernden und exponentiell abfallenden Gleichstrompuls aufgebaut. Wenn das Potential der Membran einen bestimmten Schwellenwert überschritten hat, kommt es zu einem vorübergehenden Zusammenbruch der Membranintegrität und zur Porenbildung. Für dieses Ereignis sind die Parameter Feldstärke und Pulslänge von entscheidender Bedeutung.

Parameter bei der Elektroporation:

Feldstärke: Die Feldstärke wird in der Einheit V/cm angegeben. Sie stellt die aktuelle Spannung im Küvettenpalt dar. Durch sie wird die Anzahl der gebildeten Poren bestimmt. Es gibt für jede Art von Zellen eine bestimmte Feldstärke, die optimal für die Transfektion ist. Dies ist abhängig von der Größe der Zellen und vom Aufbau der Membran. In der Regel gilt: Die Feldstärke muss umso größer sein, je kleiner die Zellen sind.

Pulslänge: Darunter versteht man die Zeitspanne in der die Zellen dem elektrischen Feld ausgesetzt sind. Sie wird in Sekunden angegeben und je nach Pulsform unterschiedlich berechnet. Sie hängt von der Konduktivität des Mediums ab und verhält sich zu dieser umgekehrt proportional. Die Pulszeit bestimmt wie lange die Poren in der Membran geöffnet sind.

Elektroporation von DCs und PBMCs

Vor der Elektroporation werden die Zellen in Optimem gewaschen und dann in einer Konzentration von 4×10^6 Zellen/200 μ l in Optimem aufgenommen. 200 μ l der Zellsuspension werden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, in welchem bereits 10 μ g mRNA vorgelegt sind. Diese Schritte erfolgen auf Eis, da die RNA bei höheren Temperaturen sonst dem Abbau durch RNasen ausgesetzt ist, bevor sie durch die Elektroporation in die Zelle gelangen kann. Die Zellen werden durch vorsichtiges pipettieren mit der RNA vermischt und sofort in eine vorgekühlte 0,4 cm-Elektroporationsküvette gegeben. Es wird sofort mit der Elektroporation begonnen. Die Elektroporation erfolgt mit folgenden Parametern: Spannung von 300 V, Kapazität von 150 μ F, Widerstand von 1540 Ω und einer Pulszeit von 231 ms. Sofort nachdem der Puls erfolgt ist werden die Zellen aus der Elektroporationsküvette pipettiert und in 1,5 ml vorgewärmtes X-Vivo 15-Kulturmedium pipettiert, das bereits in einer 24-Well-Zellkulturplatte vorgelegt ist. Die Elektroporationsküvette wird nochmals mit Kulturmedium gespült, um alle Zellen in Kultur nehmen zu können.

3.2. Molekularbiologische Methoden

3.2.1. Herstellung der mRNA

Zur Synthese der verwendeten mRNA wird die gewünschte kodierende Sequenz in einen Plasmidvektor kloniert. Dieser wird linearisiert und dann die mRNA durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Die Aufreinigung der somit gewonnenen mRNA erfolgt durch Präzipitation oder Chromatographie. Die Qualitätskontrolle erfolgt über eine Agarose-Gelelektrophorese.

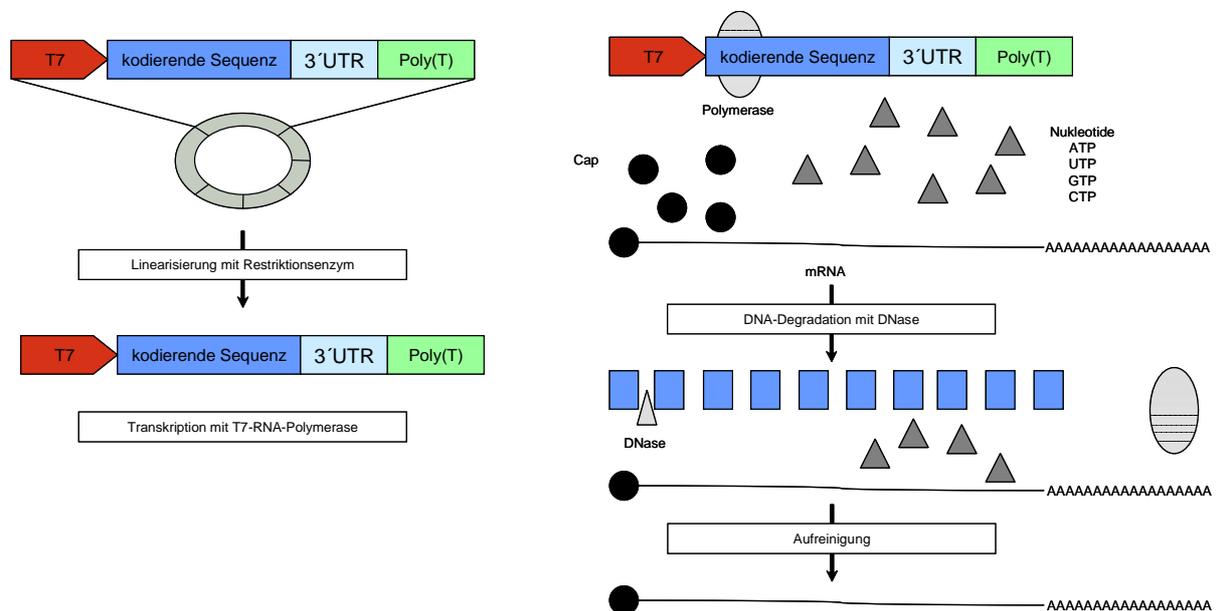


Abbildung 7 *In vitro*-Transkription.

Das Plasmid mit dem gewünschten Konstrukt wird linearisiert und daraufhin durch Zugabe von RNA-Polymerase, Cap und Nukleotide transkribiert. Die DNA, die als Matrize diente, wird durch Zugabe von DNase abgebaut. Anschließend wird die synthetisierte mRNA durch Fällung mit Lithiumchlorid aufgereinigt.

3.2.1.1. Produktionsvektor

Als Produktionsvektor zur Transkription *in vitro* wird das Plasmid pT7TS verwendet. Dieses Plasmid besitzt den T7-Promotor, der spezifisch für die rekombinante RNA-Polymerase ist. Im Anschluss an die klonierte kodierende Sequenz besitzt der Vektor

als 3'UTR eine α -Globin- und anschließend eine Poly(A)-Sequenz, sowie vor der gewünschten Sequenz als 5'UTR eine β -Globin-Sequenz.



Abbildung 8 Struktur von RNactive®.

Auf die Cap-Struktur folgt eine β -Globin 5' untranslatierte Region. Nach der kodierenden Sequenz folgt die Sequenz des α -Globins als 3' untranslatierte Region (UTR).

3.2.1.2. Linearisierung des Plasmids

Vor der *in vitro*-Transkription wird das verwendete Plasmid zunächst linearisiert. Dieser Schritt ist notwendig, da supercoiled DNA zwar auch zur Transkription verwendet werden kann, aber die Ausbeute an RNA wesentlich geringer ist.

Ansatz:

- 1 μ g DNA-Plasmid
- 2 μ l 10x Restriktionspuffer (passend für verwendetes Enzym)
- add 19 μ l mit nukleasefreiem Wasser
- 1 μ l Restriktionsenzym [10 u/ μ l]

Die Herstellung des Reaktionsansatzes erfolgt auf Eis in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß. Nach sorgfältigem Vortexen wird der Ansatz für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Qualität des Restriktionsverdau wird durch DNA-Agarosegelelektrophorese ausgewertet.

3.2.1.3. DNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung des Agarosegels wird die entsprechende Menge an Agarose je nach Länge des zu untersuchenden DNA-Fragments (siehe Tabelle) in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und in 50 ml TBE-Puffer aufgelöst. Die Agaroselösung wird in der Mikrowelle solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und eine homogene Lösung entstanden ist. Die Agaroselösung wird auf 60°C abgekühlt und 0,5 μ l Ethidiumbromidlösung werden zugegeben und vermischt. Das Gel wird in die Gelvorrichtung mit dem Probenkamm gegossen und

bis zum Festwerden abgekühlt. Der Probenkamm wird entfernt und das Gel um 90° in der Gelkammer gedreht. Die Gelkammer wird bis zur Markierung mit ca. 400 ml TBE-Puffer gefüllt und das Gel für ca. 30 Minuten equilibriert. Die zu untersuchenden DNA-Proben werden in nukleasefreiem Wasser auf ein Volumen von 20 ml verdünnt. Es werden dann 4 µl 6x DNA-Probenladepuffer zugegeben. Die Probenlösung wird vorsichtig in die Probenfächer im Agarosegel pipettiert. Die Spannungsquelle wird angeschlossen und das Gel bei ca. 40 V für 2 h laufen gelassen. Das Gel wird im UV-Licht mit der Geldokumentationsapparatur ausgewertet und fotografiert.

DNA-Länge [kb]	Agarosekonzentration [%(w/v)]	Agarosemenge [g]
5-60	0,3	0,15
1-20	0,6	0,30
0,8-10	0,7	0,35
0,5-7	0,9	0,45
0,4-6	1,2	0,60
0,2-3	1,5	0,75
0,1-2	2,0	1,00

3.2.1.4. *In vitro*-Transkription

Bei der *in vitro*-Transkription wurde nach dem Protokoll des Herstellers vorgegangen.:

1 µl	linearisierte Plasmid-DNA [1µg/µl]
4 µl	5x Transkriptionspuffer
0,1 µl	NTP-Mix
10,5 µl	H ₂ O
1 µl	Polymerase Mix

Das verschlossen Gefäß wird im Brutschrank bei 37°C für 4 h inkubiert.

Dann erfolgt die Entfernung der Template-DNA. Hierfür wird 1 µl DNase zugegeben, vermischt und für 1 h bei 37°C inkubiert. Darauf erfolgt ein Aufreinigungsschritt durch LiCl-Fällung. Dazu werden 30 µl H₂O und 25 µl LiCl-Lösung zugegeben und

mindestens 10 Sekunden gevortext. Der Ansatz wird für mindestens 1 h bei -20°C inkubiert und dann bei 4°C und bei maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Auf das Pellet werden 5 µl 75%iges Ethanol gegeben und nochmals für 20 min bei 4°C und bei maximaler Beschleunigung zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Pellet wird dann unter der Sicherheitswerkbank getrocknet. Zur Resuspension werden zu dem gut getrockneten Pellet 10 µl H₂O gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Konzentration der synthetisierten mRNA wird photometrisch bestimmt. Die Qualität der RNA wird mittels Agarose-Gelelektrophorese kontrolliert.

3.2.1.5. Agarosegelelektrophorese von mRNA

Die Qualitätskontrolle der hergestellten mRNA erfolgt in einem 1,2%igen denaturierenden Agarosegel. Zur Herstellung des Gels werden 0,6 g Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und in 45 ml nukleasefreiem Wasser und 5 ml 10x MOPS-Puffer gelöst. Die Suspension wird dann im Mikrowellenherd solange erhitzt bis die Agarose vollständig gelöst ist. Der Erlenmeyerkolben wird dazu immer wieder aus dem Mikrowellenherd genommen und vorsichtig geschüttelt. Die Lösung wird auf 65°C abgekühlt und 0,9 ml 37%ige Formaldehydlösung unter dem Abzug zugegeben. Dann wird die Gellösung sofort in die Gelkammer die mit einem Probenkamm versehen ist gegossen. Wenn sich das Gel verfestigt hat, wird der Probenkamm vorsichtig entfernt und das Gel in der Elektrophoresekammer um 90° gedreht. Die Gelkammer wird mit RNA-Laufpuffer bis zur eingezeichneten Markierung gefüllt und ca. 30 min equilibriert. Zur Vorbereitung der Proben werden 1 µg der mRNA mit 10 µl nukleasefreiem Wasser und 3 ml 6x RNA-Probenladepuffer vermischt. 5 µl der RNA-Leiter werden in 15 µl nukleasefreiem Wasser verdünnt und mit 4 ml 6x RNA-Probenladepuffer vermischt. Die RNA-Proben und die -Leiter werden für 5 min bei 70°C erhitzt. Die Proben werden vorsichtig in die Probentaschen des Gels pipettiert. Die Spannungsquelle wird angeschlossen und das Gel bei ca. 40 V für ca. 2 h laufen gelassen.

4. Ergebnisse

4.1. mRNA-Transfektion

4.1.1. Test unterschiedlicher Transfektionsmethoden

4.1.1.1. Elektroporation der mRNA in Tumorzellen

Um die Qualität der verwendeten mRNA zu testen und zur Etablierung einer Positivkontrolle wurde die Elektroporation von mRNA in Tumorzellen vorgenommen. Es wurden dieselben Elektroporationsparameter verwendet wie sie zur Elektroporation von mRNA in dendritische Zellen in der Literatur beschrieben sind (Grunebach et al., 2003). Es wurden 4 Mio. Zellen in Optimem-Medium aufgenommen und mit 10 µg mRNA die für das *Enhanced green fluorescent protein* (EGFP) elektroporiert. Die verwendeten Tumorzellen sollten in sich in der linearen Wachstumsphase befinden und zu ca. 80% konfluent sein, um ein optimales Expressionsergebnis zu erzielen. 6 h nach der Elektroporation wurden die Zellen fixiert und im Durchflusszytometer die Expression von EGFP analysiert (Abbildung 9).

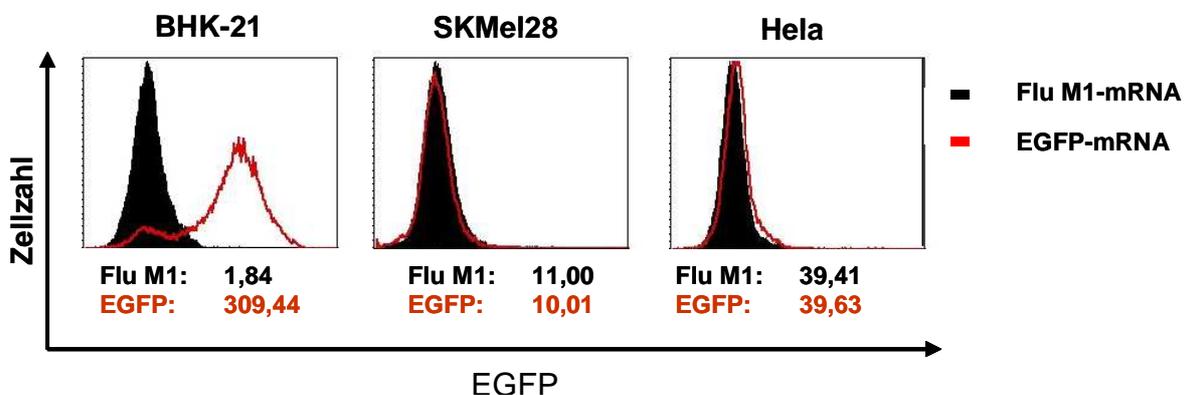


Abbildung 9 Elektroporation von mRNA in Tumorzellen.

Es wurden Tumorzellen (BHK-21, SKMel28, Hela) mit mRNA die für das Reporterogen EGFP kodiert elektroporiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit mRNA die für Flu M1 kodiert elektroporiert. 6 h nach Elektroporation wurde die Proteinexpression durch Durchflusszytometrie gemessen. Rot: EGFP-mRNA, schwarz: Flu M1-mRNA. Die dargestellten Werte stellen die mittlere Fluoreszenz dar.

Es konnte nur für die elektroporierten BHK-21 eine Expression von EGFP festgestellt werden. Für die Negativkontrolle (Elektroporation mit Flu M1-mRNA) wurde eine mittlere Fluoreszenz von 1,84 und für die mit EGFP mRNA elektroporierten BHK-21

eine mittlere Fluoreszenz von 309,44 festgestellt. Für die elektroporierten SKMel28- und Hela-Tumorzelllinien konnte keine EGFP-Expression gegenüber der Negativkontrolle gemessen werden.

4.1.1.2. Lipofektion der mRNA in Tumorzellen

Um eine weitere Transfektionsmethode zu etablieren wurden BHK-21 Tumorzellen mit in das kationische Lipid Unifektin eingeschlossener mRNA die für EGFP kodiert transfiziert. 8 h nach Lipidzugabe wurden die Zellen geerntet und im Durchflusszytometer auf EGFP-Expression untersucht.

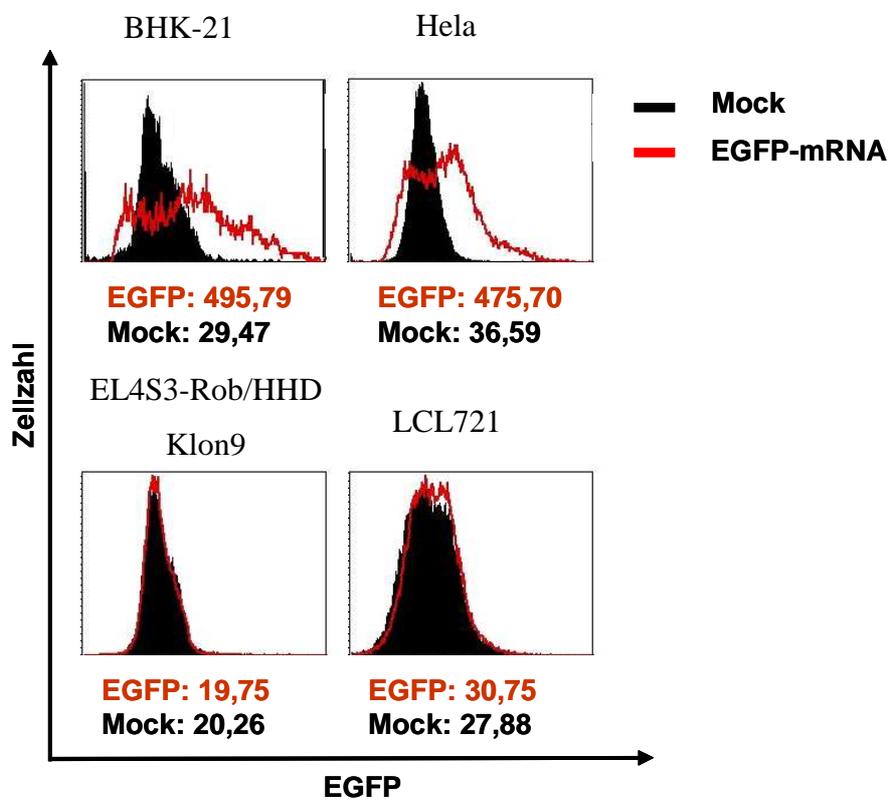


Abbildung 10 Lipofektion von mRNA in Tumorzelllinien.

Die Tumorzelllinien BHK-21, Hela, EL4S3-Rob/HHD Klon9 und LCL721 wurden mit dem Liposom Unifektin mit mRNA die für EGFP kodiert transfiziert. Als Negativkontrolle wurde das Liposom ohne Zugabe von mRNA verwendet (Mock). 8 h nach Lipidzugabe wurden die Tumorzellen geerntet und im Durchflusszytometer untersucht. In den Diagrammen wird die mittlere Fluoreszenz der transfizierten Zellen dargestellt. Rot: EGFP-mRNA, schwarz: Mock

Es konnte nur für die Tumorzelllinie BHK-21 und Hela eine Expression von EGFP nachgewiesen werden. Bei den transfizierten BHK-21 lag die mittlere Fluoreszenz für

die mit EGFP-mRNA transfizierten Zellen bei 495,79, die der Negativkontrolle (Mock: Lipofektion ohne mRNA-Zugabe) bei 29,47. Bei den Hela-Tumorzellen lag sie für die EGFP-mRNA bei 475,70 gegenüber 36,59 bei der Negativkontrolle. Für die Tumorzelllinien EL4S3-Rob/HHD2 Klon9 und LCL721 konnte keine EGFP-Expression nach Lipofektion nachgewiesen werden (Abbildung 10). Da Unifektin zwar Nukleinsäuren effektiv in Zellen schleusen, kann sich aber negativ auf die Viabilität von Primärzellen auswirken kann, wurden die BHK-21-Tumorzellen auch mit dem weniger toxischen Lipofektionsreagenz DOTAP transfiziert (Daten nicht gezeigt). Bei Verwendung der Standardparameter, die im Protokoll angegeben werden, erhält man eine ähnliche Transfektionseffizienz wie bei der Transfektion mit Unifektin.

4.1.1.3. Elektroporation von mRNA in dendritische Zellen

In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass dendritische Zellen die mit mRNA elektroporiert werden, das entsprechende Protein exprimieren. Es wurden die Versuche mit den bereits veröffentlichten Elektroporationsparametern reproduziert. Dazu wurden DCs in verschiedenen Transfektionsmedien elektroporiert und die Transfektionseffizienz verglichen. 4 Mio. DCs wurden in 200 µl Optimem, X-Vivo 15 und RPMI 1640 resuspendiert und mit dem Easyject PLUS mit den Standardelektroporationsbedingungen elektroporiert. 6 h nach Transfektion wurde die EGFP-Expression gemessen.

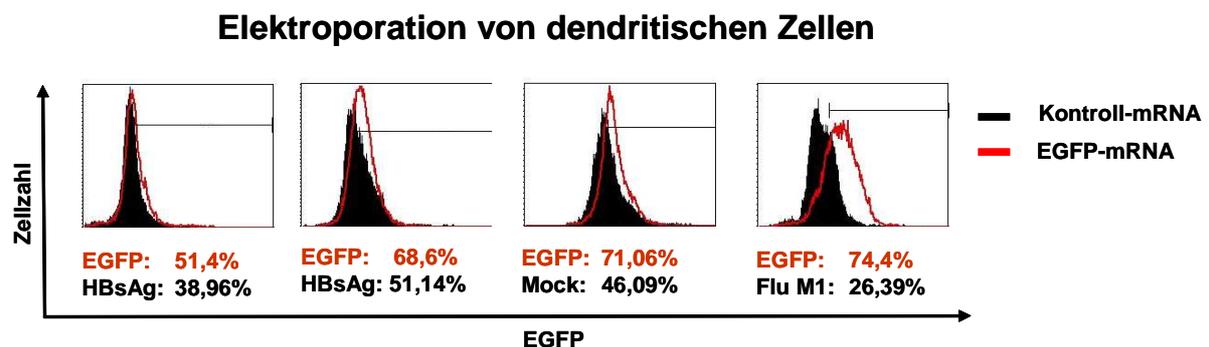


Abbildung 11 Elektroporation von mRNA in dendritische Zellen.

Die dendritischen Zellen wurden mit mRNA in Optimem elektroporiert. 6h nach Elektroporation wurde die EGFP-Expression gemessen. Es sind hier vier unabhängige Experimente dargestellt, um die Schwankungen der Elektroporationseffizienz darzustellen. Rot: EGFP-mRNA, schwarz: Negativkontrolle. Die dargestellten Werte stellen den Prozentsatz der markierten Zellen dar.

Es konnte nur für die dendritischen Zellen, die in Optimem elektroporiert wurden eine Expression von EGFP detektiert werden (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 11 werden die Ergebnisse aus vier unabhängigen Experimenten gezeigt. Hier wird deutlich, dass die Methode der mRNA-Elektroporation erhebliche Schwankungen in der Transfektionseffizienz in unterschiedlichen Experimenten aufweist. Es wurde eine Spanne im Prozentsatz der fluoreszenten Zellen vom ca. 1,3 fachen bis zum ca. 3 fachen der Negativkontrolle gemessen.

4.1.1.4. Lipofektion von mRNA in dendritische Zellen und PBMCs

Zur Lipofektion von mRNA in dendritische Zellen und PBMCs wurde zunächst das kationische Lipid Unifektin verwendet und verschiedene Parameter im Experiment verändert. Das Liposom zeigte jedoch in allen Experimenten eine hohe Toxizität und keine detektierbare mRNA-Aufnahme in die Zelle. Es wurden verschiedene Inkubationszeiten und Transfektionsmedien verwendet. In Abbildung 12 (oben) ist die durchflusszytometrische Auswertung von DCs, die mit Unifektin transfiziert wurden, dargestellt. Es wurden die Transfektionsmedien Optimem, X-Vivo 15 und RPMI (ohne Zugabe von Antibiotika und L-Glutamin) verglichen. Für keinen der Transfektionsansätze konnten EGFP⁺-Zellen nachgewiesen werden.

Daraufhin wurden Lipofektionen mit dem Transfektionsreagenz DOTAP durchgeführt. Die Transfektion wurde mit verschiedenen Zellkulturmedien in unterschiedlichen Volumina und verschiedenen Inkubationszeiten mit dem DOTAP-/mRNA-Komplex durchgeführt. Es konnte jedoch in keinem der durchgeführten Experimente mit PBMCs nach Lipofektion von mRNA die für EGFP kodiert eine Proteinexpression durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Für die Lipofektion von dendritischen Zellen mit DOTAP konnte eine geringe EGFP-Expression detektiert werden. Es wurde ein Prozentsatz von 38,25% an EGFP-exprimierenden Zellen (Negativkontrolle: 28,25%) festgestellt.

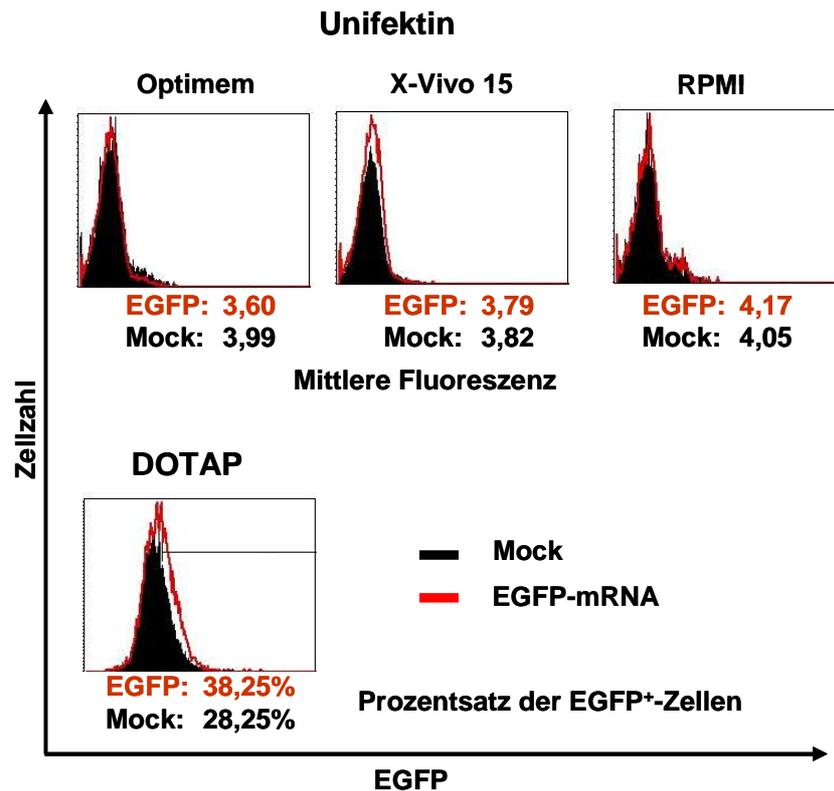


Abbildung 12 Lipofektion von dendritischen Zellen

In den oberen Plots ist die Auswertung der Transfektion von DCs mit Unifektin und verschiedenen Medien während der Transfektion dargestellt (angegebene Werte: mittlere Fluoreszenz). Im unteren Plot sind mit DOTAP transfizierte Zellen abgebildet (angegebene Werte: Prozentsatz der EGFP⁺-Zellen). Rot: EGFP-mRNA, schwarz: Negativkontrolle.

4.1.1.5. Passive Pulsing von dendritischen Zellen

Die Arbeitsgruppe um Eli Gilboa konnte zeigen, dass dendritische Zellen bei Koinkubation mit mRNA ohne Zugabe von Transfektionsreagenz die mRNA bevor sie abgebaut wird aufnehmen können und das kodierte Protein translatieren können. Es wurde versucht dieses Experiment in unserem Labor zu etablieren.

Es wurden 1×10^5 dendritische Zellen in 200 μ l X-Vivo 15-Kulturmedium/Well in einer 96-Well-Zellkulturplatte mit folgenden Ansätzen koinkubiert:

Proben:

- 1 μ g mRNA
- 5 μ g mRNA
- 1 μ g mRNA + 1 μ g Protamin
- 5 μ g mRNA + 5 μ g Protamin
- 1 μ g mRNA + 1 μ l RNasin
- 5 μ g mRNA + 5 μ l RNasin

Positivkontrolle:

- Elektroporation der dendritischen Zellen mit der entsprechenden mRNA

Positivkontrolle für den Zytokinnachweis:

- LPS

Negativkontrollen:

- Medium ohne Zugabe von mRNA, Protamin oder RNasin
- 1 μ g und 5 μ g Protamin ohne mRNA
- 1 μ l und 5 μ l RNasin ohne mRNA

Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Morgen für die Durchflusszytometrie fixiert um das Reporterprotein EGFP nachzuweisen. Wurden die Zellen mit mRNA koinkubiert die für das Influenza Matrix Protein oder für CMV pp65 kodiert wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und mittels ELISA auf Zytokinproduktion (TNF- α) untersucht.

In den zahlreichen durchgeführten Versuchen konnte weder mit nackter noch mit durch Protamin kondensierter, oder mit durch RNasin-Zugabe stabilisierter mRNA eine Expression des Reporterproteins EGFP detektiert werden. Ebenso war keine vermehrte Sekretion von TNF- α in den Zellkulturüberständen feststellbar. Bei den dendritischen Zellen die mit mRNA und Protamin koinkubiert wurden, war eine TNF- α -Ausschüttung sichtbar. Dies ist jedoch auf die unspezifisch immunstimulatorische Wirkung von mit Protamin kondensierter mRNA über TLR zurückzuführen (Scheel et al., 2005).

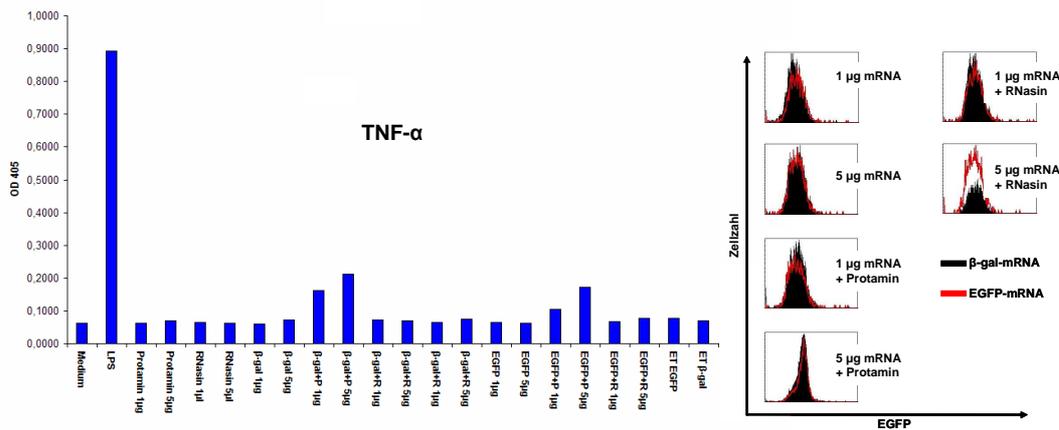


Abbildung 13 Passive Pulsing von dendritischen Zellen.

1 x 10⁵ DCs wurden mit mRNA alleine, mRNA mit Protamin und mRNA mit RNasin für 12 h in einer 96-Well-Zellkulturplatte koinkubiert. Es wurden die mRNA-Konstrukte für EGFP und β-Galaktosidase verwendet. Der Zellkulturüberstand wurde im Zytokin-ELISA auf TNF-α-Sekretion untersucht. Als Positivkontrolle dienten mit mRNA elektroporierte Zellen (Diagramm links). Die DCs wurden durchflusszytometrisch auf EGFP-Expression untersucht (Abbildung rechts).

Da die Menge an transkribiertem Protein nach dem Pulsen mit mRNA eventuell zu gering ist, um es mit herkömmlichen Nachweismethoden zu detektieren, wurde mRNA verwendet, die für das Influenza Matrix Protein kodiert und nach der Transfektion eine CTL-Kultur angesetzt. Für das Auslösen der Proliferation von spezifischen zytotoxischen T-Zellen ist nur eine sehr geringe Menge an Peptid notwendig. Die gepulsten Zellen wurden mit autologen PBMCs koinkubiert und für 1-3 Wochen mit Zytokinen (IL-7 und IL-2) kultiviert. Es konnte jedoch auch nach zwei Restimulationen mit peptidbeladenen PBMCs keine Tetramer⁺-Zellen für das Flu M1 Peptid nachgewiesen werden.

4.1.1.6. Elektroporation von mRNA in PBMCs

Obwohl eine detektierbare Proteinexpression nach der Transfektion von Zellen mit mRNA zum Auslösen einer Immunreaktion nicht notwendig ist, wurde die Expression von Reporterproteinen nach Elektroporation von PBMCs untersucht und mit der Expression in DCs und Tumorzellen verglichen.

Für die Experimente wurde mRNA verwendet, die für die Reporterproteine EGFP und für Luziferase kodiert. Die EGFP-Expression in den Zellen kann durch Durchflusszytometrie nachgewiesen werden, die Luziferase-Expression durch Messung der Lumineszenz im Zelllysat.

Das Enzym Luziferase wurde ursprünglich aus *Photinus pyralis*, einem Leuchtkäfer, isoliert. Dieses 62 kDa große Protein katalysiert in biolumineszenten Organismen die Produktion von Licht und benötigt dafür Luziferin, ATP und molekularen Sauerstoff als Substrate:

In der ersten Reaktion wird unter Verbrauch von ATP und der Produktion von Pyrophosphat (PP_i) Luziferyl-AMP als Zwischenprodukt gebildet, das im zweiten Schritt oxidativ zu Oxyluziferin decarboxyliert wird. Dabei werden Kohlendioxid, AMP und Licht (hν) freigesetzt. Das Enzym benötigt Mg²⁺ als Kofaktor.



Luziferase bietet sich als Reportergen an, da es in Säugerzellen normalerweise nicht vorkommt und seine Messung sehr sensitiv ist. Es wurden 4 Mio. PBMCs und DCs mit mRNA elektroporiert. 6 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die Expression ausgewertet. In PBMCs wurde, verglichen mit der Expression in DCs eine nur etwa die Hälfte an Luziferase-Aktivität gemessen. Es war jedoch in allen durchgeführten Elektroporationen von mRNA die für Luziferase kodiert eine nachweisbare Expression von Luziferase zu beobachten die wie hier gezeigt, ca. 20 fach über der Negativkontrolle (Elektroporation mit mRNA die für EGFP kodiert) liegt.

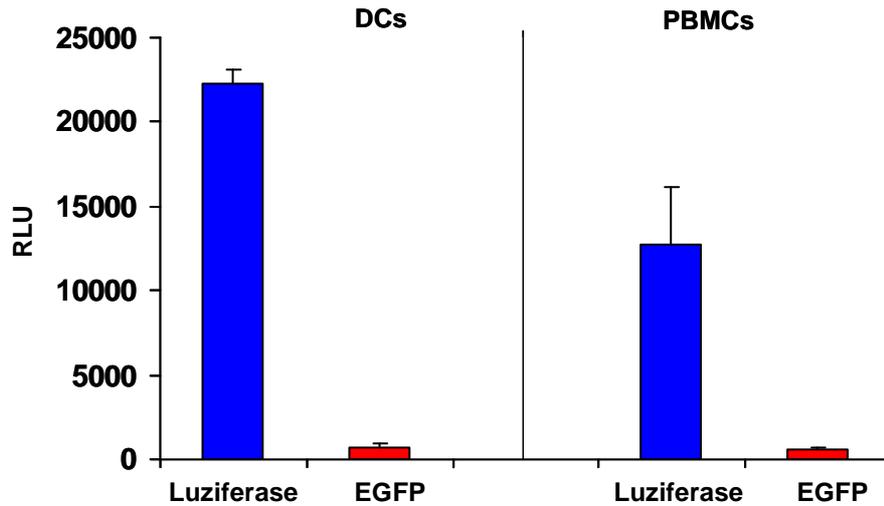


Abbildung 14 Luziferase-Expression in elektroporierten DCs und PBMCs.

DCs und PBMCs desselben Donors wurden mit mRNA elektroporiert die für Luziferase kodiert. Als Negativkontrolle Zellen die mit mRNA, die für EGFP kodiert, elektroporiert sind. Messung der Luziferase-Aktivität 6 h nach Transfektion.

4.2. Untersuchung der transfizierten Zellpopulationen

4.2.1. CTL-Kultur mit transfizierten Subpopulationen

Nachdem nachgewiesen wurde, dass es möglich ist PBMCs mit mRNA zu transfizieren, sollte untersucht werden, welche Subpopulationen innerhalb der PBMCs die RNA aufnehmen und exprimieren. Dazu wurden in 6 x 4 Mio. PBMCs mit mRNA die für das Influenza Matrix kodiert elektroporiert. Die einzelnen Elektroporationen wurden gepoolt und für 1 h in X-Vivo 15-Kulturmedium im CO₂-Inkubator inkubiert. Dann wurden die elektroporierten PBMCs über MACS® (*magnetic cell sorting*) sortiert. Dazu wurden jeweils 10 Mio. PBMCs mit anti-CD19 PE und anti-CD14 PE und 3 Mio. PBMCs mit anti-CD3 PE gefärbt. Die Zellen wurden mit anti-PE MicroBeads inkubiert und über MACS-Säulen sortiert. Die einzelnen Zellensubpopulationen (Durchfluss und Positivpopulation) wurden zur CTL-Kultur verwendet. Im Gegensatz zu den anderen hier beschriebenen Versuchen wurde hier aufgrund der limitierten Zellzahl für jeden Kulturansatz nur $2,2 \times 10^5$ Zellen/Well in einer 24-Well-Zellkulturplatte verwendet. Nach einer Woche Kultur wurden die Zellen über Durchflusszytometrie auf Flu M1 Tetramer⁺-CTLs untersucht. Es konnten Flu M1 Tetramer⁺-CTLs in allen drei untersuchten Zellpopulationen nachgewiesen. Der

Prozentsatz der Tetramer⁺-Zellen lag nach einer Woche Kultur bei 1,78% für die CD19⁺-Zellen (B-Lymphozyten), bei 1,42% für die CD14⁺-Zellen (Monozyten) und bei 1,78% für die CD3⁺-Zellen (T-Lymphozyten). Die Positivkontrolle (unsortierte PBMCs mit Flu M1 Peptid beladen) wies einen Prozentsatz von 1,42% Tetramer⁺-CTLs auf. Trotz der niedrigen Prozentzahlen der proliferierten CTLs ließ sich ein deutlicher Unterschied zur Negativkontrolle (unsortierte PBMCs elektroporiert mit mRNA die für EGFP kodiert) feststellen (Abbildung 15).

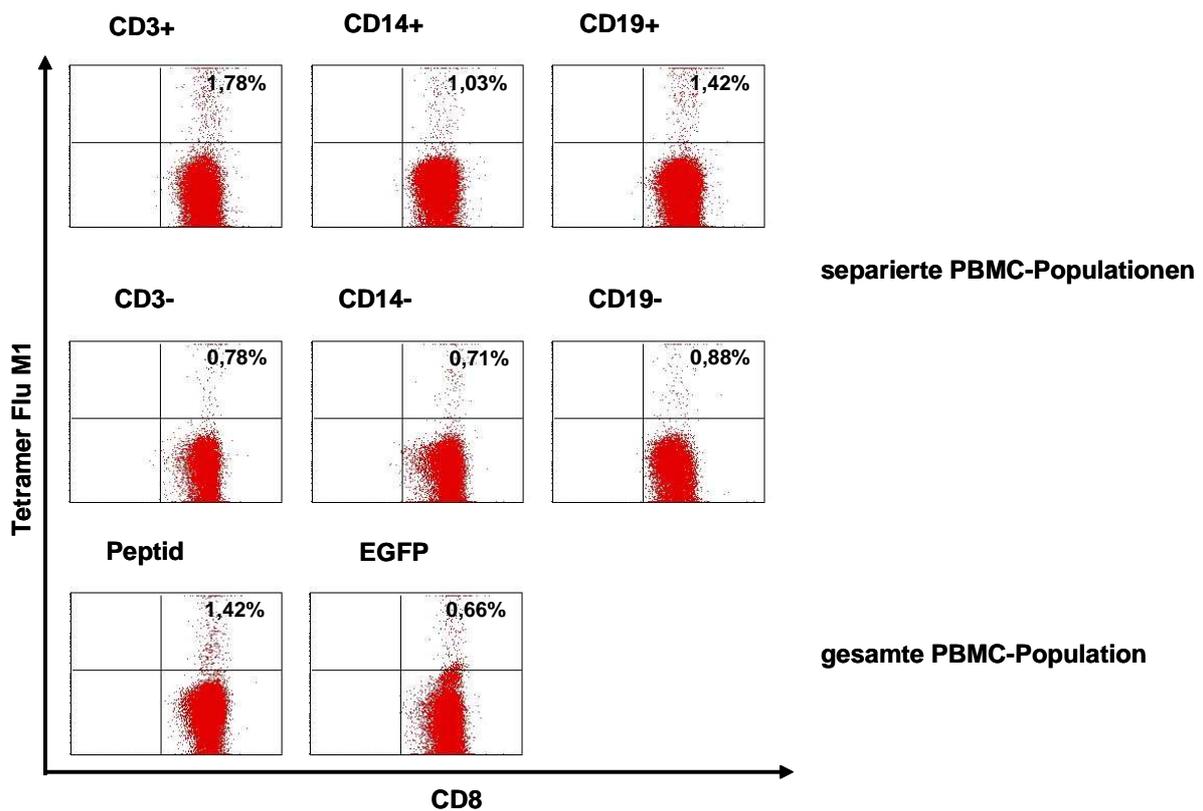


Abbildung 15 Untersuchung der elektroporierten Zellpopulationen.

Elektroporation von Zellpopulationen (CD3⁺-, CD14⁺- und CD19⁺-Zellen) die mittels MACS-Technologie aufgetrennt wurden. Die mit Flu M1-mRNA elektroporierten Zellen (Negativkontrolle EGFP-mRNA) wurden für eine Woche kultiviert. Die Proliferation der spezifischen T-Zellen in den einzelnen Zellpopulationen wurde durch Tetramerfärbung untersucht.

4.2.2. Reporterexpression in transfizierten PBMCs

Um Kulturartefakte zu vermeiden und die unterschiedlichen Fähigkeiten zur Antigenpräsentation der einzelnen Subpopulationen in PBMCs außer acht zu lassen, wurde anhand der Expression des Reportergens EGFP nach Elektroporation mit

mRNA die für EGFP kodiert untersucht welche Zellen die RNA aufnehmen und exprimieren. Dazu wurden PBMCs mit mRNA elektroporiert und dann für 6 h kultiviert. Die transfizierten PBMCs wurden dann zur Analyse im Durchflusszytometer mit anti-CD14-PE-, anti-CD15-PE-, anti-CD19-PE-, anti-CD3-PE- und anti-CD56-PE-Antikörpern gefärbt. Es konnte beobachtet werden, dass in allen untersuchten Zellpopulationen durch eine kleine Anzahl von Zellen die mRNA durch Elektroporation aufgenommen werden kann und das kodierte Protein exprimiert wird. Die Prozentzahlen an EGFP⁺-Zellen betragen für die CD14⁺-Zellen (Monozyten) 0,68%, für die CD15⁺-Zellen (Makrophagen/Monozyten, Granulozyten) 0,06%, für die CD19⁺-Zellen (B-Lymphozyten) 0,05%, für die CD3⁺-Zellen (T-Lymphozyten) 0,14% und für die CD56⁺-Zellen (NK-Zellen) 0,10%. In Summe für alle Zellen konnten von 0,37% bis zu 1,21% EGFP⁺-Zellen beobachtet werden. Trotz der niedrigen Anzahl an proteinexprimierenden Zellen kann ein deutlicher Unterschied zur Negativkontrolle (PBMCs elektroporiert mit mRNA die für Mucin-1 kodiert) festgestellt werden.

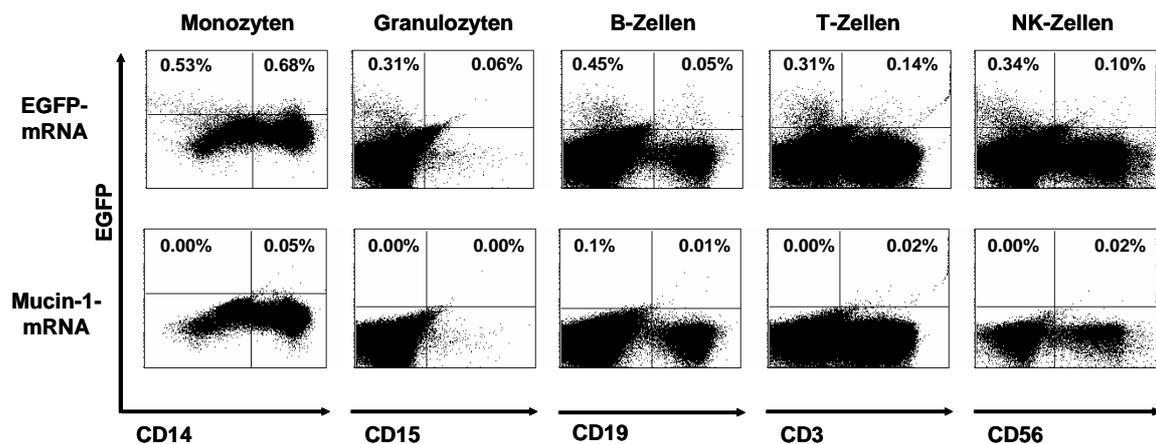


Abbildung 16 EGFP-Expression in PBMC-Subpopulationen.

PBMCs wurden mit mRNA elektroporiert, die für EGFP kodiert (Negativkontrolle: mRNA, die für Mucin-1 kodiert). 6 h nach Transfektion wurden die Zellen auf EGFP-Expression von einzelnen Zellpopulationen untersucht (zusätzliche Färbung mit Antikörpern für CD14, CD15, CD19, CD3, CD56).

4.3. Optimierung der CTL-Kultur von elektroporierten PBMCs

4.3.1. Test verschiedener Elektroporationsgeräte

Zu den Versuchen die Elektroporation von dendritischen Zellen mit mRNA, wie sie bereits beschrieben wurde zu reproduzieren wurde zuerst der Elektroporator GenePulser[®] II von BioRad verwendet. Mit den Elektroporationsbedingungen 300 V und 150 μ F wurden DCs und PBMCs mit mRNA die für EGFP kodiert elektroporiert. 6 h nach Elektroporation wurden die Zellen geerntet und auf EGFP-Expression im Durchflusszytometer untersucht. Für die Transfektion von dendritischen Zellen konnte in vielen durchgeführten Transfektionen keine EGFP-Expression nachgewiesen werden. In einigen Experimenten konnte eine sehr schwache Proteinexpression nachgewiesen werden. Es konnten für die mit EGFP-RNA elektroporierten Zellen 12,13% EGFP-positive Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle mit 10,07% positiven Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Für die Elektroporation von PBMCs konnte in keinem der zahlreich durchgeführten Experimente eine EGFP-Expression nachgewiesen werden. Für weitere Experimente wurde der Nucleofector[™] von Amaxa verwendet. Die Nucleofector-Technologie ist eine Weiterentwicklung der Elektroporation. Sie verwendet für bestimmte Zelltypen optimierte elektrische Parameter, kombiniert mit optimal abgestimmten Puffersystemen. Dieses Verfahren ist eigentlich optimiert um zu transfizierende DNA direkt in den Nukleus der Zelle einzuschleusen. Dies ist bei der Transfektion von DNA von Vorteil, da die Transkription der DNA im Nukleus stattfindet. Die mRNA hingegen hat ihre Aufgabe im Zytosol, wo sie an den Ribosomen translatiert wird. Es sollte jedoch untersucht werden, ob diese Methode zu eine effizienteren Elektroporation mit geringer Zellmortalität und darauf folgender Proteinexpression in PBMCs geeignet ist. Es wurde der Human B cell Nucleofector[™] Kit verwendet. 6 h nach der Elektroporation konnte eine EGFP-Expression festgestellt werden.

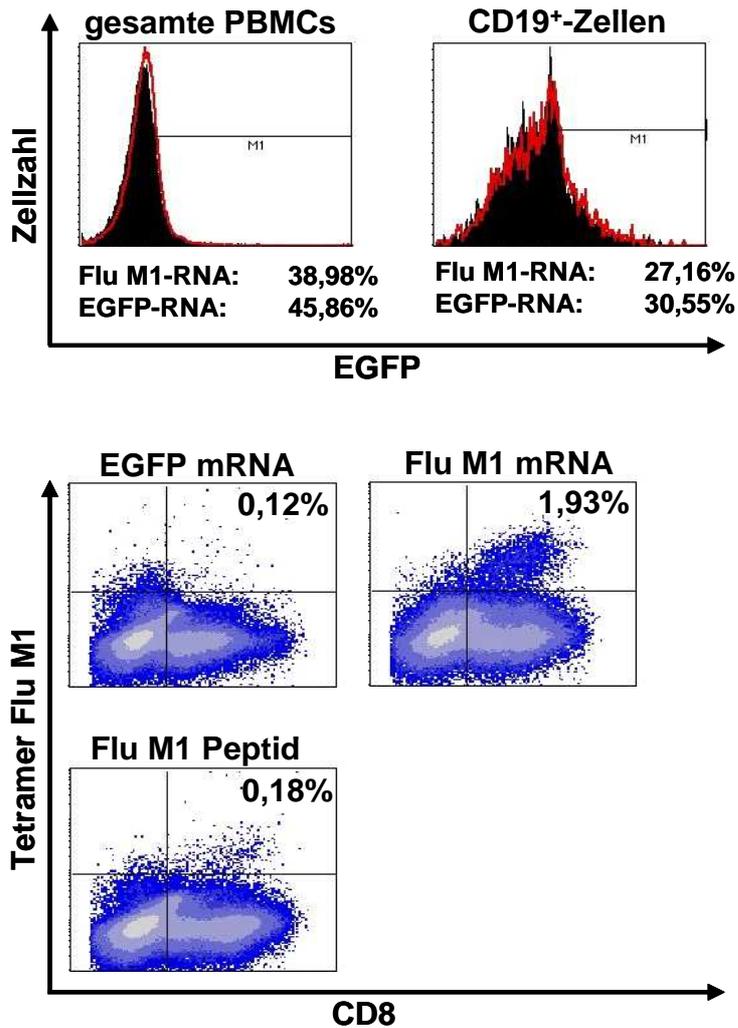


Abbildung 17 Elektroporation von PBMCs mit Amaxa Nucleofector™.

PBMCs wurden mit dem Human B cell Nucleofector™ Kit mit EGFP-mRNA elektroporiert. 6h nach der Transfektion wurden die Zellen auf EGFP-Expression untersucht (Abbildung oben: rot: EGFP-mRNA, schwarz: Flu M1-mRNA). Es wurden sowohl die gesamten PBMCs, als auch nur die CD19⁺-Zellen untersucht. Es wurde eine CTL-Kultur mit den elektroporierten Zellen angesetzt. Nach einer Woche Kultur wurde auf Flu M1-Tetramer⁺-Zellen untersucht.

Untersuchte man die gesamte Population der PBMCs, konnte man eine Expression von EGFP von 45,86% feststellen (Negativkontrolle 38,98). Untersucht man nur die B-Lymphozyten, die durch den speziell optimierten Kit besonders gut transfiziert werden sollen, konnte man eine EGFP-Expression von 30,55% beobachten (Negativkontrolle 27,16%). In den CD19⁻-Zellen konnte keine erhöhte EGFP-Expression gegenüber der Negativkontrolle festgestellt werden. Als Negativkontrolle zur Untersuchung der EGFP-Expression wurde mRNA verwendet, die für das Influenza Matrix Protein kodiert. Es wurde parallel eine CTL-Kultur angesetzt, um die

Proliferation von Flu M1-Tetramer⁺-CTLs zu untersuchen. Nach einer Woche Kultur konnten für die Zellen die mit mRNA die für Flu M1 kodiert 1,93% Flu M1-Tetramer⁺-Zellen nachgewiesen werden. In der Negativkontrolle (PBMCS elektroporiert mit mRNA die für EGFP kodiert) wurden 0,12% Tetramer⁺-Zellen nachgewiesen. Die Zellen die mit Flu M1-Peptid beladen wurden und als Positivkontrolle dienen, zeigten nur einen Prozentsatz von 0,18% Tetramer⁺-Zellen (Abbildung 17).

In einer anderen Versuchsreihe wurde noch der Elektroporator Easyject Optima und der Easyject PLUS von Peqlab getestet. Der Easyject PLUS wurde in vielen Veröffentlichungen über die Elektroporation von mRNA in dendritische Zellen verwendet. Es wurden die in der Literatur für die Elektroporation beschriebenen Elektroporationsparameter (300 V, 150 µF, 1540 Ω, 231 ms) für den Easyject PLUS verwendet. Für den Easyject Optima wurden die Parameter 300 V und 150 µF und 250 V und 1050 µF getestet. Bei diesem Gerät kann kein Widerstand und keine Pulslänge gewählt werden. Mit den elektroporierten Zellen wurde eine CTL-Kultur angesetzt. Nach einer Woche Kultur wurde die Frequenz der Flu M1-Tetramer⁺-Zellen gemessen.

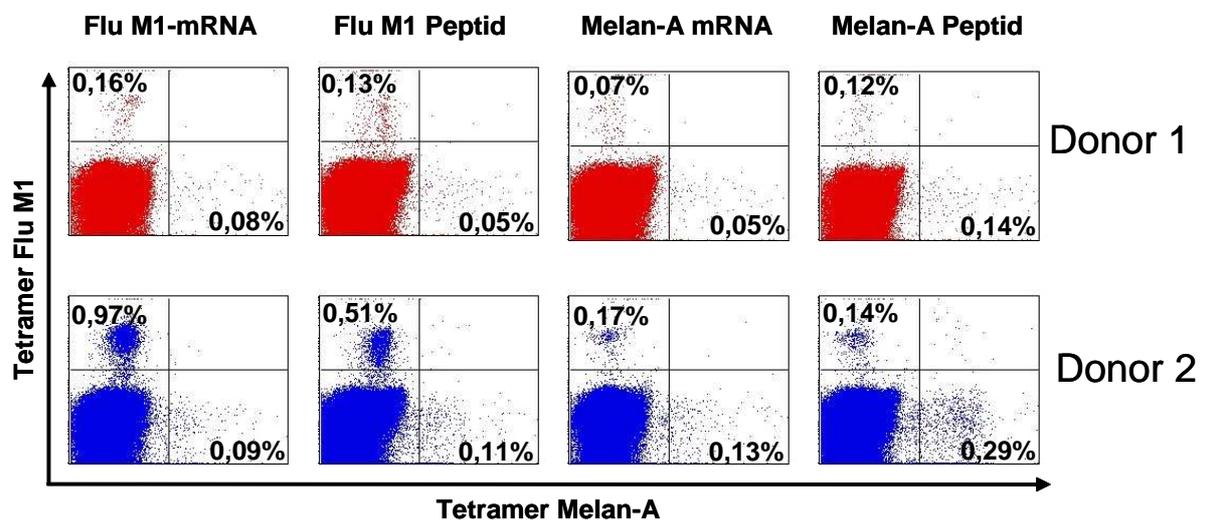


Abbildung 18 CTL-Induktion nach Elektroporation von PBMCs mit Easyject PLUS.

PBMCs wurden mit mRNA mit dem Easyject PLUS elektroporiert die für Flu M1 und MART-1/Melan-A kodiert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit den entsprechenden HLA-A*0201-Peptiden beladen. Nach einer Woche CTL-Kultur wurde die Frequenz an Flu M1- und Melan-A-Tetramer⁺-CD8⁺-Zellen gemessen. Hier werden beispielhaft die Ergebnisse von zwei unterschiedlichen Blutspendern dargestellt.

Für die Zellen die mit dem Easyject Optima elektroporierten PBMCs konnte keine Proliferation von spezifischen Flu M1-Tetramer⁺-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei der CTL-Kultur, die mit PBMCs angesetzt wurde die mit dem Easyject PLUS elektroporiert wurden, konnte nach einer Woche Kultur eine Flu M1-Tetramer⁺-Zellpopulation detektiert werden. Im Vergleich zur Negativkontrolle (Elektroporation mit mRNA die für MART-1/Melan-A kodiert) sind die Unterschiede in der Frequenz der Tetramer⁺-Zellen in unterschiedlichen Blutspendern verschieden hoch. In Abbildung 18 sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie nach einer Woche CTL-Kultur für zwei verschiedene Blutspender dargestellt.

4.3.2. Vergleich verschiedener Aktivierungssignale der elektroporierten Zellen für die CTL-Kultur

In der Literatur wurde beschrieben, dass dendritische Zellen die nach Elektroporation oder Peptidbeladung durch Aktivierungssignale zur Reifung angeregt werden bessere antigenpräsentierende Zellen in der Zellkultur sind, als Zellen ohne Aktivierungssignal. Es wurden somit verschiedene Aktivierungssignale miteinander verglichen. Es wurde eine Kombination aus TNF- α und Lipopolysaccharid (LPS), Poly I:C (*polyinosinic polycytidylic acid*) und mit Protamin kondensierte mRNA getestet. LPS und TNF- α führen zu einer Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) und zur Ausschüttung von Zytokinen (IL-12). Poly I:C ist synthetische doppelsträngige RNA. Sie war das erste RNA-Molekül, für das ein immunstimulatorischer Effekt nachgewiesen wurde (Absher und Stinebring, 1969). mRNA die mit Protamin kondensiert ist, besitzt ebenso die Fähigkeit Zellen des Immunsystems zu stimulieren (Scheel et al., 2004). Es wurden PBMCs mit mRNA elektroporiert die für Flu M1 und MART-1/Melan-A kodiert. Als Positivkontrolle wurden PBMCs verwendet die mit den entsprechenden Peptiden beladen wurden. Die Zellen wurden über Nacht nur in Medium, mit 100 $\mu\text{g/ml}$ LPS und 20 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α , mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly I:C oder mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Protamin-mRNA (EGFP-mRNA ohne CAP) inkubiert. Nach einer Woche CTL-Kultur konnte für die PBMCs, die mit LPS und TNF- α stimuliert wurden, der höchste Prozentsatz an Flu M1-Tetramer⁺-Zellen festgestellt werden (4,87%). Für die peptidbeladenen Zellen konnte jedoch keine Proliferation von spezifischen CTLs beobachtet werden. Hierbei handelte es sich höchstwahrscheinlich um einen Kulturartefakt, da in anderen unabhängigen

Ergebnisse

Experimenten mit denselben Versuchsparametern Tetramer⁺-Zellen detektiert werden konnten. Für das MART-1/Melan-A-Tetramer waren alle Kulturansätze negativ, die mit mRNA die für MART-1/Melan-A kodiert elektroporiert wurden. Für die peptidbeladenen PBMCs konnten hingegen Tetramer⁺-Zellen gefunden werden (Abbildung 19).

Aktivierungssignal	Antigen	Flu M1-Tetramer ⁺ -Zellen (%)	MART-1/Melan-A-Tetramer ⁺ -Zellen (%)
Ohne	Flu M1-mRNA	2,55	0,02
	Flu M1-Peptid	1,16	0,02
	MART-1/Melan-A-mRNA	0,00	0,02
	MART-1/Melan-A-Peptid	0,06	1,90
LPS + TNF- α	Flu M1-mRNA	4,87	0,01
	Flu M1-Peptid	0,00	0,01
	MART-1/Melan-A-mRNA	0,01	0,02
	MART-1/Melan-A-Peptid	0,01	4,54
Poly I:C	Flu M1-mRNA	0,17	0,01
	Flu M1-Peptid	2,46	0,03
	MART-1/Melan-A-mRNA	0,01	0,02
	MART-1/Melan-A-Peptid	0,07	21,44
Protamin-RNA	Flu M1-mRNA	1,78	0,01
	Flu M1-Peptid	0,33	0,13
	MART-1/Melan-A-mRNA	0,01	0,03
	MART-1/Melan-A-Peptid	0,05	6,56

Abbildung 19 *Unterschiedliche Aktivierungssignale für elektroporierte PBMCs für CTL-Kultur. Elektroporierte PBMCs wurden über Nacht mit unterschiedlichen Aktivierungssignalen (ohne Aktivierungssignal, LPS + TNF- α , Poly I:C oder Protamin-RNA) inkubiert. Diese Zellen wurden mit autologen PBMCs koinkubiert und nach einer Woche Kultur auf Flu M1- und MART-1/Melan-A-Tetramer⁺-Zellen untersucht.*

4.3.3. Vergleich der Elektroporation von frischen und aufgetauten PBMCs

Es sollte untersucht werden, ob es ebenso möglich ist, statt frisch aus Vollblut oder Buffy-Coats isolierten PBMCs, aufgetaute PBMCs mit mRNA zu elektroporieren und nach CTL-Kultur eine Proliferation von spezifischen CTLs erhalten. Zur Auswertung der Immunantwort von Patienten in klinischen Studien werden häufig aufgetaute PBMCs verwendet. Es wurden frische und aufgetaute PBMCs desselben Donors mit mRNA elektroporiert die für das Influenza Matrix Protein, MART-1/Melan-A oder für EGFP kodiert elektroporiert und die Frequenz an Flu M1- und MART-1/Melan-A - Tetramer⁺-Zellen nach einer Woche CTL-Kultur gemessen. Es konnte sowohl für die frisch isolierten, als auch für die aufgetauten PBMCs eine Proliferation von Flu M1-spezifischen CTLs nachgewiesen werden. So konnte für die frischen PBMCs ein Prozentsatz von 1,08% an Tetramer⁺-Zellen detektiert werden. Für die aufgetauten PBMCs lag der Prozentsatz deutlich darunter (0,43%), aber es war eine deutliche Zellpopulation zu erkennen, die ca. 6 fach über der Negativkontrolle lag. Für MART-1/Melan-A konnten nur in der Positivkontrolle (Stimulation mit Peptid) Tetramer⁺-Zellen nachgewiesen werden.

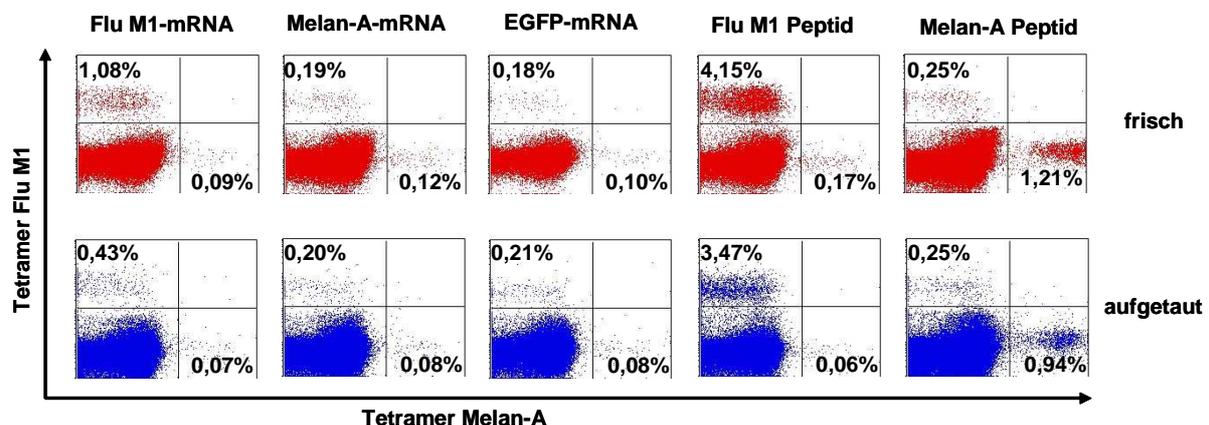


Abbildung 20 Vergleich der Frequenz Tetramer⁺-Zellen nach Elektroporation von frischen und aufgetauten PBMCs.

FrISChe und aufgetaute PBMCs desselben Donors wurden mit mRNA die für Flu M1 und MART-1/Melan-A kodiert elektroporiert und für eine Woche in Kultur genommen. Als Positivkontrolle dienen PBMCs die mit den entsprechenden Peptiden beladen wurden. Als Negativkontrolle wurden PBMCs verwendet, die mit EGFP-mRNA elektroporiert wurden.

In einer weiteren Versuchsreihe wurden frische und aufgetaute PBMCs eines Donors mit mRNA die für Luziferase kodiert elektroporiert. 6 h nach Transfektion wurde die Luziferase-Aktivität im Zellysate in Duplikaten gemessen. In allen getesteten PBMCs konnte eine Luziferase-Aktivität nach Elektroporation festgestellt werden. Bei allen untersuchten Blutspendern lag die Proteinexpression der frischen PBMCs ca. 2-mal so hoch als bei den aufgetauten PBMCs. Die Höhe der Proteinexpression bei den verschiedenen Blutspendern lag auf sehr unterschiedlichem Niveau. So konnte für Donor 1 für die frischen PBMCs eine RLU von ca. 12000 gemessen werden. Bei Donor 2 ca. 7500 RLU und bei Donor 3 nur ca. 3000 RLU.

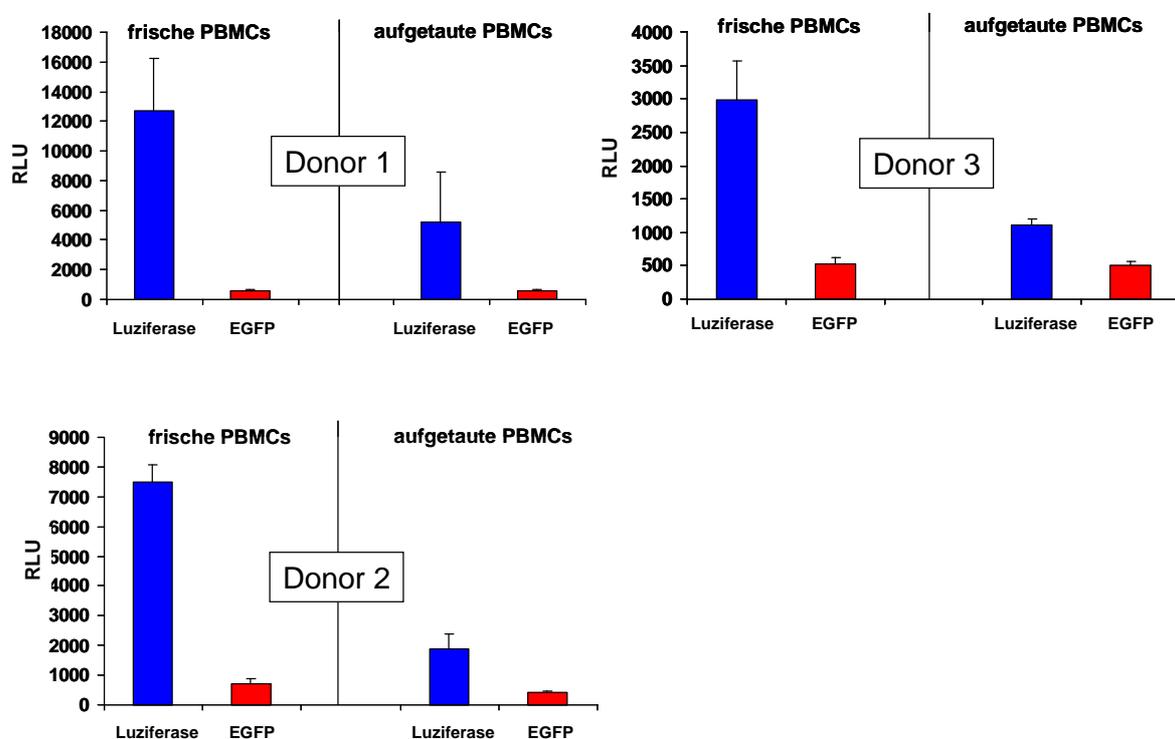


Abbildung 21 Vergleich der Luziferase-Aktivität in frischen und aufgetauten mit mRNA elektroporierten PBMCs.

FrISChe und aufgetaute PBMCs eines Donors wurden mit mRNA elektroporiert, die für Luziferase kodiert. 6 h nach Elektroporation wurde die Luziferase-Aktivität gemessen. Als Negativkontrolle wurden PBMCs mit mRNA elektroporiert, die für EGFP kodiert.

4.4. Können nur Gedächtnis-T-Zellen oder auch naive T-Zellen stimuliert werden?

Es sollte herausgefunden werden, ob elektroporierte PBMCs in der Lage sind eine T-Zell-Antwort zu „primen“, oder ob sie nur die bereits vorhandenen Memory-T-Zellen stimulieren können. PBMCs wurden mit mRNA die für das Influenza Matrix Protein kodiert um eine Aktivierung von Memory-T-Zellen zu erreichen und mit mRNA die für das Tumorantigen MART-1/Melan-A kodiert, um naive T-Zellen zu aktivieren, elektroporiert. Im Blut von vielen HLA-A*0201⁺ gesunden Personen befinden sich naive T-Zellen die spezifisch für das MART-1/Melan-A-Antigen sind. Als Positivkontrollen wurden die PBMCs mit den beiden immundominanten Peptiden beladen und dendritische Zellen desselben Donors mit mRNA elektroporiert und mit Peptiden beladen.

Nach 3 Wochen in Kultur (mit zwei Restimulationen mit dem entsprechenden immundominanten HLA-A*0201-Epitop) wurden die Zellen auf Flu M1- und MART-1/Melan-A-Tetramer⁺-Zellen untersucht. Es konnte festgestellt werden, dass elektroporierte PBMCs ebenso effizient in der Stimulation von Memory-T-Zellen die spezifisch für das Flu M1-Peptid sind wie elektroporierte dendritische Zellen.

So konnte nach Elektroporation von PBMCs eine Flu M1-Tetramer⁺-Population von 13,41% und von DCs von 12,98% nachgewiesen werden. Die Proliferation nach Beladung, von sowohl PBMCs, als auch von DCs, mit dem entsprechenden Peptid war um einiges geringer, als nach Elektroporation mit mRNA (PBMCs: 1,67%, DCs: 1,82%). Für die mit mRNA die für das Tumorantigen MART-1/Melan-A kodiert elektroporierten PBMCs konnte im Gegensatz zu den elektroporierten DCs kein Auslösen einer T-Zell-Antwort detektiert werden. Für die elektroporierten DCs war eine Population von MART-1/Melan-A-Tetramer⁺-CTLs von 3,27% sichtbar, für die Kultur aus elektroporierten PBMCs bewegte sich die Zellpopulation im Bereich des Hintergrunds (0,22% Tetramer⁺-Zellen). Für die Peptidbeladung mit dem immundominanten Peptid von MART-1/Melan-A, zeigte sich im Gegensatz zur Elektroporation mit mRNA, dass auch PBMCs naive MART-1/Melan-A spezifische T-Zellen aktivieren können (Tetramer⁺-Zellen für DCs: 39,93%, für PBMCs: 33,53%) (Abbildung 22). Diese Ergebnisse konnten durch Experimente mit den Blutzellen von

zahlreichen gesunden Blutspendern bestätigt werden. Es wird hiermit deutlich, dass trotz der Aktivierung durch LPS und TNF- α , die APCs die in den PBMCs vorhanden sind (mDCs, pDCs, B-Lymphozyten und Monozyten) nicht in der Lage sind *in vitro* (unter den hier verwendeten Kulturbedingungen) eine T-Zell-Erst-Antwort auszulösen.

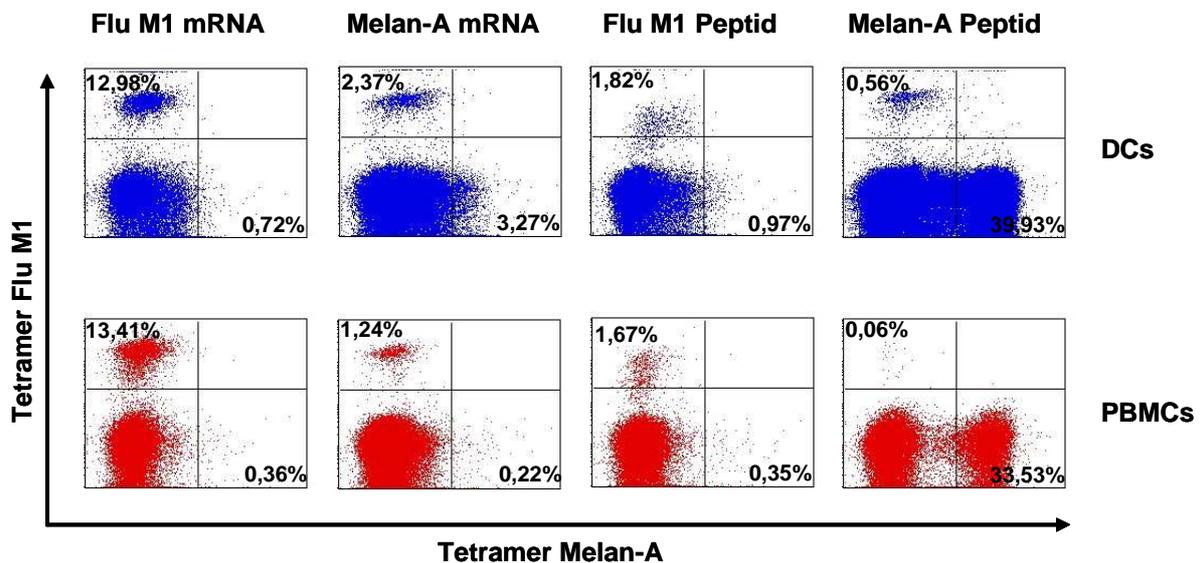


Abbildung 22 Können naive und Gedächtnis-T-Zellen durch Elektroporation von PBMCs stimuliert werden.

PBMCs und DCs desselben Donors mit mRNA elektroporiert die für MART-1/Melan-A und Flu M1 kodiert. Die PBMCs und DCs wurden zusätzlich mit den entsprechenden für HLA-A*0201 immundominanten Peptiden inkubiert. Nach 1 Woche Kultur wurde eine Tetramer-Färbung durchgeführt.

4.5. Untersuchung der Funktionalität der *in vitro* generierten CTLs

Werden zytotoxische Effektor-T-Zellen *in vitro* generiert, ist diese spezifische Proliferation nicht immer mit der Fähigkeit verbunden die Aufgaben einer bewaffneten Effektorzelle auszuüben. Die aus der Kultur entstandenen CTLs besitzen oft eine funktionelle Anergie, was bedeutet dass sie keine Zytokine (TNF- α , IFN- γ) ausschütten und ihre Effektorfunktion (unschädlich machen von infizierten Zellen) nicht wahrnehmen. Um zu untersuchen, ob die aus mit mRNA elektroporierten PBMCs stimulierten Memory-T-Zellen die funktionellen

Eigenschaften von bewaffneten Effektorzellen besitzen, wurden die nach einer Woche *in vitro*-Kultur gewonnenen CTLs mit dem immundominanten HLA-A*0201-Epitop von Flu M1 koinkubiert. Zusätzlich zum Peptid wurde ein Inhibitor zur Sekretion (GolgiStop) zugegeben und für 5 h inkubiert. Dann wurden die Zellen permeabilisiert, fixiert und durch intrazelluläre Zytokinfärbung die Expression von TNF- α gemessen. Da hier nur kurze Zeit mit Peptid stimuliert wird ist die Anzahl von T-Zell-Rezeptoren und kostimulatorischen Molekülen, wie z.B. CD8 (siehe in Abbildung) reduziert (Matsui, 1987). Es wurde sowohl die Produktion von TNF- α durch CD8⁺-Zellen und durch CD4⁺-Zellen untersucht. Es konnte jedoch nur eine antigenspezifische Zytokinproduktion in den CD8⁺-Zellen festgestellt werden. Für die CD4⁺-Lymphozyten bewegten sich die Prozentsätze im Bereich des Hintergrunds. So produzierten 2,54% der CD8⁺-T-Zellen TNF- α , wovon 2,17% dieser Zellen das kostimulatorische Molekül CD8 in hoher Anzahl produzierten. Dagegen kommen nur 0,37% dieser zytokinproduzierenden Zellen aus der Population der T-Zellen, die CD8 in einer geringen Anzahl auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zur Kontrolle wurden die Zellen aus der Kultur gleichzeitig mit dem Flu M1-Tetramer gefärbt und analysiert. Für die Kultur, die mit PBMCs stimuliert wurde, die mit der mRNA elektroporiert wurden die für das Influenza Matrix Protein kodiert, konnten 1,81% spezifische CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden. Für die Negativkontrolle (Elektroporation mit EGFP-RNA) lag der Prozentsatz bei 0,09%.

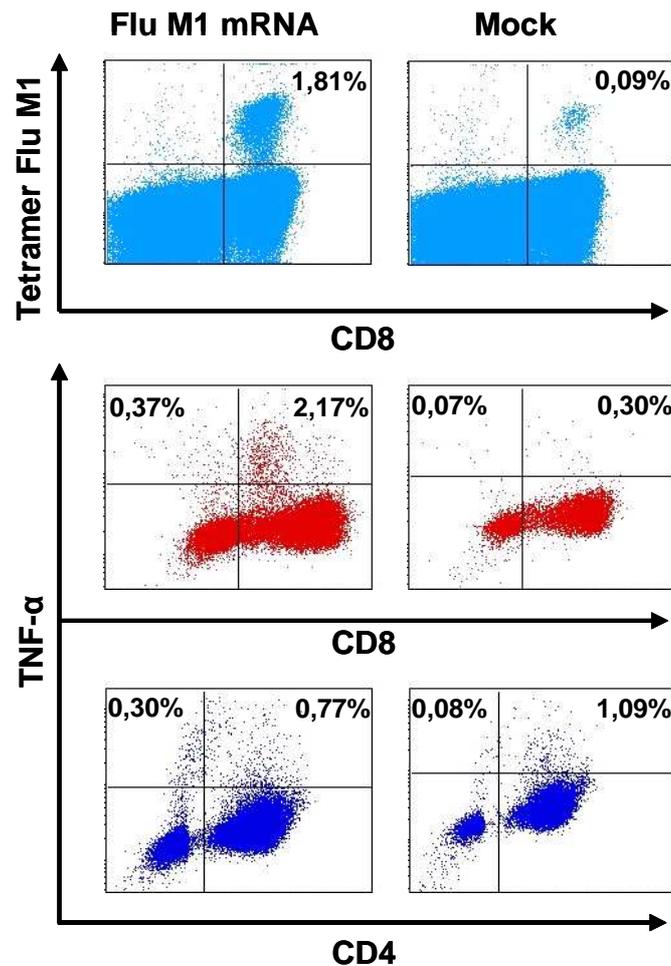


Abbildung 23 Funktionalität der *in vitro* generierten CTLs.

PBMCs wurden mit mRNA elektroporiert, die für Flu M1 und EGFP (Negativkontrolle) kodiert. Nach einer Woche Kultur wurde eine Tetramer-Färbung durchgeführt (Abbildung oben). Die Zellen wurden mit Flu M1-Peptid stimuliert und eine intrazelluläre TNF- α -Färbung durchgeführt.

4.6. Untersuchung der Viabilität der elektroporierten PBMCs

Elektroporation von Zellen stellt eine Belastung an ihre Viabilität dar. Es sollte nun getestet werden, wie viele PBMCs nach Elektroporation mit mRNA unter den von uns verwendeten Elektroporationsbedingungen (300 V, 150 μ F, 1540 Ω) durch Apoptose (programmierter Zelltod) sterben. Dazu werden PBMCs mit mRNA elektroporiert, nach 6 h mit 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Auswertung ergab, dass nur 8,42% der Zellen durch Apoptose zugrunde gehen. In der

Negativkontrolle, für welche PBMCs verwendet wurden, die nicht elektroporiert wurden, starben 2,35% der PBMCs durch Apoptose (Abbildung 24).

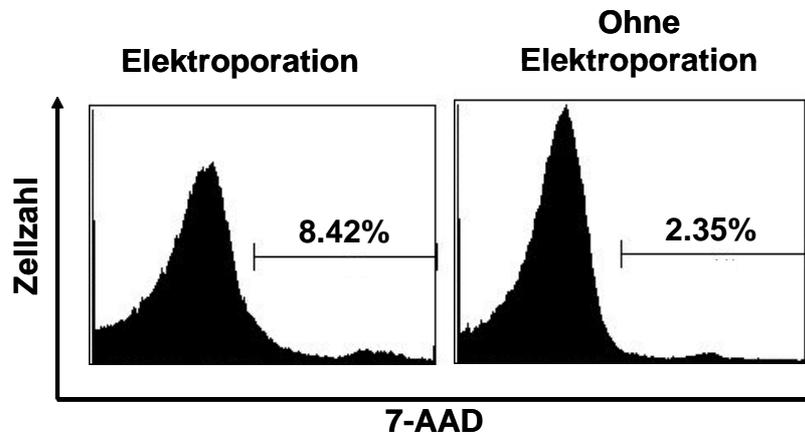


Abbildung 24 Viabilität der PBMCs nach Elektroporation mit mRNA.

PBMCs wurden mit mRNA elektroporiert und nach 6 h Kultur mit 7-AAD gefärbt. Als Negativkontrolle dienten PBMCs ohne Elektroporation.

4.7. Untersuchung der spezifischen Proliferation von T-Zellen nach Elektroporation mit mRNA

Durch die Auswertungstechnik der Tetramerfärbung nach Kultur der elektroporierten Zellen wurde eine Methode entwickelt, die eine Auswertung der Proliferation der für das Antigen spezifischen CD8⁺-Zellen ermöglicht. Durch diese Methode wird jedoch die Immunreaktion der CD4⁺-Zellen nicht untersucht. Es ist jedoch inzwischen bekannt, dass die Aktivierung von spezifischen T-Helferzellen eine wichtige Rolle bei der Bekämpfung von Tumoren spielt. Ein weiterer Nachteil ist die Beschränkung der Anwendbarkeit der Tetramerfärbung auf die verfügbaren Tetramere und damit auf Patienten beschränkt die einen bestimmten HLA-Haplotyp besitzen. Des Weiteren können nur bereits bekannte T-Zell-Epitope untersucht werden.

Es wurden Experimente durchgeführt in denen die elektroporierten PBMCs mit CFSE markiert wurden und ohne Zugabe von aufgetauten PBMCs für 1 Woche kultiviert wurden. Es wurde mRNA verwendet die für das Influenza Matrix Protein und für CMV

pp65 kodiert. Als Negativkontrolle dienten PBMCs, die mit EGFP-mRNA elektroporiert wurden. Als Positivkontrollen wurden die immunodominanten HLA-A*0201-Peptide von Flu M1 und CMV pp65 verwendet. Die Stimulation der PBMCs mit PHA diente der Kontrolle der Proliferation und der CFSE-Markierung. Die PBMCs wurden dann durchflusszytometrisch auf Proliferation von CD4⁺- und CD8⁺-Zellen untersucht.

Für die Zellen die mit der mRNA für CMV pp65 elektroporiert wurden, konnte sowohl bei den CD8⁺- (41,03%), als auch bei den CD4⁺-Zellen (49,38%) eine erhöhte Proliferation im Vergleich zur Negativkontrolle (CD8⁺: 30,87%, CD4⁺: 37,88%) beobachtet werden. Für die Zellen, die mit der mRNA für Flu M1 elektroporiert wurden lag die Anzahl der proliferierten Zellen in beiden untersuchten Zellpopulationen unter der der Negativkontrolle (CD8⁺: 29,56%, CD4⁺: 37,88%). Die PBMCs die mit CMV pp65 Peptid beladen wurden zeigten gegenüber den Zellen die mit dem Flu M1 Peptid beladen wurden eine vermehrte Proliferation, sowohl bei den CD4⁺-, als auch bei den CD8⁺-Zellen (CD4⁺: Flu M1: 6,48% CMV pp65: 17,69%, CD8⁺: Flu M1: 6,88% CMV pp65: 15,43%). Die erhöhte Proliferation der CD4⁺-Zellen ist möglicherweise auf die Zytokinausschüttung (IL-2) der aktivierten CD8⁺-Zellen zurückzuführen (Abbildung 25).

Es wurden weitere Proliferationsexperimente mit den Zellen desselben Donors durchgeführt. Dieses erste viel versprechende Ergebnis konnte jedoch nicht mehr reproduziert werden. Oft war die unspezifische Proliferation der elektroporierten und kultivierten Zellen zu groß, um Unterschiede in der spezifischen Proliferation noch detektieren zu können.

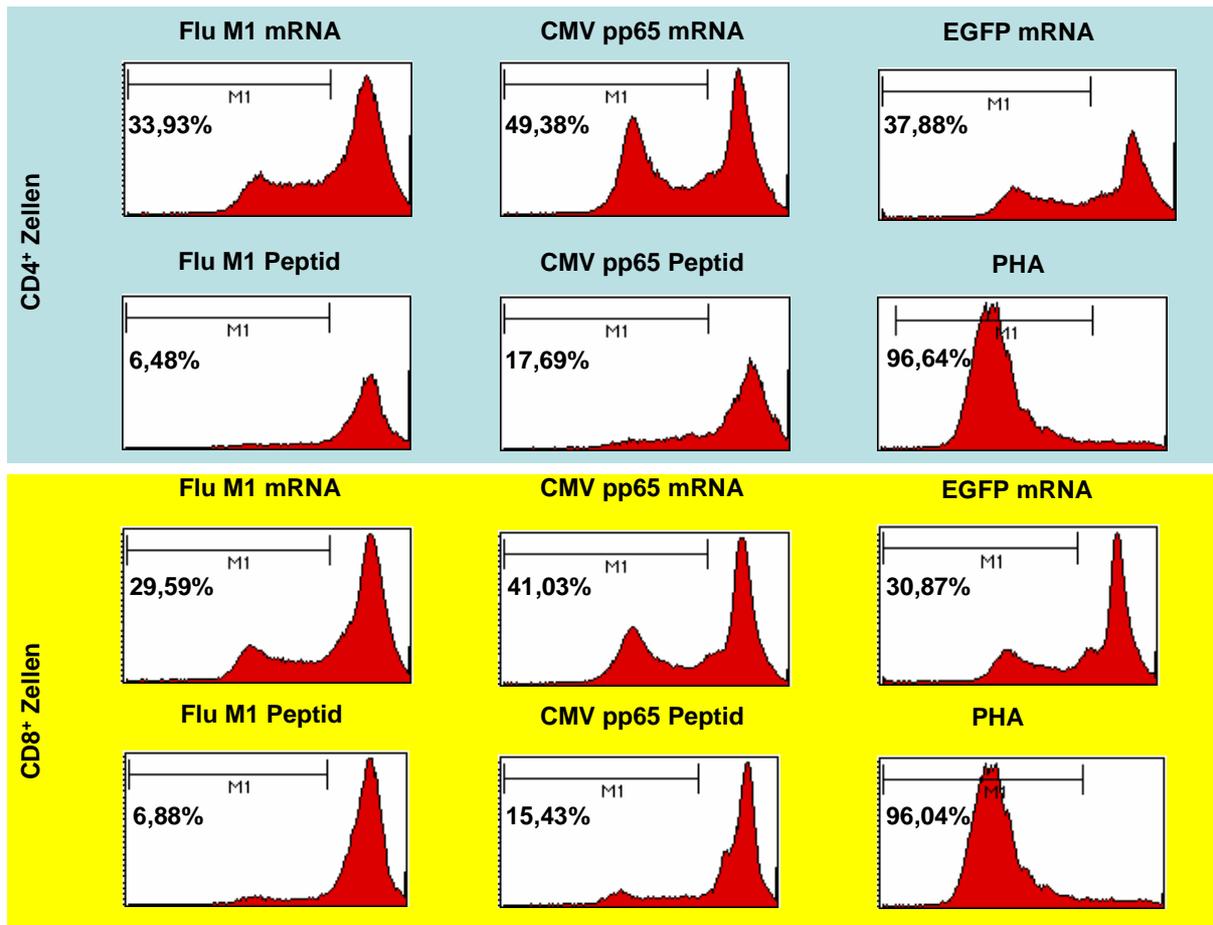


Abbildung 25 Untersuchung der spezifischen Proliferation von elektroporierten PBMCs.

PBMCs wurden mit mRNA die für Flu M1, CMV pp65 und EGFP kodiert elektroporiert. Als Kontrolle wurden die PBMCs mit den immunodominanten HLA-A*0201-Peptiden für die beiden Antigene beladen. Dann wurden die Zellen mit CFSE markiert und für eine Woche kultiviert. Die Proliferation durch Antikörperfärbung für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen ausgewertet.

4.8. Untersuchung der mRNA-Stabilität und Proteinexpression in unterschiedlichen Konstrukten

Die Menge an Protein die durch eine mRNA exprimiert werden kann ist sowohl von ihrer Stabilität, als auch von ihrer Fähigkeit zur Translation abhängig. Um die mRNA-Stabilität zu verbessern wurden in den von uns verwendeten Produktionsvektor als 5'UTR die Sequenz des β -Globin- und als 3'UTR die Sequenz des α -Globin-Gens von *Xenopus laevis* kloniert. Ist die mRNA der kodierenden Sequenz von diesen stabilisierende Sequenzen flankiert, wird die mRNA stabilisiert (Strong et al., 1997) und die Translationsrate ist *in vivo* im Vergleich zu unstabilisierten Konstrukten bis zu 40 fach erhöht (Malone et al., 1989). Die Globin-Proteine werden in den späten

Phasen der Erythrozyten-Differenzierung exprimiert, und globin-kodieren mRNA können dann einen Anteil an der Gesamt-mRNA der Zelle von bis zu 98% bilden. Dieser hohe Anteil ist nicht nur auf die vermehrte Transkriptionsrate zurückzuführen, sondern auch auf die hohe Halbwertszeit der mRNA von 24 bis zu 60 h. Die Globin-mRNAs sind mit die stabilsten vorkommenden Ribonukleinsäuren (Bastos und Aviv, 1977).

In den folgenden Experimenten sollte die Proteinexpression nach Transfektion von Konstrukten mit verschiedenen Globin-UTRs und der Einfluss von Poly(A) untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit ist die Stabilisierung der mRNA durch Veränderung der Nukleotidsequenz. Aufgrund des degenerierten genetischen Kodes ist es möglich die Nukleotidsequenz zu verändern, ohne das sich die Sequenz der Proteine ändert. Durch die veränderte Nukleotidsequenz kann die Translation verstärkt werden und eventuell die Stabilität der mRNA erhöht werden. Es werden zwei Varianten verwendet. Durch Anreicherung der Nukleotide Guanin (G) und Cytosin (C) in der Nukleotidsequenz der mRNA. Besitzt diese so genannte GC-reiche mRNA eine höhere Stabilität in der Zelle, da sie durch ihren hohen Gehalt an Guanin und Cystein besser vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt ist, als die mRNA mit der normalen Nukleotidsequenz. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Basenpaarung von Guanin und Cystein sehr stark ist und somit die Ausbildung von Sekundärstrukturen fördert. Diese Sekundärstrukturen machen die RNA widerstandsfähiger gegen Einzelstrang-spezifische RNasen. Außerdem führt die Vakzinierung mit Wildtyp-Genen aus Mikroorganismen und Parasiten im Empfänger oft zu einer ineffizienten Proteinexpression, da die verschiedenen Organismen bei der Translation unterschiedliche Kodon-Triplets bevorzugen (Ikemura, 1985). Diese GC-reichen Sequenzen werden synthetisch hergestellt. Die kodierte Aminosäure-Sequenz verändert sich nicht, da viele Aminosäuren durch mehr als ein Kodon kodiert werden Es werden lediglich die Kodons für eine Aminosäure gewählt, die den höchsten GC-Gehalt aufweisen. Die so entstandene mRNA wird i.d.R auch besser translatiert, da die GC-reichen Kodons auch diejenigen sind, für welche die meisten tRNA-Moleküle in der Zelle vorhanden sind. Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass kodonoptimisierte Gensequenzen im Gegensatz zur Wildtyp-Sequenz eine starke Immunantwort im Empfänger-Organismus auslösen können (Stratford et al., 2000).

RNA, die mit den Nukleotiden Adenin und Guanin angereichert ist (AG-reiche mRNA), könnte eine erhöhte Translationsrate in der Zelle hervorrufen, da Pyrimidinbasen (Uracil und Cystein) von RNasen erkannt werden und die RNA daher anfällig für den Abbau durch RNasen machen (Probst et al., 2006).

Es wurden PBMCs mit mRNA elektroporiert die für Flu M1 kodiert. Es wurde verglichen ob die GC-reiche und die AG-reiche mRNA eine Verbesserung in der Aktivierung von spezifischen T-Zellen *in vitro* im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz (Flu M1 WT) mit sich bringt.

4.8.1. Proteinexpression nach Elektroporation von BHK-Tumorzellen

Für die Untersuchung der Proteinexpression nach Elektroporation wurden unterschiedliche mRNA-Konstrukte verwendet, die die kodierende Sequenz des Hepatitis-B Oberflächen-Antigens (HBsAg, *Hepatitis-B surface Antigen*) tragen. Dieses Protein wird von den Zellen sekretiert, und kann somit im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden. Rekombinant hergestelltes HBsAg ist der hauptsächliche Bestandteil des Impfstoffs gegen Hepatitis-B der heutzutage verabreicht wird. Das Auftreten von HBsAg im Serum oder im Plasma ist ein Hinweis für eine Hepatitis-B-Infektion. Daher sind sehr sensitive und zuverlässige ELISA-Testsysteme zum Nachweis von HBsAg erhältlich. Somit ist der Nachweis des exprimierten Proteins nach Elektroporation mit mRNA sehr einfach durchzuführen.

Ergebnisse

Es wurden folgende mRNA-Konstrukte verwendet:

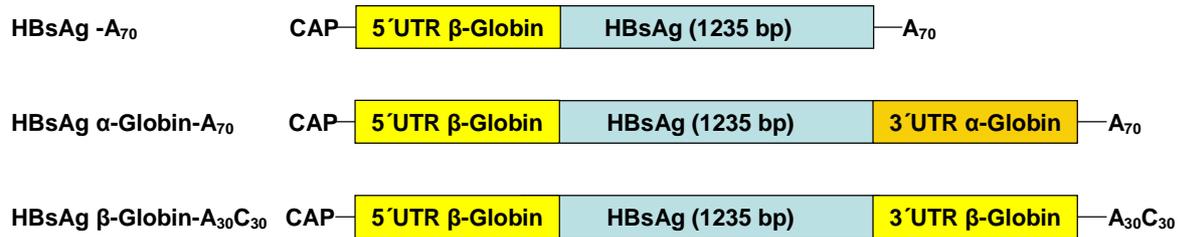


Abbildung 26 Unterschiedlich stabilisierte mRNA-Konstrukte von HBsAg.

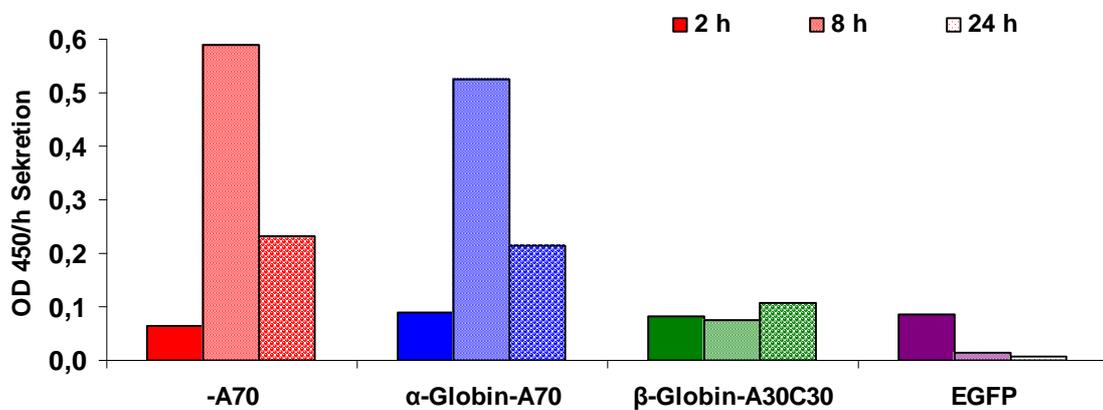


Abbildung 27 Untersuchung der Stabilität und Proteinexpression verschiedener HBsAg-mRNA-Konstrukte.

BHK-21 Tumorzellen wurden mit mRNA die für HBsAg kodiert elektroporiert. Die untersuchten mRNA-Konstrukte besitzen verschiedene 3'UTR und poly(A)-Schwänze. 2 h, 8 h und 24 h nach Elektroporation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, die Zellen gewaschen und erneut Zellkulturmedium zugegeben. Im Diagramm sind die Proteinmengen dargestellt, die in einer Stunde sekretiert wurden (OD/Anzahl der Stunden zwischen Mediumzugabe und -abnahme).

Es wurden 4 Mio. BHK mit 10 µg der entsprechenden mRNA (Konstrukte aus Abbildung 26) elektroporiert und in 2 Wells in 300 µl RPMI-Zellkulturmedium einer 24-Well-Zellkulturplatte kultiviert. 2 h, 8 h und 24 h nach der Elektroporation wurde jeweils der Zellkulturüberstand abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 300 µl frisches RPMI-Zellkulturmedium zugegeben. Die einzelnen Überstände wurden 1:8 verdünnt im Monolisa HBs Ag Plus auf HBsAg-Expression untersucht.

Zur Auswertung wurden die erhaltenen OD-Werte durch die jeweilige Anzahl an Stunden dividiert, die zwischen den einzelnen Medienwechseln lagen. Somit wird in Abbildung 27 die Menge an sekretierten HBsAg pro Stunde Kultur dargestellt.

Die Sekretion der BHK-21 von HBsAg 2 h nach Elektroporation liegt im Bereich der Negativkontrolle (EGFP-mRNA). Von 2 h bis 8 h nach Elektroporation zeigt die sekretierte Menge an HBsAg ein Maximum. Wobei HBsAg-A70 (0,59) und HBsAg- α -Globin-A70 (0,53) eine ähnlich hohe Proteinexpression zeigen. Bei Elektroporation mit HBsAg- β -Globin-A30C30 wird eine viel geringere Menge (0,08) an sekretiertem Protein im Zellkulturüberstand gemessen. Zwischen 8 h und 24 h nach Elektroporation sinkt die Expressionsrate in den Konstrukten mit HBsAg-A70 und HBsAg- α -Globin-A70 stark ab (-A70: 0,23; α -Globin-A70: 0,22). Für die Zellen, die mit HBsAg- β -Globin-A30C30 elektroporiert wurden, steigt die gemessene Sekretion leicht an (0,11). Diese Ergebnisse konnten in mehreren durchgeführten Experimenten reproduziert werden. Es hat sich gezeigt dass die Konstrukte HBsAg-A70 und HBsAg- α -Globin-A70 eine vermehrte Proteinexpression gegenüber dem Konstrukt HBsAg- β -Globin-A30C30 zeigen, ihre Halbwertszeit jedoch geringer ist.

4.8.2. Proteinexpression nach Elektroporation von PBMCs

Zum Vergleich der mRNA-Stabilität und damit der Proteinexpression von verschiedenen mRNA-Konstrukten nach Elektroporation, wurde das Reporterprotein Luziferase verwendet. Der Nachweis dieses Proteins ist sehr sensitiv und einfach durchführbar.

Es wurden jeweils 4 Mio. PBMCs mit 10 μ g mRNA elektroporiert. Für jeden der untersuchten Zeitpunkte nach Transfektion wurde eine Elektroporation durchgeführt und die Zellen vereinigt. Für jeden Zeitpunkt wurden die elektroporierten PBMCs in zwei Wells einer 24-Well-Zellkulturplatte in X-Vivo 15-Kulturmedium kultiviert (2 Mio./Well). Die Luziferase-Aktivität wurde nach 6 h, 8 h, 10 h, 25 h, 35 h und 47 h Kultur gemessen.

Ergebnisse

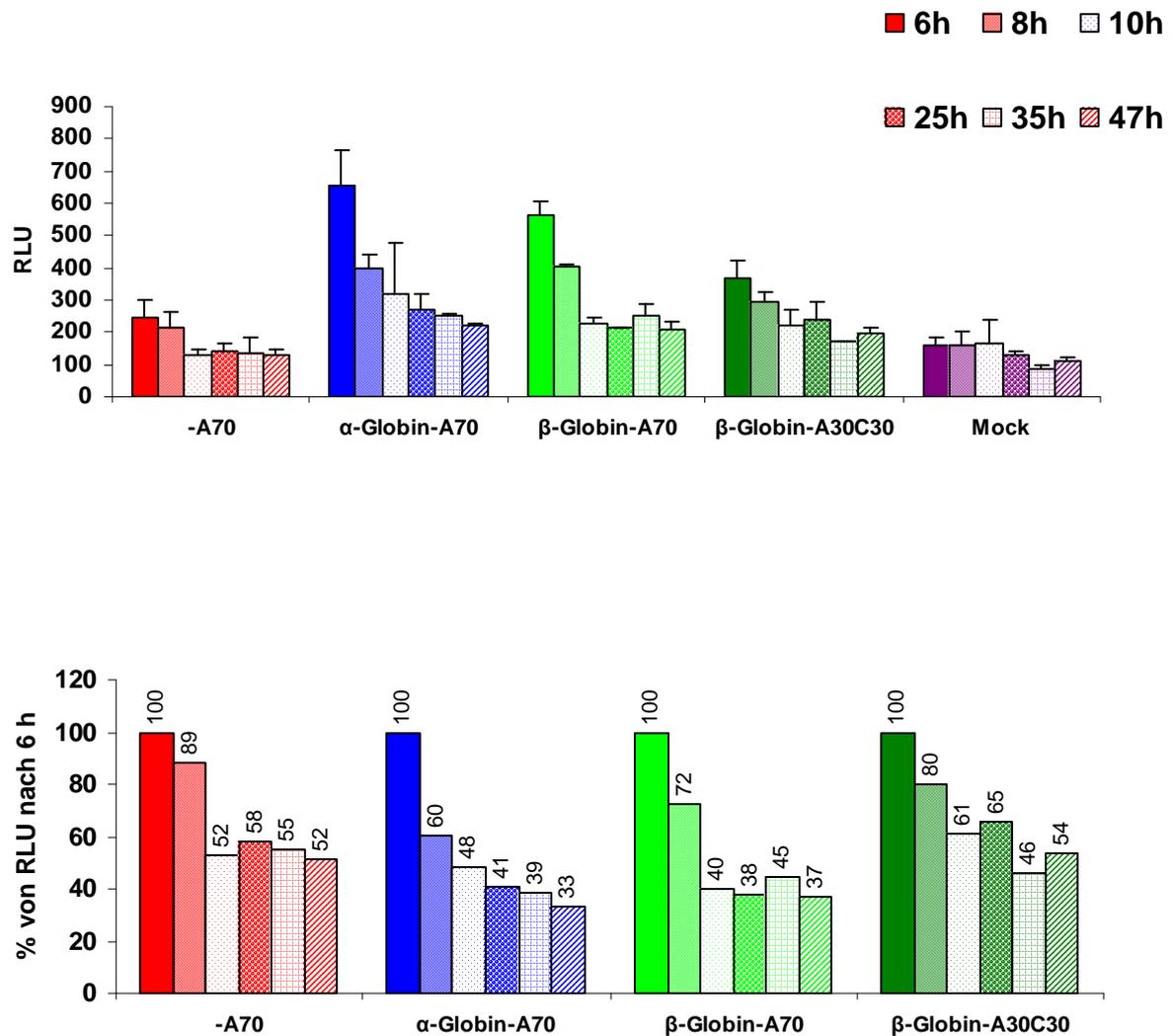


Abbildung 28 *Luziferase-mRNA-Stabilität nach Transfektion in PBMCs mit verschiedenen mRNA-Konstrukten.*

PBMCs wurden mit Luziferase-mRNA elektroporiert. Es wurden Konstrukte verwendet die unterschiedliche Stabilisierungssequenzen besitzen (RNAActive folgende 3'UTR und Poly(A)-Schwanz: ohne 3'UTR und A70, mit α-Globin 3'UTR und A70, mit β-Globin 3'UTR und A70, mit β-Globin 3'UTR und A30 und C30). Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten auf Luziferase-Aktivität untersucht. Oben sind die Mittelwerte der in Duplikaten durchgeführten Elektroporationen dargestellt. Im unteren Diagramm sind die Werte prozentual vom Ausgangswert nach 6 h dargestellt (RLU nach 6 h=100%).

Bei allen verwendeten mRNA-Konstrukten lag das Maximum an exprimierter Luziferase bei der Messung 6 h nach Elektroporation. Vergleicht man die Höhe der Luziferase-Aktivität 6 h nach Elektroporation, so kann festgestellt werden, dass die PBMCs, die mit dem mRNA-Konstrukt mit α-Globin 3'UTR und A70 elektroporiert wurden den höchsten Wert von 657 RLU aufweisen. Für das mRNA-Konstrukt ohne

3'UTR hingegen nur 244 RLU. Für die Konstrukte mit β -Globin 3'UTR und A70 563 RLU und mit A30C30 366 RLU. Die Negativkontrolle (Mock, PBMCs ohne mRNA-Zugabe elektroporiert) wurde eine Hintergrundaktivität von 158 RLU gemessen (Abbildung 28, Diagramm oben). Vergleicht man die Stabilität der mRNA in der Zelle im Zeitverlauf nach der Elektroporation, so konnte beobachtet werden, dass das Konstrukt mit β -Globin 3'UTR und A30C30 am stabilsten ist. Es konnte nach 8 h 80%, nach 10 h 60%, nach 25 h 65%, nach 35 h 46% und nach 47 h 54% der Proteinmenge nach 6 h nachgewiesen werden (Abbildung 28, Diagramm unten). Für das mRNA-Konstrukt ohne 3'UTR ergab sich ein ähnliches Ergebnis. Jedoch war hier die Höhe der Proteinexpression nur sehr gering. Sie lag in der Nähe der Nachweisgrenze (vgl. RLU-Werte mit Negativkontrolle). Die mRNA-Stabilität in den Konstrukten mit α -Globin 3'UTR A70 und β -Globin 3'UTR A70 zeigten eine ähnliche Stabilität. So waren 10 h nach Elektroporation 40-48%, 25 h nach Elektroporation 38-41%, 35 h nach Elektroporation 38-45% und 47 h nach Elektroporation 33-37% der Proteinmenge 6 h nach Elektroporation detektierbar.

Diese Stabilitäts-Untersuchung verschiedener mRNA-Konstrukte wurde zusätzlich mit BHK-21 Tumorzellen durchgeführt. Diese Zellen weisen eine wesentlich höhere Transfektionsrate als PBMCs auf, wie sich schon in den vorausgegangenen Experimenten gezeigt hat. In diesem Experiment konnten die Ergebnisse aus der Transfektion von PBMCs mit diesen Konstrukten bestätigt werden. Die höchste Proteinmenge 6 h nach Transfektion konnte beim mRNA-Konstrukt mit α -Globin 3'UTR A70 beobachtet werden. Die geringste Menge an exprimierter Luziferase konnte für das Konstrukt ohne 3'UTR festgestellt werden. Dazwischen lagen die Konstrukte mit β -Globin 3'UTR, wobei das Konstrukt mit A70 eine größere exprimierte Proteinmenge hervorbrachte, als das Konstrukt mit A30C30 (Abbildung 29, Diagramm oben). Bei der Stabilität der mRNA, konnte ebenso wie bei den transfizierten PBMCs die beste Stabilität für das Konstrukt mit β -Globin 3'UTR A30C30 nachgewiesen werden. Die anderen drei mRNA-Konstrukte waren sich in ihrer Stabilität ähnlich (Abbildung 29, Diagramm unten).

Ergebnisse

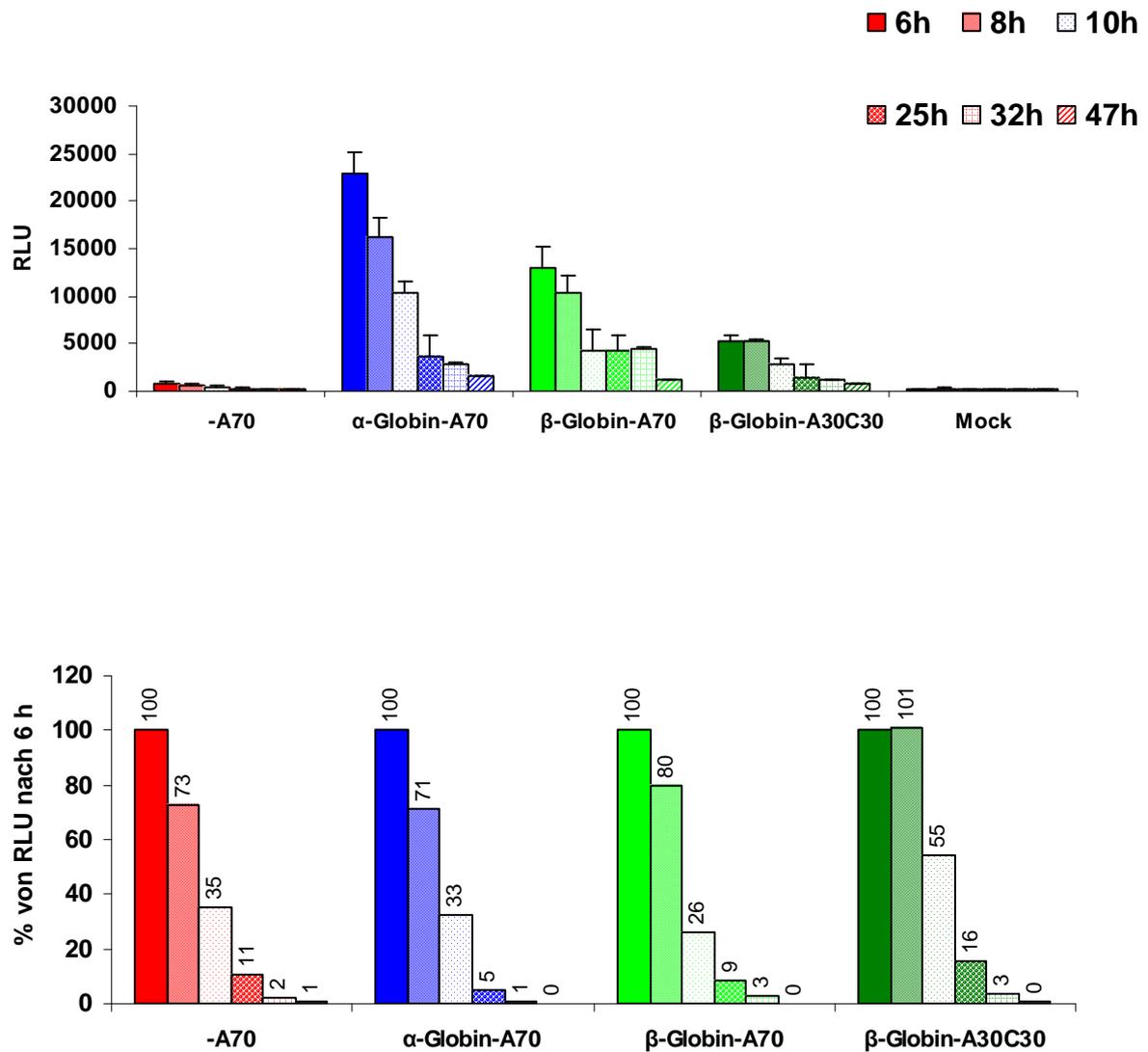


Abbildung 29 *Luziferase-mRNA-Stabilität nach Transfektion in BHK-21 mit verschiedenen mRNA-Konstrukten.*

BHK-21 wurden mit Luziferase-mRNA elektroporiert. Es wurden Konstrukte verwendet die unterschiedliche Stabilisierungssequenzen besitzen (RNAActive folgende 3'UTR und Poly(A)-Schwanz: ohne 3'UTR und A70, mit α -Globin 3'UTR und A70, mit β -Globin 3'UTR und A70, mit β -Globin 3'UTR und A30 und C30). Die Zellen wurden nach unterschiedlichen Zeitpunkten auf Luziferase-Aktivität untersucht. Oben sind die Mittelwerte der in Duplikaten durchgeführten Elektroporationen dargestellt. Im unteren Diagramm sind die Werte prozentual vom Ausgangswert nach 6 h dargestellt (RLU nach 6 h=100%).

4.8.3. Vergleich von GC-reicher und AG-reicher mRNA mit der Wildtyp-mRNA

Es wurden PBMCs mit mRNA die für Flu M1 kodiert elektroporiert. Es wurden das Wildtyp-Konstrukt, das GC-reiche-Konstrukt und das AG-reiche-Konstrukt verwendet. Für das Wildtyp-Konstrukt wurde eine Sequenz mit einer stabilisierenden 3' α -Globin-UTR und einer 3' β -Globin-UTR verglichen. Die GC-reiche-Sequenz wurde zusätzlich mit einer Sequenz, die zur Sekretion des Proteins führt versehen. Als Negativkontrolle dienten mRNA die für EGFP kodiert. Die elektroporierten Zellen wurden für eine Woche kultiviert und mittels Tetramerverfärbung auf spezifische CTLs untersucht.

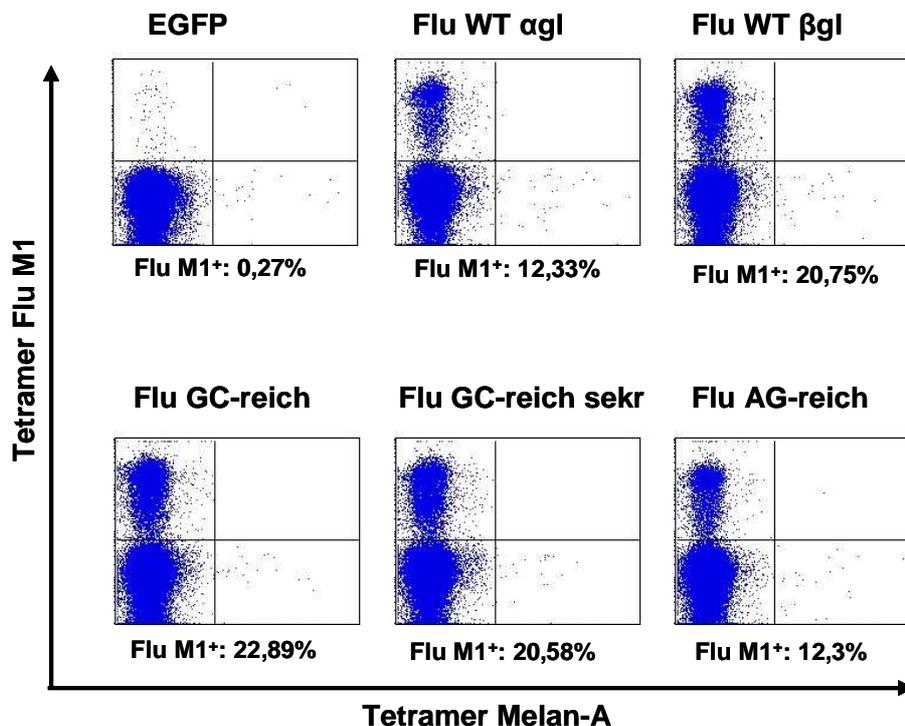


Abbildung 30 Vergleich von GC-, AG-reicher und Wildtyp-mRNA die für Influenza Matrix Protein kodiert.

Es wurden PBMCs mit der mRNA die für EGFP und für Flu M1 kodiert. Von der Flu M1-mRNA wurden folgende Varianten verwendet: Flu M1 Wildtyp mit α -Globin 5'UTR (Flu WT α gl), Flu M1 Wildtyp mit β -Globin 5'UTR (Flu WT β gl), Flu M1 GC-reich (Flu GC-reich), Flu M1 GC-reich mit Leadersequenz zur Sekretion des Proteins (Flu GC-reich sekr) und Flu M1 AG-reich (Flu AG-reich). Die elektroporierten PBMCs wurden nach einer Woche Kultur auf Flu M1-Tetramer⁺-Zellen untersucht. Gezeigt sind nur die CD8⁺-Zellen.

Dieses Experiment wurde mehrmals reproduziert. In allen durchgeführten Experimenten war der Prozentsatz der Flu M1-Tetramer⁺-Zellen für den Kulturansatz mit PBMCs, die mit Flu M1 WT (α -Globin-UTR oder β -Globin-UTR) geringer als mit den PBMCs, die mit dem GC-reichen-Konstrukt (mit oder ohne Sequenz zur Sekretion) elektroporiert wurden. Die Elektroporation mit der AG-reichen mRNA zeigte immer eine geringere oder ungefähr gleiche Anzahl an Tetramer⁺-Zellen, wie die Elektroporation mit Flu M1-Wildtyp mRNA. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind darauf zurückzuführen, dass es sich hierbei um verschiedene Blutspender handelt und sich die einzelnen durchgeführten Elektroporationen in ihrer Effektivität voneinander unterscheiden.

5. Diskussion

5.1. RNA-Transfektion in Zellen

In den letzten Jahren nahm die Anzahl der klinischen Studien, die mRNA zur Vakzinierung gegen Infektionskrankheiten und Tumorerkrankungen verwenden stetig zu. Im Gegensatz zur Verwendung von Peptidvakzinen ist bei diesem Ansatz das Epitop nicht bekannt, gegen das die Immunantwort ausgelöst werden kann. Bei der Vakzinierungsstrategie mittels mRNA ist die Anwendbarkeit nicht nur auf Patienten beschränkt, die einen bestimmten HLA-Haplotyp besitzen, für den Antigene bereits charakterisiert wurden. Daher beschränken sich die meisten der bisher veröffentlichten Vakzinierungsstudien auf Patienten, die das MHC-Klasse I-Molekül HLA-A2 exprimieren. Der HLA-A2-Genotyp tritt in der Bevölkerung von Europa und Nordamerika in einer Häufigkeit von ca. 50% auf. Für dieses Molekül sind zurzeit auch die meisten Peptidepitope charakterisiert. Für andere HLA-Klasse 1 Allele sind weniger Epitope bekannt.

Es wurde sowohl die Lipofektion, als auch die Elektroporation von mRNA in Tumorzellen, DCs und PBMCs untersucht. Die Lipofektion in Tumorzellen zeigte eine hohe Expressionsrate des kodierten Proteins. Unterzieht man humane DCs und PBMCs dieser Transfektionsmethode, ist die Proteinexpression kaum detektierbar und die Viabilität der Zellen ist stark herabgesetzt. Dies konnte in der durchflusszytometrischen Auswertung der transfizierten Zellen in der FSC/SSC-Darstellung beobachtet werden. In der Literatur und den Angaben der Hersteller wird zwar beschrieben, dass die Toxizität der heute gebräuchlichen liposomalen Transfektionsreagenzien (z.B. DOTAP) sehr gering ist, die verwendeten Primärzellen zeigten jedoch trotz Optimierung der Versuchsparameter eine herabgesetzte Überlebensrate. Wurden die DCs und PBMCs hingegen mit der mRNA elektroporiert, konnte eine bessere Proteinexpression und Zellviabilität, als mit Lipofektion, festgestellt werden. Es wurde bereits veröffentlicht, dass die Elektroporation von DCs mit mRNA eine wesentlich bessere Expression des Reporterproteins EGFP auslöst, als die Lipofektion mit dem Transfektionsreagenz DOTAP oder durch rezeptorvermittelte Endozytose (Grunebach et al., 2003). Die Autoren zeigen hier, dass nach der Elektroporation mit 2,5 µg RNA exprimierten ca. 29% der dendritischen Zellen das Reporterprotein EGFP, nach Lipofektion mit DOTAP mit 2,5

µg und 20 µg RNA hingegen nur ca. 7% und ca. 17,5% und nach rezeptorvermittelter Endozytose von 20 µg RNA nur ca. 1%. Eine noch höhere Transfektionseffizienz von bis zu 63% bei der Elektroporation von DCs mit mRNA wurde von der Arbeitsgruppe um van Tendeloo beschrieben (Van Tendeloo et al., 2001). Die mRNA-Transfektion von DCs durch Elektroporation und über virale Vektoren wurde ebenfalls bereits miteinander verglichen. Durch adenoviralen Gentransfer konnte eine Transfektionseffizienz von 90% gegenüber 60% nach Elektroporation detektiert werden (Lundqvist et al., 2002). Trotz dieser Ergebnisse stellt die Elektroporation von mRNA eine geeignete Alternative zum viralen Transfer dar, da hierbei nicht die vorgeschriebenen aufwändigen Sicherheitsvorschriften beim Umgang mit viralen Vektoren umgegangen werden muss. Dazu kommt, dass die durch mRNA ausgelöste Immunantwort in den DCs gegen das kodierende Protein der mRNA, und nicht gegen vom viralen Vektor kodierten Proteine gerichtet ist.

Die Effizienz der Elektroporation hängt stark von den verwendeten Elektroporationsparametern (Pulsart (Rechteck oder exponentiell abfallend), Spannung, Kapazität, Pulslänge), dem Elektroporationsgerät, den verwendeten Puffern, der Zellzahl, der Menge an RNA und vom Zelltyp ab. Bei unseren Experimenten mit verschiedenen Elektroporationsgeräten, konnte nur für den Nucleofector™ von Amaxa und den EasyJect Plus von Peqlab eine Transfektion von Zellen beobachtet werden. Für die weiteren Versuche wurde der EasyJect Plus verwendet, da der Nucleofector™ zur Transfektion von DNA entwickelt wurde, die in den Zellkern gelangen muss, um ihre biologische Funktion zu erfüllen. Die mRNA hingegen muss nur eine Membran durchdringen, da sie im Zytosol transkribiert wird. Ein weiterer Grund für die Verwendung des EasyJects liegt in seiner Anwendbarkeit für Transfektionen in andere Zellen ohne dass ein speziell dafür optimierter und kommerziell vertriebener Transfektionspuffer verwendet werden muss, wie dies beim Gerät von Amaxa der Fall ist. Unter diesen Transfektionspuffern mit optimisiertem Protokoll ist keines erhältlich, das für die gesamte Fraktion der PBMCs bestimmt ist. Es werden nur Kits zur Transfektion von Subpopulationen angeboten, wie z.B. der hier verwendete Human B cell Nucleofector™ Kit.

Die Zellmortalität nach Elektroporation von mRNA in PBMCs ist nur gering. 6 h nach erfolgter Elektroporation war durch 7-AAD-Färbung nur ein Prozentsatz von ca. 8% an durch Zelltod zugrunde gegangener Zellen zu sehen. Nach Elektroporation von

DNA in wurde teilweise eine Zellmortalität von bis zu 60%, bei einer Expressionsrate von nur 2% beobachtet. Diese erhöhte Mortalitätsrate kann durch die elektrischen Parameter der Elektroporation erklärt werden. So muss die Plasmid-DNA bei der Transfektion in Zellen gleich zwei Membranbarrieren überwinden: die Zellmembran und die Membran des Nukleus. Im Gegensatz zu mRNA, die im Zytosol ihre Funktion erfüllt, kann DNA nur wenn sie sich im Zellkern befindet transkribiert werden und somit ihre biologische Funktion erfüllen. Vergleicht man die EGFP-Expression nach DNA- und mRNA-Elektroporation in DCs, kann man eine vergleichbare Höhe und Länge der Proteinexpression beobachten (Ponsaerts et al., 2003).

Ein weiterer Vorteil der Elektroporation gegenüber der Transfektion mit Liposomen stellt die bessere Anwendbarkeit in der Vakzinierung von Patienten. So ist können elektroporierte DCs oder PBMCs direkt in Patienten injiziert werden, ohne dass eine toxische Reaktion durch das Transfektionsreagenz befürchtet werden muss. Es gibt bereits zahlreiche klinische Studien, in denen Patienten mit dendritischen Zellen vakziniert werden, die mit mRNA elektroporiert wurden.

Für das Auslösen einer antigen-spezifischen T-Zell-Antwort *in vitro* ist die Menge an exprimierten und damit detektierbarem Protein nicht entscheidend. In unseren Experimenten war die Expression der Reporterproteine in PBMCs nach Elektroporation mit mRNA im Vergleich zu elektroporierten dendritischen Zellen gering. So erhält man etwa nur halb so viel Luziferase-Aktivität für elektroporierte PBMCs gegenüber elektroporierten DCs (Abbildung 14). Vergleicht man hingegen die spezifischen zytotoxischen T-Zellen nach einer Woche Kultur der beiden Zelltypen, so konnten keine entscheidenden Unterschiede in der Frequenz der spezifischen CTLs festgestellt werden. Für die mit Flu M1-mRNA elektroporierten PBMCs erhält man 13,41% und für die DCs 12,98% Tetramer⁺-Zellen (Abbildung 22). Diese Tatsache ist eventuell darauf zurückzuführen, dass die Induktion einer CTL-Antwort eine höhere Sensitivität besitzt, als die Detektion der Proteinexpression mittels Durchflusszytometer oder Messung der Luziferase-Aktivität. So kann schon durch eine geringe Anzahl an Proteinen eine ausreichende Menge an Peptid zur Präsentation auf MHC-Molekülen auf der Oberfläche von APCs prozessiert werden. Ein weiterer Grund für diese Beobachtungen ist eventuell, dass die exprimierten Proteine nach mRNA-Elektroporation biologisch nicht funktionell sind, da sie degradiert sind oder nur eine unvollständige Aminosäuresequenz besitzen. Diese

unvollständigen Proteine können aber durchaus über den Weg der Antigenprozessierung zu Peptiden verarbeitet werden, die eine T-Zell-Antwort auslösen können. Dies ist eventuell auch über die von Jonathan Yewdell aufgestellte „DRIPs (*defective ribosomal products*)-Hypothese“ zu erklären. Diese Hypothese besagt, dass die in der Zelle hergestellten MHC-Epitope hauptsächlich aus unvollständigen oder falsch gefalteten Proteinen stammen. Diese defekten Proteine werden in den Zellen schnell und effektiv zu Peptiden prozessiert und auf MHC-Moleküle geladen auf der Oberfläche von Zellen präsentiert (Yewdell et al., 1996). Im Gegensatz zu diesen Theorien, wurde von anderen Arbeitsgruppen festgestellt, dass eine höhere Menge an Antigen zu einer höheren Anzahl von Peptid/MHC-Komplexen führt, und damit eine effektivere Immunantwort ausgelöst werden kann (Van Tendeloo et al., 2001).

5.1.1. Passive Pulsing

Es wurden zahlreiche Experimente durchgeführt, in denen mRNA mit DCs ohne Zugabe von Transfektionsreagenz koinkubiert wurden. Diese Methode bringt den Vorteil mit sich, dass keine toxischen Substanzen oder für die Zellviabilität schädliche Einflüsse auf die zu transfizierenden Zellen einwirken. Diese Methode stellt eine einfache, kostengünstige und einfach unter konstanten Bedingungen reproduzierbare Transfektionsmethode dar. In den von uns durchgeführten Transfektionsversuchen konnte jedoch weder eine Proteinexpression, noch eine CTL-Aktivierung festgestellt werden (Abbildung 13). Die Arbeitsgruppe von Eli Gilboa hat gezeigt, dass eine Aufnahme und Translation der mRNA durch Koinkubation mit DCs möglich ist. So wurden DCs mit mRNA die für PSA (*prostate specific antigen*) kodiert „gepulst“. Durch RT-PCR mit PSA-spezifischen Primern konnte die Aufnahme der mRNA in die Zellen dargestellt werden. Nach CTL-Kultur dieser DCs konnten durch die *in vitro* generierten CTLs Tumorzellen lysiert werden, die mit dem HLA*A0201 Epitop von PSA beladen waren (Heiser et al., 2000) Diese Ergebnisse konnten von uns, wie auch von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden (Van Tendeloo et al., 2001).

5.1.2. Verwendung von PBMCs zur mRNA-Transfektion

Bisher wurde in der Literatur hauptsächlich die Verwendung von dendritischen Zellen zur mRNA-Transfektion beschrieben. Diese Methode ist leicht zu reproduzieren und dendritische Zellen sind sehr potente antigenpräsentierende Zellen. So kann mit antigenbeladenen (Beladung mit Peptid, Tumorlysat, Protein, mRNA-Transfektion) DCs *in vitro* eine spezifische T-Zellantwort ausgelöst werden. Aus diesem Grund können diese Zellen zur Auswertung der Immunantwort der Patienten in klinischen Vakzinierungsversuchen verwendet werden. Dazu werden aus autologen PBMCs *in vitro* DCs generiert. Diese DCs werden mit dem Antigen beladen, bzw. mit mRNA elektroporiert und dann als Zielzellen in Versuchen verwendet, die die spezifische T-Zell-Antwort, die *in vivo* ausgelöst wurde, untersuchen. Es können mit mRNA transfizierte DCs als APCs in einem ELISpot, bei der intrazellulären Zytokinfärbung und als Zielzellen im zytotoxischen-T-Zell-Assay verwendet werden. So wurden mit mRNA, die für PSA (*prostate-specific antigens*) kodiert, elektroporierte DCs als Zielzellen in einem zytotoxischen T-Zell-Assay verwendet. Als Effektorzellen dienten CTLs die durch *in vitro*-Stimulation von autologen PBMCs aus Patienten mit Prostatatumoren durch elektroporierte DCs generiert wurden. Die *in vitro* generierten CTLs waren in der Lage die Zielzellen spezifisch zu lysieren (Su et al., 2003). Aufgrund ihrer sehr guten Fähigkeit zur Antigenpräsentation, können DCs *in vitro* eine T-Zell-Erstantwort auslösen. Bei der Auswertung der ausgelösten Immunantwort nach klinischen Vakzinierungsstudien, soll jedoch nur die *in vivo* ausgelöste Gedächtnis-T-Zellantwort untersucht werden. In unseren Versuchen zur Generation von CTL-Antworten *in vitro* durch mit mRNA elektroporierte PBMCs als APCs, konnte nur eine Gedächtnis-T-Zell-Anwort ausgelöst werden. Die elektroporierten PBMCs konnten nur die Flu M1-spezifischen T-Zellen zur Proliferation anregen, nicht aber eine T-Zell-Erstantwort von naiven MART-1/Melan-A spezifischen T-Zellen auslösen. Im Gegensatz dazu, waren die elektroporierten DCs in der Lage auch bei den MART-1/Melan-A-spezifischen naiven T-Zellen eine Immunantwort auszulösen. Die Proliferation der CTLs nach Elektroporation von DCs und PBMCs mit mRNA die für Flu M1 kodiert ist jedoch vergleichbar (Abbildung 22). Daraus lässt sich schließen, dass elektroporierte PBMCs und DCs eine ähnlich gute Fähigkeit besitzen nach Elektroporation mit mRNA Gedächtnis-T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

Ein weiterer Nachteil bei der Verwendung von DCs zur Auswertung von Immunantworten, ist die große Anzahl von Patientenzellen die zur Herstellung von DCs benötigt wird. So werden aus 100 ml Blut nur etwa 10 Mio. PBMCs gewonnen und die Menge an Blut, die von den Patienten erhalten werden kann, ist durch ihren manchmal schlechten Allgemeinzustand limitiert. So ist aufgrund des Probenmaterials eine ausreichende Reproduktion der erhaltenen Resultate oft nicht möglich. Zusätzlich fordert die Herstellung von DCs aus Monozyten eine *in vitro*-Kultur, die für die Verwendung von PBMCs nicht notwendig ist. Somit sind elektroporierte PBMCs ein einfacheres und schnelleres Instrument zur Immunstimulation *in vitro*. In der Literatur wurde zusätzlich die Verwendung von durch CD40-Ligand aktivierte B-Zellen beschrieben. So wurden aktivierte B-Zellen mit mRNA elektroporiert, die für Flu M1 kodiert. Nach einer Woche Kultur war eine Proliferation von spezifischen T-Zellen nach Tetramerfärbung sichtbar. Diese Zellen sind in der Lage peptidbeladene Tumorzellen spezifisch zu lysieren und sekretieren Interferon- γ im ELISpot. Die elektroporierten aktivierten B-Zellen (aus gesunden Blutspendern) konnten ebenso eine funktionelle CTL-Antwort gegen MART-1/Melan-A auslösen (Coughlin et al., 2004). Bei dieser Methode der T-Zell-Stimulation ist die Anzahl an benötigten Patientenzellen ebenfalls sehr gering. Es ist jedoch eine aufwändige Kultur notwendig, um die durch CD40-Liganden aktivierten B-Zellen zu gewinnen. Hinzu kommt, dass diese Zellen ebenso wie dendritische Zellen fähig sind eine T-Zell-Erstantwort *in vitro* auszulösen.

In unseren Experimenten wurde gezeigt, dass neben der Elektroporation von frisch isolierten PBMCs, ebenfalls die Möglichkeit besteht kryokonservierte PBMCs zu verwenden. Werden diese Zellen mit mRNA elektroporiert und als APCs in einer CTL-Kultur verwendet, kann eine spezifische Proliferation von CD8⁺-T-Zellen beobachtet werden. Zwar ist der Prozentsatz der Proliferation geringer, als bei der Verwendung von frisch isolierten PBMCs, jedoch ist die Proliferation für eine zuverlässige Auswertung ausreichend (Abbildung 20). Beim Vergleich der Expression von Luziferase in frischen und aufgetauten PBMCs, wurden ähnliche Ergebnisse erhalten (Abbildung 21). Diese Anwendungsmöglichkeit macht diese Methode zu einem geeigneten Instrument zur Auswertung der Immunantwort in klinischen Studien. Hier wird an definierten Zeitpunkten während des Studienverlaufs Patientenblut gewonnen, das bis zum Zeitpunkt der Auswertung am Abschluss der

Studie eingefroren wird. Bei der Auswertung sollten möglichst die Zellen aus allen Blutentnahmen gleichzeitig untersucht werden, um genaue Aussagen über die Immunantwort im Verlauf der Studie machen zu können. Um zuverlässige Aussagen über den Erfolg eines Vakzins machen zu können, ist es notwendig die *in vitro*-Auswertung zu reproduzieren.

5.2. CD4⁺-T-Helferzellen bei der Tumorabwehr

Bei den meisten durchgeführten Vakzinierungsstudien gegen Tumorerkrankungen wird versucht eine starke zytotoxische T-Zell-Antwort auszulösen, da die CTLs die Fähigkeit besitzen Tumorzellen direkt abzutöten. Dazu tragen Tumoren meist MHC-Klasse I-Moleküle auf ihrer Oberfläche. In der letzten Zeit wurde jedoch die bedeutende Rolle der CD4⁺-T-Helferzellen bei der Bekämpfung von Tumoren bekannt. Sie spielen eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von CTLs. Sie erkennen auf MHC-Klasse II präsentierte Antigene auf der Oberfläche von DCs und aktivieren diese antigenpräsentierenden DCs. Diese Interaktion zwischen CD4⁺-T-Helferzellen und DCs findet über die CD40 und CD40-Ligand (CD40L) statt. CD40L ist ein Zelloberflächenmolekül, das auf antigenstimulierten CD4⁺-T-Helferzellen exprimiert wird, und mit DCs über den Zelloberflächenrezeptor CD40 in Kontakt tritt und diese aktiviert. Die aktivierte DC produziert daraufhin Zytokine (hohe Menge von IL-12). CD40L ist dazu der potenteste Stimulator zur Hochregulation der Oberflächenmoleküle ICAM-1, CD80 und CD86 auf DCs. Diese aktivierten DCs besitzen eine sehr gute Fähigkeit die Proliferation und IFN- γ -Sekretion von T-Zellen zu stimulieren (Cella et al., 1996). Somit können CD4⁺-T-Helferzellen antigenspezifische zytotoxische T-Zellen aktivieren.

T-Helferzellen werden in zwei Subtypen unterteilt: T_H1-Zellen sekretieren IFN- γ und TNF- α und regulieren die Entwicklung und Persistenz von CTLs, sie aktivieren APCs und fördern die Produktion von Antikörpern, die die Aufnahme von infizierten Zellen oder Tumorzellen in die APC verstärken; T_H2-Zellen sekretieren IL-4 und fördern vor allem eine humorale Immunantwort.

T_H1-Zellen können durch Zytokinsekretion, die Todesrezeptoren aktiviert Tumorzellen direkt eliminieren.

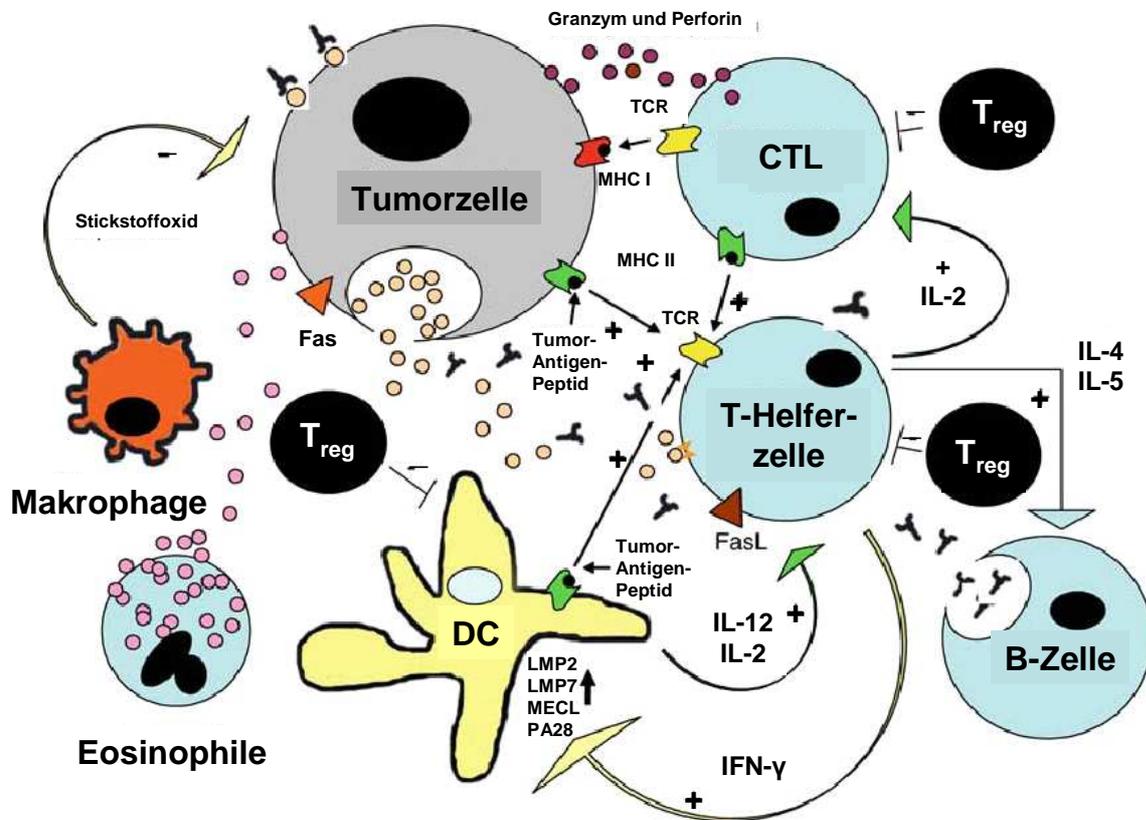


Abbildung 31 Rolle von $CD4^+$ -T-Helferzellen bei der Immunabwehr von Tumoren.

Die T-Helferzellen können sowohl mit Tumorzellen, als auch mit zahlreichen anderen Immunzellen interagieren, sowohl kontaktabhängig, als auch kontaktunabhängig. Ein + kennzeichnet einen positiven, ein - den negativen Einfluss auf die anti-Tumor-Immunantwort. (Abbildung aus (Knutson und Disis, 2005b))

Auch die intrazellulären Tumorantigene können durch MHC-Klasse II-Moleküle präsentiert werden. Es konnte beobachtet werden, dass bei Vakzinierungen sowohl zytotoxische T-Zellen, als auch T-Helferzellen aktiviert werden. Dies kann zu einer lang anhaltenden Immunität führen, wie sie zur Bekämpfung von Tumoren wichtig ist, und einer nach T_H1 gerichteten Immunantwort, die zu „*epitope spreading*“ führen kann (Knutson und Disis, 2005a). Des Weiteren sind $CD4^+$ -T-Helferzellen in der Lage, auch in der Abwesenheit von CTLs, die Regression von Tumoren auszulösen. Der genaue Mechanismus für dieses Phänomen ist noch unklar. In einigen Untersuchungen wurde jedoch festgestellt, dass das sekretierte IFN- γ der T-

Helferzellen eine Rolle bei der Tumorabwehr und der Verhinderung der Tumorangiogenese spielt (Qin und Blankenstein, 2000). Andere Studien haben ergeben, dass die Tumorabwehr durch T-Helferzellen über Rekrutierung von Effektorzellen, wie Eosinophile, Makrophagen und Mastzellen vermittelt wird. Da die CD4⁺-T-Zellantwort eine entscheidende Rolle bei Vakzinierungen gegen Tumoren spielt, und beim Ansatz mit mRNA sowohl MHC-Klasse I, als auch MHC-Klasse II-Epitope prozessiert werden können, sollte bei der Untersuchung der Immunantwort sowohl die CTL- als auch die T-Helferzell-Immunantwort untersucht werden.

Es ist bekannt dass nach Vakzinierung von Mäusen mit nackter mRNA und Injektion von GM-CSF 24 h später eine T_H1-polarisierte Immunantwort ausgelöst werden kann (Carralot et al., 2004). Die Auswertung durch MHC-Klasse I-Tetramere berücksichtigt nur die Immunantwort der CD8⁺-T-Zellen, die spezifisch für ein bestimmtes Epitop sind. Bei den Versuchen die mit CFSE-Markierung der mit mRNA elektroporierten Zellen durchgeführt wurden wird sowohl die Aktivierung von CD4⁺-, als auch von CD8⁺-T-Zellen berücksichtigt. Bei dieser Methode können die Zellen bei der durchflusszytometrischen Auswertung durch Färbung mit spezifischen Antikörpern in Subpopulationen unterteilt werden. Dies stellt einen Vorteil gegenüber der Proliferationsuntersuchung mit radioaktiv markiertem Thymidin dar. Hier kann die festgestellte Proliferation nicht einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden. Dazu müssen die Zellen vor der Proliferationsmessung in die einzelnen Zellpopulationen aufgetrennt werden, was mit einem hohen Zeitaufwand und Zellverlust verbunden ist. Dieser Ansatz ist nur sehr modellhaft, da die Interaktion der einzelnen Zelltypen, wie sie *in vivo* stattfindet, nicht berücksichtigt werden kann.

Bei unseren Versuchen mit elektroporierten und CFSE-markierten Zellen wurde festgestellt, dass die Elektroporation und die darauf folgende Zellkultur eine zu starke unspezifische Proliferation der zu untersuchenden Zellen auslöst und damit eine Auswertung der antigenspezifischen Proliferation schwierig macht (Abbildung 25). Ursachen für die unspezifische Proliferation können durch Elektroporation, Proteine des Zellkulturmediums, den Zusatz von Serum (FCS oder humanes Serum) und viele andere Einflüsse entstehen.

5.3. mRNA-Stabilität

mRNA ist aufgrund ihrer Struktur und der großen Anzahl an natürlich vorkommenden RNasen wesentlich instabiler als DNA. Diese Instabilität bringt bei der Anwendung *in vivo* den Vorteil, dass sie schnell abgebaut wird und damit keine Gefahr für die Sicherheit birgt. Da nach den ersten *in vivo*-Versuchen der Nukleinsäurevakzinierung die stabile DNA der instabilen mRNA vorgezogen wurde (Wolff et al., 1990), soll nun die Halbwertszeit der verwendeten mRNA verbessert werden, um eine Translation des Antigens vor dem Abbau der mRNA zu ermöglichen.

Ein wichtiges Instrument bei der Genregulation *in vivo* ist die Regulation der mRNA-Stabilität. So unterscheidet sich die Halbwertszeit verschiedener mRNA-Sequenzen bis um das 100 fache. Einige mRNA-Sequenzen haben eine Halbwertszeit von nur wenigen Minuten (z.B. regulatorische Proteine), andere hingegen von einigen Stunden (z.B. Strukturproteine). Vor allem bei den Haushaltsgenen (*house keeping genes*) findet eine ausgeprägte Regulation der mRNA-Stabilität statt. Die mRNA-Stabilität kann zusätzlich durch äußere Einflüsse (wie z.B. Wachstumsfaktoren und Hormone) gesteuert werden. In natürlich vorkommenden mRNA-Molekülen wird die Grundstabilität durch den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende (Wilson und Treisman, 1988) und die CAP-Struktur am 5'-Ende gewährleistet (Shimotohno et al., 1977, Furuichi et al., 1977). Diese Strukturen schützen die mRNA vor dem Abbau durch Exonukleasen. Der Poly(A)-Schwanz interagiert mit PABP (*poly(A)-binding protein*) und mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G, der an das Cap-Bindungsprotein eIF4E gebunden ist. Somit wird ein zirkulärer Komplex gebildet (Gingras et al., 1999a), der vor Deadenylierung und Decapping schützt (Abbildung 3). Des Weiteren ist der Abbau der mRNA durch andere cis-stabilisierende Elemente wie Adenin- und Uracil-reiche Elemente (ARE), Cytosin- und Uracil-reiche Elemente (CRE) und Haarnadelschleifen (*stem-loop*-Struktur) geregelt. Die Bindung dieser Sequenzen mit spezifischen Bindungsproteinen kann den Abbau oder die Stabilität der mRNA fördern. Die Eigenschaften dieser Elemente können genutzt werden, um einen mRNA-Vektor zu generieren, der eine erhöhte Translationsrate und Stabilität aufweist.

In den von uns verwendeten mRNA-Konstrukten (RNActive) werden als stabilisierende Sequenzen α - und β -Globin UTRs verwendet. Die Globin-Proteine

sind im späten Stadium der Erythrozytenentwicklung in der Zelle angehäuft. Da die Transkription in ausdifferenzierenden Erythrozyten nicht mehr stattfindet, ist diese Anhäufung auf eine Stabilisierung der bereits vorhandenen mRNA-Transkripte zurückzuführen, welche eine Halbwertszeit von 24 bis 60 h besitzen. Globin-mRNA enthält in ihrer 3'UTR eine cytosinreiche Sequenz, die mit einem Ribonukleoproteinkomplex (α -Komplex) interagiert. Diese Bindung verhindert die Spaltung der mRNA durch die in den Abbau der stabilen α -Globin-mRNA involvierte sequenzspezifische Endonuklease ErEN (*Erythroid cell enriched endoribonuclease*). Die Bindung des α -Komplexes wird durch PABP verstärkt, was darauf hindeuten könnte, dass der Poly(A)-Schwanz einen negativen Effekt auf den α -Globin-mRNA-Abbau haben könnte (Wang et al., 1999, Wang und Kiledjian, 2000b). Der α -Komplex wird in allen Zellen und Organismen exprimiert. Somit ist die UTR von α - und β -Globin geeignet die mRNA für die *in vivo*-Applikation zu stabilisieren.

Beim Vergleich von GC-reicher und Wildtyp-mRNA, die für das Influenza Matrix Protein kodiert, wurde festgestellt, dass die GC-reiche Variante einen höheren Anteil an Flu M1-Tetramer⁺-Zellen nach erfolgter Zellkultur hervorbringt, als die Wildtyp-mRNA. Der Guanin- und Cytosin-Gehalt dieser modifizierten Sequenz ist höher und zeichnet sich dadurch durch eine größere Stabilität aus. Die kodierte Proteinsequenz wird dadurch nicht verändert, es werden lediglich diejenigen Kodons für eine Aminosäure verwendet, welche den höchsten Gehalt an G- und C-Nukleotiden besitzen (alternative Kodonverwendung, *codon usage*). Dies ist möglich, da der genetische Kode degeneriert ist, d.h. dass mehrere Kodons für dieselbe Aminosäure kodieren. Die Translationseffizienz einer Sequenz kann dadurch gesteigert werden, indem in ihr Kodons vorhanden sind für die häufig vorkommende tRNAs bestimmt sind. Durch die erhöhte Translation und damit die Vermehrte Anlagerung von Ribosomen an der mRNA ist sie möglicherweise besser vor dem enzymatischen Abbau geschützt, als mRNA mit niedrigerer Translationsrate.

6. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Regina Teufel
Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 30.07.1975
Geburtsort: Sindelfingen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1981-1985 Grundschole in Magstadt
1985-1991 Realschole Renningen
Abschluss: Mittlere Reife
1994-1995 Wirtschaftsoberschole Stuttgart
1995-1997 Kolping-Kolleg Stuttgart
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsbildung:

1991-1994 Ausbildung zur Industriekaufrau bei der Siemens AG, Stuttgart
Feb. 1994-Aug. 1994 Vertriebskauffrau bei der Siemens-Nixdorf Informationssysteme AG, Stuttgart
1995-2002 Werksstudent bei der Siemens AG, Stuttgart

Hochschulausbildung:

WS 1997/1998-SS1999 Studium der Biologie an der Universität Hohenheim
Abschluss: Vordiplom
WS 1999-WS 2001 Studium der Biologie an der Universität Tübingen
Hauptfach: Humangenetik
Nebenfächer: Immunologie, Humanphysiologie
Dez. 2001-Sep.2002 Diplomarbeit mit dem Titel „Untersuchung der Antikörperantwort von Kindern mit schwerer und milder Malaria gegen Domänen von Parasitenoberflächenantigenen mit Protein-Microarrays“ am Institut für Tropenmedizin, Sektion Humanparasitologie unter Anleitung von Prof. Dr. Kreamsner
Abschluss: Diplom
Okt. 2002-Mrz. 2006 Arbeit an der vorliegenden Dissertation am Interfakultären Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie an der Universität Tübingen unter Anleitung von Prof. Dr. Rammensee.
Seit Mai 2006 Mitarbeiterin der Fa. Dinkel, Entsorgungsfachbetrieb

7. Publikationsverzeichnis

Teufel R, Carralot J P, Scheel B, Probst J, Walter S, Jung G, Hoerr I, Rammensee H G, Pascolo S. Human peripheral blood mononuclear cells transfected with messenger RNA stimulate antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in vitro. *Cell Mol Life Sci* 2005; (62): 1755-1762.

Scheel B, **Teufel R**, Probst J, Carralot J P, Geginat J, Radsak M, Jarrossay D, Wagner H, Jung G, Rammensee H G, Hoerr I, Pascolo S. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol* 2005; (35): 1557-1566.

Mutzke T, Schubkegel G, **Teufel R**, Ketterer T, Probst J, Scheel B, Carralot J P, Pascolo S, Ghoreschi K, Weigert C. Co-transfection of messenger RNA and siRNA as a method to study the efficiency of siRNA. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2005; (24): 147-152.

Carralot J P, Probst J, Hoerr I, Scheel B, **Teufel R**, Jung G, Rammensee H G, Pascolo S. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 2004; (61): 2418-2424.

Carralot J P, Weide B, Schoor O, Probst J, Scheel B, **Teufel R**, Hoerr I, Garbe C, Rammensee H G, Pascolo S. Production and characterization of amplified tumor-derived cRNA libraries to be used as vaccines against metastatic melanomas. *Genet Vaccines Ther* 2005; (3): 6.

8. Referenzen

Absher M, Stinebring W R. Toxic properties of a synthetic double-stranded RNA. Endotoxin-like properties of poly I. poly C, an interferon stimulator. *Nature* 1969; (223): 715-717.

Albert M L, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; (392): 86-89.

Alexander-Miller M A, Leggatt G R, Sarin A, Berzofsky J A. Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med* 1996; (184): 485-492.

Alexopoulou L, Holt A C, Medzhitov R, Flavell R A. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001; (413): 732-738.

Altman J D, Moss P A, Goulder P J, Barouch D H, McHeyzer-Williams M G, Bell J I, McMichael A J, Davis M M. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; (274): 94-96.

Banchereau J, Pulendran B, Steinman R, Palucka K. Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *J Exp Med* 2000; (192): F39-F44.

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

Bastos R N, Aviv H. Theoretical analysis of a model for globin messenger RNA accumulation during erythropoiesis. *J Mol Biol* 1977; (110): 205-218.

Baumann S, Krueger A, Kirchhoff S, Krammer P H. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med* 2002; (2): 257-272.

Beelman C A, Parker R. Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 1995; (81): 179-183.

Binder R, Horowitz J A, Basilion J P, Koeller D M, Klausner R D, Harford J B. Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3' UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J* 1994; (13): 1969-1980.

Boczkowski D, Nair S K, Nam J H, Lysterly H K, 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): 1028-1034.

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

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

Bullock T N, Mullins D W, Engelhard V H. Antigen density presented by dendritic cells in vivo differentially affects the number and avidity of primary, memory, and recall CD8+ T cells. *J Immunol* 2003; (170): 1822-1829.

Burnet F M F F. The production of antibodies. 1949. Melbourne: McMillan 1949.

Butch A W, Kelly K A, Munshi N C. Dendritic cells derived from multiple myeloma patients efficiently internalize different classes of myeloma protein. *Exp Hematol* 2001; (29): 85-92.

Butcher E C, Picker L J. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; (272): 60-66.

Carralot J P, Probst J, Hoerr I, Scheel B, Teufel R, Jung G, Rammensee H G, Pascolo S. Polarization of immunity induced by direct injection of naked sequence-stabilized mRNA vaccines. *Cell Mol Life Sci* 2004; (61): 2418-2424.

Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; (184): 747-752.

Chen C Y, Shyu A B. AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci* 1995; (20): 465-470.

Coughlin C M, Vance B A, Grupp S A, Vonderheide R H. RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* 2004; (103): 2046-2054.

Dass C R. Lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: factors affecting in vivo transfection. *J Mol Med* 2004; (82): 579-591.

Decker C J, Parker R. A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev* 1993; (7): 1632-1643.

Ellington A D, Szostak J W. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature* 1990; (346): 818-822.

Felgner P L, Gadek T R, Holm M, Roman R, Chan H W, Wenz M, Northrop J P, Ringold G M, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; (84): 7413-7417.

Fukui M, Ueno K, Suehiro Y, Hamanaka Y, Imai K, Hinoda Y. Anti-tumor activity of dendritic cells transfected with mRNA for receptor for hyaluronan-mediated motility is mediated by CD4+ T cells. *Cancer Immunol Immunother* 2006; (55): 538-546.

Furuichi Y, LaFiandra A, Shatkin A J. 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* 1977; (266): 235-239.

Gilbert W. The RNA World. *Nature* 1986; (319): 618.

Gilboa E, Vieweg J. Cancer immunotherapy with mRNA-transfected dendritic cells. *Immunol Rev* 2004; (199): 251-263.

Gingras A C, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999a; (68): 913-963.

Gingras A C, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999b; (68): 913-963.

Gorer P. Further studies on antigenic differences in mouse erythrocytes. *Brit J Exp Pathol* 1936;17-42.

Granstein R D, Ding W, Ozawa H. Induction of anti-tumor immunity with epidermal cells pulsed with tumor-derived RNA or intradermal administration of RNA. *J Invest Dermatol* 2000; (114): 632-636.

Green D R, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003; (193): 70-81.

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

Heiser A, Coleman D, Dannull J, Yancey D, Maurice M A, Lallas C D, 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.

Heiser A, Dahm P, Yancey D R, Maurice M A, Boczkowski D, Nair S K, 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 M A, Yancey D R, Coleman D M, Dahm P, Vieweg J. Human dendritic cells transfected with renal tumor RNA stimulate polyclonal T-cell responses against antigens expressed by primary and metastatic tumors. *Cancer Res* 2001a; (61): 3388-3393.

Heiser A, Maurice M A, Yancey D R, Wu N Z, Dahm P, Pruitt S K, Boczkowski D, Nair S K, Ballo M S, Gilboa E, Vieweg J. Induction of polyclonal prostate cancer-specific CTL using dendritic cells transfected with amplified tumor RNA. *J Immunol* 2001b; (166): 2953-2960.

Herbst B, Kohler G, Mackensen A, Veelken H, Kulmburg P, Rosenthal F M, Schaefer H E, Mertelsmann R, Fisch P, Lindemann A. In vitro differentiation of CD34+ hematopoietic progenitor cells toward distinct dendritic cell subsets of the birbeck granule and MHC-positive Langerhans cell and the interdigitating dendritic cell type. *Blood* 1996; (88): 2541-2548.

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

Homann D, Teyton L, Oldstone M B. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med* 2001; (7): 913-919.

Ikemura T. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. *Mol Biol Evol* 1985; (2): 13-34.

Janeway C.A., Travers P. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1997.

Klinman D M, Takeno M, Ichino M, Gu M, Yamshchikov G, Mor G, Conover J. DNA vaccines: safety and efficacy issues. *Springer Semin Immunopathol* 1997; (19): 245-256.

Knutson K L, Disis M L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005a; (54): 721-728.

Knutson K L, Disis M L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2005b.

Lundqvist A, Noffz G, Pavlenko M, Saeboe-Larssen S, Fong T, Maitland N, Pisa P. Nonviral and viral gene transfer into different subsets of human dendritic cells yield comparable efficiency of transfection. *J Immunother (1997)* 2002; (25): 445-454.

Lyons A B, Parish C R. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1994; (171): 131-137.

Malone R W, Felgner P L, Verma I M. Cationic liposome-mediated RNA transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; (86): 6077-6081.

Mandl C W, Aberle J H, Aberle S W, Holzmann H, Allison S L, Heinz F X. In vitro-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. *Nat Med* 1998; (4): 1438-1440.

Martinon F, Krishnan S, Lenzen G, Magne R, Gomard E, Guillet J G, Levy J P, Meulien P. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 1993; (23): 1719-1722.

Matsui Y. Increased density of class I major histocompatibility complex antigens and decreased density of T-cell differentiation antigens in the early stages of T-cell activation. *Hum Immunol* 1987; (18): 123-133.

Mattick J S. Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep* 2001; (2): 986-991.

Mitchell P, Tollervey D. mRNA stability in eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 2000; (10): 193-198.

Morse M A, Lyerly H K, Gilboa E, Thomas E, Nair S K. Optimization of the sequence of antigen loading and CD40-ligand-induced maturation of dendritic cells. *Cancer Res* 1998; (58): 2965-2968.

Muhlrad D, Parker R. Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature* 1994; (370): 578-581.

Murali-Krishna K, Altman J D, Suresh M, Sourdive D J, Zajac A J, Miller J D, Slansky J, Ahmed R. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 1998; (8): 177-187.

Nair S K, Boczkowski D, Morse M, Cumming R I, Lyerly H K, 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): 364-369.

Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider P H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1982; (1): 841-845.

Pascolo S. Messenger RNA-based vaccines. *Expert Opin Biol Ther* 2004; (4): 1285-1294.

Pimm M V, Embleton M J, Baldwin R W. Treatment of transplanted rat tumours with double-stranded RNA (BRL 5907). I. Influenced of systemic and local administration. *Br J Cancer* 1976; (33): 154-165.

Ponsaerts P, Van Tendeloo V F, Berneman Z N. Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 2003; (134): 378-384.

Porgador A, Gilboa E. Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1995; (182): 255-260.

Probst J, Brechtel S, Scheel B, Hoerr I, Jung G, Rammensee H G, Pascolo S. Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genet Vaccines Ther* 2006; (4): 4.

Qin Z, Blankenstein T. CD4+ T cell-mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 2000; (12): 677-686.

Qiu P, Ziegelhoffer P, Sun J, Yang N S. Gene gun delivery of mRNA in situ results in efficient transgene expression and genetic immunization. *Gene Ther* 1996; (3): 262-268.

Rees W, Bender J, Teague T K, Kedl R M, Crawford F, Marrack P, Kappler J. An inverse relationship between T cell receptor affinity and antigen dose during CD4(+) T cell responses in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; (96): 9781-9786.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch P O, Steinman R M, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; (180): 83-93.

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): 137-151.

Russell J E, Morales J, Liebhaber S A. The role of mRNA stability in the control of globin gene expression. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 1997; (57): 249-287.

Saeboe-Larsen S, Fossberg E, Gaudernack G. mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). *J Immunol Methods* 2002; (259): 191-203.

Saenz-Badillos J, Amin S P, Granstein R D. RNA as a tumor vaccine: a review of the literature. *Exp Dermatol* 2001; (10): 143-154.

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 alpha. *J Exp Med* 1994; (179): 1109-1118.

Scheel B, Braedel S, Probst J, Carralot J P, Wagner H, Schild H, Jung G, Rammensee H G, Pascolo S. Immunostimulating capacities of stabilized RNA molecules. *Eur J Immunol* 2004; (34): 537-547.

Scheel B, Teufel R, Probst J, Carralot J P, Geginat J, Radsak M, Jarrossay D, Wagner H, Jung G, Rammensee H G, Hoerr I, Pascolo S. Toll-like receptor-dependent activation of several human blood cell types by protamine-condensed mRNA. *Eur J Immunol* 2005; (35): 1557-1566.

Scheper W, Meinsma D, Holthuisen P E, Sussenbach J S. Long-range RNA interaction of two sequence elements required for endonucleolytic cleavage of human insulin-like growth factor II mRNAs. *Mol Cell Biol* 1995; (15): 235-245.

Schiavi S C, Belasco J G, Greenberg M E. Regulation of proto-oncogene mRNA stability. *Biochim Biophys Acta* 1992; (1114): 95-106.

Schott M, Feldkamp J, Schattenberg D, Krueger T, Dotzenrath C, Seissler J, Scherbaum W A. Induction of cellular immunity in a parathyroid carcinoma treated with tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Eur J Endocrinol* 2000; (142): 300-306.

Shimotohno K, Kodama Y, Hashimoto J, Miura K I. Importance of 5'-terminal blocking structure to stabilize mRNA in eukaryotic protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; (74): 2734-2738.

Stefanovic B, Hellerbrand C, Holcik M, Briendl M, Aliebhaber S, Brenner D A. Posttranscriptional regulation of collagen alpha1(I) mRNA in hepatic stellate cells. *Mol Cell Biol* 1997; (17): 5201-5209.

Steinman R M, Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; (137): 1142-1162.

Steinman R M, Inaba K. Stimulation of the primary mixed leukocyte reaction. *Crit Rev Immunol* 1985; (5): 331-348.

Steinman R M, Kaplan G, Witmer M D, Cohn Z A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J Exp Med* 1979; (149): 1-16.

Steinman R M, Young J W. Signals arising from antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol* 1991; (3): 361-372.

Stratford R, Douce G, Zhang-Barber L, Fairweather N, Eskola J, Dougan G. Influence of codon usage on the immunogenicity of a DNA vaccine against tetanus. *Vaccine* 2000; (19): 810-815.

Strong T V, Hampton T A, Louro I, Bilbao G, Conry R M, Curiel D T. Incorporation of beta-globin untranslated regions into a Sindbis virus vector for augmentation of heterologous mRNA expression. *Gene Ther* 1997; (4): 624-627.

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.

Su Z, Dannull J, Yang B K, Dahm P, Coleman D, Yancey D, Sichi S, Niedzwiecki D, Boczkowski D, Gilboa E, Vieweg J. Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* 2005; (174): 3798-3807.

Tang D C, DeVit M, Johnston S A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; (356): 152-154.

Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den D P, Brocker E B, Steinman R M, 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.

Tillmar L, Welsh N. Hypoxia may increase rat insulin mRNA levels by promoting binding of the polypyrimidine tract-binding protein (PTB) to the pyrimidine-rich insulin mRNA 3'-untranslated region. *Mol Med* 2002; (8): 263-272.

Toes R E, Blom R J, Offringa R, Kast W M, Melief C J. Enhanced tumor outgrowth after peptide vaccination. Functional deletion of tumor-specific CTL induced by peptide vaccination can lead to the inability to reject tumors. *J Immunol* 1996; (156): 3911-3918.

Tonegawa S, Steinberg C, Dube S, Bernardini A. Evidence for somatic generation of antibody diversity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; (71): 4027-4031.

Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* 1990; (249): 505-510.

Van Tendeloo V F, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele D R, Berneman Z N. 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.

Vassilev V B, Gil L H, Donis R O. Microparticle-mediated RNA immunization against bovine viral diarrhea virus. *Vaccine* 2001; (19): 2012-2019.

Wagner E, Lykke-Andersen J. mRNA surveillance: the perfect persist. *J Cell Sci* 2002; (115): 3033-3038.

Wahn U. Pädiatrische Allergologie und Immunologie. 2005. Elsevier GmbH Deutschland.

Wang X, Kiledjian M, Weiss I M, Liebhaber S A. Detection and characterization of a 3' untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human alpha-globin mRNA stability. *Mol Cell Biol* 1995; (15): 1769-1777.

Wang Z, Day N, Trifillis P, Kiledjian M. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol Cell Biol* 1999; (19): 4552-4560.

Wang Z, Kiledjian M. Identification of an erythroid-enriched endoribonuclease activity involved in specific mRNA cleavage. *EMBO J* 2000a; (19): 295-305.

Wang Z, Kiledjian M. The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Mol Cell Biol* 2000b; (20): 6334-6341.

Wilson T, Treisman R. Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* 1988; (336): 396-399.

Wolff J A, Malone R W, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner P L. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; (247): 1465-1468.

Wurtele H, Little K C, Chartrand P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells. *Gene Ther* 2003; (10): 1791-1799.

Xu N, Chen C Y, Shyu A B. Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol* 1997; (17): 4611-4621.

Yewdell J W, Anton L C, Bennink J R. Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules? *J Immunol* 1996; (157): 1823-1826.

Ying H, Zaks T Z, Wang R F, Irvine K R, Kammula U S, Marincola F M, Leitner W W, Restifo N P. Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat Med* 1999; (5): 823-827.

Zeh H J, III, Perry-Lalley D, Dudley M E, Rosenberg S A, Yang J C. High avidity CTLs for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy. *J Immunol* 1999; (162): 989-994.

Zeis M, Siegel S, Wagner A, Schmitz M, Marget M, Kuhl-Burmeister R, Adamzik I, Kabelitz D, Dreger P, Schmitz N, Heiser A. Generation of cytotoxic responses in mice and human individuals against hematological malignancies using survivin-RNA-transfected dendritic cells. *J Immunol* 2003; (170): 5391-5397.

Zhou X, Berglund P, Rhodes G, Parker S E, Jondal M, Liljestrom P. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine* 1994; (12): 1510-1514.

Zinkernagel R M, Doherty P C. Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* 1974; (251): 547-548.