
**Induktion und Analyse spezifischer Immunantworten
nach intranodaler Immunisierung mit RNA im murinen
Modell**

**Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“**

**Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz**

**Abderraouf Selmi
geb. am 04.11.1967 in Cherichira-Tunesien**

Mainz, 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.10.2007

Für meine Mutter

Zusammenfassung

Die Wirksamkeit einer Vakzine ist von vielen Parametern abhängig. Dazu gehören unter anderen: das ausgewählte Antigen, die Formulation in der das Antigen benutzt wird sowie die Applikationsroute. Antigen-kodierende Ribonukleinsäuren (RNA) gilt heutzutage als eine sichere und effiziente Alternative zu traditionellen Impfstoff-Formulierungen, wie Peptiden, rekombinanten Proteinen, viralen Systemen oder DNA basierten Impfstoffen. Bezüglich des Applikationsortes repräsentiert der Lymphknoten ein optimales Milieu für die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen. Vor diesem Hintergrund war die Zielsetzung dieser Arbeit, ein auf direktem *in vivo* Transfer von Antigen-kodierender *in vitro* transkribierter RNA (IVT-RNA) basierendes Impfverfahren zu entwickeln, zu charakterisieren und auf seine anti-tumorale Wirksamkeit zu testen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen (DCs) *in vitro* hocheffizient mit IVT-RNA transfiziert werden können und eine hohe stimulatorische Kapazität besitzen. Durch Sequenzmodifikation der IVT-RNA konnten wir die Transkriptstabilität und Translationseffizienz erhöhen was zu einer Steigerung der stimulatorischen Kapazität *in vivo* führte. Darüber hinaus untersuchten wir die Auswirkung der Insertion eines Signalpeptides 5' sowie einer C-terminalen transmembran- und zytosolischen-Domäne eines MHC-Klasse-I-Moleküls am 3' der Antigen-kodierenden Sequenz auf die Effizienz der MHC-Klasse-I und -II Präsentation. Wir konnten *in vitro* und *in vivo* nachweisen, dass diese Modifikation zu einer gesteigerten, simultanen Stimulation von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen führt.

Auf der Basis der optimierten Vektorkassetten etablierten wir die intranodale (i.n.) Transfektion von antigenpräsentierenden Zellen in der Maus. Dazu nutzten wir verschiedene Reportersysteme (eGFP-RNA, fluoreszenzmarkierte RNA) und konnten zeigen, dass die intranodale Applikation von IVT-RNA zu selektiven Transfektion und Maturation lymphknotenresidenter DCs führt.

Zur Untersuchung der immunologischen Effekte wurden in erster Linie auf Influenza-Hemagglutinin-A und Ovalbumin basierende Modellantigensysteme verwendet. Beide Antigene wurden als Antigen-MHC-Fusionskonstrukte genutzt. Als Responderzellen wurden TCR-transgene Lymphozyten verwendet, die MHC-Klasse-I oder -Klasse-II restringierte Epitope des Influenza-Hemagglutinin-A bzw. des Ovalbumin-Proteins erkennen.

Wir konnten *in vivo* zeigen, dass die intranodale Immunisierung mit IVT-RNA zu einer effizienten Stimulation und Expansion von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in einer dosisabhängigen Weise führt. Funktionell konnte gezeigt werden, dass diese T-Zellen Zytokine sezernieren und zur Zytolyse befähigt sind. Wir waren in der Lage durch repetitive i.n. RNA Immunisierung ein ‚Priming‘ CD8⁺ T-Zellen in naiven Mäusen sowohl gegen virale als auch gegen Tumor assoziierte Antigene zu erreichen. Die geprimten T-Zellen waren befähigt eine zytolytische Aktivität gegen mit spezifischem Peptid beladene Targetzellen zu generieren. Darüber hinaus waren wir in der Lage Gedächtniszellen expandieren zu können. Abschließend konnten wir in Tumormodellen sowohl in prophylaktischen als auch in therapeutischen Experimenten zeigen dass die i.n. RNA Vakzination die Potenz zur Induktion einer anti-tumoralen Immunität besitzt.

Summary

The efficiency of a vaccine depends on several parameters such as the type and the form of the antigen used as well as the route of application.

Antigen encoding RNA is today considered to be a safe and efficient alternative to traditional protein-, peptide-, virus- or DNA-based vaccine formulations. Concerning the route of application, the lymph nodes represent an optimal milieu for the interaction between antigen presenting cells and T cells.

Based on this background, the objective of this doctoral thesis was to establish the intranodal application of naked in-vitro transcribed RNA (IVT RNA) as method for tumor vaccination protocols and to characterize and study its anti-tumoral potency.

In this present work, it could be shown that DCs can be highly efficiently transfected *in vitro* with IVT-RNA and have a high capacity to stimulate T cells. Through modifications of the IVT-RNA sequence, we could increase the transcript stability and the translation efficiency, thus we could enhance the stimulatory capacity *in vivo*.

Furthermore, we investigated the effect of the insertion of a signal peptide to 5' of antigen coding sequence as well as the insertion of the C-terminal transmembrane and cytosolic domain of MHC class I molecule 3' of the antigen coding sequence on the efficiency of MHC class I and MHC class II presentation. We could *in vitro* and *in vivo* demonstrate that this modification resulted in an increased and simultaneous stimulation of antigen specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells.

Based on these optimized vector cassettes, we established the intranodal transfection of antigen presenting cells in the mouse. For these purpose, we used different reporter

systems: eGFP, fluorescence labelled RNA (Cy3/Cy5-RNA) and we could show that the intranodal application of naked IVT-RNA leads to the selective transfection and maturation of lymph node resident DCs.

For immunological studies, influenza hemagglutinin-A and ovalbumin based model antigen systems are predominantly used. As responder cells, we used TCR-transgenic lymphocytes which recognize MHC class I or II restricted epitopes of Influenza hemagglutinin-A and ovalbumin proteins

We could also demonstrate *in vivo* that the intranodal immunization with IVT-RNA leads to efficient stimulation and expansion of antigen specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells in a dose dependent manner. Functionally, it could be shown that these T cells secrete cytokines and have the capacity to lyse target cells.

Through repetitive intranodal IVT-RNA immunization, we were able to prime naïve T cells against viral as well as tumour associated antigens. The primed T cells elicited efficient cytotoxic activity against target cells loaded with the specific peptide. Furthermore, we were able to expand memory cells. Finally, we could show in tumor models that the intranodal RNA vaccination possesses the potential of anti-tumor immunity in both prophylactic and therapeutic experiments.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem.....	1
1.2	T-Lymphozyten.....	2
1.3	Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen	3
1.4	Antigenprozessierung und Antigenpräsentation.....	6
1.4.1	Klassischer MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg.....	6
1.4.2	Klassischer MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg.....	7
1.4.3	Kreuzpräsentation.....	8
1.5	Sekundäre lymphatische Organe als Ort der Interaktion zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen.....	10
1.5.1	Lymphknoten	10
1.5.2	Milz	12
1.6	Immuntherapeutische Ansätze	14
1.6.1	Peptidvakzine	14
1.6.2	Vakzinierungen mit Plasmid-DNA.....	15
1.6.3	Vakzinierungen mit RNA.....	16
1.7	Applikationsroute von Vakzinen	20
1.8	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1	Material	23
2.1.1	Chemikalien	23
2.1.2	Peptide	25
2.1.3	Antikörper	25
2.1.4	Kits.....	26

2.1.5	Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.6	Geräte.....	27
2.1.7	Puffer und Lösungen	27
2.1.8	Oligonukleotide und Sequenzen	29
2.1.9	Puffer für FACS-Färbungen.....	31
2.1.10	Puffer für ELISPOT	31
2.1.11	Zellkultur Medien	32
2.2	Methoden	35
2.2.1	Zellbiologische Methoden	35
2.2.2	Molekularbiologische Methoden	42
2.2.3	Immunologische Methoden.....	55
2.2.4	Tierexperimentellen Methoden	64
3	ERGEBNISSE.....	68
3.1	RNA transfizierte dendritische Zellen als Immunstimulatoren	68
3.1.1	Phänotypisierung von immaturren und maturaen KMDCs.....	68
3.1.2	<i>In vitro</i> Transfektion von dendritischen Zellen mit eGFP-RNA.....	70
3.1.3	Stimulatorische Potenz von RNA-transfizierten dendritischen Zellen	71
3.2	Vektormodifikationen zur Optimierung der Transkriptstabilität und Modifikation des intrazellulären Antigen-targetings	73
3.2.1	Vektorkonstruktion.....	73
3.2.2	Auswirkungen der poly(A) Länge, eines frei endenden poly(A) Schwanzes und einer optimierten 3'-UTR der IVT-RNA auf die <i>in vivo</i> Expansion antigenspezifischer T-Lymphozyten.....	75
3.2.3	Antigen-targeting in den MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Prozessierungsweg	76
3.3	Intranodal applizierte RNA zur Immunstimulation	83
3.3.1	Die Methode der intranodalen RNA Injektion.....	83
3.3.2	Nachweis der Transfektion dendritischer Zellen nach intranodaler Injektion von RNA.....	84
3.3.3	Kinetik der RNA-Degradation nach intranodaler RNA-Transfektion.....	87

3.3.4	Nachweis der RNA-Translation intranodal applizierter RNA in Lymphknoten residenten dendritischen Zellen	88
3.3.5	Aktivierung dendritischer Zellen durch intranodal applizierte IVT-RNA.....	89
3.4	Dosis- und Zeitkinetik antigenspezifischer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten Immunantworten nach intranodaler IVT-RNA Immunisierung.....	90
3.4.1	Dosiskinetik InfHA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellantworten	91
3.4.2	Dosiskinetik InfHA-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellantworten	93
3.4.3	Zeitkinetik der InfHA-spezifischen CD4 ⁺ T-Zellantwort und Aktivierungsstatus der antigenspezifischen CD4 ⁺ T-Zellen	96
3.4.4	Zeitkinetik der antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellantwort nach intranodaler RNA Immunisierung und Aktivierungsstatus der antigenspezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	98
3.5	Funktionelle Charakterisierung expandierter, antigenspezifischer CD8 ⁺ T-Zellen nach intranodaler RNA Immunisierung.....	100
3.5.1	Zytokinproduktion expandierter CD8 ⁺ T-Zellen.....	101
3.5.2	Charakterisierung expandierter InfHA-spezifischer CD8 ⁺ T-Zellen anhand der Expression von Aktivierungsmarkern.....	102
3.5.3	Generierung zytotoxischer Effektorzellen durch intranodale RNA Immunisierung.....	103
3.6	Simultane Expansion antigenspezifischer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen nach intranodaler Immunisierung mit RNA	104
3.7	Histologischer Nachweis expandierter T-Lymphozyten im Lymphknoten nach intranodaler RNA-Immunisierung.....	105
3.8	De novo Priming durch intranodale RNA-Immunisierung.....	106
3.9	Expansion von Gedächtnis-T-Zellen nach intranodaler IVT-RNA Immunisierung.....	109
3.10	Vergleich verschiedener Immunisierungsstrategien.....	112

3.11	Untersuchung der intranodalen RNA Vakzinierung hinsichtlich ihrer Effizienz zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort	114
3.11.1	Prophylaktische intranodale Vakzinierung mit IVT-RNA	114
3.11.2	Therapeutische intranodale Vakzinierung mit IVT-RNA.....	116
4	DISKUSSION	118
4.1	Transfektion von APCs im Lymphknoten nach intranodaler Injektion von RNA.....	121
4.2	Induktion von Immunantworten und deren Kinetik	123
4.2.1	Kinetik der Zellexpansion.....	123
4.2.2	Expansion von Gedächtnis T-Zellen	125
4.2.3	Priming naiver T-Zellen.....	126
4.2.4	Untersuchung der intranodalen RNA Vakzinierung hinsichtlich ihrer Effizienz zur Induktion einer Antitumor Immunantwort.....	128
4.3	Ausblick	131
	LITERATUR.....	132
	PUBLIKATIONEN.....	157

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AICD	Aktivierungsinduzierter Zelltod (<i>activation induced cell death</i>)
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphate
BCR	B-Zellrezeptor (<i>B cell receptor</i>)
BSA	Rinderserum Albumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Oberflächenantigen (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
CDS	kodierende Sequenz (<i>coding sequence</i>)
CG Gen	<i>Cancer/Germline gene</i>
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (<i>cytotoxic T lymphocyte</i>)
CMV	Zytomegalievirus (<i>cytomegalovirus</i>)
CSFE	<i>Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGHO	Deutsche Gesellschaft für Hämatologie und Onkologie
DGfI	Deutsche Gesellschaft für Immunologie
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRIPs	fehlerhafte ribosomale Produkte (<i>defective ribosomal products</i>)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>)
FCS	Fötales Kälberserum (<i>foetal calf serum</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (<i>fluorescence activated cell sorter</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GITC	Guanidinisothiocyanat
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.d., i.n., i.p., i.v.,	intradermal, intranodal, intraperitoneal, intravenös
IFN	Interferon
LK	Lymphknoten
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal antibody</i>)
MACS	<i>magnetic cell sorting</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>

MEM	<i>minimal essential medium</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
OD	Optische Dichte
OVA	Hühner-Ovalbumin
ORF	<i>open reading frame</i>
PBMC	Periphere mononukleare Zellen (<i>peripheral blood monocytes</i>)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SEREX	<i>serological expression cloning of human tumor antigens</i>
sec	Sekretionssignal
s.c.	subkutan
TAA	Tumor assoziiertes Antigene (<i>tumor associated antigen</i>)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
T _{EM}	Effektor Gedächtnis T-Zellen (<i>effector memory T cells</i>)
T _{CM}	Zentrale Gedächtnis T-Zellen (<i>central memory T cells</i>)
TCR	T-Zellrezeptor (<i>T cell receptor</i>)
T _H	T-Helferzelle
TM	Transmembrandomän
TNF	Tumornekrosefaktor
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierte Regionen (<i>untranslated regions</i>)

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems besteht in der Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“, d.h. körperfremde Strukturen und Zellen zu attackieren, ohne dabei die körpereigenen Zellen und Gewebe zu schädigen.

Das Immunsystem lässt sich unterteilen in eine angeborene und eine erworbene (adaptive) Immunität. Bei den Zellen der angeborenen Immunität handelt es sich in erster Linie um Granulozyten und Makrophagen, die Antigene unspezifisch durch Phagozytose eliminieren.

Zellen der adaptiven Immunität erkennen hingegen Antigene spezifisch über membranständige Antigenrezeptoren. Darüber hinaus ist die erworbene Immunität in der Lage, ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, d.h. bei einem wiederholten Kontakt mit einem Antigen entsteht eine schnellere und stärkere Immunreaktion (Janeway *et al.*, 2001).

Die adaptive Immunität kann wiederum unterteilt werden in eine humorale und eine zelluläre Immunität. Die humorale Immunität wird von B-Lymphozyten, während die zelluläre Immunität von T-Lymphozyten vermittelt wird. Beide Zelltypen sind für die spezifische Erkennung von Antigenen und für die Ausbildung einer effizienten Immunantwort essentiell (siehe Abb. 1.1). Dabei erkennen B-Zellen lösliche Antigene über membranständige Immunglobuline (Ig) und sekretieren Antikörper. T-Zellen erkennen hingegen mit Hilfe ihres antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors (TCR) Antigene in Form von Peptiden, die im Komplex mit Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complex*, MHC) Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden.

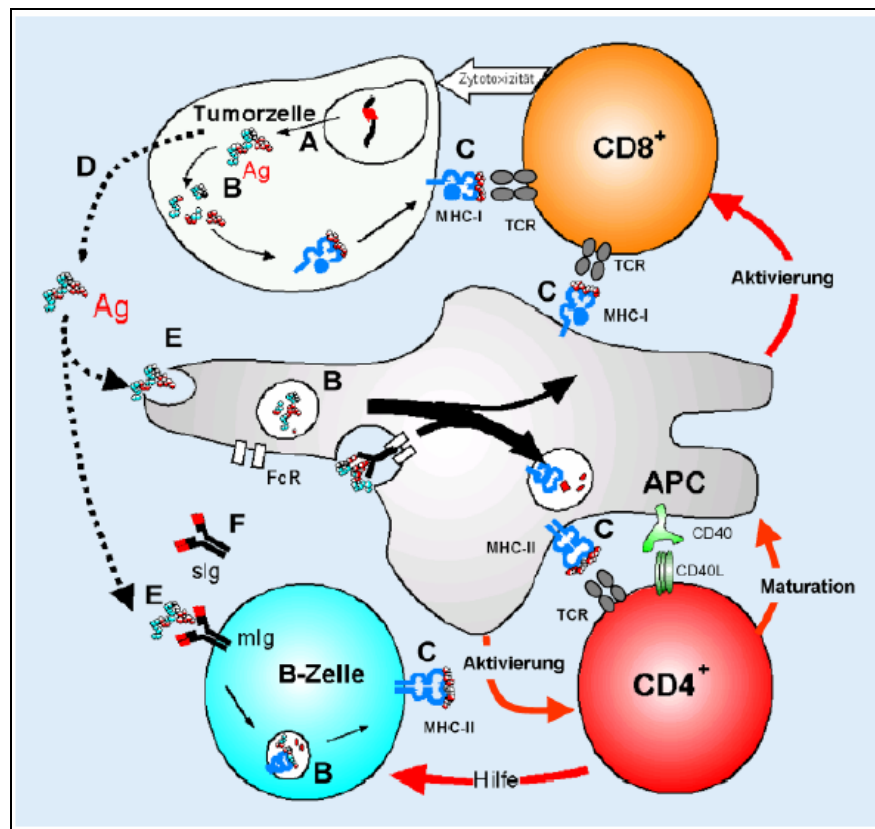


Abb 1.1: Immunerkennung von Antigenen. Tumorantigene sind genetisch festgelegte Merkmale (A) einer Tumorzelle, die durch das antigenspezifische Immunsystem erkannt werden können. Die Erkennung von Tumorantigen durch T-Lymphozyten erfolgt nach Prozessierung (B) und Präsentation (C) auf MHC-Molekülen der Tumorzelle oder nach Freisetzung (D) und Wiederaufnahme (E) durch antigenpräsentierende Zellen (APCs) oder B-Lymphozyten. (Entnommen aus: Sahin, 2005).

1.2 T-Lymphozyten

Ein wesentlicher Aspekt bei der Antigenerkennung durch T-Zellen, ist die spezifische Erkennung von Peptidfragmenten (sog. Epitopen) im Kontext mit MHC-Klasse-I- oder MHC-Klasse-II-Molekülen (MHC-Restriktion) durch den membranständigen TCR (siehe auch Abb. 1.1).

T-Zellen haben die gleichen lymphatischen Vorläuferzellen wie B-Zellen. Allerdings durchlaufen T-Zellen einen Reifungs- und Selektionsprozess im Thymus, der gewährleistet, dass autoreaktive T-Zellen durch Apoptose eliminiert werden (negative Selektion). Dahingegen überleben T-Zellen mit einer Spezifität für autologe MHC-Moleküle plus potentiellm Fremdpeptid (positive Selektion) (Bommhardt *et al.*, 2004). Somit verlassen vorwiegend reife $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T-Zellen mit einer Spezifität für antigene Peptide fremden Ursprungs den Thymus. Die Gesamtzahl der Spezifitäten des T-Zellrepertoires innerhalb eines Individuums wird hierbei auf ca. 10^{15} geschätzt (Casrouge *et al.*, 2000; Davis und Bjorkman, 1988).

CD8⁺ T-Zellen erkennen prozessierte Antigene im Komplex mit MHC-Klasse-I-Molekülen, während CD4⁺ T-Zellen zur Erkennung die Kombination aus prozessiertem Antigen und MHC-Klasse-II-Molekül benötigen (siehe Abb. 1.1) (Davis und Bjorkman, 1988). Naive CD8⁺ T-Zellen, welche noch keinen Antigenkontakt hatten, werden durch die Erkennung ihres spezifischen Epitopes aktiviert und zur Proliferation angeregt. Nach Aktivierung sekretieren sie bei erneuter Erkennung die Zytotoxine Granzyme und Perforin, die die Apoptose der Zielzellen induzieren. Diese Effektorzellen werden deshalb auch als zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) bezeichnet.

CD4⁺ T-Zellen bilden zwei funktionelle Klassen aus. Sie können sich nach ihrer Aktivierung entweder zu einer T_H1- oder einer T_H2-Zelle entwickeln. T_H1-Zellen setzen nach ihrer Stimulierung Zytokine, wie z.B. Interferon- γ (IFN- γ) oder Interleukin-2 (IL-2) frei, welche die zellvermittelte Immunität unterstützen. T_H2-Zellen fördern dagegen, u.a. durch IL-4-Sekretion, die Induktion einer B-Zellantwort (Mosmann und Coffman, 1989; Mosmann und Sad, 1996; O'Garra und Arai, 2000).

Eine wichtige Funktion bei der Aktivierung der T-Zellen übernehmen die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (*antigen presenting cells*, APCs), wie z.B. dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) und Makrophagen exprimiert werden (Chen *et al.*, 1993; Davis und Bjorkman, 1988; Ma *et al.*, 2004) und mit CD28 auf der T-Zelle interagieren (Espinoza-Delgado, 2002). Ohne diese Moleküle finden weder Proliferation noch Differenzierung der T-Zelle zur Effektorzelle statt. Stattdessen kann das fehlende kostimulatorische Signal Anergie auslösen, d.h. naive T-Zellen werden trotz Erkennung ihres spezifischen Epitopes nicht aktiviert sondern arretiert (Harding *et al.*, 1992; Tan *et al.*, 1993).

Die Funktion der beiden Korezeptoren CD8 und CD4 besteht darin, bei der Antigenerkennung die Wechselwirkung zwischen dem TCR und dem MHC-Klasse-I- bzw. MHC-Klasse-II-Molekül auf den APCs durch Interaktion mit spezifischen Domänen dieser Moleküle zu stabilisieren (Janeway *et al.*, 2002).

1.3 Dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen

DCs sind professionelle APCs und einzigartige Initiatoren primärer Immunantworten (Banchereau *et al.*, 2000). Sie sind sehr effiziente Stimulatoren von B- und T-

Lymphozyten. Wenige DCs und niedrige Konzentrationen des Antigens reichen aus, um eine starke T-Zell-Antwort zu induzieren.

Wichtig für die hohe stimulatorische Potenz der DCs sind kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die auf murenen DCs stark exprimiert werden (Banchereau *et al.*, 2000). Daher hängt das Ergebnis einer DC-T-Zell-Interaktion vom Reifestatus der DCs ab: reife DCs *primen* eine Immunantwort, während immature DCs Toleranz induzieren können (Steinman und Nussenzweig, 2002).

Verschiedene Faktoren wie Pathogene, Zytokine, Antigene aber auch T-Zellen können immature DCs dazu veranlassen, sich phänotypischen und funktionellen Veränderungen zu unterziehen, welche eine Maturation zur Folge haben (Banchereau *et al.*, 2000). In Abbildung 1.3 sind einige Merkmale von immaturren und murenen DCs aufgeführt.

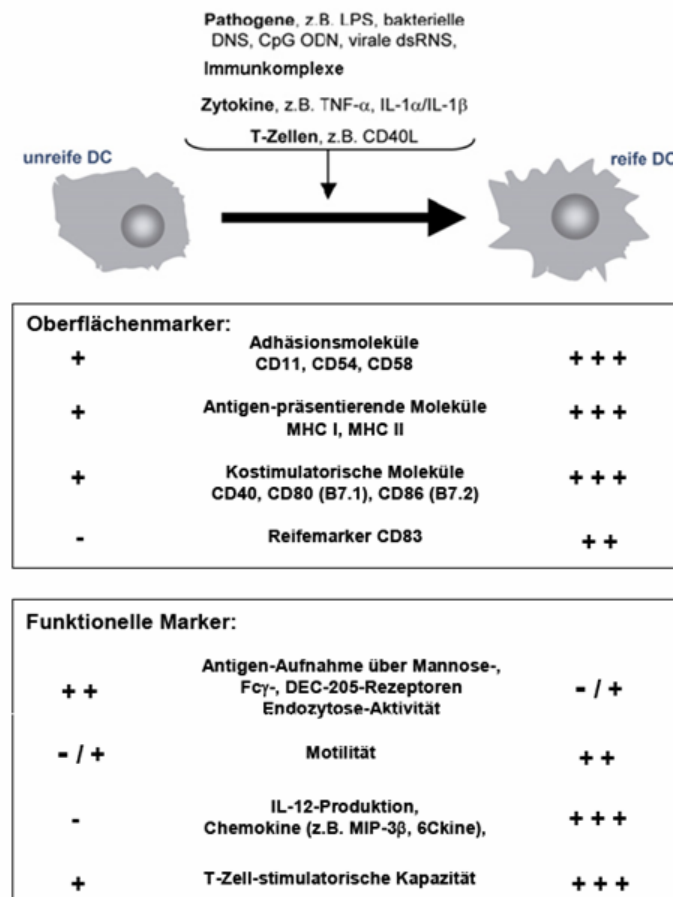


Abb. 1.3: Charakteristika unreifer und reifer DCs. Pathogene, Zytokine und T-Zellen können Auslöser für die Reifung von DCs sein. Unreife DCs sind auf die Antigenaufnahme, bzw. reife DCs auf die Antigenpräsentation spezialisiert und zeigen daher Merkmale auf, die mit dieser Spezialisierung in Zusammenhang stehen. LPS: Lipopolysaccharide, CpG-ODN: CpG Oligodesoxydinukleotide, dsRNA: doppelsträngige RNA, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor, IL: Interleukin, CD40L: CD40 Ligand, MHC II: MHC-Klasse-II, CCR1, CCR5, CCR6 = Chemokinrezeptoren, CD80, 86, 40 = kostimulatorische Signale, CD54 (ICAM-1): interzelluläres Adhäsionsmolekül, CD83 = CD-Marker, Funktion unbekannt, LAMP: Lysosom-assoziierte Membranproteine. (Modifiziert nach Timmerman und Levy, 1999 und Banchereau *et al.*, 2000).

DCs besitzen viele Möglichkeiten um Antigene aufzunehmen: (i) durch Phagozytose können Partikel und Mikroben aufgenommen werden (Inaba *et al.*, 1993; Moll *et al.*, 1993; Svensson *et al.*, 1997), (ii) durch Makropinozytose (Formung großer, Pinozytose-ähnlicher Vesikel) können extrazelluläre Flüssigkeit und Stoffe eingeschlossen werden (Sallusto *et al.*, 1995), (iii) durch die Expression von Rezeptoren, welche eine adsorptive Endozytose vermitteln, wie z.B. C-Typ Lektin-Rezeptoren, der Mannose Rezeptor (Sallusto *et al.*, 1995), DEC-205, ein *orphan* Rezeptor (Jiang *et al.*, 1995), oder auch Fc γ - und Fc ϵ -Rezeptoren (Sallusto und Lanzavecchia, 1994). Durch die unter (ii) und (iii) erwähnten Mechanismen können Antigene effizient aufgenommen werden, so dass pikomolare und nanomolare Konzentrationen des Antigens bereits ausreichen um eine effiziente MHC-Beladung zu erreichen (Sallusto *et al.*, 1995).

Nicht nur die Eigenschaft Antigene hervorragend aufzunehmen macht DCs zu den leistungsfähigsten Initiatoren einer T-Zell-Antwort. Sie besitzen außerdem die Fähigkeit zur effizienten Kreuzpräsentation und zu einem effizienten *cross-priming* (Bevan, 1976). Man versteht darunter die Stimulation und anschließende Generierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch die Präsentation eines exogenen Antigens via MHC-Klasse-I-Moleküle (siehe auch Abschnitt 1.4.3).

Kommt es, z.B. vermittelt durch eine Gewebsschädigung, zu einer Aktivierung von peripheren, gewebsständigen DCs, verlassen diese das Gewebe und wandern in den drainierenden regionalen Lymphknoten. Dort interagieren sie mit T-Lymphozyten, die ihrerseits nach Aktivierung durch die DCs über die Lymphe und das Blut den Ort der Gewebeschädigung aufsuchen, um ihre Funktion als Effektoren der Immunantwort zu erfüllen. Einige T-Lymphozyten differenzieren im Laufe der Expansionsphase nach Antigenkontakt zu Gedächtniszellen, die nach einer zweiten Begegnung mit dem Antigen zu einer raschen Exekution von Effektormechanismen sowie zu einer massiven Proliferation in der Lage sind (siehe Abb. 1.4).

DCs, die im nichtaktivierten Zustand den Lymphknoten erreichen, bewirken eine T-Zell-Anergie oder T-Zell-Toleranz.

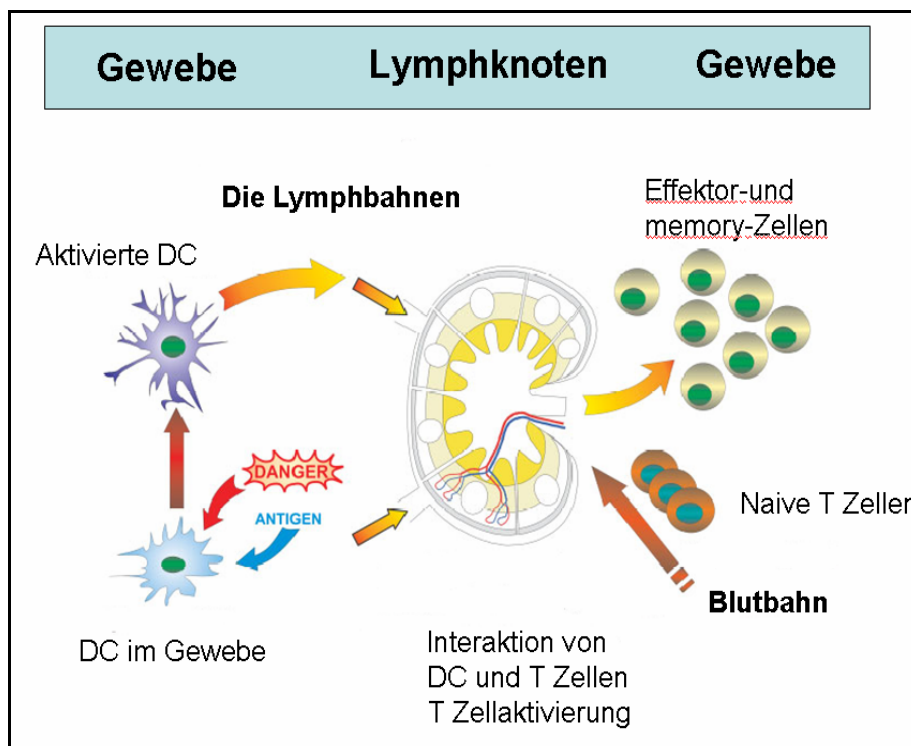


Abb. 1.4: Migration und *Homing* von DCs. Nach Kontakt mit Antigenen werden DCs im Gewebe aktiviert und wandern in den Lymphknoten, wo Sie mit T-Zellen interagieren. Diese werden wiederum aktiviert und differenzieren zu T-Effektorzellen und migrieren in den Ort der Inflammation oder Gewebeschädigung, wo sie ihre Effektorfunktion ausüben können. Einige T-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen. (Entnommen aus: Rajnavölgyi, 2003).

1.4 Antigenprozessierung und Antigenpräsentation

Es existieren zwei klassische Antigenpräsentationswege; der sogenannte MHC-Klasse-I-Weg ist für die Präsentation von zytosolischen Antigenen und die Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen verantwortlich; der sogenannte MHC-Klasse-II-Weg vermittelt hingegen die Präsentation von exogenen Antigenen und die Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen (eine Übersicht liefert: Janeway *et al.*, 2002).

1.4.1 Klassischer MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg

Antigene Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden können, stammen in der Regel von zytosolischen Selbstproteinen oder viralen Proteinen, die nach Infektion in dem Zytosol der Wirtszelle synthetisiert werden. Zytosolische Proteine werden hauptsächlich durch das Proteasom abgebaut. Antigene Peptide werden häufig mittels TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das ER transloziert. TAP bildet einen Heterodimer aus TAP1 und TAP2, die wahrscheinlich 8 bzw. 7 Transmembrandomänen besitzen und ATP-Bindungskassetten beinhalten. TAP bildet eine Pore in der ER-

Membran und transportiert Peptide in einem ATP-abhängigen Mechanismus aus dem Zytosol in das ER. Teilweise werden die in das ER eingebrachten Peptide noch durch dort lokalisierte Aminopeptidasen nachprozessiert und dann auf „leere“ MHC-Klasse-I-Moleküle geladen. Nach der Bindung eines Peptides und Vervollständigung seiner Faltung wird das Peptid beladene MHC-Klasse-I-Molekül an die Zelloberfläche transportiert (siehe Abb. 1.5) (eine Übersicht liefert: Grommé und Neefjes, 2002; Janeway *et al.*, 2002).

1.4.2 Klassischer MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg

Exogene Antigene, durch (rezeptorvermittelte) Endozytose aufgenommene Proteine oder größeres, partikelförmiges Material, welches durch Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommen wurde, wird durch den MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationsweg prozessiert. Die Antigene werden in sauren Endosomen durch Proteasen proteolytisch gespalten. Der Biosyntheseweg der MHC-Klasse-II-Moleküle beginnt, wie bei anderen Glykoproteinen der Zelloberfläche, mit der Translokation in das ER. Um die vorzeitige Peptidbeladung der MHC-Klasse-II-Moleküle zu verhindern, werden neu synthetisierte Moleküle mit der sogenannten MHC-Klasse-II-assoziierten invarianten Kette (Ii) assoziiert. Diese bildet Trimere, wobei jede Untereinheit nichtkovalent an ein MHC-II- α : β -Heterodimer bindet und die Peptidbindungsfurche blockiert.

Eine zweite Funktion der invarianten Kette besteht in dem Transport von MHC-Klasse-II-Molekülen aus dem ER zum endosomalen Kompartiment. Durch Proteasen wird die invariante Kette sukzessive proteolytisch gespalten, bis nur noch ein kurzes Stück, das sogenannte CLIP-Fragment (*class II-associated invariant-chain peptide*) in der Peptidbindungsfurche von MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden bleibt. Wenn das CLIP-Fragment entweder nach Abdissoziation oder nach Verdrängung durch ein Peptid ersetzt wurde, können die peptidbeladenen MHC-Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert werden.

Die Mechanismen der Beladung von MHC-Klasse-II-Molekülen sind noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Wahrscheinlich findet die Spaltung der invarianten Kette und die Bindung von Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle während einer späten Phase des endosomalen Abbauweges in einem spezialisierten vesikulären Kompartiment statt, dem MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC) (siehe Abb. 1.5) (eine Übersicht liefert: Villadangos und Ploegh, 2000; Villadangos, 2001; Janeway *et al.*, 2002).

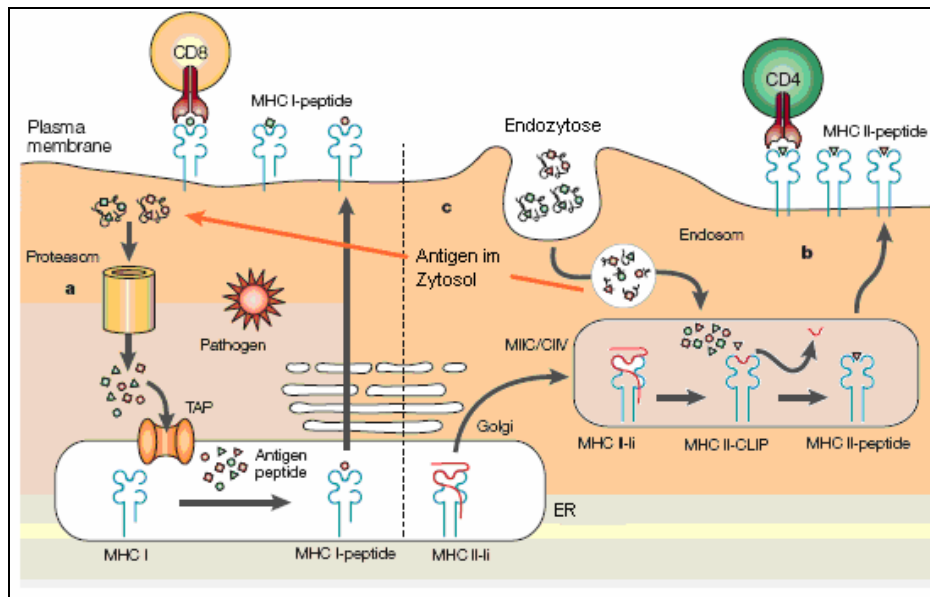


Abb. 1.5: Schematische Darstellung der MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Antigenpräsentationswege. Die einzelnen Schritte der Antigenpräsentationswege sind im Text näher erläutert. (Entnommen aus: Heath und Carbone, 2001).

1.4.3 Kreuzpräsentation

Neben dem direkten, klassischen Weg der Antigenprozessierung zur MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation wird noch ein weiterer Mechanismus diskutiert. So wurde beobachtet, dass die Präsentation von exogenen Antigenen durch Zellen, die keine kostimulatorischen Fähigkeiten besitzen, zur Aktivierung antigenspezifischer $CD8^+$ T-Zellen führt. Eine Erklärung für dieses Phänomen lieferten erstmals Ergebnisse von M. Bevan, die zeigten, dass auch exogene Antigene auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden können (Bevan, 1976). APCs können virusinfizierte Zellen phagozytieren und im Anschluss Virusantigene über die eigenen MHC-Klasse-I-Moleküle $CD8^+$ T-Zellen präsentieren. Werden nach Aufnahme und Prozessierung exogene Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert und gleichzeitig kostimulatorische Signale durch die APCs vermittelt, können naive zytotoxische $CD8^+$ T-Zellen aktiviert werden. Dieser Vorgang wird Kreuzimmunität genannt, während die Kreuzpräsentation ohne kostimulatorische Signale (z.B. von körpereigenen Peptiden) als Kreuztolerisierung bezeichnet wird und keine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen zur Folge hat.

Die Aufnahme von Antigenen zur Kreuzpräsentation geschieht durch die gleichen Mechanismen wie bei der Präsentation auf MHC-Klasse-II-Molekülen. Nach Internalisierung in Phagosomen müssen die Antigene zur proteolytischen Spaltung durch das Proteasom in das Zytosol gelangen (siehe Abb. 1.6). Der Mechanismus und

die Bedingungen, die für die Kreuzpräsentation der Antigene bedeutend sind, sind zurzeit noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Arbeiten, die zeigen, dass die Kopplung von Antigenen an Chaperone ausschlaggebend für die Bindung an Oberflächenrezeptoren (wie z.B. CD91) von APCs und deren Rezeptor-induzierte Endozytose sind (Srivastava, 2002; MacAry *et al.*, 2004). Andere Arbeiten wiesen jedoch auch die Aufnahme exogener Antigene ohne Chaperon-Beteiligung nach (Norbury *et al.*, 2004; Wolkers *et al.*, 2004).

Nach Antigenaufnahme fusionieren die exogene Antigene enthaltenden Phagosomen mit Vesikeln, die sich vom ER abspalten (Ackerman *et al.*, 2003; Guermonprez *et al.*, 2003; Houde *et al.*, 2003). Diese ER-Vesikel enthalten neusynthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle und zusätzlich die zur Beladung notwendigen Bestandteile, wie z.B. TAP und Tapasin. Aus diesen fusionierten Vesikeln werden die Antigene wahrscheinlich über einen multimolekularen Kanal (Sec 61-Komplex) ins Zytosol transportiert (Wiertz *et al.*, 1996; Romisch, 1999). Es werden aber auch andere Proteinkanäle, wie z.B. TAP in Verbindung mit der Translokation gebracht (van Endert, 1996; Matlack *et al.*, 1998; Johnson *et al.*, 1999; Jarosch *et al.*, 2002). Im Zytosol werden die Antigene vom Proteasom degradiert und gelangen, analog zum Mechanismus der Präsentation endogener Antigene, über TAP wieder zurück in das Vesikel-Hybrid, wo sie an MHC-Klasse-I-Moleküle binden und an die Zelloberfläche transportiert werden. Es gibt aber auch Hinweise, dass zur Kreuzpräsentation eine Translokation von Antigen auch ohne Beteiligung von TAP möglich ist (Schoenberger *et al.*, 1998b; Norbury *et al.*, 2004).

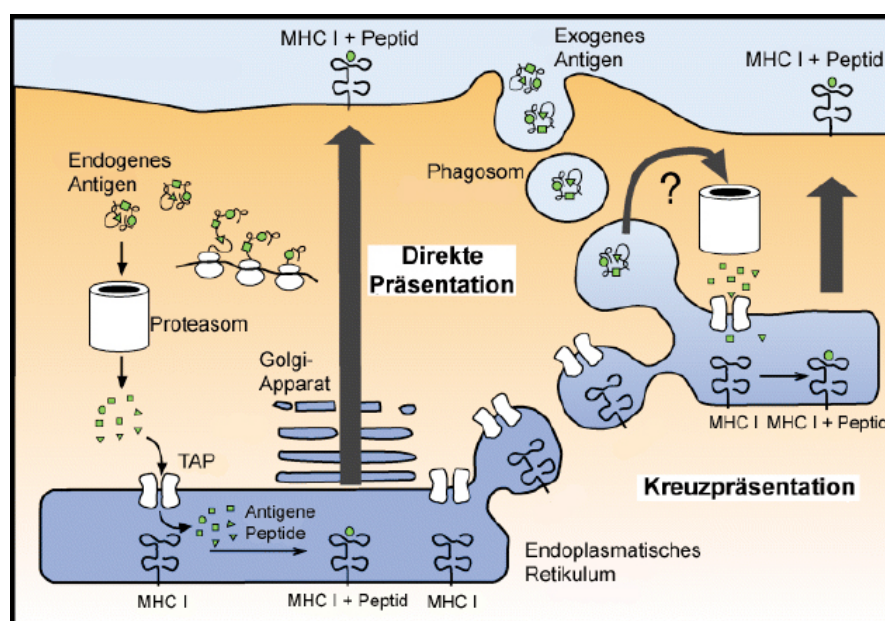


Abb. 1.6: Schematische Übersicht der MHC-Klasse-I-Antigenpräsentation und Kreuzpräsentation. Eine Erläuterung der einzelnen Schritte ist im Text beschrieben. (Modifiziert nach: Heath *et al.*, 2004).

Das Phänomen der Kreuzpräsentation kann nicht bei allen APCs in gleicher Weise beobachtet werden. Für Makrophagen konnte eine Kreuzpräsentation nachgewiesen werden (Bellone *et al.*, 1997), jedoch bisher keine Kreuzimmunität, welche für DCs charakteristisch zu sein scheint (Albert *et al.*, 1998; Ronchetti *et al.*, 1999; Kurts *et al.*, 2001). Für B-Zellen konnte bisher sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nur die Fähigkeit zur Kreuzpräsentation gezeigt werden (Schoenberger *et al.*, 1998a; Heit *et al.*, 2004).

Die Untersuchungen zur Beteiligung der unterschiedlichen DC-Subpopulation sind Gegenstand der aktuellen Forschung. Es zeichnet sich im Maussystem ab, dass CD8⁺ DCs hauptsächlich für die Kreuzpräsentation verantwortlich sind. Dies geschieht nicht nur durch die direkte Aufnahme von exogenem Antigen, sondern auch durch eine Art Antigenaustausch zwischen CD8⁺ DCs und anderen DC Familienmitgliedern (eine Übersicht liefert: Heath *et al.*, 2004).

1.5 Sekundäre lymphatische Organe als Ort der Interaktion zwischen T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen

Zu den sekundären lymphatischen Organen gehören neben Milz und Lymphknoten auch die lymphatischen Gewebe der Schleimhaut (MALT = Mucosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe) im Rachen-Nasenbereich (Waldeyerscher Rachenring), im Gastrointestinalbereich (GALT = Gastrointestinal-assoziiertes lymphatisches Gewebe, z.B. Peyersche Plaques, Appendix) sowie im Atemapparat (BALT = Bronchien-assoziiertes lymphatisches Gewebe). Die Hauptaufgabe der sekundären lymphatischen Organe ist es, Antigene, APCs und die in nur geringer Zahl vorhandenen antigenspezifischen Lymphozyten zusammenzubringen. Nur dann ist die Auslösung einer vollständigen und effizienten Immunantwort des Organismus auf das Antigen möglich.

1.5.1 Lymphknoten

Lymphknoten bilden einen Teil des Netzwerkes, in welchem Antigene aus der Gewebeflüssigkeit oder Lymphe während ihrer Passage von der Peripherie zum Ductus thoracicus herausgefiltert werden. Lymphknoten kommen häufig an Verzweigungen von Lymphgefäßen vor. Größere Ansammlungen sind an strategisch wichtigen Punkten platziert, wie im Nacken, an den Achseln, in der Leistengegend, im Mediastinum und in der Bauchhöhle. Sie drainieren die unterschiedlichen oberflächlichen und tiefen

Körperregionen. Die Lymphe erreicht den Lymphknoten über mehrere afferente lymphatische Gefäße und verlässt den Knoten durch ein efferentes lymphatisches Gefäß am Hilus. Die radialen Trabekel unterstützen zusammen mit den retikulären Fasern die verschiedenen zellulären Komponenten innerhalb des Lymphknotens.

Der Lymphknoten ist aus einem B-Zell-Areal (Kortex), einem T-Zell-Areal (Parakortex) und der zentralen Medulla, die T-Zellen, B-Zellen, Plasmazellen und häufig Makrophagen enthält, zusammengesetzt. Der Parakortex enthält viele APCs (interdigitierende Zellen), die eine große Anzahl von MHC-Klasse-I- und -II-Antigenen auf ihrer Zelloberfläche tragen (siehe Abb. 1.7).

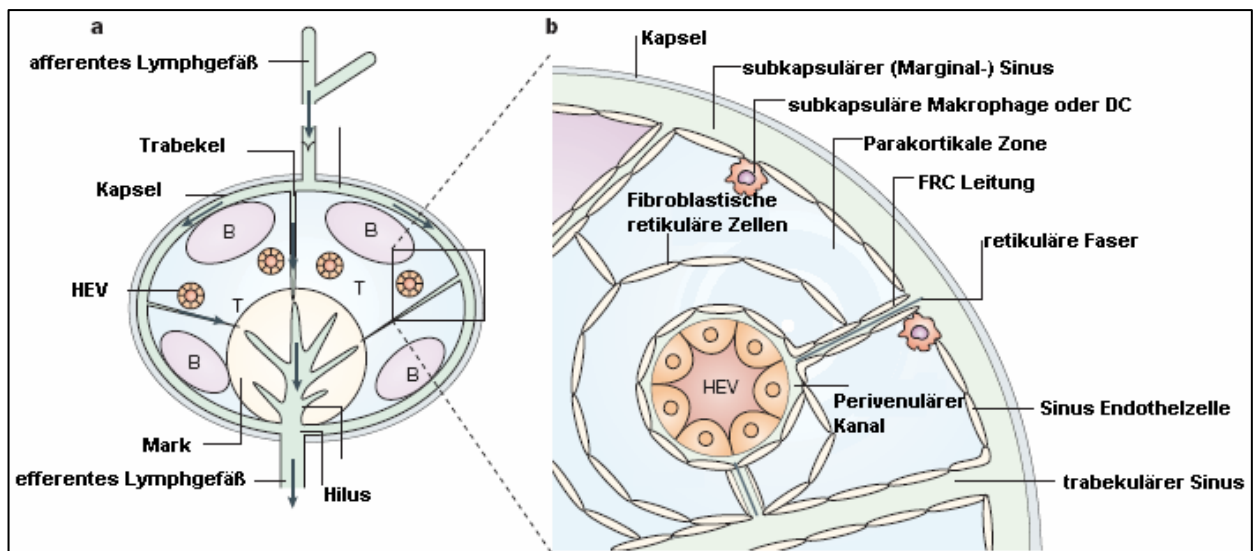


Abb. 1.7: Schematische Darstellung der Architektur von Lymphknoten (a) und der parakortikalen Zone (b). Die Beschreibung der Abbildung befindet sich im Text. (Modifiziert nach von Adrian *et al.*, 2003).

In den Lymphknoten werden zahlreiche Antigene transportiert. Diese werden im Lymphknoten von APCs aufgenommen, prozessiert und den vorbeizirkulierenden Lymphozyten präsentiert. Der Eintritt der Lymphozyten in den Lymphknoten gelingt einerseits über die Lymphbahn durch afferente Lymphgefäße, eine andere Möglichkeit besteht über den Blutweg über Venulen mit hohem Endothel (HEV). Dies sind definierte postkapilläre Blutgefäßabschnitte, die mit ihrem speziellen Endothel eine Extravasation der Blutzellen ermöglichen (Kraal *et al.*, 1997). Die Extravasation der Lymphozyten ist ein komplexer, mehrstufiger Vorgang, an dem verschiedene Klassen von Zelloberflächenmolekülen (z.B. Selektine, Integrine und zelluläre Adhäsionsmoleküle) und chemoattraktive Stoffe (z.B. Chemokine und Zytokine) beteiligt sind (Springer, 1994; Adams *et al.*, 1994).

Im murinen Lymphknoten befinden sich mindestens fünf unterschiedliche DC-Subtypen, die sich durch die Expression von CD4, CD8 α , CD11b, CD11c, CD205 (DEC205), B220, MHC-Klasse-II-Molekülen und Gr1 (Ly6C/G) unterscheiden (Henri *et al.*, 2001; Nakano *et al.*, 2001) (siehe Tabelle 1.1).

Der CD11c-Marker gilt als spezifisch für DCs und die Expressionshöhe erlaubt die Unterscheidung zwischen Plasmazytoide (CD11c niedrig) und anderen DC-Subpopulationen (CD11c high) (Heath *et al.*, 2004).

% der Gesamt-DCs in	Lymphoide DCs CD4 ⁺ CD8 ^{hi} CD205 ^{hi} CD11b ⁻	Myeloide DCs CD4 ⁺ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	Myeloide DCs CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁻ CD11b ⁺	Myeloide DCs CD4 ⁻ CD8 ⁻ CD205 ⁺ CD11b ⁺	Langerhans DCs CD4 ⁻ CD8 ^{lo} CD205 ^{hi} CD11b ⁺
Milz	23	56	19	<4	<1
Thymus	70	-	-	-	-
Mesenteriale Lymphknoten	19	4	37	26	41
Haut -drainierende Lymphknoten	17	4	17	20	33

Tab. 1.1: Verteilung der murinen DC-Subtypen im lymphatischen Gewebe (nach Shortman und Liu, 2002).

CD11b-positive, myeloide DCs lokalisieren spezifisch im Parakortex, einem Ort, der ihnen die Aufnahme der sich in der Lymphe befindenden Proteine erlaubt. Die lymphoiden DCs (CD8 α ^{high}) und die plasmazytoiden DCs sind hingegen überall in den T-Zell-Zonen der Lymphknoten verteilt.

DCs gelangen hauptsächlich über das afferente Lymphsystem in die Lymphknoten. Eine zentrale Rolle in der Steuerung der Migration der DCs in die T-Zell Bereiche der Lymphknoten wird dem CCR7/CCL19/CCL21 Chemokinsystem zugeordnet (Robbiani *et al.*, 2000; Saeki *et al.*, 1999). So weisen plt/plt Mäuse, die weder CCL19 noch CCL21 exprimieren, keine DCs in den Lymphknoten auf (Gunn *et al.*, 1999).

1.5.2 Milz

Die Milz ist direkt in den Blutkreislauf integriert. Man erkennt anhand der Schnittfläche der Milz bereits makroskopisch eine Unterteilung in die beiden Hauptkompartimente, rote Pulpa (~75%) und die als weißliche Punkte imponierende weiße Pulpa (~25%). Ein drittes Kompartiment wird erst in der Histologie sichtbar: die Marginalzone (siehe Abbildung 1.9) (Chamberlain, 1990). Die weiße Pulpa ummantelt die arteriellen,

trabekelhaft angeordneten Gefäße (zentrale Arteriolen) röhrenförmig. Als periarteriöle Lymphozytenscheide (PALS) bezeichnet man die direkte Umgebung von Arterien, in der sich vor allem T-Lymphozyten und interdigitierende DCs befinden. Neben der PALS gibt es noch lymphatische Follikel mit Keimzentren, den Hauptanteil der Zellen bilden hier vor allem B-Lymphozyten und follikuläre DCs. Direkt im Anschluss als Abgrenzung zur roten Pulpa findet sich der Marginalsinus und die Marginalzone mit Makrophagen und B-Lymphozyten.

Die rote Pulpa besteht hauptsächlich aus einem Netz von Arterien, Sinus und Pulpavenen, die in einem Maschenwerk aus retikulären Zellen organisiert sind. Dort finden sich locker verteilt B- und T-Zellen, sowie reichlich Plasmazellen und NK-Zellen.

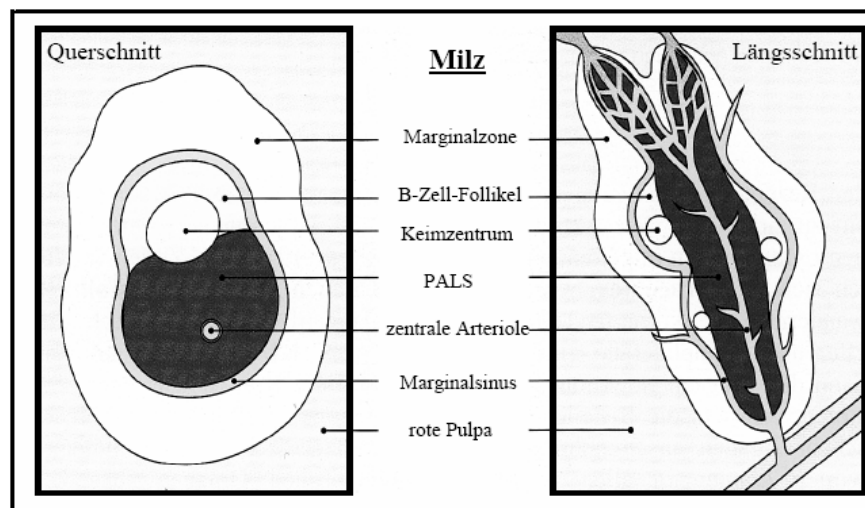


Abb. 1.9: Anatomische Struktur der Milz im Quer- und Längsschnitt. (Modifiziert nach Janeway *et al.*, 1997).

In der Milz sind zwei verschiedene Blutkreisläufe vorhanden. Ein geschlossenes System, in dem das Blut durch Arteriolen über Kapillaren zu venösem Sinus und Venulen fließt, und ein offener Kreislauf, bei dem die Zellen aus dem Blut im Bereich der Marginalzone frei in das Milzparenchym austreten können und sich schließlich wieder im Sinus sammeln.

Die Aufgaben der Milz sind im Wesentlichen unterteilbar in Filterfunktion und Immunfunktion (Kopp, 1990). Während der Passage durch das trabekuläre Netzwerk der Milz werden abnorme Blutzellen, z.B. Retikulozyten, deformierte oder geschädigte Zellen aus dem Blutstrom herausgefiltert und abgebaut. Auch andere Fremdstoffe werden aus dem Blut herausgefiltert. Außerdem bildet die Milz einen der größten Speicherplätze für Thrombozyten (im normalen Zustand bis 30%). Bei Insuffizienz des Knochenmarks kann sie sogar ihre in der Fetalentwicklung vorübergehend vorhandene

Granulo- und Erythropoese wieder aufnehmen. Andererseits werden im Blut vorhandene Antigene eingefangen. Deren Präsentation über APCs an zirkulierende immunkompetente Lymphozyten ermöglicht deren suffiziente Aktivierung. Der Zirkulationsweg der Lymphozyten durch die Milz ist nicht einwandfrei geklärt (van Ewijk *et al.*, 1985). Man nimmt an, dass die Lymphozyten in der Marginalzone die Blutgefäße verlassen und durch den Marginalsinus in die PALS gelangen. Die T-Lymphozyten verweilen dort, während die B-Lymphozyten in die Follikel weiterwandern.

Bei fehlender Stimulierung mit spezifischem Antigen verläuft der Weg zurück in den Blutkreislauf über die Marginalsinus in das Gefäßsystem (Tarlinton, 1998). Ist ein Antigen vorhanden, dann ändert sich der Migrationsweg der Lymphozyten entscheidend. Das Antigen wird von interdigitierenden DCs in der PALS an die wenigen, dafür aber spezifischen T-Zellen präsentiert, die dadurch einen Stimulus bekommen, ihre Migration stoppen und innerhalb der PALS proliferieren (Kearney *et al.*, 1994). B-Zellen werden ebenfalls in der PALS mit Unterstützung von T-Helferzellen aktiviert. Sie wandern schließlich zusammen mit einigen Helferzellen in benachbarte Follikel und differenzieren dort zu Plasmazellen.

1.6 Immuntherapeutische Ansätze

Zur Induktion von antigenspezifischen Immunantworten *in vivo* können verschiedene Antigenformate (Nukleinsäuren, rekombinante Proteine, synthetische Peptide) zur direkten Applikation *in vivo* bzw. zur *in vitro* Beladung von DCs und subsequentem Transfer genutzt werden.

1.6.1 Peptidvakzine

Die Identifizierung von MHC-Klasse-I-restringierten Epitopen lieferte einen Ansatzpunkt zur Entwicklung neuer Immunisierungsstrategien zur Induktion einer gesteigerten und spezifisch gegen einen Tumor gerichteten Immunantwort. In klinischen Studien wurden Peptide, die sich von sog. Cancer-Testis-Antigenen (z.B. MAGE-3) oder auch Differenzierungsantigenen (z.B. TRP2, gp100 oder MART-1/MelanA) ableiten, zur Peptidvakzinierung eingesetzt. So konnten Marchand *et al.* in klinischen Untersuchungen mit MAGE-3A.1-Peptiden Tumorregressionen bei 7 von 25 Patienten nachweisen (Marchand *et al.*, 1999).

Da peptidbasierte Immunisierungen keine kostimulatorischen Signale hervorrufen, finden Adjuvantien wie *Freund's Incomplete Adjuvant* (Aichele *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1999), CpG-Motive (Davila und Celis, 2000; Weeratna *et al.*, 2000) oder Zytokine wie GM-CSF (Scheibenbogen *et al.*, 2003) häufig Anwendung.

Durch die Kombination von CpG-Motiven und der gleichzeitigen CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4*) Blockade in einer TRP2-Peptid basierten Immunisierung zeigten Davila *et al.* eine gesteigerte CTL- und Anti-Tumorantwort für das murine B16-Melanommodell (Davila und Celis, 2000).

Den Vorteilen einer Peptidimmunisierung, wie etwa der einfachen Herstellung, stehen jedoch auch Nachteile gegenüber: i) Der erforderliche Einsatz von Adjuvantien, ii) es wird nur ein einzelnes Epitop präsentiert, d.h. eine vorausgehende HLA-Typisierung ist erforderlich, um das entsprechende Peptid effizient einsetzen zu können und iii) durch die Präsentation des Peptids über nicht-professionelle APCs kann Toleranz hervorgerufen werden.

1.6.2 Vakzinierungen mit Plasmid-DNA

Im Vergleich zu Peptidvakzinen hat die DNA-Immunisierung mit nackter, Antigenkodierender Plasmid-DNA einige potentielle Vorteile. Die Zelle, die mit der Plasmid-DNA transfiziert wurde oder die Plasmid-DNA aufnimmt, besitzt die Fähigkeit, Antigene endogen zu generieren, so dass diese für den MHC-Klasse-I-Antigenpräsentationsweg zugänglich sind. Der hauptsächliche Vorteil der Vakzinierung mit Plasmid-DNA liegt jedoch in der möglichen Induktion sowohl einer humoralen als auch einer zellulären Immunantwort. Zusätzlich überzeugt diese Methode durch geringen Kostenaufwand für Herstellung und Lagerung.

1990 wurde von Wolff *et al.* gezeigt, dass die intramuskuläre (i.m.) Injektion von Plasmid-DNA zur Expression verschiedener Reportergene in Muskelzellen führt (Wolff *et al.*, 1990). Nachdem von Tang *et al.* nachgewiesen wurde, dass die Injektion von Plasmid-DNA eine antigenspezifische Antikörperantwort gegen ein kodiertes Protein induzierte (Tang *et al.*, 1992), demonstrierten Ulmer *et al.* und Robinson *et al.*, dass die Impfung mit Plasmid-DNA, die für Influenza Hemagglutinin (InfHA) kodiert, Mäuse (Ulmer *et al.*, 1993), bzw. Hühner (Robinson *et al.*, 1993) vor einer Infektion mit Influenzaviren schützen kann. In der Mausstudie wurde desweiteren nachgewiesen, dass die DNA-Immunisierung zu einer Antikörper- und CTL-Antwort führte (Ulmer *et al.*, 1993).

Der erfolgreiche Einsatz von DNA-Vakzinen zur Induktion von Immunantworten gegen Differenzierungsantigene wurde in mehreren tierexperimentellen Studien gezeigt. Schreurs *et al.* konnten nach Immunisierung mit humanem gp100 eine tumorspezifische Antwort im murinen B16-Melanommodell erzeugen (Schreurs *et al.*, 1998). In Untersuchungen von Bronte *et al.* konnte eine Abstoßung des Tumors nach i.m. Injektion TRP2-kodierender Plasmid-DNA im murinen B16-Melanommodell nachgewiesen werden (Bronte *et al.*, 2000).

Plasmid-DNA birgt einige potentielle Sicherheitsrisiken, wie die Induktion von anti-DNA-Antikörpern (Gilkeson *et al.*, 1995) und die Integration des Transgens in das Wirtsgenom. Dies kann zur Inaktivierung zellulärer Gene oder Onkogenese führen und ist daher für tumorassoziierte Antigene (TAA) mit onkogenem Potential, wie z.B. erb-B2 (Bargmann *et al.*, 1986) und p53 (Greenblatt *et al.*, 1994), fragwürdig.

1.6.3 Vakzinierungen mit RNA

1.6.3.1 Struktur und Stabilität von eukaryontischer mRNA

Die typische eukaryontische mRNA trägt am 5'-Ende eine „Kappe“ (*cap*). Hierbei handelt es sich um einen 7-Methylguanosin-Rest, der über eine Triphosphat-Brücke mit der 5'-OH-Gruppe des nächstfolgenden Nukleotids verknüpft ist. Diese und das dritte Nukleotid in der Reihe sind in der Regel ebenfalls modifiziert, und zwar je durch eine Methylgruppe am 2'-OH der Ribose. Darauf folgt ein 5'-Nichtkodierungsbereich (*untranslated region*, UTR), der im Standardfall aus 50-100 Nukleotiden besteht und die Ribosomen-Bindungsstelle (RBS) beinhaltet. Das offene Leseraster wird auf der 5'-Seite von dem universellen Initiationskodon AUG und auf der 3'-Seite von einem der drei Stoppkodons (UAA, UAG, UGA) eingefasst. Hinter dem Stoppkodon befindet sich eine 3'-UTR meist mit einer Länge von einigen hundert Nukleotiden. Das Ende der meisten eukaryontischen mRNAs ist der sogenannte poly(A)-Schwanz, eine monotone Folge von 100-200 Adenylatresten (siehe Abb.1.10).

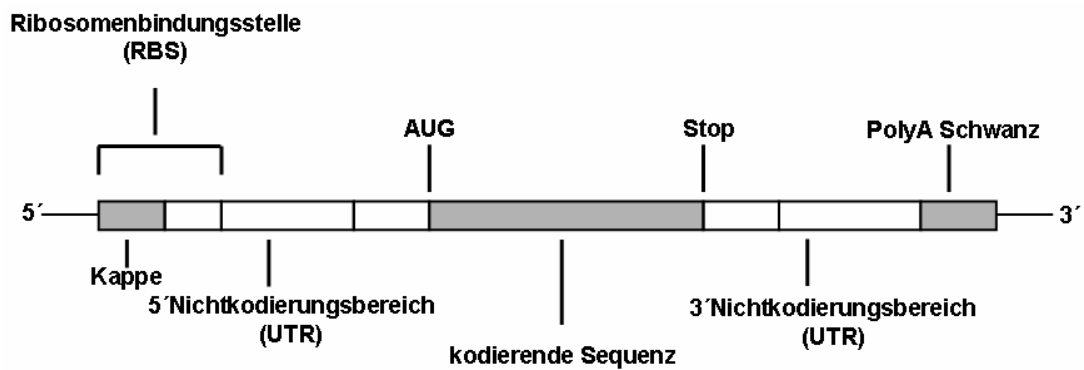


Abb. 1.10: Schematische Struktur einer eukaryontischen mRNA. Die verschiedenen strukturellen Bestandteile der mRNA sind im Text beschrieben.

Die Polyadenylierung am 3'-Ende findet im Zellkern offensichtlich bei nahezu allen eukaryontischen mRNA-Vorläufern mit Ausnahme der Histon-mRNAs statt. Nach ihrer Translokation ins Zytosol wird der ca. 200 Nukleotide umfassende poly(A)-Schwanz im Verlauf von Tagen schrittweise verkürzt. Da keine poly(A)-Schwänze mit einer Länge von weniger als 30 Nukleotiden entdeckt werden konnten, nimmt man an, dass es sich hierbei um die minimale poly(A)-Schwanzlänge handelt, die für eine hinreichende mRNA-Stabilität benötigt wird.

Die Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA vermittelt deren Export vom Kern ins Zytosol und trägt ebenfalls erheblich zur Stabilität bei.

1.6.3.2 Immunisierung mit RNA

Der Einsatz von RNA als Vakzine stellt heutzutage eine vielversprechende Strategie dar, um eine effiziente humorale und zelluläre Immunantwort zu induzieren.

RNA als Vakzinformat verknüpft die Vorteile der Nutzbarkeit als Impfstoff unabhängig von HLA-Restriktionselementen des Patienten, guter Transfizierbarkeit in APCs *in vitro* und Unabhängigkeit von viralen Vektorsystemen. Darüber hinaus ist RNA im Vergleich zu den potentiell sich ins Genom integrierenden DNA-basierten Impfstoffen im Hinblick auf Onkogenität sicherheitstechnisch unbedenklich.

Eine Übersicht über die Vor- und Nachteile der verschiedenen Vakzinformate gibt Tabelle 1.2 wieder.

Vakzinformat	synthetische Peptide	Nukleinsäure basierte Vakzine	
		Plasmid-DNA	RNA
Immunantwort			
humoral Antikörper	++	+++	+++
zellulär CD4 ⁺	+++	+++	+++
CD8 ⁺	+++	+++	+++
Antigenpräsentation	MHC-I oder MHC-II	MHC-I + MHC-II	MHC-I + MHC-II
Sicherheit	++++	++	++++
Nachteile	<ul style="list-style-type: none"> • HLA-Restriktion • schwach immunogen • benötigt Adjuvantien • aufwändige reverse T-Zell Immunologie 	<ul style="list-style-type: none"> • Überwindung der Kernmembran • Integration in das Genom 	<ul style="list-style-type: none"> • keine triviale Pharmakokinetik

Tab. 1.1: Tabellarische Übersicht der Charakteristika sowie der Vor- und Nachteile verschiedener Vakzinformate. ++ gut, +++ sehr gut, ++++ hervorragend (modifiziert nach Holtkamp, 2006).

Es gibt grundsätzlich zwei Arten von RNA die immuntherapeutisch genutzt werden kann. Einerseits ist es möglich, die gesamte Tumor-RNA, welche aus Tumoren isoliert werden kann, zu nutzen. Andererseits kann eine molekular definierte, *in vitro* transkribierte RNA (IVT-RNA), die für ein spezifisches Antigen kodiert, verwendet werden.

RNA als Vakzine wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen hauptsächlich in drei Formen eingesetzt: (i) RNA-transfizierte DCs; (ii) RNA in Liposomen verpackt und (iii) nackte RNA.

Mehrere Studien konnten zeigen, dass die Immunisierung mit RNA-transfizierten DCs antigenspezifische CTLs *in vitro* und *in vivo* induziert (Heiser *et al.*, 2002; Su *et al.*, 2003). Boczkowski *et al.* (1996) demonstrierten, dass die Immunisierung mit Ovalbumin- (OVA) RNA-transfizierten DCs zu einer CTL-Immunantwort führte, die in der Lage war, Mäuse gegen ein *challenge* mit vitalen E.G7-OVA-Zellen (mit Ovalbumin transfizierte murine Thymomzellen) zu schützen. Durch die Vakzinierung mit MUC1-RNA (Mucin-Antigen, ein Membranprotein, das auf zahlreichen Adenokarzinomen, bei Lymphomen und beim Multiplem Myelom in verstärktem Maße vorkommt) transfizierten Zellen konnte eine humorale und zelluläre Immunität erzeugt werden (Koido *et al.*, 2000). Der Einsatz von autologen DCs, die mit der mRNA für das Prostata-spezifischem Antigen (PSA) transfiziert worden waren, induzierte eine CTL-Antwort gegen PSA (Heiser *et al.*, 2000).

Die Verwendung von Liposomen-verpackter RNA ist eine weitere Methode, um eine Immunantwort zu stimulieren. Die Translation von RNA *in situ* kann zu einer längeren Antigenpräsentation führen als bei Protein- oder Peptid-Vakzinen. Mit dem Transfer von

in Liposomen-verpackter RNA in Mäuse erreichten Martinon und Mitarbeiter (1993) eine spezifische CTL-Antwort gegen Epitope des Influenza-Nukleoproteins. Zhou *et al.* zeigten 1999, dass in Liposome verpackte gp100-RNA sowohl zu einer anti-gp100 Antikörper-Antwort als auch zu einer spezifischer CTL-Antwort gegen B16 führte. Nach Komplexierung der RNA mit Unifectin oder Protamin (kationische Liposome) zeigten Hoerr *et al.* (2000), dass eine CTL-Antwort durch s.c. Injektion von RNA induziert werden konnte. Kürzlich zeigte diese Gruppe, dass die intratumorale Injektion von Protamin-komplexierter RNA zu einer protektiven Tumormunität in VM/Dk Mäusen gegen murine Glioblastome führte (Hoerr *et al.*, 2006).

Für die Umsetzung dieser Liposomen-Vakzinierungsstrategie in die klinische Anwendung bleibt ein wesentlicher Kritikpunkt bestehen: nämlich das kationische Liposomen sehr toxisch für Makrophagen sind und die Produktion von wichtigen Immunmodulatoren beeinträchtigen (Philips *et al.*, 1997). Ebenso muss mit einem verstärkten Risiko einer anaphylaktischen Reaktion gerade bei einem hochdosierten Einsatz dieser Liposomen gerechnet werden.

Um diese Limitation zu überwinden wurde in einigen Arbeitsgruppen versucht, nackte RNA zu verwenden. Wolff und Mitarbeiter konnten 1990 zeigen, dass nachdem nackte Luciferase-RNA in den Muskel injiziert worden war, eine Luciferase-Aktivität im Muskelgewebe nachzuweisen war, die nach 18 Stunden ihr Maximum erreichte und nach 60 Stunden nicht mehr nachweisbar war. Ying und Mitarbeiter konnten 1999 zeigen, dass nackte RNA i.m. injiziert eine spezifische CTL-Antwort gegen ein Epitop von β -Galaktosidase hervorruft. Durch Injektion einer *in vitro* transkribierten, infektiösen RNA in Mäuse gelang es Mandl *et al.* (1999) in einem Flavivirus-Modell eine spezifische CTL-Antwort zu erzeugen.

Die Fähigkeit von nackter RNA zur Induktion einer Immunantwort im Mausmodell wurde durch Hoerr und Mitarbeiter (2000) untersucht. Sie zeigten, dass die Vakzinierung mit LacZ-RNA im Ohrgewebe sowohl zu einer Antikörper- als auch zu einer CTL-Antwort führte. Tabelle 1.3 fasst eine Auswahl veröffentlichter Studien mit nackter RNA zusammen.

Studien	Typ und Herkunft der RNA	Immunantwort	Applikationsroute	Immunisierungsfrequenz	<i>In vivo</i> Tumorprotektion
Wolff <i>et al.</i> , 1990	mRNA für: - Luciferase - β -galaktosidase - CAT	k.A.	i.m.	einmal	k.A.
Conry <i>et al.</i> , 1995	mRNA für: - Luciferase - CEA	Antikörper	i.m.	10 Vakzine in 5 Wochen	k.A.
Ying <i>et al.</i> , 1999	mRNA für LacZ	Antikörper und CTL	i.m.	einmal	ja
Hoerr <i>et al.</i> , 2000	mRNA für LacZ	CTL	Ohrgehöre (i.e.) Keine CTL nach i.v., s.c. und i.m	einmal	k.A.
Granstein <i>et al.</i> , 2000	Gesamt-RNA aus S1509a (Spindeltumor)	k.A.	i.d.	dreimal (1x pro Woche)	ja
Hoerr <i>et al.</i> , 2006	mRNA für β -galaktosidase	CTL	intratumoral	siebenmal	ja

Tab. 1.3: Studien mit nackter RNA zur Vakzinierung gegen Tumoren. CAT: Chloramphenicol acetyltransferase, CTL: zytotoxische Lymphozyten, CEA: *Carcinoembryonic antigen*. i.m.: intramuskulär, i.v.: intravenös, s.c: subkutan, i.d.: intradermal.

1.7 Applikationsroute von Vakzinen

Es wurden verschiedene Varianten bezüglich des Injektionsortes für die Immunisierung untersucht, wobei sich zeigte, dass dieser eine wesentliche Rolle für den Erfolg der Immunisierung spielt.

Bei der Immunisierung mit Peptiden und Lipopeptiden wurde durch intraperitoneale (i.p.) sowie subkutane (s.c.) Injektion oder orale Verabreichung ein Infektionsschutz gegen *Salmonella typhimurium* erreicht (Schlecht *et al.*, 1993; Allsopp *et al.*, 1996). Durch intranasale Immunisierung von Ovalbumin (OVA) (als gelöstes Protein verpackt in Liposomen) konnte eine spezifische Immunantwort gegen OVA erzeugt werden (Vadolas *et al.*, 1995).

DNA-Immunisierung mit nackter Plasmid-DNA wurde im Allgemeinen intramuskulär (i.m.) vorgenommen (Donnelly *et al.*, 1997). Plasmid-DNA, in Liposomen verpackt, kann intravenös (i.v.) und s.c. verabreicht werden (Templeton *et al.*, 1997). Die i.p. Immunisierung von viralen Partikeln konnte ebenfalls erfolgreich durchgeführt werden (Zhou *et al.*, 1995).

Für die RNA-Immunisierung fehlten bislang Erfahrungswerte. Martinon *et al.* (1993) konnten zeigen, dass in Liposomen verpackte RNA s.c. und i.v. eine humorale und zelluläre Immunantwort hervorrufen kann. Mit β -Galaktosidase als Modell-Antigen

konnte Hoerr *et al.* (2000) durch Verabreichung nackter RNA in Ohrgewebe eine spezifische CTL-Induktion zeigen.

Bei der Verwendung von mit RNA transfizierten DCs wurden unterschiedliche Applikationsrouten gewählt: Subkutan oder intrakutan gespritzte DCs müssen für eine Interaktion mit T-Zellen in der Lage sein, einen drainierenden Lymphknoten aufzusuchen. Intravenös verabreichte Antigene reichern sich zunächst im Kapillargebiet der Lunge und der Leber an, bevor sie die Gelegenheit haben, lymphatisches Gewebe zu erreichen.

Durch die direkte intranodale (i.n.) Injektion, z.B. in einen Leistenlymphknoten, soll die Notwendigkeit der Migration umgangen werden. So induziert die i.n. Injektion von semi-maturen, aus Monozyten differenzierten DCs, eine T-Helfer-Antwort vom Typ1 gegen ein Neoantigen (Nestle *et al.*, 2003a). Im selben Jahr konnten Czerniecki *et al.* (2003b) demonstrieren, dass die i.n. Vakzinierung mit peptidbeladenen, maturen DCs zu einer stärkeren CD8⁺ T-Zellantwort bei Melanoma Patienten führte, als die i.v. oder i.d. Applikation. Die i.n. Verabreichung von Adenovirus-transduzierten DCs führte zum *priming* der T-Zellimmunität gegen SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*) bei Eseln (Barratt-Boyes, 2003c).

In klinischen Studien konnten Tagawa *et al.* beobachten, dass eine i.n. Injektion Tyrosinasekodierender DNA eine Immunantwort auslösen kann, während erwartete klinische Antworten jedoch ausblieben (Tagawa *et al.*, 2003).

Im Mausmodell konnten Kündig *et al.* (2000, 2005) zeigen, dass die direkte Injektion des Impfstoffes (Peptid oder DNA) in einem Lymphknoten oder in die Milz, die Effizienz des Impfstoffes millionenfach steigerte und sowohl zu einer protektiven antiviralen als auch Anti-Tumorimmunität führte.

1.8 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Entwicklung eines Impfverfahrens, das auf der intranodalen Immunisierung mit nackter, Antigen-kodierender, *in vitro* transkribierter (IVT) RNA basiert, um antigenspezifische Immunantworten zu induzieren. Als „Gold-Standard“ diente die subkutane Immunisierung mit DCs, die zuvor mit IVT-RNA transfiziert wurden. Zunächst sollte diese Form der peripheren Vakzinierung etabliert werden. Anschließend wurden verschiedene Vektroptimierungen hinsichtlich ihrer Auswirkung auf den Vakzinierungserfolg *in vivo* untersucht. Auf diesen

Erkenntnissen aufbauend sollte die Methode der intranodalen Transfektion von antigenpräsentierenden Zellen durch Injektion nackter IVT-RNA etabliert werden. Anschließend wurde die Pharmakokinetik der *in vivo* applizierten RNA analysiert und untersucht welche Zellpopulationen transfiziert werden. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob die intranodale Immunisierung mit RNA zur Expansion antigenspezifischer T-Zellen sowie zur Rekrutierung von Gedächtnis T-Zellen und zum *priming* von naiven T-Zellen führt. Die immunologischen Charakteristika der *in vivo* RNA-Immunisierung sollten anhand von Kriterien, wie die Messung der Proliferation, Zytotoxizität und Zytokinsekretion erarbeitet werden. Abschließend sollte getestet werden, ob durch intranodale Immunisierung mit IVT-RNA eine protektive antitumorale Immunität im murinen Modell induziert werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acetyliertes Rinderserumalbumin (BSA)	Invitrogen, San Diego, CA
Agar	Difco, Detroit
Agarose für Elektrophorese	Sigma, St. Louis
Ampicillin (Amp)	Sigma, St. Louis
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
BamHI	MBI Fermentas, Burlington, ON
BglII	MBI Fermentas, Burlington, ON
Bpil	MBI Fermentas, Burlington, ON
Bpml	MBI Fermentas, Burlington, ON
Betaplate Scint Szintillationsflüssigkeit	Wallac
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP)	MBI Fermentas, Burlington, ON
Collagenase D	Roche
DAKO	DAKO Corporation, Carpinteria, CA
Di-nucleicacid tri-phosphate (dNTP)	Invitrogen, San Diego, CA
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, St. Louis
Distilled water	Invitrogen, San Diego, CA
Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)	Invitrogen, San Diego, CA
Ecil	New England Biolabs, Frankfurt
EcoRI	MBI Fermentas, Burlington, ON
E coli DNA-Ligase	Invitrogen, San Diego, CA
E.coli DNA-Polymerase I	Invitrogen, San Diego, CA
E.coli RNase-H	Invitrogen, San Diego, CA
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol absolut 96-100% (v/v) p.A.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatrium	Sigma, St. Louis
Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'tetraacetic acid (EGTA)	Merck, Darmstadt
FACS-Clean	BD, Heidelberg
FACS-Flow	BD, Heidelberg
FACS-Rinse	BD, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, San Diego, CA
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
GeneRuler 50bp DNA Ladder	MBI Fermentas, Burlington
GeneRuler 1kB DNA Ladder	MBI Fermentas, Burlington
Glycerin (wasserfrei)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
mIL4	PeptoTech, USA
mGM-CSF	R&D
HindIII	MBI Fermentas, Burlington, ON
Hoechst 33342	Molecular Probes, Eugene, OR
Hyperfilm ECL	Amersham bioscience, Schweden
HotStarTaq-DNA-Polymerase	Qiagen, Hilden

Ionomycin Calcium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf
Isopropanol p.a.	Merck, Darmstadt
Kanamycin (Kana)	Sigma, St. Louis
λ -DNA Eco47I (Avall)	MBI Fermentas, Burlington, ON
Ketamin	WDT
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma
Lithiumchlorid	Merck, Darmstadt
Liquenium Heparin-Lösung	Roche
Lumi Light	Santa Cruz, Heidelberg
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt
Mouse CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec
Mouse CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec
MES freie Säure Monohydrat	Sigma, St. Louis
MES Natriumchlorid	Sigma, St. Louis
Methanol	Merck, Darmstadt
Minimum essential medium (MEM)	Invitrogen, San Diego, CA
Natriumacetat (3M ; pH 4,5)	Ambion, Austin, Texas
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumacid	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid p.a.	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid RNase-/DNase free (5M)	Ambion, Austin, Texas
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, St. Louis
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Merck, Darmstadt
3-(N-Morpholino)propanesulfonic acid (MOPS)	Sigma, St. Louis
Non-essential amino acids (NEAA)	Invitrogen, San Diego, CA
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PolyI:C	InvivoGen, France
pCMV-Script Vektor	Stratagen
Penicillin-streptomycin	Invitrogen, San Diego, CA
PFU Ultra Hot Start	Stratagene, Amsterdam
PHA	Sigma
PMA	Sigma
Phosphate buffered saline (PBS) pH 7,2	Invitrogen, San Diego, CA
Phosphate buffered saline (PBS)	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien
Primer	Invitrogen, San Diego, CA
Propidiumiodid	Sigma, St. Louis
Restriktionsendonukleasen	Pharmacia, Freiburg
Rinderserumalbumin (BSA)	Invitrogen, San Diego, CA
RNA Längenstandard (Century Marker)	Ambion, Huntingdon, Cambridgeshire
Roti Load 1	Roth, Karlsruhe
Rompun 2 %	Bayer HealthCare, Leverkusen
RPMI 1640	Invitrogen, San Diego, CA
R-Phycoerythrin-Streptavidin	MoBiTec, Göttingen
SapI	New England Biolabs, Frankfurt
Superscript II	Invitrogen, San Diego, CA
T4 DNA-Polymerase	Invitrogen, San Diego, CA
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas, Burlington, ON
T4 Ligase	MBI Fermentas, Burlington, ON
TNF- α	
Trichloessigsäure	Merck, Darmstadt
Trishydroxymethylaminomethan (TrisBase)	Sigma, St. Louis
Triton-X 100	Merck, Darmstadt
Trypsin	Invitrogen, San Diego, CA
Trypton	Difco, Detroit
Tween 20	Merck, Darmstadt
Water Molecular Biology Grade	Cambrex, Rutherford, NJ

Hefe-Extrakt	Difco, Detroit
Xbal	MBI Fermentas, Burlington, ON
XhoI	MBI Fermentas, Burlington, ON
XL1-Blue MRF'	Promega
X-Vivo	Bio Whittaker Europe, Verviers, Belgien

2.1.2 Peptide

Bezeichnung	Hersteller
gp70-Peptid (H2-L ^d)	Jerini
InfHA-Peptid I (H2-K ^d)	Biosyntan
InfHA-Peptid II (I-E ^d)	Biosyntan
pp65-Peptid	Jerini
SIINFEKL-Peptid	Biosyntan
SSX2-Peptid (HLA-A201)	Jerini
TRP2-Peptid	
VSV-GP (MHCII: I-A ^d)	Biosyntan

2.1.3 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti Maus CD3 PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen
anti Maus CD4 (L3T4) FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD4(L3T4) APC	BD Pharmingen
anti Maus CD4 (L3T4) PerCP	BD Pharmingen
anti Maus CCR5 PE	BD Pharmingen
anti Maus CCR7 PE	BD Pharmingen
anti Maus CD8 (Ly-2) APC	BD Pharmingen
anti Maus CD8 (Ly-2) PE	BD Pharmingen
anti Maus CD8 (Ly-2) PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen
anti Maus CD8 (Ly-2) FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD11a PE	BD Pharmingen
anti Maus CD11b FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD11c FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD11c APC	BD Pharmingen
anti Maus CD19 APC	BD Pharmingen
anti Maus CD25 PE	BD Pharmingen
anti Maus CD27 PE	BD Pharmingen
anti Maus CD27 FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD40 PE	BD Pharmingen
anti Maus CD44 PE	BD Pharmingen
anti Maus CD49b FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD54 PE	BD Pharmingen
anti Maus CD62 L PE	BD Pharmingen
anti Maus CD62 L FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD69 PerCP-Cy5.5	BD Pharmingen
anti Maus CD80 FITC	BD Pharmingen
anti Maus CD86 PE	BD Pharmingen
anti Maus CD127 PE	BD Pharmingen
anti Maus I-Ad FITC	BD Pharmingen
anti Maus I-Ab FITC	BD Pharmingen
anti Maus Ly-6C PE	BD Pharmingen
anti Maus V B 8.1/8.2PE	BD Pharmingen
anti Maus CD90.2 (Thy1.2) APC	BD Pharmingen
Rat IgG2a FITC (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen

Rat IgG1 PE (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen
Rat IgG1 PerCP-Cy5.5 (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen
Hamster IgG1 APC (Isotyp Kontrolle)	BD Pharmingen
SIINFEKL Tetramere APC	Beckman Coulter

2.1.4 Kits

Bezeichnung	Hersteller
Cell Proliferation Kit	DELTA
Cytometric Bead Array; mouse inflammation kit	Becton Dickinson, Heidelberg
Endofree Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden
mMESSAGE mMACHINE™ T7 Ultra	Ambion, Austin, Texas
mMESSAGE mMACHINE™ SP6	Ambion, Austin, Texas
MEGAclear™	Ambion, Austin, Texas
MEGAscript™ T7	Ambion, Austin, Texas
NucleoSpin Kit	Macherey und Nagel, Düren
Poly(A) Tailing Kit	Ambion, Austin, Texas
QiaQuick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Qiafilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Qiafilter Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, San Diego, CA
TOP10 chemisch-kompetente Zellen Kit	Invitrogen, San Diego, CA
Vybrant CFDA SE	Molecular Probes

2.1.5 Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Hersteller
Cell Strainer	BD Falcon
Einfrierrohrchen/Cryo Tube, 1,8 ml	Nunc
ELISPOT Platten	Nunc
FACS Röhrchen	Becton Dickinson
Gewebekulturflaschen	Becton Dickinson
Filtermatte 102 x 258mm	Wallac, Turku, Finnland
Insulinspritzen 0,33 mm (29G) x 12,7mm	BD Micro-Fine
Insulinspritzen 0,33 mm (31G) x 8mm	BD Ultra-Fine, USA
Spritze 1ml, 2ml	B/Braun
Spritze 5ml	BD Discardit II
Kanülen (Sterican 0,45 x 12mm)	B/Braun
Kanülen (Sterican 0,45 x 25mm)	B/Braun
Kanülen (Sterican 0,60 x 30mm)	B/Braun
Kanülen (Sterican 0,70 x 30mm)	B/Braun
Kanülen (Sterican 0,80 x 40mm)	B/Braun
Michel Wundklammern	Bruneau, France
Mikro-Hämatokri-Kapillaren	Brand
Rnase freie Eppis (1,5 und 2ml)	Eppendorf
6 Well Platten	Nunc
96 Well Platten	Nunc
Zentrifugationsröhrchen (15 und 50ml)	Greiner

2.1.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism 7700 Sequence detection system	Applied Biosystems, Foster City, CA
Begasungsbrutschrank	Heraeus instruments, Hanau
BioAnalyzer 2100	Agilent Technologies, Pado Alto, CA
Biofuge pico	Heraeus instruments, Hanau
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop IX 70	Olympus, Hamburg
Gene Pulser II	BioRad, München
Harvester 96	Tomtec, USA
Küvettenschleuder	IST, Thorsten Betzel, Hattersheim
KS ELISPOT-System	Zeiss, Jena
MS2 Minishaker	IKA Labortechnik, Staufen
Omnifuge 2:ORS	Heraeus instruments, Hanau
Sicherheitswerkbank herasafe	Heraeus instruments, Hanau
Szintillationszähler	Wallac, Turku, Finnland
Subcell GT	BioRad, München
Thermocycler T3	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Mikro 22R	Hettich, Tuttlingen
Ultra Turrax T8	IKA Labortechnik, Staufen
Ultrospec 2100 pro	Amersham Pharmacia, Uppsala Schweden
Vortexer VF2	IKA Labortechnik, Staufen
Wallac Viktor2	PerkinElmer
Zentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg

2.1.7 Puffer und Lösungen

Blaumarker und Ladepuffer für Agarosegele

0,25%	Bromphenolblau
0,25%	Xylenyanol FF
0,25%	Orange G
1mM	EDTA
40%	Sucrose

- in H₂O_{dest} lösen

DEPC- Wasser

1ml DEPC ad 1l Aqua ad inectibilia

- ü.N. bei Raumtemperatur schütteln
- autoklavieren

<u>MOPS 10x Stammlösung</u>	42,8g	MOPS
	6,8g	Na-Acetat
	3,7g	EDTA
		• einstellen auf pH 7,0
<u>MOPS-Gel (1%)</u>	1,5g	Agarose (für 150ml)
	120ml	DEPC- Wasser
		• aufkochen bis sich Agarose gelöst hat
		• nach Abkühlen auf 55°C Zugabe 15ml
		10x MOPS Stammlösung und 15ml
		37%iges Formaldehyd
<u>RNA-Probenpuffer</u>	120µl	10xMOPS
	500µl	Formamid
	350µl	Formaldehyd 37%ig
	150µl	Blaumarker
	100µl	Ethidiumbromid
<u>TAE 50x Stammlösung</u>	242g	TrisBase
	57,1ml	Eisessig
	100ml	0,5M EDTA pH 8,0
		• ad 1000ml H ₂ O _{dest} ; autoklavieren
<u>TAE-Gel</u>	1,5g	Agarose (für 150ml)
	150ml	1xTAE
		• aufkochen bis Agarose sich gelöst hat
		• nach Abkühlen auf 55°C Zugabe von
		Ethidiumbromid (0,25ppM)
<u>LB-Medium</u>	1%	Trypton
	0,5%	Hefe-Extrakt
	1%	Natriumchlorid
		• in H ₂ O _{dest} lösen
		• autoklavieren

<u>LB-Agar</u>	1,5%	Agar
		<ul style="list-style-type: none"> • in LB-Medium lösen • autoklavieren

2.1.8 Oligonukleotide und Sequenzen

2.1.3.1 Oligonukleotidprimer mit Restriktionsschnittstellen für die Klonierung

3'UTR des humanen β globin (aus hKM) in pGEM3Z

Sense h β globin 3'UTR-5'XhoI

5'-TTACTCGAGAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCT-3'

Antisense h β globin 3'UTR-3'Sall

5'-TTAGTCGACGCAGCAATGAAAATAAATGTTTTTTATTAGGCA-3'

eGFP (aus pEGFP-N3) in pGEM3Z und pST1

Sense eGFP-Kozak-Start-5'BamHI

5' -ATTGGATCCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTG- 3'

Antisense eGFPstop-3'BamHI

5' -ATTGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGT- 3'

InflHA (aus HA-A20 Zellen) in pGEM3Z und pST1

Sense Infl-HA-Kozak-Start-5'HindIII

5' -ATTAAGCTTATGAAGGCAAACCTACTGGTCCTGTTA- 3'

Antisense A Infl-HA-3'BamHI

5' -ATTGGATCCAATCTGATAGATCCCCATTGATTCCAA- 3'

Antisense B Infl-HA-TM-3'BamHI

5' -ATTGGATCCTCAGATGCATATTCTGCACTGCAAAGA- 3'

pp65 (aus HMCV infizierten Fibroblasten) in pST1

Sense pp65-BamHI
5' -GGATCCACCATGGAGTCGCGCGGTGCGCCGTTGTCCCGAAATG-3'

Antisense pp65-No-Stop-BamHI
5' -GGATCCACCTCGGTGCTTTTTGGGCGTCGAGGCGATGC-3'

Antisense pp65-Stop-BamHI
5' -GGATCCTCAACCTGGGCGTCGAGGCGATGC-3'

Sec (aus aktivierten PBMC)

Sense Sec-Kozak-Start-5'HindIII
5'-AAGCTTAGCGGCCGCACCATGCGGGTCACGGCGCCCCGAACC-3'

Antisense Sec-3'PstI
5'-CTGCAGGGAGCCGGCCCAGGTCTCGGTCAG-3'

TM_{MHCI} (aus aktivierten PBMC)

Sense Sec-Kozak-Start-5'BamHI
5'-GGATCCATCGTGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCT-3'

Antisense Sec-3'XhoI
5'-GAATTCAGTCTCGAGTCAAGCTGTGAGAGACACATCAGAGCC-3'

2.1.3.2 NukleotidsequenzenSequenz für Codon optimiertes Influenza HA (Inf HA_{opt})

TCGACGGCAGACTGAAGGGCATCGCTCCTCTCCAGCTGGGCAAATGTAACATCGCTGGCTGGCT
GCTGGGAAATCCTGAGTGTGATCCCCTGCTGCCTGTGAGAAGCTGGTCTTACATCGTGGAGACC
CCCAACTCTGAGAACGGCATCTGTTACCCTGGCGACTTCATCGATTACGAGGAGCTGAGAGAGC
AGCTGTCTAGCGTGTCTAGCTTCGAGCGGTTTCGAGATTTTCCCTAAGGAGTCCAGCTGGCCAAA
CCACAACACAACCAAGGGCGTGACAGCTGCTTGTCTCACGCCGGCAAGAGCAGCTTTTACCGG
AACCTGCTGTGGCTCACAGAGAAGGAGGGCTCTTACCCCAAGCTGAAGAACAGCTACGTGAACA
AGAAGGGCAAGGAGGTGCTGGTGTGTGGGGAATCCACCACCCTAGCAACTCTAAGGACCAGCA
GAACATCTACCAGAACGAGAACGCCTACGTGTCTGTGGTGACCAGCAACTACAACAGGAGATTC
ACCCCTGAGATCGCCGAAAGACCCAAGGTGAGAGATCAGGCCGGCAGGATGAACTACTACTGGA
CCCTGCTGAAGCCTGGCGACACAATCATCTTCGAGGCCAACGGCAATCTCATCGCCCCTAGATA
CGCCTTTGCTCTGAGCAGAGGCTTTGGCTCTGGCATCATCACCAGCAACGAGAGAGCCATCTA

Sequenz für SIINFEKL

ATGCTGGAGTCCATCATCAACTTCGAGAAGCTGACCGAG

Sequenz für MHC-Klasse-I-Transmembran- und zytoplasmatische Domäne

ATCGTGGGCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCCTAGCAGTTGTGGTCATCGGAGCTGTGGTCGCTA
 CTGTGATGTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAG
 CGACAGTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACAGCTTGA

Die Sequenz von Influenza-HA wurde von der Firma GENART (Regensburg, Deutschland) bezogen.

2.1.9 Puffer für FACS-Färbungen

<u>Fixationspuffer</u>	2%	PFA
	2%	FCS
	5mM	EDTA
	• in PBS lösen	
<u>FACS-Puffer</u>	2%	FCS
	5mM	EDTA
	0,1%	Natriumacid
	• in PBS lösen	
<u>FACS-Puffer mit Propidiumiodid</u>	2%	FCS
	5mM	EDTA
	0,1%	Natriumacid
	• in PBS lösen	
	• Zugabe 10µg/ml Propidiumiodid	

2.1.10 Puffer für ELISPOT

<u>Blocking-Medium</u>	X-Vivo + 2% Albumin
<u>PBS/TWEEN 0,1%</u>	500ml PBS + 500µl TWEEN
<u>PBS/TWEEN 0,05%</u>	500ml PBS + 250µl TWEEN
<u>PBS/BSA 0,5%</u>	50ml PBS + 250mg BSA
<u>Avidin-Peroxidase-Komplex</u>	10ml PBS/TWEEN 0,1% + je 1 Tropfen Reagenz A und B für 30min inkubieren vor Benutzung (Vectastain)

<u>Acetat-Puffer</u>	46,9ml H ₂ O + 4,6ml 0,2M Essigsäure + 11ml 0,2M Na-Acetat Lösung.
<u>Substrat-Lösung</u>	1 AEC-Tablette in 2,5 N-N-Dimethylformamid lösen, 47,5ml Acetat-Puffer und 30µl H ₂ O ₂ (30%ig) zugeben Frisch zubereiten und vor Verwendung durch 0,45µm Weißrandfilter filtrieren
<u>Na-Acetat 0,2 M</u>	8,2g ad 500ml Aqua dest. (Roth; Art.Nr.: 6773,2; M = 82,03 g/mol)

2.1.11 Zellkultur Medien

RPMI komplett-Medium

- 500ml RPMI-Medium mit Glutamax
- 50ml FCS (10%)
- 5ml Natriumpyruvat 100 mM (1%)
- 5ml Non-Essential-Aminoacids 100 x (1%)
- 2,5ml Pen/Strep (0,5%)
- 500µl 50µM 2-ME

DC-Medium

- 500ml RPMI 1640 Medium + Glutamax (Gibco)
- 5ml 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin (P/S) (Gibco)
- 500µl 50µM 2-ME (Gibco)
- 50ml (10%) FCS (Hitzeinaktiviert und filtriert)
- 50ml (10%) GM-CSF Überstand + 100U/ml GM-CSF + 25-50 U/ml mL4

Maturationsmedium

- DC-Medium
- 25ng/ml LPS + 10-20ng/ml TNF α (Sigma-Aldrich) oder Poly I:C (5µl/ml)

X63/0-Medium (Hybridomzelllinie, GM-CSF produzierende Zellen)

- 500ml basales Iscove-Medium
- 5ml (1%) P/S
- 25ml (5%) FCS

Einfriermedien

Zum Einfrieren von A20, CT26, DC , Milz- und Lymphknoten-Zellen wurde FCS-haltiges Medium verwendet.

Es bestand aus:

- 70% Kultivierungsmedium (meistens RPMI-Medium)
- 20% FCS
- 10% DMSO

Lyse-Puffer: Ammoniumchloridlösung zur Erylyse

- 8,29g NH₄CL (AppliChem)
- 1g KHCO₃ (AppliChem)
- 0,0372g EDTA (AppliChem)
- ad 1l aqua dest. pH 7,29 steril filtrieren

2.1.12 Versuchstiere

Für die Vakzinierungsversuche wurden männliche und weibliche Mäuse der Inzuchtstämme Balb/c, C57Bl/6 und OT-1 im Alter zwischen 6-10 Wochen verwendet. Die Versuchstiere stammen aus der zentralen Versuchstierhaltung der Uni-Klinik Mainz.

BALB/c

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^d.

BALB/c Thy1.1

Balb/c mit Thy1.1 Allel.

BALB/c HA TCR transgen Rag^{-/-}

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid InfHA110-119 im Kontext von MHC-Klasse-II H2 I-A^d erkennt.

BALB/c TCR-CL4

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor, der das Peptid InfHA₅₁₈₋₅₂₆ im Kontext von MHC-Klasse-I H2-K^d erkennt.

C57Bl/6

Der MHC-Haplotyp dieses Mausstamms ist H-2K^b.

OT-1

Dieser Mausstamm ist transgen für einen T-Zellrezeptor (TCR), der das Peptid OVA₂₅₇₋₂₆₄ im Kontext mit MHC-Klasse-I H2-K^b erkennt (Hogquist *et al.*, 1994). Der TCR kann spezifisch mit den monoklonalen Antikörpern anti-Maus V α 2 und V β 5.1, 5.2 TZR nachgewiesen werden.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

Alle Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank mit autoklavierten oder steril filtrierten Lösungen durchgeführt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte im jeweiligen Medium im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

2.2.3.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Lebende Zellen können über längere Zeit tiefgefroren in Flüssigstickstoff bei -196°C gelagert werden. Um eine Schädigung durch die Bildung intrazellulärer Eiskristalle zu vermeiden, wurde dem Einfriermedium 10% DMSO zugesetzt.

Allgemein wurde sowohl beim Einfrieren als auch beim Auftauen mit gekühlten Medien gearbeitet und in der Kühlzentrifuge abzentrifugiert (bei 4°C). Es wurden spezielle Freezing Container (Cryo 1°C Freezing Container) verwendet, um die Zellen erschütterungsfrei einzufrieren und um einen linearen Temperaturabfall beim Einfrieren zu gewährleisten. Die Freezing Container mussten vor Gebrauch auf 4°C vorgekühlt werden. Da das in den Einfriermedien enthaltene DMSO zelltoxisch ist, musste zügig gearbeitet werden, um die Zellverluste möglichst gering zu halten.

2.2.1.1.1 Einfrieren

Das Einfriervolumen betrug bei allen Zellen 1,8ml pro Cryo-Nunc. Nachdem das entsprechende Einfriermedium angesetzt worden war, konnten die Zellen zentrifugiert (300 x g; 4°C; 8min) und in dem benötigten Volumen resuspendiert werden. Anschließend wurden die Zellen in die Cryo-Nuncs pipettiert und zunächst in den Einfrierboxen bei -80°C gelagert. Am folgenden Tag konnten sie in die Stickstofftanks umgelagert (-180°C) werden.

2.2.1.1.2 Auftauen

Vor dem Auftauen der Zellen wurde ein 50ml Falcon mit PBS, 2mM EDTA gefüllt. Die Cryo-Nuncs wurden im Wasserbad (37°C) erwärmt. Sobald der Inhalt vollständig aufgetaut war, wurden die Zellen in das vorbereitete Falcon überführt und zentrifugiert

(300 x g; 4°C; 8min). Nachdem das zelltoxische DMSO durch zweimaliges Waschen der Zellen weitgehend eliminiert worden war, konnten die Zellen in jeweiligen Kulturmedien resuspendiert werden.

2.2.3.2 Kultivierung in Suspension wachsender Tumorzellen

Die Zellen der Linie A20 wurden in RPMI Komplett-Medium in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte nach Bedarf alle 3-4 Tage mit frischem Medium. Dazu wurde etwa ein Viertel der in Suspension wachsenden Zellen in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 8min lang bei 300 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in frischem Medium aufgenommen und in die Zellkulturflasche überführt, während die verbliebenen drei Viertel der Suspension verworfen wurden.

2.2.3.3 Kultivierung adhärent wachsender Tumorzellen

Adhärent wachsende Zellen wurden durch Trypsin/EDTA Behandlung abgelöst. Dafür wurde das Medium entfernt, der Boden der Zellkulturflasche mit sterilem PBS abgespült und mit Trypsin-EDTA-Gebrauchlösung bedeckt. Die Zellen wurden so lange mit der Enzym-Lösung inkubiert, bis sie sich vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst hatten. Anschließend wurde die Trypsin-EDTA-Gebrauchlösung mit den abgelösten Zellen in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt, das 10 bis 20ml Gebrauchsmittel mit FCS enthält, um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellen wurden im jeweiligen Medium gewaschen und in dem berechneten Volumen aufgenommen. Ein Teil der Zellsuspension wurde in die Zellkulturflasche überführt. Die restlichen Zellen wurden verworfen.

2.2.3.4 Zellzahl-Bestimmung mittels Neubauer-Kammer

Aus frisch in RPMI Komplett-Medium aufgenommenen Zellsuspensionen wurden Aliquots entnommen und in einer 1:1 Verdünnung mit Trypanblau gefärbt. 10µl einer solchen Verdünnung wurden auf die Zählkammer gegeben und ausgezählt. Die Lebendzellzahl kann mit dieser Methode bestimmt werden, da sich Trypanblau an Proteinstrukturen des Zytoplasmas anlagert, d.h. es kann nur in Zellen mit permeabler

Zellmembran eindringen und somit tote Zellen selektiv blau anfärben. Die Zellzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

Zellzahl in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x Konstante ($10^4/\text{ml}$) = Zellzahl/ml

2.2.3.5 Gewinnung und Kultivierung von murinen primären Milzzellkulturen

Die Maus wurde durch Genickbruch getötet und die Milz über die seitliche Bauchdecke unter der Sterilbank herauspräpariert. Die Milz wurde einmal mit PBS gewaschen und noch anhaftende Fettreste weitestgehend entfernt. Zur Gewinnung der Milzzellen wurde die Milz vorsichtig unter sterilen Bedingungen mit einem Spritzenstempel durch ein Zellsieb (40 oder $70\mu\text{m}$) in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gerieben. Die Zellsuspension wurde gesammelt und abzentrifugiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurde das Zellpellet in 5ml Lysepuffer aufgenommen und 4-6min bei RT inkubiert. Wurden mehrere Milzen zusammen aufbereitet, wurde entsprechend mehr Lysepuffer eingesetzt und bei großen Milzen die Inkubationszeit auf 7min erhöht. Die Erythrozytenlyse wird durch Zugabe von 20-30ml Medium oder PBS abgestoppt; die Zellen werden pelletiert ($300 \times g$, RT, 8min) und anschließend einmal mit PBS gewaschen. Dabei sollten möglichst alle bei der Erythrozytenlyse entstandenen Aggregate entfernt werden. Wenn nötig wird die Zellsuspension nochmals durch ein Zellsieb filtriert. Die gewonnenen Milzzellen wurden für die Analyse mittels Durchflußzytometrie, für adoptive Transferexperimente, sowie für Proliferations- und Stimulationsexperimente eingesetzt.

Für die Weiterkultivierung wurden die Milzzellen in 24 well Platten in einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen in 2ml je well ausgelegt; in 6 well Platten wurden ca. $4-6 \times 10^6$ Zellen in 4ml je well ausgesät.

2.2.3.6 Präparation und Aufarbeitung von murinen Lymphknoten

Nach dem Abtöten des Tieres durch Exartikulation der Halswirbelsäule wurde die Maus fixiert und äußerlich gründlich mit Terralin Liquid desinfiziert. Anschließend erfolgte ein kleiner Schnitt in der Leiste. Die Fellschicht wird mit einer Schere erweitert. Der Lymphknoten ist anhand seiner opaquen Erscheinung im subkutanen Fettgewebe zu erkennen. Mit einem kleinen Schnitt wird der Lymphknoten abgelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Um Bindegewebe und Fettgewebe zu lösen wird der Lymphknoten mechanisch mit einer Pinzette in einem Eppendorf Reaktionsgefäß in $500\mu\text{l}$ PBS zerkleinert. Anschließend wurde die Zellsuspension 30min lang bei 37°C mit

1mg/ml Kollagenase inkubiert. Dann wurden die Zellen über ein Zellsieb in ein 50ml Tube filtriert. Dann folgten zwei Waschschrte zur Elimination der Kollagenase in PBS (Zentrifugation für 8min bei 4°C).

2.2.3.7 Isolation von T-Lymphozyten aus Splenozyten

Die magnetische Zellseparation (MACS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) erlaubt aus einer heterogenen Zellsuspension Subpopulationen zu isolieren. Um aus der Splenozytensuspension T-Lymphozyten zu gewinnen, wurden die gewaschenen und zentrifugierten Zellen zunächst in 90µl MACS-Puffer (PBS, pH 7,2, supplementiert mit 0,5% bovinem Serum-Albumin) pro 10^7 Gesamtzellen resuspendiert und nach Zugabe von 10µl MACS CD4 oder CD8 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) für 15min bei 4°C inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit der 10- bis 20-fachen Puffermenge gewaschen und bei 1200rpm für 8min zentrifugiert. In allen Experimenten wurden Säulen zur Positiv-Selektion verwendet, wobei die Auswahl der Größe (MS+/RS+ oder LS+/VS+) von der erwarteten positiven Zellzahl abhing. Nach Äquilibration der Säule mit der für die jeweilige Größe empfohlenen Puffermenge erfolgte die Beschichtung mit der Zellsuspension in einem Volumen von 500µl/ 10^8 Zellen. Die nicht magnetisch markierten, negativen Zellen konnten so ungehindert durchfließen, während die positiven Zellen zurückgehalten wurden. Nach dreimaligem Nachspülen der Säule mit Puffer wurde die Säule aus dem Separator entnommen und über einem passenden Sammelröhrchen mit einem Puffervolumen von 1 bis zu 5ml mit Hilfe eines kleinen Kolbens durchgespült. Die auf diese Weise gewonnene Positivselektion wurde ebenso wie die von CD4 und/oder von CD8-positiven Zellen befreiten Splenozyten für die Untersuchung der Immunantwort *in vitro* oder *in vivo* verwendet. Nach Depletion blieb der Anteil der zurückgebliebenen CD4- und CD8-positiven Zellen stets unter 4%.

2.2.3.8 Zelllinien zur Produktion von murinem GM-CSF

Zur Produktion von mGM-CSF (*murine granulocyte macrophage-colony stimulating factor*)-haltigem Überstand wurde die Zelllinie X-63 in 50ml Zellkulturflaschen mit supplementiertem RPMI Medium kultiviert. Sobald die Zellen eine gewisse Dichte erreicht hatten, wurden sie in 250ml Zellkulturflaschen überführt. Anschließend wird die Apoptose der Zellen durch Zugabe von Cadmium Chlorid (5µM CdCl₂) ausgelöst.

Sobald das Medium eine stärkere Gelbfärbung aufwies wurden die Zellen abzentrifugiert. Der mGM-CSF-haltige Überstand wurde auf dessen biologische Aktivität hin untersucht. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte anhand der Ausdifferenzierung von DCs aus Knochenmark im Vergleich zu kommerziell erhältlichen GM-CSF. Es wurden zwei Konzentrationen von zugegebenem Überstand (5% und 10%) getestet. Der Überstand wurde aliquotiert und für spätere Versuche bei -20C° eingefroren. In flüssigem Stickstoff eingefrorene X-63 Zellen wurden bei Bedarf nach dem Auftauen für eine Passage in Medium kultiviert. Jede neue Charge wurde hinsichtlich ihrer Funktionalität getestet.

2.2.3.9 Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark

Die Generierung erfolgte mit geringen Abwandlungen wie in der Literatur beschrieben (Inaba, 1992; Lutz *et al.*, 1999). Eine 6-8 Wochen alte, weibliche Balb/c oder C57BL/5 Maus wurde durch cervicale Dislokation getötet. Nach Fixierung der Maus und Desinfektion der Hinterläufe mit EtOH erfolgte die Präparation von Tibia und Femur durch Entfernung von Fell und Muskulatur mittels steriler Schere. Nach Überführung der unversehrten Knochen in eine mediumhaltige Kulturschale fanden alle weiteren Schritte in der sterilen Atmosphäre eines Laminar-Air-Flow statt. Einem kurzen Eintauchen der Knochen in EtOH und Überführen in frisches Medium folgte die zunächst einseitige Eröffnung knapp unterhalb der Epiphyse sowie das Einführen einer 26G Kanüle. Mit insgesamt 2-3ml frischem Medium wurden zunächst von einer Seite und nach Eröffnung der gegenüberliegenden Seite von beiden Seiten aus die Zellen des Knochenmarks in eine sterile Petrischale ausgespült. Zur Beseitigung störender Gewebstücke wurde die gewonnene Zellsuspension durch ein 70mm Cellstrainer filtriert und anschließend mit 10ml Medium nachgespült.

Nach Zentrifugation ($300 \times g$, 8min, 4°C) erfolgte die Lyse der Erythrozyten mit 5ml Erythrozyten Lysepuffer durch eine 5-minütige Inkubation bei RT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20ml Medium abgestoppt. Einer erneuten Zentrifugation (1200 rpm, 8min, 4°C) folgte eine vorsichtige Resuspension der Zellen in 40ml Vollmedium und die Zellenzahlbestimmung. Nach erneuter Zentrifugation wurde die Zellenzahl auf $5 \times 10^5/\text{ml}$ in DC-Medium eingestellt und die Zellen in Petrischale mit einer Dichte von $5 \times 10^6/10\text{ml}$ überführt. Zwei Tage später erfolgte die Zugabe von weiteren 10ml DC-Medium das mit 200U/ml mGM-CSF (Roche, Mannheim) sowie 20ng/ml IL-4 (PeproTech, London) supplementiert war. Am Tag 4 wurden 10ml des Überstandes abgenommen und

abzentrifugiert. Das Pellet wurde in DC-Medium resuspendiert und vorsichtig wieder zu den Petrischalen zurückgegeben. Am Tag 6 können Zellen als immature DCs für Experimente verwendet werden oder durch Weiterkultivierung in frischem Maturationsmedium (enthält LPS, TNF- α oder poly I:C) zwei Tage lang maturiert werden. Die DCs befinden sich zu diesem Zeitpunkt in Suspension oder sind nur leicht am Boden angeheftet. Die sich auch bildenden Makrophagen sind fest adhären am Boden. Bei späteren Experimenten wurde das mGM-CSF durch Zugabe von 5-10% Überstand aus der mGM-CSF produzierenden Kultur der X-63-Zellen ersetzt. Die so aktivierten BM-DCs wurden am Tag 8 für die Proliferationsversuche eingesetzt.

2.2.3.10 Fluoreszenz-Markierung von Zellen

Für Proliferationsuntersuchungen werden die gewonnenen Milzzellen (siehe 2.2.1.6) fluoreszent markiert. CFSE (5-6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch Modifikation der Carboxy-Gruppen des Moleküls mit Acetomethyl-Estergruppen ein relativ ungeladenes Molekül darstellt (siehe Abb. 2.1). Dieser Farbstoff kann durch Zellmembranen hindurch in das Zytosol von Zellen gelangen. Durch endogene Esterasen werden die lipophilen Gruppen gespalten, was zur geladenen Form des Farbstoffes führt, welcher sehr viel langsamer wieder aus der Zelle wandert (siehe Abb. 2.1). Durch die aktivierte Gruppe kann der Farbstoff kovalent an freie Aminogruppen zellulärer Proteine gebunden werden, so dass die Mutterzellen fluoreszent markiert werden. Bei jeder Teilung wird der Farbstoff gleichmäßig von der Mutterzelle auf die Tochterzellen verteilt, so dass die Intensität der Markierung bei jeder Teilung kontinuierlich abnimmt (Lyons *et al.*, 1994) (siehe Abb. 2.2).

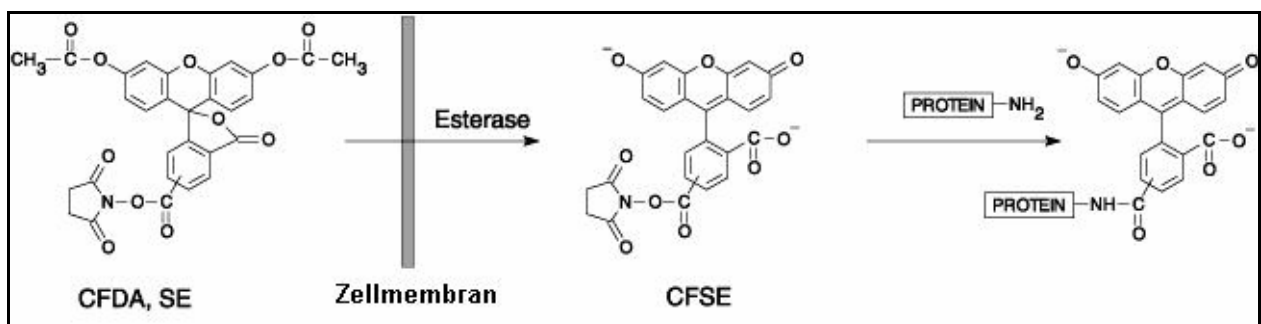


Abb. 2.1: Mechanismus der zellulären Markierung mit CFDA SE. CFDA SE ist ein nonpolares Molekül (MW=557), welches spontan durch die Zellmembran diffundiert und intrazellulär von Esterasen gespalten wird. Der Lakton-Ring wird geöffnet und zwei Moleküle Essigsäure abgespalten. Dadurch wird die Verbindung hydrophiler und kann nicht mehr aus der Zelle diffundieren, außerdem kann das Molekül jetzt zur Fluoreszenz angeregt werden. Intrazellulär kann das Molekül aufgrund seines Succinimidylersters an primäre ungeladene Amine binden.

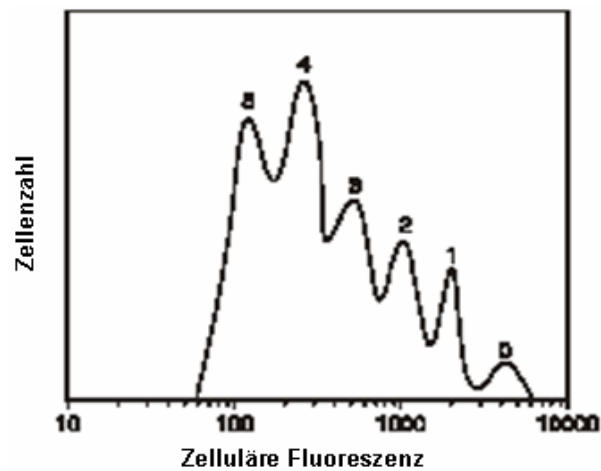


Abb. 2.2: Verfolgung der asynchronen Zellteilung unter Verwendung von CFSE-Markierung und Flowzytometrie. Die Zellteilung resultiert in der sequentiellen Halbierung der CFSE-Fluoreszenz, welche ein zelluläres Fluoreszenz-Histogramm ergibt, in dem die Peaks aufeinanderfolgende Generationen repräsentieren, bezeichnet mit 0, 1, 2, 3, 4, 5.

Zur Herstellung einer 100mM CFSE- Lösung wurden ein vial CSFE mit 90µl DMSO gut gelöst und 10µl davon mit 990µl PBS vermischt. Diese Lösung wurde in einer Endkonzentration von 10µM eingesetzt.

Milzzellen werden mit vorgewärmtem PBS + 0,1% BSA auf 5×10^7 /ml eingestellt und in ein 50ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Dazu wird ein bestimmtes Volumen einer 100µM CFSE-Lösung (angesetzt in PBS) gegeben, um eine Endkonzentration von 10µM zu erreichen. Anschließend werden die Zellen für 10min bei 37°C im Wasserbad inkubiert (ab und zu leicht schwenken). Die Reaktion wird durch Auffüllen des Röhrchens mit eiskaltem RPMI Medium gestoppt. Die Zellen werden pelletiert (1200 rpm, 8min, RT) und anschließend zweimal mit FCS und zweimal mit komplettem RPMI-Medium gewaschen. Die markierten Zellen werden dann für *in vitro* Proliferationsanalysen, bzw. für adoptive Transferexperimente sowie für *in vivo* Zytotoxizitätsversuche eingesetzt.

2.2.3.11 Transfektion von DCs mit RNA mittels Elektroporation

Als Elektroporation bezeichnet man die Verwendung von kurzen elektrischen Impulsen zum Einbringen von Nukleinsäuren in Zellen. Dabei hängt die Effizienz der Elektroporation von verschiedenen Faktoren ab. Die Stärke des angelegten elektrischen Feldes, die Dauer des elektrischen Impulses, die Temperatur, das verwendete Elektroporationsmediums und die eingesetzte RNA-Konzentration spielen hierbei eine Rolle. Um maximale Elektroporationseffizienzen zu erreichen, müssen alle diese

Parameter für den jeweiligen Zelltyp optimal eingestellt werden (Wolf *et al.*, 1994). Um die Elektroporation durchzuführen, wurden die DC an Tag 6 im unreifen Zustand geerntet. Zur Beseitigung aller Serumreste, welche die Elektroporation negativ beeinflussen würden, wurden die Zellen dreimal mit serumfreien X-Vivo 15-Medium gewaschen und in einer Konzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/200 μ l in X-Vivo 15-Medium aufgenommen. 200 μ l der Zellsuspension wurden dann in eine 4mm Küvette überführt, in welche 5-10 μ g RNA zugegeben wurden. Nach sorgfältigem Mischen der Zellsuspension wurde die Küvette in die Elektroporationsvorrichtung des Elektroporators geschoben. Für DC hat sich ein Impuls von 276V und 150 μ F als ideal erwiesen. Alle anderen Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben, bei 300V und 150 μ F elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen aus der Küvette in eine 6 Well Platte überführt, in welche 3ml Medium vorgelegt wurden. Im Falle der Elektroporation von DC wurde das Medium nach der Elektroporation mit Reifungszytokinen versetzt. Durch mehrmaliges Ausspülen der Küvette wurde verhindert, dass zu viele Zellen verloren gehen. Die Zellen wurden dann für 24h inkubiert und anschließend in weiteren Versuchen eingesetzt.

Beim Arbeiten mit RNA muss darauf geachtet werden, dass keine Kontaminationen in Form von RNAsen auftreten, welche die RNA abbauen würden. Deshalb wurden alle Arbeiten mit Handschuhen und sterilen gestopften Pipettenspitzen durchgeführt. Weiterhin sollten alle Schritte mit RNA so schnell wie möglich durchgeführt werden.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Extraktion für RT-PCR

Bei der Arbeit mit RNA wurde eine Reihe von Maßnahmen getroffen, um das gegenüber endogenen und exogenen RNAsen sehr empfindliche Molekül zu schützen und Kontaminationen zu vermeiden. Dazu gehörte die Benutzung von sterilen Glasgefäßen, Metallgegenständen und Plastikware, sowie die Behandlung aller eingesetzten Lösungen mit 0,1%igem Diethylpyrocarbonat (DEPC), wodurch eventuell vorhandene RNAsen vernichtet wurden (Fedorcsak und Ehrenberg, 1966). Gewebe und Zellen, die zur Extraktion von RNA bestimmt waren, wurden zur Asservierung bei -80°C gelagert. Etwa 50mg Gewebe bzw. 5×10^6 - 1×10^7 Zellen wurden für die RNA Extraktion eingesetzt, die mittels des RNeasyMini Kits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde. Im ersten Schritt wurde das Gewebestück, bzw.

Zellpellet mit einem Guanidinisothiocyanat (GITC)-haltigen Puffer versetzt, der stark denaturierend wirkt und mit Hilfe eines Ultra Turrax homogenisiert. Hierdurch wurde eine schnelle Inaktivierung der RNAsen und somit die Isolation von intakter RNA gewährleistet. Durch die Zugabe von Ethanol wurden die Bindungsbedingungen der Gesamt-RNA an die Silikanmembran der Säulen optimiert. Durch anschließende Waschschriffe mit den Puffern RW1 bzw. RPE wurden eventuell vorhandene Kontaminationen durch z.B. DNA oder Proteine entfernt. Vor der Elution der RNA in RNase-freiem Wasser wurden Reste des Puffers RPE entfernt, da er durch seinen hohen Ethanolgehalt nachfolgende Enzymreaktionen stören würde. Um die Konzentration und Qualität der extrahierten RNA zu bestimmen, wurden die Proben photometrisch vermessen und eine Agarose/Formaldehyd Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Elektrophorese wurde 1µl der extrahierten RNA in 30µl RNA-Probenpuffer aufgenommen, für 10min bei 70°C denaturiert und auf einem MOPS-Gel aufgetrennt. Als Ergebnis sollten deutlich abgegrenzte, distinkte Banden entstehen. Dabei sollte die 28S-Bande etwa doppelt so stark sein wie die 18S-Bande. In der anschließenden reversen Transkription wurden nur RNA-Proben mit entsprechender Qualität und ausreichender Quantität eingesetzt.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Durch die reverse Transkriptase wird die als Matrize dienende RNA, ausgehend von angelagerten Primern, zu einer komplementären, einzelsträngigen DNA umgeschrieben. Dabei wird durch die Verwendung von Poly-dT-Primern spezifisch die polyadenylierte mRNA transkribiert. Die so hergestellte cDNA (*copy DNA*) wurde für RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) eingesetzt. Die Qualitätskontrolle der synthetisierten cDNA wurde durch eine PCR für das Gen p53 durchgeführt. Dieses Gen ist in den meisten Geweben konstitutiv, aber gering abundant exprimiert. Für real time PCR (siehe 2.2.2.4) Analysen wurde die cDNA mit Hilfe von Random-Hexamer-Primern synthetisiert. Diese Primer bieten den Vorteil, dass sie an verschiedenen Stellen, die über das gesamte RNA Molekül verteilt sind, binden. Hierdurch wird auch nicht polyadenylierte RNA u.a. 18S- und 28S-RNA revers transkribiert, die später zur Normalisierung genutzt werden kann. Neben 18S-RNA wurde auch das HPRT Transkript (*hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase*) zur Normalisierung verwendet. Zur Herstellung der cDNA wurde ein 20µl Reaktionsansatz hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzte:

4µl	5x First Strand Synthesis Buffer
2µl	0,1M DTT
3µl	RNAse-freies Wasser
1µl	reverse Transkriptase
1µl	10µM dNTP
1µl	50µM poly-dT(18)Primer
1-8µl	RNA (bis zu 5µg)
	ad H ₂ O (RNAse-frei) bis zu 10µl

Die als Matrize dienende RNA wurde in entsprechender Konzentration in gekühlten Reaktionsgefäßen vorgelegt und mit Wasser, dNTPs und den entsprechenden Primern gemischt. Der Ansatz wurde für 3min bei 70°C denaturiert, wodurch die RNA anschließend linear und einzelsträngig vorlag. Die Proben wurden dann zur Abkühlung auf Eis gestellt, kurz abzentrifugiert und mit 10µl des Gemisches aus Dithiothreitol (DTT), Puffer, Wasser und reverser Transkriptase (Superscript II, Invitrogen, San Diego, CA) versetzt. Die eigentliche cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C für 60min. Ein anschließender Denaturierungsschritt bei 70°C für 15min führte zur Inaktivierung der reversen Transkriptase.

2.2.3.3 Polymerase Kettenreaktion

Mit Hilfe der PCR (*polymerase chain reaction*) ist die selektive Anreicherung definierter Nukleinsäuresequenzen aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen möglich (Mullis *et al.*, 1986). Durch den Einsatz von thermostabilen DNA-Polymerasen (Saiki *et al.*, 1988) ist eine automatisierte Durchführung der PCR in programmierbaren Thermoblöcken möglich. Im ersten Schritt wird die DNA-Matrize durch Hitzedenaturierung aufgeschmolzen. Hierdurch wird in einem zweiten Schritt die Bindung der Primer an ihre entsprechende Zielsequenz ermöglicht (Annealing). Von dem kurzen doppelsträngigen Bereich ausgehend wird im letzten Schritt der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'-3'Richtung synthetisiert (Elongation). Durch mehrfache Wiederholung dieser Reaktionsfolge wird eine exponentielle, selektive Anreicherung des gewünschten Transkripts erreicht. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierter Moleküle.

Die hohe Sensitivität der PCR erfordert die strikte Vermeidung von Kontaminationen durch DNA. Daher wurden verschiedene Maßnahmen zur Kontaminationsprophylaxe,

wie z.B. regelmäßige UV-Bestrahlung der PCR-Arbeitsplätze, Vermeidung der Benutzung jeglicher DNA am PCR-Arbeitsplatz und Verwendung von Pipettenspitzen mit Filtereinsatz zum Schutz vor Aerosol-Kontaminationen (Kwok und Higuchi, 1989), ergriffen.

Standardmäßig wurden zwei Oligonukleotid-Primer so gewählt, dass sie gegenläufig mit komplementären DNA-Strängen hybridisierten und das zu amplifizierende Genfragment eingrenzten. Als Ausgangsmaterial für die PCR wurden entweder 1-2µg Plasmid oder ca. 1µg synthetisierte cDNA verwendet. Für die Amplifizierung der DNA wurden drei verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt.

- Die *HotStarTaq* DNA Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* diente zur Etablierung der PCR und zur Amplifizierung sehr kurzer Sequenzen.
- Die *Pfu Ultra Hot Start* DNA Polymerase, deren Verwendung durch eine „proof reading“ Funktion zu einer geringeren Fehlerwahrscheinlichkeit führt, wurde für die Amplifizierung von Gensequenzen, die für die Klonierung rekombinanter Fusionskonstrukte bestimmt waren, verwendet.
- Die *ProofStart* DNA Polymerase, ebenfalls mit einer „proof reading“ Funktion ausgestattet, wurde dann verwendet, wenn die *Pfu Ultra Hot Start* kein spezifisches Amplifikat lieferte.

Zunächst erfolgte die Etablierung der spezifischen PCRs mit der *HotStarTaq* DNA Polymerase durch Variation von Zyklenzahl und Annealingtemperatur. Für die Amplifikation von DNA-Sequenzen für die Konstruktion von Fusionskonstrukten wurden die PCRs, nach erfolgreicher Etablierung mit den entsprechenden „proof reading“ Enzymen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Der Prototyp des Ablaufes der PCR-Reaktion war dabei wie folgt:

1. 95°C / 15min Aktivierung des Enzyms
2. 94°C / 1min Denaturierung
3. 55-70°C / 1min Annealingtemperatur abh. vom GC-Gehalt der Primer
4. 72°C / 1min Elongation
5. Wiederholung des Ablaufes für 35 Zyklen ab Schritt 2.
6. 72°C / 6min finale Elongation

Synthetisierte cDNA wurde nur dann als Ausgangsmaterial eingesetzt, wenn zuvor mit genspezifischen Primern für p53 eine hohe Expression nach 30 Zyklen nachgewiesen werden konnte.

2.2.3.4 Quantifizierung von eGFP-Transkripten mittels real time PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die real time PCR zur Quantifizierung von IVT-RNAs in Zellen eingesetzt und mit Hilfe des *ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systems* und Software (Applied Biosystems, Foster City, CA) durchgeführt.

Die real time RT-PCR erlaubt eine quantitative Echtzeitanalyse der PCR-Produkte über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Hierzu wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green genutzt, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Nach jedem PCR-Zyklus wird mittels lasergesteuerter Analyse die Menge an doppelsträngiger DNA mit interkaliertem SYBR-Green gemessen. Die Zyklusanzahl bei der das gemessene Fluoreszenzsignal einen vorgegebenen Schwellenwert übersteigt ergibt den Ct-Wert. Für die relative Quantifizierung der Transkriptmenge wird der Ct-Wert der Proben durch einen Abgleich mit dem Ct-Wert eines Kontrolltranskripts normalisiert. Vor der Durchführung einer real time RT-PCR wurden die Primer und die Amplifikationsbedingungen mittels einer konventionellen RT-PCR etabliert.

Für die Quantifizierung der IVT-RNAs wurden die transfizierten Zellen zu einem definierten Zeitpunkt geerntet. Die gesamte zelluläre RNA wurde extrahiert (2.2.2.1), mit Hexamer-Primern reverse transkribiert (2.2.2.2) und die erhaltene cDNA wurde in der real time RT-PCR eingesetzt. Die Reaktionen wurden in Triplikaten entsprechend den Vorgaben des Herstellers (SYBR-Green Kit; Qiagen, Hilden) angesetzt. 15µl des SYBR-Green MasterMixes, 5µl 1/10 verdünnte *first strand* cDNA und 300nM genspezifische *forward* und *reverse* Primer wurden in einem Gesamtvolumen von 30µl eingesetzt. 40 PCR-Zyklen mit 30s Denaturierung bei 95°C, 30s Annealing bei der entsprechenden Temperatur und 30s Elongation bei 72°C wurden durchgeführt. Als Kontrollen wurden PCRs spezifisch für 18S-RNA und HPRT durchgeführt, wodurch Unterschiede in der Quantität der eingesetzten cDNA ausgeglichen werden konnten.

2.2.3.5 Agarosegel zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Zur Auftrennung und Längenbestimmung von DNA-Molekülen wurden Agarosegele mit 1xTAE-Puffer und 2,5ppM Ethidiumbromid verwendet. Ethidiumbromid interkaliert in die GC-Paare von Nukleinsäuren, wodurch die DNA-Fragmente unter UV-Licht durch Abgabe von Fluoreszenzlicht sichtbar gemacht werden können. Der verwendete Agarosegehalt der Gele richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente und betrug 1-3% (w/v). Zusätzlich zu den Proben wurde ein geeigneter Längenstandard auf das Gel aufgetragen, um die Größe des DNA-Fragmentes nach der PCR bzw. Restriktionsverdau abschätzen zu können. Als Puffer für die Elektrophorese wurde 1xTAE verwendet.

Zur Kontrolle, ob die *in vitro* transkribierten mRNA Moleküle die gewünschte Länge aufwiesen erfolgte die Auftrennung über 1-2%ige Agarose Gele mit 1xMOPS. Vor dem Gießen des Gels wurde 37%iges Formaldehyd zugegeben, um die Bildung intramolekularer Sekundärstrukturen der RNA zu verhindern, bzw. aufzulösen. Die Proben wurden in Ethidiumbromidhaltigem Probenpuffer aufgenommen, für 10min bei 70°C denaturiert und anschließend über das vorbereitete Gel bei 120mA elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Längenbestimmung der RNA wurde zusätzlich ein geeigneter Längenstandard aufgetragen.

2.2.3.6 Amplifizierung und Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Fusionskonstrukte war es notwendig die entsprechenden Sequenzen mit authentischem ORF (*open reading frame*) zu klonieren. Zu diesem Zweck wurde die PCR mit der *PFU Ultra Hot Start* bzw. der *ProofStart* nach den Vorgaben des Herstellers und den angegebenen Primern (2.1.8.1) durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt enthielt flankierende Restriktionsschnittstellen, die für die Klonierung notwendig waren und über die Primer eingeführt worden waren. Zur Vorbereitung für die Klonierung wurde das PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das spezifische Fragment wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des *QiaQuick Gel Extraction Kit* (Qiagen) nach den Vorgaben des Herstellers aufgereinigt. Das Gelstück wurde mit dem dreifachen Gelvolumen Puffer QG versetzt, die Agarose bei einer Inkubationstemperatur von 50°C für 10min gelöst und die Lösung anschließend auf eine DNA-bindende Säule geladen. Durch einen ersten Waschschrift mit Puffer QG wurden

Agarosereste entfernt, während durch einen zweiten Waschschrift mit ethanolhaltigem Puffer PE Primerreste und Kontaminationen, z.B. durch nicht-inkorporierte Nukleotide, Salze und Enzyme entfernt wurden. Anschließend wurde die Säule trocken zentrifugiert und die gebundene DNA mit 30µl sterilem, deionisiertem Wasser eluiert. Qualitätskontrolle und Quantifizierung des aufgereinigten PCR-Produktes erfolgten durch Gelelektrophorese. Bis zur Klonierung wurden die DNA-Fragmente bei -20°C gelagert.

2.2.3.7 Herstellung transformationskompetenter Bakterien

Bakterien vom *E.coli* Stamm XL1-Blue MRF' (Promega) wurden auf LB-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. 200ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie angeimpft und bei 20°C und 250rpm bis zu einer optischen Dichte von 0,6 (bei 600nm) geschüttelt. Die Bakterien wurden nach 10minütigem Eisschock abzentrifugiert (600 x g, 4°C), das Sediment in 32ml Transformationspuffer resuspendiert und wieder für 10min auf Eis gestellt. Nach erneutem Abzentrifugieren (10min, 4°C, 600 x g) wurde das Sediment mit 8ml Transformationspuffer resuspendiert und mit 7% DMSO (Inoue *et al.*, 1990) versetzt. Diese Suspension wurde wieder 10min auf Eis gestellt, je 500µl in Kryo-Röhrchen (Nunc) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.3.8 Ligation und Transformation

Vor der Ligation der geschnittenen und aufgereinigten DNA-Fragmente wurden die für die Ligation bestimmten Vektoren ebenfalls einem Restriktionsverdau unterzogen und anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt. Die Selbstligation der Vektoren wurde dadurch verhindert, dass nach dem Restriktionsverdau die Vektoren durch Zugabe einer Phosphatase (*calv intestine alkaline phosphatase*, MBI Fermentas Burlington) dephosphoryliert wurden. Anschließend wurde das jeweilige Fragment in die vorbereiteten Vektoren mit kompatiblen Restriktionsschnittstellen ligiert. Dazu wurde das Insert zu Vektor Verhältnis auf 3:1 (mol/mol) eingestellt, um eine gute Ausbeute zu erreichen. Der Gesamtansatz für die Ligation betrug 10µl und enthielt 1µl Ligationspuffer und 1µl T4-Ligase. Der Ansatz wurde über Nacht bei 14°C oder für 2h bei 22°C inkubiert.

Für die Transformation des Ligationsansatzes in kompetente Bakterien wurden 100µl der frisch aufgetauten kompetenten XL-1Blue MRF' zu 5µl des Ligationsansatzes

gegeben und für 30min auf Eis inkubiert. Darauf folgte ein Hitzeschock für 45s bei 42°C, der ein kurzes Öffnen der Poren in der Zellmembran bewirkte und dadurch eine Aufnahme der DNA ermöglichte. Während einer anschließenden Erholungsphase in 450µl LB-Medium für 1h bei 37°C konnte die durch die Vektoren eingebrachte Antibiotikaresistenz ausgebildet werden. Ausplattiert wurden 100µl des Transformationsansatzes auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Selektionsantibiotikum entweder Ampicillin (Konz. 100µg/ml) oder Kanamycin (Konz. 25µg/ml). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.3.9 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterien

Kolonien, die auf den Agarplatten gewachsen waren wurden mit einer sterilen Spitze gepickt und in 3ml Selektionsmedium über Nacht auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wurde das *NucleoSpin Plasmid DNA Purification Kit* der Firma Macherey und Nagel verwendet. Dieses Verfahren basiert auf einer Lyse der Bakterien unter alkalischen Bedingungen und produziert hochreine und gering denaturierte Plasmid-DNA die sich gut zur Sequenzierung eignet (Birnboim und Doly, 1979). Den Vorgaben des Herstellers folgend wurden Bakterien zunächst pelletiert und in RNase-haltigem Puffer A1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte bei stark alkalischem pH in Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS). Durch SDS wurden Phospholipide und Proteine der Zellmembran solubilisiert und dadurch alle Zellbestandteile freigesetzt. Im nächsten Schritt wurde SDS durch Kaliumacetat präzipitiert. In dem Präzipitat sind unlösliche Bestandteile, wie denaturierte genomische DNA, denaturierte Proteine und Zelldebris enthalten. Die korrekt renaturierte Plasmid-DNA verbleibt in Lösung und kann nach Zentrifugation als Überstand abgenommen werden. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus dem Überstand erfolgte über unter hochmolaren Bedingungen DNA bindendes Säulenmaterial und anschließende Elution mit Aqua dest. Durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen wurden die Plasmide auf die erfolgreiche Ligation des PCR-Produktes hin überprüft und bei positivem Ergebnis zur Sequenzierung gegeben. Wurden größere Mengen Plasmid-DNA benötigt wurde das *Qiafilter Plasmid Maxi* oder *Mega Kit* verwendet.

2.2.3.10 Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen

Bei der photometrischen Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäurelösungen macht man sich die Eigenschaften der Biomoleküle das Licht bestimmter Wellenlängen zu absorbieren zu nutze. Nukleinsäuren besitzen bei Wellenlängen um 260nm ein Absorptionsmaximum, wohingegen die aromatischen Seitenketten einiger Aminosäuren Licht der Wellenlänge von 280nm absorbieren. Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung lässt sich mit Hilfe des Lambert Beer'schen Gesetzes errechnen. Dazu wird der Wert der Absorption bei 260nm, die Schichtdicke der verwendeten Quarzküvette, der Verdünnungsfaktor und ein für die Art der Probe spezifischer Faktor (40 für RNA, 50 für doppelsträngige DNA, 37 für einzelsträngige DNA und 20 für einzelsträngige Oligonukleotide) benötigt.

Die Reinheit der Nukleinsäurelösung wurde durch den Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ bestimmt. Dieser Wert sollte bei einer reinen, d.h. proteinfreien Lösung zwischen 1,8 und 2 betragen. Niedrigere Werte weisen auf eine Proteinkontamination hin, während höhere Werte auf eine Degradation der Nukleinsäuren schließen lassen.

2.2.3.11 Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA wurde für verschiedene Zwecke benötigt. Zum einen wie beschrieben für die Vorbereitung von Inserts und Vektoren zur Klonierung. Hierzu wurden 10µg DNA mit 10U der entsprechenden Restriktionsenzyme für 3h bei 37°C inkubiert. Zum zweiten zur Überprüfung der richtigen Orientierung und Länge von Inserts in neu hergestellten Plasmidkonstrukten. Für die Längenbestimmung eines Inserts wurden zwei Restriktionsenzyme ausgewählt, die jeweils nur einmal (*single cutter*) auf verschiedenen Seiten des Inserts in der MCS (*multiple cloning site*) des Vektors schneiden. Hierbei wurde darauf geachtet nur solche Enzyme auszuwählen, die nicht innerhalb des Insert schneiden. Es entstanden zwei DNA-Fragmente, eine Insertbande und eine Vektorbande. Anhand eines parallel aufgetragenen Längenstandards konnte die Länge des Inserts leicht abgelesen werden. Konnten nur solche Restriktionsenzyme ausgewählt werden, die auch innerhalb des Inserts schneiden wurden die entstanden Insertfragmente summiert. Nach ungerichteten Klonierungen musste außerdem die Orientierung des aufgenommenen Inserts bestimmt werden. Hierzu wurden die Restriktionsenzyme so ausgewählt, dass das einklonierte Insert asymmetrisch geschnitten wurde und sich dadurch die Orientierung im Plasmid

bestimmen ließ. Für einen analytischen Restriktionsenzymverdau wurde 1U Enzym pro 1µg DNA eingesetzt. Nach Zugabe des zum Enzym passenden 10x Puffers wurde der Ansatz mit Aqua dest. auf das gewünschte Gesamtvolumen (20-50µl) eingestellt und bei 37°C für 2h inkubiert.

2.2.3.12 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von einem kommerziellen Anbieter durchgeführt (MWG Biotech AG, Ebersberg).

2.2.3.13 Herstellung von IVT-RNA

Zur Herstellung von IVT-RNA wurden die Plasmide, die als Matrize für die *in vitro* Transkription dienen sollten, zunächst 3' vom poly(A) Schwanz linearisiert. Hierzu wurden die Plasmide für 4h bei 37°C mit den angegebenen Restriktionsenzymen verdaut. Vor der anschließenden Phenol-Chloroform-Fällung zur Inaktivierung und Entfernung der Restriktionsenzyme wurde die Vollständigkeit der Linearisierung auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Bei vollständig linearisierten Plasmiden wurde dem Restriktionsansatz ein Isovolumen eines Gemisches aus Phenol und Chloroform zugegeben und gründlich gemischt. Die Trennung in eine untere, organische Phase und in eine obere, wässrige Phase erfolgte durch eine kurze Zentrifugation bei 10.000 x g. Aufgrund ihrer hydrophilen Gruppen bleiben Nukleinsäuren in der oberen, wässrigen Phase gelöst, während Proteine zwischen den Phasen, in der sogenannten Interphase lokalisieren. Die wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend mit einem Isovolumen reinen Chloroforms gründlich gemischt, wodurch restliches Phenol abgetrennt wurde. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde erneut die DNA-haltige, wässrige Phase abgenommen und eine Natriumacetat-Ethanol Fällung durchgeführt. Die wässrige Lösung wurde auf 0,3M Natriumacetat eingestellt, mit dem zweifachen Volumen Ethanol versetzt und bei -20°C für 2h gefällt. Das Salz wird benötigt, um die Faltung der DNA zu vereinfachen, während das Ethanol gleichzeitig Wasser entzieht.

Zur Sedimentation der Nukleinsäuren erfolgte eine 45minütige Zentrifugation mit 10.000 x g bei 4°C. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit 70%igem Ethanol zur Entfernung von Salzen gewaschen und in einem geeigneten Volumen RNase-freiem Wasser aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte photometrisch

bei 260nm. Die Reinheit der DNA wurde durch die Bestimmung des OD260/280 Quotienten ermittelt. Im nächsten Schritt wurde 1µg der linearisierten und gereinigten DNA für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Hierzu wurde für die pST1-A120 abgeleiteten Vektoren das *mMessage mMachin* T7 *ultra Kit* (Ambion, Austin, Texas) nach Angaben des Herstellers verwendet. Während für die pGEM3Z basierten Plasmide das *mMessage mMachin* SP6 *Kit* des gleichen Herstellers eingesetzt wurde. In den beiden Kits sind jeweils unterschiedliche Cap-Analogen beigefügt.

Für die *in vitro* Transkription wurde ein Reaktionsansatz hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzte:

10µl	T7 2x dNTP/ARCA
2µl	10x T7 Puffer
1µl	linearisierte DNA (1µg/µl)
2µl	T7 Polymerase
<u>5µl</u>	<u>RNAse freies Aqua dest.</u>
20µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde für 2h bei 37°C inkubiert. Für die Transkription binden die Polymerasen an ihre T7- bzw. SP6-Erkennungssequenzen, die 5' von dem zu transkribierenden ORF liegen und synthetisieren den komplementären RNA-Strang.

Durch Einbau von CY3- und Cy5-konjugierten Nukleotiden während der *in vitro* Transkription kann fluoreszenzmarkierte RNA hergestellt werden.

Für die *in vitro* Transkription fluoreszenzmarkierter RNA wurde ein Reaktionsansatz hergestellt, der sich wie folgt zusammensetzte:

2µl	Reaktionspuffer
6µl	25 mM ATP/CTP/GTP Stammlösung
2µl	50 mM UTP Stammlösung
1µl	linearisierte DNA (1µg/µl)
6µl	Cy3 bzw.5 UTP Lösung
2µl	T7 Enzyme mixt
<u>1µl</u>	<u>RNAse freies Aqua dest.</u>
20µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde für 4-6 h inkubiert.

Zur Entfernung von Nukleotiden, kurzen Oligonukleotiden, Proteinen und Salzen aus der Transkriptionsreaktion wurde das *MegaClear Kit* (Ambion, Austin, Texas)

verwendet. Die Aufreinigung der IVT-RNA erfolgt in drei Schritten. Im ersten Schritt wurde die IVT-RNA nach Zugabe von Bindungspufferkonzentrat und Ethanol an eine Silikamembran gebunden. Im zweiten Schritt wurden Kontaminationen durch mehrmaliges Waschen entfernt und im dritten Schritt erfolgt schließlich die Elution durch einen Puffer mit niedriger Salzkonzentration.

Der Bindungspuffer wird zugegeben, um die optimale Salzkonzentration zu erreichen, die für eine Bindung der RNA an die Silikamembran notwendig ist, während durch die Zugabe von Ethanol der Hydrathülle der RNA Wasser entzogen wird. Die Qualitätskontrolle und die Quantifizierung erfolgten sowohl gelelektrophoretisch als auch photometrisch.

Die so gewonnene und qualitäts- sowie quantitativ kontrollierte RNA wurde anschließend zur Elektroporation oder für die intranodale Injektion aufkonzentriert eingesetzt, oder bei -80°C gelagert.

Für die Aufkonzentrierung der RNA erfolgt eine Fällung mit 5M Ammonium Acetat und 100% Ethanol für 30min bei -20°C . Nach Zentrifugation (13000rpm, 15min bei 4°C oder RT) und Waschen mit 70% Ethanol sowie erneuter Zentrifugation wird die RNA getrocknet und in 50 μl RNase freiem Wasser aufgenommen und gelöst.

Die Konzentration der so aufkonzentrierten RNA lag zwischen 3 und 6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.2.3.14 Vektorkonstruktion

IVT-Konstrukte waren auf dem pST1-A120 Vektor basiert, der ein vom pCMV-Script-Plasmid (Stratagene) abgeleiteter Vektor ist. Dieser enthält einen T7 Promotor, ein 120 bp langen poly(A) tail, eine 3' β -globin UTR und ein Neomycin-Resistenz Gen. In diesen Vektor wurde ein MHC-Klasse-I-Signalpeptid (78bp, Sec) und eine Transmembran- sowie zytoplasmatische-Domäne eines HLA-B Moleküls mit Stop-Codon (MITD, 168 bp) eingeführt. Beide Inserts wurden aus aktivierten PBMC amplifiziert. Der pSTI-eGFP-Vektor wurde durch Klonierung eines BamHI-eGFP-Fragments generiert, welches aus dem peGFP-C1 Vektor amplifiziert wurde. Für die Generierung der pp65 und pp65-MITD Konstrukte wurde die komplette kodierende Sequenz von HCMV UL83 (pp65) aus HCMV-infizierten Fibroblastenlysat (BioWhitaker) mit und ohne Stop-Codon amplifiziert und in den entsprechenden Vektoren inkloniert.

Zur Generierung der Influenza Virus Hemagglutinin-A (InfHA) Konstrukte wurde die komplette, vom Influenza Stamm A/PR/8/34 (H1N1) abgeleitete, kodierende Sequenz

(1698 bp) aus einer stabil transfizierten A20-HA Zelllinie amplifiziert (A20-HA Zellen zur Verfügung gestellt von U. Hartwig, Universität Mainz) und in den pST1-A120 Vektor kloniert. Die sekretierte Variante HA Δ TM wurde durch Deletion der Transmembrandomäne von InfHA generiert, um ein 1587bp langes (aa 1-529) 3'-trunkiertes Fragment zu erhalten. Die Ligation des MITD Fragment in den HA Δ TM Vektor resultierte in dem HA-MITD Konstrukt.

Um das pST1-Influenza-HA-MHCI(HA-TM_{MHCI}) zu generieren, wurden ein MHC-Klasse-I-Signalpeptid (78bp, Sec) und eine Transmembran- sowie zytoplasmatische-Domäne eines HLA-B Moleküls mit Stop-Codon (MITD, 168bp) am 3' des trunkierten InfHA Fragments eingeführt (siehe Abb. 2.3).

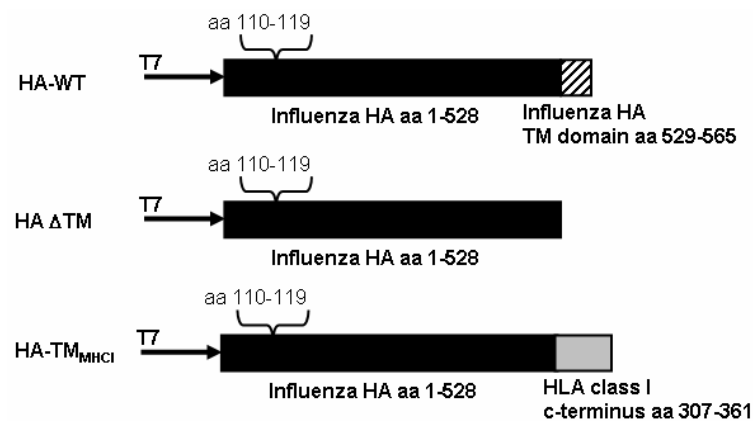


Abb. 2.3: Schematische Darstellung der HA-TM_{MHCI}, HA Δ TM und HA-WT Konstrukte. T7: T7-Promotor; HA-WT: InfHA Wildtyp; HA Δ TM: InfHA ohne Transmembrandomäne; HA-TM_{MHCI}: InfHA mit humanisierter Transmembran- und zytoplasmatischer Domäne eines HLA-B Moleküls.

Das optimierte pSTI-Influenza-HA-MHCI (InfHA_{opt}) Konstrukt wurde hergestellt durch die Insertion einer Codon-optimierten Sequenz (aa 60-285), fusioniert mit einer InfHA kodierenden Sequenz (Influenza strain A/PR/8/34; aa 518-526), welche in den pSTI-MHC-I backbone einkloniert wurde (siehe Abb. 2.4).

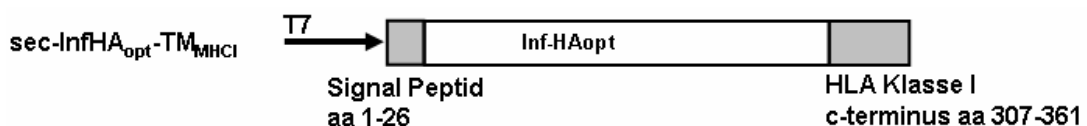


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des InfHA_{opt} Konstruktes. T7-Promotor; 3'-MHC-Klasse-I-Signalpeptid, optimierte InfHA Sequenz, 5'-humanisierte Transmembran- und zytoplasmatische Domäne eines HLA-B Moleküls.

Analog dazu wurde die Ovalbuminsequenz bp 766-801 (aa 256-267) und die Glykoprotein (gp70)-Sequenz bp 1351-1395 (aa 451-466), welche durch eine BamHI Schnittstelle flankiert war, synthetisiert und in die passenden Vektor-backbones kloniert.

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 Durchflußzytometrie

2.2.3.1.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Im Durchflußzytometer können Zellen auf morphologische Eigenschaften (Größe, Granularität und Integrität der Zellmembran), sowie nach Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz, auf die Expression von intrazellulären und Oberflächenproteinen untersucht werden. Das Gemisch der fluoreszenzmarkierten Zellen wird in einem Durchflußzytometer (FACS-Gerät, *fluorescence activated cell scanner*) durch eine Kapillare gedrückt. Dadurch entsteht ein Strom einzelner Zellen, der nacheinander zwei Laserstrahlen, einen 488nm Argonlaser und einen 635nm Diodenlaser, passiert. An den Zellen kommt es zu einer Lichtstreuung und die Fluorochrome werden zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt. Photodetektoren messen sowohl das gestreute, als auch das emittierte Licht. Ersteres liefert Informationen über die Größe und Granularität der Zellen. Die Messung der Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung der mit Fluoreszenzfarbstoffen-markierten Antikörper und damit über die Expression der interessierenden Proteine in und auf jeder Zelle. Das in geringem Winkel gestreute und mit der Größe der Zellen korrelierende Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*, FSC) bezeichnet. Das um 90° gestreute und mit der Granularität der Zelloberfläche korrelierende Licht heißt Seitwärtsstreuung (*side scatter*, SSC).

FSC- und SSC-Signale wurden mit linearer, Fluoreszenzsignale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Die Daten wurden mit dem Programm *Cell Quest Pro* (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert. Sie wurden entweder als eindimensionale Histogramme, die nur ein Fluoreszenzsignal zeigen, oder als zweidimensionale Punktfeld-Graphen (*Dot plots*), bei welchen für jede Zelle zwei Parameter gezeigt werden können, dargestellt. Die Expressionsdichte des fluoreszenzmarkierten Antigens wurde durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) quantifiziert.

2.2.3.1.2 Färbung von Oberflächenmarkern

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich einzelne Zellen oder Zellpopulationen aus einer heterogenen Zellpopulation analysieren. Dabei können spezielle Eigenschaften der Zellen identifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden. Dazu wurden spezifische Fluorochrom-markierte Antikörper verwendet, die an Oberflächenproteine binden.

Es wurden 5×10^5 - 1×10^6 Zellen aus dem Blut, Lymphknoten oder der Milz mit PBS gewaschen, in $100 \mu\text{l}$ PBS und 1 - $3 \mu\text{l}$ konjugiertem Antikörper aufgenommen und 30min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Zellen in $400 \mu\text{l}$ PBS oder FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer (FACScan, BD, Heidelberg, Germany) analysiert. Falls nicht anders angegeben, wurden alle Antikörper von Pharmingen (Heidelberg, Germany) bezogen.

Zur Erfassung der toten Zellen wird der Ansatz mit $0,3 \mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid Endkonzentration versetzt. Propidiumiodid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, der aus intakten Zellen nach Eindiffusion wieder hinaus transportiert werden kann. Bei toten Zellen kann der Farbstoff durch die geschädigte Zellmembran in die Zelle gelangen und die abgestorbenen Zellen anfärben.

2.2.3.2 Tetramerfärbung

Eine direkte strukturbasierte Quantifizierung antigenspezifischer Lymphozyten ist durch die vor kurzem entwickelte Tetramertechnologie möglich. Hierzu werden T-Zell-Populationen mit fluoreszenzfarbstoffmarkierten Multimeren aus MHC-Peptid-Komplexen angefärbt und anschließend im Durchflusszytometer quantifiziert (Pittet *et al.*, 2001). Durch die Kombination von MHC-Peptid-Komplexen mit der gleichzeitigen Färbung von membranständigen Zellmarkern wird zudem eine genaue Analyse des Phänotyps detektierter T-Zellen möglich.

Antigenspezifische CD8^+ T-Zellen wurden *ex vivo* mittels Tetramertechnik quantitativ bestimmt. Tetramere bestehen aus vier MHC-Klasse-I-Molekülen, welche das antigenspezifische Peptid tragen. Die MHC-Moleküle sind miteinander verbunden und mit APC konjugiert.

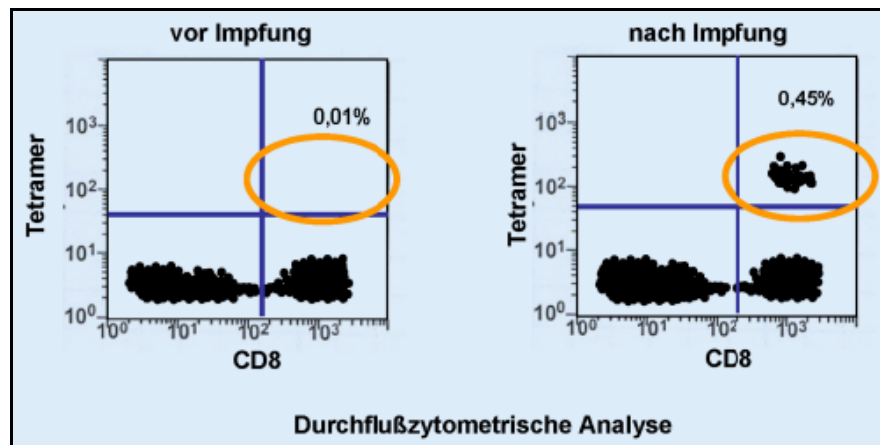


Abb. 2.5: Beispiel der Analyse mit MHC-Peptid-Tetrameren. Nach Immuntherapie lassen sich antigenspezifische T-Zellen nachweisen, deren Frequenz vor der Immuntherapie noch unter der Nachweisgrenze der angewandten Methode lag. (Entnommen aus: Sahin, 2005).

Für die Tetramerfärbung wurde sowohl für Blut, Lymphknoten oder Milz $0,5-1 \times 10^6$ Zellen pro Färbung eingesetzt. Für die Dreifach-Färbung wurden $4 \mu\text{l}$ Tetramere mit den Antikörpern $\alpha\text{-CD8}^+\text{-FITC}$ und $\alpha\text{-CD62-PE}$ (jeweils $1-2 \mu\text{l}$) eingesetzt. Nach Inkubation für 30min wurden die Zellen zweimal gewaschen und in $500 \mu\text{l}$ FACS-Puffer aufgenommen und innerhalb einer Stunde im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.3.3 Cytometric Bead Array (CBA) zur Bestimmung der Konzentration von Zytokinen

Mittels CBA-Test können in biologischen Flüssigkeiten mehrere Zytokine gleichzeitig mit dem Durchflusszytometer quantifiziert werden. Mit Hilfe des im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Tests ist es möglich, die murinen Zytokine IL-2, IL-4, IL-5, TNF- α und IFN- γ in einem Konzentrationsbereich von 20 bis 5000pg/ml nachzuweisen.

Das Testsystem besteht aus zwei Komponenten, einer Partikelsuspension, die als *Catcher*-Reagenz eingesetzt wird und einer Antikörperlösung, die als Indikator-Reagenz eingesetzt wird.

Die Partikelsuspension setzt sich aus fünf unterschiedlich stark fluoreszierenden Populationen von „beads“ zusammen, die mit der mittels Detektor FL3 gemessenen Fluoreszenz differenzierbar sind. Alle „beads“ einer durch ihre Fluoreszenz definierten Population besitzen einen anderen Zytokin-spezifischen *Catcher*-Antikörper auf ihrer Oberfläche. Die Indikator-Reagenz besteht aus fünf unterschiedlichen Zytokin-spezifischen Phykoerythrin-konjugierten Antikörpern, die die von den „beads“ eingefangenen Zytokine markieren. Die mit dem Detektor FL2 gemessene mittlere

Fluoreszenz-Intensität jeder *bead*-Population ist proportional zur Menge der gebundenen Indikator-Antikörper und damit zur Dichte der Zytokine auf der Oberfläche der „*beads*“.

Durchführung (nach Anleitung im CBA-Testsystem, alle benötigten Reagenzien sind im Test-Kit enthalten):

- pro Reaktionsgefäß werden jeweils 10µl der fünf verschiedenen *bead*-Suspension miteinander gemischt.
- für die Standardkurve werden jeweils 50µl der Verdünnungsstufen des Zytokin-Standards (0pg/ml, 20pg/ml, 40pg/ml, 80pg/ml, 156pg/ml, 312pg/ml, 625pg/ml, 1250 pg/ml, 5000pg/ml; die Konzentration bezieht sich auf jedes der fünf verschiedenen Zytokine) pro 50µl *bead*-Suspension hinzugefügt.
- 50µl der unverdünnten, unbekannt Probe werden ebenfalls mit 50µl *bead*-Suspension gemischt.
- anschließend wird in jedes Reaktionsgefäß 50µl Detektions-Reagenz pipettiert.
- Inkubation für 2h, im Dunkeln.
- pro Reaktionsgefäß werden 1ml Waschpuffer hinzugefügt und 5min lang bei 200 x g zentrifugiert.
- das Sediment wird in 300µl Waschpuffer aufgenommen.

Anschließend können die Proben mit dem Durchflusszytometer, das zuvor, wie in der Anleitung beschrieben, eingestellt wird, gemessen werden. Die Auswertung der Daten erfolgt mit der CBA-Software.

2.2.3.4 IFN- γ ELISpot (enzyme-linked immunospot)

Im ELISPOT wird die IFN- γ -Sekretion einer einzelnen Zelle sichtbar gemacht. Die Methode beruht auf dem Prinzip des einfachen Sandwich-ELISA mit dem Unterschied, dass anstatt einer flüssigen Probe, lebende Zellen auf eine mit anti-IFN- γ -Antikörper („*coating*“-Antikörper) beschichtete Oberfläche gegeben und so für kurze Zeit kultiviert werden.

Wird von den eingesetzten Zellen IFN- γ sezerniert, so bindet dieses an die o.g. Antikörper und kann später durch Zugabe eines sekundären, biotinylierten anti-IFN- γ -Antikörpers sichtbar gemacht werden. Der anschließend zugegebene Avidin-Peroxidase Komplex bindet an das Biotin und führt nach Zugabe der Substrat-Lösung zu einer Farbreaktion. Eine IFN- γ -sezernierende Zelle wird somit als roter Punkt („*spot*“) auf der Oberfläche sichtbar.

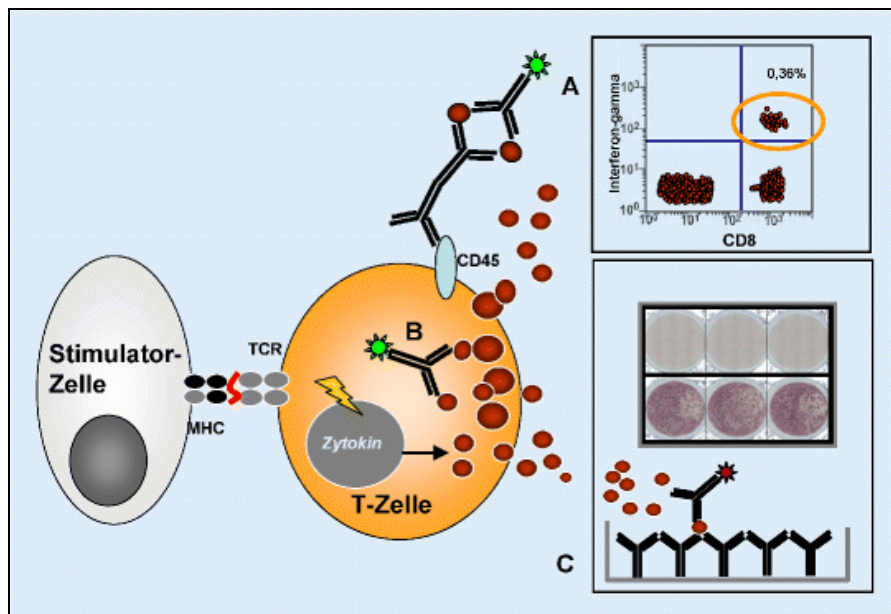


Abb. 2.6: In vitro Funktionstest zum T-Zell-Immunitest. A) Zytokinsekretionsassay, B) Intrazelluläre Färbung von Zytokinen sowie C) Spotassays. (Entnommen aus: Sahin, 2005).

Zur Vorbereitung des Assays wurde zunächst eine 96 well ELISPOT-Platte ü.N. mit 50µl/well „coating“-Antikörper AN18 (Verdünnung mit PBS 1:1000) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit jeweils 150µl PBS/well gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurde vor Zugabe der zu untersuchenden Zellen 150µl Blockierungsmedium in jedes well gegeben und die Platte anschließend für 1h bei 37°C inkubiert. Effektorzellen und Targets wurden auf die richtige Zellenzahl eingestellt und in die Platte eingebracht. Anschließend wurde die Platte ü.N. bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte durch sechsmaliges Eintauchen in ein Gefäß mit 4L Waschpuffer und anschließendes Abdekantieren der Flüssigkeit gewaschen. Nachfolgend wurde in jedes Well 100µl des biotinylierten, sekundären Antikörpers R4-6A2 Biotin (Endkonzentration 1µg/ml) pipettiert und anschließend erneut für 2h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach sechsmaligem Waschen wurde dann pro Well 100µl Avidin-Peroxidase-Komplex, welche an das Biotin des zweiten Antikörper binden kann, zugegeben (Endkonzentration 1µg/ml). Der Avidin-Peroxidase-Komplex wurde zuvor durch eine 30min lange Inkubation mit einem Tropfen der Lösung A und einem Tropfen der Lösung B des *Elite ABC Standard Kits* der Firma Vectastain in 10ml PBS/TWEEN 0,1% angesetzt.

Nach einstündiger Inkubation bei RT wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer und anschließend noch dreimal mit PBS gewaschen. Dann wurde zur Entwicklung der Platte

100µl Substratlösung (AEC) pro well zugegeben. Nach 15min wurde die Platte unter fließendem Leitungswasser abgewaschen, getrocknet und im Reader ausgewertet.

2.2.3.5 Alkalische Phosphatase-Anti-Alkalische Phosphatase (APAAP)-Färbung von Mausorganen

Bei der APAAP-Methode werden lösliche Enzym-Immunkomplexe zur Signalverstärkung und damit zur Erhöhung der Sensitivität eingesetzt. Die Immunkomplexe bestehen aus alkalischer Phosphatase und anti-alkalischer Phosphatase-Antikörpern. Je zwei Moleküle Enzym sind an einen Antikörper gebunden und nutzen das natürliche Verhältnis von Antikörper zu Antigen (in diesem Falle Antigen = Enzym) im Gegensatz zur chemischen Konjugation.

Bei dieser Methode werden drei Antikörperlösungen eingesetzt (siehe Abb. 2.5):

1. der Primär-Antikörper
2. der Brücken-Antikörper, = Sekundärantikörper, = Anti-Antikörper
 - er verbindet den Primär-Antikörper mit dem APAAP-Komplex, muß also gegen Igs der Spezies gerichtet sein, aus dem Primär-Antikörper und die im Enzym-Immunkomplex befindlichen Antikörper stammen.
 - er muss im Überschuss zugegeben werden, damit eine Antigenbindungsstelle an den Primär-Antikörper bindet und die andere Antigenbindungsstelle zur Bindung des APAAP-Komplexes "übrig" bleibt.
3. der APAAP-Komplex = Enzym-Immunkomplex, die hier eingesetzten Antikörper stammen aus derselben Spezies wie der Primär-Antikörper

Anschließend wird durch eine Enzym-Substrat-Reaktion eine Färbung zum sichtbaren Nachweis erreicht. Die gebräuchlichsten Methoden hierbei sind die Entwicklung der alkalischen Phosphatase mittels Fast Red, Fast Blue B oder NBT/BCIP.

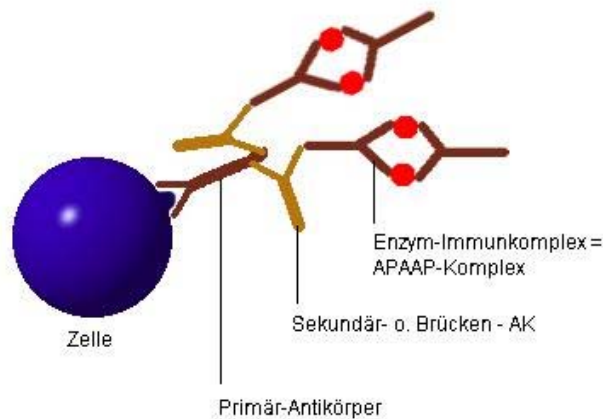


Abb. 2.7: Prinzip der APAAP-Färbung. Erläuterung siehe Text.

Am Gefrierkrotom wurden Schnitte (5-6µm) angefertigt, ü.N. bei RT oder bei 37°C getrocknet und in eiskaltem Aceton fixiert. Die Schnitte können für spätere Färbung bei -80°C trocken gelagert werden.

Die aufgetauten und luftgetrockneten Schnitte wurden 10min bei RT in Aceton fixiert, erneut luftgetrocknet. Alle folgenden Schritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Durch 30minütige Inkubation mit Blocking-Puffer erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Der Blocking-Puffer wurde abgenommen und durch primären AK ersetzt. Nach Inkubation für 2h bei RT oder ü.N. bei 4°C wurde einmal mit TBS gewaschen und dann der Brückenantikörper im Überschuss (1:50) für 30min zugegeben. Nach einem weiteren Waschschrift mit TBS wurde der APAAP-Komplex (1:50) für 30min zugegeben und anschließend erneut gewaschen.

Zur Verstärkung kann die Inkubation mit Brücken-Antikörper und APAAP-Komplex für 15min wiederholt werden, wonach noch einmal für 5min gewaschen wird. Es folgt eine 20minütige Inkubation mit APAAP-Färbelösung. Wieder wird gewaschen und 60sec zur Gegenfärbung mit Hämalaun-Lösung gefärbt. Die Präparate werden 10min unter fließendem Wasser gewaschen, getrocknet und mit Aquatex eingedeckt. Unter dem Lichtmikroskop erscheinen APAAP-positive Zellen deutlich rot.

2.2.3.6 *In vivo* Zytotoxizitätstest

Dieses Testsystem erlaubt den Nachweis spezifischer zytotoxischer T-Zellen direkt im Tier (Oehen *et al.*, 1998). Stark fluoreszenzmarkierte, mit dem spezifischen Antigen beladene Zielzellen und als Vergleichspopulation eine schwächer fluoreszenzmarkierte Zellfraktion, die mit einem irrelevanten Antigen beladen sind, werden adoptiv in einem

Zellzahl-Verhältnis von 1:1 in das Tier transferiert. Nach 12-16h wird die Milz aus dem Tier präpariert und die Milzzellen werden auf das Vorhandensein der entsprechenden fluoreszenzmarkierten, transferierten Zellen analysiert. Findet eine Lyse der mit dem spezifischen Antigen beladenen Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen im Tier statt, sollte diese Zellpopulation im Vergleich zu der Kontrollpopulationen in einem geringeren Verhältnis detektiert werden. Für den adoptiven Transfer wurden Milzzellen aus Mäusen des entsprechenden, passenden genetischen Hintergrundes isoliert (siehe 2.2.1.5). Nach der Erythrozytenlyse und einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 30ml T-Zellmedium resuspendiert und in zwei gleiche Fraktionen zu jeweils 10-20ml aufgeteilt. Die Zellzahl je Fraktion sollte $1-5 \times 10^8$ Zellen nicht überschreiten; bei größeren Zellzahlen wurde das Resuspendierungsvolumen entsprechend erhöht. Zur ersten Fraktion wurden $10 \mu\text{M}$ Endkonzentration eines irrelevanten Antigens (Peptides) zugegeben und in die zweite Fraktion $10 \mu\text{M}$ Endkonzentration des entsprechenden spezifischen Antigens (Peptides). Die Zellen wurden mit angeschraubtem Deckel für 2-3h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert und zweimal gründlich mit PBS gewaschen, um die Antigene wieder vollständig zu entfernen. Für die Fluoreszenzmarkierung der Zellpopulationen mit CFSE (siehe 2.2.1.10) wurden die Zellen in dem entsprechenden Volumen Medium aufgenommen. Die Endkonzentration an CFSE für die mit dem irrelevanten Antigen beladenen Zellen beträgt $0,5 \mu\text{M}$ und für die mit dem spezifischen Antigen beladenen Zellen $5 \mu\text{M}$ im Markierungsansatz. Nach der Markierung wurden die Zellen zusätzlich zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl wurde dann so eingestellt, dass 1×10^7 Zellen je Population (d.h. 2×10^7 Gesamtzellen) in $200 \mu\text{l}$ PBS je Tier adoptiv transferiert werden konnten. 16h nach dem Transfer werden die Milzzellen aus dem Tier isoliert und mittels Durchflußzytometrie analysiert. FL1 wurde für die lebenden Zellen aufgenommen, so dass die zwei CFSE markierten Populationen deutlich dargestellt werden konnten (Aufnahme ca. 50.000 lebende CFSE-markierte Zellen). Die Auswertung erfolgte mittels Darstellung im Histogramm für FL1. Die prozentualen Verhältnisse der verschiedenen Zellpopulationen wurden bestimmt; M1 gibt die mit dem spezifischen Antigen beladene und mit $5 \mu\text{M}$ CFSE markierte Zellfraktion an, M2 stellt die mit dem irrelevanten Antigen beladene und mit $0,5 \mu\text{M}$ CFSE markierte Zellfraktion dar. Die spezifische Lyse wurde nach folgender Berechnung ermittelt: Spezifische Lyse (%) = $(1 - (M1 (\%) / M2 (\%))) \times 100$

2.2.3.7 $^3\text{[H]}$ -Thymidin-Proliferationstest

$^3\text{[H]}$ -Thymidin wird von Zellen ausschließlich als Baustein für die DNA-Synthese verwendet. Damit lässt der Einbau des Nukleotids in das Genom Rückschlüsse auf die Proliferationsaktivität zu. Die inkorporierte Radioaktivität wurde durch eine indirekte Gasentladungsmethode gemessen. Das über die mit Tritium markierte Probe hinwegströmende Edelgas Helium wird in einem elektrischen Feld durch die beta-Strahlen ionisiert. Die daraus resultierende Entladung wird als eine vom Messgerät abhängige Zählrate in counts per minute (cpm) registriert.

Die Zellen bzw. die Zellpopulation wurden entsprechend der unterschiedlichen Protokolle vorkultiviert oder direkt nach der Aufarbeitung als Triplikate auf 96-Napf-Platten (Flachboden, Abdeckplatte, TC-Qualität) in Medium ausplattiert.

2×10^5 Responderzellen (CD4^+ T-Zellen)/Well wurden mit jeweils 1×10^5 Stimulationzellen (DC) in einer 96-well-Platte koinkubiert. Die Stimulation der CD4^+ T-Zellen mit PMA/Ionomycin diente als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurden zum einen unstimulierte CD4^+ T-Zellen und zum anderen durch mit irrelevanter RNA transfizierte DC stimulierte CD4^+ T-Zellen eingesetzt. Die Thymidin-Inkorporation wurde am Tag 3, 5 und 7 nach einer 16stündigen Inkubation mit $^3\text{[H]}$ -Thymidin ($0,5 \mu\text{Ci/well}$) im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

Nach 2, 4 oder 6 Tagen wurde die $^3\text{[H]}$ -Thymidinlösung zugegeben (jeder Napf $30 \mu\text{l} = 0,5 \mu\text{Ci}$). Nach 24stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten bei -20°C eingefroren. Letzteres diente dem Abstoppen der Reaktion und dem Zellaufschluss, der die Freisetzung der DNA bewirkte.

Nach dem Auftauen wurden die Lysate mit Hilfe eines Harvesters auf einen Glasfaserfilter überführt. Die DNA bleibt auf dem Filter zurück, während ungebundenes $^3\text{[H]}$ -Thymidin herausgewaschen wurde. Die Filtermatte wurde nach dem Abtrocknen in Szintilationswachs eingeschmolzen, und im Szintillationszähler gemessen.

Als Maß für die Proliferation wurden *counts per minute* (cpm) angegeben, welche die Menge des eingebauten Thymidins repräsentieren.

2.2.3.8 *In vivo* Proliferationsassay

Die Fähigkeit transgener T-Zellen, nach Antigenstimulation durch intranodale Injektion von RNA zu proliferieren, wurde mittels CFSE-Markierung untersucht. Nach bestimmter Zeit wurden die Milz und Lymphknoten herauspräpariert und eine Zellsuspension

daraus hergestellt. Nach dem Waschen wurden die Zellen gezählt, mit Fluorochrom-konjugierten anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörpern markiert und im FACSCalibur-Durchflußzytometer analysiert.

Das *tracking* dieser transgenen T-Zellen erfolgte durch Nutzung des Konzeptes varianter Thy1.1 und Thy1.2 Allele zwischen transferierten T-Zellen und Empfängermausen (siehe Abb. 2.6).

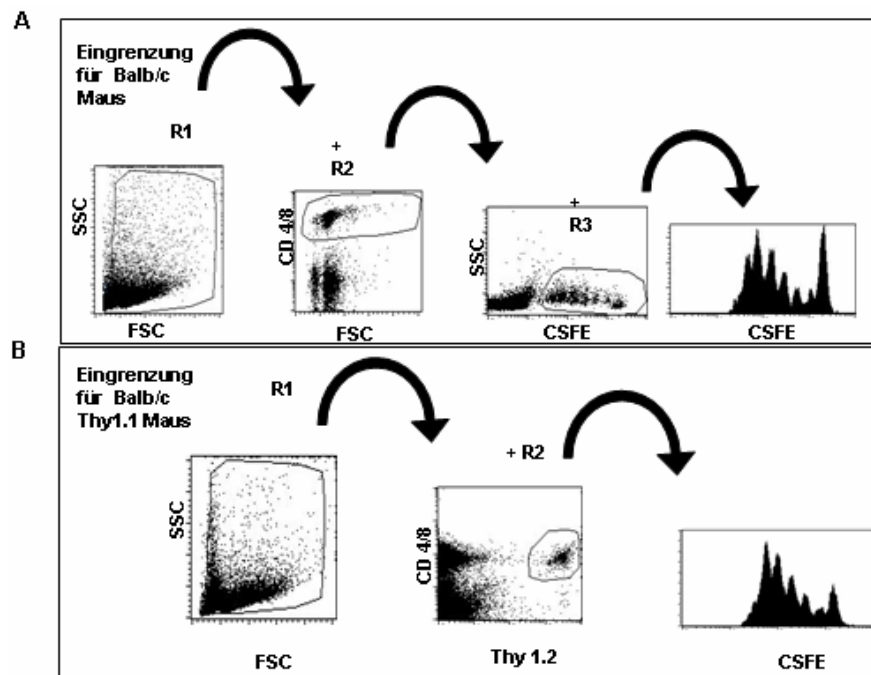


Abb. 2.8: Prinzip der durchflusszytometrischen Analyse der *in vivo* Proliferation. **A)** Die Zellen wurden über CD4/8 und CSFE-positive Zellen eingegrenzt. **B)** Die CSFE-positiven, proliferierende Zellen wurden über CD4/8 und Thy1.2 eingegrenzt.

2.2.4 Tierexperimentellen Methoden

2.2.4.1 Direkte DNA/RNA/Peptid-Injektion in den Lymphknoten

Die Maus wurde durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von Ketamine und Xylazine betäubt. Durch einen Einschnitt in der inguinale Hautfalte und anschließende Erweiterung mit der Schere war der Lymphknoten (LK) deutlich zu erkennen, da er sich aufgrund seiner dursichtigen Farbe vom umgebenden Fettgewebe deutlich unterschied. Zusätzlich war meistens das den LK versorgende Blutgefäß zu erkennen. Nach visueller Lokalisierung des LK konnten 7-10µl Vakzinformulierung injiziert werden, wodurch ein Anschwellen des LK verursacht wurde. Der Hautschnitt wurde anschließend mit Michel Wundklammern verschlossen.

2.2.4.2 Betäubung der Mäuse mit Ketamine/Xylazin

Um Mäuse über einen Zeitraum von mehr als 2 Stunden zu narkotisieren, wurde das Narkosegemisch Ketamine/Xylazin eingesetzt. Das Ketamine und das Xylazin wurden in sterilem PBS gelöst. Das Mischungsverhältnis betrug 98% Ketamine (15%) und 2% Xylazin (9%). Für die Betaübung wurden pro Maus von dem Betaübungscocktail 100-200µl i.p. mit einer Insulinspritze injiziert.

2.2.4.3 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte retroorbital mit einer 3mm Glaskapillare, welche mit Heparin beschichtet war. Das Blut wurde in ein 1,5ml Reaktionsgefäße (Facs Tube), in dem 2,5U Heparin vorgelegt waren, aufgefangen und auf Eis gestellt. Zur Plasmagewinnung wurde das gewonnene Blut für 2min bei 8000rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Das Plasma wurde bei -80°C gelagert.

2.2.4.4 Adoptiver Transfer von Zellen

Die zu injizierenden Zellen wurden in sterilem PBS aufgenommen. Die Mäuse wurden in Messingröhren so fixiert, dass ihr Schwanz zugänglich war. Der Schwanz wurde für ca. 30s in warmes Wasser gehalten, oder für ca. 1min mit Rotlicht bestrahlt, um die Durchblutung der lateralen Schwanzvenen zu verstärken. Anschließend wurden $0,5 \cdot 10^7$ Zellen in 200µl PBS in die Schwanzvene injiziert.

2.2.4.5 Subkutane Injektion von Tumorzellen

Die Tumorzellen wurden nach dem Ablösen aus der Zellkulturflasche zweimal in PBS gewaschen, anschließend gezählt und auf die zu injizierende Zellzahl/100µl PBS eingestellt. Die hergestellte Zellsuspension wurde subkutan in die rechte oder linke Flanke der Maus injiziert. Die Tumorgöße (Länge in mm x Breite der Tumore in mm) wurde dreimal wöchentlich mit Hilfe einer Schieblehre gemessen. Als Abbruchkriterium für einen Versuch galt das Erreichen oder Überschreiten einer Tumorgöße von 225 mm² (siehe Abb. 2.9).

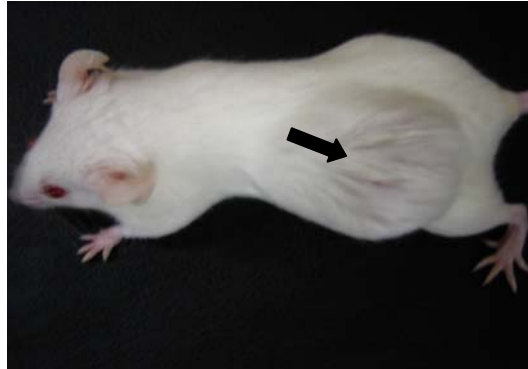


Abb. 2.9: Balb/c Mäuse mit subkutan wachsendem A20 Tumormodell.

2.2.4.6 Statistische Analysen von Überlebenskurven

Die Überlebensrate der Tiere der einzelnen Versuchsgruppen wurde nach dem Tag der Challenge dokumentiert. Zur statistischen Analyse und zur graphischen Darstellung der ermittelten Versuchsergebnisse wurde das Computerprogramm GraphPad™ Software, Version 2.01 für MS Windows 3.1, der Firma GraphPad™ Software Inc. verwendet.

Die Überlebenszeit der Versuchstiere wurde in Form von Kaplan-Meier-Diagrammen dokumentiert, in denen die Überlebensrate der Tiere gegen die Zeit aufgetragen wurde. Die Wirksamkeit der Vakzine kann nur im Vergleich zu den Tieren einer Kontrollgruppe beurteilt werden, in denen ebenfalls das Tumorstadium induziert wurde, die als Behandlung jedoch nur PBS erhielten. Die Tiere aller anderen Gruppen wurden mit dieser Gruppe verglichen.

Für den statistischen Vergleich wird der logrank-Test angewendet. Mit diesem Test kann ein Signifikanz-Wert durch den Vergleich zweier Kurven ermittelt werden. Als Nullhypothese wurde die völlige Übereinstimmung der beiden Kurven angenommen, was voraussetzen würde, dass die Wirkung der den Tieren der beiden Gruppen verabreichten Vakzine vollständig gleich war. Der im logrank-Test ermittelte P-Wert steht dann für die Wahrscheinlichkeit, dass die ermittelten Überlebenszeiten bei eigentlich identischen Verteilungskurven nur aufgrund einer zufälligen Verteilung der Stichproben ermittelt werden.

<u>P-Wert</u>	<u>Art der Signifikanz</u>
>0,05	nicht signifikant
0,01-0,05	signifikant
0,001-0,01	sehr signifikant
<0,001	extrem signifikant

Je kleiner der P-Wert ist, desto geringer die Wahrscheinlichkeit, dass die Überlebenskurven aufgrund einer Zufallsverteilung differieren. Ist der P-Wert kleiner als 0,05 kann man davon ausgehen, dass ein signifikanter Effekt der Vakzine vorliegt.

3 Ergebnisse

3.1 RNA transfizierte dendritische Zellen als Immunstimulatoren

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten zunächst Methoden etabliert und optimiert werden, die Grundlagen dafür bilden, *in vitro* transkribierte RNA (IVT-RNA) als intravitales Vakzinformat nutzen zu können. Hierfür bedurfte es einer initialen Evaluierung, ob IVT-RNA transfizierte antigenpräsentierende Zellen (APCs) grundsätzlich in der Lage sind, antigenspezifische T-Lymphozyten *in vitro* zu stimulieren und ihre Expansion zu induzieren. Als APCs dienten hierbei dendritische Zellen (DCs), da sie als die potentesten APCs gelten. Bevor die stimulatorische Kapazität IVT-RNA transfizierter DCs analysiert werden konnte, mußte zunächst untersucht werden, inwieweit DCs aus murinen Knochenmarkzellen *in vitro* generiert und maturiert werden können und wie sie sich phänotypisch voneinander unterscheiden. Ferner bedurfte es der Analyse der Transfizierbarkeit der immaturen und maturen DCs mit IVT-RNA und der Optimierung ihrer Transfektionsbedingungen.

3.1.1 Phänotypisierung von immaturen und maturen KMDCs

Frisch isolierte Knochenmarkzellen wurden für sechs Tage in KMDC-Medium unter Zusatz von GM-CSF und IL-4 zu immaturen DCs (iDCs) differenziert (siehe auch 2.2.1.9)

Ein Teil der iDCs wurde anschließend durch zweitägige Kultivierung in LPS und TNF- α -haltigem Medium maturiert (mDCs).

Der unterschiedliche Differenzierungsstatus der immaturen und maturen KMDCs konnte nachfolgend anhand der Expression der funktionell wichtigen Oberflächenmoleküle CD11c, CD80, CD86 und MHC-Klasse-II mittels durchflußzytometrischer Analyse charakterisiert werden (siehe Abb. 3.1).

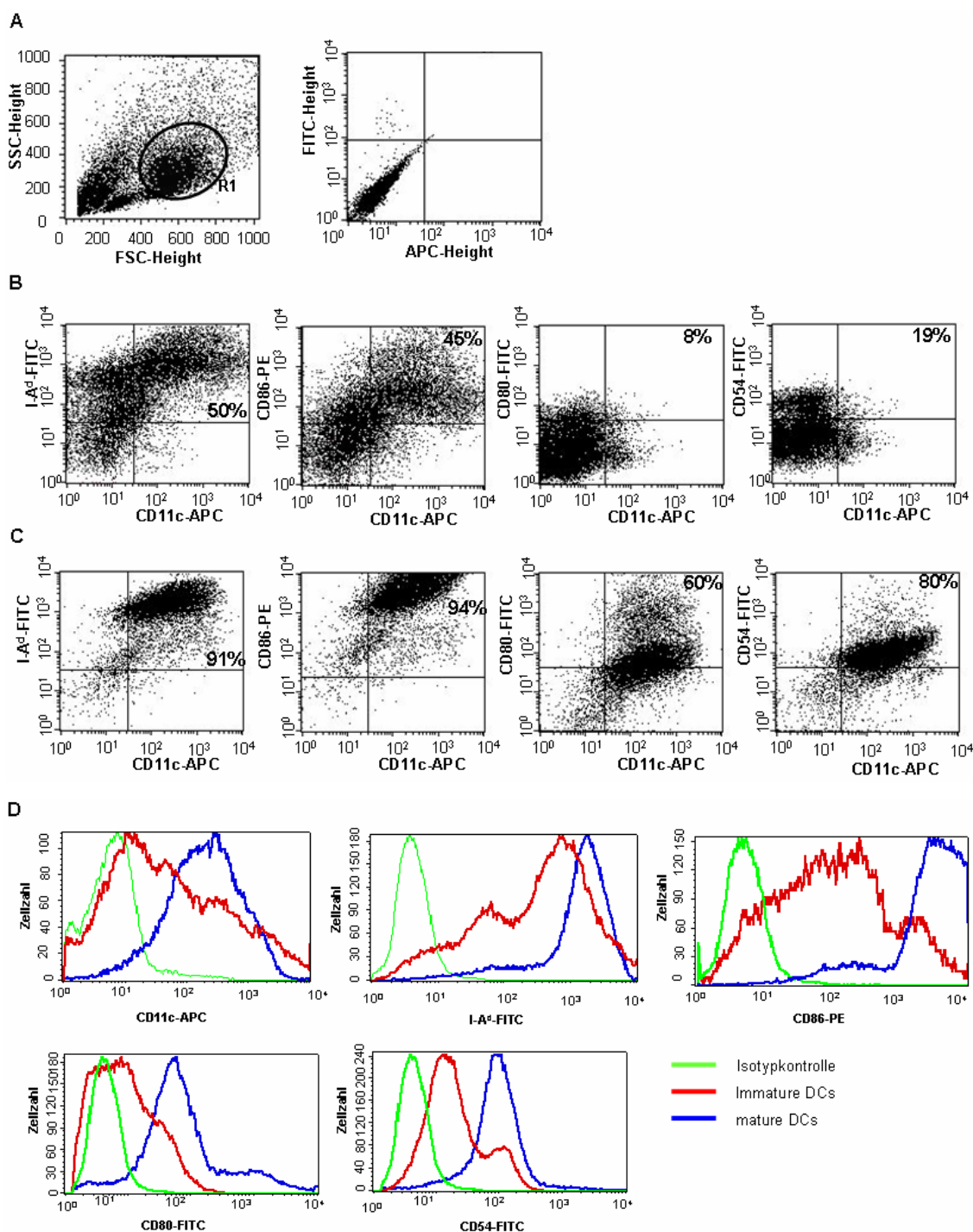


Abb. 3.1: Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenantigenexpression von immaturren und maturaen KMDCs. Immature KMDCs wurden generiert, indem aus Knochenmark isolierte Zellen für 6 Tage in KMDC-Medium unter Zusatz von GM-CSF und IL-4 kultiviert wurden. Mature KMDCs wurden nachfolgend aus immaturren KMDCs durch zweitägige Inkubation mit LPS und TNF- α hergestellt. Anschließend erfolgte der Nachweis der Oberflächenantigene CD11c, I-A^d, CD86, CD80 und CD54 mittels FACS-Analyse. Immature KMDCs wurden anhand ihrer CD11c Expression identifiziert **A**) Vorwärts-Streulicht (FSC-Height), Seitwärts-Streulicht (SSC-Height) der DCs (R1) und Isotyp-Diagramm. **B**) Dot plot Diagrammanalyse der exprimierten Oberflächenantigene bei immaturren KMDCs und der prozentuale Anteil exprimierender DCs an allen DCs. **C**).Prozentualer Anteil der exprimierten Oberflächenantigene bei maturaen KMDCs an allen DCs. **D**) Histogramm der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der exprimierten Oberflächenantigene von immaturren und maturaen KMDCs. Grüne Linie = Isotypkontrolle; rote Linie = immature KMDCs; blaue Linie = mature KMDCs.

Die KMDC-Population ließ sich bereits morphologisch durch ihre Vorwärts- und Seitwärtsstreu-Eigenschaften eindeutig von anderen Zelltypen abgrenzen (siehe Abb. 3.1A)

Immature KMDCs wiesen eine niedrige bis mittlere Expressiondichte für die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, das antigenpräsentierende MHC-Klasse-II-Molekül und das Adhäsionsmolekül CD54 auf (siehe Abb. 3.1B). Die Expression von MHC-Klasse-II (I-A^d) war bei 50% der Zellen nachweisbar, 45% der Zellen exprimierten CD86, 19% der Zellen CD54 und nur 8% der Zellen CD80.

Durch Induktion der Reifung mit LPS und TNF- α konnte eine deutliche Expressionszunahme der untersuchten Oberflächenmarker erreicht werden. LPS und TNF- α erwiesen sich im Bezug auf die Expressiondichte von CD80 und CD86, sowie CD54 und MHC-Klasse-II als sehr potente Stimuli, die zu einer homogenen Koexpression der Marker auf den maturierten DCs führten (siehe Abb. 3.1C). Beim Vergleich von immaturren und maturierten DCs bezüglich der Expression von Maturationsmarkern war eine deutlich vermehrte Expression auf maturierten DCs nachweisbar (vgl. Abb. 3.1D).

3.1.2 *In vitro* Transfektion von dendritischen Zellen mit eGFP-RNA

Nach der phänotypischen Charakterisierung immaturren und maturaer KMDCs wurden diese auf ihre Transfizierbarkeit mit IVT-RNA hin untersucht und die Transfektionseffizienz nach Elektroporation mit eGFP-kodierender IVT-RNA gemessen. Nach dem Austesten verschiedener Parameter erwiesen sich 276 Volt und 150 μ F als optimal für die Transfektion von DCs. Nach Elektroporation wurden die Zellen in DC-Medium überführt und für 16h kultiviert. Nach Ernte der Zellen wurde die Expression von eGFP durchflußzytometrisch analysiert. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der KMDCs ohne Zugabe von RNA elektroporiert (siehe Abb. 3.2).

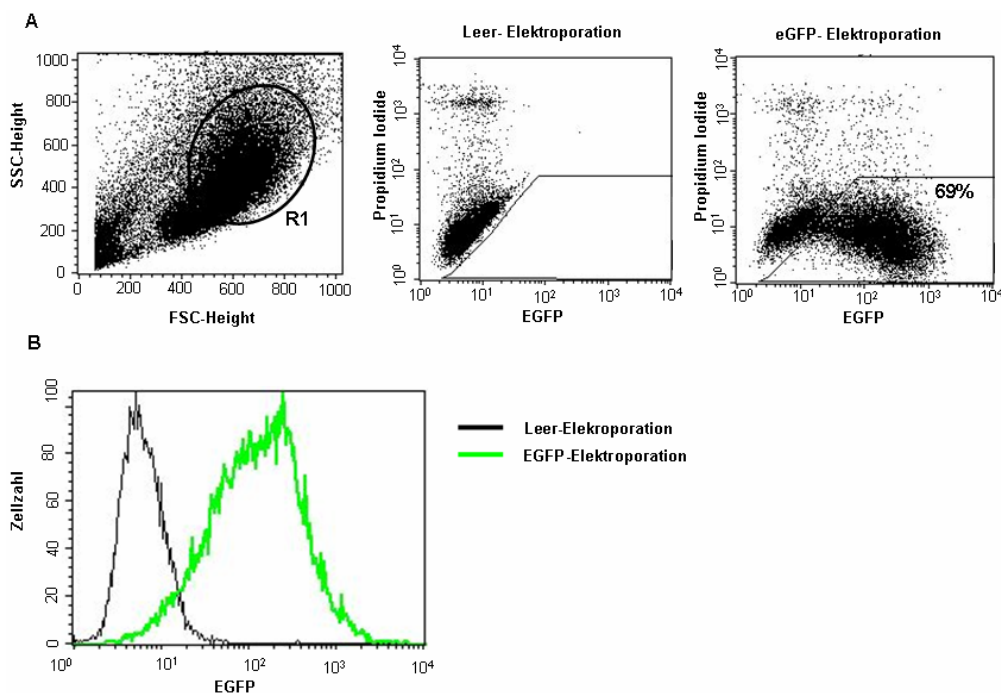


Abb. 3.2: Durchflußzytometrische Analyse der Transfektion von iDCs mit eGFP-RNA. DCs wurden mit 20µg IVT-eGFP-RNA elektroporiert, anschließend in DC-Medium überführt und für 16h kultiviert. Nach Ernte der Zellen wurde die Expression von eGFP durchflußzytometrisch nachgewiesen. Als Negativkontrolle wurde ein Teil der DCs ohne Zugabe von RNA elektroporiert (Leer-Elektroporation). **A)** Darstellung der eGFP-Fluoreszenz und der Vitalität der Zellen als Dot Plot. **B)** Darstellung der eGFP-Fluoreszenz als Histogramm PI: Propidiumiodid, dient dem Nachweis der Vitalität der Zellen.

Sowohl immature als auch mature (hier nicht gezeigt) KMDCs ließen sich unter den optimierten Elektroporationsbedingungen hocheffizient mit eGFP-kodierender RNA transfizieren. Im Mittel ließ sich bei KMDCs eine Expression von eGFP nach Transfektion mit eGFP-RNA bei etwa 60-80% der vitalen KMDCs nachweisen (Abb. 3.2A).

3.1.3 Stimulatorische Potenz von RNA-transfizierten dendritischen Zellen

DCs stellen im Bezug auf die Aktivierung von T-Zellen die potenteste Population innerhalb der APCs dar. Infolge der starken Expression von MHC-Molekülen der Klasse-I und -II (Boog *et al.*, 1988; King und Katz, 1990; Banchereau und Steinman, 1988), den kostimulierenden Molekülen CD40, B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), sowie verschiedener Adhäsionsmoleküle, sind sie in der Lage T-Zellen zu aktivieren und eine starke T-Zell-Proliferation zu initiieren (Banchereau und Steinman 1998).

Nachdem wir zeigen konnten, dass die effiziente Transfektion von KMDCs mit IVT-RNA möglich ist (siehe 3.1.2), wurde im Folgenden untersucht, ob transfizierte KMDCs in der Lage sind T-Zellen zu stimulieren und ihre Proliferation zu induzieren.

Hierzu wurden KMDCs per Elektroporation mit Influenza-Hemagglutinin (InfHA) kodierender RNA transfiziert. Die transfizierten KMDCs wurden anschließend mit InfHA-spezifischen, T-Zell-Rezeptor (TCR) transgenen CD4⁺ T-Zellen in einem [³H]-Thymidin-Proliferationsassay koinkubiert und die Proliferation anhand des ³H-Thymidin-Einbaus gemessen (siehe Abb. 3.3). Als Kontrollen dienten DCs, die mit irrelevanter RNA (NY-ESO-RNA) transfiziert oder mit irrelevantem Peptid (SSX2-Peptid) beladen wurden.

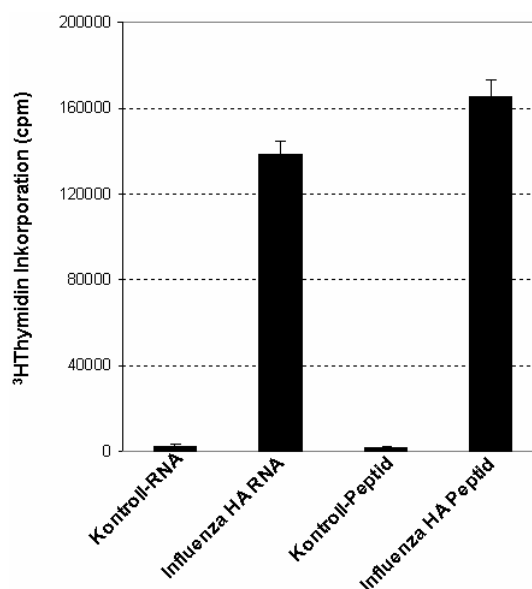


Abb. 3.3: Proliferationstest InfHA-spezifischer transgener CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation durch mKMDCs. In einer 96 well Platte wurden 5×10^5 mDC/ml (Balb/c), die zuvor mit $10 \mu\text{g}$ InfHA-RNA transfiziert oder mit $5 \mu\text{g/ml}$ InfHA₁₁₀₋₁₁₉-Peptid beladen wurden, zusammen mit 5×10^5 TCR-InfHA-CD4⁺ Lymphozyten/ml (Balb/c) für 5 Tage kokultiviert. Als Kontrolle dienten DCs, die mit NY-ESO-RNA, einer irrelevanten RNA, transfiziert (Kontroll-RNA) oder mit SSX2-Peptid, einem irrelevanten Peptid (Kontroll-Peptid) beladen wurden. Die Zellen wurden mit [³H]-Thymidin markiert und 24h später wurde die Proliferation der T-Zellen anhand des ³H-Thymidin-Einbaus gemessen.

Es zeigte sich, dass die mit IVT-InfHA-RNA transfizierten KMDCs, eine mit den InfHA-Peptid beladenen KMDCs vergleichbare Proliferation der InfHA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen induzierten, was auf eine ähnliche stimulatorische Potenz der beiden verschiedenen Vakzinformulierungen hindeutet. Die mit Kontroll-RNA transfizierten, bzw. mit Kontroll-Peptid beladenen KMDCs führten hingegen zu keiner relevanten Proliferation der InfHA reaktiven T-Lymphozyten.

3.2 Vektormodifikationen zur Optimierung der Transkriptstabilität und Modifikation des intrazellulären Antigen-targetings

Nachdem prinzipiell gezeigt werden konnte, dass IVT-RNA transfizierte KMDCs in der Lage sind T-Lymphozyten *in vitro* zu stimulieren und zur Expansion anzuregen, sollten im Folgenden die Voraussetzungen geschaffen werden, die intravitale RNA-Transfektion zu etablieren. Da bei der intravitale IVT-RNA Applikation mit einer schnellen Degradation der IVT-RNA durch abundant vorhandene RNasen sowie einer, im Vergleich zur *in vitro* Elektroporation, niedrigen Transfektionseffizienz gerechnet werden musste, wurden Vektormodifikationen getestet, welche das Ziel hatten, die Transkriptstabilität zu erhöhen sowie die Expressionsdauer zu maximieren.

Darüberhinaus wurde das Ziel verfolgt, mittels eines modifizierten IVT-Konstruktes die gleichzeitige, antigenspezifische Stimulation von CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen zu erreichen. Dazu wurden Fusionsproteine bestehend aus dem Antigen und Sequenzen welche die Antigenprozessierung beeinflussten generiert.

3.2.1 Vektorkonstruktion

Ausgehend vom Vektor pCMV-Script (Stratagene, Amsterdam, NL) wurde durch verschiedene Modifikationen ein Basisvektor kloniert, welcher für alle nachfolgenden Konstrukte zur Herstellung von IVT-RNA genutzt wurde. Der pCMV-Script Vektor verfügt über einen T7-Promotor, an welchem die *in vitro* Transkription startet. In den Vektor wurde ein 120bp langer poly(A) Schwanz einkloniert, welcher an seinem 3'-Ende über eine EciI und eine SapI Restriktionsschnittstelle verfügte. Mittels dieser beiden Schnittstellen war eine Linearisierung des Vektors möglich, welche einen frei endenden poly(A) Schwanz generierte (siehe Abb. 3.4).

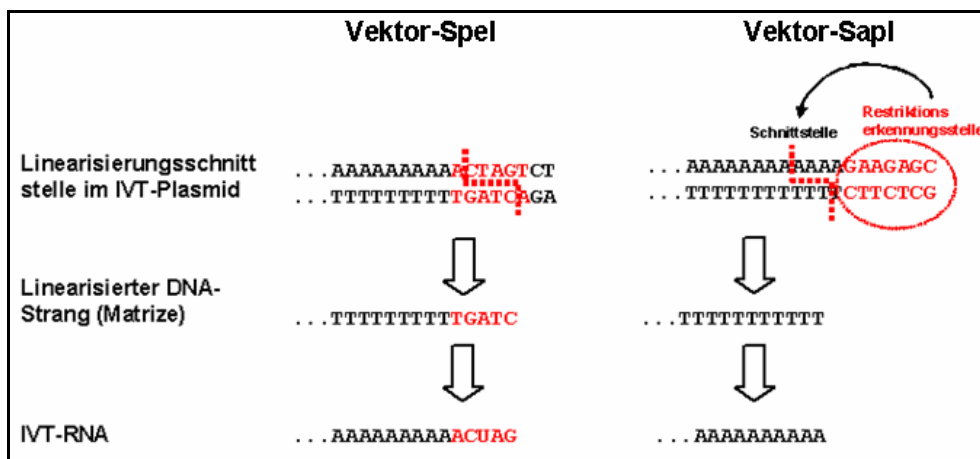


Abb. 3.4: Vergleich zwischen Restriktionsenzymen des Typ II (SpeI) und des Typ IIs (SapI) bei der Linearisierung der Vektoren vor der IVT. Typ IIs Restriktionsenzyme schneiden außerhalb statt innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Dadurch wird vermieden, dass das resultierende Transkript am 3' Ende des poly(A) Schwanzes durch Nukleotide verdeckt wird, die als Teil der Restriktionsschnittstelle nach der Linearisierung verbleiben. (Abbildung entnommen aus Holtkamp *et al.* 2006)

3' der einzuklonierenden, proteinkodierenden Sequenz wurden zwei Sequenzen aus dem 3' untranslatierten Bereich (UTR) des humanen β -Globin Gens integriert. Diese 3'-UTR Sequenzen führen zu einer erhöhten Stabilität der transkribierten RNA (Mignone *et al.*, 2002). Dieser Vektor wird im Folgenden als Vektor pST1 bezeichnet und ist in Abbildung 3.5 exemplarisch mit einer eGFP-kodierenden Sequenz gezeigt.

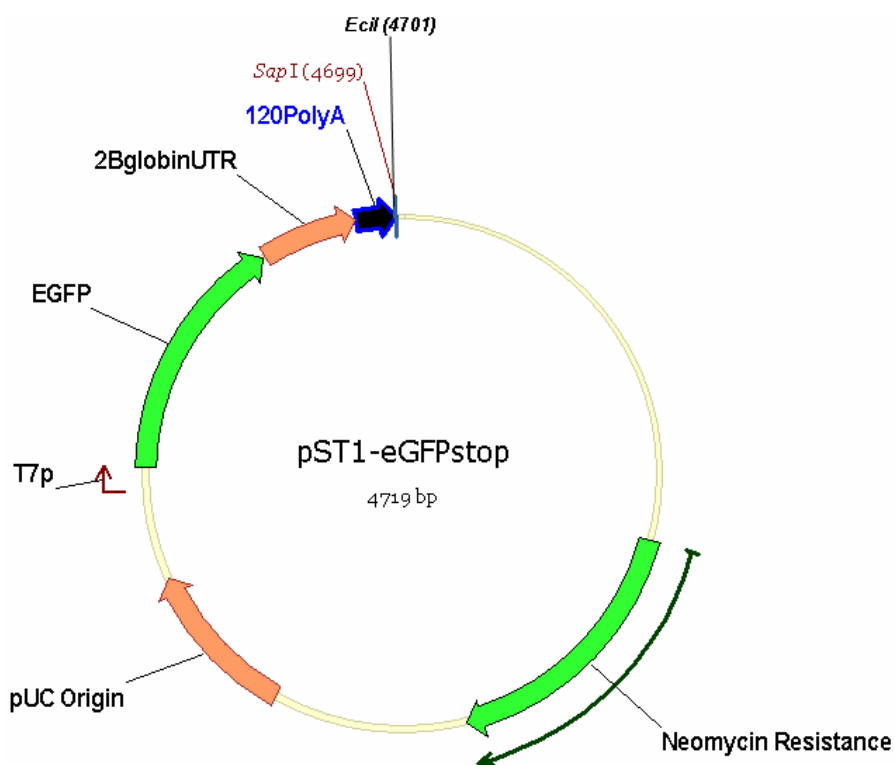


Abb. 3.5: Schematische Darstellung des pST1-eGFP-Vektors. Dieser Vektor wurde als Ausgangsvektor für die weiteren Klonierungen genutzt. T7p: T7 Promotor; EGFP: eGFP-kodierende Sequenz als Reporter-Gen; 2BglobinUTR: zweifache Sequenz der 3' UTR des humanen β -Globin Gens; SapI: Schnittstelle für SapI, Ecil: Schnittstelle für Ecil.

3.2.2 Auswirkungen der poly(A) Länge, eines frei endenden poly(A) Schwanzes und einer optimierten 3'-UTR der IVT-RNA auf die *in vivo* Expansion antigenspezifischer T-Lymphozyten

Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass die Einführung von zwei 3'-UTRs des humanen β -globin Gens, sowie die poly(A) Länge und die Generierung eines frei endenden poly(A) Schwanzes die Transkriptstabilität und die Translationseffizienz der IVT-RNA beeinflussen. Es konnte zudem *in vitro* gezeigt werden, dass durch die eingeführten Modifikationen die Anzahl der Peptid/MHC-Komplexe auf der Zelloberfläche erhöht wurde (Holtkamp *et al.*, 2006).

Um den Effekt der eingeführten Modifikationen auf die Expansion antigenspezifischer T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurde ein immundominantes MHC-Klasse-I Epitop des Ovalbumin (OVA) mit der H-2K^b restringierten Sequenz SIINFEKL (aa 257-264) genutzt (Anton *et al.*, 1997).

Die für SIINFEKL-kodierende Sequenz wurde in den mit allen Optimierungen ausgestatteten Vektor (pST1-SIINFEKL-2 β gUTR-A(120)-SapI) und in einen Vektor ohne Optimierungen (Standardvektor, pST1-SIINFEKL-A(67)-SpeI) kloniert. Von beiden Vektoren abgeleitete IVT-RNAs wurden separat in murine mDCs elektroporiert. Als Negativkontrolle wurden mDCs mit irrelevanten RNA (NY-ESO-RNA) transfiziert.

TCR transgene CD8⁺ OT-I Zellen, welche das SIINFEKL Epitop erkennen, wurden adoptiv in C57Bl/6J Mäuse transferiert und anschließend wurden die elektroporierten mDCs intraperitoneal (i.p.) injiziert. Vier Tage später wurde den Mäusen Blut entnommen und die Expansion SIINFEKL/K^b spezifischer CD8⁺ T-Zellen mittels Tetramerfärbung quantifiziert (siehe Abb. 3.6).

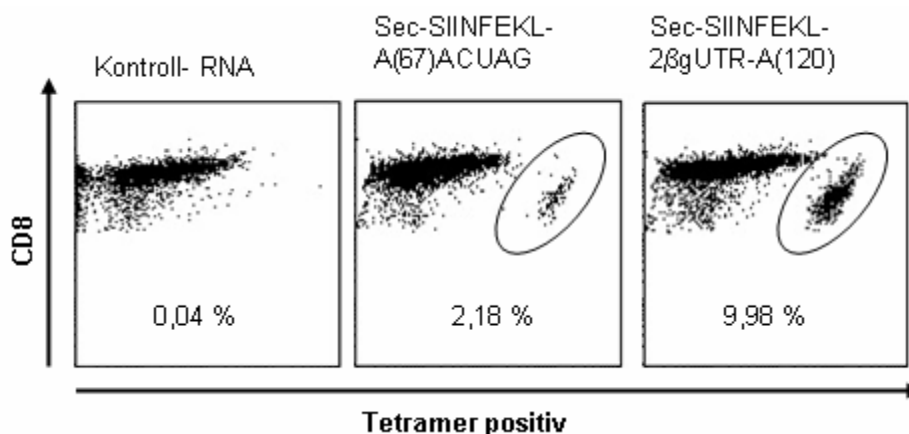


Abb. 3.6: Verbesserte CD8⁺ T-Zell Expansion *in vivo* durch Nutzung optimierter IVT-RNA Konstrukte. 1×10^5 TCR transgene CD8⁺ OT-I Zellen wurden am Tag 0 in C57Bl/6J Mäuse adoptiv transferiert. Murine DCs wurden mit 50pMol der angegebenen IVT-RNA elektroporiert, maturiert und an Tag 1 injiziert (n=3). Als Kontrolle dienten mDCs, die mit irrelevanter RNA (NY-ESO-RNA) transfiziert wurden. An Tag 4 wurden CD8⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut mittels Tetramerverfärbung quantifiziert. Die Dot plots zeigen die CD8⁺ T-Zellen und die angegebenen Zahlen repräsentieren die Tetramerpositiven CD8⁺ T-Zellen in Prozent bezogen auf alle CD8⁺ T-Zellen.

Die Transfektion von mDCs mit Kontroll-RNA führte zu keiner Expansion SIINFEKL-spezifischer T-Lymphozyten. Die *in vivo* Expansion von antigenspezifischen, TCR-transgenen CD8⁺ T-Zellen war reproduzierbar stärker, wenn das Antigen unter Verwendung des optimierten Vektors eingebracht wurde. Die eingeführten Optimierungen innerhalb des IVT-RNA Vektors, die die Transkriptstabilität und Translationseffizienz verbesserten (Holtkamp *et al.*, 2006), wirkten sich somit funktionell auch *in vivo* aus, da sie zu einer verbesserten T-Zell Expansion führten.

3.2.3 Antigen targeting in den MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II Prozessierungsweg

Im Unterschied zur *in vitro* Elektroporation von DCs werden bei einer intravitalem Applikation von IVT-RNA vermutlich nur wenige APCs transfiziert, die die RNA spontan aufgenommen haben. Daher sollten zusätzlich zu den zuvor beschriebenen Transkriptstabilitäts- und Translationseffizienz verbessernden Modifikationen weitere Modifikationen des IVT-RNA Vektors analysiert werden, die die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I und Klasse-II Moleküle verbessern. Dies würde gewährleisten, dass, auch wenn nur wenige APCs transfiziert werden, eine optimale Stimulation antigenspezifischer T-Zellen erfolgt.

Durch weitere Vektormodifikationen sollte deswegen versucht werden, die Antigene hocheffizient simultan in den MHC-Klasse-I und Klasse-II Prozessierungsweg einzubringen. Aufgrund der zytosolischen Lokalisation eines Antigens, welches als RNA

in Zellen transfiziert wurde, kommt es primär zur Prozessierung des Antigens über den MHC-Klasse-I Prozessierungsweg. Um die Rekrutierung des Antigens in den MHC-Klasse-II Prozessierungsweg zu erhöhen, untersuchten wir verschiedene genetische Modifikationen. Eine dieser Modifikationen beruhte auf einer N-terminalen Flankierung des Antigens durch ein Sekretionssignal, sowie der C-terminalen Insertion einer Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne eines humanen MHC-Klasse-I-Moleküls.

Aufgrund der bekannten Lokalisation von MHC-Klasse-I-Molekülen in Zellkompartimenten welche der Prozessierung von MHC-Klasse-II-bindenden Peptiden dienen (Dengjel *et al.*, 2005), erwarteten wir, dass es durch die Fusionsproteine auch zu einem verstärktem Antigentargeting in den MHC-Klasse-II Prozessierungsweg kommen würde.

Die Auswirkungen der oben erwähnten Modifikationen wurden zuerst einzeln und dann zusammen getestet.

3.2.3.1 Einfluss der Einführung des Antigens in den sekretorischen Prozessierungsweg auf die Effizienz der Antigenpräsentation

Durch das Einfügen eines humanen MHC-Klasse-I Signalpeptids (aa 1-26) transloziert das IVT-RNA-kodierte Protein in das endoplasmatische Retikulum (ER). Um die Effekte dieser Modifikation auf die Expansion antigenspezifischer T-Zellen *in vivo* zu untersuchen, wurde wiederum das SIINFEKL-Modell verwendet.

Dafür wurden OT1-Zellen in C57Bl/6 Mäusen adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die Stimulation der transfizierten Zellen durch i.p. Immunisierung mit DCs, die zuvor mit IVT-RNA ohne Signalsequenz (pST1-SIINFEKL) oder mit Signalsequenz (pST1-Sec-SIINFEKL) transfiziert wurden.

Der Effekt der eingeführten Modifikation wurde nach Immunisierung durch Messung der lytischen Aktivität der expandierten OT1-Zellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätsassay überprüft.

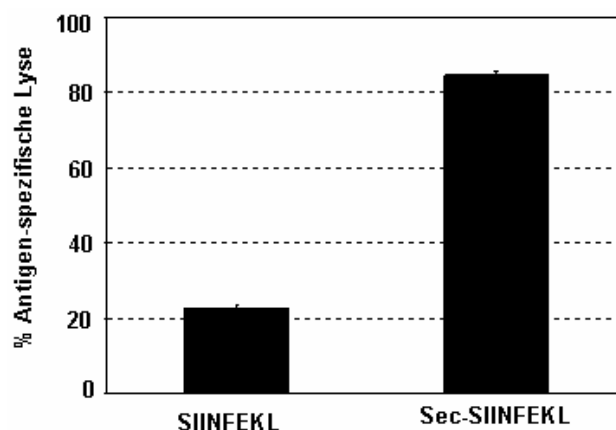


Abb. 3.7: Die Insertion eines Sekretionssignals führt zur stärkeren Expansion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen. 1×10^5 OT1-Zellen wurden am Tag -1 in C57Bl/6 Mäusen adoptiv transferiert. Am Tag 0 erfolgte eine *in vivo* Stimulation durch i.p. Immunisierung mit $0,75 \times 10^6$ DCs (n=2), welche mit 15pMol RNA transfiziert worden waren. Ein *in vivo* Zytotoxizitätstest wurde 5 Tage nach der Immunisierung durchgeführt. Dafür wurde jeweils 1×10^7 SIINFEKL-Peptid (5 μ M; CSFE^{high}) und 1×10^7 Kontroll-Peptid (0,5 μ M; CSFE^{low}) beladene Milzzellen adoptiv transferiert. Nach 18h wurden die Milzzellen präpariert, durchflußzytometrisch gemessen und die antigenspezifische Lyse bestimmt. Die Grafik zeigt die spezifische Lyse in Prozent und die Mittelwert-Abweichung (MWAbw).

Nach Immunisierung mit Sec-SIINFEKL-RNA transfizierten KMDCs lag die spezifische Lyse bei 85% im Vergleich zu 25% nach Nutzung der nicht-modifizierten Konstruktvariante.

Die massiv gesteigerte Lyse der SIINFEKL-Peptid beladenen Milzzellen bei Verwendung der in den sekretorischen Pfad eingebrachten Konstruktvariante (pST1-Sec-SIINFEKL) war ein Hinweis auf eine Erhöhung der stimulatorischen Kapazität durch die eingeführte Modifikation.

3.2.3.2 Einfluss der Einführung einer C-terminalen HLA Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne auf die Stimulation antigenspezifischer T-Zellen

Um den Einfluß der C-terminalen Insertion einer Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne eines HLA-B Moleküls auf das Antigen Targeting und die Stimulation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen wurde das Modellantigen InfHA verwendet.

InfHA verfügt über ein autochtones Signalpeptid, welches zur Translokation des Moleküls in das ER führt. Am 3'-Ende der InfHA Sequenz wurde die transmembrane und zytoplasmatische Domäne eines HLA-B Moleküls (aa 307-361) eingefügt. Der kodierende Vektor für dieses Fusionsprotein wird im folgenden pSTI-InfHA-TM_{MHCI} genannt (Abb. 3.8).

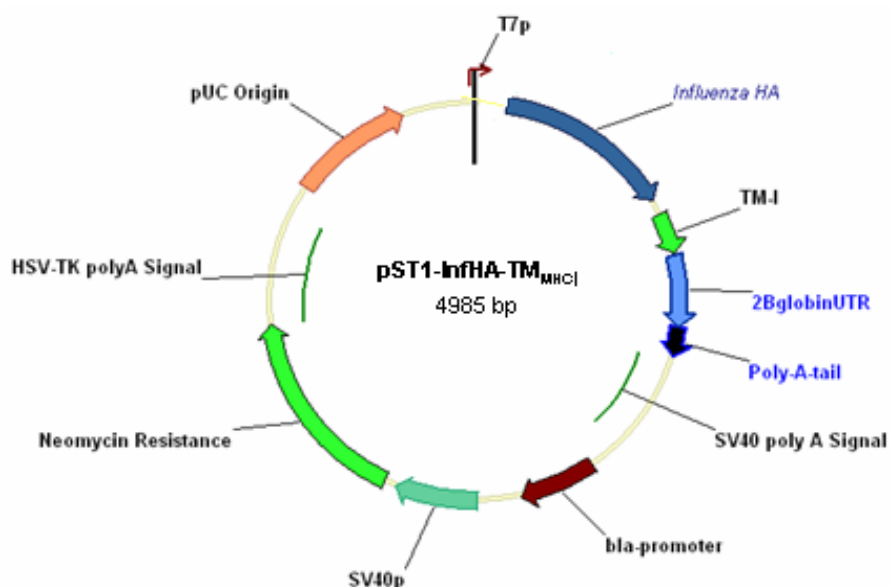


Abb. 3.8: Schematische Darstellung des pST1-InfHA-TM_{MHC}I Vektors. T7p: T7-Promotor; TM-I: Transmembran- und zytosolische Domäne des humanen MHC-Klasse-I-Moleküls HLA-B; 2βglobinUTR: zweifache 3'-UTR des humanen β-Globin Gens, Poly-A-tail: Vektor kodierter poly(A)-Schwanz aus 120(A).

Zunächst sollte untersucht werden, ob die Einführung von Transmembran- und zytosolischer Domäne im InfHA-Modell zu einer verbesserten Stimulation antigenspezifischer CD4⁺ T-Zellen führte. Dazu wurden verschiedene InfHA-Konstrukte (Wildtyp, ohne autochtone Transmembrandomäne, mit humanen TM_{MHC}I) (siehe Abb. 3.9) auf ihre Fähigkeit InfHA-spezifische CD4⁺ T-Zellen zu stimulieren getestet.

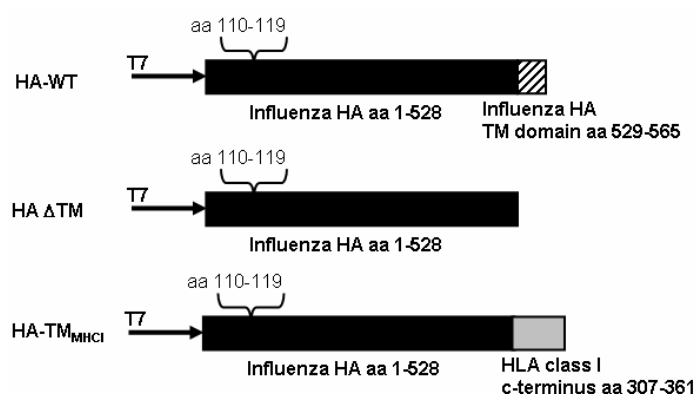


Abb. 3.9: Schematische Darstellung der verschiedenen InfHA-Konstrukte. T7: T7-Promotor; HA-WT: InfHA-Wildtyp; HAΔTM: InfHA ohne autochtone Transmembrandomäne; HA-TM_{MHC}I: InfHA mit C-terminal inserierter humaner Transmembran- und zytosolischer Domäne eines HLA-B Moleküls. aa 110-119: autochthones Sekretionssignal von InfHA.

InfHA-reaktive, TCR transgene CD4⁺ T-Zellen wurden mit Balb/c KMDCs kokultiviert, die zuvor mit den verschiedenen InfHA-Konstrukten elektroporiert worden waren. Als Kontrolle dienten mDCs, die mit irrelevanter RNA transfiziert wurden.

Die proliferative Kapazität dieser InfHA-Konstrukte wurde anhand eines [3 H]-Thymidin-Proliferationsassays sowie eines Zytokinesekretionsassays überprüft (siehe Abb. 3.10).

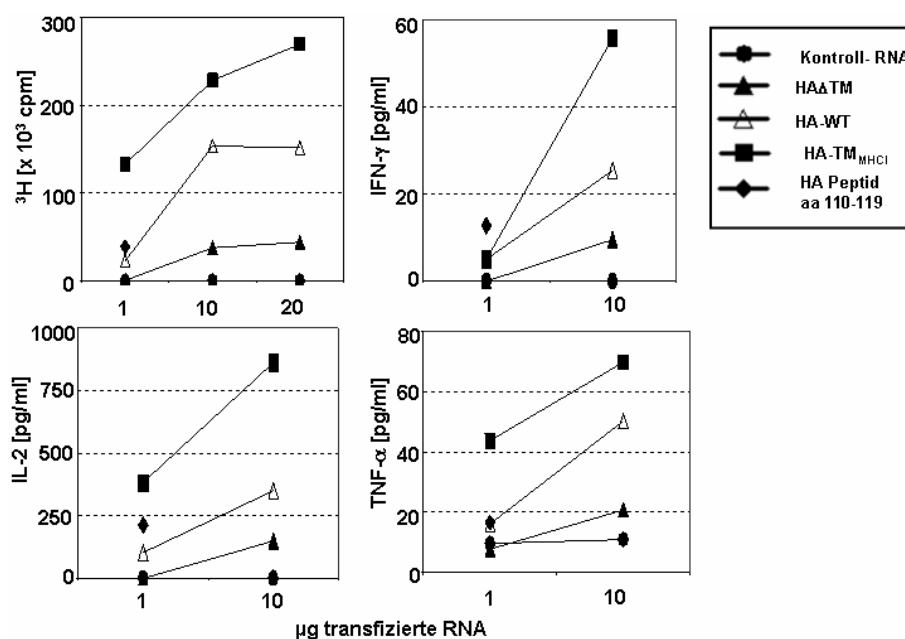


Abb. 3.10: Effekte verschiedener genetischer Modifikationen von InfHA auf die Stimulation transgener, InfHA-spezifischer CD4⁺-T-Lymphozyten. links oben: [3 H]-Thymidin-Proliferationsassay; rechts oben und unten: Resultate von Zytokinanalysen mit zytometrischen Beads. Um die proliferative Fähigkeit verschiedener InfHA-Konstrukte zu testen, wurden DCs mit absteigender RNA-Menge transfiziert oder mit Peptid [2µg/ml] beladen. Als Kontrolle wurden DCs mit irrelevanten RNA (NY-ESO-RNA) transfiziert. Über MACS-isolierte, naive CD4⁺ TCR-HA Zellen ($0,4 \times 10^5$ /well) wurden 3 Tage lang mit DCs ($0,3 \times 10^5$ /well) stimuliert. Anschließend wurden sie mit [3 H]-Thymidin gepulst und 16h lang inkubiert. Zum Vergleich verschiedener InfHA-Konstrukte bezüglich ihrer Zytokin-Produktion nach Stimulation mit RNA transfizierten DCs, wurden naive CD4⁺ TCR-HA Zellen ($0,4 \times 10^5$ /well) mit DCs ($0,3 \times 10^5$ /well) stimuliert. Die DCs wurden mit unterschiedlichen RNA-Mengen transfiziert und für 40h mit CD4⁺ TCR-HA Zellen kokultiviert. Die Zytokinkonzentrationen wurden im Überstand gemessen.

Im Proliferationsassay konnten wir zeigen, dass obwohl eine Transmembran- und zytoplasmatische Domäne eines humanen MHC-Klasse-I-Moleküls eingeführt wurde, auch eine gesteigerte Proliferation der antigenspezifischen, MHC-Klasse-II restringierten CD4⁺ T-Zellen im Vergleich mit den Kontrollkonstrukten erreicht wurde. Dieser positive Effekt wurde bei allen eingesetzten RNA Mengen beobachtet. Besonders im niedrigen Dosisbereich (1µg) zeigte sich eine bis über hundertfache Steigerung der T-Zellproliferation. Analog dazu konnte auch gezeigt werden, dass die Sekretion von Zytokinen wie IL-2, IFN- γ und TNF- α durch die antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen mittels der Verwendung der modifizierten Antigenvariante deutlich gesteigert wurde.

Nachfolgend untersuchten wir, ob beide Modifikationen, d.h. die aminoterminalen Insertion eines HLA-Signalpeptides und die C-terminale Insertion einer HLA-B Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne, zu einer simultanen und effektiven

Prozessierung des kodierten Antigens im MHC-Klasse-I und -II Prozessierungsweg führen. Dazu wurde ein IVT-Konstrukt generiert bei dem aus der Wildtypsequenz von InfHA das Signalpeptid (aa 1-26) und die Transmembrandomäne deletiert waren. Stattdessen wurden das humane Signalpeptid und die HLA-B Transmembran- und zytoplasmatischen Domäne eingefügt.

Zum Testen der Modifikationen wurden KMDCs mit den jeweiligen IVT-RNA Konstrukten (InfHA-WT, InfHA_{opt}⁻, Kontroll-RNA: NY-ESO-RNA) transfiziert, oder mit InfHA-Peptiden (HA₁₁₀₋₁₁₉, HA₅₃₃₋₅₄₁) beladen und dann im IFN- γ ELISPOT mit aufgereinigten CD4⁺ TCR-HA, bzw. CD8⁺ TCR-CL4-Lymphozyten koinkubiert.

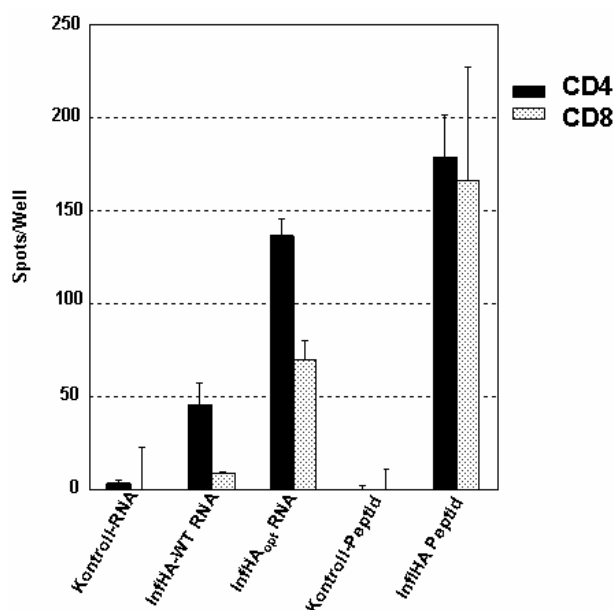


Abb. 3.11: Kombinierte Stimulation von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten durch IVT-RNA Fusionskonstrukte. In einer 96 well ELISPOT-Platte wurden 2×10^5 DC/ml (Balb/c), die zuvor mit InfHA-WT bzw. InfHA_{opt}⁻ RNA transfiziert oder mit InfHA-Peptiden HA₁₁₀₋₁₁₉, HA₅₃₃₋₅₄₁ beladen wurden, zusammen mit $1,5 \times 10^5$ TCR-InfHA-CD4⁺ bzw. TCR-CL4-CD8⁺ Lymphozyten/ml (Balb/c) für 24h kokultiviert. Als Kontrolle dienten DCs, die mit einer irrelevanten RNA (NY-ESO-RNA) transfiziert oder mit einem irrelevanten Peptid (SSX2-Peptid) beladen wurden. Das Diagramm gibt die Anzahl der Spots nach Abzug der Spots des Ansatzes zur Bestimmung der spontanen IFN- γ -Ausschüttung an \pm MWAbw.

Die Verwendung des modifizierten Fusionskonstruktes (InfHA_{opt}) führte zu einer, im Vergleich zum InfHA-Wildtyp Konstrukt, deutlich gesteigerten Stimulation von CD4⁺ antigenspezifischen T-Zellen. Wie im SIINFEKL Modellsystem nach Einführung des Sekretionssignals gezeigt (siehe 3.2.3.1), wurden CD8⁺ antigenspezifische T-Zellen durch die modifizierte RNA (InfHA_{opt}) nicht nur in einer dem Wildtypkonstrukt äquivalenten Weise stimuliert, sondern zeigten sogar eine deutliche höhere Frequenz spezifisch stimulierter T-Zellen.

Zusammenfassend konnten wir in unseren initialen Experimenten zeigen, dass DCs *in vitro* hocheffizient mit IVT-RNA transfiziert werden konnten und eine hohe stimulatorische Kapazität besaßen (siehe 3.1.2 und 3.1.3).

Durch Modifikation der IVT-RNA konnten wir die Transkriptstabilität und Translationseffizienz erhöhen und dadurch eine Verbesserung der stimulatorischen Kapazität *in vivo* erreichen (siehe 3.2.2). Darüber hinaus führte die zusätzliche Modifikation der IVT-RNA mit Domänen eines MHC-Klasse-I-Moleküls zu einer gesteigerten, simultanen Stimulation von antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen, was wahrscheinlich auf eine Verbesserung des intrazellulären Antigen-targetings zurückzuführen war (siehe 3.2.3).

Basierend auf diesen Ergebnissen, wurde in den weiteren Experimenten zur Etablierung und Charakterisierung der intranodalen (i.n.) RNA-Immunisierung generell die IVT-RNA in Form der unten beschriebenen Fusionskonstrukte genutzt, die sämtliche, die stimulatorische Potenz steigernden Modifikationen beinhalteten (Abb. 3.12).

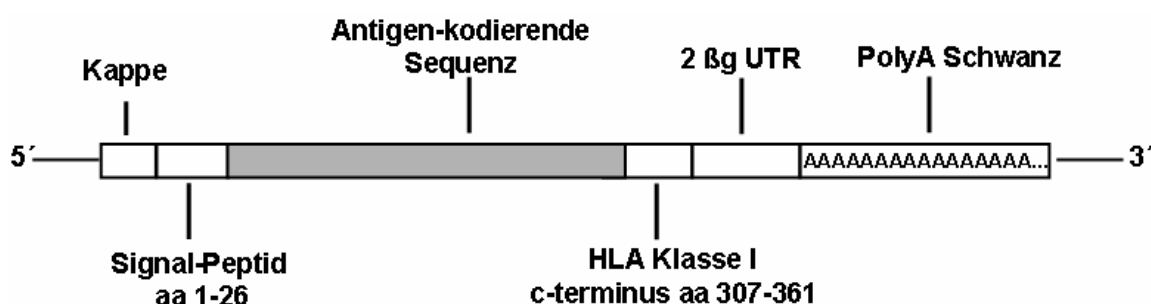


Abb. 3.12: Schematische Darstellung eines IVT-RNA Fusionskonstruktes mit sämtlichen Modifikationen. Das Fusionskonstrukt besteht aus der Antigen-kodierenden Sequenz, flankiert am N-terminalen Ende durch ein Sekretionssignal und am C-terminalen Ende durch eine Transmembran- und zytoplasmatische Domäne eines humanen MHC-Klasse-I-Moleküls. Für die gesteigerte Stabilität der IVT-RNA sind die Kappe-Struktur am 3'-Ende und die untranslatierten Regionen des humanen β -Globin Gens (2 β g UTR) sowie der poly(A) Schwanz am 5'-Ende verantwortlich.

3.3 Intranodal applizierte RNA zur Immunstimulation

Wir setzten die zuvor beschriebenen, pharmakokinetisch und immunologisch optimierten Konstrukte nachfolgend ein, um ein Protokoll zur intranodalen (i.n.) Immunisierung mit RNA zu entwickeln.

Zuerst überprüften wir, ob durch diese Methode eine Transfektion lymphknotenresidenter DCs möglich war. Weiterhin wurde die Charakterisierung der Zeit- und Dosiskinetik der i.n. Immunisierung mit RNA angestrebt.

Auch sollten durch i.n. RNA-Immunisierung expandierte T-Lymphozyten hinsichtlich ihrer Markerprofile und funktionellen Eigenschaften charakterisiert werden. Der neu etablierte Immunisierungsmodus sollte hinsichtlich seiner Effizienz mit bereits etablierten Modi verglichen werden. Abschließend wurde eine Evaluierung der i.n. RNA Vakzinierung hinsichtlich der Induktion einer anti-Tumor Immunantwort durchgeführt.

3.3.1 Die Methode der intranodalen RNA Injektion

Die *in vivo* Applikation von RNA erfolgte durch direkte i.n. Injektion in die Leistenlymphknoten betäubter Mäuse. Hierzu wurde der Leistenlymphknoten nach Narkotisierung der Mäuse frei präpariert. Der in einem Fettdrüse einsehbare inguinale Lymphknoten wurde dargestellt und die RNA unter Sicht injiziert (siehe Abb. 3.13).

In Vorversuchen wurde ein maximales Injektionsvolumen von 10µl erarbeitet. Bei erfolgreicher Injektion wurde ein Anschwellen des Lymphknotens bei fehlendem Flüssigkeitsrückfluß beobachtet.

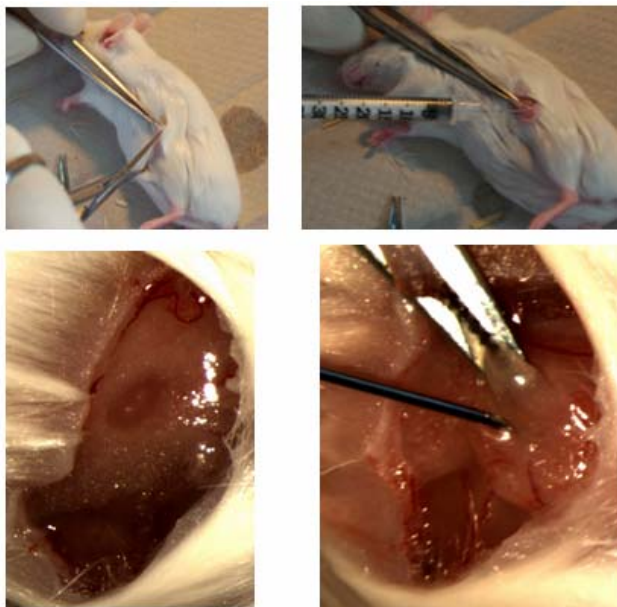


Abb. 3.13: Intranodale Injektion als Applikationsroute einer Vakzine. Durch einen Einschnitt in der inguinalen Hautfalte und anschließende Erweiterung mit der Schere war der Lymphknoten deutlich zu erkennen. Anhand seiner differentiellen Farbe ist der Lymphknoten vom umgebenden Fettgewebe zu unterscheiden. Weiterhin war meistens das den Lymphknoten versorgende Blutgefäß zu erkennen. Nach visueller Lokalisierung des Lymphknotens konnten 7-10 μ l Vakzinformulierung injiziert werden, wodurch ein Anschwellen des Lymphknotens verursacht wurde. Der Hautschnitt wurde am Ende mit Wundklammern verschlossen.

3.3.2 Nachweis der Transfektion dendritischer Zellen nach intranodaler Injektion von RNA

Für die pharmakokinetischen Untersuchungen wurden verschiedene Reportersysteme eingesetzt. Durch Einbau von Cy3- und Cy5-konjugierten Nukleotiden während der *in vitro* Transkription wurden fluoreszenzmarkierte RNA-Moleküle hergestellt, die uns zum direkten Nachweis applizierter Transkripte dienen. Als Reportermolekül zur Quantifizierung der Translation *in vivo* wurde eGFP verwendet. So wollten wir durch Immunfluoreszenzuntersuchungen an Lymphknoten-Schnitten qualitativ die Aufnahme von RNA im morphologischen Zusammenhang beurteilen.

Zur Quantifizierung der Transfektion und Translation nach i.n. RNA-Applikation wurde die multiparametrische Durchflußzytometrie genutzt. Nach Aufarbeitung der Lymphknoten konnten verschiedene Zellpopulationen, welche die RNA aufnahmen, bzw. aufgenommene RNA erfolgreich translatierten, identifiziert, quantifiziert und charakterisiert werden.

3.3.2.1 Durchflußzytometrischer Nachweis der intranodalen Transfektion antigenpräsentierender Zellen nach intranodaler Injektion von RNA

Um zu klären, ob APCs durch i.n. RNA Injektion transfiziert werden, wurde Cy5-fluoreszenzmarkierte RNA hergestellt und den Mäusen i.n. appliziert. Als Negativkontrolle wurden reine Cy5-Nukleotide (NTPs) verwendet, welche ein der Cy5-RNA Probe äquivalentes Fluoreszenzsignal generierten. 30min nach i.n. Injektion von 20µg Cy5-markierter RNA oder Kontrollprobe wurden die Lymphknoten präpariert, aufgearbeitet und mit Antikörpern, die gegen verschiedene Oberflächenmarker gerichtet waren, gefärbt. Die verwendeten Zelloberflächenmarker (CD8, spezifisch für T-Zellen und DC-Subpopulationen; CD11b, spezifisch für Makrophagen und DC-Subpopulationen; CD11c, spezifisch für DCs) ermöglichten die Klassifizierung Cy5-positiver Zellen in unterschiedlichen Zellpopulationen.

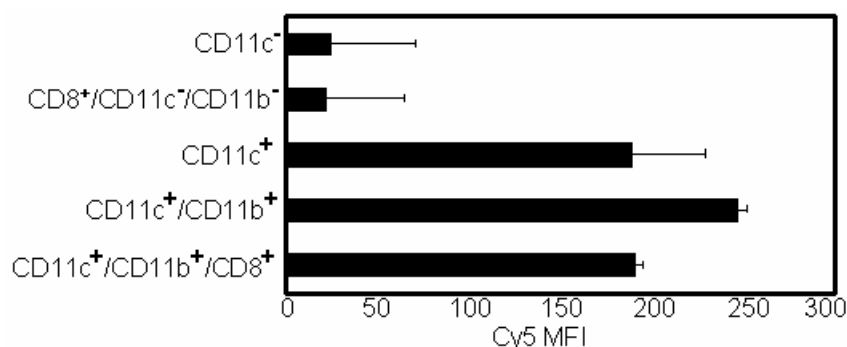


Abb. 3.14: Durchflußzytometrischer Nachweis der Transfektion von DCs nach i.n. Injektion Cy5-markierter RNA. 20µg Cy5-markierte RNA oder äquivalent fluoreszierende Cy5-NTPs als Negativkontrolle wurden i.n. in C57Bl/6 Mäuse (n=3) injiziert. 30min nach der Injektion wurden Lymphknoten präpariert und daraus eine Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit anti-CD8, anti-CD11c und anti-CD11b Antikörpern angefärbt und durchflußzytometrisch auf ein Cy5-Signal hin untersucht. Die Balken zeigen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) die von der Cy5-markierten RNA generiert wurde (nach Substraktion des durch die Negativkontrolle generierten Signals) und die MWAbw. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

In CD11c⁻ Zellen des Lymphknotens (z.B. Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen) konnte nur eine geringe Cy5-Signalintensität nachgewiesen werden. Da Makrophagen im Vergleich zu T-Zellen nur in sehr geringem Umfang im Lymphknoten vorhanden sind und die beobachtete Cy5-Signalintensität in CD8⁺/CD11c⁻/CD11b⁻ Zellen (entspricht CD8⁺ T-Zellen) der von CD11c⁻ Zellen entsprach, konnte davon ausgegangen werden, dass Makrophagen und B-Zellen die Cy5-markierte RNA nicht oder nur in einem äußerst geringem Umfang aufgenommen haben.

Im Unterschied dazu konnte eine sehr starke Cy5-Signalintensität in CD11c⁺ Zellen (entspricht myeloiden DCs) und besonders in CD11c⁺/CD11b⁺ doppelt positiven DCs

nachgewiesen werden. Dies deutete darauf hin, dass lymphknotenresidente CD11b⁺/CD11c⁺ DCs die i.n. injizierte RNA besonders effizient aufgenommen haben. Auch die Subpopulation, der für das Priming naiver T-Lymphozythen relevanten CD8⁺ DCs wies ein starkes Cy5-RNA Signal auf.

3.3.2.2 Immunhistologischer Nachweis der intranodalen Transfektion antigenpräsentierender Zellen durch intranodale Injektion von RNA

Die Transfektion lymphknotenresidentialer Zellen nach i.n. Injektion von RNA konnte auch mit Hilfe Cy3-markierter RNA immunhistologisch nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.15).

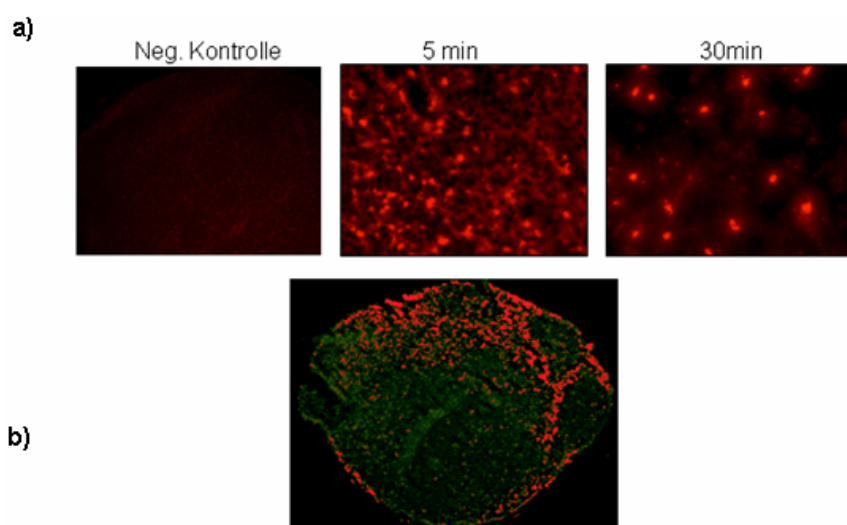


Abb. 3.15: Nachweis der Transfektion lymphknotenresidentialer Zellen nach intranodaler Injektion Cy3-markierter RNA. 20µg Cy3-markierter InfHA-RNA oder Aqua dest. (Negativkontrolle) wurde in Balb/c Mäusen i.n. injiziert. Die Lymphknoten wurden nach 5min, bzw. 30min präpariert und nach ihrer Einbettung in OCT tiefgefroren. Kryoschnitte (6µm) wurden für die Untersuchung des Cy3-Signals (rot) nach PFA-Fixierung verwendet. **A)** Cy3-Signal im Lymphknoten nach 5min, bzw. 30 min, **B)** Gesamtbild eines Lymphknotens, 30min nach Cy3-RNA-Injektion.

Bereits fünf Minuten nach der i.n. Injektion war schon teilweise eine intrazelluläre Lokalisierung der RNA, jedoch mit noch relativ viel Hintergrund-Signal von möglicherweise freier vorliegender RNA, sichtbar, was für einen schnelle RNA-Aufnahme sprach. Dreißig Minuten später zeigte sich ein Bild starker, intrazellulärer Cy3-Fluoreszenzsignale und fast kein Hintergrund-Signal mehr.

Bei der Visualisierung eines kompletten Lymphknotens (Abb. 3.15B) zeigte sich ein Signalmuster, welches, bei Aussparung der B-Zellfollikel, vor allem in der paracorticalen T-Zellzone Cy3-Signale aufwies.

Bei Gegenfärbung mit einem CD11b-reaktiven Antikörper konnte in der immunhistologischen Analyse nachfolgend gezeigt werden, dass vorwiegend CD11b⁺ Zellen ein kolocalisierendes Cy3-Signal aufwiesen (siehe Abb. 3.16). Unter Berücksichtigung der zuvor erfolgten durchflußzytometrischen Analyse (vgl. 3.3.2.1) handelte es sich dabei vorwiegend um myeloide DCs.

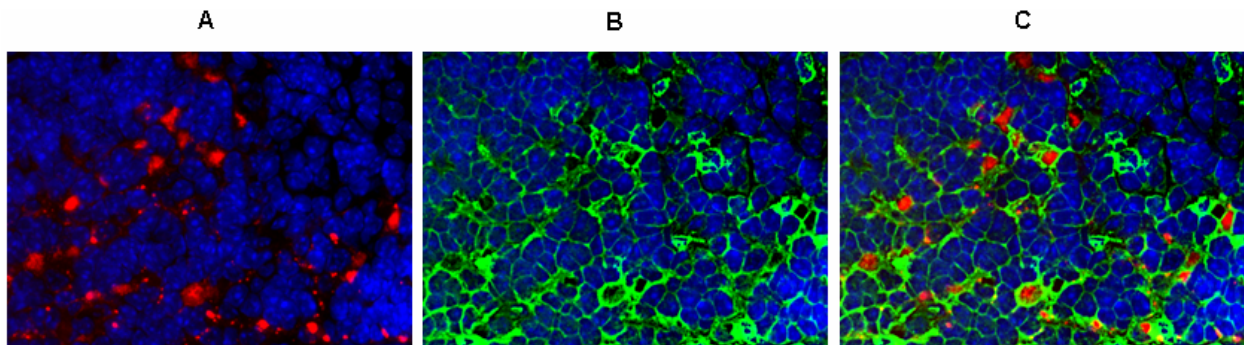


Abb. 3.16: Immunfluoreszenzanalyse zum Nachweis der Transfektion von DCs nach i.n. Injektion Cy3-markierter RNA. 20µg Cy3-markierte InfHA_{opt} RNA wurden in Balb/c Mäuse i.n. injiziert. Nach 30min wurden Lymphknoten präpariert, eingefroren und in OCT eingebettet. Kryoschnitte (4µm) wurden für die Analyse des Cy3-Signals nach PFA Fixierung verwendet. Die Kernfärbung erfolgt mit DAPI. Die gezeigten Schnitte sind repräsentativ für 3-5 Lymphknoten. **A)** Cy3-Signal (rot) und Kernfärbung mit DAPI (blau). **B)** CD11b FITC Signal (grün) mit Kernfärbung. **C)** Overlay: Kolocalisation von Cy3-positiven Zellen mit CD11b positiven Zellen.

3.3.3 Kinetik der RNA-Degradation nach intranodaler RNA-Transfektion

Zur Untersuchung der Degradationskinetik von RNA-Transkripten nach i.n. RNA-Transfektion wurde die quantitative real-time PCR (qRT-PCR) genutzt. Als Reportergen diente dabei eGFP. Mit Hilfe der qRT-PCR konnte der relative eGFP-Transkriptlevel im zeitlichen Verlauf quantifiziert werden.

Aufgrund der nicht vermeidbaren Kontamination der IVT-RNA durch Plasmid-DNA Residuen wurde von jedem Lymphknoten Probe eine Hälfte ohne reverse Transkription prozessiert. Diese Kontrollprobe diente zur Quantifizierung der Plasmid-DNA

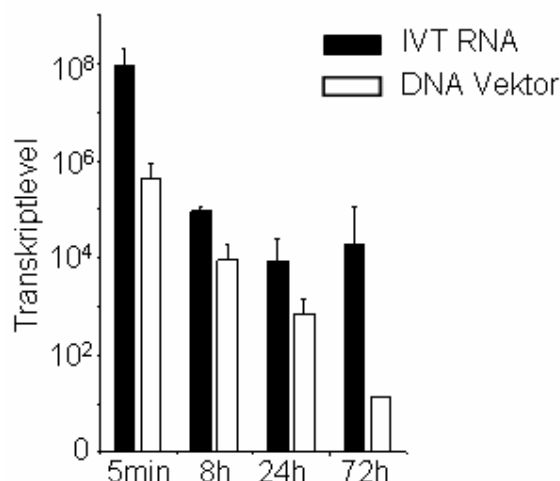


Abb. 3.17: qRT-PCR zur Bestimmung der Degradationskinetik von IVT-RNA nach i.n. RNA-Transfektion. 20µg eGFP-RNA wurden in Lymphknoten von Balb/c Mäusen injiziert (n=3). Nach verschiedenen Zeitpunkten (5min, 8h, 24h und 72h) wurden die Lymphknoten präpariert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der Transkriptlevel von eGFP (IVT-RNA) wurde anhand einer qRT-PCR quantifiziert. Die Durchführung einer qRT-PCR ohne vorherige reverse Transkription (DNA Vektor) diente zur Detektion kontaminierender DNA.

Die qRT-PCR Daten zeigten, dass die eGFP-RNA innerhalb der ersten 8h nach Transfektion einem starken Abbau unterlag (Faktor: ca. 1000). Im Zeitraum von 8-72h zeigte sich jedoch ein weitgehend stabiler Signalverlauf, während die Degradation der Plasmid-DNA kontinuierlich fortschreitend war.

3.3.4 Nachweis der RNA-Translation intranodal applizierter RNA in Lymphknoten residenten dendritischen Zellen

Um zu überprüfen, ob die von Lymphknoten residenten DC aufgenommene IVT-RNA auch translatiert wurde, wurde wiederum eGFP-kodierende IVT-RNA i.n. in Balb/c Mäuse injiziert. Nach 24h wurden die Lymphknoten präpariert, aufgearbeitet und durchflußzytometrisch untersucht.

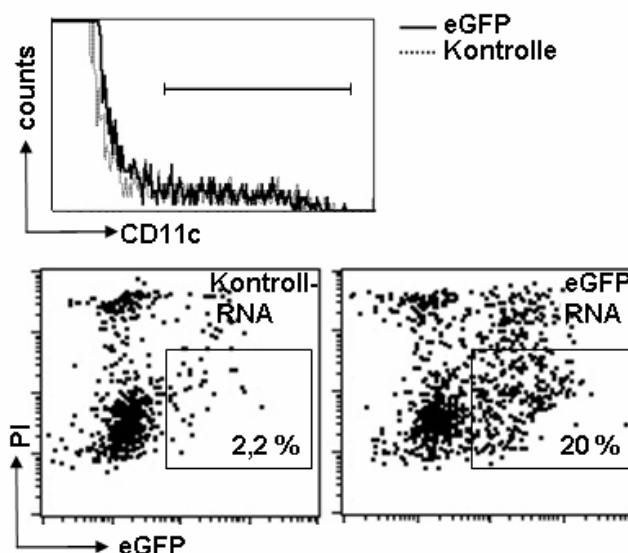


Abb. 3.18: Durchflußzytometrischer Nachweis der RNA-Aufnahme durch DCs und Translation von eGFP. 40µg eGFP-RNA wurden i.n. in Balb/c Mäuse injiziert. Nach 20h wurden die Lymphknoten präpariert und daraus eine Zellsuspension hergestellt. Die Zellen wurden mit anti-CD11c Antikörper angefärbt und im FACS analysiert. Die Dot plots stellen nur die CD11c⁺ Zellen (entspricht DCs) dar. Die angegebenen Zahlen stellen den prozentualen Anteil der eGFP-positiven DCs dar. Die Daten sind repräsentativ für vier Lymphknoten. PI: Propidiumiodid (verwendet zur Unterscheidung vitaler von nicht-vitalen Zellen); Kontroll-RNA: nicht-fluoreszierende NY-ESO-RNA; counts: Zellzahl; waagerechter Strich (obere Abbildung): in die Analyse eingegangene CD11c⁺ Zellen.

Die Analyse ergab, dass bei ca. 20-30 % der im Lymphknoten residenten CD11c⁺ DCs ein signifikantes eGFP-Signal nach i.n. IVT-RNA Applikation nachweisbar war. Dies zeigte, dass die von DCs aufgenommene eGFP-RNA auch translatiert wurde.

3.3.5 Aktivierung dendritischer Zellen durch intranodal applizierte IVT-RNA

Es gibt Hinweise darauf, dass doppel- und einzelstängige RNA nach Erkennung durch Toll-like Rezeptoren (TLRs) zu einer Maturation von DCs führt (Medzhito *et al.*, 2001; Heil *et al.*, 2004).

Um zu klären, ob die i.n. applizierte, nackte RNA ebenfalls zu einer Maturation der DCs führt und somit einen Adjuvanzeffekt ausübt, und inwiefern dieser Dosis-abhängig ist, wurde InfHA-RNA i.n. appliziert und nach 24h lymphknotenresidente DCs hinsichtlich ihres Aktivierungsstatus durchflußzytometrisch untersucht.

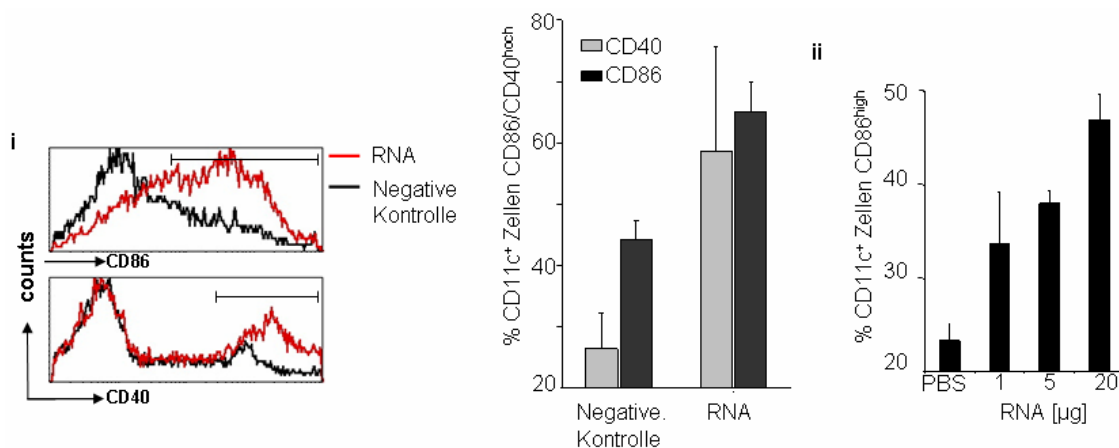


Abb. 3.19: Aktivierung von DCs durch i.n. Injektion von RNA. 20µg InfHA_{opt}-RNA oder Kontroll-Probe (IVT ohne RNA-Polymerase) wurden in Balb/c Mäusen i.n. injiziert (n=3). Nach 24h wurden Lymphknoten präpariert und die daraus isolierten Zellen mit anti-CD11c, -CD86 und -CD40 angefärbt und im FACS analysiert. **i)** Expressionsprofile von CD40 und CD86 auf DCs nach i.n. Applikation von RNA als Histogramm-Analyse. Die Histogramme stellen nur die CD11c⁺ Zellen dar. Die Balken stellen den prozentualen Anteil von CD40 und CD86 hoch exprimierenden DCs dar. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente. **ii)** Abhängigkeit der DC-Aktivierung von der i.n. injizierten RNA-Dosis. Angegeben wurde der prozentuale Anteil der CD11c⁺ und CD86⁺ hoch exprimierender Zellen von allen DCs.

Die durchflußzytometrische Analyse zeigte, dass die i.n. Applikation von IVT-RNA zur vermehrten Expression von CD86 und CD40 auf den DCs führte (Abb. 3.19 i). Für CD86 konnte zudem nachgewiesen werden, dass diese Aktivierung der DCs im Bereich zwischen 1µg und 20µg RNA dosisabhängig erfolgte (Abb. 3.19. ii). Daraus ließ sich schließen, dass die i.n. applizierte IVT-RNA einen Adjuvanzeffekt auf die DCs ausübte.

3.4 Dosis- und Zeitkinetik antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten Immunantworten nach intranodaler IVT-RNA Immunisierung

Eine Vielzahl von Faktoren sind an der Induktion und am Erhalt von effektiven Immunantworten beteiligt. Zu diesen Faktoren gehört z.B. auch die Antigenpersistenz, d.h. die Dauer der Antigenstimulation (Zinkernagel *et.al.*, 1998). Daher sollte nachfolgend die Zeit- und zusätzlich die Dosiskinetik der durch i.n. IVT-RNA Immunisierung induzierten T-Zell Stimulation charakterisiert werden.

Für die immunologischen Untersuchungen zur Zeit- und Dosiskinetik wurden in erster Linie die auf InfHA- und OVA-basierenden Modellantigensysteme verwendet. Beide Antigene lagen in Form von Antigen-MHC-Fusionskonstrukten vor (siehe Abb. 3.12). In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass diese nach Aufnahme und Translation zu einer

effizienten Prozessierung und Präsentation von Epitopen auf MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Molekülen führen.

Als Responderzellen wurden TCR-transgene Lymphozyten verwendet, die MHC-Klasse-I restringierte Epitope (InfHA₅₁₈₋₅₂₆ auf MHC-I H2-K^d bzw. Ovalbumin-SIINFEKL auf H2-K^b) oder das MHC-Klasse-II restringierte InfHA₁₀₇₋₁₁₉ I-E^d Epitop erkennen. Transgene T-Lymphozyten wurden vor dem adoptiven Transfer mit CFSE markiert, so dass ihre Proliferation als Maß der Stimulation gemessen werden konnte. Das Tracking dieser transgenen T-Zellen erfolgte durch Nutzung des Konzeptes varianter Thy1.1 und Thy1.2 Allele zwischen transferierten T-Zellen und T-Zellen der Empfängermause.

3.4.1 Dosiskinetik InfHA-spezifischer CD4⁺ T-Zellantworten

Um zu untersuchen, ob die i.n. Immunisierung mit IVT-RNA eine Dosis-abhängige Rekrutierung und Expansion MHC-Klasse-II restringierter CD4⁺ T-Zellen ermöglicht, wurde ein adoptives Transfersystem mit InfHA spezifischen TCR-transgenen T-Zellen (HA-TCR tg; aa 107-119 I-E^d Epitop) verwendet.

Die InfHA spezifischen TCR-transgenen CD4⁺ T-Zellen wurden vor dem Transfer in die Empfängertiere mit CFSE markiert um eine detaillierte Analyse der durch die i.n. Immunisierung induzierten Zellexpansion zu ermöglichen. Nach durchgeführter i.v. Injektion der T-Lymphozyten erfolgte die i.n. RNA-Immunisierung mit verschiedenen InfHA-RNA Dosen (0,01-20µg). Drei Tage nach der Immunisierung wurden die Milzzellen präpariert und die CFSE-Fluoreszenz der InfHA-TCR transgenen T-Zellen mittels FACS-Analyse untersucht (siehe Abb. 3.20).

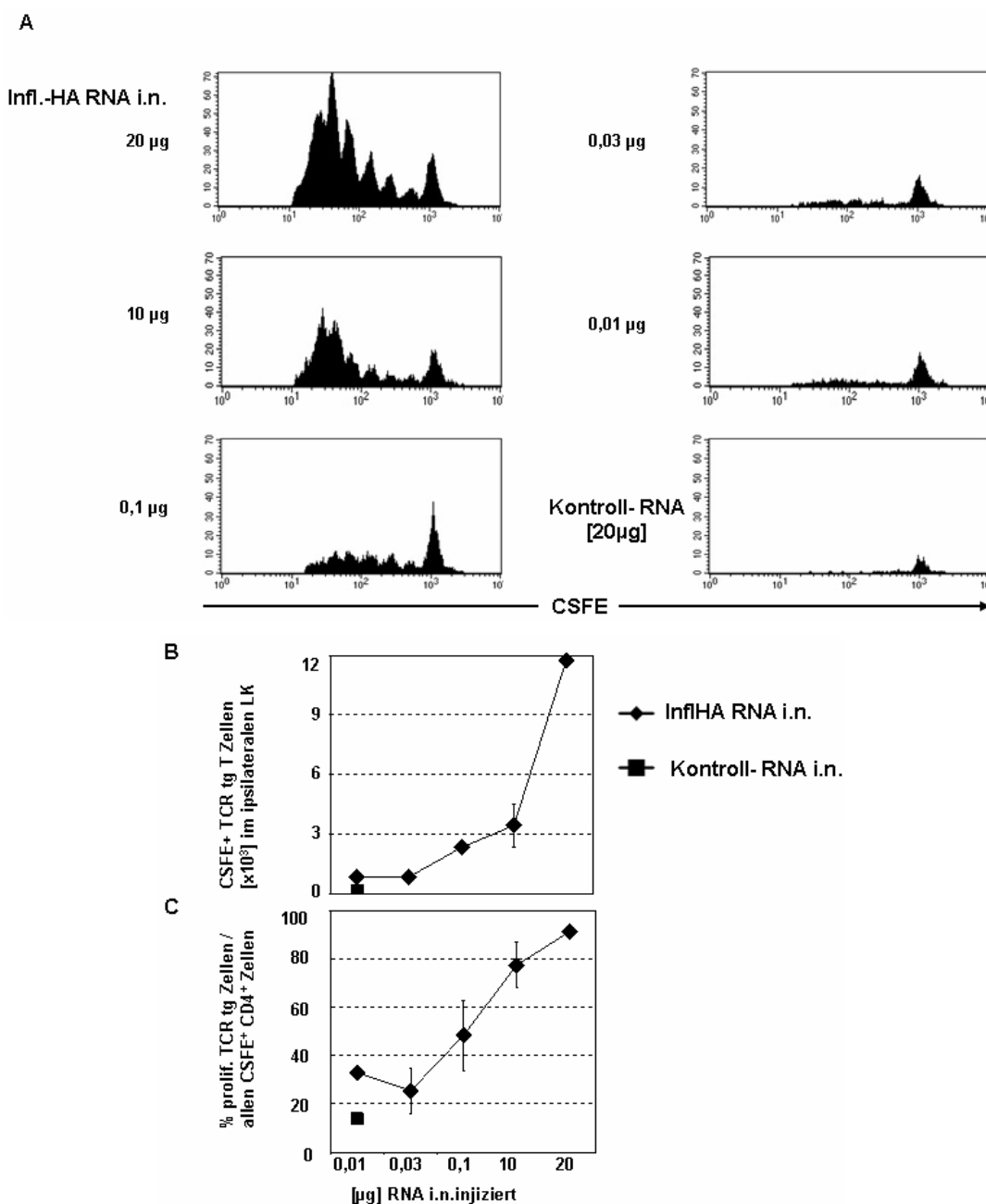


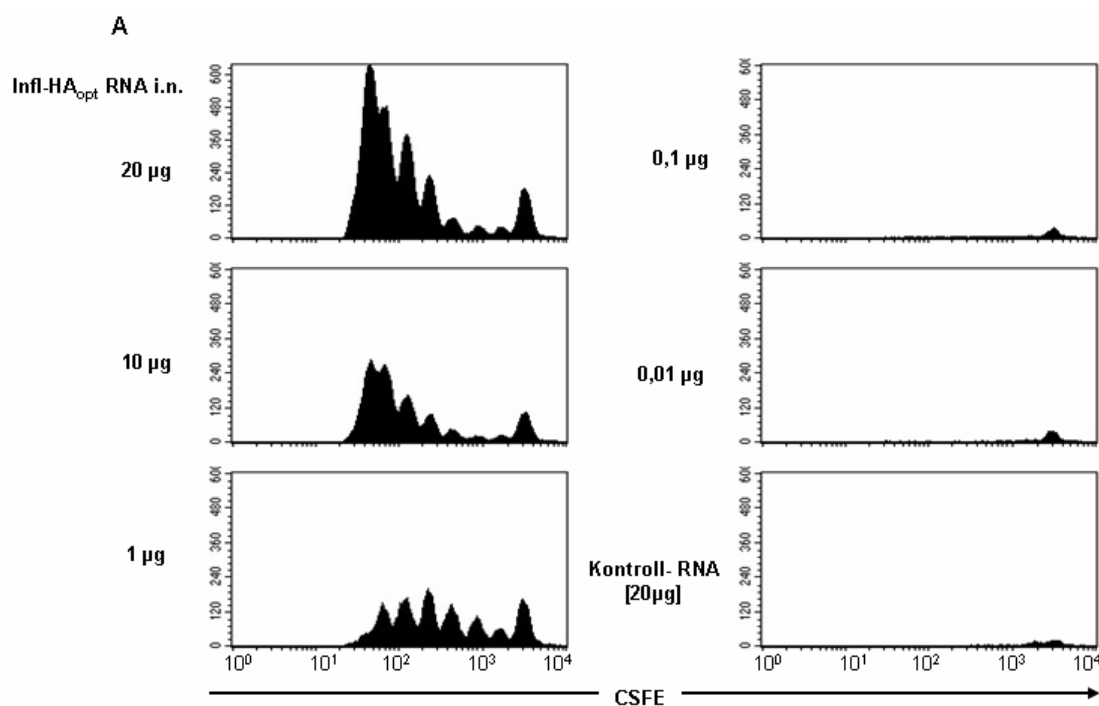
Abb. 3.20: *In vivo* Stimulation InfHA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen durch i.n. Immunisierung mit verschiedenen RNA-Dosen. 5×10^5 CSFE-markierte, InfHA-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden in Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte eine *in vivo* Stimulation durch i.n. Immunisierung mit unterschiedlichen InfHA-RNA Mengen (20, 10, 1, 0,03 und 0,01 µg). Als Kontrolle dienten Mäuse, die mit irrelevanter RNA immunisiert wurden. Nach 3 Tagen wurden die Lymphknoten präpariert, daraus Zellsuspensionen hergestellt und die Fluoreszenz-markierten, transferierten T-Zellen mit anti-CD4⁺- und anti-Thy1.2-Antikörpern angefärbt und im FACS analysiert. **A)** Histogrammanalyse der *in vivo* Expansion InfHA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation durch i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA. **B)** Absolute Zellzahl CSFE-markierter InfHA-transgener CD4⁺ T-Zellen und **C)** Anteil der proliferierenden, transgenen Zellen an allen CSFE-positiven CD4⁺ T-Zellen im Lymphknoten.

Wir konnten zeigen, dass die i.n. Immunisierung mit IVT-RNA zu einer Dosis-abhängigen T-Zell Rekrutierung in den Lymphknoten, sowie zu einer antigenspezifischen Proliferation und Expansion TCR-transgener CD4⁺ T-Zellen *in vivo* führte. Es zeigte sich, dass schon nach Injektion von 0,01 µg InfHA-RNA eine

gegenüber der Kontrollgruppe gesteigerte Rekrutierung antigenspezifischer T-Lymphozyten und eine verstärkte Proliferation derselben induziert werden konnte (siehe Abb. 3.20A). Die Expansion der T-Lymphozyten korrelierte dabei mit der applizierten IVT-RNA-Dosis. Bis zu einer Dosis von 20µg RNA konnte ein exponentieller Anstieg der Anzahl im Lymphknoten lokalisierter InfHA-spezifischer T-Lymphozyten beobachtet werden. Bei Applikation von 20µg RNA wurde kein Absättigungsplateau bezüglich der T-Zellexpansion erreicht (Abb. 3.20B und C).

3.4.2 Dosiskinetik InfHA-spezifischer CD8⁺ T-Zellantworten

Zur Untersuchung der Beziehung zwischen applizierter RNA-Dosis und Expansion antigenspezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten wurden CSFE-markierte, CL4-InfHA-spezifische T-Lymphozyten in Thy1.1⁺ Balb/c Mäuse adoptiv transferiert und anschließend die Immunisierung mit verschiedenen RNA-Dosen durchgeführt. Die Proliferation InfHA-spezifischer, CSFE-markierter CD8⁺ T-Zellen erfolgte wiederum durchflußzytometrisch.



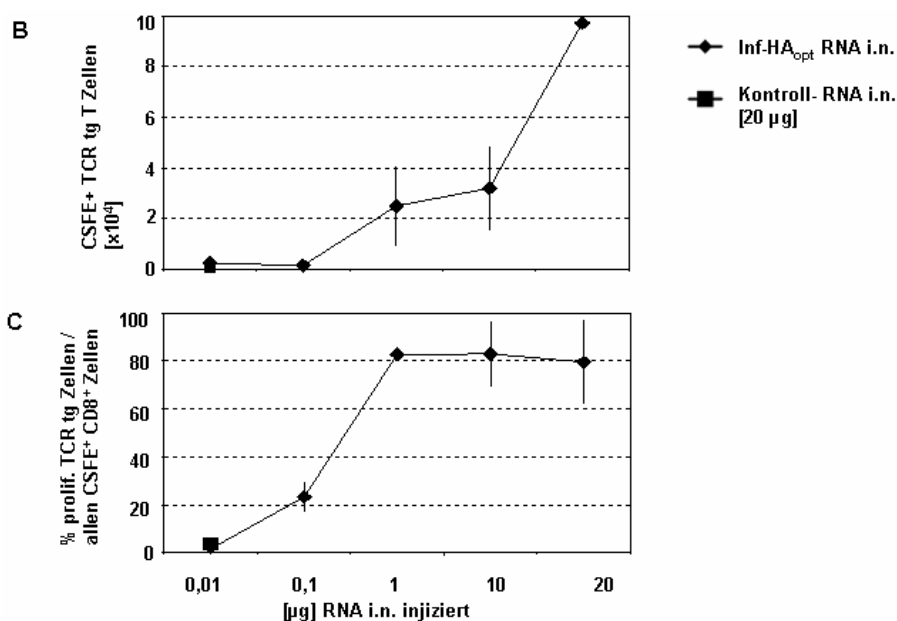


Abb. 3.21: *In vivo* Stimulation InfHA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch i.n. Immunisierung mit verschiedenen RNA-Dosen. $7,5 \times 10^5$ CSFE-markierte CL4-InfHA-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden in Thy1.1⁺ Balb/c Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die *in vivo* Stimulation durch i.n. Immunisierung mit unterschiedlichen InfHA-RNA Dosen (20, 10, 1, 0,03 und 0,01 µg). Als Kontrolle dienen Mäuse, die mit irrelevanter RNA immunisiert wurden. Nach drei Tagen wurden die Lymphknoten präpariert, daraus Zellsuspension angefertigt und die fluoreszenzmarkierten, transferierten Zellen mit anti-CD8⁺- und anti-Thy1.2-Antikörpern angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. **A)** Histogrammanalyse der Proliferation. **B)** Anteil der proliferierenden transgenen Zellen an allen CSFE positiven CD8⁺ T-Zellen. **C)** Absolute Zellzahl CSFE-markierter, InfHA-transgener CD8⁺ T-Zellen.

Ähnlich wie bei der Expansion von CD4⁺ T-Lymphozyten zeigte sich auch hier eine deutliche Abhängigkeit der T-Zellexpansion und Proliferation von der injizierten Antigenosis. Allerdings war, bei Verwendung der identischen IVT-RNA, erst bei einer Applikation von 0,1 µg RNA eine Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen nachzuweisen. Eine deutliche Akkumulation der InfHA-reaktiven T-Lymphozyten zeigte sich ab einer RNA-Menge von 1 µg. Während schon bei 1 µg RNA praktisch eine komplette Rekrutierung der T-Lymphozyten zur Proliferation erfolgte, konnte auch bei der Dosisstufe von 20 µg, in Analogie zu den Daten für CD4⁺ T-Lymphozyten, keine Saturation bezogen auf die Expansion der CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden.

Nachfolgend untersuchten wir den Einfluß noch höherer RNA-Dosierungen auf die Proliferation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen. Der Ablauf dieser Untersuchung ist analog zum vorbeschriebenen Experiment, allerdings erfolgte die Immunisierung mit 1, 20 und 60 µg InfHA-RNA.

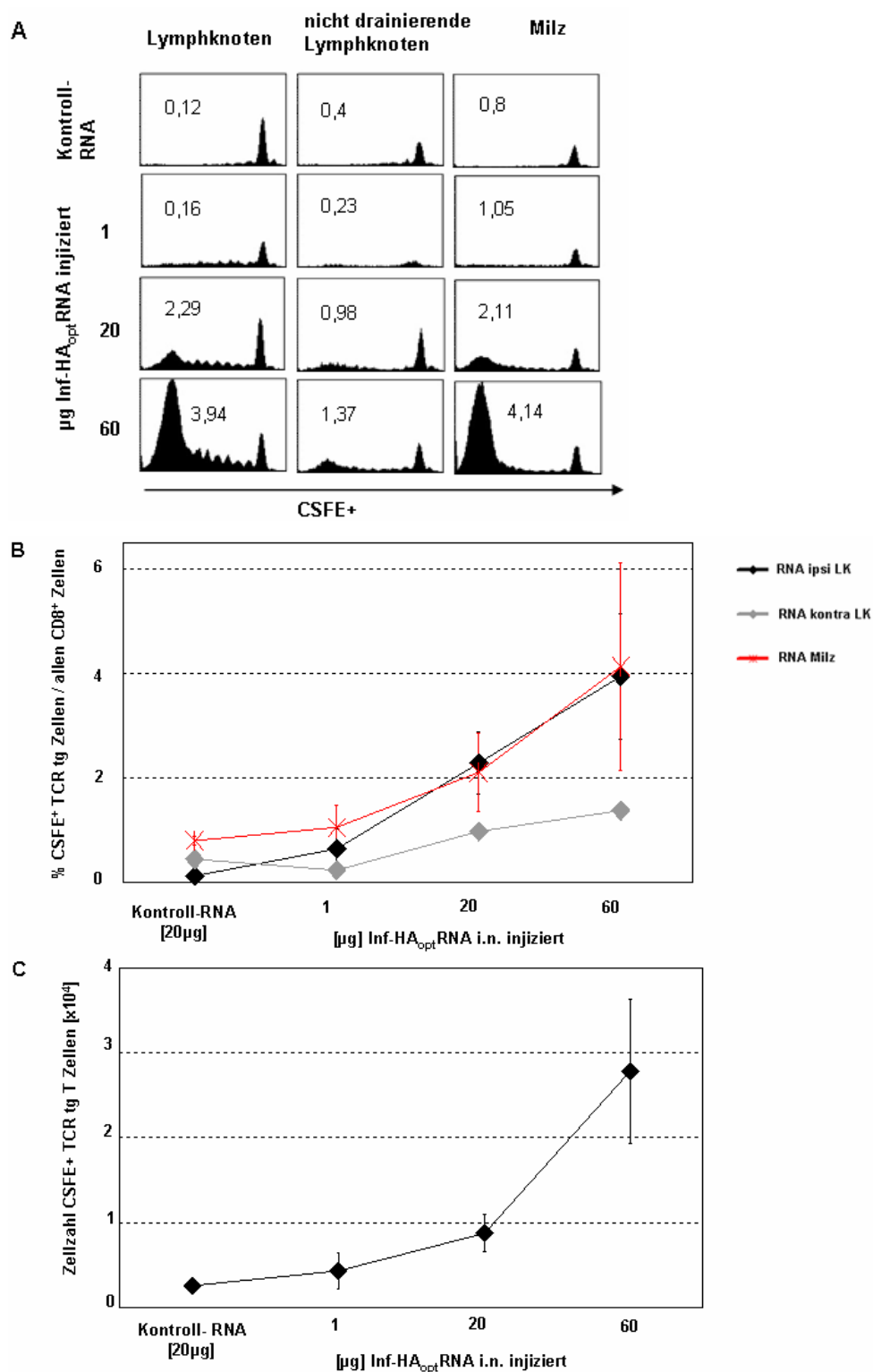


Abb. 3.22: *In vivo* Stimulation InfHA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch i.n. Immunisierung mit hohen RNA-Dosen. 1×10^6 CSFE-markierte CL4-InfHA-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden in Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die i.n. Immunisierung mit 1, 20 oder 60 µg RNA. Als Kontrolle wurde irrelevante RNA oder Peptid appliziert. Am Tag fünf wurde den Mäusen Lymphknoten (ipsilaterale und kontralaterale) sowie Milzen entnommen und im Durchflußzytometer auf CFSE-markierte Zellen untersucht. **A)** Histogramm der Proliferation TCR-transgener, CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit InfHA RNA. Die angegebene Zahlen stellen die Prozentzahlen TCR-transgener CD8⁺ T-Zellen der Gesamt-CD8⁺ Population dar. **B)** Anteil der proliferierenden transgenen Zellen an allen CSFE-positiven CD8⁺ T-Zellen. **C)** Absolute Zellzahl CSFE-markierter InfHA-transgener CD8⁺ T-Zellen.

Wie in Abbildung 3.22 zu sehen ist, wurde die maximale Expansion auch nach i.n. Gabe von 60µg RNA noch nicht erreicht, da keine Saturation der T-Zellexpansion, die sich als Plateauphase widerspiegeln würde, detektiert wurde. Der Anteil InfHA-TCR transgener T-Zellen an allen CD8⁺ T-Zellen sowohl im Lymphknoten als auch in der Milz nahm mit ansteigender RNA-Dosis weiterhin zu.

3.4.3 Zeitkinetik der InfHA-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort und Aktivierungsstatus der antigenspezifischen CD4⁺ T-Zellen

Um zu untersuchen, wie anhaltend der proliferative Stimulus der i.n. RNA-Immunisierung auf T-Lymphozyten wirkt, wurde ein adoptiver Transfer von CFSE-markierten, InfHA-TCR transgenen CD4⁺ T-Zellen in Balb/c-Thy1.1 Mäuse mit anschließender i.n. RNA-Immunisierung genutzt. Nach 3, 5, 7 und 12 Tagen wurden die Lymphknoten (ipsilateral und kontralateral), sowie die Milz präpariert und Blut entnommen und nachfolgend durchflußzytometrisch analysiert.

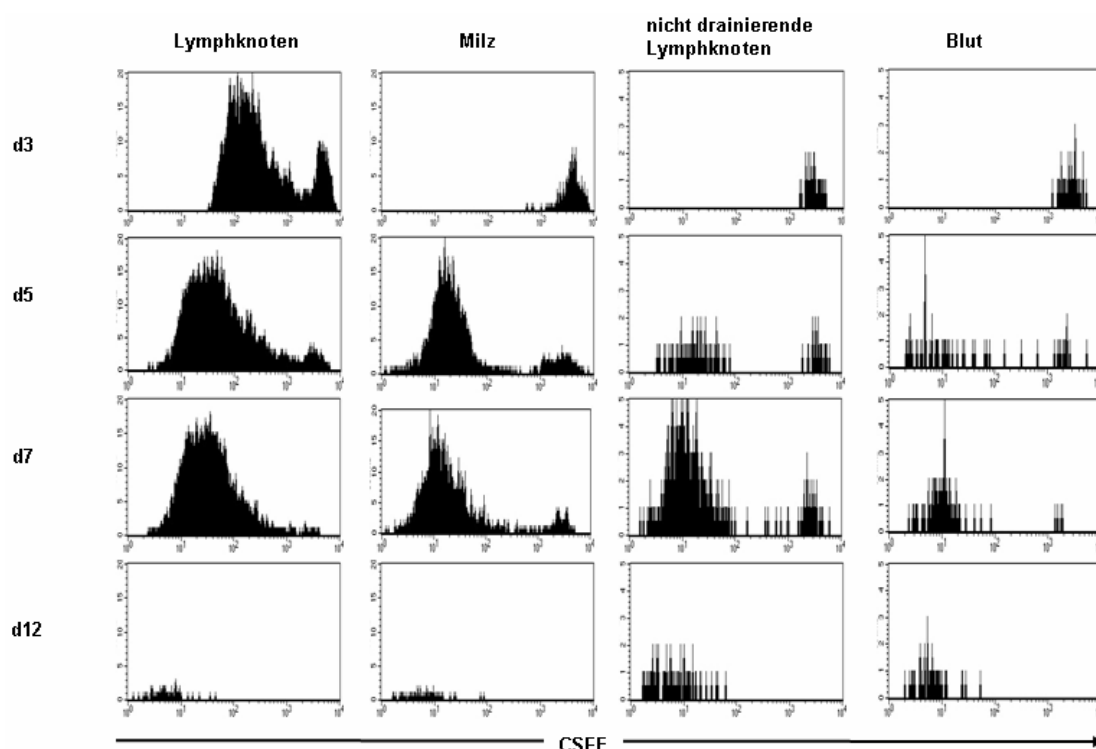
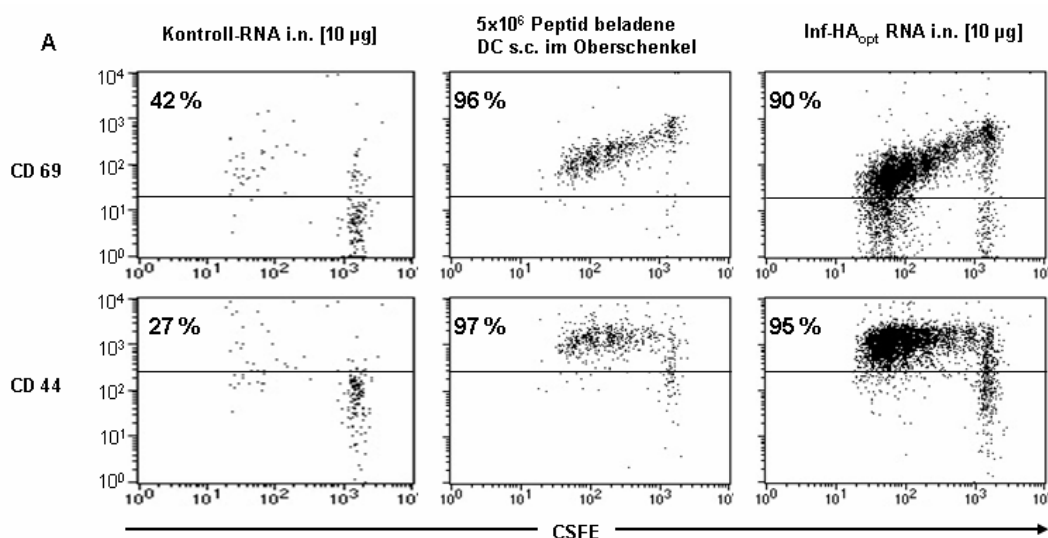


Abb. 3.23: Zeitlicher Verlauf der Proliferation InfHA-spezifischer, adoptiv transferierter CD4⁺ TCR-transgener T-Lymphozyten in Lymphknoten, Milz und Blut von Mäusen, die i.n. mit InfHA-RNA immunisiert wurden. 5×10^5 CFSE-markierte, InfHA-spezifische CD4⁺ T-Zellen wurden in Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte eine *in vivo* Stimulation durch i.n. Immunisierung mit 20µg InfHA RNA. Als Kontrolle dienten Mäuse, die mit irrelevanter RNA immunisiert wurden. Nach 3, 5, 7 und 12 Tagen wurden die Lymphknoten und Milzen präpariert und daraus Zellsuspensionen hergestellt. Darüber hinaus wurde Blut entnommen. Die Fluoreszenz-markierten, transferierten T-Zellen wurden mit anti-CD4⁺- und anti-Thy1.2-Antikörpern angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

Bereits am Tag 3 nach der Immunisierung konnte im behandelten Lymphknoten eine antigenspezifische Proliferation beobachtet werden, während in Milz, Blut und irrelevantem Lymphknoten nur naive, nicht-proliferierende, antigenspezifische CD4⁺ T-Lymphozyten vorhanden waren. Die maximale Proliferation im Lymphknoten wurde am Tag 5 erreicht, an welchem auch in der Milz, dem kontralateralen Lymphknoten und im Blut proliferierende CD4⁺ T-Lymphozyten messbar waren. Die Frequenz der antigenspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten nahm vom Tag 7 an massiv ab, so dass am Tag 12 nur noch geringe Mengen proliferierter CD4⁺ T-Lymphozyten und keine naiven, antigenspezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten mehr nachweisbar waren.

Neben der Expansion der adoptiv transferierten CD4⁺ T-Zellen wurde auch deren Aktivierungsstatus durch Analyse von Aktivierungsmarkern, wie z.B. CD69 und CD44, die auf der Oberfläche von stimulierten CD4⁺ T-Zellen exprimiert werden, bestimmt.

Zur Untersuchung der Zelloberflächenexpression der Aktivierungsmarker wurden die Milzen aus immunisierten Mäusen isoliert, daraus Zellsuspensionen hergestellt und mit anti-CD4, anti-CD44 und CD69-Antikörper angefärbt. Als Kontrolle dienten Milzzellen aus Mäusen, die mit irrelevanter RNA (NY-ESO-RNA) immunisiert worden waren. Die Analyse der Expression der Aktivierungsmarker erfolgte im Durchflusszytometer.



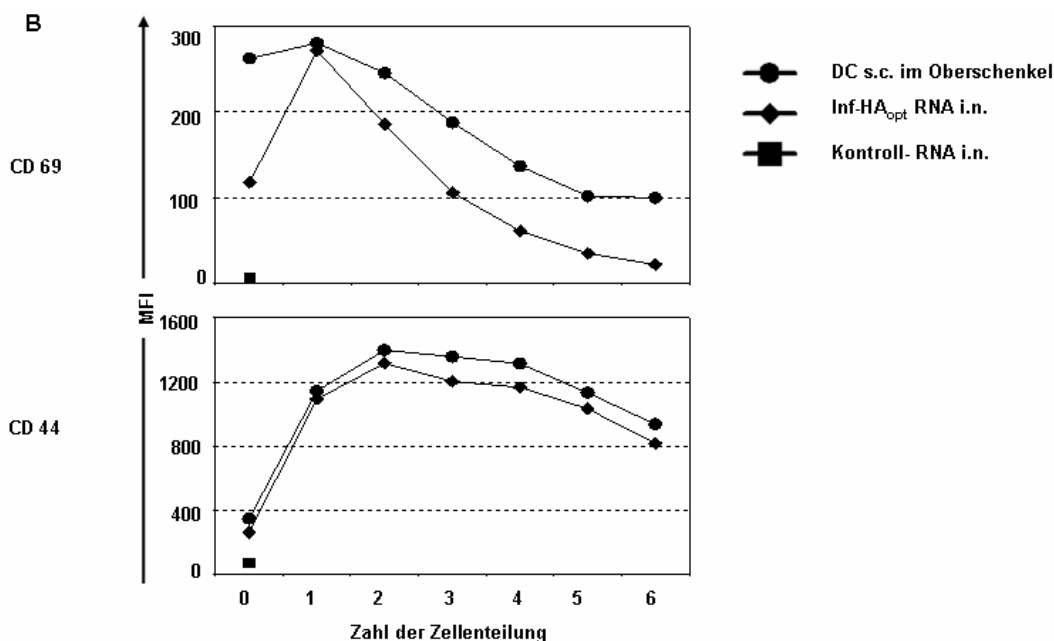


Abb. 3.24: Analyse der Zelloberflächenexpression der Aktivierungsmarker CD69 und CD44 auf InfHA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen während der Proliferation nach i.n. Immunisierung mit RNA. A) Dot Plot Darstellung der Expression von Aktivierungsmarkern. B) Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) der exprimierten Marker während der Zellteilungen. 1×10^6 TCR-HA-transgene T-Lymphozyten wurden in Thy1.1 Mäusen i.v. adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die i.n. Immunisierung mit Kontroll-RNA oder InfHA-RNA. Zum Vergleich wurde eine Gruppe von Mäusen DCs verabreicht, die vorher mit InfHA-Peptid (HA₁₁₀₋₁₁₉) beladen wurden. Am Tag 3 wurden die Milzen isoliert, die Erythrozyten lysiert und die Zellsuspension mit anti-CD69-, anti-CD44- und anti-Thy1.2-Antikörpern angefärbt. Die Expression der Aktivierungsmarker auf CSFE-markierten, expandierten, TCR-HA-transgenen CD4⁺ T-Zellen wurde durchflußzytometrisch analysiert.

Wie in Abbildung 3.24 zu erkennen, exprimierten ca. 95% der CD4⁺ InfHA-TCR transgenen T-Zellen nach i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA die Aktivierungsmarker CD69 und CD44 auf ihrer Oberfläche. Die Hochregulation dieser Marker war dabei äquivalent zu den Messergebnissen nach zellulärer Immunisierung (Abb. 3.26A).

Der CD69 Marker wurde nach Aktivierung transient hochreguliert mit einem Maximum nach der ersten Zellteilung, woraufhin er mit jeder weiteren Teilung langsam wieder herunterreguliert wurde. (Abb. 3.26B). Der Verlauf der Expression von CD44 zeigte dagegen eine frühe Hochregulation, gefolgt von einer nur geringen Abschwächung der Expression mit fortschreitender Proliferation.

3.4.4 Zeitkinetik der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellantwort nach intranodaler RNA Immunisierung und Aktivierungsstatus der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen

Die Untersuchung der Zeitkinetik sowie des Aktivierungsstatus InfHA-spezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten nach i.n. RNA-Immunisierung erfolgte analog zur Analyse der CD4⁺ T-Zellantwort (vgl. 3.4.5). Als Marker für die Charakterisierung des Aktivierungsstatus

fungierte dabei der homing Rezeptor L-Selektin (CD62L), dessen Expression nach erfolgter Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen auf deren Zelloberfläche herunterreguliert wird. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Lymphknoten, bzw. Milzen präpariert und Blut entnommen. Als Kontrolle dienten Zellen aus Mäusen, die mit irrelevanter IVT-RNA (NY-ESO-RNA) immunisiert worden waren. Die Zellen wurden mit antiThy1.2-, anti-CD62L und anti-CD8⁺ Antikörpern angefärbt und die CFSE-markierten Populationen durchflußzytometrisch analysiert.

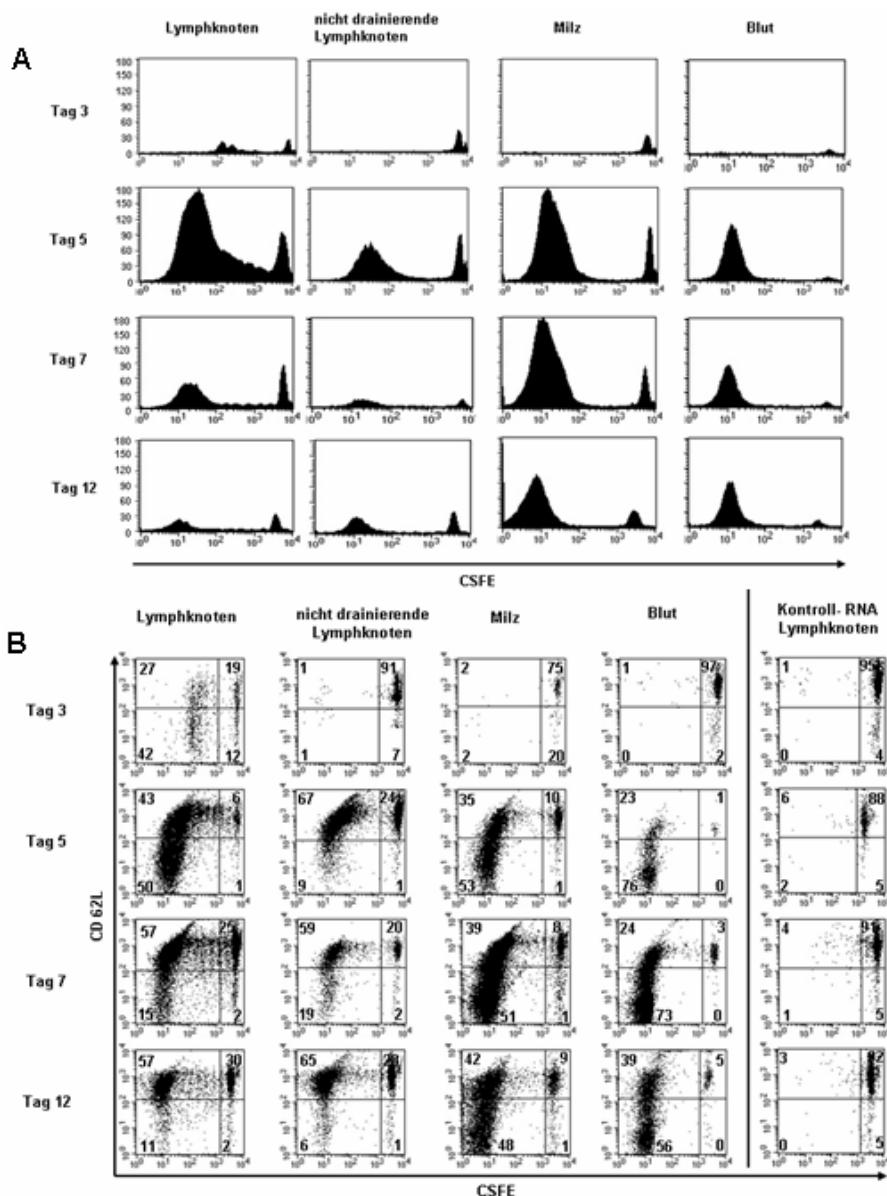


Abb. 3.25: Zeitlicher Verlauf der Proliferation und Charakterisierung InfHA-spezifischer, adoptiv transferierter CD8⁺ TCR-transgener T-Lymphozyten in Lymphknoten, Milz und Blut von Mäusen, die i.n. mit InfHA-RNA immunisiert wurden. A) FACS-Analyse der Proliferation. B) Charakterisierung expandierter InfHA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen anhand der CD62L Expression. 5x10⁵ CSFE-markierte, InfHA-spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden adoptiv in Thy1.1 Mäusen transferiert. Anschließend erfolgte eine *in vivo* Stimulation durch i.n. Immunisierung mit 20µg InfHA-RNA. Als Kontrolle dienten Mäuse, die mit irrelevanter RNA (NY-ESO-RNA) immunisiert wurden. Nach 3, 5, 7 und 12 Tagen wurden die Lymphknoten und Milzen präpariert und daraus Zellsuspensionen hergestellt. Darüber hinaus wurde Blut entnommen. Die Fluoreszenz-markierten, transferierten T-Zellen wurden mit anti-CD8⁺-, anti-CD62 und anti-Thy1.2-Antikörpern angefärbt und durchflußzytometrisch analysiert.

Äquivalent zur Zeitkinetik der CD4⁺ T-Zellproliferation (siehe 3.4.3) zeigten antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen im behandelten Lymphknoten schon am Tag 3 erste Zeichen einer Proliferation, während zu diesem Zeitpunkt in Blut und Milz ausschließlich naive T-Zellen detektierbar waren. Die maximale Akkumulation der InfHA-reaktiven T-Lymphozyten im Lymphknoten war am Tag 5 messbar. Danach zeigte sich eine rasche Verminderung der Frequenz antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten, während die maximale T-Zellfrequenz in Milz und Blut am Tag 5 erreicht wurde (Abb. 3.25A).

Darüber hinaus zeigte sich im Lymphknoten eine Abnahme der proliferierenden CD8⁺ CD62L niedrig exprimierenden T-Zellen vom Tag 5 (50%) zum Tag 7 (15%) (Abb. 3.25C). Diese Abnahme kann durch die Migration von expandierten T-Zellen aus dem Lymphknoten in die Peripherie und Organe begründet werden. In den immunisierten Lymphknoten zeigten sich auch am Tag 7 und 12 antigenspezifische CD8⁺ T-Zellen in frühen und intermediären Proliferationszyklen. Die prolongierte Antigen-Expression, welche die fortdauernde Stimulation von naiven antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen in immunisierten Lymphknoten induziert, könnte hierfür verantwortlich sein.

In der Milz und im Blut erschienen die proliferierenden Zellen zuerst am Tag 5 und die Frequenz der proliferierenden CD8⁺ T-Zellen erreichte ihr Maximum am Tag 7 (Abb. 3.25A). Wie zu erwarten, waren die CD62L niedrig exprimierenden Zellen mit 94% der antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen die dominante Population im Blut (Abb. 3.25C).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, dass die i.n. Immunisierung mit optimierter, Antigen-kodierender IVT-RNA sowohl zu einer dosis- als auch zeitabhängigen, Expansion antigenspezifischer CD4⁺, bzw. CD8⁺ T-Zellen führte und diese in einen aktivierten Zustand überführt wurden.

3.5 Funktionelle Charakterisierung expandierter, antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen nach intranodaler RNA Immunisierung

Im Weiteren sollte untersucht werden, ob neben der Proliferation und Expansion von T-Zellen nach i.n. RNA Immunisierung auch eine *in vivo* Ausdifferenzierung der T-Zellen erfolgt, welche dieselben zur Exekution ihrer Effektorfunktionen befähigt. Nur dann wären die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Anwendung der i.n. Applikation von IVT-RNA als Vakzinformat gewährleistet. Zur Analyse der T-Zell Effektorfunktionen

wurden Aspekte wie Zytokinproduktion, Oberflächenmarkerprofile und die T-Zell vermittelte Zelllyse untersucht.

3.5.1 Zytokinproduktion expandierter CD8⁺ T-Zellen

Zusätzlich zur Proliferation sollte die Funktionalität der aktivierten, antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell charakterisiert werden. Dazu wurde als ein Parameter ihre IFN- γ Produktion im ELISPOT gemessen. Der Assay wurde mit Hilfe einer Milzzellsuspension durchgeführt. Als Targetzellen dienten APCs, wie DCs, B-Zellen und Makrophagen, die in der Milz vorhanden waren und mit MHC-Klasse-I restringiertem InfHA-Peptid beladen wurden. Als Effektoren fungierten in der Milz vorhandene, adoptiv transferierte, InfHA-spezifische CD8⁺ T-Zellen, die zuvor durch i.n. Immunisierung mit InfHA-IVT-RNA aktiviert wurden und mit CFSE markiert waren.

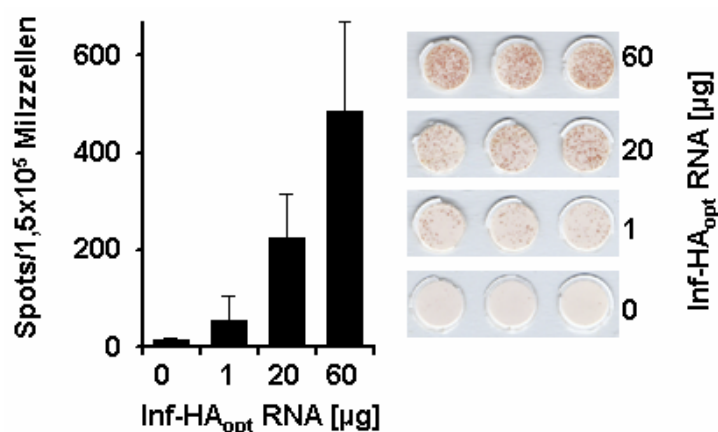


Abb. 3.26: Produktion von IFN- γ durch CD8⁺ antigenspezifische T-Zellen nach i.n. Stimulation mit verschiedenen InfHA-RNA Dosen. 1×10^6 CD8⁺ TCR-CL4 T-Zellen wurden am Tag -1 in Balb/c-Thy1.1⁺ Mäuse (n=3) nach CFSE-Markierung adoptiv transferiert. Mäuse wurden i.n. mit 20 μ g Kontroll-RNA (NY-ESO-RNA) oder unterschiedlichen Dosen von InfHA-RNA (1, 20 oder 60 μ g RNA) am Tag 0 immunisiert. Am Tag 5 wurden Milzzellen präpariert und nachfolgend ein IFN- γ ELISPOT durchgeführt. Dabei wurden $1,5 \times 10^5$ Milzzellen verwendet, die mit 2 μ g/ml InfHA-Peptid₅₁₂₋₅₂₀ beladen wurden. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die MWAbw. Das eingescannte Bild zeigt die originalen ELISPOT Triplikate aus einer Maus.

Die Milzzellen aus der Kontrollgruppe zeigten erwartungsgemäß keine IFN- γ Produktion. Die Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen durch i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA führte hingegen zu einer dosisabhängigen IFN- γ Produktion.

3.5.2 Charakterisierung expandierter InfHA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen anhand der Expression von Aktivierungsmarkern

Die Effektorfunktion antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen konnte indirekt auch durch die Untersuchung ihres Aktivierungsstatus charakterisiert werden. Als spezifischer Aktivierungsmarker fungierte hierbei der Chemokinrezeptor CCR5, der nur von Effektorzellen exprimiert wird (Silva *et al.*, 2005 und Zaunders *et al.*, 2006).

Zur Bestimmung der Aktivierungsstatus der expandierten, InfHA-spezifischen CD8⁺ T-Zellen wurden Zellsuspensionen aus Milzen und Lymphknoten InfHA-IVT-RNA immunisierter Mäuse mit anti-Thy1.2-, anti-CD8⁺- und anti-CCR5 Antikörpern angefärbt und im Durchflußzytometer auf CFSE-markierte Zellen hin untersucht.

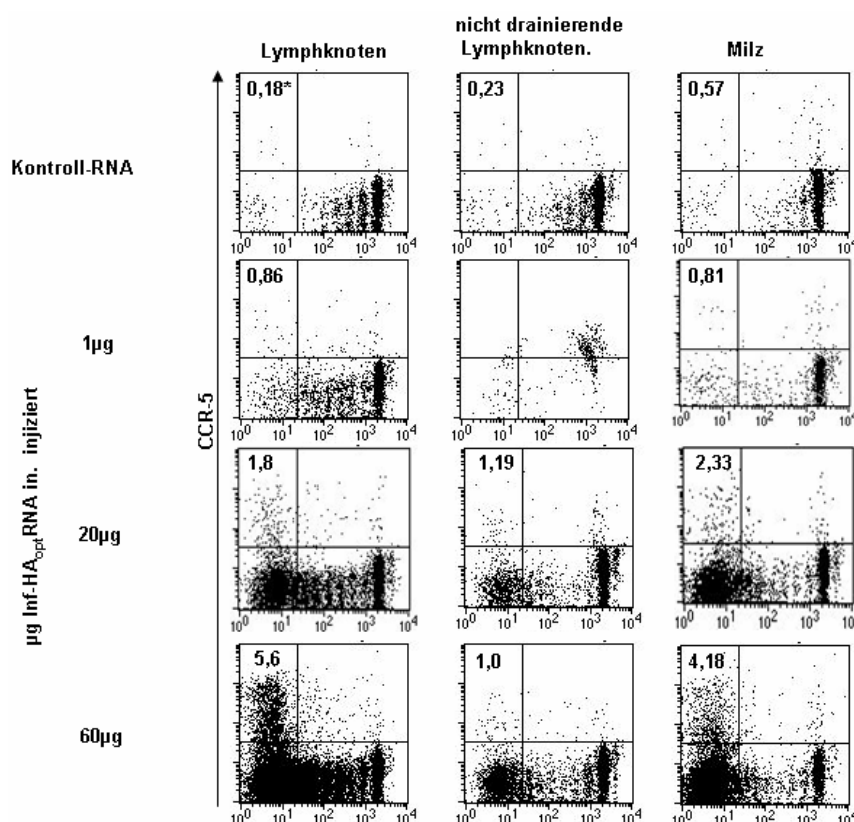


Abb. 3.27: Charakterisierung expandierter InfHA-spezifischer CD8⁺ T-Zellen anhand der Expression von Aktivierungsmarkern auf ihrer Zelloberfläche nach Stimulation durch i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA. 1×10^6 CL4-InfHA spezifische CD8⁺ T-Zellen wurden in Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die Immunisierung mit 1, 20 und 60 µg Inf-HA_{opt}-RNA. Als Kontrolle wurde den Mäusen irrelevante RNA appliziert. Die Zellen aus Lymphknoten und Milzen immunisierter Mäuse wurden mit anti-Thy1.2-, anti-CCR5- und anti-CD8⁺ Antikörpern angefärbt und die CFSE-markierten Populationen durchflußzytometrisch analysiert. Die angegebenen Zahlen stellen die Prozentzahlen CCR5⁺ CFSE-markierter, transgener CD8⁺ T-Zellen der Gesamt-CD8⁺ Population dar.

Die Daten dieser Analyse zeigten, dass die Expression des Aktivierungsmarkers CCR5 sowohl in den Lymphknoten als auch in der Milz nach i.n. InfHA-RNA Immunisierung

dosisabhängig zunahm. Der Anteil CCR5⁺ CFSE-markierter, transgener CD8⁺ T-Zellen war in der Kontrollgruppe hingegen nur sehr gering.

3.5.3 Generierung zytotoxischer Effektorzellen durch intranodale RNA Immunisierung

Um neben der Expansion und der Effektorzytokinproduktion auch die Induktion funktioneller, zytotoxischer T-Lymphozyten durch i.n. Immunisierung mit IVT-RNA zu überprüfen, wurde der Effekt der Immunisierung auf die Differenzierung der CD8⁺ T-Lymphozyten durch *in vivo*-Zytotoxizitätstests untersucht.

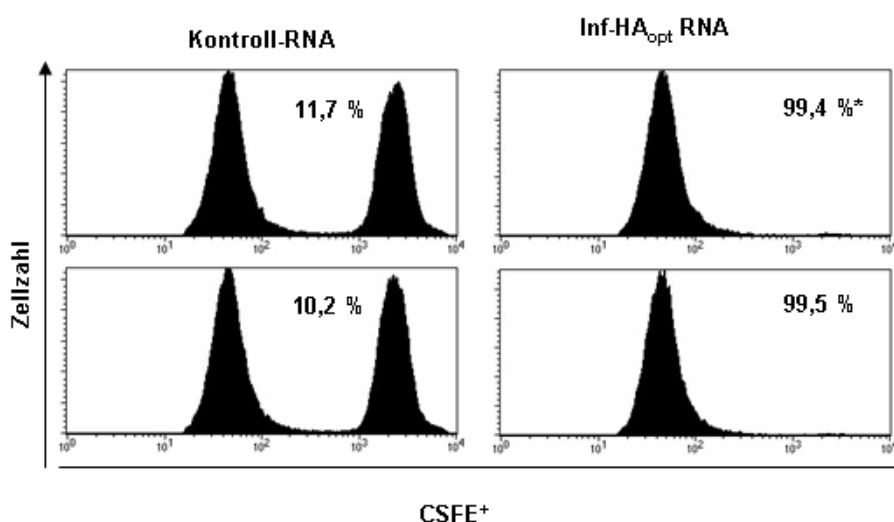


Abb. 3.28: Generierung zytotoxischer Effektorzellen durch i.n. RNA Immunisierung. CD8⁺ TCR-CL4 Milzzellen wurden am Tag -1 adoptiv in Balb/c Thy1.1 Mäuse transferiert ($7,5 \times 10^5$ transgene CD8⁺ T-Zellen je Maus). 24h nach dem Zelltransfer wurden die Tiere mit 20µg InfHA-RNA, bzw. einer irrelevanten RNA(Nyeso-RNA) i.n. immunisiert. 5 Tage nach der Immunisierung wurde zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen ein *in vivo* Zytotoxizitätstest (siehe 2.2.3.6) durchgeführt. Dazu wurden zwei Populationen an Milzzellen vorbereitet; Population 1 wurde mit 5µM CFSE markiert und mit 10µM InfHA-Peptid Klasse I (HA₅₁₈₋₅₂₆) beladen, Population 2 wurde mit 0,5µM CFSE markiert und mit 10µM irrelevantem Peptid (SSX2-Peptid) beladen. 1×10^7 Zellen je Population (d.h. 2×10^7 Gesamtzellen) wurden je Maus adoptiv transferiert. 18h nach dem Zelltransfer wurden die Milzzellen aus den Mäusen isoliert und auf Wiederfindung der Fluoreszenz-markierten, transferierten Zellpopulationen durchflußzytometrisch analysiert. Im Histogramm sind die Muster der CFSE-Markierung der isolierten Milzzellen dargestellt. In diesem Experiment wurden je immunisierter Tiergruppe 3 Mäuse analysiert. Für die Kontrollgruppen wurden je 2 Tiere untersucht.

In den Kontrolltieren, in die CL4-Balb/c Milzzellen adoptiv transferiert und die mit irrelevanter RNA immunisiert worden waren, wurde eine Lyse der Zielzellen von 10-11% beobachtet. Nach Immunisierung mit InfHA-RNA wurde hingegen eine spezifische Lyse von über 99% gemessen, was auf eine hoch effiziente Induktion von Effektorfunktionen hinwies.

Als zusammenfassendes Ergebnis lässt sich eine effiziente Generierung von zytotoxischen, antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell nach i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA festhalten. Die i.n. Vakzinierung mit IVT-RNA führte zu einer starken Aktivierung und Proliferation InfHA-spezifischer zytotoxischer T-Zellen. Die starke Expansion korrelierte dabei mit einer starken, antigenspezifischen, zytolytischen Aktivität.

3.6 Simultane Expansion antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach intranodaler Immunisierung mit RNA

Nachdem sowohl die Expansion von CD4⁺ als auch von CD8⁺ T-Lymphozyten in getrennten Experimenten gezeigt werden konnte, untersuchten wir, ob auch eine simultane *in vivo* Expansion beider T-Zellpopulation durch eine i.n. RNA-Immunisierung möglich war. Es wurde wiederum das adoptive Transfersystem mit InfHA-TCR transgenen, CFSE-markierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten verwendet und eine i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA durchgeführt. Als Positivkontrolle wurden die jeweiligen InfHA-Peptide verwendet.

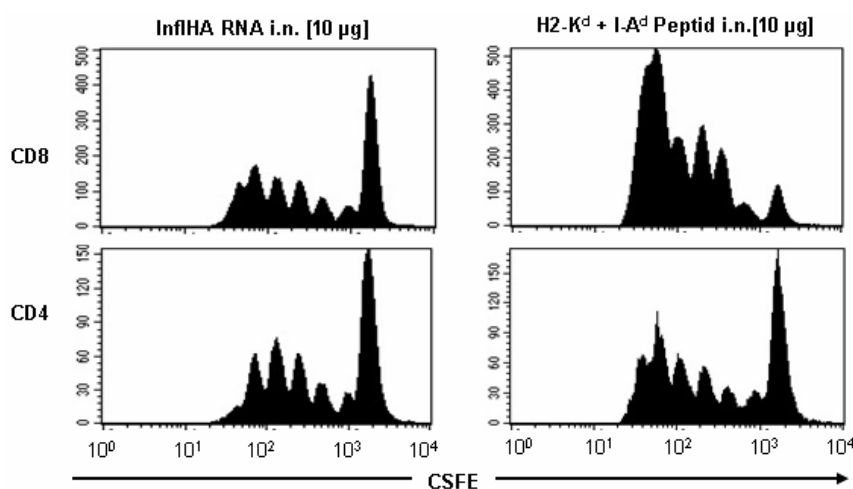


Abb. 3.29: Simultane Expansion InfHA-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA. 1×10^6 InfHA-spezifische TCR-transgene CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurden am Tag -1 in Thy1.1 Mäusen adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die i.n. Immunisierung mit jeweils 10µg InfHA-RNA oder mit den InfHA-Peptiden HA₁₀₇₋₁₁₉ bzw. HA₅₁₈₋₅₂₆. Die Expansion InfHA-spezifischer, TCR-transgener T-Zellen wurde nach Färbung mit Antikörpern (CD4, CD8 und Thy1.2) am Tag 5 im FACS analysiert.

Wir konnten in der durchflußzytometrischen Analyse zeigen, dass die i.n. RNA-basierte Immunisierung prinzipiell eine effiziente, simultane Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten im gleichen Lymphknoten ermöglicht. Die erzielte Proliferationsrate war dabei quantitativ der Stimulierung mit den InfHA-Peptiden äquivalent.

3.7 Histologischer Nachweis expandierter T-Lymphozyten im Lymphknoten nach intranodaler RNA-Immunisierung

Die Funktionalität und strukturelle Integrität eines Lymphknotens nach i.n. RNA-Injektion sollte durch immunhistologische Untersuchungen überprüft werden.

Dafür wurden InfHA-TCR transgene $CD4^+$ und CL4-InfHA $CD8^+$ T-Zellen in Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die i.n. Immunisierung mit $20\mu\text{g}$ InfHA-RNA. Als Kontrolle wurde den Mäusen irrelevante RNA (NY-ESO-RNA) appliziert. Vier Tage später wurden die Milzen und die Lymphknoten für Immun histochemie-Untersuchungen asserviert. Die Organe wurden mit einem anti-Thy1.2 Antikörper gefärbt, mittels der APAAP-Methode sichtbar gemacht und im Lichtmikroskop analysiert.

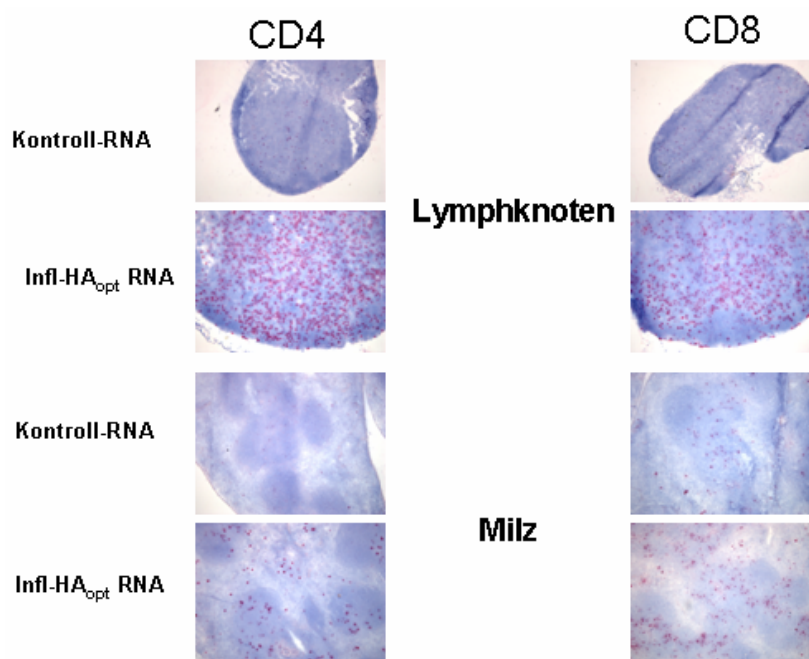


Abb. 3.30: Immunhistochemischer Nachweis der Expansion InfHA-spezifischer $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen. 1×10^6 InfHA-spezifische $CD4^+$ T-Zellen wurden am Tag 1 in Thy1.1-Mäuse adoptiv transferiert. Die i.n. Immunisierung mit Kontroll- oder InfIHA-RNA ($20\mu\text{g}$) erfolgte am Tag 0. Am Tag 4 wurden die inguinalen Lymphknoten sowie die Milzen präpariert und die angefertigten Kryoschnitte wurden mit anti-Thy1.2-Antikörpern angefärbt.

Die transferierten T-Lymphozyten aus Mäusen, die mit irrelevanter RNA immunisiert wurden, waren nur sporadisch im Lymphknoten zu finden. Lymphknoten in die InfHA RNA injiziert wurde, zeigten dagegen eine starke Akkumulation von antigenspezifischen T-Lymphozyten. Dieses Ergebnis deutete somit daraufhin, dass die Funktionalität und

strukturelle Integrität eines Lymphknotens nach i.n. RNA-Injektion nicht beeinträchtigt wurde.

3.8 De novo Priming durch intranodale RNA-Immunisierung

T-Lymphozyten sind die wichtigsten Waffen des Körpers im Bereich der zellulären Immunabwehr. Aktivierte, mit Effektorfunktionen ausgestattete T-Zellen können z.B. Tumorzellen, fremde Zellen oder virusinfizierte Zellen gezielt abtöten. Zuvor müssen sie ihren „Gegner“ jedoch erst kennen lernen. Dieses erstmalige Erkennen und Einprägen (Priming) erfolgt durch Kontakt mit den individuellen Oberflächenmerkmalen (Antigenen) der Zielzellen, die den T-Lymphozyten von APCs präsentiert werden. Das *de novo* Priming ist essentiell für die Initiierung einer effizienten anti-Tumor-Antwort und unterliegt strengen Regeln. Es vollzieht sich in den lymphatischen Organen (Lymphknoten, Milz, etc.) und erfordert neben der Erkennung des Antigen-MHC-Komplexes durch den T-Zellrezeptor, auch die Interaktion kostimulatorischer Moleküle (Lanzavecchia *et al.*, 1998).

Im folgenden Versuch sollte daher untersucht werden, ob naive T-Zellen gegen murine (InfHA, SIINFEKL, gp70) oder humane Modellantigene (HCMV pp65) durch i.n. Immunisierung mit IVT-RNA, die für das jeweilige Antigen kodieren, *de novo* geprimed werden können.

Zuerst untersuchten wir, ob das Priming naiver T-Zellen im SIINFEKL-System induzierbar war und welche Dosiskinetik dafür bestand.

Hierzu wurden naive C57Bl/6 Mäuse i.n. mit 20µg SIINFEKL-RNA ein- bis dreimal immunisiert. Die Expansion antigenspezifischer T-Zellen aus naiven Mäusen wurde über eine Tetrameranalyse quantifiziert (siehe Abb. 3.31A) Desweiteren wurde ihre lytische Aktivität gegen mit spezifischem Peptid beladene Zielzellen (Targets) gemessen (siehe Abb. 3.31B).

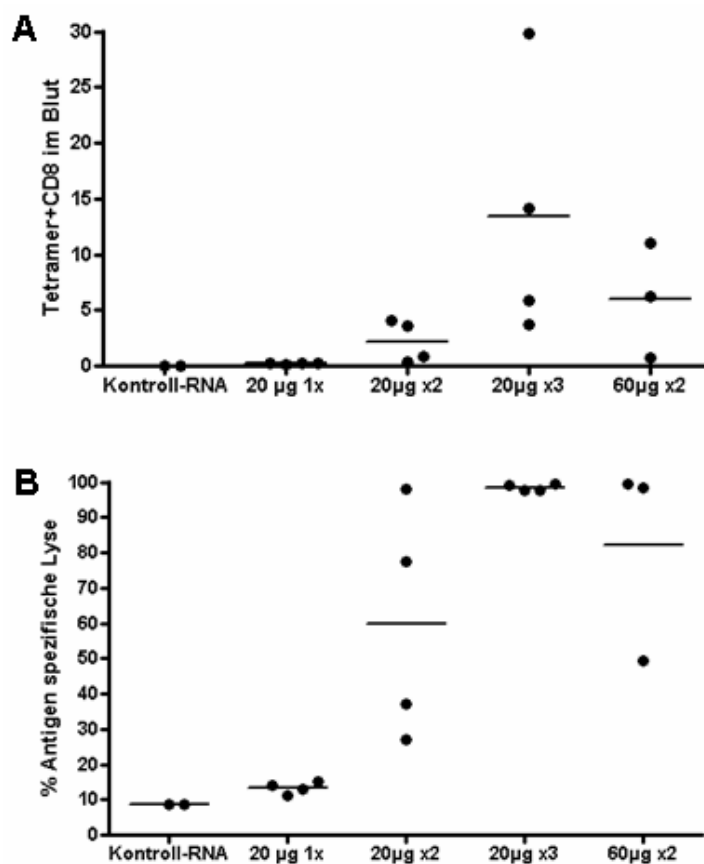


Abb. 3.31: De novo Priming naiver T-Zellen gegen SIINFEKL-Antigen durch i.n. RNA-Immunsierung. Naive C57Bl/6 Mäuse wurden i.n. mit SIINFEKL-RNA oder irrelevanter RNA (20µg oder 60µg) 2-3x (d0, d+3, d+6; n=3) immunisiert. Ein *in vivo* Zytotoxizitätstest wurde 5 Tage nach der letzten Immunisierung durchgeführt. Dafür wurden jeweils 1×10^7 SIINFEKL-Peptid (5µM; CSFE^{high}) und 1×10^7 Kontroll-Peptid (0,5µM; CSFE^{low}) beladene Milzzellen adoptiv transferiert. Nach 18h wurden die Milzzellen präpariert und im FACS analysiert. **A)** Prozentualer Anteil antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen im Blut. Die Zellen wurden 5 Tage nach der letzten Immunisierung durch Färbung mit anti-CD8-Antikörpern und H-2K^b/SIINFEKL-Tetrameren quantifiziert. **B)** Bestimmung der antigenspezifischen Lyse in Prozent.

Wir konnten zeigen, dass die i.n. Immunisierung zum Priming naiver T-Zellen führte. Die Frequenz SIINFEKL-spezifischer CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut (Abb. 3.32A) wie auch ihre zytotoxische Aktivität (Abb. 3.32B) war dabei IVT-RNA dosisabhängig und korrelierte zudem mit der Anzahl der durchgeführten i.n. Immunisierungen.

Nachfolgend wurde untersucht, ob ähnliche Resultate des de novo Primings auch unter Verwendung des InfHA-Systems erzielt werden können. Dazu wurden nicht vorbehandelte, naive Mäuse mit InfHA-RNA, bzw. mit InfHA₅₁₈₋₅₂₆ Peptid viermal im Abstand von jeweils 3 Tagen immunisiert. Als Kontrolle wurde Mäusen irrelevante RNA (NY-ESO-RNA) appliziert. Fünf Tage später wurden die Milzzellen aus immunisierten Mäusen für eine Woche mit Peptid restimuliert. Das Priming naiver Zellen wurde anhand der IFN-γ Produktion im ELISPOT untersucht (siehe Abb. 3.32).

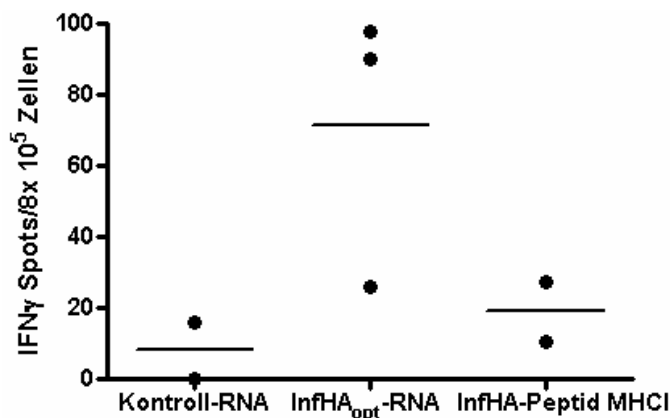


Abb. 3.32: De novo Priming naiver Mäuse gegen ein virales Antigen (InfHA) durch i.n. RNA-Immunsierung. Naive Balb/c Mäuse wurden mit 20 μ g RNA (Kontroll-RNA, Inf-HA_{opt}-RNA) oder InfHA-Peptid (20 μ g + IFA) am Tag 0, Tag +3, Tag +6 und Tag +9 immunisiert. Am Tag +14 wurden Milzzellen präpariert und eine Woche mit InfHA-Peptid(518-526) beladenen Milzzellen (4 μ g/ml) *in vitro* restimuliert. Der IFN- γ ELISPOT wurde mit Milzzellen als Zielzellen durchgeführt, die mit InfHA- oder Kontroll-Peptid (4 μ g/ml) beladen wurden. Die Hintergrund-Reaktivität wurde abgezogen.

Wir konnten zeigen, dass in zwei von drei naiven Mäusen durch i.n. Immunisierung mit InfHA_{opt}-RNA die Induktion einer primären Immunantwort möglich war. Die Effizienz des resultierenden Primings war dabei der Immunisierung mit InfHA-Peptid überlegen.

Im nächsten Schritt wurde getestet, ob der erzielte Effekt des *de novo* Primings auch unter Verwendung anderer viraler Antigene oder muriner Tumorantigene reproduzierbar war.

Dafür nutzten wir IVT-RNA, die für das humane Zytomegalovirusprotein HCMV pp65 oder das murine Tumorantigen gp70 kodierten. Bei gp70 handelt es sich um ein endogenes retrovirales Tumorantigen, das von spezifischen, murinen Tumoren hoch exprimiert wird, jedoch nicht in Normalgeweben nachweisbar ist. Somit ist es immunologisch vergleichbar mit den humanen Cancer/Germline Genen.

Naive C57Bl/6-A2/K^b bzw. Balb/c Mäuse wurden fünfmal im Abstand von jeweils drei Tagen mit den jeweiligen IVT-RNAs immunisiert und der Read-out erfolgte fünf Tage nach der letzten Immunisierung mittels IFN- γ ELISPOT. Als Targets dienten APCs wie B-Zellen, DCs und Makrophagen, die in der Milz vorhanden waren und die zuvor mit pp65 Peptid-Pools, bzw. gp70 Peptid beladen wurden.

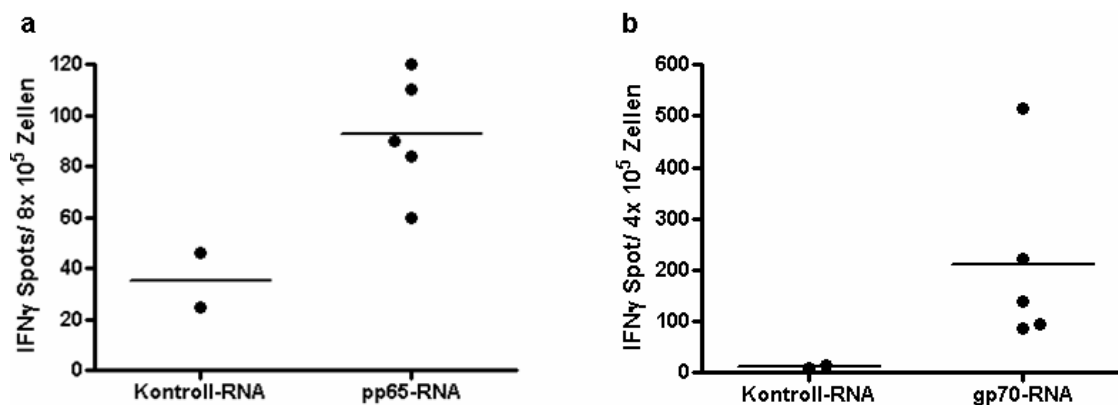


Abb. 3.33: Priming naiver Mäuse gegen HVMV pp65 und endogenes retrovirales gp70 durch i.n. RNA-Immunisierung. A) Naive C57Bl/6-A2/K^b Mäuse wurden mit 20 µg RNA (Kontroll-RNA, pp65-RNA) fünfmal im Abstand von jeweils drei Tagen immunisiert. Fünf Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milzzellen präpariert und im IFN- γ ELISPOT eingesetzt. Als Targets dienten Milzzellen, die zuvor mit pp65 Peptid-Pools beladen wurden. Die Hintergrundreaktivität gegen ein Kontroll-Peptid wurde subtrahiert und die Ergebnisse wurden als Mittelwert + MWAbw gezeigt. **B)** Naive Balb/c Mäuse wurden mit 20 µg RNA (Kontroll-RNA, gp70-RNA) fünfmal im Abstand von jeweils drei Tagen immunisiert. Sieben Tage nach der letzten Immunisierung wurden Milzzellen präpariert, für 7 Tage *in vitro* mit Peptid stimuliert und anschließend im IFN- γ ELISPOT angesetzt. Als Targets dienten Milzzellen, die mit gp70-Peptid (H2-L^d aa 451-466) beladen wurden. Die Hintergrund-Reaktivität gegen ein Kontroll-Peptid wurde subtrahiert.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten Milzzellen der mit RNA-immunisierten Mäuse für beide Antigene eine starke IFN- γ Ausschüttung, was auf ein erfolgreiches und effizientes *de novo* Priming von T-Zellen gegen diese Antigene hinwies.

Durch i.n. Immunisierung mit IVT-RNA war es uns somit gelungen, ein *de novo* Priming gegen murine und virale Modellantigene sowie gegen das murine Tumorantigen gp70 zu induzieren.

3.9 Expansion von Gedächtnis-T-Zellen nach intranodaler IVT-RNA-Immunisierung

Die Ausbildung von immunologischen Gedächtniszellen ist essentiell für eine erfolgreiche Vakzine, da durch eine Immunisierung die Bildung von antigenspezifischen, schnellwirkenden Gedächtniszellen induziert wird, ohne dass es zu einer gefährlichen Ausbreitung des Erregers kommt. Daher ist die Ausbildung und Expansion von Gedächtniszellen ein wichtiger Parameter für eine effiziente Immunisierung.

Um zu testen, ob CD8⁺ Gedächtniszellen durch i.n. Immunisierung mit IVT-RNA rekrutiert und expandiert werden können, wurden transgene CD8⁺ T-Zellen in Balb/c Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert und die Mäuse anschließend zur Ausbildung von

Gedächtniszellen zweimal mit InfHA-Peptid stimuliert. Fünf Wochen später wurden die Gedächtniszellen (charakterisiert durch $CD62^+$, $CD127^+$, $CD69^-$) durch i.n. Immunisierung der Mäuse mit InfHA-RNA oder mit transfizierten DCs restimuliert. Als funktioneller Parameter für die Charakterisierung der aktivierten Gedächtniszellen wurde ihre IFN- γ Produktion im ELISPOT fünf Tage nach der IVT-RNA Immunisierung gemessen.

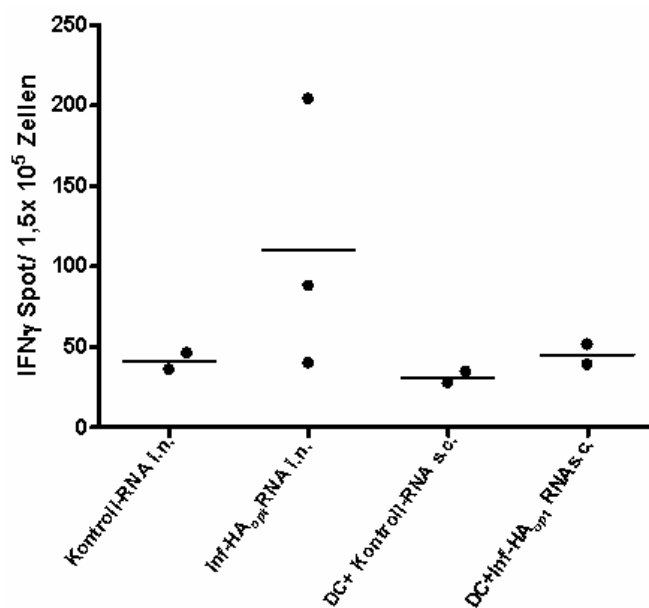


Abb. 3.34: IFN- γ Produktion aktivierter Gedächtnis-T-Zellen nach Restimulation durch i.n. Immunisierung mit RNA im adoptiven Transfermodell. $1,5 \times 10^6$ transgene $CD8^+$ T-Zellen wurden am Tag -1 in Balb/c Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert und anschließend am Tag +1 und Tag +21 durch s.c. Immunisierung mit InfHA-Peptid (aa 533-541) stimuliert. Am Tag +35 wurden die differenzierten Gedächtniszellen durch i.n. Immunisierung der Mäuse mit Inf-HA_{opt}-RNA i.n. oder mit DCs, die mit InfHA-RNA transfiziert wurden, restimuliert. Als Kontrollgruppe wurde Mäusen irrelevante RNA appliziert. Fünf Tage später wurden Milzzellen präpariert und die entstandenen Gedächtniszellen auf ihre Funktionalität im IFN- γ ELISPOT untersucht.

Während die Kontrolltiere, die mit irrelevanter RNA immunisiert worden waren, nur eine minimale, unspezifische IFN- γ Produktion aufwiesen, konnte bei Tieren, die mit InfHA-RNA immunisiert worden waren, eine starke IFN- γ Produktion der antigenspezifischen $CD8^+$ T-Zellen beobachtet werden (Abb. 3.34). Die $CD8^+$ Gedächtniszellen aus Tieren, die mit transfizierten DCs immunisiert worden waren, zeigten nur eine geringe IFN- γ Produktion.

Ähnliche Untersuchungen wie mit dem InfHA-Modell wurden auch unter Verwendung des SIINFEKL-Modells durchgeführt. Um mit einer noch besser charakterisierten T-Zellpopulation zu arbeiten, wurden $CD8^+$ Gedächtniszellen aufgereinigt und adoptiv in

C57Bl/6 Mäuse transferiert. Die antigenspezifische Immunantwort wurde sowohl im Blut als auch in der Milz mittels Tetrameranalyse visualisiert.

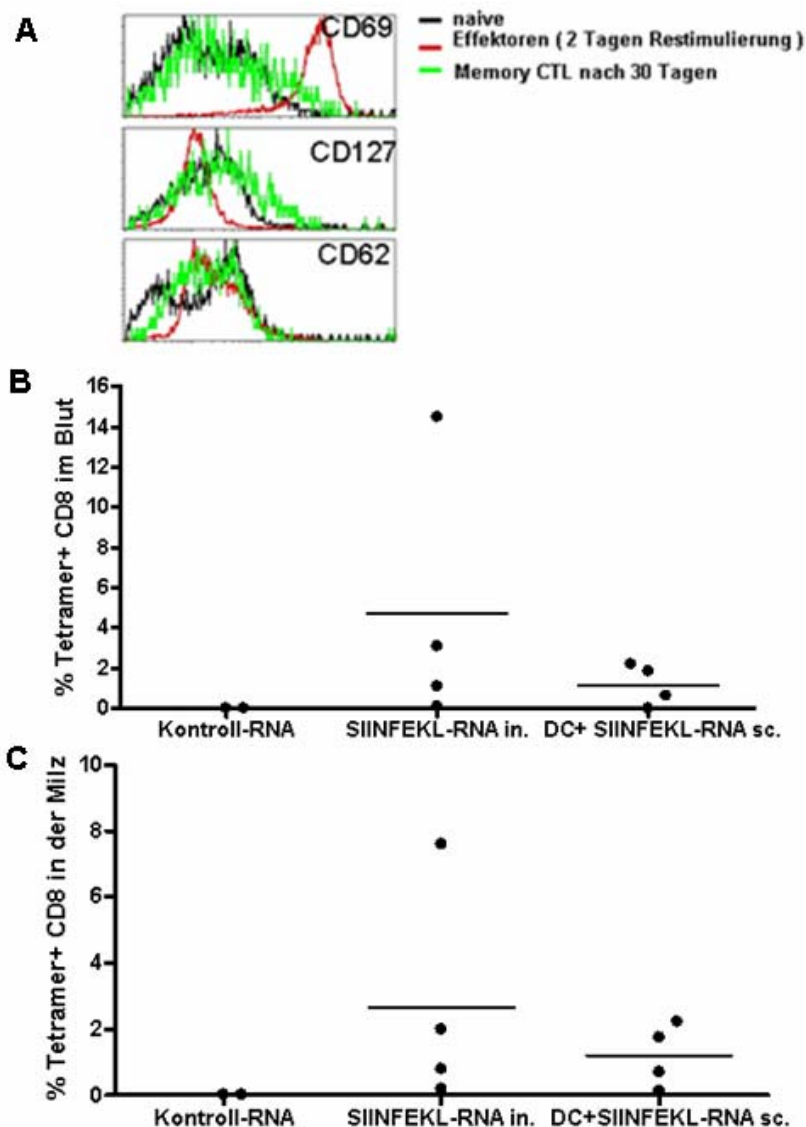


Abb. 3.35: Analyse der CD8⁺ T-Zellexpansion nach i.n. Immunisierung mit RNA. OT1-Milzzellen wurden *in vitro* mit SIINFEKL-Peptid zwei Tage lang stimuliert. Anschließend wurden sie in C57Bl/6-Rag^{-/-} Mäuse adoptiv transferiert, wo sie fünf Wochen lang ruhten. Die so entstandenen Gedächtniszellen (CD62⁺, CD127⁺, CD69⁻, Abb. 3.36A) wurden isoliert, wiederum in C57Bl/6 Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert und diese zweimal im Abstand von drei Tagen i.n. mit SIINFEKL-RNA oder mit transfizierten DCs s.c. immunisiert. Fünf Tage später wurde die SIINFEKL-spezifische T-Zellantwort nach Färbung mit anti-CD8, anti Thy1.2 und SIINFEKL-Tetramer im Blut und in der Milz quantifiziert (Abb. 3.36B und C).

Wir konnten zeigen, dass die i.n. RNA-Immunisierung und die s.c. Vakzinierung mit transfizierten DCs zu einer antigenspezifischen Expansion OT1-transgener CD8⁺ Gedächtniszellen *in vivo* führte. Dieser Effekt war sowohl in der Milz als auch im Blut nach Immunisierung mit nackter RNA reproduzierbar nachzuweisen. Die i.n. RNA-Immunisierung führte im Vergleich zur zellulären Vakzinierung mit DCs zu einer stärkeren T-Zellexpansion (Abb. 3.35B und C).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die Generierung von Gedächtniszellen und deren Stimulierung durch i.n. Immunisierung mit IVT-RNA möglich war. Die i.n. Immunisierung mit IVT-RNA schien dabei hinsichtlich der Expansion von Gedächtniszellen effizienter zu sein, als die s.c. Immunisierung mit RNA transfizierten DCs. Die expandierten Gedächtniszellen waren zudem funktionell, da sie in der Lage waren, die mit spezifischem Peptid beladenen Targetzellen zu lysieren.

3.10 Vergleich verschiedener Immunisierungsstrategien

Zur Induktion von antigenspezifischen Immunantworten können verschiedene Antigenformate, wie z.B. Nukleinsäuren, rekombinante Proteine oder synthetische Peptide, zur direkten Applikation *in vivo* bzw. zur *in vitro* Beladung von DCs und subsequentem Transfer genutzt werden.

Unter Nutzung InfHA-spezifischer, TCR-transgener CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen wurde vergleichend die Fähigkeit verschiedenener Antigenformate untersucht, eine antigenspezifische Aktivierung und Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Lymphknoten nach intralymphatischer Applikation zu induzieren. Dafür wurde ein adoptiver Transfer von CFSE-markierten, InfHA-TCR transgenen CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen in Balb/c-Thy1.1 Mäuse mit anschließender i.n. Immunisierung mit verschiedenen Antigenformaten (InfHA-DNA, InfHA-RNA, InfHA-Peptid und InfHA-RNA transfizierte DCs) durchgeführt. Die Expansion antigenspezifischer T-Zellen im Lymphknoten wurde anschließend durchflusszytometrisch analysiert.

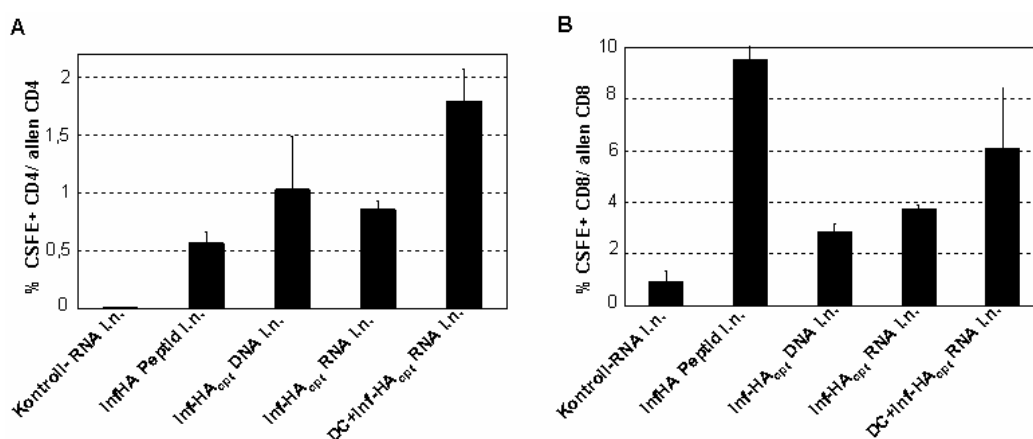


Abb. 3.36: Untersuchung verschiedener Antigenformate bezüglich ihrer Fähigkeit antigenspezifische CD4⁺ (A) und CD8⁺ (B) T-Zellen im Lymphknoten zu stimulieren. 1×10^6 InfHA-spezifische TCR-transgene CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen wurden am Tag -1 in Thy1.1 Mäuse adoptiv transferiert. Anschließend erfolgte die i.n. Immunisierung mit InfHA-Peptid, -DNA bzw. -RNA (jeweils 20 μ g) sowie mit DCs (1×10^6) die zuvor mit RNA transfiziert wurden. Die Expansion InfHA-spezifischer, transgener T-Zellen wurde nach Färbung mit CD4, CD8 und Thy1.2 Antikörpern am Tag +5 im FACS analysiert.

Während in der Kontroll-Immunsierung mit irrelevanter RNA nur eine geringe Proliferation gemessen werden konnte, führte die Immunsierung mit Peptid, DNA und RNA zu einer mäßigen bis starken Expansion antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen. Die stärkste Proliferation von antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen wurde hierbei durch Verabreichung von RNA-transfizierten DCs erzielt (Abb. 3.36B), während die Peptid Immunsierung bei CD4⁺ T-Zellen am effizientesten war.

Anhand dieses Experiments konnten jedoch gezeigt werden, dass eine nahezu äquivalente Expansion und Aktivierung antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ Zellantwort durch i.n. Immunsierung mit IVT-RNA im Vergleich zu Peptid oder DNA als Antigenformat induziert werden konnte.

Nachfolgend wurde die i.n. Immunsierung mit nackter RNA mit der peripheren s.c. Immunsierung mittels RNA-transfizierter DCs untersucht.

Hierzu wurden naive C57Bl/6 Mäuse i.n. mit 20µg SIINFEKL-RNA, bzw s.c. mit SIINFEKL-RNA transfizierten DCs (1×10^6) zweimal immunisiert. Die Stimulation naiver T-Zellen wurde über ihre lytische Aktivität gegen mit spezifischem Peptid beladene Zielzellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätsassay gemessen.

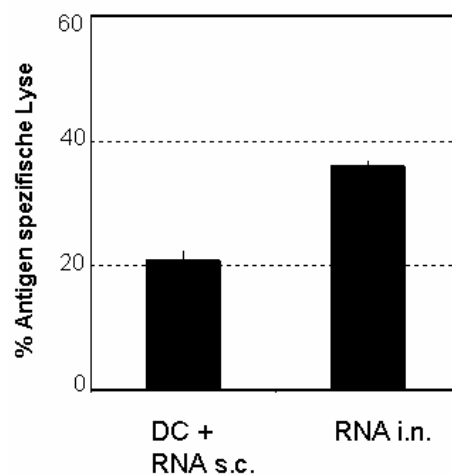


Abb. 3.37: Vergleich der stimulatorischen Kapazität zwischen einer i.n. IVT-RNA und einer zellulären s.c. Immunsierung. Naive C57Bl/6 Mäuse wurden zweimal (d0, d+3, n=3) i.n. mit SIINFEKL-RNA oder s.c. mit DCs (1×10^6), die mit SIINFEKL-RNA (20µg) transfiziert worden waren, immunisiert. Ein *in vivo* Zytotoxizitätstest wurde 5 Tage nach der letzten Immunsierung durchgeführt. Dafür wurden jeweils 1×10^7 SIINFEKL-Peptid (5µM; CSFE^{high}) und 1×10^7 Kontroll-Peptid (0,5µM; CSFE^{low}) beladene Milzzellen adoptiv transferiert. Nach 18h wurden die Milzzellen präpariert, im FACS gemessen und die antigenspezifische Lyse bestimmt.

Es konnte gezeigt werden dass die i.n. RNA-Immunsierung zu einer der peripheren, zellbasierten Immunsierung mindestens äquivalenten Expansion antigenspezifischer T-Lymphozyten führte.

3.11 Untersuchung der intranodalen RNA Vakzinierung hinsichtlich ihrer Effizienz zur Induktion einer antitumoralen Immunantwort

Wie wir anhand oben beschriebener Experimente gezeigt haben, konnte die Aktivierung und Expansion antigenspezifischer CD8⁺ T-Lymphozyten im adoptiven Transfermodell durch i.n. Immunisierung mit IVT-RNA induziert werden (3.4.4 und 3.5). Darüber hinaus führte diese Immunisierungsstrategie zum *de novo* Priming naiver T-Zellen (siehe 3.8). Die expandierten T-Zellen waren zudem in der Lage eine lytische Aktivität gegen Zielzellen, die mit Antigen beladen wurden, auszuüben (siehe 3.8).

Zur weiteren Charakterisierung der Potenz der RNA-basierten i.n. Vakzinierung, wurden Untersuchungen zur prophylaktischen und therapeutischen Vakzinierung in Maus Tumor-Modellen durchgeführt. Dabei wurde die Lymphomzelllinie A20, die stabil mit InfHA-transfiziert war, genutzt.

Tumorstoffe können prophylaktisch oder therapeutisch eingesetzt werden. Bei der prophylaktischen Vakzinierung wurden die Tiere vor der Tumorentstehung mehrmals mit der Tumorstoffe immunisiert. Eine Woche nach der letzten Vakzinierung werden die Tiere mit einer letalen Dosis vitaler Tumorzellen belastet. Bei der therapeutischen Vakzinierung wurde den Tieren zuerst eine letale Dosis vitaler Tumorzellen appliziert. Danach erst wurden, zu einem Zeitpunkt an dem der Tumor makroskopisch messbar war, die Vakzinierungen durchgeführt.

3.11.1 Prophylaktische intranodale Vakzinierung mit IVT-RNA

In diesem Experiment sollte überprüft werden, ob die durch repetitive, prophylaktische i.n. Vakzinierung mit InfHA-RNA hervorgerufene Immunantwort gegen die nachfolgende Belastung mit vitalen Tumorzellen des A20-InfHA B-Lymphoms schützt. Als Positivkontrolle wurde Mäusen InfHA-Peptid in Kombination mit inkompletten Freund'schem Adjuvanz (IFA) appliziert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte Tiere. Die Gruppen und die Zusammensetzung der Vakzine sind in nachfolgender Tabelle angegeben.

Gruppe	Nr.	Vakzineinhalstoffe	Applikationsort
1	7	unbehandelt	
2	7	20µg InfHA _{opt} -RNA	i.n. 2x ipsi, 1x kontra, 1x ipsi
3	7	20µg InfHA-Peptid I + IFA	s.c. 4x Flanke

Tab. 3.1: Zusammensetzung der Vakzine die zur prophylaktischen Behandlung von A20-InfHA Lymphom eingesetzt wurden. i.n.: intranodal, ipsi: Ipsilateral, kontra: Kontralateral, s.c: subkutan, IFA: inkomplettes Freund'sches Adjuvanz.

Die Mäuse wurden viermal in Abstand von jeweils drei Tagen immunisiert. Drei Tage nach der letzten Vakzinierung wurden die Tiere der Versuchsgruppen mit 1×10^5 vitalen A20-InfHA B-Lymphomzellen subkutan belastet. Das Auswachsen der Tumore wurde über die folgenden 120 Tage beobachtet. Die Tumorgöße wurde durch Ausmessen der Länge und Breite des Tumors ermittelt. Tiere, die einen Tumor größer als 15mm x 15mm entwickelt hatten, wurden abgetötet. Das Überleben der Tiere wurde ab dem Tag der Tumorinduktion dokumentiert. Der Anteil der noch lebenden Tiere wurde gegen die Überlebenszeit in einem Kaplan-Meier-Diagramm aufgetragen (siehe Abb. 3.39).

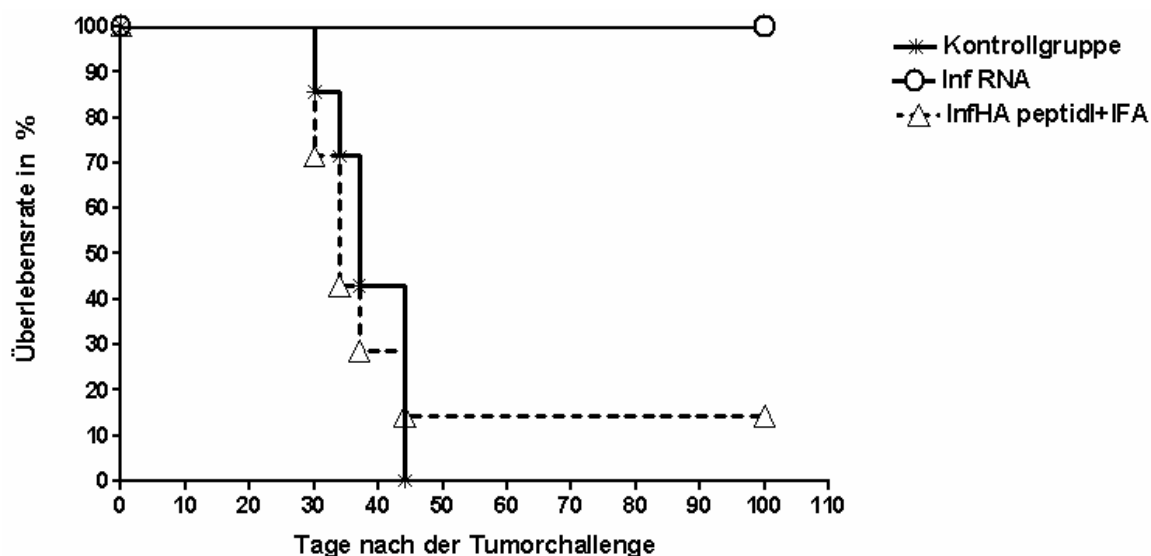


Abb. 3.38: Darstellung der, nach Vakzinierung mit den in der Tabelle aufgeführten Vakzinen, ermittelten Überlebenskurven in Form eines Kaplan-Meier-Diagrammes.

Die i.n. Immunisierung mit InfHA-RNA führte zu einer 100%igen protektiven Immunität, d.h. alle Tiere blieben tumorfrei. Die Überlebenskurve dieser Gruppe unterschied sich signifikant von der Kontrollgruppe ($p < 0,01$). Die Tiere der Gruppe, welche mit Peptid immunisiert wurden, verstarben bis auf ein Tier innerhalb von 45 Tagen und zeigten damit keinen Überlebensvorteil gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Ursache kann in der Verabreichung einer zu niedrigen Dosis von nur 20µg InfHA-Peptid

vermutet werden. Die Überlebenskurve der Mäuse dieser Gruppe und der Kontrollgruppe verlaufen sehr ähnlich und unterscheiden sich dementsprechend nicht signifikant voneinander ($p=0,76$).

3.11.2 Therapeutische intranodale Vakzinierung mit IVT-RNA

Aufgrund der größeren Nähe zur realen Anwendungssituation beim Menschen, wurde nachfolgend die Wertigkeit der i.n. RNA-Vakzinierung in einem therapeutischen Anwendungsmodell unter erneuter Nutzung des A20 B-Zell-Lymphoms untersucht.

Der Tumor wurde zunächst durch s.c. Injektion von 1×10^5 vitalen A20-HA Lymphomzellen induziert. 17 Tage später erfolgte die fünfmalige repetitive Immunisierung (Tag 17, 20, 23, 26, 29) mit den in Tabelle 3.2 dargestellten Vakzineformulierungen.

Gruppe	Nr.	Vakzineinhaltsstoffe	Applikationsort
1	10	unbehandelt	
2	10	20 μ g InfHA _{opt} -RNA	i.n. 2x ipsi, 1x kontra, 1x ipsi, 1x kontra
3	10	50 μ g InfHA-Peptid I + IFA	s.c. 4x Flanke
4	10	1×10^6 DC + InfHA _{opt} -RNA (20 μ g)	s.c. 4x Flanke

Tab. 3.2: Zusammensetzung der Vakzine, die zur therapeutischen Behandlung von A20-HA Lymphom eingesetzt wurden. i.n.: intranodal, ipsi: Ipsilateral, kontra: Kontralateral, s.c: subkutan, IFA: inkomplette Freund'sche Adjuvanz, DC: dendritische Zellen.

Das Überleben der Tiere wurde ab dem Tag der Tumorinduktion dokumentiert. Der Anteil der noch lebenden Tiere wurde gegen die Überlebenszeit in einem Kaplan-Meier-Diagramm aufgetragen (siehe Abb. 3.39).

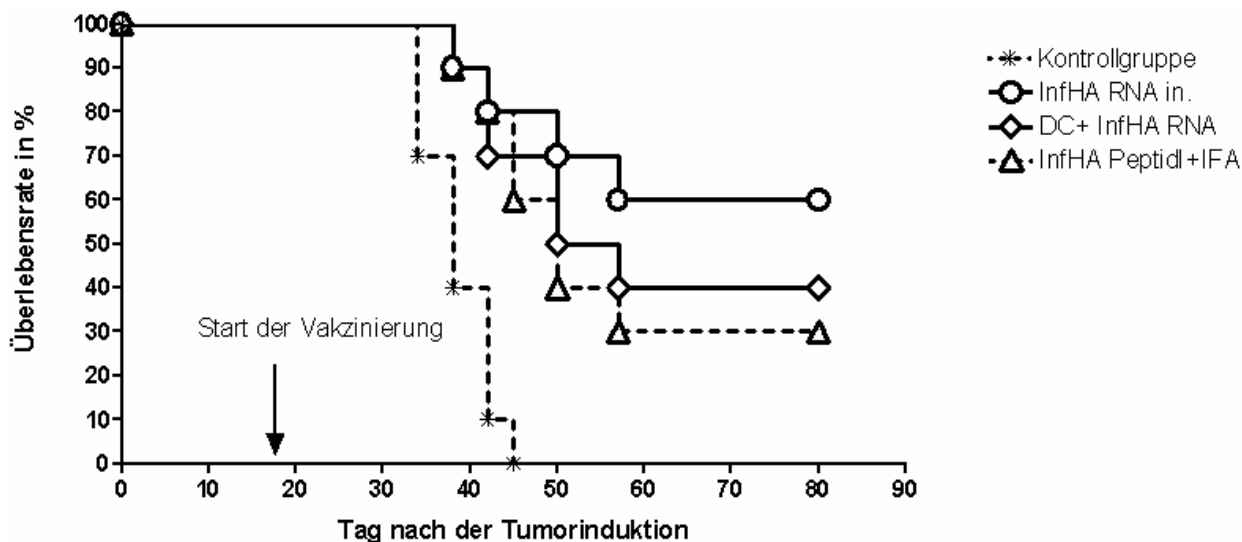


Abb. 3.39: Darstellung der nach Vakzinierung mit den in Tabelle 3.2 aufgeführten Vakzinen erhaltenen Überlebenskurven in Form eines Kaplan-Meier-Diagrammes.

Alle Tiere in der Kontrollgruppe entwickelten bis zum Tag 45 Tumore und wurden getötet. Die Vakzinierung mit InfHA-Peptid oder mit InfHA-RNA transfizierten DCs führte zu einer signifikanten Verzögerung des Tumorwachstums. Bei 30% bzw. 40% der Mäuse konnte eine protektive Immunität erzielt werden. Der beste Schutzeffekt wurde jedoch durch i.n. Applikation von InfHA-RNA erzielt. Diese Immunisierungsstrategie führte zu einer signifikanten Überlebensverlängerung und konnte bei 60% der Mäuse eine langanhaltende protektive Immunität erzeugen. Die Überlebenskurve dieser Gruppe unterscheidet sich signifikant von denen der Kontrollgruppe ($p=0,002$).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass die i.n. Immunisierung mit nackter IVT-RNA eine effiziente Vakzinierungsstrategie war, um Tumoren prophylaktisch oder therapeutisch zu bekämpfen.

Als Fazit der durchgeführten Analysen lässt sich festhalten, dass die i.n. Immunisierung mit IVT-RNA eine vielversprechende und hocheffiziente Immunisierungsmethode ist. Durch sie konnten wir simultan antigenspezifische $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen in einer zeit- und dosisabhängigen Weise stimulieren. Darüber hinaus waren wir in der Lage Gedächtniszellen zu generieren und zu expandieren sowie naive T-Zellen *de novo* zu primen. Die geprimten T-Zellen waren befähigt eine zytolytische Aktivität gegen mit spezifischem Peptid beladene Targetzellen zu generieren. Abschliessend zeigten wir zudem die hohe Wirksamkeit einer prophylaktischen oder therapeutischen Vakzinierung mit i.n. applizierter IVT-RNA in einem murinem Tumormodell.

4 Diskussion

In den letzten 15 Jahren wurden im Rahmen der Impfstoffentwicklung zur Tumorthherapie verschiedene Vakzineformate, wie synthetische Peptide, rekombinante Proteine, rekombinante Viren, DNA oder RNA, getestet (eine Übersicht gibt: Britten und Sahin, 2005). Bisher haben jedoch nur wenige der prinzipiell verfügbaren Vakzinekandidaten Eingang in die systematische, klinische Testung als Impfstoff gefunden. Neben Kostenfaktoren sind hierfür den bisher genutzten Prozessen inhärente methodische und technologische Barrieren mitverantwortlich.

Während breite Akzeptanz dafür besteht, dass experimentelle Vakzinestudien durch Messung spezifischer immunologischer Parameter begleitet werden sollten, stehen „Goldstandards“ bezüglich konkreter Applikationsmodi, Antigenformulierungen und Protokolle noch aus.

Synthetische Peptide stellen aufgrund des Kostenprofils und der unkomplizierten *in vivo* Applizierbarkeit ein einfaches und attraktives Vakzineformat dar. Als Epitop-Vakzine haben Peptide aber den Nachteil, dass von den jeweiligen Antigenen derivierte, prozessierte, präsentierte und von CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Lymphozyten erkannte Peptide identifiziert werden müssen. Diese reverse T-Zellimmunologie ist Ressourcen-intensiv, technisch besonders aufwendig für Antigene, die eine geringe spontane Immunogenität aufweisen und führt damit zu einer massiven Verlangsamung der Pharmakoentwicklung für dieses Vakzineformat. Ein weiterer Nachteil solcher Epitop-basierter Vakzineformate ist, dass sie auf Teilpopulation von Patienten beschränkt sind, die geeignete Kombinationen aus Antigenexpression und passendem HLA-Allel aufweisen. Zur Umgehung dieser Limitationen können Antigen-kodierende Nukleinsäuren (DNA, RNA) in dendritische Zellen (DCs) eingebracht werden, die das in der Zelle gebildete Antigen prozessieren und präsentieren. So wurden virale Vektorsysteme (z.B. Mitglieder der Poxvirusgruppe wie Vaccinia, adenovirale oder Adenovirus-assoziierte Vektoren oder Influenzavirus-basierte Systeme), die DCs *in vitro* und *in vivo* hocheffizient infizieren, immuntherapeutisch als Vektoren zur Expression von Tumorantigenen genutzt. Wo sind die Literaturangaben? Allerdings sind die beim Patienten induzierten Immunantworten primär gegen koexprimierte Virusbestandteile gerichtet (sog. Backbone-Immunantworten), woraus häufig eine geringe Tumorantigen-spezifische Immunantwort resultiert (Meyer *et al.*, 2005). Eine Alternative stellt die direkte Nutzung von Ribonukleinsäuren zur Transfektion von dendritischen Zellen dar (Boczkowski *et al.*,

1996, Van Tendeloo *et al.*, 2001; Schaft *et al.* 2005; Pan *et al.*, 2005). Dabei unterscheidet man zwischen molekular nicht-definierter Vakzine (Gesamtumor RNA) und molekular definierter Vakzine (IVT-RNA), welche für ein oder mehrere Antigene kodieren.

RNA-Moleküle sind im Gegensatz zur doppelsträngigen DNA in der Regel einzelsträngig. Beides sind Polynukleotide, bei denen die Nukleinbasen (Adenin, Guanin, Cytosin, Uracil bzw. Thymin bei der DNA) an Zuckern (Ribose für RNA; Desoxyribose für DNA) über Phosphorsäurediester miteinander verknüpft sind. Durch das Enzym RNA-Polymerase wird die DNA in mRNA transkribiert, welche wiederum in Protein translatiert wird. Die typische eukaryontische Kappe am 5' Ende sowie der poly(A) Schwanz am 3' Ende spielen eine essentielle Rolle bei der Stabilität der mRNA (Furuichi *et al.*, 1977; Bernstein *et al.*, 1989).

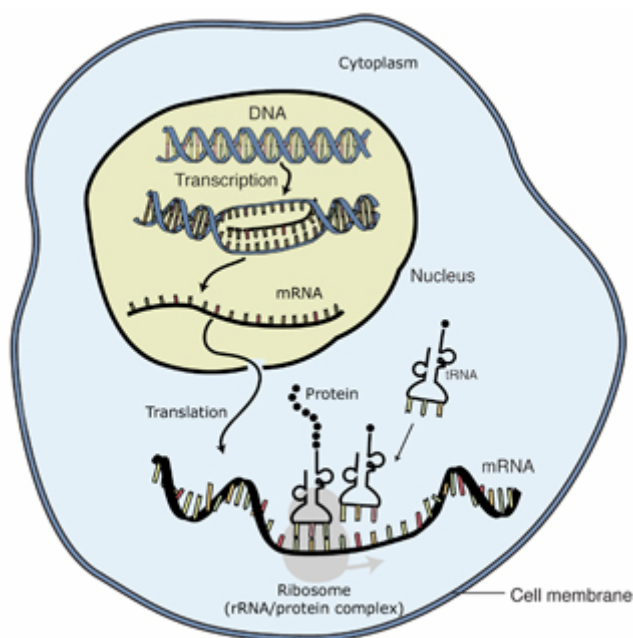


Abb. 4.1: Der Weg von der DNA bis zum Protein in einer eukaryontischen Zelle (**Abbildung entnommen** aus: National Human Genome Research Institute).

RNA als Vakzineformat verknüpft die Vorteile der Nutzbarkeit als Impfstoff unabhängig von HLA-Restriktionselementen des Patienten, guter Transfizierbarkeit in antigenpräsentierende Zellen *in vitro* und Unabhängigkeit von viralen Vektorsystemen. Darüber hinaus ist RNA im Vergleich zu den potentiell sich ins Genom integrierenden DNA-basierten Impfstoffen im Hinblick auf Onkogenität sicherheitstechnisch unbedenklich.

In klinischen Studien wurden bereits durch RNA-Transfer modifizierte dendritische Zellen (Heiser *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2002) zur adoptiven Therapie von Tumorpatienten getestet (siehe Übersichtsartikel Gilboa und Vieweg 2005; Grünenbach

et al., 2005). Die Analyse immunisierter Patienten in mehreren unabhängigen Studien (Su *et al.*, 2005) zeigte hierbei, dass robuste antigen-spezifische Immunantworten durch RNA-transfizierte DCs induziert werden konnten. Inwieweit dies mit einer klinischen Wirksamkeit korreliert, ist unklar. Unabhängig von einer potentiell erfolgreichen klinischen Umsetzung haben diese Konzepte die typischen logistischen und kostentechnischen Nachteile einer autologen Zelltherapie.

Die direkte *in vivo* Applikation von RNA, z.B. durch intradermale Injektion (Carralot *et al.*, 2004) stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, diese Limitation zu überwinden, ist jedoch bisher in einem frühen Entwicklungszustand. Als Ort der Interaktion zwischen antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und T-Zellen bietet die direkte intranodale Applikation von Vakzinen eine optimale Umgebung für die Initiierung einer effizienten Immunantwort, da das Antigen von Lymphknoten residenten APCs aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden kann. Darüber hinaus kann dadurch die Notwendigkeit der Migration von APCs in den Lymphknoten, wie sie nach einer subkutanen, intraperitonealen und intravenösen Immunisierung besteht, umgangen werden (Nestle *et al.* 1998). Bei intranodaler Applikation des Impfstoffes besteht zudem nicht das Risiko der Elimination von APCs durch antigenspezifische Effektor T-Zellen in der Peripherie, was zu einer verminderten Einwanderung in den drainierenden Lymphknoten führt (Hermanns *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006).

Obwohl zahlreiche publizierte Arbeiten sich mit der intranodalen Immunisierung mit zellulären Vakzine befasst haben (Barrat-Boyes *et al.*, 2003; Maloney *et al.*, 2001; Nestle *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1993 und Eggers *et al.*, 1992), ist die Nutzung der auf Nukleinsäure basierten intranodalen Vakzinierung bisher nicht detailliert untersucht worden (Kündig *et al.*, 2001; Tagawa *et al.*, 2003).

Vor diesem Hintergrund verfolgten wir in der vorliegenden Arbeit die *in vivo* Applikation von rekombinanten Antigen-kodierenden Ribonukleinsäuren zur Induktion von antigenspezifischen Immunantworten (*in vivo* RNA-Immunisierung), mit dem Ziel, diese zu einem hochpotenten Impfstoffverfahren weiterzuentwickeln. Insbesondere sollten pharmakologische und immunologische Parameter für die Generierung effektiver antitumorale Immunantworten erarbeitet und deren Wirksamkeit in experimentellen und präklinischen Tumormodellen getestet werden.

4.1 Transfektion von APCs im LK nach intranodaler Injektion von RNA

DCs sind als professionelle APCs bekannt für ihre Fähigkeit T-Zellen effizient zu stimulieren (Steinmann *et al.*, 2003). Nach subkutaner oder intradermaler Immunisierung wird das Antigen von DCs aufgenommen und prozessiert. Die DCs migrieren in den drainierenden Lymphknoten, wo sie mit naiven durch den Organismus zirkulierenden T-Zellen interagieren. Unter bestimmten Bedingungen können DCs als Ziel für aktivierte T-Zellen fungieren, die sie eliminieren, bevor die DCs den Lymphknoten erreicht haben (Hermanns *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2006). Die in den Lymphknoten eingewanderten DCs machen 2-10% der ursprünglich transferierten Anzahl aus (Nestle *et al.*, 2003). Daher kann die periphere Applikation von zellulären Vakzineformulationen oder IVT-RNA nach repetitiver Vakzinierung zu einer Reduktion der Immunisierungseffizienz führen (Gilboa *et al.*, 2006, Hoerr *et al.*, 2004.). Denn in der Situation der repetitiven Vakzinierung muß mit einer deutlich erhöhten Wahrscheinlichkeit von einer durch Vorimmunisierungen induzierten Expansion und Ausdifferenzierung von Effektor-T-Zellen gerechnet werden, welche in der Lage sind, APCs in der Peripherie zu lysieren. Durch die direkte intralymphatische Applikation kann die Notwendigkeit der Migration von DCs umgangen werden.

Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten wir, unter Verwendung der in dieser Arbeit etablierten Methode, Lymphknoten residente DCs selektiv durch intranodale Injektion mit RNA transfizieren. Hierzu wurden verschiedene Reportersysteme genutzt. Zum einen konnte gezeigt werden, dass die intranodale Injektion von eGFP-kodierender RNA zu einer durchflußzytometrisch nachweisbaren Translation von eGFP in ca. 20-30% aller DCs im Lymphknoten führt (siehe 3.1.2).

Die Interaktion von naiven T-Zellen mit antigenpräsentierenden DCs im Lymphknoten findet in der paracorticalen Zone statt (Ingulli *et al.*, 2002). Unter Verwendung von Cy3-fluoreszenzmarkierter RNA zeigte sich immunhistologisch nach intranodaler Applikation der RNA ein Signalmuster, welches bei Aussparung der B-Zellfollikel, vor allem in der paracorticalen T-Zellzone Cy3-Signale aufwies (siehe 3.3.2.2). Diese Lokalisierung der transfizierten APCs stimmt mit der bekannten intranodalen Distribution der für das T-Zellpriming verantwortlichen DC Population überein (von Adrian *et al.*, 2003).

Bei den in der paracorticalen Zone des Lymphknotens lokalisierten DCs handelt es sich vornehmlich um CD11b/CD11c doppelt-positive Zellen (Von Adrian *et al.*, 2003). Um

nachzuweisen, ob diese DC-Population durch die intranodale RNA Injektion transfiziert wird, wurde unter Nutzung von Cy5-markierter RNA eine durchflußzytometrische Analyse der transfizierten Zellpopulationen durchgeführt. Wir konnten hiermit die Selektivität der Transfektion für DCs bestätigen. Weiterhin zeigte sich, dass CD11c/CD11b doppelt-positive DCs das stärkste RNA-Signal zeigten (siehe 3.3.2.1). Dies weist auf die Spezialisierung dieser Zellen zur Antigenaufnahme und Prozessierung hin. In Arbeiten von Heath *et al.* konnte gezeigt werden, dass für eine effiziente T-Zellstimulation nicht das direkte Priming durch eingewanderte T-Zellen verantwortlich ist, sondern es zu einem Transfer auf Lymphknoten residente DCs kommt, welche dann für die Antigenpräsentation verantwortlich sind (Heath *et al.*, 2006). Daher kommt der von uns gezeigten, effizienten Transfektion Lymphknoten residenter DCs eine prädiktive Bedeutung für die Induktion einer Immunantwort zu.

Da für eine effiziente Stimulation von T-Zellen nicht nur die effiziente Präsentation des Antigens, sondern auch eine Aktivierung der T-Zelle über kostimulatorische Moleküle notwendig ist, überprüften wir ob, in Analogie zu DNA, durch die IVT-RNA eine Aktivierung der Lymphknoten residenten DCs erfolgt (Stockinger *et al.*, 1999). In Arbeiten von Heil *et al.* (2004) und anderen konnte gezeigt werden dass liposomal verpackte RNA in der Lage ist, DCs zu aktivieren und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine zu fördern. Wir konnten erstmals den *in vivo* Nachweis einer solchen, durch einzelsträngige RNA induzierten DC Aktivierung erbringen, in dem wir eine deutliche Hochregulierung von Aktivierungsmarkern auf Lymphknoten residenten DCs 24 h nach RNA Injektion zeigten (siehe 3.3.5). Da auf liposomale Agentien zur Verpackung der RNA verzichtet wurde, kann aus unseren Daten gefolgert werden, dass die IVT-RNA auch in ihrer natürlichen dreidimensionalen Struktur in der Lage ist, eine Aktivierung der DCs *in vivo* zu bewirken. Mögliche Rezeptoren für die Transduktion dieses Signals sind TLR7 und TLR8, für welche gezeigt wurde, dass sie im endosomalen Prozessierungsweg in der Lage sind, einzelsträngige RNA zu detektieren (Diebold *et al.*, 2004).

Aus der gezeigten Selektivität der RNA Aufnahme für Lymphknoten residente DCs ergibt sich die Frage, welcher Mechanismus dafür verantwortlich sein könnte. Da zu dieser Frage bisher nur wenige Untersuchungen und keine konklusiven Daten in der Literatur vorliegen (Rammensee *et al.*, 2007) kann nur angenommen werden, dass z.B. Mechanismen wie Makropinozytose, welche nur in DCs und Makrophagen konstitutiv aktiv sind, von Relevanz sein könnten. Diese Fragestellung soll in weiterführenden Untersuchungen getestet werden. Eine Charakterisierung des Aufnahmemechanismus

dient auch der Planung weiterer methodischer Optimierungen, mit dem Ziel die RNA Aufnahme *in vivo* zu maximieren.

Während nach Peptidvakzinierung das Peptid unspezifisch alle MHC-I positiven Zellen, DCs, B-Zellen und Makrophagen belädt (Kündig *et al.*, 1995; Rock *et al.*, 2005), handelt es sich bei der intranodalen Immunisierung um einen spezifischen Prozess, bei dem DCs selektiv transfiziert werden.

Zur Untersuchung der Zeitkinetik von RNA Transkripten nach intranodaler RNA Transfektion wurde die quantitative, real-time RT-PCR (qRT-PCR) genutzt. Als Reporter gen diente dabei eGFP. Mit Hilfe der qRT-PCR konnte der Level der eGFP mRNA im zeitlichen Verlauf quantifiziert werden. Im Zeitraum von 8-72h zeigte sich ein weitgehend stabiler Signalverlauf (siehe 3.3.3). Dieser Befund ist wichtig für die Initiierung einer Immunantwort nach intranodaler Vakzinierung mit IVT-RNA, da die Dauer des T-Zellrezeptor-MHC- Interaktion ein wichtiger Faktor für die Regulation der T-Zellaktivierung ist. Naive CD4⁺ T-Zellen benötigen z.B. nach dem TCR-MHC Interaktion ungefähr 20 h *in vitro*, um zu proliferieren (Iezzi *et al.*, 1998). Die Persistenz des im qPCR gemessenen Transkripts bis 72 h nach intranodaler Immunisierung mit IVT-RNA sichert die Verfügbarkeit des Antigens und führt im Lymphknoten zu einer Antigenpersistenz in antigenpräsentierenden DCs. Durch die selektive Aufnahme der RNA und die schnelle Elimination im Interzellularraum wird im Gegensatz zur intranodalen Peptidimmunisierung ein Antigen-Abfluß in andere Organe, z.B die Milz, verhindert (Kündig *et al.*, 2005).

4.2 Induktion von Immunantworten und deren Kinetik

4.2.1 Kinetik der Zellexpansion

Die Kinetik der T-Zellexpansion nach Antigenstimulation ist ein Parameter, welcher zur Charakterisierung des Stimulationsmodus beiträgt. Um die Effizienz der Aktivierung und Expansion von antigenspezifischen T-Zellen im natürlichen Gewebe- und Zellkontext untersuchen zu können, wurde auf Modelle mit adoptivem T-Zelltransfer zurückgegriffen.

Für die Untersuchungen der Dosis- und Zeitkinetik antigenspezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach intranodaler RNA Immunisierung, wurden in erster Linie die auf Influenza-Hemagglutinin und Ovalbumin basierenden Modellsysteme verwendet. Beide Antigene

lagen in Form der bereits beschriebenen Antigen-MHC-Fusionskonstrukte (siehe 3.2.3.2) zur intranodalen Injektion vor. Wie wir gezeigt haben, führen diese nach Aufnahme und Translation zu einer effizienten Präsentation von Epitopen auf MHC Klasse I und MHC Klasse II Molekülen.

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Frequenzen und Expansionskinetiken nach intranodaler Immunisierung stimmen mit Beobachtungen aus mehreren publizierten Studien überein (Kaech und Ahmed, 2001; Kedl *et al.*, 2000; Ludewig *et al.*, 1998; Mercado *et al.*, 2000). Die initiale Expansion nach Antigenstimulation ist eine Funktion der Rekrutierung von T-Zellen in die Expansion sowie der Anzahl der Zellteilungen, welche nach Stimulation erfolgt. Bezüglich der Zellteilungen konnte gezeigt werden, dass CD8⁺ T-Zellen unabhängig von der Antigendosis nach spezifischer Stimulation ca. 7-10 Teilungen durchlaufen (Ahmed *et al.*, 2001). In Entsprechung zu diesen Daten fanden wir mit steigender eingesetzter RNA Menge eine steigende Rekrutierung in die Proliferation (siehe 3.4.2).

Kaech und Ahmed berichteten, dass selbst sehr geringe Antigenmengen ausreichen, um die Teilung und Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu induzieren (Kaech und Ahmed, 2001). Wir konnten zeigen, dass nach intranodaler Immunisierung mit 0,1µg RNA, antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen expandiert wurden (siehe 3.4.1 und 3.4.2). Da in der Dosiskinetik auch bei Nutzung von 60µg RNA noch keine Abflachung der Expansionskurve zu beobachten war, sollte eine weitere deutliche Steigerung der T-Zellexpansion durch höhere RNA Dosen möglich sein. Da hierfür die zytosolisch vorliegende RNA entscheidend ist, sind neben der reinen Dosiserhöhung auch alle Maßnahmen, welche eine effizientere Aufnahme der RNA ermöglichen, geeignet, um dieses Potential nutzbar zu machen.

Um zu untersuchen, wie anhaltend der proliferative Stimulus der intranodalen RNA Immunisierung auf T-Lymphozyten ist, wurden die adoptiv transferierten CFSE markierten transgenen T-Zellen nach intranodaler RNA Immunisierung im zeitlichen Verlauf verfolgt. In mehreren Publikationen (Hassett *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2000 und 2001; Zinkernagel *et al.*, 1999; Harty *et al.*, 2005; und Braciale *et al.*, 2004) wurde beschrieben, dass die antigenspezifischen T-Zellen nach peripherer Immunisierung ihr Expansionsmaximum in lymphatischen Organen zwischen Tag 7-10 erreichen. In unseren Untersuchungen zur Zeitkinetik der T-Zellexpansion konnten wir im Lymphknoten am Tag 3 deutliche Zeichen der Proliferation beobachten, wobei die T-Zellen zu diesem Zeitpunkt noch nicht die maximale Zahl an Teilungszyklen durchlaufen hatten. Das Maximum der T-Zellexpansion im Lymphknoten war nach intranodaler RNA

Immunisierung schon am Tag 5 messbar, gefolgt von einer deutlich verminderten Nachweisbarkeit antigenspezifischer T-Zellen an Tag 7 (siehe 3.4.3 und 3.4.4). Das im Vergleich zu den publizierten Daten frühzeitiger auftretende Maximum der T-Zellexpansion könnte sich durch die Lokalisation der Immunisierung erklären. Bei der intranodalen RNA Immunisierung entfällt die Notwendigkeit einer Migration von antigenprozessierenden Zellen in den Lymphknoten, was zu einer schneller einsetzenden T-Zellexpansion führen könnte.

Neben der Expansion der adoptiv transferierten T-Zellen wurde auch deren Aktivierungsstatus durch Analyse von Aktivierungsmarkern (z.B. CD62L, CCR5, CD44) die auf der Oberfläche von stimulierten T-Zellen exprimiert werden, bestimmt. Nach antigenspezifischer Aktivierung von T-Zellen kommt es zu einer Herunterregulierung von CD62L und zu Hochregulierung von z.B. CD44 und CCR5 (Anderson *et al.*, 1994; Zimmermann *et al.*, 1996; Dutton *et al.*, 1998). Neben der Dosisabhängigkeit der T-Zellexpansion konnten wir zeigen, dass auch die Expression von CCR5 als Marker für den Effektorstatus der T-Zellen in dosisabhängiger Weise hochreguliert wurde (Silva *et al.*, 2005 und Zaunders *et al.*, 2006).

Darüber hinaus wurden die proliferierende T-Zellen auf ihre Fähigkeit nach Stimulation durch intranodale Immunisierung mit RNA IFN- γ zu produzieren untersucht. Die *in vivo* gewonnenen Daten aus der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Aktivierung antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen durch intranodale RNA Immunisierung zu einer dosisabhängigen IFN- γ Produktion und Expression von Aktivierungsmarkern führt (siehe 3.5).

Unter dem Blickwinkel der angestrebten Nutzung der intranodalen RNA Vakzination zur Tumorthherapie ist die qualitativ entscheidende Fähigkeit der T-Zellen, die Zytolyse von Zielzellen. Daher überprüften wir, ob unsere Methodik in der Lage ist, eine adäquate Ausdifferenzierung der T-Zellen zu induzieren, da eine T-Zellexpansion nicht zwangsläufig mit einer funktionellen CTL Induktion einhergeht (Curtsinger *et al.*, 2003).

Im Rahmen dieser Experimente konnten wir zeigen, dass naive T-Zellen 5 Tage nach intranodaler RNA Immunisierung *in vivo* zu einer Komplettlyse intravenös applizierter Targetzellen in der Lage waren (siehe 3.5.3).

4.2.2 Expansion von Gedächtnis T-Zellen

Bei der T-Zellantwort werden verschiedene Phasen durchlaufen, die für die Entwicklung des immunologischen Gedächtnisses wichtig sind. Auf eine frühe Expansionsphase, in

der aus naiven T-Zellen zytotoxische Effektoren entstehen, folgt eine Kontraktionsphase, in der die Mehrzahl (>90%) der T-Zellen abstirbt. Gedächtnis T-Zellen dagegen zeichnen sich durch die Fähigkeit der Selbst-Erneuerung und der raschen Expansion nach erneutem Antigenkontakt aus (Ahmed, 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe eines adoptiven Zelltransfersystems untersucht, ob durch intranodale Immunisierung mit IVT-RNA Gedächtnis T-Zellen in den Lymphknoten rekrutiert und expandiert werden können. Analog zu Daten von Ahmed *et al.* (2001 und 2006) generierten wir Mäuse mit CD8⁺ Gedächtnis T-Zellen (CD62⁺, CD127⁺, CD69⁻), die spezifisch für das SIINFEKL Epitop sind. Wir konnten zeigen, dass sich diese Population durch zweimalige intranodale RNA Immunisierung effizient expandieren lässt (siehe 3.9). Das Potential zur Expansion von Gedächtnis T-Zellen durch die intranodale RNA Vakzination stellt eine Voraussetzung für die klinische Nutzung der hier etablierten Methode dar, denn hierbei wird auf einer vorangegangenen Auseinandersetzung des Immunsystems mit dem Tumor aufbauend eine effiziente Expansion von T-Zellen anzustreben sein.

4.2.3 Priming naiver T-Zellen

T-Lymphozyten sind hocheffiziente Werkzeuge des Körpers im Bereich der zellulären Immunabwehr. Sie können z.B. Tumorzellen, fremde Zellen oder virusinfizierte Zellen gezielt abtöten. Zuvor muss allerdings das ‚Priming‘ erfolgen, d.h. eine über T-Zellrezeptor und MHC-Peptidkomplexe vermittelte antigenspezifische Aktivierung der T-Zelle. Für diesen Vorgang ist neben der Epitopdichte auf der antigenpräsentierenden Zelle auch das Vorhandensein kostimulatorischer Signale von essentieller Bedeutung (Zinkernagel *et al.*, 1997). Weiterhin relevant ist auch die Antigenpersistenz, welche über eine prolongierte Antigenpräsentation mit einer statistisch höheren Wahrscheinlichkeit zu einem erfolgreichen Priming führt.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Dichte der MHC-gebundenen Peptide mit der intrazellulären Proteinkonzentration korreliert (Princiotta *et al.*, 2003). Wir konnten zeigen, dass die Modifikation struktureller Merkmale von Antigen-kodierender RNA zur Erhöhung der verfügbaren Antigenosis führt (Holtkamp *et al.*, 2006). Diese Modifikationen betreffen die Stabilität des Impfstoffs sowie die Antigenpräsentation.

Zur Stabilität der RNA tragen neben der 5' Kappe-Struktur weitere Strukturelemente wie poly(A) Schwanz und untranslatierte Regionen (UTRs) bei. Bezogen auf die Länge des poly(A) Schwanzes zeigten unsere Untersuchungen eine direkte Korrelation zwischen

zunehmender Länge des poly(A) Schwanzes und steigender Transkriptstabilität bzw. Translationseffizienz der IVT-RNA (Holtkamp *et al.* 2006). Weiterhin spielen 5'- und 3'-UTRs eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression und der RNA-Stabilität (Mignone *et al.*, 2002). In einigen präklinischen Studien wurden IVT-RNAs mit UTRs des humanen oder des *Xenopus laevis* β -globin Gens genutzt (Teufel *et al.*, 2005; Michiels *et al.*, 2005; Conry *et al.*, 1995). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Einführung einer zweiten β -globin 3'-UTR zwischen der kodierenden Sequenz und dem poly(A) Schwanz sowohl in immaturren DCs als auch in maturaen DCs zu einer signifikanten Steigerung der Proteinexpression führte. Die Kombination einer optimalen poly(A) Länge, eines frei endenden poly(A) Schwanzes und einer optimierten 3'-UTR wirken synergistisch auf die RNA-Stabilität und Translationseffizienz (Holtkamp *et al.*, 2006) und resultierten in einer effizienteren Stimulation und Expansion antigenspezifischer CD8⁺-T-Lymphozyten.

Um die Effizienz der Antigenpräsentation und damit die Immunogenität unserer Vakzine zu erhöhen, wurden in dieser Arbeit RNA Konstrukte hergestellt, die für Fusionsproteine bestehend aus Impfstoffen und Anteilen von Histokompatibilitätsantigenen kodieren.

Wir konnten zeigen, dass die Nutzung der chimären Fusionskonstrukte, bestehend aus Antigen, Signalpeptid und HLA-Transmembran sowie zytosolischer Domäne, die Einschleusung von Antigen in den MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Prozessierungsweg erlaubt und dadurch zu einer simultanen und effizienten Stimulation und Expansion antigenspezifischer CD8⁺ und CD4⁺ Lymphozyten führt (siehe 3.2.3.2). Es konnte gezeigt werden, dass die Immunogenität eines Antigens alleine durch das Einbringen in den sekretorischen Prozessierungsweg gesteigert werden kann (siehe 3.2.3.1). Darüber hinaus zeigte sich *in vivo* unter Verwendung von Influenza-HA als Modellantigen, dass die Modifikation des intrazellulären Antigentargetings zu einer überlegenen Expansion von CD4⁺ T-Zellen im Vergleich mit unmodifiziertem Antigen führt (siehe 3.2.3.2). Im Unterschied zu anderen Fusionskonstrukten, welche die effiziente MHC-Klasse-II Prozessierung ermöglichen (z.B. LAMP oder invariant chain Fusionsproteine (Thomson *et al.*, 1998; Bonini *et al.*, 2001; Bonehill *et al.*, 2003; 2004 und 2005)), sich aber nicht auf die MHC-Klasse-I Prozessierung auswirken, konnten wir ebenfalls demonstrieren, dass durch Verwendung unseres Fusionsproteins eine effizientere Stimulation der CD8⁺ T-Zellen ermöglicht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es uns gelungen, unter Verwendung von optimierten Fusioskonstrukten ein Priming von naiven T-Zellen gegen verschiedene murine Modellantigene: (InfHA, SIINFEKL, gp70) und humane Modellantigene (HCMV pp65) zu induzieren (siehe 3.8). Das Ausmaß der T-Zellexpansion korrelierte positiv mit der vorhandenen Antigenmenge, d.h. je mehr Antigen verfügbar war, desto mehr geprimte Zellen konnten induziert (Kaech und Ahmed, 2001; Kedl *et al.*, 2000; Ludewig *et al.*, 1998; Mercado *et al.*, 2000). Die Effizienz der *in vivo* Zytolyse der Effektor T-Zellen nach Priming durch intranodale RNA Immunisierung steht im Einklang mit publizierten Daten anderer Gruppen (Belyakov *et al.*, 2004; Dutz *et al.*, 2004; Radsak *et al.*, 2005 und 2006). Um eine weitere Optimierung der Effizienz des Primings zu erreichen, ist geplant, RNA kodierte molekulare Adjuvantien (u.a. IL-2; CD40L) simultan zur Antigenkodierenden RNA in den Lymphknoten zu injizieren. Durch die räumliche Nähe von Antigen und Adjuvanz hoffen wir zusätzliche Adjuvanzeffekte gezielter nutzen zu können, als bei einer systemischen Gabe, welche mit vielfältigen Nebenwirkungen verbunden ist.

4.2.4 Untersuchung der intranodalen RNA Vakzinierung hinsichtlich ihrer Effizienz zur Induktion einer Antitumor Immunantwort

Seit der ersten Beschreibung von T-Zellen die aufgrund der Erkennung eines Tumorassoziierten Antigens in der Lage sind, spezifisch Tumorzellen zu lysieren, wurde mit verschiedensten Immunisierungsmethoden versucht, diese Potenz der zellulären Abwehr klinisch nutzbar zu machen (Boon *et al.*, 1991). Aufgrund verschiedenster Verfahren zur Identifikation von tumorassoziierten Antigenen (Türeci *et al.*, 1998; 2003 und 2005; Sahin *et al.*, 1995 und 1997; Koslowski *et al.*, 2002 und 2004) ist die Verfügbarkeit von Zielstrukturen, welche als Antigen in einem Vakzineverfahren dienen könnten, nicht mehr der limitierende Faktor. In präklinischen Modellen und frühen klinischen Studien sind eine Vielzahl von Antigenformaten und Vakzineschemata angewandt worden (eine Übersicht gibt: Britten und Sahin, 2005). Trotzdem steht der Nachweis einer relevanten Lebensverlängerung für Patienten durch Tumorstimmungstherapien noch aus. Ein ursächlicher Faktor für die fehlende therapeutische Effizienz der bisher verfolgten Vakzinierungsstrategien ist die mangelnde Untersuchung und Optimierung von Pharmakokinetik und Pharmakodynamik der gewählten Antigenformate. Im Rahmen dieser Arbeit haben wir daher einen Schwerpunkt auf die Charakterisierung der pharmakokinetischen

Eigenschaften der Methode und deren Optimierung gelegt. Infolgedessen sind die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Tumorexperimente unter dem Gesichtspunkt eines ‚proof of principle‘ zu sehen.

Als Modellsystem wählten wir das murine B-Zellymphom A20, welches uns als stabile Influenza-HA Transfektante (A20-HA) zur Verfügung stand. A20 ist ein aggressiv wachsendes B-Zellymphom welches einen IgG2a Idiotyp exprimiert und nach subkutaner Inokulation solide Tumoren ausbildet. Nach Injektion einer letalen Dosis von A20 Zellen versterben die Mäuse innerhalb von 30-40 Tagen (Graf *et al.*, 2003). Im Rahmen präklinischer Modelle wurden verschiedene Vakzinationsansätze erprobt, um Tumorprotektion oder Kuration zu erreichen. In Protektionsexperimenten unter Nutzung von A20 Zellen, welche mit GM-CSF stabil transfiziert wurden, zeigte sich bei ca. 60 % der Mäuse ein Schutz vor Tumorwachstum (Selmayr *et al.*, 1999). Kronenberger *et al.* (2002) konnten zeigen, dass nur durch eine zusätzliche Aktivierung der zellulären Immunität eine effiziente Tumorabstoßung möglich ist (Armstrong *et al.*, 2002).

In vielen Tumormodellen ist gezeigt worden, dass nur bei antigenspezifischer Aktivierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen eine effiziente antitumorale Wirkung erzielt werden kann (Pardoll *et al.*, 1994; Melief *et al.*, 1998; Lew *et al.*, 2000 und Steinmann *et al.*, 2003). Aufgrund der für Influenza-HA beschriebenen MHC-Klasse-I und Klasse-II restringierten Epitope (von Böhmer *et al.*, 1994; Sherman *et al.*, 1996) und der von uns gezeigten simultanen Expansion Inf-HA spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen nach intranodaler RNA Immunisierung, bot das A20-HA System die Möglichkeit zur Evaluation unserer Vakzine und des gewählten Applikationsmodus. Wir konnten zeigen, dass durch die intranodale RNA Immunisierung eine hundertprozentige Protektion gegen eine Belastung mit einer letalen Dosis A20-HA Zellen erreicht werden kann (siehe 3.11.1). Im kurativen Therapiemodell zeigte sich ein Überleben von 60% aller Mäuse nach RNA basierter intranodaler Immunisierung am Tag 100 (siehe 3.11.2). Antigen-spezifische Tumorkurativmodi anderer Arbeitsgruppen zeigten z.B. bei Nutzung von DCs, welche mit einer für den immaturren Laminin Rezeptor Protein kodierenden RNA transfiziert wurden, in Protektionstests ein Überleben von 75% und in Kurationstests von 50% (Zeis *et al.*, 2003). Auch bei unseren Untersuchungen war die Nutzung von RNA transfizierten DCs oder peptidbeladenen DC weniger effizient als die intranodale RNA Vakzination. Die Potenz der intranodalen Applikationsroute konnte auch durch Arbeiten von Kündig *et al.* gezeigt werden. Er zeigte für gp33 (Glykoprotein des lymphozytären Choriomeningitis Virus LCMV) exprimierende EL4

Thymomtumorzellen eine Protektion von 80% der Mäuse nach intranodaler Applikation von gp33 kodierender DNA (Kündig *et al.*, 2001).

Man kann die Immunantwort welche durch eine RNA-Vakzine induziert wird in mehrere Phasen gliedern. Erstens muss die RNA von APCs (vorwiegend DCs) aufgenommen werden. Verschiedene Mechanismen sind möglicherweise an der Aufnahme der RNA beteiligt (Makropinozytose, Endozytose, Phagozytose). Dabei werden die DCs durch die RNA über Toll like Rezeptoren (TLR) aktiviert. Zweitens wird die RNA von im Lymphknoten residenten DCs in Protein translatiert und nach posttranslationellen Modifikationen zu Peptiden prozessiert. Drittens interagieren die aktivierten DCs im Lymphknoten mit $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen und präsentieren Peptide, die an MHC-Moleküle binden. Durch Interaktion mit kostimulatorischen Molekülen auf DCs (CD86, CD80 etc.) werden die T-Zellen aktiviert und differenzieren sich in zytotoxische Effektorzellen (CTL), die in der Lage sind, Tumorzellen abzutöten. $CD4^+$ T-Zellen können als Helferzellen eine Rolle sowohl bei der zellulären als auch bei der humoralen Antwort (Antikörper-Antwort durch B-Zellen) spielen.

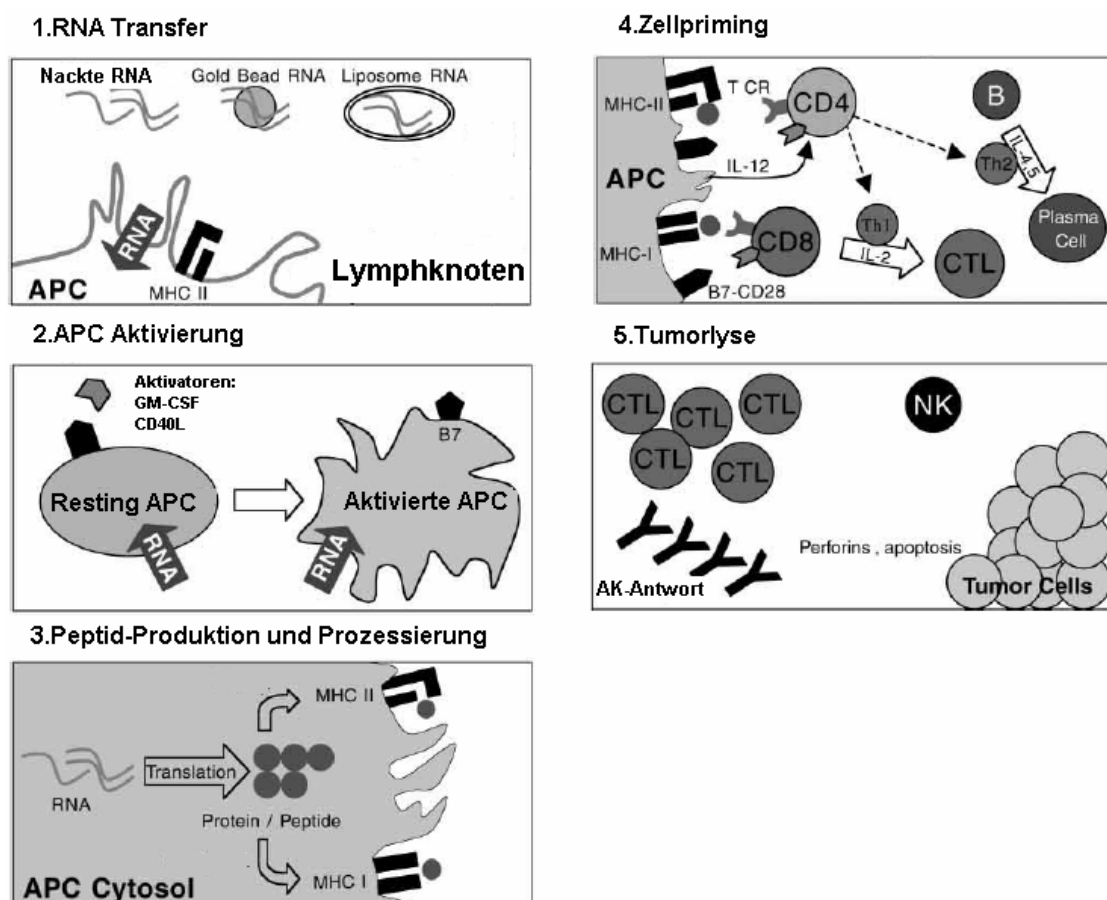


Abb. 4.2: Theoretischer Ablauf der Immunantwort nach intranodaler Immunisierung mit IVT-RNA (modifiziert nach Granstein *et al.*, 2001). Die Erläuterung befindet sich im Text. CTL: zytotoxische T-Lymphozyten, AK: Antikörper.

4.3 Ausblick

Antigen-kodierende RNA ist eine vielversprechende und sichere Alternative zu konventionellen Impfstoffen. Bis dato wurde von vielen Arbeitsgruppen der Applikationsweg der Transfektion von APCs mit nachfolgendem adoptivem Transfer genutzt (Heiser *et al.*, 2002; Nair *et al.*, 2002). Diese Applikationsroute ist mit hohem logistischem und finanziellem Aufwand verbunden und stellt daher ein retardierendes Element in der Tumorimpfstoffentwicklung dar.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die intranodale Injektion von nackter RNA zur selektiven Transfektion von APCs im Lymphknoten, zum Priming und zur Expansion naiver T-Zellen und zur Induktion einer potenten Anti-Tumor Immunantwort führt.

In Fortführung dieser Untersuchung werden wir die Frage der Vakzinierungsfrequenz, welche ein weiterer entscheidender und bisher ungenügend definierter Parameter ist, in den uns zur Verfügung stehenden Modellsystemen untersuchen.

Wir konnten weiterhin zeigen, dass durch Modifikation des intrazellulären Antigen-targetings einerseits eine effiziente MHC-Klasse-II Beladung, andererseits auch eine gesteigerte MHC-Klasse-I Beladung erreicht werden kann. Die dadurch gegebene Möglichkeit der simultanen Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen soll in weiteren Tumormodellen hinsichtlich ihres Einfluß auf die Effizienz der anti-tumoralen Immunantwort untersucht werden.

Eine weitere Möglichkeit zur Maximierung antitumoraler Immunantworten sehen wir in der Möglichkeit der intranodalen Applikation RNA kodierter Adjuvantien. Hierdurch wird eine Verbesserung der Antigenpräsentation und Kostimulation erreicht, von welcher wir zum einen eine Maximierung der Effekte und zum anderen eine deutliche Reduktion unerwünschter systemischer Nebenwirkungen erwarten.

Letztlich stellen die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Daten eine Vorbereitung der klinischen Translation dar. Wir streben an in den kommenden Jahren ein klinisches Vakzinationsprogramm zu etablieren und hoffen der modernen multimodalen Tumortherapie einen weiteren Baustein hinzufügen zu können.

Literatur

Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. and Cresswell, P. (2003). Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 12889-94.

Adams, D. H. and Shaw, S. (1994). Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet* 343: 831-6.

Ahmed, R., Kaech, S. M. and Wherry, E. J. (2002). Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2: 251-62.

Ahmed, R. and Kaech, S. M. (2001). Memory CD8⁺ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* 2(5): 415-22.

Ahmed, R., Masopust, D., Ha, S. J. and Vezyz V. (2006). Stimulation History Dictates Memory CD8⁺ T cell Phenotype: Implication for Prime-Boost Vaccination. *J. Immunol.* 177: 831-39.

Aichele, P., Brduscha-Riem, K., Zinkernagel, R. M., Hengartner, H. and Pircher, H. (1995). T cell priming versus T cell tolerance induced by synthetic peptides. *J Exp Med* 182: 261-6.

Albert, M. L., Sauter, B. and Bhardwaj, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392(6671): 86-9.

Allsopp C. E. M., Plebanski, M., Gilbert, S., Sinden, R. E., Harris, S., Frankel, G., Dougan, G., Hioe, C., Nixon, D., Paoletti, E., Layton, G. and Hill, A. V. S. (1996). Comparison of numerous delivery systems for the induction of CTL by Immunization. *Eur J Immuno.* 26: 1951-59.

Andersson, E. C., Christensen, J. P., Marker, O. and Thomsen, A. R. (1994). Changes in cell adhesion molecule expression on T cells associated with systemic virus infection. *J Immunol* 152: 1237-45.

Armstrong, A. C., Dermime, S., Allinson, C. G., Bhattacharyya, T., Mulryan, K., Gonzalez, K. R., Stern, P. L. and Hawkins, R. E. (2002). Immunization with a Recombinant Adenovirus Encoding a Lymphoma Idiotype: Induction of Tumor-Protective Immunity and Identification of an Idiotype-Specific T Cell Epitope. *J Immunol* 168: 3983-91.

Banchereau, J., Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-52.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. and Palucka, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.

Baratt-Boyes, S. M., Brown, K., Gao, W., Alber, S., Trichel, A., Murphey-Corb, M., Watkins, S. C. and Gambotto, A. (2003). Adenovirus-Transduced Dendritic cells injected into Skin or Lymph Node Prime Potent Simian Immunodeficiency Virus-Specific T Cell Immunity in Monkeys. *J Immunol* 171: 6875-82.

Bargmann, C. I., Hung, M. C. and Weinberg, R. A (1986). The neu oncogene encodes an epidermal growth factor receptor-related protein. *Nature* 319: 226-30.

Barnden, M. J., Allison, J., Heath, W. R. and Carbone, F. R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76: 34.

Belayakov, I. M., Hammond, S.A.; Ahlers, J. D., Glenn, G. M. and Berzofsky, J. A. (2004). Transcutaneous immunization induces mucosal CTLs and protective immunity by migration of primed skin dendritic cells. *J Clin Invest* 113: 998-1007.

Bellone, M., Iezzi, G., Rovere, P., Galati, G., Ronchetti, A., Protti, M. P., et al. (1997). Processing of engulfed apoptotic bodies yields T cell epitopes. *J Immunol* 159(11): 5391-9.

Bevan, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143(5): 1283-8.

Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6): 1513-23.

Blankenstein, T. and Schuler, T. (2002). Cross-priming versus cross-tolerance: are two signals enough? *Trends Immunol* 23(4): 171-3.

Boczkowski, D., Nair, S. K., Snyder, D., Gilboa, E. (1996). Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells *in vitro* and *in vivo*. *J Exp Med* 184: 465-72.

Bommhardt, U., Beyer, M., Hunig, T. and Reichardt, H. M. (2004). Molecular and cellular mechanisms of T cell development. *Cell Mol Life Sci* 61: 263-80.

Bonehill, A., Heirman, C. and Tuyaerts, S. (2003). Efficient presentation of known HLA class II-restricted MAGE-A3 epitopes by dendritic cells electroporated with messenger RNA encoding an invariant chain with genetic exchange of class II-associated invariant chain peptide. *Cancer Res* 63: 5587-94.

Bonehill, A., Heirman, C., Tuyaerts, S., Michiels, A., Breckpot, K., Brasseur, F., Zhang, Y., Van Der, B. P. and Thielemans, K. (2004). Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J Immunol* 172: 6649-57.

Bonehill, A., Heirman, C., Thielemans, K. (2005). Genetic approaches for the induction of a CD4⁺ T cell response in cancer immunotherapy. *J Gene Med* 7: 686-95.

Bonnefoix, T., Claret E., Piccinni, M. P., Jacob, M. C., Zheng, X. Q., Sotto, J. J. (1991). Impaired clonogenic potential of CD25 positive T cells in lymph nodes involved by B cell non-Hodgkin's lymphomas. *Immunol Lett* 27: 135-9.

Bousso, P., Levraud, J. P., Kourilsky, P. and Abastado, J. P. (1999). The composition of a primary T cell response is largely determined by the timing of recruitment of individual T cell clones. *J Exp Med* 189: 1591-1600.

Bronte, V., Apolloni, E., Ronca, R., Zamboni, P., Overwijk, W. W., Surman, D. R., Restifo, N. P. and Zanovello, P. (2000). Genetic vaccination with "self" tyrosinase related protein 2 causes melanoma eradication but not vitiligo. *Cancer Res* 60: 253-8.

Budker, V. G., Godovikov, A. A., Naumova, L. P. and Slepneva, I. A. (1980). Interaction of Polynucleotides with Natural and Model Membranes, *Nucleic Acids Res* 8: 2499-2515.

Busch, D. H., Pilip. I. M., Vijn. S. and Pamer, E. G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8: 353-62.

Butcher, E. C., Picker, L. J. (1996). Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60-6.

Campbell, J. J. and Butcher, E. C. (2000). Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 12: 336-41.

Campbell, J. J., Murphy, K. E., Kunkel, E. J., Brightling, C. E., Soler, D., Shen, Boisvert J., Greenberg, H. B., Vierra, M. A., Goodman, S. B., Genovese, M. C., Wardlaw, A. J., Butcher, E. C. and Wu, L. (2001). CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol* 166: 877-84.

Casrouge, A., Beaudoin, E., Dalle, S., Pannetier, C., Kanellopoulos, J. and Kourilsky, P. (2000). Size estimate of the alpha beta TCR repertoire of naïve mouse splenocytes. *J Immunol* 164: 5782-7.

Chamberlain, J. K. (1990). The microanatomy of the spleen in man. London, Chapman and Hall, 9-22.

Chen, L., Linsley, P. S. and Hellstrom, K. E. (1993). Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* 14: 483-6.

Conry, R. M., LoBuglio, A. F., Wright, M. *et al.* (1995). Characterization of a messenger RNA polynucleotide vaccine vector. *Cancer Res* 55: 1397-1400.

Curtsinger, J. M., Lins, D. C. and Mescher, M. F. (2003). Signal 3 determines tolerance versus full activation of naive CD8 T cells: dissociating proliferation and development of effector function. *J Exp Med* 197(9): 1141-51.

Czerniecki, B. J., Bedrosian, I., Mick, R., Xu, S., Nisenbaum, H., Faries, M., Zhang, P., Cohen, P. A., Koski, G. (2003b). Intranodal Administration of peptide-Pulsed Mature Dendritic Cell Vaccines Results in Superior CD8+ T-cell Funktion in Melanoma Patients. *J Clin Oncology* 20: 3826-35.

Davila, E., Kennedy, R. and Celis, E. (2003). Generation of antitumor immunity by cytotoxic T lymphocyte epitope peptide vaccination, CpG-oligodeoxynucleotide adjuvant, and CTLA-4 blockade. *Cancer Res* 63: 3281-8.

Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334: 395-402.

Donnelly, J. J., Ulmer, J. F., Shiver, J. W. and Liu, M. (1997). DNA Vaccines. *Annu Rev Immunol* 15: 617-48.

Dutton, R. W., Bradley, L. M. and Swain, S. L. (1998) T cell memory. *Annu.Rev.Immunol.* 16: 201-23.

Dutz, J. P., Klimuk, S. K., Najjar, H. M., Semole, S. C. and Aslanian, S. (2004). Epicutaneous Application of Protein Antigen Promotes the Generation of CTL. *J Invest Dermatol* 122: 1042-9.

Espinoza-Delgado, I. (2002). Cancer vaccines. *Oncologist* 7 Suppl 3: 20-33.

Filion, M. C., Philips, N. C. (1997). Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells. *Biochim Biophys Acta* 1329: 345-56.

Fong, L., Brockstedt, D., Benike, C., Wu, L., Engleman, E. G. (2001). Dendritic cells injected via different routes induce immunity in cancer patients. *J Immunol* 166: 4254-9.

Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E. and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* 99(1): 23-33.

Freyschmidt, E. J. und Michel, N. (2003). Nachweis antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen. *Modern Aspects of Immunology Journal* (Immunologie Aktuell) 3.

Gilkelson, G. S., Pippen, A. M. and Pisetsky, D. S. (1995). Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J Clin Invest* 95: 1398-1402.

Girard, J. P. and Springer, T. A. (1995). High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today* 16: 449-57.

Gogolak, P., Rethi, B., Hajas, G. and Rajnavölgyi, E. (2003). Targeting dendritic cells for priming cellular immune responses *J Mol Recognit* 16: 299-317.

Graf, N; Adam, C and Mocikat, R (2003). Persistence of xenogenized vaccine cells in vivo. *Int. J. Cancer* 105, 217-20

Granstein, R. D., Ding, W., Ozawa, H. (2000). Induction of anti-tumor immunity with epidermal cells pulsed with tumor-derived RNA or intradermal administration of RNA. *J Invest Dermatol* 114: 632-6.

Greenberg, P., Yee, C. (2002). Modulating T-cell immunity to tumours: new strategies for monitoring Tcell responses. *Nat Rev Cancer* 2: 409-19.

Greenblatt, M. S., Bennett, W. P., Hollstein, M. and Harris, C. C. (1994). Mutation in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 54: 4855-78.

Grohmann, U., Puccetti, P., Bianchi, R., Fioretti, M. C., Ayroldi, E., Uyttenhove, C., Van Pel, A., Boon, T. (1994). Use of a skin test assay to determine tumor-specific CD8⁺ T cell reactivity. *Eur J Immunol* 24:1446-52.

Gromme, M. and Neefjes, J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39: 181.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. and Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425(6956): 397-402.

Gunn, M. D., Kyuwa, S., Tam, C., Kakiuchi, T., Matsuzawa, A., Williams, L. T. and Nakano, H. (1999). Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localisation. *J Exp Med* 189(3): 451-60.

Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H., Allison, J. P. (1992). CD28-mediated signaling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature* 356: 607-10.

Harvill, E. T., Fleming, J. M. and Morrison, S. L. (1996). In vivo properties of an IgG3-IL-2 fusion protein. A general strategy for immune potentiation. *J Immunol* 157(7): 3165-70.

Heath, W. R. and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self tolerance. *Nat Rev Immunol* 1:126.

Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M., Smith, C. M., Forehan, S. P., Parish, I. A., et al. (2004). Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* 199: 9-26.

Heiser, A., Dahm, P., Yancey, D. R. (2000). Human dendritic cells transfected with RNA encoding prostate-specific antigen stimulate prostate-specific CTL responses *in vitro*. *J Immunol* 164: 5508-14.

Heit, A., Huster, K. M., Schmitz, F., Schiemann, M., Busch, D. H. and Wagner, H. (2004). CpG-DNA aided cross-priming by cross-presenting B cells. *J Immunol* 172(3): 1501-7.

Hermans, I. F., Ritchie, D. S., Yang, J., Roberts, J. M., Ronchese, F. (2000). CD8⁺ T cell-dependent elimination of dendritic cells in vivo limits the induction of antitumor immunity. *J Immunol* 164: 3095-3101.

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

Hoerr, I., Sheel, B., Aulwurm, S., Probst, J., Stitz, L., Rammensee, H. G., Weller, M. and Pascolo, S. (2006). Therapeutic anti-tumor immunity triggered by injections of immunostimulating single-stranded RNA. *Eur J Immunol* 36: 2807-16.

Hogquist, K. A., Jameson, S. C., Heath, W. R., Howard, J. L., Bevan, M. J. and Carbone, F. R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76: 17.

Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., Tureci, Ö., Sahin, U. (2006). Modification of antigen encoding RNA increases stability, translational efficacy and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 108(13): 4009-17.

Homann, D., Teyton, L. and Oldstone, M.B, 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8⁺ but declining CD4⁺ T-cell memory. *Nat Med* 7: 913-9.

Hou, S., Hyland, L., Ryan, K. W., Portner, A. and Doherty, P. C. (1994). Virus-specific CD8⁺ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature* 369: 652-4.

Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A. *et al.* (2003). Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425(6956): 402-6.

Huang, A. Y., Gulden, P. H., Woods, A. S., Thomas, M. C., Tong, C. D., Wang, W., Engelhard, V. H., Pasternack, G., Cotter, R., Hunt, D., Pardoll, D. M. and Jaffee, E. M. (1996). The immunodominant major histocompatibility complex class I-restricted antigen of a murine colon tumor derives from an endogenous retroviral gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 9730-5.

Inaba, K., Inaba, M., Naito, M. and Steinman, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* 178(2): 479-88.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., Steinman, R. M. (1992b). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 176 (6): 1693-702.

Inaba, K., Steinman, R. M., Pack, M. W., Aya, H., Inab, M., Sudo, T., Wolpe, S., Schuler, G., 1992: Identification of proliferation dendritic cells precursors in mouse blood. *J Exp Med* 175(5): 1157-67.

Ingulli, E., Ullman, D., Luciddo, M. M. and Jenkins, M. K. (2002). In Situ Analysis Reveals Physical Interactions between CD11b⁺ Dendritic Cells and Antigen-specific CD4⁺ T Cells after Subcutaneous Injection of Antigen. *J Immunol* 169: 2247-52.

Janeway C. A. and Travers P. (1995). Immunologie. 1. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Janeway, C. A. and Travers, P. (1997). Immunologie, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Shlomchik, M. (2002). Immunologie 5. Auflage, Heidelberg, Spektrum Akademischer Verlag.

Jarosch, E., Geiss-Friedlander, R., Meusser, B., Walter, J. and Sommer, T. (2002). Protein dislocation from the endoplasmic reticulum - pulling out the suspect. *Traffic* 3(8): 530-6.

Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M. and Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* 375(6527): 151-5.

Johnson, A. E. and van Waes, M. A. (1999). The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 799-842.

Kearney, E. R., Pape, K. A., Loh, D. Y. and Jenkins, M. K. (1994). Visualization of peptide-specific T cell immunity and peripheral tolerance induction in vivo. *Immunity* 1: 327-39.

Kedl, R. M., Rees, W. A., Hildeman, D. A., Schaefer, B., Mitchell, T., Kappler, J. and Marrack, P. (2000). T cells compete for access to antigen-bearing antigen-presenting cells. *J Exp Med* 192(8): 1105-13.

Khvorova, A., Kwak, Y.-G., Tamkun, M., Majerfeld, I. and Yarus, M. (1999). RNAs that Bind and Change the Permeability of Phospholipid Membranes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 10649-54.

Kim, K. J., Kanellopoulos-Langevin, C., Merwin, R. M., Sachs, D. H. and Asofsky, R. (1979). Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol* 122(2): 549-54.

King, P. D., Katz, D. R. (1990). Mechanism of dendritic cell function. *Immunol Today* 11: 206-11.

Koido, S., Kashiwaba, M., Chen, D., Gendler, S., Kufe, D., Gong, J. (2000). Induction of antitumor immunity by vaccination of dendritic cells transfected with MUC1 RNA. *J Immunol* 165: 5713-9.

Kopp, W. C. (1990). The immune functions of the spleen. London, Chapman and Hall, 103-26.

Kraal, G. and Mebius, R. E. (1997). High endothelial venules: lymphocyte traffic control and controlled traffic. *Adv Immunol* 65: 347-95.

Kronenberger, K., Mocikat, R., Selmayr, M., Thierfelder, S., Strehl, J., Wahl, U., Lindhofer, H. and Kraal, G. (2002). Impact of the lymphoma idiotype on in vivo tumor protection in a vaccination model based on targeting antigens to antigen-presenting cells. *Blood* 99: 1327-31.

Kündig, T. M., Maloy, K. J., Erdmann, I., Basch, V., Sierro, S., Kramps, T. A., Zinkernagel, R. M. and Oehen, S. (2001). Intralymphatic immunization enhances DNA vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(6): 3299-303.

Kündig, T. M., Bachmann, M. F., DiPaolo, C., Simard, J. J., Battegay, M., Lother, H., Gessner, A., Kuhlcke, K., Ohashi, P. S. and Hengartner, H. (1995). Fibroblasts as efficient antigen-presenting cells in lymphoid organs. *Science* 268: 1343-7.

Kündig, T. M., Johansen, P., Häffner, A. C., Koch, F., Zepter, K., Erdmann, I., Maloy, K., Simard, J. J., Storni, T., Senti, G., Bot, A. and Wütrich, B. (2005). Direct intralymphatic injection of peptide vaccines enhances immunogenicity. *Eur J Immunol* 35: 568-74.

Kurts, C., Cannarile, M., Klebba, I. and Brocker, T. (2001). Dendritic cells are sufficient to crosspresent self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J Immunol* 166(3): 1439-42.

Kwok, S. and Higuchi, R. (1989). Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339: 237-8.

Levitsky, H. I., Montgomery, J., Ahmadzadeh, M., Staveley-O'Carroll, K., Guarnieri, F., Longo, D. L., Kwak, L. W. (1996). Immunization with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-transduced, but not B7-1-transduced, lymphoma cells primes idiotypespecific T cells and generates potent systemic antitumor immunity. *J Immunol* 156: 3858-65.

Levy, R., Syrengelas, A. D., Chen, T. T. (1996). DNA immunization induces protective immunity against B-cell lymphoma. *Nat Med* 2: 1038-41.

Lew., A. M., Zhan, Y., Corbett, A. J., Brady, J. L. and Sutherland, R.M. (2000). CD4 Help-Independent Induction of Cytotoxic CD8 Cells to Allogeneic P815 Tumor Cells is Absolutely Dependent on Costimulation. *J Immunol* 165: 3612-9.

Lowenadler, B., Svennerholm, A. M., Gildund, M., Holmgren, E., Krook, K., Svanholm, C., Uiff, S. and Josephson, S. (1990). Enhanced immunogenicity of recombinant peptide fusions containing multiple copies of a heterologous T helper epitope. *Eur J Immunol* 20(7): 1541-5.

Ludewig, B., Ehl, S., Karrer, U., Odermatt, B, Hengartner, H. und Zinkernagel, R. M. (1998). Dendritic cells efficiently induce protective antiviral immunity, *J Virol* 72(5): 3812-8.

Luther, S. A., Tang, H. L., Hyman, P. L., Farr, A. G. and Cyster, J. G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the plt/plt mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23): 12694-9.

Lutz, M. B., Kukutsch, N., Ogilvie, A. L., Rossner, S., Koch, F., Romani, N. and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77-92.

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

Ma, B. Y., Mikolajczak, S. A., Yoshida, T., Yoshida, R., Kelvin, D. J. and Ochi, A. (2004). CD28 T cell costimulatory receptor function is negatively regulated by N-linked carbohydrates. *Biochem Biophys Res Commun* 317: 60-7.

Mackay, C. R. (1993). Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5(3): 423-7.

Mandl, C. W., Aberle, J. H., Aberle, S. W., Holzmann, H., Allison, S. L., Heinz, F. X. (1998). *In vitro*-synthesized infectious RNA as an attenuated live vaccine in a flavivirus model. *Nat Med* 4: 1438-40.

Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M. H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., Bourlond, A., Vanwijck, R., Lienard, D., Beauduin, M., Dietrich, P. Y., Russo, V., Kerger, J., Masucci, G., Jager, E., De Greve, J., Atzpodien, J., Brasseur, F., Coulie, P. G., van der Bruggen, P. and Boon, T.

(1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80: 219-30.

Martinon, F., Krishnan, S., Lenzen, G., Magne, R., Gomard, E., Guillet, J.-G., Levy, J-P. and Meulien, P. (1993). Induction of virus specific cytotoxic T lymphocytes in vivo by liposome-entrapped mRNA. *Eur J Immunol* 23: 1719-22.

Matlack, K. E., Mothes, W. and Rapoport, T. A. (1998). Protein translocation: tunnel vision. *Cell* 92(3): 381-90.

Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.

Melief, J. M., Ossendorp, B. F., Mengede, E., Camps, M. and Filius, R. (1998). Specific T Helper cell Requirement for Optimal Induction of Cytotoxic T Lymphocytes against Major Histocompatibility Complex Class II Negative Tumors. *J Exp Med* 187(5): 693-702.

Mercado, R., Vijh, S., Allen, S. E., Kerksiek, K., Pilip, I. M. and Pamer, E. G. (2000). Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol* 165 (12).

Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. and Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol* 3.

Mocikat, R., Selmayr, M., Thierfelder, S. and Lindhofer, H. (1997). Trioma-based Vaccination against B-Cell Lymphoma Confers Long-Lasting Tumor Immunity. *Cancer Research* 57.

Mohler, K. M. and Butler, L. D. (1989). In vitro detection of lymphokines produced by in vitro activated lymphocytes. *J Immunol Methods* 121: 67-73.

Moll, H., Fuchs, H., Blanc, C. and Rollinghoff, M. (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* 23(7): 1595-601.

Mosmann, T. R. and Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7: 145-73.

Mosmann, T. R. and Sad, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17: 138-46.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbour, Symp. Quant. Biol. 51(Pt 1), 263-73.

Murali-Krishna, K., Altman, J. D., Suresh, D. J., Sourdive, A. J., Zajac, J. D., Miller, J. and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8: 177-87.

Nestle, F. O., Gilliet, M., Kleinhans, M., Lantelme, E., Schadendorf, D. and Burg, G. (2003a). Intranodal injection of semimature monocyte-derived dendritic cells induces T helper type 1 response to protein neoantigen. *Blood* 102: 1.

Nestle, F. O., Aljagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G. and Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4: 328-32.

Nisbet, A. D., Saundry, R. H., Moir, A. J., Fothergill, L. A. and Fothergill, J. E. (1981). The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur J Biochem* 115: 335.

Nishimura, T., Watanabe, K., Yahata, T. *et al.* (1996). Application of interleukin 12 to antitumor cytokine and gene therapy. *Cancer Chemother Pharmacol* 38: 27-34.

Norbury, C. C., Basta, S., Donohue, K. B., Tschärke, D. C., Princiotta, M. F., Berglund, P., *et al.* (2004). CD8⁺ T cell cross-priming via transfer of proteasome substrates. *Science* 304(5675): 1318-21.

Oehen, S. and Brduscha-Riem, K. (1998). Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol* 161: 5338-46.

O'Garra, A. and Arai, N. (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 10: 542-50.

Pamer, E. and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16: 323-58.

Pardoll, D. M. (1995). Paracrine cytokine adjuvants in cancer immunotherapy. *Ann Rev Immunol* 13: 399-415.

Pardoll, D. M.; Levitsky, H. I., Lazenby, A. and Hájashi, R. J. (1994). In vivo Priming of Two Distinct Antitumor Effector Populations: The Role of MHC I Expression. *J Exp Med* 179: 1215-24.

Pittet, M. J., Speiser, D. E., Valmori, D., Rimoldi, D., Lienard, D., Le jeune, F., Cerottini, J. C., Romero, P. (2001). Ex vivo analysis of tumor antigen specific CD8⁺ T cell responses using MHC/peptide tetramers in cancer patients. *Int Immunopharmacol* 1: 1235-47.

Porgador, A., Yewdell, J. W., Deng, Y., Bennink, J. R. and Germain, R. N. (1997). Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6: 715.

Puccetti, P., Bianchi, R., Fioretti, M. C., Ayroldi, E., Uyttenhove, C., Van Pel, A., Boon, T., Grohmann, U. (1994). Use of a skin test assay to determine tumor-specific CD8⁺ T cell reactivity. *Eur J Immunol* 24: 1446-52.

Radsak, M., Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P. and Schild, H. J. (2005). *J Immunol* 174: 2476-80.

Radsak, M., Rechtsteiner, G., Warger, T., Osterloh, P., Schmitt, E. and Schild, H. J. (2006). Synergistic activation of dendritic cells by combined toll-like receptor ligation induces superior CTL responses *in vivo*. *Blood* 108(2): 544-50.

Rammensee, H. G., Probst, J., Hoerr, I. and Pascolo, S. (2007). Spontaneous cellular uptake of Exogenous messenger RNA *in vivo* is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene Therapy* 1-6.

Raz, E., Carson, D. A., Parker, S. E., Parr, T. B., Abai, A. M., Aichinger, G., Gromkowski, S. H., Singh, M., Lew, D., Yankauckas, M. A., *et al.* (1994). Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(20): 9519-23.

Raz, E., Tighe, H., Sato, Y., Corr, M., Dudler, J. A., Roman, M., Swain, S. L., Spiegelberg, H. L. and Carson, D. A. (1996). Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5141-5.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., They, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S. (1999). Fc-gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189(2): 371-80.

Robinson, H. L., Hunt, L. A. and Webster, R. G. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11(9): 957-60.

Rock, K. L., Pozzi, L. M. and Maciaszek J. W. (2005). Both Dendritic Cells and Macrophages Can Stimulate Naïve CD8 T Cells *In Vivo* to Proliferate, Develop Effector Function, and Differentiate into Memory Cells. *J Immunol* 175: 2071-81.

Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* 1(6): 362-8.

Romisch, K. (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* 112(Pt 23): 4185-91.

Ronchetti, A., Rovere, P., Iezzi, G., Galati, G., Heltai, S., Protti, M. P., *et al.* (1999). Immunogenicity of apoptotic cells in vivo: role of antigen load, antigen-presenting cells, and cytokines. *J Immunol* 163(1): 130-6.

Rotzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Walden, P. and Rammensee, H. G. (1991). Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 21: 2891-4.

Sahin, U., Britten, C. M. (2005). Impfstrategie zur Prävention oder Therapie von Tumoren. *Onkologe* 11: 502-13.

Sahin, U., Türeci, Ö., Pfreundschuh, M (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9: 709-16.

Sahin, U., Türeci, Ö., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Pfreundschuh, M. (1995). Human tumors elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11810-3.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-91.

Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994). 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* 179(4): 1109-18.

Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. and Lanzavecchia, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the

major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 182(2): 389-400.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M. and Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-12.

Scensson, M., Stockinger, B. and Wick, M. J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* 158(9): 4229-36.

Scheibenbogen, C., Schadendorf, D., Bechrakis, N. E., Nagorsen, D., Hofmann, U., Servetopoulou, F., Letsch, A., Philipp, A., Foerster, M. H., Schmittel, A., Thiel, E. and Keilholz, U. (2003). Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and foreign helper protein as immunologic adjuvants on the T-cell response to vaccination with tyrosinase peptides. *Int J Cancer* 104: 188-94.

Schlecht, S., Wiesmüller, K.-H., Jung, G., und Bessler, W. G. (1994). Lipopeptide als natürliche Adjuvantien für Impfstoffe aus Gram-negativen Bakterien. *Naturwissenschaften* 80: 9-17.

Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. and Melief, C. J. (1998a). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393(6684): 480-3.

Schoenberger, S. P., van der Voort, E. I., Krietemeijer, G. M., Offringa, R., Melief, C. J. and Toes, R. E. (1998b). Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells. *J Immunol* 161(8): 3808-12.

Schoenberger, S. P., van der Voort, E.I. and Krietemeijer, G. M. (1998). Cross-priming of CTL responses in vivo does not require antigenic peptides in the endoplasmic reticulum of immunizing cells, *J Immunol* 161: 3808-12.

Schortman, K. and Liu, Y. J. (2002). Mouse and human Dendritic Cell subtypes. *Nat Rev Immunol* 2(3):151-61.

Schreurs, M. W., de Boer, A. J., Figdor, C. G. and Adema, G. J. (1998). Genetic vaccination against the melanocyte lineage-specific antigen gp100 induces cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor protection. *Cancer Res* 58: 2509-14.

Schwartz, J. C., Zhang, X. and Nathenson, S. G. (2002). Structural mechanisms of costimulation. *Nat Immunol* 3: 427-34.

Schwarz, L. M., Osborne, B. A., (1993). Programmed cell death, apoptosis and killer genes. *Immunol Today* 14: 582-90.

Selmayr, M., Strehl, J., Kremer, J. P., Hültner, L., Lindhofer, H. and Mocikat, R. (1999). Gene therapy of B-cell lymphoma with cytokine gene-modified trioma cells. *Int J Cancer* 83: 113-20.

Sette, A., Buus, S., Colon, S., Smith, J. A., Miles, C. and Grey, H. M. (1987). Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature* 328: 395.

Sherman, L., Morgan, D. J., Liblau, R., Scott, B., Fleck, S., McDevitt, H. O., Sarvetnick, N. and Lo, D. (1996). CD8(+) T cell-mediated spontaneous diabetes in neonatal mice. *J Immunol* 157: 978-83.

Silva, S. J., Machado, F. S., Koyama, N. S., Carregaro, V., Ferreira, B. R., Milanezi, C. M., Teixeira, M.M. and Rossi, M. A. (2005). CCR5 Plays a critical Role in the Development of Myocarditis and Host Protection in Mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infectious Disease* 191: 627-36.

Slater, J. S., Futch, W. S., Cavanaugh, V. J. and Campbell, A. E. (1991). Murine cytomegalovirus independently inhibits priming of helper and cytotoxic T lymphocytes. *Virology* 185: 132-9.

Springer, T. A. (1994). Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 76: 301-14.

Srivastava, P. (2002). Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20: 395-425.

Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 9: 271-96.

Steinman, R. M. and Nussenzweig, M. C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(1): 351-8.

Steinman, R., Goldszmid, R. S., Idoyaga, J., Bravo, A. and Wainstok, R. (2003). Dendritic Cells charged with Apoptotic Tumor Cells induce Long-lived protective CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Immunity against B16 Melanoma. *J Immunol* 171: 5940-7.

Stevenson, F. K., Wraitham, M. and Glennie, M. J. (1986). Antibodies to shared idiotypes as agents for analysis and therapy for human B cell tumors. *Blood* 68: 430-6.

Stockinger, B., Abkari, B. O., Panjwani, N., Carcia, S., Tascon, R. and Lowrie, D. (1999). DNA Vaccination: Transfection and Aktivation of Dendritic Cells as Key Events for Immunity. *J Exp Med* 189: 169-77.

Su, Z., Dannull, J., Heiser, A., Yancey, D., Pruitt, S., Madden, J., Coleman, D., Niedzwiecki, D., Gilboa, E., Vieweg, J. (2003). Immunological and clinical responses in metastatic renal cancer Patients vaccinated with tumor RNA-transfected dendritics cells. *Cancer Res* 63: 2127-31.

Su, Z., Dannull, J., Yang, B. K., Dahm, P., Coleman, D., Yancey, D., Sichi, S., Niedzwiecki, D., Boczkowski, D., Gilboa, E. and Vieweg, J. (2005). Telomerase mRNA-transfected dendritic cells stimulate antigen-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cell responses in patients with metastatic prostate cancer. *J Immunol* 174: 3798-807.

Tagawa, S. T., Lee, P., Snively, J., Boswell, W., Ounpraseuth, S., Lee, S., Hickingbottom, B., Smith, J., Johnson, D. and Weber, J. S. (2003). Phase I study of intranodal delivery of a plasmid DNA vaccine for patients with Stage IV melanoma. *Cancer* 98: 144-54.

Tan, P., Anasetti, C., Hansen, J. A., Melrose, J., Brunvand, M., Bradshaw, J., Ledbetter, J. A., Linsley, P.S. (1993). Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1. *J Exp Med* 177: 165-73.

Tang, D. C., DeVit, M. and Johnston, S. A. (1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-4.

Tarlinton, D. (1998). Germinal centers: form and function. *Curr Opin Immunol* 10: 245-51.

Templeton, N. S., Lasic, D. D., Frederik, P. M., Strey, H. H., Roberts, D. D. and Pavlakis, G. N. (1997). Improved DNA: Liposome complexes for increased systemic delivery and gene expression. *Nature Biotechnology*, 15: 647-52.

Thomson, S. A., Burrows, S. R. and Misko, I. S. (1998). Targeting a polyepitope protein incorporating multiple class II-restricted viral epitopes to the secretory/endocytic pathway facilitates immune recognition by CD4⁺ cytotoxic T lymphocytes: a novel approach to vaccine design. *J Virol* 72: 2246-52.

Turner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., Brocker, E. B., Steinman, R. M., Enk, A., Kampgen, E. and Schuler, G. (1999). 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* 190: 1669-78.

Timmerman, J. M. and Levy, R. (1999). Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy. *Annu Rev Med* 50: 507-29.

Türeci, Ö., Mack, U., Luxemburger, U., Heinen, H., Krummenauer, F., Sester, M., Sester, U., Sybrecht, G. W., Sahin, U. (2005). Frequent humoral immune responses against tumor antigen NY-ESO-1 in lung cancer patients. *Cancer Letters*

Türeci, Ö., Ding, J., Hilton, H., Bian, H., Ohkawa, H., Braxenthaler, M., Setz, G., Radrizzani, L., Friess, H., Buchler, M., Sahin, U., Hammer, J. (2003). Computational dissection of tissue contamination for identification of colon cancer-specific expression profiles. *FASEB J* 17: 376-85.

Türeci, Ö., Sahin, U., Zwick, C., Koslowski, M., Seitz, G., Pfreundschuh, M. (1998). Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 5211-6.

Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromboski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M. and Friedman, A. (1993). Heterologous protection against Influenza by Injektion of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745-9.

Vadolas, J., Davies, J. K., Wright, P. J. and Strugnell, R. A. (1995). Intranasal immunization with liposomes induces strong mucosal immune response in mice. *Eur J Immunol* 25: 969-75.

Van Endert, P. M. (1996). Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing? *Immunol Res* 15(4): 265-79.

Van Ewijk, W. and Nieuwenhuis, P. (1985). Compartments, domains and migration pathways of lymphoid cells in the splenic pulp. *Experientia* 41: 199-208.

Villadangos, J. A. (2001). Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 38: 329.

Villadangos, J. A. and Ploegh, H. L. (2000). Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* 12: 233.

Von Adrian, U. H. and Mempel, T. R. (2003). Homing and Cellular Traffic in Lymph Node. *Nature Reviews Immunol* 23: 867-78.

Von Boehmer, H., Kirberg, J., Baron, A., Jakob, S., Rolink, A. and Karjalainen, K. (1994). Thymic Selection of CD8 Single Positive Cells with a Class II Major Histocompatibility Complex-restricted Receptor. *J Exp Med* 180: 25-34.

Wang, F., Bade, E., Kuniyoshi, C., Spears, L., Jeffery, G., Marty, V., Groshen, S. and Weber, J. (1999). Phase I trial of a MART-1 peptide vaccine with incomplete Freund's adjuvant for resected high-risk melanoma. *Clin Cancer Res* 5: 2756-65.

Weeratna, R. D., McCluskie, M. J., Xu, Y. and Davis, H. L. (2000). CpG DNA induces stronger immune responses with less toxicity than other adjuvants. *Vaccine* 18: 1755-62.

Wiertz, E. J., Tortorella, D., Bogyo, M., Yu, J., Mothes, W., Jones, T. R., *et al.* (1996). Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384(6608): 432-8.

Wolf, H., *et al.* (1994). Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells. *Biophys J* 66(2 Pt1): 524-31.

Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., *et al.* (1990). Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 247: 1465-8.

Wolkers, M. C., Brouwenstijn, N., Bakker, A. H., Toebes, M. and Schumacher, T. N. (2004). Antigen bias in T cell cross-priming. *Science* 304(5675): 1314-7.

Yang, J., Huck, S. P., McHugh, R. S., Hermans, I. F., Ronchese, F. (2006). Perforin-dependent elimination of dendritic cells regulates the expansion of antigen-specific CD8⁺ T cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 147-152.

Yang, N. S., Burkholder, J., Roberts, B., Martinell, B. and McCabe, D. (1990). In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9568-72.

Yee, C., Greenberg, P. (2002). Modulating T-cell immunity to tumours: new strategies for monitoring T-cell responses. *Nat Rev Cancer* 2: 409-19.

Ying, H., Zaks, T. Z., Wang, R. F., *et al.* (1999). Cancer therapy using a self-replicating RNA vaccine. *Nat Med* 5: 823-7.

York, I. A. and Rock, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14: 369-96.

Zaunders, J. J., Dyer, W. B., Liu, J., Rawlinson, W., Kent, S. J., Cooper, D. A. and Kellerher, A. D. (2006). CD127⁺CCR5⁺CD38⁺⁺⁺CD4⁺ Th1 Effector Cells are an Early Component of the Primary Immune Response to Vaccinia Virus and Precede Development of Interleukin-2⁺MemoryCD4⁺ T Cells. *J Virology* 10151-61.

Zeis, M., Siegel, S., Wagner, A., Kabelitz, D., Marget, M., Coggin, J., Barsoum, A., Rohrer, J. and Schmitz, N. (2003). Induction of cytotoxic T-Cell responses against the oncofotal antigen-immature laminin receptor for the treatment of hematologic malignancies. *Blood* 102: 4416-23.

Zhou, W. Z., Hoon, D. S., Huang, S. K., *et al.* (1999). RNA melanoma vaccine: induction of antitumor immunity by human glycoprotein 100 mRNA immunization. *Hum Gene Ther* 10: 2719-24.

Zimmerman, C., Brduscha-Riem, K., Blaser, C., Zinkernagel, R. M. and Pircher, H. (1996). Visualization, characterization, and turnover of CD8⁺ memory T cells in virusinfected hosts. *J Exp Med* 183: 1367-75.

Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701-2.

Zinkernagel, R. M., Ehl, S., Aichele, P., Ramseier, H. and Hengartner, H. (1998). Antigen persistence and time of T-cell tolerization determine the efficacy of tolerization protocols for prevention of skin graft rejection. *Nat Med* 9: 1015-9.

Veröffentlichungen

Publikationen

- Selmi, A., Holtkamp, S., Kreiter, S., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö., Sahin, U. Modification of antigen encoding RNA increases stability, translational efficacy and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 108(13): 4009-17.
- Manuskript für diese Arbeit ist in Vorbereitung

Posterbeiträge

Holtkamp, S., Selmi, A., Kreiter, S., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö., Sahin, U. Modifications of antigen coding RNA increases stability, translational efficacy and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Annual meeting on cancer immunotherapy* (2006.)

Kreiter, S., Selmi, A., Holtkamp, S., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö., Sahin, U. Verstärkte Expansion von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Antigen-targeting in dendritischen Zellen. *Gemeinsame Jahrestagung von DGHO, ÖGHO und SGMO* (2005).

Kreiter, S., Selmi, A., Holtkamp, S., Koslowski, M., Huber, C., Schild, H., Türeci, Ö., Sahin, U. Highly efficient, polyepitopic antigen presentation and simultaneous stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells by linking antigens to a MHC-class-I targeting signal. *36th Annual Meeting of the DGfI* (2005).

Kreiter, S., Selmi, A., Holtkamp, S., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö., Sahin, U. Highly efficient stimulation and expansion of antigen specific CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes by improved targeting into MHC-I and -II processing pathways. *12th International congress of Immunology and 4th annual conference of FOCIS, Toronto, Canada* (2004).

Kreiter, S., Selmi, A., Holtkamp, S., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, Ö., Sahin, U. Enhanced and simultaneous stimulation of CD4⁺ and CD8⁺ T cells by antigen targeting in dendritic cells. *35th Annual Meeting of the DGfI* (2004).