

**Untersuchungen zur selektiven Deletion alloreaktiver Spender-T-
Lymphozyten durch CD178-modifizierte dendritische Zellen im
Rahmen der allogenen Blutstammzelltransplantation**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Marcus Kaltwasser
geb. in Wiesbaden

Mainz 2006

*für Katrin
und
meine Eltern*

Inhaltsverzeichnis

A. Zusammenfassung.....	1
B. Einleitung.....	3
1. Die allogene Stammzelltransplantation.....	3
1.1. Mit der allogenen Stammzelltransplantation assoziierte immuno- logische Effekte, Nebenwirkungen und Komplikationen.....	3
2. Die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD).....	5
2.1. Pathogenese der GvHD.....	5
2.2. GvHD-Prophylaxe.....	8
3. Programmierter Zelltod (Apoptose).....	10
3.1. Todesrezeptoren und ihre Liganden: Das CD95/CD178-System.....	11
3.1.1. CD95 (Fas/Apo-1).....	12
3.1.2. CD178 (CD95L/FasL).....	12
3.1.3. Induktion der CD95/CD178-vermittelten Apoptose.....	13
3.2. Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD).....	15
4. Dendritische Zellen (DZ).....	18
4.1. Eigenschaften und Generierung von DZ.....	18
4.2. Therapeutische Modifikation von DZ.....	20
5. Zielsetzungen der Arbeit.....	21
C. Material und Methoden.....	23
1. Material.....	23
1.1. Geräte.....	23
1.2. Verbrauchs- und spezielles Material.....	24
1.3. Chemikalien.....	25
1.4. Enzyme, Kits und spezielle Reagenzien.....	27
1.5. Kulturmedien und Antibiotika.....	28

1.6. Zytokine.....	28
1.7. Antikörper.....	29
1.8. Fusionsproteine.....	30
1.9. Oligonukleotide.....	30
1.10. Plasmide.....	31
1.11. Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme.....	31
1.12. Mausstämme.....	32
2. Methoden.....	33
2.1. Biochemische und molekularbiologische Methoden.....	33
2.1.1. Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen.....	33
2.1.2. Gelelektrophorese von RNA in Agarosegelen.....	33
2.1.3. Enzymatische Hydrolyse von DNA.....	34
2.1.4. Reinigung und Fällung von DNA.....	34
2.1.4.1. Phenolextraktion.....	34
2.1.4.2. Ethanol-fällung.....	35
2.1.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	35
2.1.6. Ligation von DNA-Fragmenten.....	35
2.1.7. Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab.....	36
2.1.8. Absorptionsmessung und Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren.....	36
2.1.9. DNA-Amplifizierung mittels PCR.....	36
2.1.9.1. PCR-Reaktion mit der Deep-Vent TM - bzw. Taq-DNA-Polymerase...36	
2.1.9.2. Reinigung des amplifizierten PCR-Produktes.....	37
2.1.9.3. Kolonie-PCR.....	37
2.1.10. Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen.....	38
2.1.11. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR).....	38
2.1.12. Synthese von <i>in vitro</i> transkribierter RNA.....	39
2.1.12.1. Vorbereitung der Vektoren für die <i>in-vitro</i> -Transkription (IVT).....	39
2.1.12.2. <i>In-vitro</i> -Transkription (IVT) und Polyadenylierung.....	40
2.2. Arbeiten mit Bakterien.....	40

2.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien.....	40
2.2.2. Transformation kompetenter E.coli-Bakterien.....	41
2.2.3. Glycerin-Dauerkulturen von Bakterien.....	41
2.3. Zellbiologische Methoden.....	41
2.3.1. Kultivierung permanenter Zelllinien.....	42
2.3.2. Gewinnung von GM-CSF-Kulturüberstand.....	42
2.3.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	43
2.3.4. Zellzahlbestimmung.....	43
2.3.5. Generierung von dendritischen Zellen (DZ) aus Mäuse- knochenmark.....	43
2.3.6. Maturierung von DZ.....	44
2.3.7. Gewinnung von Lymphozyten.....	44
2.3.7.1. Isolation von T-Lymphozyten aus Milzzellen.....	45
2.3.7.2. Isolation von B-Lymphozyten aus Mausmilzen.....	45
2.3.7.2.1. Aktivierung naiver B-Lymphozyten.....	46
2.3.8. Transfektionsexperimente mit IVT-mRNA.....	46
2.3.9. Immunphänotypisierung von Zellen mittels Durchflußzytometrie.....	47
2.3.10. Immunologisch funktionelle Analysen.....	48
2.3.10.1. Proliferationstest (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR).....	48
2.3.10.2. ELISpot-Assay.....	49
2.3.10.3. <i>In-vitro</i> -Deletion alloreaktiver T-Zellen.....	50
2.4. Tierexperimente.....	51
2.4.1. Zucht und Haltung von Experimentaltieren.....	51
2.4.2. Adoptive T-Zell-Transferexperimente.....	51
2.4.3. Organpräparationen.....	51
D. Ergebnisse.....	53
1. Deletion alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten durch CD178-mRNA- transfizierte murine dendritische Zellen.....	53
1.1. Konstruktion von <i>in-vitro</i> -Transkriptionsvektoren zur Herstellung von messenger RNA für CD178 und CD178-X-Fusionsproteine.....	54

1.2. Synthese von mRNA durch <i>in-vitro</i> -Transkription (IVT).....	55
1.2.1. Überprüfung der erfolgreichen RNA-Synthese und der Polyadenylierung der <i>in vitro</i> generierten RNA.....	57
1.3. Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark.....	58
1.3.1. Morphologie der aus Knochenmark generierten DZ.....	58
1.3.2. Phänotypische Charakterisierung der aus Knochenmark generierten DZ.....	59
1.3.3. Die stimulatorische Kapazität der generierten DZ.....	61
1.4. Modifikation von murinen DZ durch Transfektion mit RNA.....	62
1.4.1. Transfektion von K562-Zellen mit CD178-mRNA mittels Elektroporation.....	63
1.4.2. Nachweis der biologischen Aktivität der CD178-mRNA.....	64
1.4.3. Sind <i>in vitro</i> generierte DZ resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose?.....	65
1.4.4. Transfektion muriner DZ mit CD178-mRNA mittels Elektroporation...67	
1.4.5. Liposomenvermittelte Transfektion von DZ.....	68
1.4.6. Stimulation allogener T-Lymphozyten mit DZ-CD178-mRNA- Transfektanten in der MLR.....	69
1.5. Untersuchungen zur ausbleibenden CD178-Expression.....	70
1.5.1. Kinetik der mRNA-Expression nach Elektroporation muriner DZ.....	71
1.5.2. Wird in DZ die Expression von CD178 durch posttranslationelle Modifikation reguliert?.....	73
1.5.2.1. Einfluß von Proteasomeninhibitoren.....	73
1.5.2.2. Einfluß von Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren.....	73
1.5.2.3. Einfluß von Caspase-Inhibitor.....	73
1.5.2.4. Inhibition der Apoptose-Signaltransduktionskette durch cFLIP.....	74
1.5.2.5. Transfektion CD95-defizienter muriner DZ mit CD178-mRNA.....	75
1.5.3. Regulation der Expression und biologischen Aktivität von CD178 in murinen DZ über die zytoplasmatische Region des Liganden.....	76
2. Deletion alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten mit CD178-X-Fusions-proteinen.....	79

2.1. Aufbau und Funktion der CD178-X-Fusionsproteine.....	79
2.2. Nachweis der Bindung der Fusionsproteine CD178-CD40 und CD178-CD28 an die membrangebundenen Rezeptoren/Liganden CD80/CD86 bzw. CD154.....	81
2.3. Bestimmung der CD178-X-Fusionsprotein Konzentrationen für <i>in vitro</i> Anwendungen.....	82
2.4. Einfluß von hCD178-X-Fusionsproteinen auf die Alloreaktivität von T-Zellen in einem MHC-disparaten System.....	83
2.5. Einfluß von hCD178-X-Fusionsproteinen auf die Alloreaktivität von T-Zellen in einem minor-Histokompatibilitätsantigen- (mHAg) disparaten System.....	85
2.6. Stimulation alloreaktiver T-Zellen mit DZ nach Transfektion hCD178-X-Fusionsprotein-kodierender mRNA.....	86
2.7. Ist die Reduktion von Alloreaktivität durch hCD178-X-Fusions- proteine auf AICD zurückzuführen?.....	87
2.7.1. Inhibieren CD80/86-bindende hCD178-X-Fusionsproteine die Kostimulation zwischen DZ und T-Zelle?.....	89
2.8. Wie effizient ist die Inhibition der Alloreaktivität durch hCD178-X- Fusionsproteine?.....	90
2.9. Spezifität der Deletion alloreaktiver T-Zellen durch hCD178-X- Fusionsproteine.....	91
2.10. Adoptive T-Zell-Transferexperimente nach <i>in-vitro</i> -Deletion allo- reaktiver T-Lymphozyten.....	93
2.11. Chimärismusanalyse.....	96
2.12. Verwendung von aktivierten B-Lymphozyten als Effektorzellen zur Deletion alloreaktiver T-Zellen mittels hCD178-X-Fusionsproteinen....	97
E. Diskussion.....	100
1. Deletion alloreaktiver T-Zellen mittels hCD178-exprimierender allogener DZ.....	100
1.1. <i>In-vitro</i> -Synthese von hCD178-mRNA.....	100

1.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität der <i>in vitro</i> transkribierten mRNA.....	101
1.3. <i>In-vitro</i> generierte murine DZ aus Knochenmark als professionelle Stimulatorzellen.....	102
1.4. Transfektion muriner DZ mit mRNA.....	104
1.4.1. Murine DZ lassen sich effizient mit mRNA transfizieren, zeigen jedoch nur schwache CD178-Expression.....	104
1.4.2. <i>In-vitro</i> -generierte murine maturierte DZ sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose.....	105
1.4.3. CD178-mRNA-DZ-Transfektanten induzieren in T-Zellen <i>in vitro</i> kein AICD.....	106
1.4.4. Insuffiziente CD178-Expression in DZ nach Transduktion ist keine Folge CD95-vermittelter Apoptose.....	106
1.4.5. Die zytoplasmatische Region von CD178 hat einen regulatorischen Einfluß auf die Lokalisation und Funktion von CD178.....	108
2. Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten mittels CD178-X-Fusionsproteinen sowie agonistischem anti-CD95-Antikörper.....	110
2.1. CD178-X-Fusionsproteine binden auf Zelloberflächenmolekülen und inhibieren die Proliferation allogener T-Zellen.....	110
2.1.1. Transfektion von CD178-X-Fusionsprotein kodierender RNA in DZ führt zur Expression und Inhibition von Alloreaktivität.....	112
2.2. CD178-X-Fusionsproteine sind bifunktional.....	112
2.2.1. Fusionsproteine können die Kostimulation zwischen T-Zellen und DZ inhibieren und Anergie in T-Zellen hervorrufen.....	113
2.3. CD178-X-Fusionsproteine deletieren selektiv alloreaktive T-Zellen....	114
2.4. <i>In vitro</i> mit hCD178-mCD28-Fusionsprotein durchgeführte Deletion/Inhibition alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten führt <i>in vivo</i> zur effektiven GvHD-Prophylaxe.....	115
2.4.1. Nach adoptivem Transfer <i>in-vitro</i> -deletierter Spender-T-Lymphozyten entwickelten die Rezipienten einen T-Zell-Chimärismus.....	116

2.5. B-Lymphozyten eignen sich ebenfalls als APZ für die Beladung mit Fusionsproteinen.....	117
3. Ausblick.....	118
F. Abkürzungsverzeichnis.....	119
G. Literaturverzeichnis.....	123

A Zusammenfassung

Eine der häufigsten Komplikationen bei der allogenen Blutstammzelltransplantation stellt die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (Graft versus Host Disease, GvHD) dar. Sie wird durch allogene Spender-T-Lymphozyten verursacht, die Gewebe des Transplantatempfängers erkennen und inflammatorische Entzündungsprozesse auslösen. Neben dieser Alloreaktivität induzieren Spender-T-Lymphozyten jedoch auch immuntherapeutisch erwünschte Transplantat-gegen-Leukämie-Reaktionen (Graft versus Leukemia, GvL-Reaktion), bei denen residuelle Tumor- bzw. Leukämiezellen im Patienten durch Spender-T-Zellen spezifisch erkannt und eliminiert werden. Im Rahmen einer verbesserten Immuntherapie wird daher versucht, GvHD-reaktive und GvL-reaktive Spender-T-Lymphozyten effizient voneinander zu separieren und so eine wirkungsvolle GvHD-Prophylaxe bzw. optimierte GvL-Induktion zu erreichen.

In diesem Kontext war es Ziel dieser Arbeit, murine dendritische Zellen (DZ) so zu modifizieren, daß sie für die spezifische Deletion alloreaktiver T-Zellen in murinen GvHD/GvL-Tiermodellen eingesetzt werden können. Die Modifikation der DZ sollte dazu führen, daß über das CD95/CD178-System Aktivierungs-induzierter Zelltod (activation induced cell death, AICD) in alloreaktiven T-Zellen ausgelöst wird. Hierzu wurden für die Modifikation der DZ zwei verschiedene Mechanismen angewandt: a) die Transfektion der DZ mit CD178-mRNA sowie b) die zielgerichtete Immobilisierung von hCD178-X-Fusionsproteinen auf Oberflächenmolekülen von DZ bzw. T-Zellen. Als Positivkontrolle für die Induktion CD95-vermittelter Apoptose diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2.

Bei der Transfektion muriner DZ mit mRNA zeigte sich anhand des Reportergens EGFP, daß aus dem Knochenmark generierte DZ mit hoher Effizienz mit EGFP-mRNA transfizierbar waren. Im Falle von hCD178-mRNA führte die Transfektion jedoch zu einer insuffizienten CD178-Expression, die mit den regulatorischen Eigenschaften der zytoplasmatischen CD178-Region in Verbindung gebracht werden konnte. So führte die Verwendung einer zytoplasmatisch trunkierten Form der CD178-mRNA (CD178 Δ zyt) zu einer durchflußzytometrisch nachweisbaren CD178-Expression in DZ. Mit diesen CD178 Δ zyt-exprimierenden DZ konnte in einem Proliferationstest die Proliferation alloreaktiver T-Zellen inhibiert werden.

Die Beladung von DZ bzw. von T-Zellen mit hCD178-X-Fusionsproteinen führte *in vitro* ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion von Alloreaktivität. Dabei konnte eine spezifische Deletion/Inhibition alloreaktiver T-Zellen nachgewiesen werden.

Die Elimination alloreaktiver T-Zellen erfolgte in beiden Verfahren über AICD. Darüber hinaus wurde eine Bifunktionalität der Fusionsproteine festgestellt, da sie neben der Induktion CD95-vermittelter Apoptose auch in der Lage waren, die Kostimulation allogener T-Zellen effizient zu inhibieren.

Mit Hilfe adoptiver T-Zell-Transferexperimente konnten abschließend die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse *in vivo* in zwei verschiedenen GvHD-Mausmodellen bestätigt werden.

B Einleitung

1. Die allogene Stammzelltransplantation

Für die Therapie von Erkrankungen des blutbildenden (hämatopoetischen) Systems wird seit mehr als drei Jahrzehnten die Stammzelltransplantation eingesetzt (Verfaillie, 2002). Die erfolgreiche Behandlung von Leukämien erfordert den Einsatz z.T. hochdosierter Chemotherapien, evtl. kombiniert mit einer Ganzkörperbestrahlung. Bei dieser sog. Konditionierung des Patienten wird das hämatopoetische System des Körpers zerstört und die im Knochenmark und zum Teil auch im peripheren Blut befindlichen hämatopoetischen Stammzellen abgetötet. Für eine Rekonstitution des hämatopoetischen Systems müssen nun diese Stammzellen ersetzt, d.h. transplantiert werden. Stammen diese Stammzellen von einem Spender, der mit den wichtigsten Gewebemerkmale des Empfängerorganismus übereinstimmt (HLA-Typisierung), aber nicht den gleichen Genotyp besitzt, so spricht man von einer allogenen Transplantation.

Im Knochenmark werden alle Zellen des Blutes generiert. Darunter befinden sich sog. pluripotente Stammzellen, die in jede Zellform des hämatopoetischen Systems ausdifferenzieren können. Diese Stammzellen lassen sich für eine Transplantation entweder direkt durch Punktion des Beckenkamms aus dem Knochenmark oder aus dem peripheren Blut des Spenderorganismus gewinnen. Zur Isolation aus dem peripheren Blut ist eine Vorbehandlung des Spenders mit dem Wachstumsfaktor G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) notwendig, welcher die Menge der im Blut zirkulierenden Blutstammzellen so weit erhöht, daß eine für die Transplantation ausreichende Anzahl an Stammzellen aus dem peripheren Blut im Rahmen einer Leukapherese gewonnen werden kann.

1.1. Mit der allogenen Stammzelltransplantation assoziierte immunologische Effekte, Nebenwirkungen und Komplikationen

Die allogene Stammzelltransplantation geht mit verschiedenen Begleiterscheinungen einher, die einen Einfluß auf den Therapieerfolg der Grunderkrankung haben. Abhängig von dem Grad der Myeloablation nach dem klinischen Protokoll der Konditionierung kommt es in der Zeit unmittelbar nach der Transplantation zu einer Phase der Aplasie . Dieser Zeitraum, in dem keine Blutzellen mehr gebildet werden,

entsteht dadurch, daß die endogenen Stammzellen des Patienten nach der Therapie nicht mehr in der Lage sind, die Hämatopoese zu regenerieren und die transplantierten Stammzellen diese Defizienz nur zeitlich und funktionell verzögert kompensieren können. In dieser Zeit können Thrombozyten und Erythrozyten in ausreichender Menge durch Transfusion ersetzt werden, nicht aber Leukozyten. Die unkontrollierte Transfusion von Lymphozyten würde die Gefahr des Aufkommens einer Erkrankung nach sich ziehen, bei der die im Transplantat befindlichen Lymphozyten des Spenders Immunreaktionen gegen die Zellen des Empfängers hervorrufen. Hierbei handelt es sich um die sog. Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (Graft versus Host Disease, GvHD) (Appelbaum, 2003).

Lymphozyten des Transplantats bergen aber nicht nur das Risiko der GvHD in sich. Sie induzieren auch Immunreaktionen gegen die nach der Strahlen- und Chemotherapie verbliebenen Leukämie- bzw. Tumorzellen. Diesen immuntherapeutisch wichtigen Effekt bezeichnet man als Transplantat gegen Leukämie-Effekt (Graft versus Leukemia, GvL). In verschiedenen Arbeiten wurde gezeigt, daß mit GvL-reaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten durch adoptiven Transfer erfolgreich Leukämien behandelt werden können (Falkenburg et al., 1999, Kolb et al., 1995).

Diese Dichotomie der aus dem Transplantat resultierenden T-Lymphozyten, nämlich sowohl die Gefahr der Entstehung einer GvHD als auch den Benefiz eines GvL-Effektes in sich zu vereinen, ist in Abbildung B1 graphisch dargestellt.

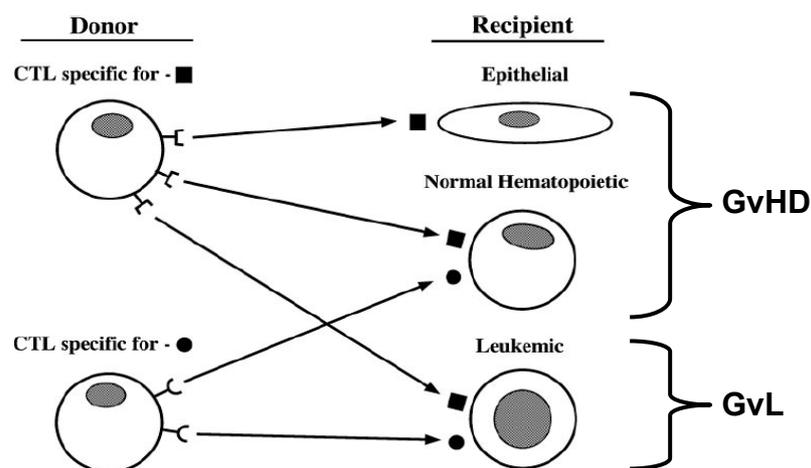


Abb. B1: Dichotomie bei der allogenen Stammzelltransplantation. Zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) des Donors erkennen sowohl Leukämiezellen als auch epitheliale und gesunde hämatopoetische Zellen des Wirtes aufgrund von minor-Antigenspezifitäten als fremd. Dies führt sowohl zu einem wünschenswerten GvL-Effekt als auch zu unerwünschter GvHD (nach Appelbaum, 2003).

Neben der GvHD besteht für den transplantierten Patienten aber auch die Gefahr einer erhöhten Infektanfälligkeit gegenüber opportunistischen Infektionen, insbesondere durch Viren (Goodman et al., 1992), aber auch durch Mykosen. Dies ist auf das Fehlen der Leukozyten (vor allem der Granulozyten) und die immunsuppressive Therapie zurückzuführen. Hierbei ist z.B. die rezidivierende Infektion mit dem endemisch in der Bevölkerung präsenten Zytomegalo-Virus (CMV) zu nennen (Goodrich et al., 1993). Etwa 70% CMV-seropositiver Patienten und 30% CMV-seronegativer Patienten entwickeln nach einer Stammzelltransplantation eine akute CMV-Infektion (Meyers et al., 1986).

2. Die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (GvHD)

Bei der GvHD handelt es sich primär um eine Komplikation der allogenen Blutstammzelltransplantation. Sie ist die bedeutsamste Begleiterkrankung dieser Transplantationsform und kann zum Tode des transplantierten Patienten führen (Ho und Soiffer, 2001). Bei einer autologen Transplantation, d.h. bei genetisch völlig identischem Spender-Empfänger-Paar (z.B. bei eineiigen Zwillingen oder der Eigenspende) ist eine GvHD aus immunologischer Sicht unwahrscheinlich.

2.1. Pathogenese der GvHD

Die GvHD kann in zwei Erscheinungsformen unterteilt werden: akute und chronische GvHD. Die akute GvHD tritt innerhalb der ersten drei Monate nach der Transplantation auf, während man von einer chronischen GvHD ab Tag 100 nach Ablauf einer Transplantation spricht. Darüber hinaus wird die Erkrankung in vier Schweregrade klassifiziert (Martin et al., 1998): eine akute GvHD der Grade II bis IV entwickeln etwa 30% aller Patienten trotz immunsuppressiver Behandlung mit Methotrexat und Cyclosporin, die ein MHC-identisches Transplantat erhalten. Bei Patienten, die ein Transplantat mit einem MHC-disparaten Antigen erhalten, liegt die GvHD-Rate bei 50%, bei Patienten mit zwei MHC-disparaten Antigenen bei 70%.

Die akute GvHD tritt häufiger bei älteren Patienten auf und ist charakterisiert durch Entzündungsreaktionen in der Haut, im gastrointestinalen Bereich, insbesondere des Darms und der Leber. Daraus resultiert ein Anstieg des Serumspiegels von Bilirubin, von Transaminasen sowie der alkalischen Phosphatase (Nash et al., 1992). Eine chronische GvHD entwickeln etwa 20 bis 40% der Patienten, die mehr als sechs Monate nach der Transplantation noch leben (Atkinson et al., 1990). Sie kann aus einer akuten GvHD entstehen, sich aber auch ohne vorangegangene akute GvHD

entwickeln. Akute und chronische Form unterscheiden sich deutlich voneinander. Bei der chronischen GvHD kommt es in den meisten Fällen zu Mundtrockenheit und trockenen Augen, sie kann aber auch mit Erkrankungen der Haut und der Leber einhergehen. Darüber hinaus ist der Befall weiterer Organsysteme möglich, aber seltener. Auch hier muß eine immunsuppressive Therapie angewandt werden (Appelbaum 2003).

Daß allogene T-Zellen wesentlich für die Pathogenese der GvHD verantwortlich sind, konnte bereits 1968 im Tiermodell gezeigt werden. Subletal bestrahlte Mäuse, die in adoptiven Transferexperimenten T-Zell-deletierte allogene Milzzellen erhielten, zeigten eine Überlebensrate von 80 bis 100%, während Kontrolltiere nach Transfer allogener Milzzellfraktionen mit eskalierender T-Zell-Konzentration an den Folgen einer GvHD verstarben (Dicke et al., 1968).

Die Pathogenese der akuten GvHD auf zellulärer und molekularer Ebene wird in drei Phasen unterteilt. Phase I beginnt im Transplantatrezipienten bereits vor der Transfusion des Transplantats als Folge der konditionierenden Therapie mit Immunsuppressiva und Strahlentherapie. In dieser afferenten Phase kommt es aufgrund von Gewebeschäden bereits zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine wie TNF- α und IL-1. Phase II findet nach der Transplantation statt. Hier kommt es zur Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen des Transplantats durch Antigen präsentierende Zellen (APZ) des Empfängerorganismus, was zur Freisetzung weiterer Zytokine wie IL-2 und IFN- γ sowie zur Proliferation der Donor-T-Zellen führt. Die Interaktion zwischen den T-Zellen und den APZ wird dabei durch Haupthistokompatibilitätsantigene (MHC-Antigene) und/oder minor-Histokompatibilitätsantigene (mHAg) induziert. Entscheidend für die Entstehung und den Verlauf der GvHD ist die Interaktion zwischen den Donor-T-Zellen und den APZ des Rezipienten, da bei einer Eliminierung der Rezipienten-APZ vor einer Transplantation das Risiko der Entstehung einer GvHD drastisch sinkt.

Phase III, die sog. efferente Phase der GvHD, zeichnet sich durch die Freisetzung einer Reihe von Zytokinen wie IL-1, IL-2, IFN- γ und TNF- α aus. Es kommt zur Rekrutierung einer Reihe weiterer Zellen des Immunsystems wie zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten, die vor allem in Haut, Darm und Leber das Gewebe des Transplantatrezipienten angreifen (Ferrera et al., 1999). Darüber hinaus werden durch vermehrte Freisetzung von TNF- α und IL-1 apoptotische und inflammatorische Prozesse induziert. Dieser Verlauf der akuten GvHD ist in Abbildung B2 dargestellt:

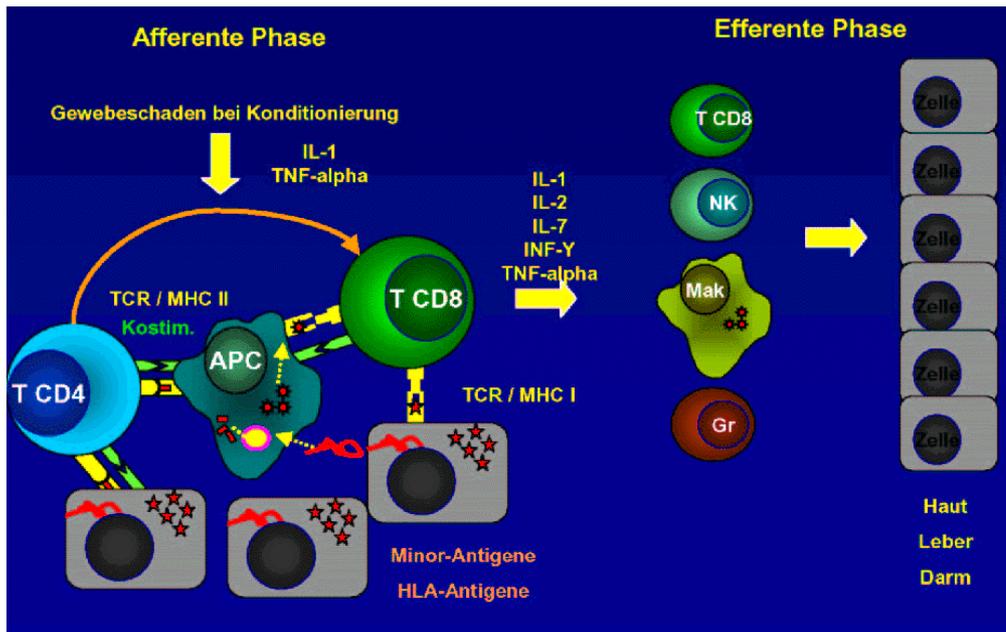


Abb. B2: Pathogenese der akuten GvHD. Die Entstehung der akuten GvHD zeichnet sich durch eine afferente Phase (Phasen I und II der GvHD) sowie durch eine efferente Phase (Phase III) aus. Während der afferenten Phase kommt es aufgrund der Konditionierung des Patienten zur Freisetzung inflammatorischer Zytokine sowie zur MHC-/mHAg-restringierten Aktivierung der allogenen Spender-Lymphozyten durch APC des Rezipienten. Die efferente Phase ist gekennzeichnet durch einen zytokininduzierten Gewebsangriff vor allem in Haut, Darm und Leber aufgrund der Aktivierung weiterer Immunkomponenten wie zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen, Makrophagen und Granulozyten.

Obwohl bei der allogenen Stammzelltransplantation Donor und Rezipient umfassend auf eine Übereinstimmung ihrer Gewebemerkmale, insbesondere der immunogenen MHC-Antigene „gematcht“ werden, und somit möglichst HLA-identische Transplantate verwandt werden, entwickeln 30 – 60% der transplantierten Patienten eine GvHD. Dieser Umstand wird der Existenz von mHAg zugeschrieben (Goulmy et al., 1996), die dafür verantwortlich sind, daß mit den Stammzellen transferierte Donor Lymphozyten das Gewebe des Wirtes als fremd erkennen und eine GvH-Reaktivität induzieren. Aber auch der GvL-Effekt wird zumindest partiell über diese mHAg vermittelt, wie dies in Abbildung B1 dargestellt ist (Appelbaum, 2003).

Die mHAg sind definiert als ein breites Spektrum polymorpher Zelloberflächenproteine, die prozessiert und im Folgenden über HLA-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert werden, um HLA-restringiert T-Zell-Immunantworten und damit verbunden GvH- und/oder GvL-Reaktivität zu induzieren. Die Bezeichnung dieser Antigene in der Literatur als „minor“-Histokompatibilitätsantigene ist historisch durch ihre Entdeckung nach den MHC-Antigenen bedingt und zieht nicht in Betracht, daß es im Vergleich zu den MHC-Antigenen wahrscheinlich eine größere Anzahl an nicht definierten mHAg gibt. Die meisten mHAg sind bislang biochemisch weit weniger charakterisiert als MHC-Antigene (Perreault et al., 1998). Die häufige

Inzidenz einer GvHD bei der HLA-identischen allogenen Stammzelltransplantation läßt eine große Anzahl von mHAg vermuten (Loveland und Simpson, 1986). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, daß bereits das Vorhandensein eines dominanten mHAg genügt, um GvHD zu induzieren. Es wird daher diskutiert, daß GvHD weniger eine polyklonale Immunreaktion gegen eine große Anzahl von mHAg darstellt, als vielmehr eine oligoklonale Antwort gegen eine limitierte Anzahl dominanter mHAg (Perreault et al., 1998).

Obgleich für die Entstehung der GvHD aufgrund der nachgewiesenen Beteiligung MHC-Klasse-I-restringierter mHAg den zytotoxischen T-Zellen eine entscheidende Rolle beigemessen wird, gibt es auch verstärkt experimentelle Hinweise auf eine Beteiligung von CD4⁺ T-Zellen bei der Entstehung der GvHD. Demnach scheinen auch MHC-Klasse-II-restringierte mHAg eine Rolle zu spielen sowie die daraus resultierende Zytokinexpression von CD4⁺ T-Helferzellen (Vogelsang et al., 2003). So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß IL-18 und IFN- γ insbesondere bei Anwesenheit von IL-12 induziert wird (Okamura et al., 1995). IL-18 ist in der Lage, eine T-Zell-Antwort von CD4⁺ T-Helferzellen des TH-1 Subtyps zu induzieren. Überraschenderweise konnte in einem Tiermodell für akute GvHD aber auch gezeigt werden, daß die Blockade von IL-18 die GvHD-Mortalität der Versuchstiere beschleunigte, während die gesteuerte Zuführung von IL-18 die Mortalität reduzierte. Dies konnte experimentell auf eine verstärkte Induktion CD95-mediierter Apoptose in Donor-T-Zellen kurz nach der Transplantation aufgrund der IL-18-Zuführung zurückgeführt werden (Reddy et al., 2001). Darüber hinaus konnte auch in einem Mausmodell nachgewiesen werden, daß IL-18 in der Lage ist, die Entstehung chronischer GvHD zu verhindern (Okamoto et al., 2000). Es gibt also verstärkt experimentelle Evidenz dafür, daß GvH-reaktive CD4⁺ T-Zellen des TH-1 Subtyps suszeptibel für CD95-medierte Apoptose sind. Darüber hinaus gibt es Arbeiten, die klar zeigen, daß CD4⁺ T-Zellen des TH-1-Subtyps wesentlich suszeptibler für CD95-medierte Apoptose sind als CD4⁺ T-Zellen des TH-2 Subtyps (Ramsdell et al., 1994; Zhang et al., 1997).

2.2. GvHD-Prophylaxe

Für die GvHD-Prophylaxe existieren derzeit zwei grundlegende Strategien: eine Deletion der Lymphozyten des Transplantats sowie eine pharmakologische Therapie. Bei letzterer werden immunsuppressive Medikamente wie Kortikosteroide und antiproliferative Substanzen (meist Methotrexat und Cyclosporin) eingesetzt, die u.a. IL-2-supprimierende Wirkung haben (Vogelsang et al., 2003).

Durch eine vollständige Entfernung (Deletion) der Donor-T-Lymphozyten aus dem Transplantat kann die GvHD vermieden werden, allerdings führt dies zum Verlust des GvL-Effektes sowie einer gestörten Rekonstitution des Immunsystems des Transplantatempfängers (Apperly et al., 1986; Martin et al., 1985). Darüber hinaus steigert die *ex-vivo*-Deletion von Donor-T-Zellen das Risiko opportunistischer Infektionen (Li et al., 1994). Dennoch gibt es eine ganze Reihe neuerer experimenteller Arbeiten, in denen versucht wird, die bislang unzufriedenstellende pharmakologische GvHD-Prophylaxe durch Donor-T-Zell-Deletion zu verbessern (Ho und Soiffer, 2001). Ziel von T-Zell-Deletionen ist dabei die Entfernung GvH-reaktiver allogener T-Zellen unter Erhalt der GvL-Reaktivität, d.h. die spezifische Elimination GvH-reaktiver Spender-T-Lymphozyten. Gestützt werden diese Ansätze durch experimentelle und klinische Hinweise auf Donor-T-Zell-Populationen, die tatsächlich sowohl aus distinkten Wirt-spezifischen sowie aus Leukämie-spezifischen alloreaktiven T-Zell-Populationen bestehen (Datta et al., 1994; Jiang et al., 1997; Falkenburg et al., 1999). Diese Erkenntnisse geben Anlaß zu der Annahme, daß sich GvH- und GvL-Reaktivitäten über die Modulation der Zytokinexpression CD4⁺ T-Helferzellen oder über die Antigenspezifität trennen lassen. So konnten beispielsweise allogene GvL-reaktive zytotoxische T-Zellen isoliert werden, die ein Leukämie-assoziiertes mHAg einer B-Zell-Leukämie erkennen (Dolstra et al., 1997) als auch allogene zytotoxische T-Zellen mit Spezifität für CML-spezifische Peptide (Molldrem et al., 1996). Die erhöhte Expression der Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 geht mit einem GvH-protectiven Effekt einher, während erhöhte Freisetzungen von IL-12 in Fällen akuter GvHD beobachtet wurden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß CD4⁺ T-Zellen des T-Helfer Subtyps TH-2 nach Transfer eine wesentlich geringere GvH-Reaktivität zeigen, aber potent einen GvL-Effekt induzieren können. Ferner führte die Applikation hoher Dosen von IL-12 am Tag der Stammzelltransplantation im Tiermodell zu einer Inhibition alloreaktiver CD4⁺ T-Zellen unter Erhalt eines durch IFN- γ und CD8⁺ cytotoxische T-Zellen vermittelten GvL-Effektes (Tanaka et al., 1997; Uharek et al., 1998; Yang et al., 1997).

Eine besondere Bedeutung als Effektormechanismus GvH-reaktiver T-Zellen hat das CD95/CD178-System. Dies konnte an funktionell CD95-defizienten (*lpr*) oder an CD178-defizienten (*gld*) Mäusen gezeigt werden. Der Transfer von T-Zellen aus *lpr*-Mäusen in kongene Wildtyp-Rezipienten führte zu einer akuten GvHD, die mit einer Expansion der Donor-T-Zellen sowie einer Hyperexpression von CD178 einher geht (Theofilopoulos et al., 1985; Chu et al., 1995). Die allospezifische Stimulation von T-Zellen aus *gld*-Mäusen führte zu einer verminderten GvH-Reaktivität, was mit einer verringerten Expansion als auch mit einer reduzierten zytolytischen Aktivität der Donor-T-Zellen verbunden war (Via et al., 1996). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß zytotoxische T-Zellen aus CD178- bzw. CD178/Perforin-defizienten

Mäusen nicht mehr in der Lage sind, akute GvHD zu induzieren (Braun et al., 1996; Baker et al., 1997). Somit eröffnet das CD95/CD178-System die Möglichkeit, alloreaktive T-Zellen nach Stimulation selektiv über aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) zu deletieren. Eine Evidenz für den Erhalt der GvL-Reaktivität bei dieser Art der T-Zell-Deletion gibt die Beobachtung, daß CD4⁺ T-Zellen des TH-1-Subtyps wesentlich suszeptibler gegenüber AICD sind als T-Zellen des Subtyps TH-2, so daß eine Anreicherung von T-Zellen des TH-2-Subtyps erfolgen könnte (Ramsdell et al., 1994; Zhang et al., 1997). So gibt es in murinen Systemen Arbeiten darüber, daß GvHD durch die spezifische Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten via AICD verhindert werden kann. Dies gelang beispielsweise durch gezielte Induktion von Apoptose durch AICD in alloantigen-spezifisch aktivierten alloreaktiven T-Zellen mittels agonistischem anti-CD95-Antikörper (Hartwig et al., 2002).

Weitere experimentelle Ansätze zur Deletion GvH-reaktiver T-Zellen zwecks GvHD-Prophylaxe wenden physikalische, immunologische sowie kombinierte Methoden an wie beispielsweise Dichtegradientenzentrifugationen, selektive Deletion über Lectin-Agglutination, Verwendung von inhibierenden monoklonalen Antikörpern oder aber auch die Separation von T-Zell-Populationen über immunmagnetische Partikel, die an Antikörper gekoppelt sind (Ho und Soiffer, 2001).

3. Programmierter Zelltod (Apoptose)

Man unterscheidet zwei Formen des Zelltodes: Nekrose und Apoptose. Nekrose ist als Folge von Gewebeschädigungen (z.B. durch Sauerstoffmangel, Verletzungen u.a.) eine passive Form des Zelltodes und geht mit einer unkontrollierten Zellyse sowie inflammatorischen Reaktionen in den umliegenden Geweben einher. Es findet bei dieser Form des Zelltodes keine Kondensation des Zellkernes statt und eine DNA-Fragmentierung geschieht weniger definiert und durch andere Enzyme als bei der Apoptose (Wyllie, 1997; Dong et al., 1997). Apoptose ist im Unterschied zur Nekrose eine genetisch regulierte Form des Zelltodes, die daher auch als programmierter Zelltod bezeichnet wird. Die Induktion eines apoptotischen Prozesses kann durch verschiedene Stimuli erfolgen: durch UV- oder γ -Bestrahlung, durch Entzug von Wachstumsfaktoren, durch Chemotherapeutika oder aber durch Stimulation sogenannter Todesrezeptoren. Spezifisch für Apoptose ist, daß sich apoptotische Zellen von ihren benachbarten Zellen separieren und eine charakteristische Kondensierung des Chromatins und des Zytoplasmas stattfindet. Es treten durch enzymatische Spaltung oligonukleosomale DNA-Fragmente von einer Länge von 180bp und Vielfachen davon auf (Wyllie et al, 1980, Wyllie et al., 1984). Darüber hinaus geht Apoptose einher mit einer Membraninversion, der

Exposition von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche, einer Abschnürung und Schrumpfung der Plasmamembran (Zeiose) und der Bildung sog. apoptotischer Körperchen. Diese enthalten die Chromatinfragmente sowie die kondensierten Zellorganellen. Hierdurch werden im Gegensatz zur Nekrose inflammatorische Reaktionen verhindert, weil die apoptotischen Körperchen schnell durch Phagozytose beseitigt werden und so die Zellinhalte apoptotischer Zellen nicht in das umgebende Gewebe gelangen (Hengartner, 2001).

Die physiologische Bedeutung der Apoptose ist die Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes zwischen der Bildung neuer Zellen und der Eliminierung von überflüssigen, geschädigten oder abnormen Zellen eines vielzelligen Organismus. So ist die Apoptose beispielsweise ein ganz entscheidender Prozeß bei der Homöostase des Immunsystems. Die Bedeutung apoptotischer Prozesse wird anhand vieler Krankheiten deutlich, die mit einer abnorm verminderten oder erhöhten Apoptose einhergehen wie z.B. AIDS, Krebs oder aber Immunerkrankungen (Krammer, 1999; Vaux und Korsmeyer, 1999).

3.1. Todesrezeptoren und ihre Liganden: Das CD95/CD178-System

Apoptose kann durch sogenannte Todesrezeptoren induziert werden. Todesrezeptoren stellen eine Subfamilie der TNF/NGF- (Tumor Necrosis Factor/Nerve Growth Factor) Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) dar. Bei den Todesrezeptoren handelt es sich um differenziell glykosylierte Typ-I-Transmembranproteine (der C-Terminus des Proteins befindet sich im Zytoplasma) mit zwei bis sechs extrazellulären cysteinreichen Domänen. Über diese Domänen bilden sie trimere oder multimeren Komplexe, die durch Disulfidbrücken stabilisiert sind. Diese Rezeptoren besitzen ferner eine intrazelluläre Todesdomäne (engl.: Death Domain, DD), die für die Transduktion des Todesignals in die Zelle hinein verantwortlich ist. Bei einigen Mitgliedern der TNFRSF existiert sowohl eine membrangebundene als auch eine lösliche Form. Die lösliche Form wird entweder durch proteolytische Spaltung der extrazellulären Region oder durch alternatives Spleißen erzeugt. Die lösliche Form kann als Negativregulator fungieren, da sie ihren natürlichen Liganden binden und dadurch dessen Wirkung blockieren kann. Beim Menschen sind bislang sechs Mitglieder dieser Subfamilie charakterisiert: CD95 (Apo/Fas), CD120a (TNF-R1), DR3 (Apo-3/LARD/TRAMP/WSL1), TRAIL-R1 (Apo-2/DR4), TRAIL-R2 (DR5/KILLER/TRICK2) und DR6 (Gruss et al., 1996; Janssen et al., 2000; Aggarwal, 2003).

Die Aktivierung der Todesrezeptoren erfolgt über ihre natürlichen Liganden. Diese sind glykosylierte TypII-Transmembranproteine (mit Ausnahme von $LT\alpha$) und gehören

der TNF-Liganden-Familie an. Bei TypII-Transmembranproteinen ist der N-Terminus im Zytoplasma lokalisiert ist und der C-Terminus liegt außerhalb der Zelle.

3.1.1. CD95 (Fas/Apo-1)

Der bislang am besten untersuchte Todesrezeptor ist CD95 (Krammer, 1999). CD95 hat ein Molekulargewicht von etwa 45 bis 52 kDa (335 Aminosäuren). Es besteht aus einer 156 Aminosäuren langen extrazellulären Region, einem 20 Aminosäurereste langen Transmembransegment und einer aus 144 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Region und wird sowohl in einer transmembranären als auch solublen Form als Dimer bzw. Trimer exprimiert. CD95 wird von einer ganzen Reihe von Zelltypen und Geweben konstitutiv exprimiert: u.a. von CD34⁺ Stammzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, dendritischen Zellen, natürlichen Killerzellen (NK-Zellen), B- und T-Zellen und malignen Zellen (Lymphomzellen, Leukämiezellen, Myelomzellen), der Lunge, den Ovarien, dem Herz sowie in der Leber. Dabei sind insbesondere Hepatozyten sehr suszeptibel für CD95-vermittelte Apoptose. Für CD95, das auf Fibroblasten, auf frisch isolierten T-Zellen, auf Thymozyten und auf einigen malignen B-Zellen exprimiert wird, wurde neben der apoptotischen Wirkung auch eine kostimulatorische Funktion beschrieben.

CD95 existiert auch in einer löslichen Form, die durch beide genannten Mechanismen erzeugt werden kann. Sie liegt im Blut als Dimer und Trimer vor. Bei erhöhtem Serumspiegel von löslichem CD95 kann es durch die Ligand-blockierende Wirkung zu Autoimmunerkrankungen wie z.B. systemischem Lupus erythematodes und lymphoproliferativem Syndrom kommen.

Die homeostatische Regulation, insbesondere bei Lymphozyten, wird auch durch das lymphoproliferative (lpr) Syndrom bei Kindern belegt, das aufgrund einer Punktmutation in der zytoplasmatischen DD von CD95 entsteht und in dessen Folge keine CD95-vermittelte Apoptoseinduktion mehr möglich ist (Gruss et al., 1996).

3.1.2. CD178 (CD95L/Fas-Ligand)

CD178 ist ein 40 kDa schweres und 281 Aminosäuren langes Glykoprotein, das aus einer 80 Aminosäuren bestehenden zytoplasmatischen Region, einer Transmembranregion von 22 Aminosäuren und einer extrazellulären Region von 179 Aminosäuren besteht. CD178 wird von wesentlich weniger Zellarten exprimiert und ist wesentlich stärker reguliert als CD95. Der Ligand wird von aktivierten Splenozyten und T-Zellen, von Makrophagen sowie von einigen wenigen nicht-

lymphoiden und von immunprivilegierten Geweben innerhalb der Testis und der Augen exprimiert (Griffith und Ferguson, 1995, Krammer, 2000).

Aufgrund der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) existiert CD178 ebenfalls in löslicher Form. Dabei entsteht durch proteolytische Abspaltung des extrazellulären Teils von CD178 durch MMPs ein Homotrimer, das aus 26 kDa schweren Monomeren besteht (Gruss et al., 1996). Für die zytotoxische Aktivität der löslichen Form existieren gegensätzliche experimentelle Daten. Während einige Arbeiten auch der löslichen Form von CD178 eine zytotoxische Aktivität zusprechen (Krammer, 1999), zeigen andere Studien eine verminderte Zytotoxizität gegenüber der membrangebundenen Form oder gar eine Apoptose-inhibierende Wirkung von löslichem CD178 (Suda et al., 1997; Schneider et al., 1998). Möglicherweise ist diese Diskrepanz auf speziesspezifische Unterschiede zurückzuführen, denn mit humanem löslichen CD178 konnte in CD95-exprimierenden Zellen effizient Apoptose induziert werden, nicht aber mit der murinen löslichen Form von CD178 (Suda et al., 1996, Suda et al., 1997). Die genaue Rolle von löslichem CD178 bedarf weiterer experimenteller Abklärung.

Das humane und das murine CD178 weisen eine 77%ige Homologie auf und beide Proteine sind über die Speziesbarriere hinweg biologisch aktiv (Takahashi et al., 1994).

Analog zu CD95 führt eine Punktmutation an Position 273 (Leucin statt Phenylalanin) zu einer Inaktivierung von CD178. Daraus resultiert eine lymphoproliferative Erkrankung, wie man sie im Falle des murinen Gens bei *gld*-(generalized lymphoproliferative disease) Mäusen beobachten kann (Takahashi et al., 1994).

3.1.3. Induktion der CD95/CD178-vermittelten Apoptose

Die Interaktion von CD178 oder agonistischem Antikörper an CD95 führt zu einem Multiproteinkomplex, dem sog. Tod-induzierende-Signal-Komplex (Death Inducing Signaling Complex, DISC). Dabei wird das Adaptermolekül FADD/Mort-1 (Fas Associated Death Domain) an den CD95-Rezeptor rekrutiert. Dieser oligomerisiert wahrscheinlich zu einem Trimer (Boldin et al., 1996; Chinnaiyan et al., 1995). Anschließend werden weitere Moleküle in den DISC rekrutiert: Caspase-8 (FLICE), Caspase-10 und CAP-3, das die N-terminale DED (Death Effector Domain) von Caspase-8 enthält (Boldin et al., 1996; Muzio et al., 1996; Kischkel et al., 1995). Durch Spaltung von Caspase-8 im DISC in drei aufeinanderfolgenden Schritten wird aktive Caspase-8 gebildet (Medema et al., 1997). Die sog. Prodomäne von Caspase-8 bleibt bei der Spaltung am DISC gebunden, während die aktive Domäne der

Caspase-8 abdissoziiert und eine Kaskade weiterer Caspasen induziert und aktiviert, wodurch die Exekutionsphase der Apoptose in Gang gesetzt wird (Salvesen, 1999).

Die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose wird auf posttranskriptioneller Ebene reguliert. So hat z.B. der Glykosylierungszustand von CD95 einen modulierenden Einfluß auf CD95-vermittelten Zelltod (Keppler et al., 1999). Auch eine Modulation auf transkriptioneller Ebene ist möglich: der Tumorsuppressor p53 induziert die CD95-Expression nach DNA-Schädigung (Muller et al., 1998). Darüber hinaus existieren sehr potente Apoptoseinhibitoren, die die CD95-Signalkaskade unterbrechen. Hierzu zählt vor allem cFLIP (cellular-FLICE Inhibitory Protein), das in einer kurzen Form (cFLIP_s) und einer langen Form (cFLIP_L) vorkommt und aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft zu Caspase-8 diese Caspase inhibiert. cFLIP besitzt jedoch ein enzymatisch inaktives Zentrum (Meinl et al., 1998; Scaffidi et al., 1999).

Das intrazelluläre Signal der CD95-CD178-Interaktion wird über zwei verschiedene Signalwege weitergeleitet, die als CD95-Typl- und CD95-TypII-Signaltransduktionsweg bezeichnet werden (Scaffidi et al., 1998). Beim CD95-TypII-Signalweg erfolgt eine apoptotische Aktivierung der Mitochondrien aufgrund einer schwachen Ausbildung des DISC. Hierbei erfolgt eine Spaltung von Bid, einem Mitglied der apoptoseregulierenden Bcl2-Proteinfamilie, durch Caspase-8. Die schwache Bildung des DISC reicht aus, um genügend Caspase-8 für die Spaltung von Bid zu rekrutieren. Das gespaltene Bid führt in den Mitochondrien zu einer Freisetzung apoptotischer Faktoren wie AIF (Apoptosis Inducing Factor) und Cytochrom c, die im Zytosol gemeinsam mit Apaf-1 und Procaspase-9 ein Apoptosom bilden, das nach Prozessierung von Procaspase-9 zur aktiven Caspase-9 die weitere Caspasenkaskade initiiert (Gross et al., 1999a/b; Scaffidi et al., 1998; Zou et al., 1999). Bei dem CD95-Typl-Signalweg werden am DISC große Mengen an Caspase-8 aktiviert, was eine schnelle Spaltung von Caspase-3 und die Initiation der Caspasenkaskade zur Folge hat. Es wird aber auch hier der mitochondriale Apoptoseweg initiiert (Scaffidi et al., 1999). Diese beiden CD95-Signaltransduktionswege sind in Abbildung B3 dargestellt:

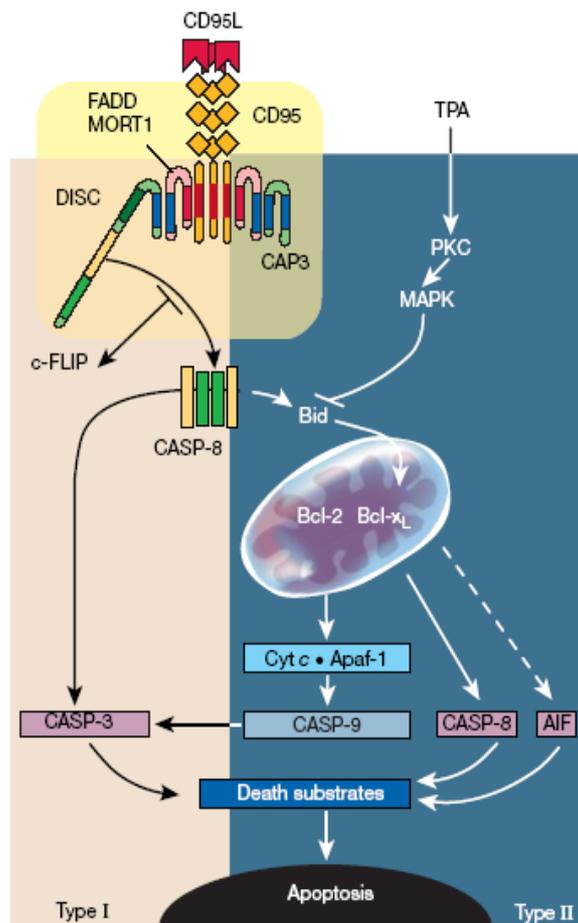


Abbildung B3: Schematische Darstellung der beiden CD95-Signaltransduktionswege. CD95-Stimulation führt in Typl-Zellen (links) zu einer starken Caspase-8-Aktivierung durch den DISC. Hierdurch wird die Caspasenkaskade direkt in gang gesetzt. In TyplI-Zellen (rechts) führt aufgrund einer schwachen DISC-Bildung die Spaltung von Bid zur apoptotischen Aktivierung der Mitochondrien, wodurch hier mittels Cytochrom c-Freisetzung und weiterer apoptoseinduzierender Faktoren die Caspasenkaskade aktiviert wird. (Abb. aus Kramer, 2000).

3.2. Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD)

Der Begriff AICD wurde erstmals im Jahre 1989 geprägt, als gezeigt werden konnte, daß T-Zell-Hybridome und Thymozyten nach Stimulation des CD3-Moleküls sterben können (Krueger et al., 2003; Shi et al., 1989). Dieser Zelltod infolge der Stimulation des T-Zell-Rezeptors (TZR) wurde in späteren Arbeiten auf eine CD95-vermittelte Apoptose zurückgeführt, die mit einer Hochregulation der CD178-Expression in diesen Zellen einher geht. Sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen koexprimieren CD95 und CD178 nach Aktivierung über den TZR. Während naive T-Zellen Apoptose-resistent sind, führt die repetitive Stimulation zur Induktion des CD178-vermittelten AICD (Alderson et al., 1995; Dhein et al., 1995; Brunner et al., 1995; Ju et al., 1995). Allerdings können auch naive T-Zellen CD95-mediert in Apoptose gebracht werden, jedoch AICD-unabhängig, d.h. ohne vorherige Aktivierung der T-Zellen durch einen repetitiven TZR-Stimulus (Suda et al., 1996). Die Induktion des AICD erfolgt spezifisch in T-Zellen, die über den TZR aktiviert werden. Verschiedene Arbeiten

weisen darauf hin, daß CD4⁺ T-Zellen des TH-1-Subtyps wesentlich suszeptibler gegenüber AICD sind als CD4⁺ T-Zellen des TH-2-Subtyps (Ramsdell et al., 1994; Zhang et al., 1997).

Die Suszeptibilität proliferierender T-Zellen für Apoptose hängt entscheidend von dem als Schlüsselregulator fungierenden Zytokin IL-2 ab. Nach der Aktivierung naiver T-Zellen über den TZR wird die Genexpression für IL-2 und den IL-2-Rezeptor (IL-2R/CD25 α -Kette) induziert (Green et al., 1992; Lenardo, 1991; Russell et al., 1991). IL-2 stimuliert die T-Zell-Proliferation und führt zur Differenzierung der T-Zellen zu Effektorzellen. Gleichzeitig übt IL-2 aber auch einen rückkoppelnden Effekt auf die Induktion des AICD in den T-Zellen aus, die ohne IL-2 keiner aktiven Apoptose unterliegen. Diese regulatorische Funktion von IL-2 für die Empfänglichkeit CD95-mediierter Apoptose bei T-Zellen konnte an IL-2- und IL-2-Knockout-Mäusen untersucht werden, bei denen eine Akkumulation aktivierter T-Zellen beobachtet wurde (Willerford et al., 1995; Suzuki et al., 1995; Kneitz et al., 1995; Zheng et al., 1998). Die Rolle der repetitiven Antigenstimulation und des IL-2 ist schematisch in Abbildung B4 dargestellt:

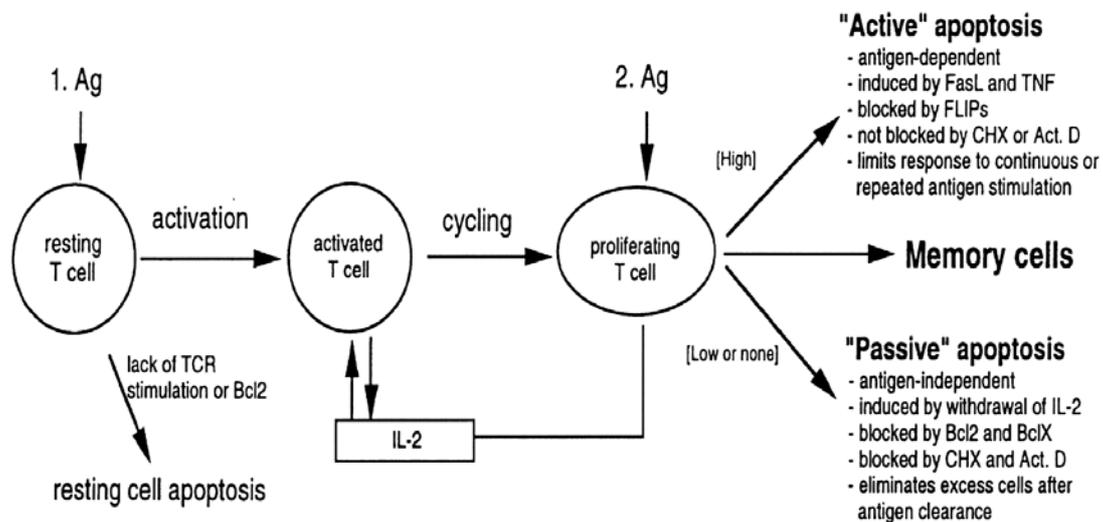


Abb. B4: Paradigma der Apoptosesuszeptibilität von T-Zellen. T-Zellen reagieren auf zwei verschiedene Weisen auf die Stimulation des TZR durch ein Antigen. Ruhende/naive T-Zellen werden durch den Antigenstimulus aktiviert und produzieren hierauf IL-2. Dieses führt zur Proliferation der aktivierten T-Zellen. Eine starke repetitive Stimulation dieser T-Zellen durch das Antigen führt unter Rückkopplung mit IL-2 zur Induktion hoher Apoptosesuszeptibilität, sie unterliegen „aktiver“ Apoptose. Der Entzug von IL-2 hingegen führt zu geringerer Apoptosesuszeptibilität bzw. sog. „passiver“ Apoptose, die unabhängig von repetitiver Antigenstimulation stattfindet. Eine geringe Anzahl an T-Zellen entgeht jedoch beiden Arten der Apoptoseinduktion; sie entwickeln sich zu Gedächtnis-T-Zellen (Abb. aus Lenardo, 1999).

Die physiologische Bedeutung des AICD liegt in der Regulation einer Immunantwort und lässt sich am Beispiel des Verlaufs einer T-Zell-Immunantwort verdeutlichen: während T-Zellen nach dem Erstkontakt mit einem Antigen in der sog. klonalen Expansionsphase sowie in der darauffolgenden Effektorphase, in der die eigentliche T-Zell-vermittelte Immunantwort stattfindet, apoptoseresistent sind, werden die T-Zellen nach wiederholter Stimulation durch das Antigen empfänglich für CD95-medierte Apoptose. Bei der Aufrechterhaltung der Apoptoseresistenz in der Effektorphase scheinen kostimulatorische Effekte eine Rolle zu spielen. Es konnte nachgewiesen werden, daß während der Erstaktivierung die Kostimulation von T-Zellen über ihr CD28-Molekül durch Bindung von CD80 bzw. CD86 der APZ die T-Zellen vor apoptotischem Zelltod schützt (Noel et al., 1996). Nach der Effektorphase gehen die durch repetitiven Antigenstimulus und aufgrund der Wirkung von IL-2 gegenüber Apoptose suszeptiblen T-Zellen in die sog. Deletionsphase über, in der sie nun meist innerhalb von 5 Tagen dem AICD erliegen. Die aufgrund der klonalen Expansion stark angewachsene Zahl an T-Zellen wird wieder reduziert und dadurch die Immunantwort beendet. Wenige nicht apoptosesuszeptiblen T-Zellen bleiben als Gedächtniszellen erhalten und sind während der gesamten „Memory“-Phase bis zur erneuten Stimulation durch das Antigen nicht empfänglich für Apoptose (Janssen et al., 2000; Sprent und Miller, 1976; Sprent und Tough, 2001). Der Verlauf einer solchen T-Zell-Immunantwort ist in Abbildung B5 dargestellt:

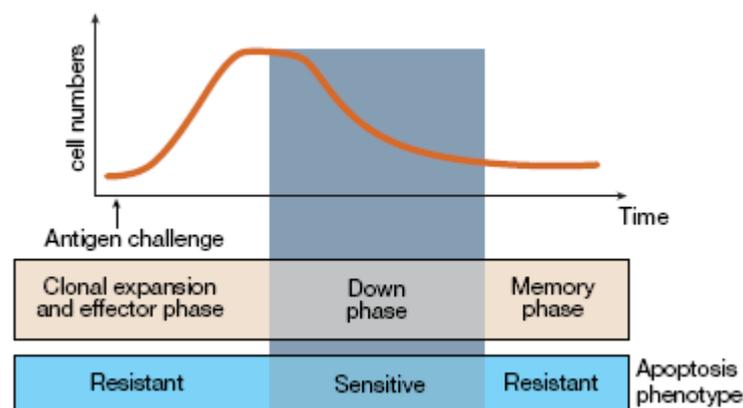


Abb. B5: Verlauf einer T-Zell-Immunantwort. Antigen-spezifische T-Zellen beginnen nach dem Erkennen eines Antigens zu Effektorzellen zu differenzieren. Nach Beseitigung des Antigens werden die T-Zellen auf dem Gipfel der Immunantwort suszeptibel für CD95-vermittelte Apoptose. Dieser Mechanismus leitet die sog. Down- bzw. Deletionsphase ein und er wird als Aktivierungs-induzierter Zelltod (AICD) bezeichnet. AICD führt dann zum Sterben der Zellen. Die wenigen überlebenden T-Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen (Abb. aus Kramer, 2000).

Beim AICD werden TZR-aktivierte T-Zellen über zwei verschiedene Signalwege getötet. Dies beruht auf der Beobachtung, daß in Gegenwart von Reagenzien, die die CD95-CD178-Interaktion unterbinden, noch immer – wenngleich in sehr geringem

Umfange – Zelltod bei TZR-aktivierten T-Zellen feststellbar ist. Demnach ist CD95-vermittelte Apoptose der Hauptsignalweg des AICD, es existiert aber auch ein CD95-unabhängiger Weg (Dhein et al., 1995; Brunner et al., 1995; Alderson et al., 1995). An diesem CD95-unabhängigen Weg ist das TNF-R1/TNF- α -System beteiligt, da für T-Zellen aus CD95-defizienten lpr-Mäusen gezeigt werden konnte, daß deren verbleibende, TZR-induzierte Apoptose durch TNF-Inhibitoren blockiert werden kann (Tucek-Szabo et al., 1996; Zheng et al., 1995).

4. Dendritische Zellen (DZ)

Die Aktivierung von T-Zellen erfolgt durch Antigen präsenternde Zellen (APZ). Als APZ werden Zellen definiert, die MHC- oder verwandte Moleküle exprimieren, die Antigene wie z.B. Peptide binden, welche durch T-Zellen erkannt werden können (Austyn, 2000). Dabei kommt den DZ als professionelle APZ eine besondere Rolle zu, da sie aufgrund ihrer starken MHC-Klasse-II-Molekülexpression die potentesten und effizientesten Antigen präsenternden Zellen sind (Banchereau et al., 2000). DZ zeichnet darüber hinaus aber auch aus, daß sie nicht nur Antigene über ihre MHC-Moleküle präsentieren können, sondern parallel hierzu über kostimulatorische Moleküle Signale beim T-Zell-Kontakt speziell an naive T-Zellen weitergeben können, um eine Lymphozyten-medierte Immunantwort zu initiieren (Austyn, 2000).

4.1. Eigenschaften und Generierung von DZ

DZ entstehen aus CD34⁺ Vorläuferzellen des Knochenmarks oder aus CD14⁺ Blutmonozyten. Sie differenzieren entlang eines myeloiden oder eines lymphoiden Differenzierungsweges in drei verschiedene Subtypen unreifer DZ: in Langerhans-Zellen, interstitielle DZ sowie in plasmazytoide DZ (Steinmann, 1991; Banchereau et al., 2000). DZ exprimieren konstitutiv MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle und können somit sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ T-Zellen Antigene präsentieren. Darüber hinaus exprimieren DZ der Haut, die Langerhans-Zellen, sowie die in der Mucosa vorkommenden DZ CD1-Moleküle, die den MHC-Klasse-I-Molekülen verwandt sind und speziell bakterielle Lipid- oder Glycolipid-Antigene präsentieren können. Auf der DZ-Membran befinden sich ferner in großer Zahl Moleküle, welche eine Adhäsion mit T-Zellen ermöglichen (wie beispielsweise ICAM-1/CD54) oder die T-Zell-Aktivierung durch Kostimulation unterstützen. Letztere werden als kostimulatorische Moleküle bezeichnet; hierbei handelt es sich vor allem um CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2). Mit steigendem Maturierungsgrad steigt die Expression dieser Moleküle an (Girolomoni und Corinti, 2001).

Die Expression der kostimulatorischen Moleküle der DZ und die Stimulation der T-Zellen bedingen sich gegenseitig über die Interaktion von DZ und T-Lymphozyten. Neben dem ersten, die T-Zellen aktivierenden Signal über die Interaktion von MHC-Peptid-Komplex und TZR wird ein zweites kostimulatorisches Signal benötigt, um die T-Zellproliferation zu ermöglichen und T-Zellenergie zu verhindern. Dieses kostimulatorische Signal erfolgt durch die Interaktion von CD80 und CD86 mit CD28 auf den T-Zellen. Aktivierte CD4⁺ T-Zellen wiederum vermitteln retrograd über das von ihnen exprimierte CD154 (CD40-Ligand) ein Stimulierungssignal an DZ: eine Interaktion mit CD40 auf den DZ sowie eine Interaktion von TRANCE (RANK-Ligand; wird von T-Zellen exprimiert) und RANK (von DZ exprimiert) führt zu einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle, von MHC- und Adhäsionsmolekülen sowie zur Sekretion von IL-12. Die aufgrund dieser Interaktionen maturierten DZ induzieren Antigen-spezifische CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und das freigesetzte IL-12 führt zusätzlich zur Ausbildung einer TH-1-Immunantwort der CD4⁺ T-Zellen (Schoenberger et al., 1998; Bennett et al., 1998).

Bei der *in-vitro*-Generierung humaner DZ stimulieren GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor) und TNF- α das Wachstum und die Differenzierung der DZ-Vorläuferzellen in potente DZ (Caux et al., 1992). Darüber hinaus spielen bei der Generierung und Ausdifferenzierung von DZ IL-4 und Flt-3-Ligand eine Rolle: IL-4 führt bei humanen DZ *in vitro* zu einer höheren Ausbeute und Flt-3-Ligand in der Maus nach Injektion zu einer höheren Frequenz sowohl an lymphoiden als auch an myeloiden DZ in allen Organen (Kämpgen et al., 1994; Maraskovsky et al., 1996).

Die *in-vitro*-Generierung einer großen Zahl muriner DZ aus dem Knochenmark mittels GM-CSF wurde erstmals 1992 beschrieben (Inaba et al., 1992). Dabei konnte gezeigt werden, daß Granulocyten, Makrophagen und DZ alle aus der gleichen MHC-Klasse-II-negativen Progenitorzelle des Mausknochenmarks hervorgehen (Inaba et al., 1993). Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde eine Methode zur Generierung einer großen Anzahl reiner DZ (etwa $1-3 \times 10^8$ DZ pro Maus mit einer Reinheit von 90-95%) aus unseparierten Knochenmarkszellen lediglich unter Verwendung von GM-CSF entwickelt (Lutz et al., 1999).

4.2. Therapeutische Modifikation von DZ

Durch eine Vielzahl experimenteller Arbeiten wird evident, daß DZ nicht nur Immunantworten initiieren, sondern diese auch regulieren können (Banchereau et al., 2000). Die Kontrolle und Regulation einer Immunantwort gelingt den DZ durch ihre Fähigkeit, T-Zell-Toleranz zu erzeugen. Daher werden DZ immer mehr das Ziel der therapeutischen Regulierung von Immunantworten durch pharmakologische oder genetische Modifikation. Diese Modifikationen greifen mit Hilfe von u.a. Zytokinen, Kortikosteroiden und Vitaminen in die Differenzierung, Ausreifung, Expansion, Migration, Antigenaufnahme oder die phänotypischen und funktionellen Eigenschaften der DZ ein. Hierdurch können gezielt Subtypen von DZ mit bestimmten immunregulatorischen Eigenschaften erhalten werden. Daher bezeichnet man sie auch als regulatorische DZ (Hackstein und Thomson, 2004).

Entscheidend für die Ausbildung bestimmter immunregulatorischer Eigenschaften von DZ sind deren Maturierungsbedingungen. Immunsuppressive und antiinflammatorische Agenzien üben einen Einfluß auf die immunphänotypischen Eigenschaften der DZ aus, indem sie deren Expression der MHC-Moleküle, der kostimulatorischen Moleküle sowie die Zytokinfreisetzung regulieren. Es konnte experimentell nachgewiesen werden, daß die Ausreifung von DZ in Anwesenheit von Kortikosteroiden dazu führt, daß diese nicht die proinflammatorischen Zytokine IL-12p70 und TNF produzieren (Moser et al., 1995; Piemonti et al., 1999). Darüber hinaus führt die Behandlung von DZ mit Kortikosteroiden zur verstärkten Produktion des immunsuppressiven Zytokins IL-10 in diesen DZ sowie zu einer vermehrten Aktivierung IL-10-produzierender regulatorischer T-Zellen sowie der Inhibition von TH1-T-Zell-Anworten. Mit Hilfe multipler Restimulation mittels kortikosteroid-behandelter DZ konnten *in vitro* regulatorische T-Zellen generiert werden (Matyszak et al., 2000; Rea et al., 2000). Auch die Behandlung von DZ mit Vitamin D₃ in Kombination mit Steroiden führt zur Induktion regulatorischer, IL-10-produzierender DZ (Pedersen et al., 2004). Das therapeutische Potenzial pharmakologisch modifizierter DZ wurde in Tiermodellen gezeigt: mit Hilfe regulatorischer DZ konnten Mäuse vor akuter GvHD und einem Leukämierезidiv geschützt werden, wobei die verwendeten DZ mit IL-10 und TGF- β behandelt und nicht mit LPS oder TNF maturiert wurden (Sato et al., 2003).

Neben Kortikosteroiden gibt es weitere Faktoren, die einen Einfluß auf die immunregulatorischen Eigenschaften von DZ ausüben können. So konnte beispielsweise sowohl für murine als auch humane DZ gezeigt werden, daß der für die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen wichtige Wachstumsfaktor Flt3-Ligand einen Einfluß auf die regulatorischen Eigenschaften von DZ ausübt und zu einer Expansion tolerogener DZ führt (Miller et al., 2003).

Eine weitere therapeutische Anwendung von DZ stellt die gezielte Veränderung der immunregulatorischen Eigenschaften der DZ durch genetische Modifikation dar. Diese gelingt durch das Einbringen von Nukleinsäuren in die Zellen, beispielsweise durch Transduktion mit viralen Vektorsystemen oder aber durch Transfektion mit DNA oder RNA. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß humane und murine DZ durch Transduktion mit adenoviralen Vektorsystemen zur Expression von CD178 gebracht werden können. Darüber hinaus wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt, daß von murinen DZ nach Transfektion mit mRNA mittels Elektroporation effizient verschiedene Gene, u.a. auch für Transmembranproteine sowie für GFP codierende Gene, exprimiert wurden (Hoves et al., 2003; Min et al., 2000; Van Meirvenne et al., 2002; Kaltwasser et al., 2003).

Immuntherapeutische Relevanz besitzt neben den hier beschriebenen Modifikationsmethoden auch die Antigenbeladung von DZ mit spezifischen Tumorantigenen für die Verwendung als zelluläres Adjuvans bei Vakzinierungstherapien von Krebserkrankungen (Figdor et al., 2004).

5. Zielsetzungen der Arbeit

Bei der Behandlung maligner Erkrankungen des hämatopoetischen Systems durch eine allogene Blutstammzelltransplantation tritt als eine schwerwiegende Begleiterkrankung die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (Graft versus Host Disease, GvHD) auf. Sie wird durch allogene T-Lymphozyten des Transplantats verursacht, die das Gewebe des Transplantatempfängers als fremd erkennen und eine hiergegen gerichtete Immunantwort einleiten. Neben der klassischen Prophylaxe und Behandlung der GvHD mit immunsuppressiven Medikamenten, die aber weder das Auftreten einer akuten noch chronischen GvHD ausschließen können, werden zunehmend Behandlungsstrategien entwickelt, die eine spezifische Entfernung (Deletion) allogener GvH-reaktiver T-Lymphozyten aus dem Transplantat zum Ziel haben. In dieser Arbeit bestand die Aufgabenstellung darin, murine dendritische Zellen (DZ) derart zu modifizieren, daß diese in der Lage sind, durch Aktivierungs-induzierten Zelltod (Activation Induced Cell Death, AICD) alloreaktive T-Zellen *in vitro* zu deletieren. Darüber hinaus war in Mausmodellen zu untersuchen, ob die nach der Deletion verbleibenden T-Zellen nach adoptivem Transfer in allogene Rezipientenmäuse noch GvH-Reaktivität aufweisen.

Für die Deletion alloreaktiver T-Zellen via AICD sollten folgende drei Strategien angewandt werden:

- Transfektion von DZ mit *in-vitro*-transkribierter humaner CD178-mRNA und anschließende Stimulation allogener T-Zellen mit diesen CD178-Transfektanten.
- Stimulation allogener T-Lymphozyten mit DZ in Gegenwart von CD178-X-Fusionsproteinen, die an Oberflächenstrukturen entweder auf den DZ oder den T-Zellen binden. Darüber hinaus Einsatz von DZ, die mit *in-vitro*-transkribierter CD178-X-Fusionsprotein-mRNA transfiziert wurden.
- Stimulation allogener T-Lymphozyten mit DZ in Gegenwart von murinem agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2). Die Verwendung des Antikörpers sollte als Vergleichskriterium hinsichtlich der Induktion von AICD dienen.

C Material und Methoden

1. Material

1.1. Geräte

Autoklav.....	KGS-Sterilisatoren (Olching, BRD)
Bakterien-Schüttelinkubator.....	New Brunswick (Darmstadt, BRD)
Bestrahlungsanlage (Gammacell 2000)....	Molsgaard Medical (Dänemark)
Eismaschine.....	Ziegra-Eismaschinen (Isernh., BRD)
Elektroporator.....	Fischer (Heidelberg, BRD)
Elispot-Auslesegerät (Zeiss Vision C).....	Zeiss (Oberkochen, BRD)
Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS Calibur).....	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)
Gelelektrophoreseapparatur.....	Cosmo Bio (Tokyo, Japan)
GenePulser2 (Elektroporator).....	BioRad (München, BRD)
Heizblock.....	Techne (UK)
Heizschrank (Bakterien-Inkubator).....	WTB-Binder (Tuttlingen, BRD)
Laminarwerkbank.....	Integra Biosciences (Chur, Schweiz)
Mikroliter-Pipetten.....	Gilson (UK)
Mikrowelle.....	Bosch (BRD)
Mikroskop Wilovert S.....	Hund (Wetzlar, BRD)
Mikroskop (Zeiss Axiovert 100 M).....	Zeiss (Jena, BRD)
Mikrotiterplatten-Erntegerät (Harvester 96)	Tomtec (Hamden, USA)
Pipettierhilfe (Pipette-Boy).....	Integra Biosciences (Chur, Schweiz)
Schüttelwasserbad.....	Julabo Labortechnik (BRD)
Spektralphotometer (Ultraspec 300).....	Pharmacia Biotech (BRD)
Stickstofftank.....	Taylor Wharton (Mildstedt, BRD)
Szintillationszähler.....	PerkinElmer Wallac (Wellesley, USA)

Thermocycler.....	MWG-Biotech (BRD)
UV-Leuchttisch.....	Vetter (Wiesloch, BRD)
Vortexer.....	IKA-Labortechnik (BRD)
Waage (Satorius).....	Köhne-Waagen (Hambühren, BRD)
Zählkammer (Neubauer).....	Brand (Melsungen, BRD)
Zellinkubator für Zellkultur.....	Heraeus (Hanau, BRD)
Zentrifugen:	
Biofuge pico.....	Heraeus (Hanau, BRD)
Centrifuge 5810R.....	Eppendorf (Hamburg, BRD)

1.2. Verbrauchs- und spezielles Material

Für die Zellkultur wurden Einwegmaterialien der Firmen Falcon[®], Becton Dickinson (Heidelberg, BRD) und Greiner (Frickenhausen, BRD) verwendet.

Deckgläschen.....	Menzel-Gläser (Braunschweig, BRD)
Einfrierröhrchen 2ml.....	Nunc (Wiesbaden, Germany)
Einschweißfolien.....	Canberra Packard (Dreieich, BRD)
Elektroporationsküvetten (1cm).....	BioRad (München, BRD)
Glasfaserfiltermatte (Printed Filtermat A)..	PerkinElmer Wallac (Wellesley, USA)
MACS MS Seoaration Columns.....	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, BRD)
MACS LS Separation Columns.....	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, BRD)
MiniMACS Separation Unit.....	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, BRD)
Objektträger.....	Menzel-Gläser (Braunschweig, BRD)
Plastikpipetten.....	Greiner (Frickenhausen, BRD)
Quarzglasküvetten (Suprasil.....	Hellma (Müllheim, BRD)
Sammelhülle (Sample Bag).....	PerkinElmer Wallac (Wellesley, USA)
Szintillationsflüssigkeit (1205 Betaplate [™]).	PerkinElmer Wallac (Wellesley, USA)
Sterilfilter.....	Schleicher&Schuell (Dassel, BRD)

1.3. Chemikalien

7-AAD (7-Amino-Actinomycin D).....	Beckmann Coulter (Frankreich)
AAS (Antibiotic-Antimycotic-Solution).....	PAA (Pasching, Österreich)
Acrylamidlösung 30% (w/v).....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
AEC-Substrat (3-Amino-9-ethylcarbazol)..	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Agarose.....	Biogene (USA)
Ammoniumacetat.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Ammoniumchlorid.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Ampicillin.....	AGS (Heidelberg, BRD)
Aqua dest./bidest.....	Labor
Bromphenolblau.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
BSA (Rinderserumalbumin).....	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Cadmiumchlorid.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
CD90 Microbeads.....	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, BRD)
CD8 Microbeads.....	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, BRD)
CD4 Microbeads.....	Miltenyi (Bergisch-Gladbach, BRD)
Chloroform.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
dATP, dCTP, dGTP, dTTP.....	Applera (Darmstadt, BRD)
DEPC.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
DMSO (Dimethylsulfoxid).....	Apotheke der Uniklinik Mainz
EDTA (Ethylendiamintetraacetat).....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Essigsäure 96%.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Ethanol 70% zum Desinfizieren.....	Brüggemann (Heilbronn, BRD)
Ethanol 99,8%.....	Riedel-de Haen (Seelze, BRD)
Ethidiumbromid.....	Fluka (Seelze, BRD)
FACS Lysing Solution.....	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)
FACS-Flow.....	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)
FACS-Clean.....	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)
FACS-Rinse.....	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)
FCS (Fötales Kälberserum).....	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)

Formaldehydlösung mind. 37%.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Formamid.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
G418.....	Biochrom (Berlin, BRD)
L-Glutamin.....	Biochrom (Berlin, BRD)
Glycerin.....	Applichem (Darmstadt, BRD)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- 1-ethansulfonsäure).....	Cambrex (Walkersville, USA)
Isopropanol.....	Hedinger (Stuttgart, BRD)
Kaliumhydrogenphosphat.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Kalziumchlorid.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Kanamycin.....	AGS (Heidelberg, BRD)
Kohlendioxid.....	Linde (Wiesbaden, BRD)
Lipopolysaccharid (LPS).....	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Magnesiumsulfat.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
β -Mercaptoethanol.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Mineralöl.....	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Mitomycin C.....	Uniklinikapotheke (Mainz, BRD)
MOPS.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Natriumpyruvat.....	Biochrom (Berlin, BRD)
Natriumacetat.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Natriumazid.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Non-Essential-Aminoacids.....	PAA (Pasching, Österreich)
Paraformaldehyd.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung).....	PAA (Pasching, Österreich)
Phenol, puffergesättigt.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Polyethylenglykol (PEG).....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
P/S (Penicillin/Streptomycin Solution).....	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)
Random Primer.....	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)
SA-PE, SA-FITC.....	Jackson Immuno Research Europe
^3H -Thymidin.....	Hartmann Analytik (Braunschweig, BRD)

Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan.....	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Trypan blue solution (0,4%).....	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)
Trypsin/EDTA (0,05%).....	PAA (Pasching, Österreich)
Tween 20.....	Sigma (Deisenhofen, BRD)

1.4. Enzyme, Kits und spezielle Reagenzien

Die Restriktionsenzyme stammten von den Firmen New England Biolabs sowie von Roche Diagnostics.

Concert™ Rapid PCR Purification System	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)
DeepVent-DNA-Polymerase.....	New England Biolabs (UK)
Elispot-Entwickler-Kit.....	Vector Laboratories (UK)
High Pure RNA Isolation Kit.....	Roche (Mannheim, BRD)
HiSpeed Plasmid Midi Kit.....	Qiagen (Hilden, BRD)
1kb DNA Ladder.....	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)
MEGAclean™ RNA Purification Kit.....	Ambion (USA)
mMessage mMachin™ T7 Ultra (IVT-Kit)	Ambion (USA)
Mycoplasma Detection Kit.....	Minerva Biolabs (Berlin, BRD)
NucleoSpin Extract-Kit.....	Macherey-Nagel (BRD)
Protease Inhibitor Cocktail.....	Sigma-Aldrich (USA)
Rapid DNA Ligation Kit.....	MBI Fermentas (UK)
Reverse Transkriptase (Superscript™ II)..	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)
RNA Marker 0,2-10kb.....	Sigma (Deisenhofen, BRD)
RNase-Inibitor (RNase out).....	Invitrogen (Karlsruhe, BRD)
Taq-DNA-Polymerase.....	Qiagen (Hilden, BRD)
TransFectin™.....	BioRad (München, BRD)
Z-VAD-FMK (Caspase-Inhibitor).....	Biomol (Hamburg, BRD)

1.5. Kulturmedien und Antibiotika

Für eukaryontische Zellen

RPMI-1640.....	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)
ISCOV basal.....	Biochrom (Berlin, BRD)
X-Vivo 20.....	Cambrex (Walkersville, USA)
NCTC-135.....	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)

Für Bakterien

Luria-Broth-Medium (LB).....	Sigma (Deisenhofen, BRD)
LB-Agar.....	Sigma (Deisenhofen, BRD)

Antibiotika

Tabelle C1 gibt eine Übersicht der verwendeten Antibiotika sowie ihrer Anwendungskonzentrationen. Die Antibiotika wurden sterilfiltriert. Alle Stammlösungen wurden bei -20°C aufbewahrt. Bakterien wurden immer in Nährmedien bzw. Platten unter Zusatz der entsprechenden Antibiotika angezogen.

Antibiotikum	Konzentration der Stammlösung [mg/ml]	Lösungsmittel	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Ampicillin	100	H ₂ O dest.	100
Kanamycin	10	H ₂ O dest.	30
G418	50	H ₂ O dest.	500

Tab. C1: Zusammenfassung der verwendeten Antibiotikallösungen. Ampicillin und Kanamycin wurden für die Selektion bakterieller Transformanten verwendet, G418 für die Selektion eukaryontischer Transfektanten.

1.6. Zytokine

Rekombinantes humanes TNF- α wurde von der Firma PromoKine (Heidelberg, BRD) verwendet. Rekombinantes murines GM-CSF wurde aus einer murinen X6310-GM-CSF-Transfektante gewonnen, die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Schmitt (Institut für Immunologie, Uni Mainz) zur Verfügung gestellt wurde (siehe auch 2.3.2).

1.7. Antikörper

Für ELISpot Analysen

Anti-Maus-IFN- γ , Klon AN18.....	Mabtech (Nacka Strand, Schweden)
Anti-Maus-IFN- γ , Klon R4-6A2 (biotinyliert)	Mabtech (Nacka Strand, Schweden)

Zur Induktion von AICD

Anti-Maus-CD95, Klon Jo2.....	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)
-------------------------------	------------------------------------

Zur Blockierung von CD178

Anti-human-CD178, Klon NOK1.....	eBioscience (San Diego, USA)
----------------------------------	------------------------------

Für FACS-Färbungen

Tabelle C2 enthält die für die Durchflußzytometrie verwendeten Antikörper gegen humane bzw. murine Zelloberflächenmoleküle.

Antikörper	Isotyp	Format	Klon	Hersteller	Verd.
CD3	Hamster IgG1	PE ^a	145-2C11	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD11c	Hamster IgG1	PE ^a	HL3	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD19	Ratte IgG2a	PE ^a	1D3	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD40	Hamster IgM	FITC ^b	HM40-3	eBioscience (San Diego, USA)	1:50
CD54	Hamster IgG1	Bio ^c	3E2	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD80	Hamster IgG2a	Bio ^c	16-10A1	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD86	Ratte IgG2a	PE ^a	GL1	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD90	Ratte IgG2a	PE ^a	53-2.1	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD95	Hamster IgG2	PE ^a	Jo2	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
CD178	Maus IgG1	Bio ^c	NOK1	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:25
MHC-Klassel	Maus IgG2b	Bio ^c	11,05,02	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
MHC-Klassell	Maus IgG2a	Bio ^c	AF6-120.1	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:50
RANK-Ligand	Ratte IgG2a	Bio ^c	IK22/5	eBioscience (San Diego, USA)	1:50

Tab. C2: Zusammenfassung der verwendeten FACS-Antikörper. Der anti-CD178-Antikörper war gegen humanes CD178 gerichtet, alle übrigen Antikörper gegen murine Oberflächenmoleküle. Als Negativkontrolle wurden bei den FACS-Färbungen die entsprechenden Isotyp-Kontrollantikörper eingesetzt. Bei der Färbung von B-Zellen wurden die Fc-Rezeptoren zunächst mit anti-Fc-Antikörper blockiert.

a) PE = R-Phycoerythrin, b) FITC = Fluoreszeinisothiocyanat, c) Bio = Biotin; hier wurde entweder mit Streptavidin-FITC oder Streptavidin-PE gefärbt.

1.8. Fusionsproteine

Tabelle C3 führt die in dieser Arbeit verwendeten Fusionsproteine auf. Der Aufbau der Fusionsproteine ist in Abschnitt D2.1 beschrieben.

Fusionsprotein	Bezugsquelle
hCD178-mCD28	Institut für Molekulare Medizin (Uni Würzburg, BRD)
hCD178-RANK	“
hCD178-CD152	“
hCD178-hIL-2	“
hCD178-hB7-2	“
hCD40-hTRAIL	“
CD178-sc40	“
hCD152-Ig	Chimerigen (USA)
SuperFasL	Alexis (Grünberg, BRD)

Tab. C3: Zusammenfassung der verwendeten Fusionsproteine und ihrer Herkunft. Das Präfix „h“ steht für humane, „m“ steht für die murine Herkunft des entsprechenden Fusionsproteinteils.

1.9. Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit zu Klonierungen und PC-Reaktionen verwendeten Desoxyribooligonukleotide sind in der Tabelle C4 aufgeführt und wurden von der Firma SIGMA bezogen.

Name	Länge (bp)	Beschreibung/ Orientierung/ Verwendung	Sequenz in 5'→3'-Richtung
UH88	24	hCD178/ Sense/ PCR	ATGCAGCAGCCCTTCAATTACCCA
UH90	24	hCD178/ Antisense/ PCR	TTAGAGCTTATATAAGCCGAAAAA
UH122	21	m β -Actin/ Sense/ PCR	TCCTGTGGCATCCACGAAACT
UH123	21	m β -Actin/ Antisense/ PCR	GAAGCATTTCGCGGTGGACGAT

Tab. C4: Liste der verwendeten Desoxyribooligonukleotide. Angegeben sind die Bezeichnungen, die Länge jedes Oligonukleotides, seine Orientierung, die Verwendung sowie die Nukleotidsequenz.

1.10. Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle C5 zusammengefaßt.

Plasmidname	Beschreibung	Referenz
pGEM-3Z	In-vitro-Transkriptionsvektor für T7-RNA-Polymerase	Promega
pEGFP-N1	Expressionsplasmid für Eukaryonten mit EGFP-Gen	Clontech
pGEM-3Z-EGFP	IVT-Plasmid mit EGFP-Gen aus pEGFP-N1	*
pGEM-3Z-hCD178 Δ zyt	IVT-Plasmid mit zytoplasm. deletiertem hCD178-Gen	*
hCD178 Δ zyt-pEYFP-C1	Expressionsplasmid mit zytoplasm. deletiertem hCD178-Gen	H. Wajant
mCD28-FLAG-hCD178-pCR3.1	IVT-Plasmid mit Gen für hCD178-mCD28-Fusionsprotein	H. Wajant
hRANK-FLAG-hCD178-pCR3.1	IVT-Plasmid mit Gen für hCD178-hRANK-Fusionsprotein	H. Wajant
cFLIP _L -pCRV6.2	IVT-Plasmid mit cFLIP-L-Gen	H. Wajant

Tab. C5: Übersicht über die verwendeten Plasmide. Angegeben sind die Bezeichnung, eine Beschreibung sowie die zugehörige Referenz jedes Plasmids. Die mit Stern (*) gekennzeichneten Plasmide wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert. Ein Teil der Plasmide wurde freundlicherweise von Herrn Prof. H. Wajant vom Institut für Molekulare Medizin der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt.

1.11. Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme

Eukaryontische Zelllinien

Die in dieser Arbeit funktional eingesetzten Zelllinien sind in Tabelle C6 wiedergegeben.

Zelllinie	ATCC-Nr.	Beschreibung/ Pathologie	Referenzen
K562	CCL-243	Humane Lymphoblasten/ chronisch myeloide Leukämie	Lozzio und Lozzio, 1975
A20	TIB-208	Murine Lymphoblasten (H-2 ^d)/ chronisch myeloide B-Zell-Leukämie	Kim et al., 1979
E.G7-OVA (EL4G7)	CRL-2113	Murine Lymphoblasten (H-2 ^b)/ Lymphom; mit dem Plasmid pAc-neo-OVA stabil transfiziert	Moore te al., 1988

Zelllinie	ATCC-Nr.	Beschreibung/ Pathologie	Referenzen
NIH-3T3	CRL-1658	Murine Fibroblasten/ mit murinem Sarcomavirus bzw. Leukämieviren infiziert.	Jainchill et al., 1969

Tab. C6 : Übersicht über die verwendeten Zelllinien. Angegeben sind die Bezeichnung, die jeweilige Nummer der ATCC-Datenbank, eine Beschreibung inkl. Pathologie sowie die zugehörige Referenz.

Alle Zelllinien wurden regelmäßig mittels PCR auf Mycoplasmakontamination untersucht.

Bakterienstämme

Für die präparative Vermehrung von Plasmiden sowie für Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 α verwendet.

Genotyp von ***E. coli* K12 DH5 α** : endA1, F⁻, gyrA96, hsdR17, (r_k⁻, m_k⁺), lacZ Δ M15, recA1, supE44, λ ⁻, deoR, thi⁻, ϕ 80d, Δ (lacZYA-argF) U169 (Referenz: Bethesda-Research Laboratories).

1.12. Mausstämme

Tabelle C7 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme. Alle Mäuse wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in der zentralen Tierzuchtanlage der Universität Mainz gehalten.

Bezeichnung	Haplotyp/ Beschreibung	Herkunft/ Referenz
Balb/c	H-2 ^d	Tierzuchtanlage Uni Mainz
C57BL/6	H-2 ^b	Tierzuchtanlage Uni Mainz
F ₁ (Balb/c x C57BL/6)	H-2 ^{bxd}	Tierzuchtanlage Uni Mainz
GFP	H-2 ^b / transgene GFP-Maus	Tierzuchtanlage Uni Mainz
MRL/MpJ-Tnfrsf6 ^{lpr} /J (MRL/lpr)	H-2 ^k / CD95-defizient	Jackson Laboratory
OT1	H-2 ^b / transgene OVA-Maus	Tierzuchtanlage Uni Mainz

Tab. C7: Verwendete Mausstämme. Angegeben sind die Bezeichnung, der Haplotyp, eine Beschreibung sowie die Herkunft bzw. Referenz des jeweiligen Stammes. Die MRL/lpr-Mäuse wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Schwarting (I. Med. Klinik, Uni Mainz) zur Verfügung gestellt, die OT1-Mäuse von Herrn Prof. Schild (Institut für Immunologie, Uni Mainz).

2. Methoden

2.1. Biochemische und molekularbiologische Methoden

2.1.1. Gelelektrophorese von DNA in Agarosegelen

- 50x Elektrophoresepuffer pH7,8: 2 M Tris-HCl; 250 mM Natriumacetat; 50 mM EDTA (TAE-Puffer)
- 6x BPB-Ladepuffer: 20 mM Tris-HCl, pH7,5; 2 mM EDTA; 50% Sucrose; 0,2% Xylencyanol; 0,2%(w/v) Bromphenolblau

Die Agarose wurde in einer Konzentration von 0,8%-2,0% in TAE-Puffer suspendiert, durch kurzzeitiges Erhitzen mittels Mikrowellen verflüssigt, mit Ethidiumbromid (1µg/ml Endkonzentration) versetzt und in Flachbettapparaturen gegossen. Die Proben wurden mit $\frac{1}{6}$ Vol. BPB-Ladepuffer versetzt, in die Geltaschen pipettiert und mit einer Spannung von 0,5-1 V/cm elektrophoretisch aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1 × TAE, als Größenstandards wurden entsprechend den aufgetrennten Fragmenten 1kb-DNA- bzw. 100bp-DNA-Standards verwendet (Invitrogen). Die Auftrennung der DNA-Fragmente wurde mittels UV-Licht (254nm) visualisiert und mit dem Cybertech CS-1 Image Documentation System dokumentiert.

2.1.2. Gelelektrophorese von RNA in Agarosegelen

- 10x MOPS-Puffer: 200 mM MOPS, 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, pH mit NaOH auf 7,0 einstellen
- RNA-Probenpuffer: 6,5 ml Formamid, 1,2 ml Formaldehyd, 2,0 ml 10x MOPS-Puffer, 0,4 ml 50% Saccharose, 20 mg Bromphenolblau, 20 mg Xylencyanol

Die Auftrennung der RNA-Proben erfolgte in denaturierenden 1,2%igen Agarosegelen. Die für das RNA-Gel ausgewählte Elektrophoresekammer mußte zunächst von potentiellen RNasen befreit werden; dies erfolgte durch gründliches Reinigen mit Aqua dest./Detergenz (Spülmittel), Spülen mit 98%igem Ethanol und Spülen mit Aqua dest./DEPC. Ebenso wurde mit der entsprechenden Gelgießform, dem Kamm und dem Gelschlitten verfahren.

Zur Herstellung eines denaturierenden 1,2%igen Agarosegeles wurden 0,6g Agarose in eine DEPC-behandelte 500ml Schottflasche eingewogen, 37ml Aqua demin./DEPC und 5 ml 10x MOPS zugegeben und die Agarose mit Mikrowellen zur vollständigen Quellung (6 x 30sec) gebracht. Die gelöste Agarose wurde für 30 min bei 65°C inkubiert, anschließend mit 4,25ml Formaldehyd versetzt und nochmals für 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 35ml des Agaroseansatzes mit

Ethidiumbromid (1 µg/ml Endkonzentration) versetzt, in die vorbereitete Flachbettapparatur gegossen und vor dem Einsetzen in der Elektrophoreseapparatur 1h bei RT abkühlen lassen. Für einen Vorlauf von 10 min bei 100V wurde das Gel mit vorgekühltem Laufpuffer (1xMOPS) überschichtet. In der Zwischenzeit erfolgte die Vorbereitung der RNA-Proben (je 2 µg in 7 µl H₂O/DEPC) für die Elektrophorese. Dazu wurden die RNA-Lösungen mit jeweils 1 Vol. Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 65°C zum Auflösen der Sekundärstrukturen inkubiert und dann sofort in Eis gestellt. Das Gel wurde mit den RNA-Proben und RNA-Molekulargewichtsstandard (3 µl plus 3 µl RNA-Probenpuffer) beschickt.

Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V (= 4 V/cm Elektrodenabstand) und die Auftrennung der Proben wurde anschließend durch eine Fotografie dokumentiert.

2.1.3. Enzymatische Hydrolyse von DNA

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsendonukleasen vom Typ II (Arber, 1978) verwendet, welche die DNA innerhalb spezifischer Erkennungssequenzen hydrolysieren. Alle Reaktionen wurden unter den vom Hersteller empfohlenen Bedingungen durchgeführt. Bei Restriktionen mit verschiedenen Enzymen, die unterschiedliche Reaktionspuffer benötigen, wurden die Hydrolysen nacheinander mit dazwischenliegender Reinigung mit Hilfe des CONCERT-Rapid-PCR-Purification-System der Firma Gibco-BRL durchgeführt.

2.1.4. Reinigung und Fällung von DNA

Zur Entfernung von Proteinen aus einer DNA-Lösung wurde eine proteindenaturierende Phenolextraktion mit anschließender Fällung der DNA zwecks Konzentration und Entfernung von Salzen durchgeführt.

2.1.4.1. Phenolextraktion

Zu deproteinierende DNA-Lösung wurde zunächst mit H₂O dest. auf ein Mindestvolumen von 400 µl gebracht, anschließend mit 1 Vol. Phenol-Tris versetzt, und bis zur Eintrübung der Lösung gründlich durchmischt. Die Phasen wurden durch 3minütige Zentrifugation bei 8000 rpm getrennt, die wässrige, DNA-haltige Oberphase in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert. Nach erneuter Zentrifugation zur Phasentrennung für 3 min bei 8000 rpm erfolgte wiederum ein Transfer des Überstandes in ein neues Eppendorfgefäß. Zur Entfernung verbliebener Phenolmoleküle aus der DNA-Lösung wurde noch 2 x mit je 1 Vol. Chloroform/IAA extrahiert, wobei zur Phasentrennung

jeweils 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert werden mußte. Anschließend wurde die DNA gefällt.

2.1.4.2. Ethanolfällung

Dazu wurden der DNA-Lösung 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 4.8) sowie 2,5 Volumina 96% Ethanol (bei -20°C gelagert) zugegeben. Nach gründlicher Durchmischung von Hand erfolgte die Fällung entweder ÜN bei -20°C , mindestens 30 min bei -80°C oder 1 min in flüssigem Stickstoff. Durch 30minütige Zentrifugation bei 12000 rpm und 4°C wurde das Na^+ -DNA-Präzipitat pelletiert und zur Reinigung von überschüssigen Salzen 1 x mit 70%igem und 1 x mit 96%igem Ethanol gewaschen und das Pellet anschließend getrocknet. Schließlich wurde die DNA in einem angemessenen Volumen H_2O bidest. resuspendiert, wobei hier berücksichtigt werden mußte, daß bei einer Ethanolfällung mit ca. 5%, bei Fällung mit vorangegangener Phenolextraktion mit ca. 10% Verlust zu rechnen ist. Die DNA-Lösungen wurden kurzfristig bei 4°C , langfristig bei -20°C aufbewahrt.

2.1.5. DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Die DNA-Probe wurde nach Hydrolyse zunächst in einem präparativen, Ethidiumbromidhaltigen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das gesuchte DNA-Fragment wurde durch kurze UV-Beleuchtung im Gel lokalisiert, mit einem Skalpell ausgeschnitten und gewogen. Die Extraktion der DNA erfolgte mit Hilfe des NucleoSpin Extract-Kit der Firma Macherey-Nagel. Zur Kontrolle wurden 1-3 μl des Eluats durch Agarosegelelektrophorese auf Integrität überprüft.

2.1.6. Ligation von DNA-Fragmenten

Hierbei wurde die DNA in einem Gesamtvolumen von 20 μl mit 4 μl 5x Ligationspuffer und 1,0 μl T4-DNA-Ligase (5 U/ μl) versetzt (Rapid DNA Ligation Kit von MBI Fermentas). Der Ligationsansatz wurde anschließend für 5 min bei RT inkubiert und die Ligase danach 15 min bei 70°C inaktiviert. Als Kontrolle diente eine Religierung ohne DNA-Fragment.

2.1.7. Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Zur schnellen Isolierung größerer Mengen DNA in reiner Form wurde der HiSpeed Plasmid Midi Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers. Eine 100 ml ÜNK des gewünschten Stammes wurde in LB-Selektivmedium angelegt und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Bakterien bei 3500 rpm, 4°C für 15 min zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Die Isolierung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die Konzentration und der Reinheitsgrad spektralphotometrisch durch Messung der Absorptionen bei 260nm und 280nm bestimmt.

2.1.8. Absorptionsmessungen und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Absorptionsmessungen wurden am Spektralphotometer (Ultraspec 300) der Firma Pharmacia Biotech durchgeführt. Für Messungen im Bereich des sichtbaren Lichts wurden Kunststoffküvetten benutzt. Die optische Dichte von Bakterienkulturen wurde bei 600 nm gemessen. Die DNA-Konzentration in wäßrigen Lösungen wurde durch Absorptionsmessung bei 260 nm und 280 nm in Quarzküvetten bestimmt. Dabei gilt, daß 1 A_{260} einer DNA-Konzentration von 50 µg ds-DNA/ml, bzw. 33 µg ss-DNA/ml Lösung entspricht oder bezogen auf RNA einer RNA-Konzentration von 40 µg RNA/ml (Sambrook *et al.*, 1989). Der Quotient A_{260}/A_{280} gibt den Reinheitsgrad der DNA an und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

2.1.9. DNA-Amplifizierung mittels PCR

2.1.9.1. PCR-Reaktion mit der Deep-Vent™- bzw. Taq-DNA-Polymerase

Die PCR-Reaktion wurde mit den PCR-Kits der Firmen New England Biolabs (Deep-Vent®) und Qiagen (Taq-DNA-Polymerase) durchgeführt. Die Deep-Vent®-DNA-Polymerase verfügt im Gegensatz zur Taq-DNA-Polymerase über eine Proofreading-Aktivität. Sie wurde deshalb bei Klonierungen eingesetzt. Bei der Amplifizierung wurden 0,2 µg Plasmid-DNA als Matrize verwendet. Der Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

0,2 bzw. 1µg DNA

10 µl 10x PCR-Puffer

je 2µl 10 mM dNTPs

100 pmol 5'-Primer

100 pmol 3'-Primer
1 µl DNA-Polymerase (2U/µl)
ad 50 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde mit Mineralöl überschichtet und die Reaktionsgefäße anschließend in den Heizblock des PCR-Thermostaten (MWG-Biotech) überführt und folgendes Reaktionsprofil gestartet:

Der Reaktionsansatz wurde zunächst für 5 min auf 94°C aufgeheizt. In wiederkehrenden Zyklen von jeweils 1 min bei 94°C wurde die DNA denaturiert, 1 min bei einer Primersequenz-spezifischen Temperatur die Primer mit den entsprechenden DNA-komplementären Sequenzen hybridisiert (Annealing) und schließlich mit 500 Basen/min (Deep-Vent[®]-DNA-Polymerase) bzw. 1000 Basen/min (Taq-DNA-Polymerase) bei 72°C mittels Polymerasereaktion elongiert. Nach Ablauf von 30 solcher Zyklen wurde der Reaktionsansatz für 10 min auf 72°C temperiert, um abgebrochene PCR-Reaktionen zu vervollständigen. Bis zur weiteren Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch auf 4°C abgekühlt.

2.1.9.2. Reinigung des amplifizierten PCR-Produktes

Das Reaktionsgemisch wurde nach Ablauf der PCR-Reaktion in ein frisches Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend mit Hilfe des CONCERT-Rapid-PCR-Purification-Systems der Firma Gibco-BRL gemäß des Herstellerprotokolls aufgereinigt. 3 µl des Eluats wurden in einem Agarosegel auf erfolgreiche Amplifikation überprüft.

2.1.9.3. Kolonie-PCR

Die Kolonie-PCR stellt eine leichte Abwandlung der unter 2.1.9.1 beschriebenen PCR-Methode dar und diente im Anschluß an Klonierungsexperimente zur Verifizierung der Insertion von DNA-Fragmenten in den Plasmidvektor. Die Abwandlung bestand darin, daß die Plasmid-DNA, die als Matrizen-DNA für die Amplifizierung bei der PCR-Reaktion diente, nicht zuvor aus den *E. coli*-Zellen isoliert wurde. Vielmehr wurden die *E. coli*-Zellen einer Einzelkolonie mit einem Zahnstocher aufgenommen und dem Reaktionsansatz direkt zugeführt. Die starke Erwärmung des Reaktionsansatzes während des PCR-Zyklus reicht dabei aus, um die Plasmid-DNA aus den *E. coli*-Zellen freizusetzen, so daß die Matrizen-DNA für die Polymerase zugänglich wird. Die selbe Kolonie wurde parallel auf eine LB-Agarplatte mit

entsprechendem Selektionsantibiotikum überführt, um den entsprechenden Klon weiterhin zur Verfügung zu haben.

Mindestens einer der beiden Primer wurde so gewählt, daß er innerhalb des Fragmentes, dessen Insertion in das Plasmid überprüft werden sollte, hybridisierte, so daß nur dann eine Amplifizierung stattfinden konnte, wenn das Fragment beim vorangegangenen Klonierungsexperiment korrekt in den Vektor ligiert worden war.

Der Reaktionsansatz sah folgendermaßen aus:

1 Kolonie *E. coli*-Zellen
2 µl 10x PCR-Puffer
je 0,5 µl 10 mM dNTPs
100 pmol 5'-Primer
100 pmol 3'-Primer
0,5 µl DNA-Polymerase (1U/µl)
ad 20 µl mit H₂O bidest. auffüllen

Die weitere Behandlung des Reaktionsansatzes war identisch zu der zuvor beschriebenen PCR. Im Anschluß an die PCR-Reaktion wurden die Ansätze nicht aufgereinigt, sondern je 10 µl des Reaktionsansatzes in einem Agarosegel durch Gelelektrophorese auf erfolgreiche Amplifikation überprüft.

2.1.10. Isolation von Gesamt-RNA aus eukaryontischen Zellen

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden etwa 1×10^6 eukaryontische Zellen (DZ und K562) eingesetzt. Diese wurden vor der Isolation zweimal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend in 200 µl PBS-Puffer resuspendiert. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit der Firma Roche-Diagnostics nach den Angaben des Herstellers. Die RNA wurde nach der Isolation bis zur weiteren Verwendung (Einsatz als Matrize in der RT-PCR) bei -80°C gelagert.

2.1.11. Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription wurde im Rahmen dieser Arbeit die aus eukaryontischen Zellen isolierte Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und im Folgenden als Matrize in einer PCR für den Nachweis zuvor transfizierter mRNA verwendet. Die Reverse Transkription wurde mittels Oligo-dT-Nukleotiden und der

SuperScript™ II RNase H⁻ Reverse Transkriptase (Invitrogen) durchgeführt. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

1 µl Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Nukleotid
1 ng bis 5 µg Gesamt-RNA
1 µl 10 mM dNTP-Mix
ad 12 µl Aqua dest.

Der obige Ansatz wurde für 5 min auf 65°C erhitzt, anschließend sofort auf Eis gekühlt und folgende Komponenten zugegeben:

4 µl 5x Reaktionspuffer
2 µl 0,1 M DTT
1 µl RNaseOUT™

Der Reaktionsansatz wurde gemischt, für 2 min auf 42°C erhitzt und mit 1µl (200 U) der Reversen Transkriptase versetzt. Danach wurde abermals gemischt und es erfolgte eine 50minütige Inkubation bei 42°C. Durch Erhitzen auf 70°C für 15 min wurde das Enzym inaktiviert. Die amplifizierte cDNA diente als Matrize in einer sich anschließenden PCR mit genspezifischen Oligonukleotiden.

2.1.12. Synthese von *in vitro* transkribierter RNA

Alle Arbeiten, die für die in-vitro-Synthese von RNA notwendig waren, wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Alle wässrigen Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt.

2.1.12.1. Vorbereitung der Vektoren für die *in-vitro*-Transkription (IVT)

Alle Plasmide, die für die IVT eingesetzt wurden (siehe Tab. C5), wurden mittels Restriktionsendonukleasen nach dem 3'-Ende des zu transkribierenden Gens hydrolysiert. Es wurden nur solche Enzyme verwendet, die überhängende 5'-Enden produzierten (3'-Überhänge können von der RNA-Polymerase als Transkriptionsstartpunkt erkannt werden). Nach der Hydrolyse wurden die linearisierten Plasmide durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung aufgereinigt und der vollständige Verdau durch Gelelektrophorese auf einem Agarosegel kontrolliert.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch bei 260nm. Bis zur weiteren Verwendung wurde die linearisierte DNA bei -20°C aufbewahrt.

2.1.12.2. *In-vitro*-Transkription (IVT) und Polyadenylierung

Die Synthese der in dieser Arbeit verwendeten mRNA-Moleküle erfolgte mit dem mMessage mMachineTM T7 Ultra IVT-Kit der Firma Ambion nach den Angaben des Herstellers, bei dem eine T7-RNA-Polymerase verwendet wird. Dabei wurde ohne weitere Aufreinigung die Polyadenylierung direkt nach der IVT im gleichen Reaktionsgefäß durchgeführt. Vor und nach der Polyadenylierung wurden Proben der jeweiligen RNA entnommen, um diese in einem denaturierenden RNA-Gel auf Integrität zu überprüfen. Nach der Polyadenylierung wurde die mRNA mit dem MEGAcleanTM RNA Purification Kit der gleichen Firma aufgereinigt und die RNA-Konzentration photometrisch bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C aufbewahrt.

2.2. Arbeiten mit Bakterien

2.2.1. Herstellung kompetenter Bakterien

1970 zeigten Mandel und Higa, daß CaCl_2 behandelte *E. coli* Zellen DNA des Phagen λ direkt aufnehmen können. Dabei induziert die Behandlung mit den Ca^{2+} -Kationen eine Kompetenz des Bakteriums, d.h. einen physiologischen Zustand, welcher die Aufnahme der DNA ins Zellinnere ermöglicht. Nach Cohen et al. (1972) ist diese Methode auch für Plasmid-DNA anwendbar.

In dieser Arbeit wurden durch eine von Chung et al. (1989) beschriebene Ein-Schritt-Methode kompetente *E. coli* DH5 α -Zellen hergestellt. *E. coli*-Zellen wurden zunächst in LB-Medium bis zu einer optischen Dichte von etwa 0,3 kultiviert, im Folgenden auf Eis gekühlt und anschließend bei 1000 g und 4°C für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen vorsichtig in 1/10 des Ausgangsvolumens mit 1x TSS resuspendiert.

1x TSS bestand dabei aus:

- LB-Medium
- 10% (w/v) PEG 3350
- 5% (v/v) DMSO
- 40 mM MgSO_4

pH 6,5 (muß nicht eingestellt werden).

Sofort nach der Resuspension in TSS wurden Bakterienaliquots zu je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Transformation aufbewahrt.

2.2.2. Transformation kompetenter E.coli-Bakterien

Zur Transformation wurde die benötigte Anzahl an Aliquots kompetenter Zellen zunächst 30 min auf Eis aufgetaut. Nach erfolgter Zugabe der zu transformierenden Plasmid-DNA (20-200 ng) wurden die Transformationsansätze mindestens 1 h auf Eis gekühlt und nachfolgend für 2 min für einen Hitzeschock in einen 42°C -Heizblock überführt. Im Anschluß wurden möglichst rasch pro Ansatz je 800 µl LB-Medium zugegeben und die transformierten Bakterien dann für 30 min bei 37°C geschüttelt. Während dieser sogenannten Genexpressionsphase erfolgt die Ausbildung plasmid-kodierter Resistenzen; sofortiges Ausplattieren auf antibiotikahaltigen Platten würde alle Transformanten abtöten, da die Antibiotika-inaktivierenden Enzyme erst synthetisiert werden müssen. Schließlich wurden die Bakterien für 3 min bei 8000 rpm abzentrifugiert. Bei Antibiotika-Resistenzen, die durch periplasmatische Enzyme vermittelt werden, wie z.B. Ampicillinresistenz durch β -Lactamase, wurden die Zellen zwecks Vermeidung von Mikrokolonien aufgrund spontaner Zellyse noch zweimal mit antibiotikahaltigem Medium gewaschen. Dann wurde der größte Teil des Überstandes verworfen, das Zellpellet im Restvolumen resuspendiert und vollständig oder in Form verschiedener Verdünnungen auf antibiotikahaltige LB-Platten ausplattiert.

2.2.3. Glycerin-Dauerkulturen von Bakterien

Von dem zu konservierenden Bakterienstamm wurde eine 2-ml-ÜNK angelegt, davon 1,7 ml mit 300 µl sterilem Glycerin versetzt und gründlich gemischt. Die Suspension wurde 2 h bei RT belassen und in regelmäßigen Abständen durchmischt, abschließend 1 h auf Eis inkubiert und dann bei -20°C gelagert.

2.3. Zellbiologische Methoden

Die Zellkultur wurde unter Verwendung steriler Einmalartikel aus Kunststoff durchgeführt und Zellen bei 37°C , 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Alle in dieser Arbeit angelegten Zellkulturen wurden in RPMI-Medium mit 10% FCS kultiviert. Das FCS wurde vor der Verwendung für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert, um das Komplementsystem auszuschalten. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Centrifuge 5810R (Eppendorf). Für die verschiedenen Zellkulturarten und Experimente wurden folgende Medienzusammensetzungen angewandt:

- Immunologisch funktionellen Tests: RPMI mit 10% FCS, 5% NCTC, 5 mM L-Glutamin, 1,5g/l Natriumbicarbonat, 1% Antibiotic-Antimycotic-Solution (AAS, 10.000 IU Penicillin, 10mg/ml Streptomycin, 25µg/ml Amphotericin B), 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 1mM Na-Pyruvat, 10mM HEPES, 0,8% Nichtessentielle Aminosäuren (**MLR-Medium**)
- Zellpräparationen: RPMI-Medium mit 2% FCS, 1% AAS (**Präp-Medium**)
- DZ-Generierung: RPMI mit 10% FCS, 5 mM L-Glutamin, 1,5g/l Natriumbicarbonat, 1% AAS, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 1mM Na-Pyruvat, 10mM HEPES, 0,8% nichtessentielle Aminosäuren, 10% GM-CSF-Kulturüberstand (siehe 2.3.2) (**DZ-Medium**)
- Permanente Zelllinien: RPMI mit 10% FCS, 5 mM L-Glutamin, 1,5g/l Natriumbicarbonat, 1% AAS, 0,1 mM β -Mercaptoethanol, 1mM Na-Pyruvat, 10mM HEPES, 0,8% nichtessentielle Aminosäuren, (**Zellkulturmedium**)
- Kryokonservierung: 90% FCS, 10% DMSO (**Einfriermedium**)
- Erythrozytenlyse: 8,29g/l NH_4Cl , 1g/l KHCO_3 , 0,0372g/l EDTA (steril filtriert, **Erylyse-Lösung**)

2.3.1. Kultivierung permanenter Zelllinien

Die permanenten Zelllinien wurden in Zellkulturmedium kultiviert. Adhärenz wachsende Zellen wurden für die Zellernte mit Hilfe von Trypsin/EDTA gelöst. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 subkultiviert (i.d.R. alle 3 bis 4 Tage). Dabei wurde Dreiviertel des Zellkulturmediums verworfen und durch frisches Medium ersetzt. Stabile Transfektanten erhielten als Selektionsantibiotikum G418.

2.3.2. Gewinnung von GM-CSF-Kulturüberstand

Rekombinantes murines GM-CSF für die Generierung von DZ wurde aus einer stabil transfizierten X6310-Transfektante gewonnen. Hierzu wurden die Transfektanten in

einer Zellkulturflasche bis zu einer Konfluenz von 90 bis 95% in ISCOV Basal-Medium (1% P/S-Lsg., 5% FCS) herangezogen und sodann eine 5mM Cadmiumchloridlösung (CdCl_2) zugegeben, so daß die Endkonzentration an CdCl_2 $5\mu\text{M}$ betrug. Die Zellen wurden für mehrere Tage (i.d.R. vier bis sechs Tage) weiterkultiviert, bis alle Zellen abgetötet und GM-CSF möglichst vollständig in das Medium sezerniert worden war. Anschließend wurden die Zelldebris bei 4000 U/min für 20 min abzentrifugiert und der Zellkulturüberstand steril filtriert. Dieser GM-CSF-haltige Kulturüberstand wurde dann bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.3.3. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden 10^5 bis maximal 5×10^7 Zellen (je nach Zelltyp) in 1,5ml Einfriermedium aufgenommen und in 2ml-Einfrierröhrchen gegeben. Diese wurden dann sofort in einer mit Isopropanol befüllten Kryobox bei -80°C langsam auf -80°C heruntergekühlt (etwa 4°C Temperaturabsenkung/h), am nächsten Tag in einen Tank mit flüssigem Stickstoff überführt und dort bis zum Auftauen gelagert.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen schnell in ein 37°C -Wasserbad überführt und die Zellen sofort nach dem Auftauen in 10ml Präp-Medium aufgenommen, abzentrifugiert und in Zellkulturmedium resuspendiert.

2.3.4. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden $20\mu\text{l}$ der jeweiligen Zellsuspension mit Trypanblau 1:1 verdünnt und in eine Neubauer-Zählkammer transferiert. Die lebenden Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl in den Auszählungsquadranten wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Gesamtzellzahl pro ml zu bestimmen.

2.3.5. Generierung von dendritischen Zellen (DZ) aus Mäuseknochenmark

Der durch zervikale Dislokation getöteten Maus wurde das Fell von den hinteren Extremitäten entfernt (es wurden ausschließlich die hinteren Extremitäten verwandt). Sodann wurden die Beine durch kräftige Zug- und Drehbewegungen, aber ohne Zerbrechen der Knochen aus dem Hüftgelenk herausgetrennt. Ober- und Unterschenkel wurden durch Drehen in entgegengesetzter Richtung bzw. mit Hilfe einer Schere im Kniegelenk voneinander getrennt. Die Knochen wurden mit den Fingern durch Abstreifen entlang des Knochens vollständig von Sehnen und

Muskelfleisch befreit. Am Unterschenkel wurde der Fuß durch Drehen entfernt. Die gesäuberten und intakten Ober- und Unterschenkelknochen wurden nun kurz für wenige Sekunden in Isopropanol desinfiziert, mit Präp-Medium abgespült und bis zur Weiterverarbeitung in Präp-Medium aufbewahrt.

Nach der oben beschriebenen Aufbereitung aller benötigten Knochen wurden die beiden Enden eines Röhrenknochen mit einer scharfen Schere aufgetrennt und das Knochenmark mit Hilfe einer Spritze, einer dünnen Kanüle und Präp-Medium aus den Knochen herausgespült. Das Knochenmark wurde im Weiteren mit Hilfe eines Zellsiebs in Präp-Medium suspendiert und die Zellen bei 1400 U/min für 10 min zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Resuspendierung der Zellen in 5 ml Erythrose-Lösung zur Erythrozytenlyse bei Raumtemperatur für 1 bis 2 min. Anschließend wurden 20 ml Präp-Medium zum Abstoppen der Lyse zugefügt und die Zellen abermals wie zuvor zentrifugiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit je 10ml Präp-Medium und Zählung der Zellen wurden diese dann in soviel DZ-Medium aufgenommen, daß eine Zellzahl von $2,6 \times 10^6$ Zellen/ml vorlag. Je 10 ml dieser Knochenmarkszellsuspension wurden in eine Zellkulturschale mit einem Durchmesser von 10 cm gegeben und die Zellen für 48 h bei den üblichen Zellkulturbedingungen inkubiert. Dann wurden weitere 10 ml des DZ-Mediums zugegeben. Alle weiteren 48h wurden vorsichtig 10ml des Kulturmediums erneuert. Dieses Prozedere wurde bis zur Verwendung der DZ beibehalten. Als DZ wurden alle in Suspension befindlichen Zellen dieser Kultur durch Abpipettieren geerntet. Die DZ wurden üblicherweise 6 Tage nach der Isolation des Knochenmarks für Transfektionsexperimente verwendet, für alle sonstigen Stimulationsexperimente im Zeitraum von 8 bis 10 Tagen nach der Knochenmarksisolation (sofern nicht andere Angaben in der Beschreibung der Experimente gemacht sind).

2.3.6. Maturierung von DZ

Sofern im Rahmen von Experimenten dieser Arbeit DZ zusätzlich ausgereift wurden, erfolgte dies, indem die Zellen geerntet, in 6-Loch-Platten transferiert (max. 5×10^6 Zellen/Loch) und für 48h entweder mit 500 U/ml humanem rekombinantem TNF- α oder 1 μ g/ml LPS behandelt wurden. Anschließend wurden die Zellen vor ihrer weiteren experimentellen Verwendung zweimal mit Präp-Medium gewaschen.

2.3.7. Gewinnung von Lymphozyten

Sowohl T- als auch B-Lymphozyten wurden aus Milzen von Mäusen gewonnen. Hierzu wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet, die Milz nach dem

Auftrennen des Fells und der Bauchdecke entnommen und durch Verreiben des Organs auf einem Zellsieb eine Einzelzellsuspension in Präp-Medium erstellt. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 1400 U/min zentrifugiert, für eine Erythrozytenlyse in 5 bis 10 ml Erylyse-Lösung (je nach Milzzahl und Zellmenge) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 20ml Präp-Medium zugefügt und die Zellen wie zuvor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgte die Resuspendierung der Milzzellen in Präp-Medium und ihre Aufbewahrung auf Eis bis zur weiteren Verwendung.

2.3.7.1. Isolation von T-Lymphozyten aus Mausmilzen

Die Isolation von T-Lymphozyten erfolgte aus Milzzellsuspensionen mittels magnetischer Zellseparierung (Magnetic Cell Separation, MACS). Dazu wurden die Milzzellen mit anti-CD90, anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörper konjugierten magnetischen Micro Beads (Firma Miltenyi) nach den Angaben des Herstellers für 20 min bei 4°C inkubiert, anschließend die überschüssigen Beads durch Waschen mit Präp-Medium entfernt, nach Zentrifugation die Zellen in Präp-Medium resuspendiert und auf eine in einem Magneten befindliche MACS-LS-Säule (MACS Separation Unit, Miltenyi) gegeben. Nach Durchlauf und Auswaschen der nichtgebundenen Milzzellen wurde die Säule aus dem Magneten entfernt und die an die magnetischen Partikel gebundenen T-Zellen mit Präp-Medium eluiert. So wurden T-Zellen routinemäßig mit einem Reinheitsgrad $\geq 95\%$ erhalten (dieser wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft).

Die eluierten Zellen wurden dann mit MLR-Medium gewaschen, gezählt, auf die gewünschte Zellzahl/ml mit MLR-Medium eingestellt und bis zur Verwendung auf Eis aufbewahrt.

2.3.7.2. Isolation von B-Lymphozyten aus Mausmilzen

B-Lymphozyten wurden aus Milzzellsuspensionen gewonnen. Zunächst wurden zur Entfernung der T-Lymphozyten aus den Milzzellen diese nach den Angaben des Herstellers (Miltenyi) mit CD90-Micro Beads beladen, die überschüssigen Beads durch Waschen mit Präp-Medium entfernt und die Zellen auf eine MACS-LS-Säule (Miltenyi) gegeben. Die CD90⁺-Zellen verblieben in der Säule und das Eluat wurde zwecks Plastikadhäsion für 2h in eine Zellkulturschale (10cm Durchmesser) gegeben (5x10⁷ Milzzellen des Eluats in 5ml Präp-Medium pro Zellkulturschale). Anschließend wurden die nicht adhärenen Zellen durch vorsichtiges Schwenken gelöst und diese

mit dem Überstand abgenommen. In diesem befanden sich nun CD19⁺ B-Zellen mit einem Reinheitsgrad $\geq 80\%$ (dieser wurde mittels Durchflußzytometrie überprüft).

2.3.7.2.1. Aktivierung naiver B-Lymphozyten

Naive B-Zellen können durch Interaktion von CD154 (CD40-Ligand) mit CD40 auf naiven B-Zellen aktiviert werden. In dieser Arbeit wurden die aus Milzzellsuspensionen gewonnenen naiven B-Zellen durch Inkubation mit CD154 exprimierenden murinen NIH-3T3-Transfektanten aktiviert. Hierzu wurden die adhären wachsenden NIH-3T3-Zellen mit Trypsin/EDTA aus ihrer Zellkulturflasche abgelöst, mehrmals mit Präp-Medium gewaschen und anschließend in MLR-Medium resuspendiert. Nach Bestrahlung der Zellen mit 100Gy wurden die Zellen abermals gewaschen und mit MLR-Medium auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Je 4×10^4 bestrahlte NIH-3T3-Transfektanten wurden in einem Volumen von 2ml MLR-Medium in je ein Loch einer 6-Loch-Platte gegeben und zur Adhärerung ÜN im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden nun je Loch 3×10^6 frisch isolierte B-Zellen zugegeben und diese für 48h zusammen mit den NIH-3T3-CD154-Transfektanten inkubiert. Anschließend wurden die B-Zellen durch leichtes Schwenken und Spülen vorsichtig geerntet (ohne die adhären Transfektanten abzulösen) und in funktionellen Tests eingesetzt.

2.3.8. Transfektionsexperimente mit IVT-mRNA

Die in dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen erfolgten i.d.R. durch Elektroporation. In einem Falle (siehe D1.4.4) wurden DZ auch mit einem kationischen Lipid transfiziert (TransFectinTM, Firma BioRad). Hierzu wurden die DZ an Tag 6 der DZ-Kultur geerntet, mehrmals mit PBS gewaschen und gemäß den Herstellerangaben mit mRNA transfiziert. Dabei wurde die RNA zunächst mit dem Transfektionsreagenz für 20 min präkomplexiert, anschließend der RNA-Lipid-Komplex zu den DZ gegeben und diese damit ÜN inkubiert. 24h nach der Zugabe des Lipidkomplexes erfolgte die Messung der Expression der entsprechenden RNA per Durchflußzytometrie.

Elektroporationen wurden in dieser Arbeit mit A20-Zellen, K562-Zellen und DZ durchgeführt. A20-Zellen wurden mit einem Expressionsplasmid, das für das cFLIP_L-Gen kodiert (siehe Tab. C5), unter G418-Selektion stabil transfiziert. Die Elektroporation erfolgte im Elektroporator der Firma Fischer bei einer Spannung von 450V und einer Reaktionszeit von 2ms. K562-Zellen und DZ wurden im Elektroporator der Firma BioRad mit mRNA-Molekülen elektroporiert. Dabei galten

folgende Elektroporationsbedingungen: Für K562-Zellen wurde eine Spannung von 250V und eine Kondensatorkapazität von 300 μ F angelegt, für DZ wurden 300V und 150 μ F angewandt. DZ wurden i.d.R. an Tag 6 der DZ-Kultur elektroporiert, gegebenenfalls andere Angaben wurden in den jeweiligen Experimenten beschrieben. Für alle Elektroporationsexperimente wurden die Zellen geerntet, 2 mal mit X-Vivo20-Medium gewaschen und mit diesem Medium auf eine Zellzahl von 1×10^7 Zellen/ml eingestellt. Davon wurden 250 μ l (entsprechend $2,5 \times 10^6$ Zellen) in eine auf Eis vorgekühlte Elektroporationsküvette gegeben, 20 μ g frisch aufgetaute RNA zupipettiert (im Falle der Plasmid-DNA bei den A20-Zellen wurden 10 μ g linearisierte DNA verwendet), mit der Pipette gut gemischt und die Elektroporation unter den zuvor angegebenen Bedingungen durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen aus den Elektroporationsküvetten in 6-Loch-Platten mit 5ml des Zellkultur- bzw. DZ-Mediums überführt und in diesen Platten für 24h weiterkultiviert oder aber direkt in immunologisch funktionellen Analysen eingesetzt. Die Messung der Expression der transfizierten RNA erfolgte i.d.R. 24h nach Elektroporation per Durchflußzytometrie.

2.3.9. Immunphänotypisierung von Zellen mittels Durchflußzytometrie

- PBA: 1%BSA in PBS, 0,1% Na-Azid pH7,2
- Fixierlösung: 3,7%(v/v) Formaldehyd in PBS

Zur Charakterisierung von DZ und Lymphozyten wurden Differenzierungsmarker mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. Darüber hinaus erfolgte die Expressionskontrolle von transfizierten Nukleinsäuren per Durchflußzytometrie ebenfalls mit monoklonalen Antikörpern (siehe Tab. C2). Im Falle von EGFP wurde die Autofluoreszenz des Proteins im FACS-Gerät gemessen.

Je 10^4 - 5×10^5 Zellen wurden in FACS-Röhrchen gegeben und die Zellen bei 1200U/min für 5 min bei 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5810R, Eppendorf). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in PBA resuspendiert, und unspezifische Bindungsstellen (Fc-Rezeptoren) ggf. durch Inkubation der Zellen mit anti-CD16/CD32-Antikörper (Mouse BD Fc BlockTM, Becton Dickinson) für 5 min bei 4°C blockiert. Danach wurde der biotinylierte Antikörper bzw. der direktmarkierte Antikörper zugegeben, durch Vortexen gemischt und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluß wurde nicht gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 500 μ l PBS entfernt. Bei einer indirekten Färbung der biotinylierten Antikörper wurden dann 2 bis 3 μ l SA-PE bzw. SA-FITC zugegeben und nach gründlichem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Zum Schluß wurden die Zellen einmal mit PBA und einmal mit PBS gewaschen und entweder direkt im FACS analysiert

oder mit 100µl Fixierlösung (1:2 in PBS verdünnt) versetzt. Die fixierten Zellen können bis zur Analyse 4 Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

Die Messung der Zellen erfolgte am Durchflußzytometer FACS Calibur, die Analyse der Messung erfolgte mit der Software WinMDI 2.8. Dabei wurde die zu untersuchende Zellpopulation aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Granularität eingegrenzt und der prozentuale Anteil der positiven Zellen bestimmt. Die Fluoreszenzwerte der Negativkontrollen wurden dabei so eingestellt, daß der Anteil positiver Zellen höchstens 2% betrug.

2.3.10. Immunologisch funktionelle Analysen

2.3.10.1. Proliferationstest (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR)

Die spezifische Proliferation von Lymphozyten in Gegenwart von Stimulatoren wurde durch die Inkorporation von Tritium-markiertem Thymidin in die DNA bestimmt. Dazu wurden jeweils 10^5 T-Zellen in einer Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte mit Stimulator-Zellen (DZ: 10^4 bis $2,5 \times 10^4$ DZ/Loch; K562: 5×10^4 /Loch, A20: 10^5) in insgesamt 200µl MLR-Medium für 4 bis 7 Tage kultiviert. Waren DZ die Stimulatoren, so wurden diese zuvor mit 30Gy bestrahlt, um deren Grundproliferation zu minimieren. A20-Zellen und K562-Zellen, die bei Proliferationstests eingesetzt wurden, wurden nicht bestrahlt, sondern mit Mitomycin C nach den Angaben des Herstellers behandelt, um die Proliferation dieser Zellen zu minimieren.

Für Proliferationstests, in denen die Wirkung von hCD178-X-Fusionsproteinen getestet wurde, wurden die DZ in 100µl MLR-Medium zunächst in der 96-Loch-Platte vorgelegt, die benötigte Menge der Fusionsproteine (i.d.R. 250ng/ml) zupipettiert und diese dann für 1 bis 2 Stunden bei 4°C im Kühlschrank vorinkubiert. Nach dieser Proteinbeladung wurden dann die T-Zellen ebenfalls in 100µl MLR-Medium zugegeben und die Platte in den Zellinkubator gegeben. Bei der Verwendung mit mRNA transfizierter DZ wurden die DZ zunächst wie oben beschrieben bestrahlt, dann mit der mRNA transfiziert und anschließend direkt in der MLR eingesetzt.

Zu den jeweiligen Zeitpunkten, an denen die Proliferation ermittelt werden sollte (meist nach 96h), wurden 30µl Medium mit 5µCi/ml ^3H -Thymidin pro Vertiefung zugesetzt und für weitere 16 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit integrieren die proliferierenden Zellen das ^3H -Thymidin irreversibel in ihre DNA ein. Die Zellen wurden anschließend durch einmaliges Einfrieren bei -70°C und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Die freigesetzte DNA wurde mit Hilfe eines Erntegerätes auf eine Filterplatte transferiert und das nicht gebundene ^3H -Thymidin weggewaschen (10 mal). Die Trocknung der Filter erfolgte am Ende des Erntens mittels Mikrowellen.

Nach dem Trocknen wurde der Filter in einer speziellen Folie versiegelt, an einer Stelle wieder geöffnet, 10ml Szintillatorflüssigkeit zugegeben und die Öffnung wieder versiegelt. Die Filterplatte wurde dann in einem Szintillationszähler vermessen. Dabei wird die Energie der radioaktiven β -Strahlung durch die Szintillationsflüssigkeit absorbiert und im Szintillationszähler in sichtbare Strahlung (Lichtblitze) umgewandelt, die photoelektrisch als „counts per minute“ (CPM) registriert wird.

Es wurden folgende Kontrollen standardmäßig mitgeführt: alle Ansätze wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt und die zu untersuchenden Zellen als auch die Stimulatoren wurden nur mit Medium getestet, um deren Grundproliferation zu bestimmen. Abschließend wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Triplikate bestimmt. Ein Ergebnis wurde dann als positiv bewertet, wenn die experimentellen Werte plus Standardabweichung die Werte der Kontrolle deutlich überschritten (keine Überschneidung der Standardabweichung).

2.3.10.2. ELISpot-Assay

Wenn $CD8^+$ T-Lymphozyten stimuliert werden, sezernieren sie u.a. $IFN-\gamma$. Diese Eigenschaft macht man sich im $IFN-\gamma$ -„Enzyme Linked Immuno Spot Assay“ (ELISpot-Assay) zunutze, um die Spezifität von $CD8^+$ T-Zellen zu bestimmen. Das Prinzip des ELISpot-Assays entspricht dem eines Sandwich-ELISA's. Auf einem mit anti- $IFN-\gamma$ -Antikörper beschichteten Nitrozellulose-Filter werden T-Zellen mit entsprechenden Stimulatoren kultiviert. Bei spezifischer Stimulation setzen die $CD8^+$ T-Zellen $IFN-\gamma$ frei, das an den anti- $IFN-\gamma$ -Antikörper auf dem Filter bindet. Die Zellen werden durch Waschen entfernt und der Filter mit einem zweiten, biotinylierten anti- $IFN-\gamma$ -Antikörper inkubiert. Das Biotin wird nach Zugabe von Streptavidin von diesem gebunden, an das eine Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die Detektion erfolgt über die Alkalische Phosphatase, die ein wasserlösliches, gelbes Farbreagenz (BCIP/NTB) zu einem wasserunlöslichen, blauen Reagenz umsetzt, so daß am Ende ein blauer „Spot“ an der Stelle entsteht, wo sich anfangs eine spezifische Zelle befunden hat. Anhand der Spots und der ausgesäten Zellzahl kann man auf die Frequenz der spezifischen T-Zellen zurückschließen.

Eine Nitrozellulose HA-Platte wurde über Nacht bei $4^\circ C$ mit dem monoklonalen Antikörper anti-Maus- $IFN-\gamma$ (Klon AN18, $10\mu g/ml$ in PBS; $60\mu l/Vertiefung$) beschichtet. Am nächsten Tag wurden die $CD8^+$ T-Zellen (10^4 - $10^5/Vertiefung$) zusammen mit den Stimulatoren (10^4 - $10^5/Vertiefung$) in eine 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät und für 4 Stunden inkubiert. In dieser Zeit wurde die Nitrozellulose-Platte 3 mal mit $150\mu l/Vertiefung$ PBS gewaschen und mindestens 1 Stunde bei $37^\circ C$ mit RPMI/1%FCS geblockt. Nach Entfernen dieses Mediums zur

Minimierung unspezifischer Bindung wurden die Ansätze der Rundbodenplatte auf die Filterplatte übertragen und 20 Stunden (+/- 2) im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Filterplatte 6 mal 2 min mit PBS/Tween 20 (0,05%; v/v) gewaschen und mit dem Antikörper anti-Maus-IFN- γ (Klon R4-6A2, biotinyliert, 2 μ g/ml in PBS/BSA 0,5% v/v) für 2 Stunden bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Filterplatte erneut 6 mal 2 min gewaschen, um überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Es erfolgte eine Zugabe von Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex (50ng/ml in PBS). Nach 2-stündiger Inkubation bei RT wurde die Filterplatte 3 mal 2 min mit PBS/Tween 20 (0,05%; v/v) und 3 mal 2 min mit PBS gewaschen. Es wurden dann 100 μ l BCIP/NBTSubstrat zugesetzt und weitere 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt und die Platte über Nacht bei RT getrocknet. Die Auszählung der Spots erfolgte am ELISpot-Auslese-System der Firma Zeiss (Zeiss-Vision C). Die Ansätze wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Nach Berechnung von Mittelwerten und Standardabweichungen wurde ein Ergebnis dann als spezifisch bezeichnet, wenn sich die Standardabweichungen des Ergebnisses und der entsprechenden Kontrolle nicht überschneiden.

2.3.10.3. *In-vitro*-Deletion alloreaktiver T-Zellen

Bei der *in-vitro*-Deletion mit CD178-X-Fusionsprotein bzw. agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2) wurden $0,75 \times 10^7$ frisch aus der Mausmilz isolierte naive T-Zellen mit $0,75 \times 10^6$ DZ je Loch in einer 6-Loch-Platte in 5ml MLR-Medium stimuliert. Zuvor wurden die DZ zur Minimierung ihrer Eigenproliferation mit 30Gy bestrahlt, anschließend mit Präp-Medium gewaschen, mit MLR-Medium resuspendiert und in einem Volumen von 1ml je Loch in die Kulturplatte pipettiert. Danach wurde zu den DZ mit dem entsprechenden CD178-X-Fusionsprotein (1,25 μ g/5ml) für 1 bis 2 h im Kühlschrank bei 4°C beladen. Anschließend wurden die T-Lymphozyten in einem Volumen von 4ml zugegeben und die Platten für 96 bis 120 h im Brutschrank inkubiert. Im Falle der Deletion mit Jo2-Antikörper wurde dieser ohne Inkubation im Kühlschrank zu den Zellen zugegeben. Am Ende der Inkubationszeit wurden die T-Zellen durch vorsichtiges Spülen mit einer Pipette geerntet und die Zahl lebender T-Zellen durch Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer zur Ermittlung der Zahl residueller T-Zellen bestimmt. Diese $T_{\text{residuell}}$ wurden dann in weiteren immunologisch-funktionellen Tests oder für adoptive T-Zell-Transferexperimente verwendet.

2.4. Tierexperimente

2.4.1. Zucht und Haltung von Experimentaltieren

Zucht und Haltung der für *in-vivo*-Experimente benötigten Mäuse erfolgte in der Zentralen Tierversuchseinrichtung (ZVTE) der Universität Mainz am Augustusplatz, Mainz, und wurde von den Tierpflegern der ZVTE bzw. von der Med. Techn. Assistentin, Frau C. Metz, aus der AG Hartwig durchgeführt.

2.4.2. Adoptive T-Zell-Transferexperimente

Für den adoptiven T-Zell-Transfer wurden residuelle T-Zellen aus den *in-vitro*-Deletionsversuchen zwei mal mit PBS gewaschen und anschließend eine Zellzahl von $1,25 \times 10^7$ Zellen/ml mit PBS/FCS (0,5%, v/v) eingestellt. Hiervon wurden je 200 μ l (entsprechend $2,5 \times 10^6$ T-Zellen) in die Schwanzvene einer Maus nach Aufwärmen des Tieres mit einer Infrarotlampe injiziert. Die Mäuse wurden zwei bis drei Stunden vor der T-Zell-Injektion subletal mit 6,5Gy bestrahlt. Nachfolgend wurden die Mäuse alle 2 bis 3 Tage gewogen und auf Anzeichen von GvHD durch Evaluation der Parameter wie starker Gewichtsverlust, Diarrhö, raues Fell, verminderte Vitalität und deutlich bucklige Schutzhaltung untersucht. Darüber hinaus wurde die Zeit von der Injektion der T-Zellen bis zum Eintritt des Todes für jedes Versuchstier protokolliert.

2.4.3. Organpräparationen

Für Chimärismusanalysen wurde einem Teil der Mäuse aus den adoptiven T-Zell-Transferexperimenten verschiedene Organe entnommen. Zur Blutentnahme wurden die Mäuse zunächst mit einer Infrarotlampe erwärmt, um über die Schwanzvene mittels Perforation mit einem Skalpell Blut in ein Hämatokritröhrchen zu aspirieren. Das Blut wurde sogleich aus der Hämatokritkapillare in ein FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Lysing-Solution nach den Angaben des Herstellers (Becton Dickinson) eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Anschließend wurden die Blutzellen mehrfach mit PBS/BSA (1%, v/v) gewaschen und zur Charakterisierung der T-Zellen einer FACS-Färbung mit entsprechenden Antikörpern unterzogen (siehe Abschnitt C2.3.9).

Für die Entnahme von Milz und Lymphknoten wurden die Mäuse zunächst durch zervikale Dislokation getötet, die inguinalen, axilären und submandibulären Lymphknoten nach Eröffnen des Fells entnommen und dann die Bauchdecke eröffnet, um die Milz zu entnehmen. Durch Verreiben der Organe auf einem Zellsieb wurden Einzelzellsuspension in PBS/BSA (1%, v/v) erstellt. Anschließend wurde wie

unter C3.2.7 beschrieben eine Erythrozytenlyse durchgeführt und die Zellen zur Charakterisierung der T-Zellen einer FACS-Färbung (siehe C2.3.9) zugeführt.

D Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden modifizierte murine DZ als professionelle Antigen-präsentierende Zellen zur Stimulation alloreaktiver Spender T-Lymphozyten verwendet. Die Modifikation der DZ hatte zum Ziel, alloreaktive T-Zellen nach deren Aktivierung über den Aktivierungs-induzierten Zelltod (AICD) in Apoptose zu bringen. Für die Induktion des Zelltodes diente der in der Einleitung beschriebene Fas- (CD95) / Fas-Ligand- (CD95L, CD178) Signaltransduktionsweg. Hierfür fanden die in der Zielsetzung beschriebenen Strategien Anwendung: i) die Expression von CD178 durch murine DZ nach Transfektion von CD178-mRNA, ii) die Bindung von CD178-Fusionsproteinen an entsprechende auf Antigen-präsentierenden Zellen oder T-Zellen exprimierte kostimulatorische Moleküle (z.B. CD28, CD152, CD80/86) sowie iii) die Induktion des AICD durch Bindung eines agonistischen anti-CD95-Antikörpers an CD95 auf den aktivierten T-Lymphozyten. Nachfolgend sind die Ergebnisse der experimentellen Umsetzung dieser drei Strategien zur Deletion GvH-reaktiver Spender-T-Lymphozyten beschrieben.

1. Deletion alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten durch CD178-mRNA-transfizierte murine dendritische Zellen

Nach repetitiver Stimulation mit Antigen exprimieren T-Zellen verstärkt CD95 und werden suszeptibel für CD95 induzierte Apoptose (Dhein et al., 1995; Klas et al., 1993). Einer der Ansätze zur Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten bestand darin, die DZ so zu modifizieren, daß diese als professionelle APZ sowohl T-Zellen stimulieren als auch über CD178 mit CD95 auf den T-Zellen interagieren.

Native DZ exprimieren kein CD178, können jedoch durch adenovirale Transduktion mit CD178-kodierender DNA zur Expression von CD178 gebracht werden (Hoves et al., 2003). In verschiedenen Anwendungen von viralen Vektorsystemen wurde aber gezeigt, daß insbesondere Adenovirus eine Immunogenität im Empfängerorganismus induziert und daher für *in-vivo*-Anwendungen ungeeignet ist.

Aus diesem Grund sowie mit Hinblick auf eine mögliche Translation der in dieser Arbeit gelegten Grundlagen zur Deletion von Alloreaktivität für eine spätere klinische Anwendung wurde die Transfektion von DZ mit CD178-mRNA untersucht, da dies keine gentechnische Veränderung von Zellen des Empfängers (Patienten) und damit

auch keinen gentherapeutischen Ansatz darstellt. So sollte in diesen terminal differenzierten und nicht mehr proliferierenden Zellen eine Expression von exogen eingebrachten Nukleinsäuren erreicht werden. Die Einbringung von mRNA in eine Zelle führt wegen der geringen Halbwertszeiten von mRNAs zu keiner konstitutiven Expression, und RNA-Sequenzen werden nicht in das Genom der Zelle integriert.

Wie in anderen Arbeiten bereits gezeigt, lassen sich DZ mittels Elektroporation, d.h. durch Anlegen einer elektrischen Spannung unter definierten Bedingungen, effizient mit RNA transfizieren und damit Zielmoleküle zur Expression bringen (Van Meirvenne et al., 2002). Wie im Folgenden dargestellt, wurden daher verschiedene RNA-Konstrukte generiert und nach Transfektion mittels Elektroporation die Expression der Zielmoleküle in murinen DZ analysiert.

1.1. Konstruktion von *in-vitro*-Transkriptionsvektoren zur Herstellung von messenger-RNA für CD178 und CD178-X-Fusionsproteine

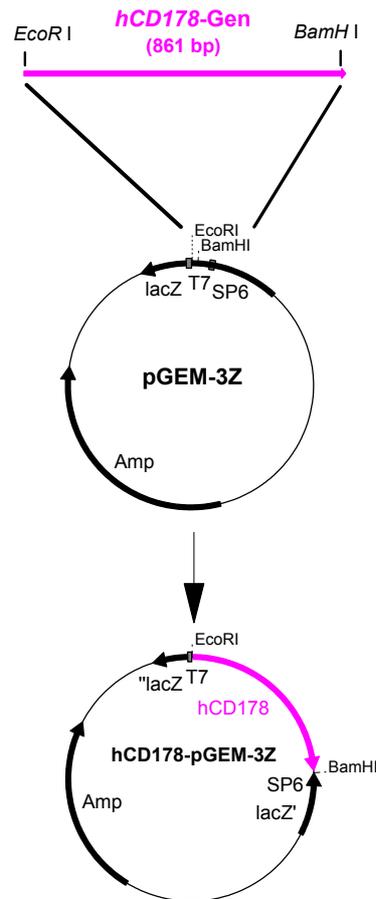
Im Rahmen dieser Arbeit wurden mRNAs für die Expression des humanen Fas-Liganden (hCD178), von einer zytoplasmatisch deletierten Form des humanem Fas-Liganden (hCD178 Δ zyt), verschiedener hCD178-X-Fusionsproteine sowie von Grün Fluoreszierendem Protein (GFP) zur Modifikation muriner DZ verwendet.

Für die *in-vitro*-Synthese von RNA wird eine DNA-Sequenz benötigt, die einen Promotor besitzt, welcher meistens bereits in kommerziell erhältlichen Vektoren zur Verfügung steht. In dieser Arbeit wurde der *in-vitro*-Transkriptionsvektor pGEM-3Z benutzt, der über einen SP6- bzw. einen T7-Promotor verfügt (Yanisch-Perron, 1985).

Die DNA-Sequenzen für das humane CD178-Gen, für die hCD178-X-Fusionsproteine, für hCD178 Δ zyt sowie die CD178-X-Fusionsproteine wurden von Herrn Prof. Dr. H. Wajant (Institut für Molekulare Medizin der Universität Würzburg) im Rahmen einer Kooperation zur Verfügung gestellt. Das verwendete GFP-Gen entspricht dem EGFP (enhanced GFP), einer durch eine Punktmutationen gegenüber dem Wildtyp-GFP stärker fluoreszierenden GFP-Variante. Das EGFP-Gen wurde aus dem Plasmid pEGFP-N1 isoliert.

Abbildung D1 zeigt schematisch die Konstruktion der entsprechenden *in-vitro*-Transkriptionsvektoren am Beispiel des hCD178-Gens.

Abb. D1: Schematische Darstellung der Konstruktion der *in-vitro*-Transkriptionsvektoren. Die zur Synthese entsprechender mRNAs benötigten DNA-Sequenzen wurden aus Vektorstrukturen durch Restriktionsverdau, z.B. über *EcoRI* am 5'-Ende und *BamHI* am 3'-Ende des *hCD178*-Gens, herausgeschnitten. Die Insertion in den Vektor erfolgte gerichtet über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in der multiplen Klonierungskassette (multiple cloning site, mcs) von pGEM-3Z. Dabei wurde bei allen hergestellten Konstrukten die jeweilige DNA-Sequenz mit dem 5'-Ende im Leseraster mit dem T7-Promotor integriert, so daß bei der Synthese der RNA die RNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 verwendet werden konnte. Da der Transkriptionsvektor das *lacZ*-Gen des Laktoseoperons aus *E. coli* besitzt, welches durch Insertion einer DNA-Sequenz in die mcs inaktiviert wird, konnte unter Zugabe von IPTG und X-Gal zu den Agarplatten eine Blau-weiß-Selektionierung auf die gewünschten Klone mit integrierter DNA durchgeführt werden.



1.2. Synthese von mRNA durch *in-vitro*-Transkription (IVT)

Die klonierten *in-vitro*-Transkriptionskonstrukte wurden zur Generierung von *in vitro* transkribierter mRNA genutzt. Vor der eigentlichen IVT mußten die Plasmidkonstrukte jedoch zunächst durch enzymatischen Restriktionsverdau nach dem 3'-Ende der zu transkribierenden DNA-Sequenz hydrolysiert werden (Plasmidlinearisierung), um eine Transkription von Plasmidbestandteilen über die interessierende DNA-Sequenz hinaus zu verhindern. Dabei war darauf zu achten, daß Restriktionsenzyme verwendet wurden, die keine überhängenden 3'-Enden produzieren, da diese ebenfalls als Startpunkt für die RNA-Synthese dienen können (Schenborn und Mierendorf, 1985). Nach der enzymatischen Linearisierung des Ausgangsplasmids mit einem 5'-Überhänge produzierenden Restriktionsenzym konnte dieses Konstrukt nach Aufreinigung durch Phenolextraktion direkt als Matrize für die mRNA-Synthese in der IVT eingesetzt werden. Die eigentliche IVT erfolgte durch Verwendung eines kommerziell erhältlichen IVT-Systems. Für die mRNA-Synthese wurde die T7-RNA-Polymerase eingesetzt. Dieses IVT-System sorgte neben der eigentlichen RNA-Synthese auch für die enzymatische Anfügung einer für

eukaryontische mRNA typischen Cap-Struktur am 5'-Ende der RNA. Diese Cap-Struktur besteht aus einem 7-Methylguanosinrest, der über eine 5'-5'-Triphosphatbrücke mit dem 5'-Anfangsnukleosid verknüpft ist. Diese Verknüpfung erfolgt über eine spezielle Guanylyl-Transferase.

Eukaryonten-mRNA besitzt an ihrem 3'-Ende ebenfalls *in natura* fast immer eine definierte Struktur. Diese besteht aus einer sog. Polyadenylierung von etwa 100 bis 200 Adenosinresten und dient der Erhöhung der Halbwertszeit der mRNA in der Zelle. Daher wurde direkt im Anschluß an die eigentliche Synthese der RNA eine solche Polyadenylierung durch Einsatz von Poly-A-Polymerase durchgeführt. Die sich anschließende Aufreinigung der generierten mRNA erfolgte mittels spezieller für die RNA-Aufreinigung geeigneter Glasmilch-Säulen.

Der Ablauf der IVT, wie sie in dieser Arbeit angewendet wurde, ist in Abbildung D2 schematisch für die Synthese von hCD178-mRNA dargestellt.

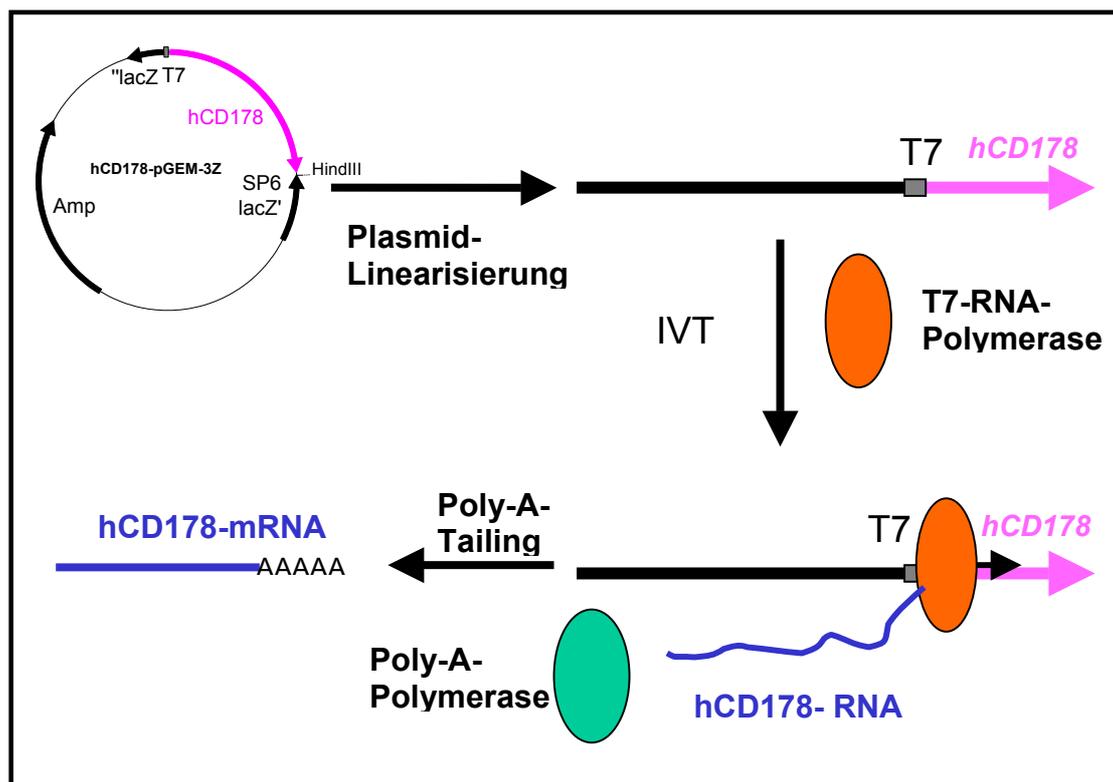


Abb. D2: Schematische Darstellung der mRNA-Synthese. Zunächst erfolgte eine Linearisierung des IVT-Vektors mit dem 5'-Überhänge erzeugenden Restriktionsenzym *HindIII*. Nach der Aufreinigung des Konstruktes durch Phenolextraktion wurde mit Hilfe eines IVT-Systems zunächst mittels T7-RNA-Polymerase die Synthese von hCD178-mRNA unter Bildung einer 5'-Cap-Struktur (7-Methylguanosinrest; nicht gezeigt) durchgeführt. Direkt im Anschluß erfolgte eine Polyadenylierung zur Erhöhung der Halbwertszeit der mRNA *in vivo*.

1.2.1. Überprüfung der erfolgreichen RNA-Synthese und der Polyadenylierung der *in vitro* generierten mRNA

Zur Validierung der IVT von RNA sowie der sich daran anschließenden Polyadenylierung wurde jeweils ein Aliquot der Reaktion unmittelbar vor und nach der Polyadenylierung aus dem Reaktionsansatz entnommen und mittels Gelelektrophorese in einem denaturierenden Agarosegel auf Qualität und richtige Nukleotidlänge überprüft. Dies ist am Beispiel von hCD178-mRNA sowie von GFP-mRNA in Abbildung D3 dargestellt. Die nichtadenylierte hCD178-mRNA sollte aufgrund der Gensequenz von hCD178 eine Länge von 846 bp, die GFP-mRNA eine Länge von 720 bp aufweisen.

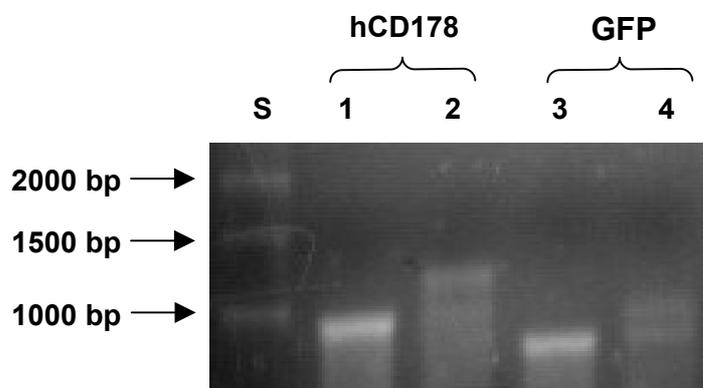


Abb. D3: Gelbild einer denaturierenden Agarosegelelektrophorese. Bei der IVT wurden zwecks Qualitätskontrolle der synthetisierten mRNA jeweils vor und nach der Polyadenylierung Aliquots der mRNA entnommen und auf ein denaturierendes Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größenabschätzung der RNA-Längen erfolgte durch Vergleich mit einem RNA-Längenstandard, aufgetragen in Spur (S). In den Gelspuren (1) und (2) ist die hCD178-mRNA vor (1) und nach (2) der Polyadenylierung zu sehen. Die Gelspuren (3) und (4) zeigen das Bild für GFP-RNA, ebenfalls vor (3) und nach (4) der Polyadenylierung.

Für die beiden polyadenylierten RNA-Formen ergab sich eine um etwa 200 bis 300 Nukleotide verlängerte Molekülgröße und damit eine erfolgreiche Polyadenylierung zur Verbesserung der RNA-Halbwertszeiten.

Die Ermittlung der bei der IVT erzielten mRNA-Konzentrationen erfolgte photometrisch durch Absorptionsmessung bei 260nm, die nach Aufreinigung der RNA im Durchschnitt bei 0,5 bis 0,7µg/µl lag. Dies entsprach einer Synthesemenge von 50 bis 70µg mRNA pro Mikrogramm eingesetzter Plasmid-DNA.

1.3. Generierung muriner dendritischer Zellen aus Knochenmark

Wie bereits erwähnt, sollten in dieser Arbeit murine DZ als professionelle APZ zur Stimulation allogener T-Zellen verwendet werden. Die Generierung von DZ aus dem Knochenmark von Mäusen wurde erstmals 1992 beschrieben (Inaba et al., 1992) und in den letzten Jahren von verschiedenen Arbeitsgruppen optimiert. Die Gewinnung der in dieser Arbeit verwendeten DZ erfolgte durch Anwendung einer Methodik mit den aus Mäuseknochenmark gewonnenen Zellen in Anlehnung an eine beschriebene Methode, bei der unter optimalen Bedingungen ca. 1 bis $3 \cdot 10^8$ DZ nach etwa 10 Tagen Zellkultur erhalten werden (Lutz et al., 1999).

Für die Gewinnung von Knochenmark wurde jeweils Femur und Tibia der hinteren Extremitäten verwendet, und das Knochenmark mit Hilfe einer Kanüle und Spritze mit RPMI-Medium aus den Knochen herausgespült. Nach erfolgter Erythrozytenlyse wurde die Zellsuspension in einer Zelldichte von 4×10^5 Zellen pro ml unter Zugabe von 10% GM-CSF enthaltendem Zellkulturüberstand (siehe Material und Methoden) ausgesät und 50% des verwendeten Zellkulturmediums (RPMI1640, 10% FCS) jeden zweiten Tag gegen frisches, GM-CSF-Zellkulturüberstand enthaltendes Medium, ausgetauscht. Die nicht adhärent wachsenden DZ wurden zwischen Tag 6 und 10 den Kulturschalen zur weiteren Verwendung innerhalb der nachfolgend beschriebenen Experimente entnommen. Dabei hing der Entnahmezeitpunkt der Zellen vom jeweils benötigten Ausreifungszustand der Zellen sowie der jeweiligen experimentellen Fragestellung ab. Die Ausbeute an DZ, die im oben erwähnten Zeitraum geerntet werden konnten, lag bei etwa 5×10^7 Zellen, bezogen auf das aus einer Maus gewonnene Knochenmark.

1.3.1. Morphologie der aus Knochenmark generierten DZ

Zur morphologischen Charakterisierung wurden die *in vitro* generierten DZ zunächst lichtmikroskopisch untersucht. Dabei konnten, wie in der in der Literatur beschrieben, ab Tag 4 bzw. 5 nach Kulturbeginn lokale Zellanhäufungen (Zellfoki) beobachtet werden. Darüber hinaus zeigten die Zellen mit zunehmendem Maturierungsgrad die Ausbildung von DZ-typischen Fortsätzen, die zur Erweiterung der Zelloberfläche dienen und ein unverwechselbares morphologisches Erscheinungsbild von DZ darstellen.

Diese morphologischen Charakteristika sind in Abbildung D4 in drei lichtmikroskopischen Aufnahmen dargestellt, welche Zellen an Tag 8 nach Gewinnung des Knochenmarks zeigen.

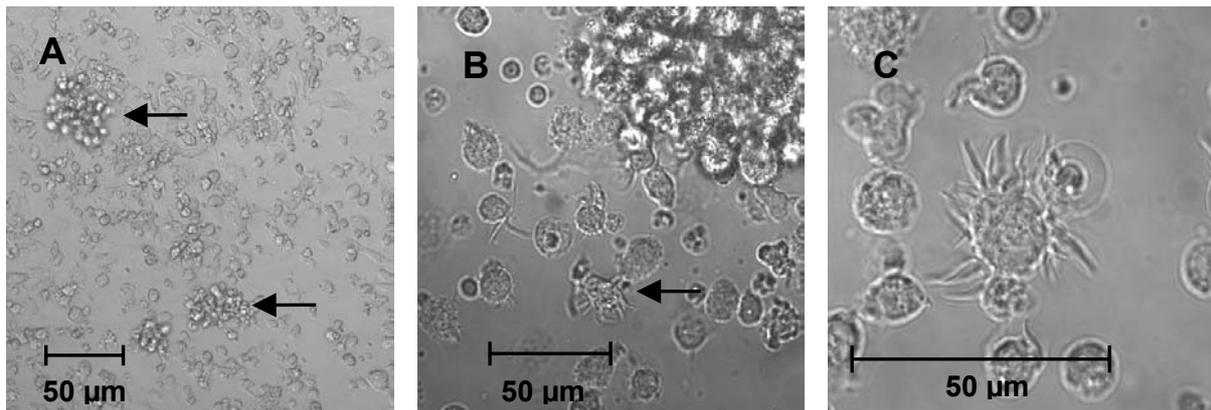
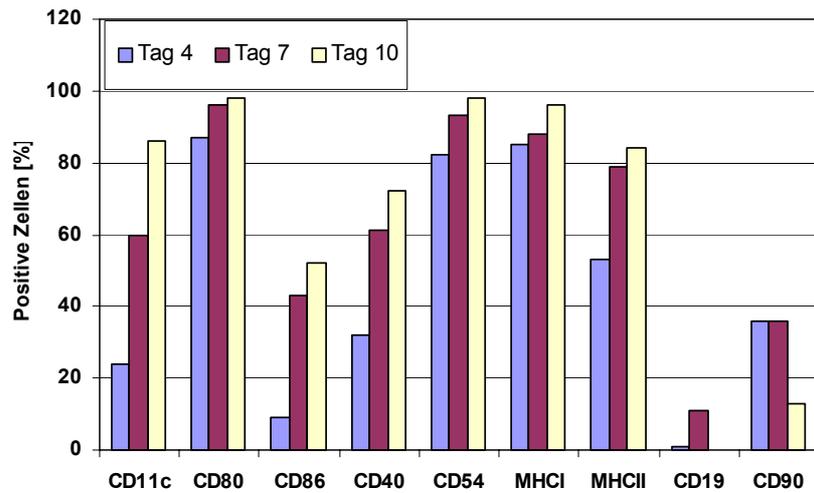


Abb. D4: Lichtmikroskopische Aufnahmen einer DZ-Kultur. An Tag 8 nach Entnahme des Knochenmarks wurden mit einem inversen Lichtmikroskop Aufnahmen von einer DZ-Kultur angefertigt. In Bild [A] sind die für eine DZ-Kultur typischen Zusammenlagerungen der DZ, die etwa ab Tag 4 bis 5 in Erscheinung treten, zu sehen. Eine solche Zellanhäufung zeigt auch Bild [B] neben der bereits gut erkennbaren typischen Morphologie einer einzelnen DZ (Pfeil). Bei noch stärkerer Vergrößerung (Zelle im Zentrum von Bild [C]) werden die für DZ charakteristischen Fortsätze deutlich sichtbar.

1.3.2. Phänotypische Charakterisierung der aus Knochenmark generierten DZ

Neben der morphologischen Beurteilung der DZ wurde weiterhin die Expression verschiedenener Oberflächenmoleküle mittels Durchflußzytometrie analysiert, um die *in vitro* generierten Zellen sowohl eindeutig als DZ zu identifizieren sowie ihren Maturierungs- bzw. Differenzierungszustand besser bestimmen zu können. Von Interesse waren dabei zwei Fragestellungen: i) der zeitliche Verlauf der Expression der immunologisch relevanten Oberflächenmoleküle und ii) die Abhängigkeit der Expression dieser Oberflächenmoleküle von Maturierungszytokinen. Im Rahmen einer Kinetik wurde an den Tagen 4, 7 und 10 die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, des Aktivierungsmarkers CD40, von CD11c und dem Adhäsionsmolekül CD54 sowie der MHC-Klasse-II-Moleküle untersucht. Für den Ausschluß von B- und T-Lymphozyten wurden zusätzlich CD19 und CD90 gemessen. Die Ergebnisse dieser Expressionskinetik sind in Abbildung D5A gezeigt. Ferner erfolgte die durchflußzytometrische Messung dieser Oberflächenmarker für DZ an Tag 10, die mit bzw. ohne das Maturierungszytokin TNF- α generiert wurden. Dies ist in Abbildung D5B dargestellt. TNF- α ist ein für murine DZ beschriebenes Maturierungszytokin. LPS als weiteres Agens zur Maturation von DZ konnte in dieser Arbeit keine Anwendung finden, da es von den DZ als bakterielles Antigen prozessiert und zur Stimulation von T-Zellen führen würde.

A.



B.

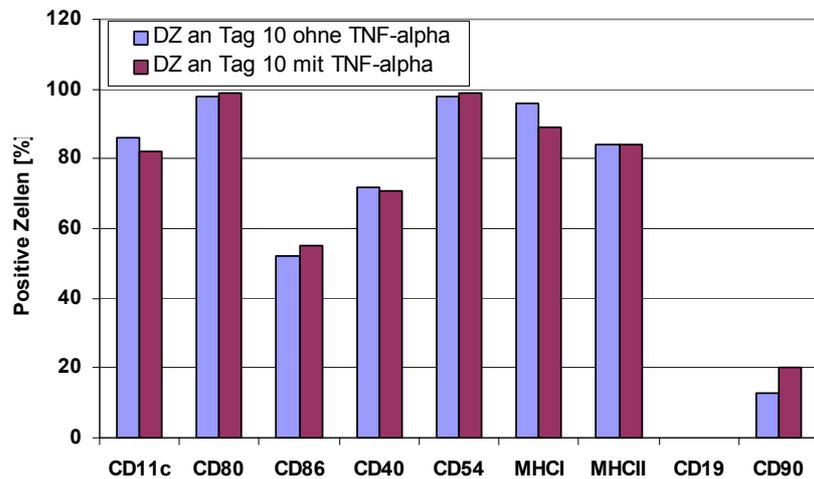


Abb. D5: Phänotypische Charakterisierung muriner DZ. Im Rahmen einer Kinetik wurden an den Tagen 4, 7 und 10 nach der Entnahme des Knochenmarks verschiedene charakteristische Oberflächenmarker hinsichtlich ihrer Expression mittels Durchflußzytometrie untersucht. Die Zellen erhielten kein Ausreifungszytokin (Bild [A]). Der Einfluß des Maturierungszytokins TNF- α zeigt Bild [B]. Die Zellen wurden für 48h vor der Messung mit und ohne TNF- α (500U/ml) inkubiert. Angegeben ist die Prozentzahl positiver Zellen für den jeweiligen Marker zu den jeweiligen Meßzeitpunkten.

Abbildung D5A zeigt, daß mit zunehmender Ausdifferenzierung der DZ die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 sowie von CD11c, ein u.a. für murine DZ typischer und für deren Nachweis häufig verwendeter Marker, bis Tag 10 stark zunahm. Weiterhin wurden CD40 sowie der MHC-Klasse-II-Komplex mit zunehmender Ausreifung maximal exprimiert. Das kostimulatorische Molekül CD80, das Adhäsion CD54 sowie die MHC-Klasse-I-Moleküle befanden sich bereits in sehr frühem Differenzierungsstadium (Tag 4) auf einem hohen Expressionsniveau und behielten dieses über den beobachteten Zeitraum bei. Der T-Zell-spezifische Marker

CD90 nahm bis an Tag 10 um mehr als 50% ab und wurde dann von weniger als 20% der Zellen exprimiert. Das für B-Zellen charakteristische CD19 war an Tag 10 nicht mehr nachweisbar. Es kann daher davon ausgegangen werden, daß an Tag 10 rund 90% der nichtadhärenten Zellen in der DZ-Kultur vollständig ausdifferenzierte murine DZ waren.

Die in den Abbildungen D5A und D5B dargestellten durchflußzytometrischen Analysen zeigen ferner, daß für eine vollständige Ausreifung der DZ kein Maturierungsstimulus benötigt wird. Vergleicht man die Expressionsprofile der dargestellten Marker, so ist zu erkennen, daß die Behandlung der Zellen mit TNF- α zu keiner Verbesserung im Vergleich zu den ohne TNF- α kultivierten DZ hinsichtlich der untersuchten Marker führte.

1.3.3. Die stimulatorische Kapazität der generierten DZ

Für die Untersuchung der stimulatorischen Eigenschaften der DZ wurde im Folgenden das optimale Effektor-Zielzell-Verhältnis (E/T-Verhältnis; Effektor/Target-Verhältnis) experimentell ermittelt. Dies erfolgte sowohl für DZ, die unter dem Einfluß von Maturierungsagenzien als auch ohne diese generiert wurden, um zu testen, ob hier gleich gute stimulatorische Kapazitäten erhalten werden.

Hierzu wurden DZ aus dem Knochenmark von C57Bl/6-Mäusen (H-2^b) in Abwesenheit von Ausreifungszytokinen für 10 Tage kultiviert oder aber vor der Verwendung in einer gemischten Lymphozytenkultur (MLR) für 48 h mit TNF- α oder alternativ mit LPS (das nur in diesem Experiment für einen Vergleich mit TNF- α Anwendung fand) behandelt. Die Durchführung der MLR erfolgte in einer 96-Loch-Platte. T-Zellen aus einer Balb/c-Maus (H-2^d) wurden als Zielzellen mit den unterschiedlich ausgereiften und MHC-disparaten (allogenen) DZ als Effektorzellen in verschiedenen E/T-Verhältnissen von 1:200, 1:100, 1:20 und 1:10 über 96 h stimuliert und dabei für die letzten 16 h mit ³H-markiertem Thymidin inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die in die DNA inkorporierte Radioaktivität mittels Szintillationsmeßgerät ermittelt. Sie ist direkt proportional des ³H-Thymidineinbaus in den T-Zellen und damit ein Maß für deren Proliferation.

Bei diesem Experiment zeigte sich, daß bei allen drei Ansätzen die besten Stimulationsergebnisse bei einem E/T-Verhältnis von 1:10 erzielt wurden. Darüber hinaus besaßen diejenigen DZ, die nicht mit einem Maturierungszytokin behandelt waren, eine wesentlich bessere stimulatorische Kapazität als mit TNF- α oder LPS vorbehandelte DZ. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung D6 dargestellt.

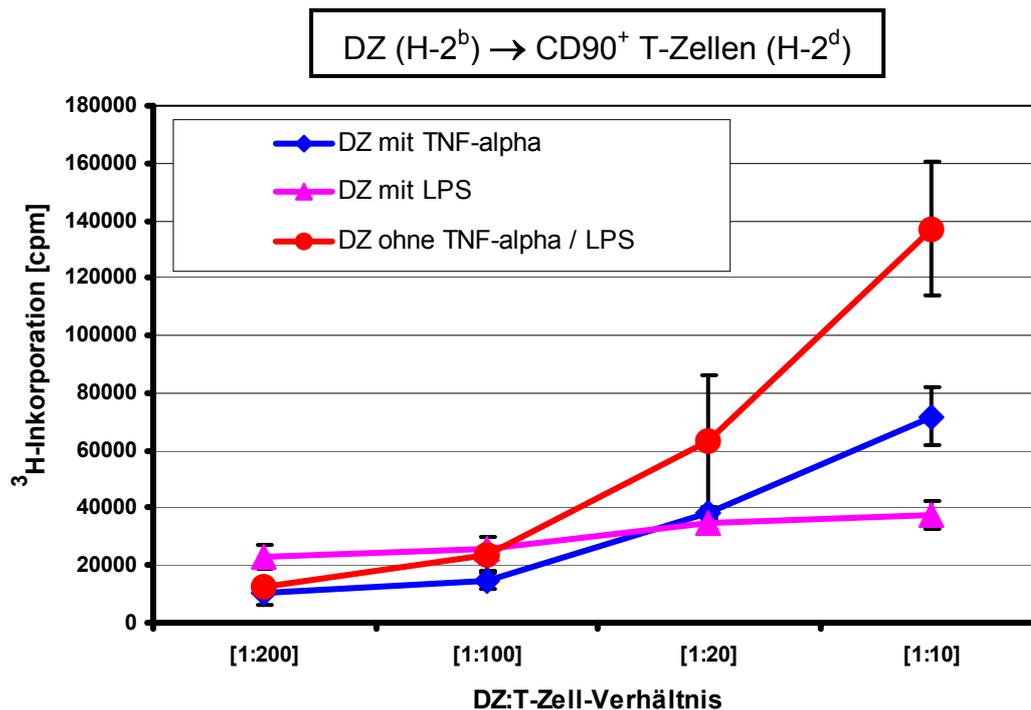


Abb. D6: MLR zur Ermittlung der stimulatorischen Eigenschaften der DZ und des optimalen E/T-Verhältnisses. In einer allogenen MLR wurden DZ (H-2^b) an Tag 10 mit alloreaktiven T-Zellen (H-2^d) in unterschiedlichen E/T-Verhältnissen für 96 h inkubiert. Dabei wurden in einem Ansatz unbehandelte DZ verwendet, in zwei weiteren Ansätzen DZ, die mit TNF- α (500U/ml) bzw. LPS (10 μ g/ml) vorstimuliert waren. Das Proliferationsverhalten der T-Zellen ist angegeben als ³H-Inkorporation in [cpm]. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Aufgrund der in diesem und dem vorangegangenen Abschnitt beschriebenen Ergebnisse wurden DZ für die folgenden Experimente nicht mit Maturierungszytokinen vorbehandelt.

1.4. Modifikation von murinen DZ durch Transfektion mit mRNA

Mit den in Abschnitt D1 beschriebenen Experimenten sollte die selektive Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten durch CD178-mRNA-transfizierte murine DZ untersucht werden. Nachdem die Generierung von DZ etabliert und geeignete Bedingungen für die Stimulation von alloreaktiven T-Lymphozyten *in vitro* bestimmt worden waren, wurde abschließend noch die biologische Funktionalität der *in vitro* transkribierten CD178-mRNA getestet.

1.4.1. Transfektion von K562-Zellen mit CD178-mRNA mittels Elektroporation

Für die Überprüfung der biologischen Funktionalität der generierten mRNA wurden K562-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine humane undifferenzierte Leukämiezelllinie einer chronisch myeloischen Leukämie (Rowley, P.T. et al., 1981). Diese Zelllinie zeigte keinerlei konstitutive CD178-Expression und konnte in Vorversuchen sehr gut und reproduzierbar mittels Elektroporation transfiziert werden.

Als Mock-Kontrolle diente jeweils eine Probe mit Zellen ohne Zugabe von mRNA, die aber ebenfalls dem Elektroporationsprozedere unterzogen wurde. Dies gilt für alle nachfolgend mit dem Präfix „Mock“ bezeichneten Proben und Ansätze.

Die Elektroporationsbedingungen (Spannung, Stromstärke, Zellzahl, Elektroporationsmedium, etc.) sowie die geeignete mRNA-Menge wurden in einer Testreihe ermittelt (siehe Material und Methoden). Mittels Durchflußzytometrie wurde in der Regel 24 h nach Transfektion die Expression der mRNA analysiert. Bei allen durchgeführten Elektroporationen wurden immer Zellen mit EGFP-mRNA als interner Standard für den Nachweis der erfolgreichen Transfektion mitgeführt. Ein repräsentatives Ergebnis der Elektroporation von K562-Zellen mit der synthetisierten CD178- bzw. EGFP-mRNA ist in den Histogrammen der Abbildung D7 gezeigt.

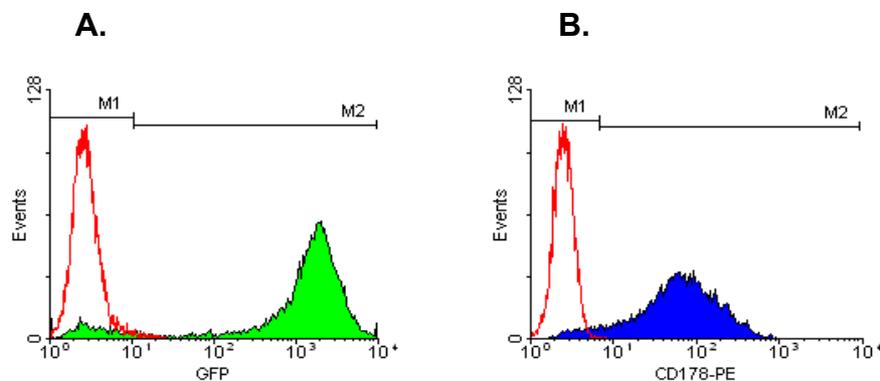


Abb. D7: Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse von EGFP- und CD178-Expression nach Elektroporation. K562-Zellen wurden mit je 20µg EGFP- bzw. CD178-mRNA mittels Elektroporation transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Expression der RNA gemessen. In Bild [A] ist die Autofluoreszenz des EGFP dargestellt. Bild [B] zeigt die Expression von CD178. Diese K562-Transfektanten wurden mit anti-CD178-Biotin-Antikörper und SA-PE gefärbt. Die Histogramme zeigen die jeweilige Fluoreszenz der Transfektanten als Überlagerung mit der Fluoreszenz der jeweiligen Mock-Transfektanten (rote Kurven). Die Marker M1 und M2 markieren die Grenze zwischen fluoreszierenden und nichtfluoreszierenden Zellen.

Wie gezeigt, konnten K562-Zellen sowohl mit EGFP-mRNA als auch mit CD178-mRNA erfolgreich mittels Elektroporation transfiziert werden. Darüber hinaus gelang anhand der durchflußzytometrischen Messung von EGFP-Autofluoreszenz bzw. dem Nachweis von CD178 mittels Fluorophor-markiertem anti-CD178-Antikörper, daß die

transfizierte mRNA in den K562-Zellen translatiert wurde. In den beiden Histogrammen sind deutliche Fluoreszenzverschiebungen gegenüber den Mock-Transfektanten zu erkennen. Für das EGFP konnte eine Fluoreszenzerhöhung um mehr als 3 Dekaden nachgewiesen werden, für CD178 waren es etwa 2 Dekaden.

Die Transfektionseffizienzen, d.h. der durchschnittliche prozentuale Anteil an Zellen, der erfolgreich transfiziert werden konnte, lag für EGFP bei 75% und für CD178 bei über 80%. Die Transfektionseffizienzen von K562 Zellen sind in der Abbildung D8 dargestellt.

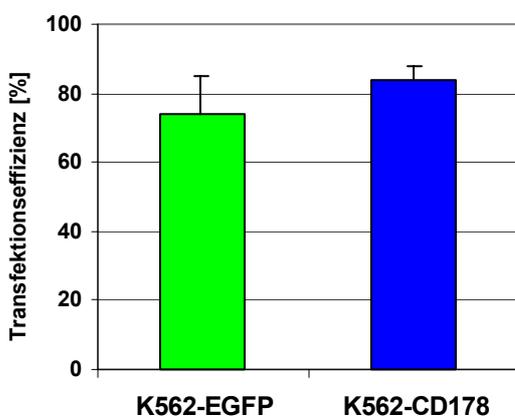


Abb. D8: Transfektionseffizienzen für die Elektroporation von K562-Zellen mit mRNA. Dargestellt ist der Anteil mittels FACS bestimmter positiver Zellen 24 h nach Transfektion mit EGFP- bzw. CD178-mRNA (Transfektionseffizienz). Gezeigt sind die Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung für je fünf voneinander unabhängige Transfektionen und Messungen.

1.4.2. Nachweis der biologischen Aktivität der CD178-mRNA

Die biologische Aktivität der CD178-mRNA wurde durch Induktion von CD95-vermittelter Apoptose in T-Zellen nach Kokultur mit CD178 exprimierenden K562-Transfektanten nachgewiesen. Zu diesem Zweck wurden T-Lymphozyten aus C67BL/6 Mäusen (H-2^b) durch DZ aus dem KM von (Balb/c x C57BL/6; H-2^{bxd}) Hybridmäusen (sog. F₁-Generation) in Gegenwart von CD178-exprimierenden K562-Transfektanten stimuliert. Dabei erkennen alloreaktive T-Zellen das H-2^d Alloantigen.

Die Proliferation der T-Zellen wurde in einer Kinetik über 6 Tage beobachtet. Die Inkubation mit radioaktiv markiertem Thymidin erfolgte ab dem zweiten Tag alle 24 h in einer für jeden Tag separat angesetzten 96-Loch-Kulturplatte für jeweils 16 h.

Wie in Abbildung D9 dargestellt, zeigte sich bei den alloreaktiven T-Zellen ein Proliferationsrückgang um rund 63 Prozent gegenüber der allogenen Kontrolle. Bei den mit den Mock-K562-Transfektanten und allogenen DZ stimulierten T-Zellen war an Tag 5, dem Zeitpunkt des Proliferationsmaximums, eine ³H-Inkorporation von rund 43000cpm messbar, während in dem Ansatz mit den K562-CD178-Transfektanten nur rund 16000cpm detektierbar waren.

Die K562-Zellen per se übten keinen stimulierenden Einfluss auf die T-Zellen aus, d.h. es wurden keine K562-Antigene durch T-Zellen erkannt. Im Gegensatz dazu zeigten mit K562 und DZ kultivierte T-Zellen ein Proliferationsmaximum am Tag 5, was demnach auf die Stimulation durch allogene DZ zurückzuführen ist. Die signifikant reduzierte Proliferation von T-Zellen in Gegenwart von CD178⁺ K562 und DZ wurde auf CD95/CD178-vermittelte Apoptose in den Zielzellen durch die K562 Transfektanten zurückgeführt. Dies konnte durch Zugabe von agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2) bestätigt werden.

Das auf K562 exprimierte hCD178 führte also bei aktivierten alloreaktionen T-Lymphozyten zur Induktion des CD95-medierten AICD. Die synthetisierte CD178-mRNA besaß daher volle biologische Funktionalität.

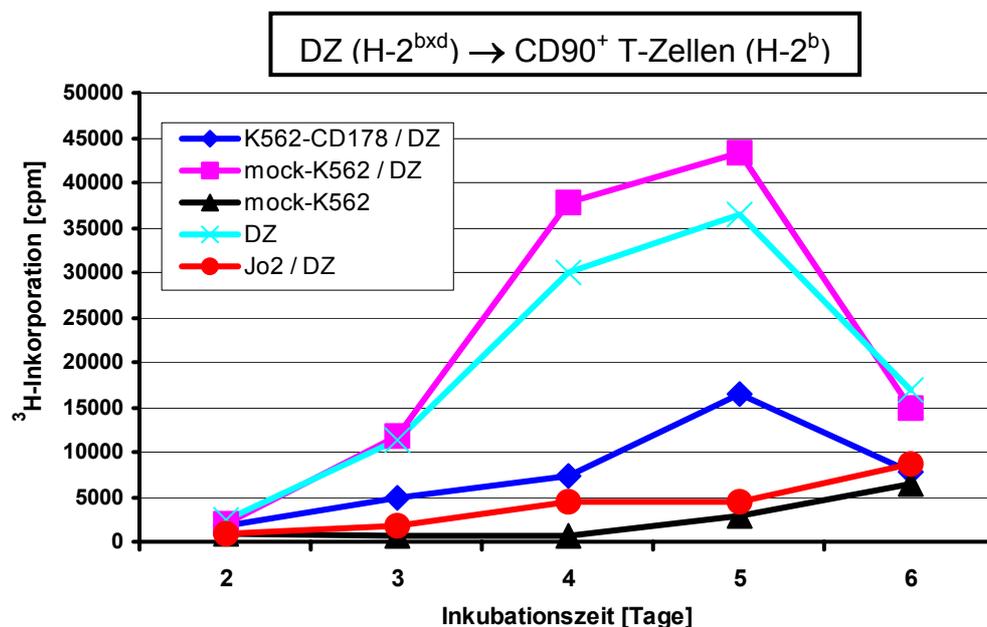


Abb. D9: MLR zur Überprüfung der biologischen Aktivität der CD178-mRNA. Durch Kokultivierung von K562-CD178-Transfektanten mit T-Lymphozyten sowie allogenen DZ wurde die biologische Aktivität der synthetisierten mRNA nachgewiesen. Als Positiv- bzw. Negativkontrollen dienten Ansätze, die neben den T-Lymphozyten nur K562-Mock-Transfektanten enthielten bzw. zusätzlich noch DZ. Der Nachweis der CD95-medierten Apoptosesuszeptibilität der T-Lymphozyten wurde durch agonistischen anti-CD95-Antikörper (Jo2; [200ng/ml]) geführt.

1.4.3. Sind *in vitro* generierte DZ resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose?

Die Suszeptibilität von DZ für CD95-vermittelte Apoptose wird in der Literatur kontrovers diskutiert und nachfolgend im Diskussionsteil dieser Arbeit eingehend

behandelt. In Vorversuchen wurde daher überprüft, in wiefern die *in vitro* generierten DZ resistent gegenüber einer CD95-vermittelten Apoptose waren.

So konnte zunächst mittels Durchflußzytometrie eine starke CD95-Expression auf *in vitro* generierten DZ an Tag 6 nachgewiesen werden (Abbildung D10).

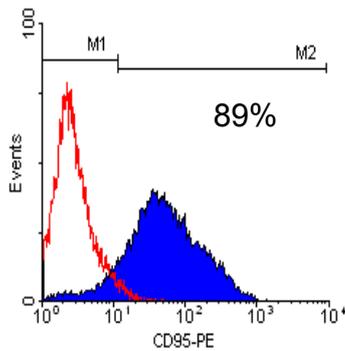


Abb. D10: Histogramm der durchflußzytometrischen Analyse der CD95-Expression bei murinen DZ. An Tag 6 wurden die DZ mit PE-markiertem anti-CD95-Antikörper gefärbt und im FACS-Gerät auf ihre konstitutive CD95-Expression untersucht. Dargestellt ist die Überlagerung der CD95-PE-Fluoreszenz (blaue Kurve) mit der Fluoreszenz der Isotypkontrolle des anti-CD95-Antikörpers (rote Kurve). Die gemessenen DZ zeigten zu 89% eine CD95-Expression.

Wie in Abbildung D11 gezeigt, waren diese DZ resistent gegenüber einer Apoptoseinduktion über CD95. Dies wurde durch Inkubation von DZ an Tag 6 mit sowohl agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2) als auch mit dem rekombinanten Fusionsprotein SuperFasL (FA Alexis), die beide Apoptose in Zielzellen induzieren (Ogasawara et al, 1993; Huang et al., 1999), untersucht.

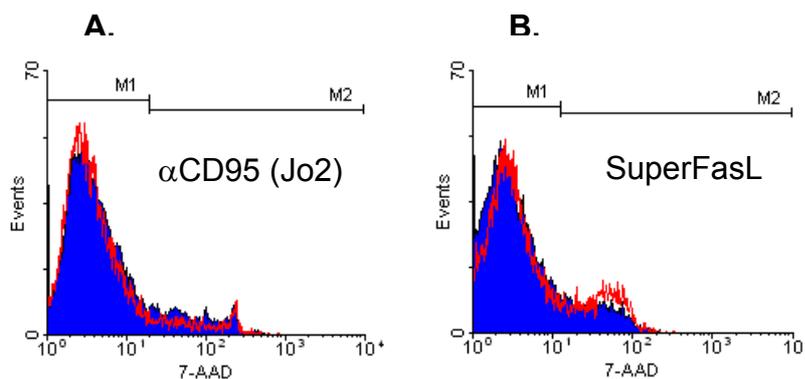


Abb. D11: Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse zur Apoptosesensitivität muriner DZ. An Tag 6 wurden die DZ in einer 6-Loch-Platte für 24 h mit agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2; [200ng/ml]; Bild [A]) bzw. 48 h mit SuperFasL ([10ng/ml]; Bild [B]) inkubiert. Parallel hierzu wurde die jeweils gleiche Anzahl an Zellen unter gleichen Bedingungen ohne die Zugabe von Jo2-Antikörper bzw. SuperFasL inkubiert. Am Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen mit 7-AAD gefärbt und unmittelbar im Anschluß auf ihre 7-AAD-Fluoreszenz im FACS-Gerät untersucht. Die Histogramme zeigen die Überlagerungen der jeweiligen 7-AAD-Fluoreszenzen der mit Jo2-Antikörper bzw. mit SuperFasL behandelten Zellen (blaue Kurven) mit den 7-AAD-Fluoreszenzen für die ohne Antikörper bzw. SuperFasL inkubierten Zellen (rote Kurven).

Wie aus Abbildung D11 hervor geht, zeigte die Behandlung mit Jo2 bzw. SuperFasL und anschließende Färbung der DZ mit dem fluoreszierenden Vitalfarbstoff 7-AAD, welcher in die DNA apoptotischer Zellen interkaliert, keinen Unterschied in der Vitalität zwischen behandelten und unbehandelten DZ .

Damit konnte davon ausgegangen werden, daß DZ nach Transfektion an Tag 6 mit CD178-mRNA keinen CD95-induzierten Suizid oder Fraterizid begehen.

1.4.4. Transfektion muriner DZ mit CD178-mRNA mittels Elektroporation

Nach erfolgreicher Verifizierung der biologischen Aktivität von CD178-mRNA und der Apoptoseresistenz gegenüber CD178 wurden DZ mit CD178-mRNA unter Austestung verschiedener Elektroporationsbedingungen und Konzentrationen von mRNA transfiziert und die Transfektionseffizienz wieder anhand von EGFP als Marker überprüft. Als optimal zu transfizierende RNA-Menge erwiesen sich 20µg RNA; höhere Konzentrationen verbesserten das Ergebnis nicht, darunterliegende Mengen hingegen verschlechterten es. Als idealer Zeitpunkt für die Transfektion stellte sich Tag 6 nach Isolation der Zellen aus dem Knochenmark heraus, also ein Zeitpunkt, an dem die DZ noch nicht vollständig ausdifferenziert sind. Die Ergebnisse der Elektroporation der DZ sind in zwei repräsentativen Histogrammen in Abbildung D12 zu sehen.

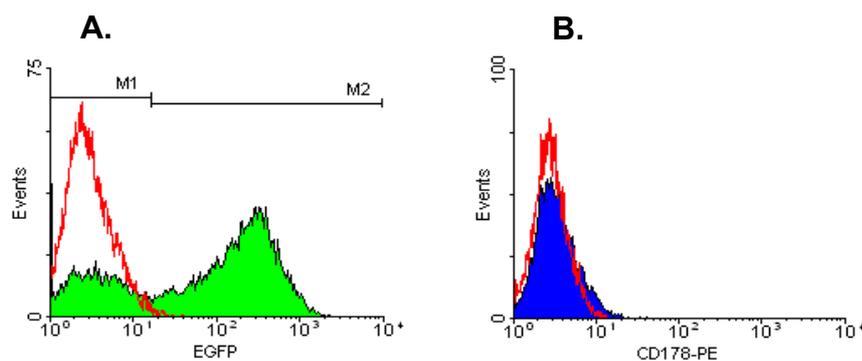


Abb. D12: Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse von EGFP- und CD178-Expression in DZ nach Elektroporation. DZ wurden mit je 20µg EGFP- bzw. CD178-mRNA mittels Elektroporation transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Expression der RNA gemessen. In Bild [A] ist die Autofluoreszenz des EGFP dargestellt. Bild [B] zeigt die Expression von CD178. Diese DZ-Transfektanten wurden mit anti-CD178-Biotin-Antikörper und SA-PE gefärbt. Die Histogramme zeigen die jeweilige Fluoreszenz der Transfektanten als Überlagerung mit der Fluoreszenz der jeweiligen Mock-Transfektanten (rote Kurven). Die Marker M1 und M2 markieren die Grenze zwischen fluoreszierenden und nichtfluoreszierenden Zellen.

Wie auch bereits für die Elektroporationsergebnisse der K562-Zellen wurde für die DZ anhand der durchflußzytometrischen Analysen die Transfektionseffizienzen ermittelt. Sie sind in Abbildung D13 dargestellt.

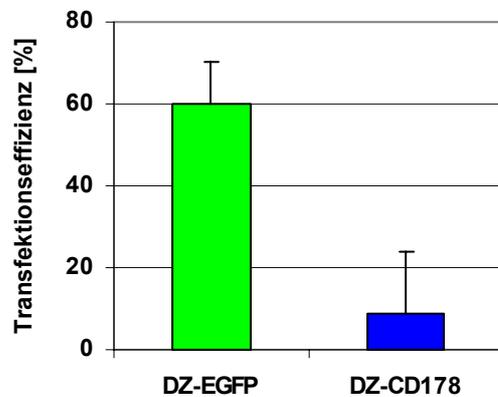


Abb. D13: Transfektionseffizienzen für die Elektroporation von murinen DZ mit mRNA. Dargestellt ist der Anteil mittels FACS bestimmter positiver Zellen 24 h nach Transfektion mit EGFP- bzw. CD178-mRNA (Transfektionseffizienz). Gezeigt sind die Mittelwerte und die zugehörige Standardabweichung für je fünf voneinander unabhängige Transfektionen und Messungen.

Aus den in den Abbildungen D12 und D13 dargestellten Ergebnissen der durchflußzytometrischen Analysen geht hervor, daß die murinen DZ reproduzierbar mit einer Transfektionseffizienz von annähernd 60% mit EGFP-mRNA transfiziert werden konnten. Im Falle der CD178-mRNA konnte jedoch kaum eine nennenswerte CD178-Expression reproduzierbar nachgewiesen werden. Um experimentelle Ursachen ausschließen zu können, wurden in einer Reihe von Elektroporationsversuchen nachfolgend verschiedene Parameter wie z.B. die Kinetik der CD178 Expression in einem Zeitraum von 2 h bis 78 h nach Transfektion der mRNA oder CD178-RNA Konzentrationen von 40 bis 80µg pro Transfektion untersucht. Ferner wurde die Transfektion nicht nur an Tag 6, sondern auch zu einem früheren Zeitpunkt (Tag 4) sowie zu Zeitpunkten, an denen die DZ bereits wesentlich weiter ausdifferenziert sind (Tag 7, 8, und 10), durchgeführt. Alle Veränderungen der experimentellen Parameter zeigten jedoch keinen positiven Effekt auf die Expression von CD178 nach mRNA-Transfektion in DZ.

1.4.5. Liposomenvermittelte Transfektion von DZ

Mittels kationischer Liposomen können ebenfalls exogene Nukleinsäuren in Zellen transfiziert werden (Lipofektion). Mit der 1987 erstmals beschriebenen Methode (Felgner et al., 1987) werden normalerweise DNA-Moleküle in Zellen eingebracht. Mittlerweile gibt es eine Reihe solcher Transfektionsreagenzien, die sich auch für die Transfektion kleinerer RNA-Moleküle bewährt haben. Alternativ zur Elektroporation wurde daher auch versucht, CD178-mRNA mittels Liposomen in DZ zu transfizieren.

Hierbei wurde wieder EGFP-mRNA als Standard eingesetzt. Die Ergebnisse dieses Experimentes sind in Abbildung D14 gezeigt.

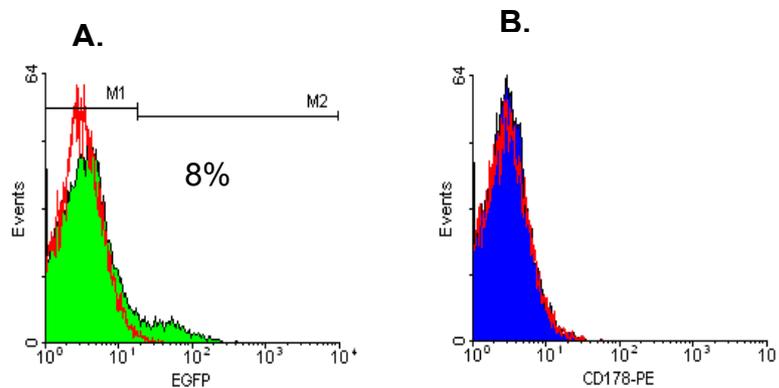


Abb. D14: Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse zur Lipofektion muriner DZ. An Tag 6 wurden DZ mittels kationischer Liposomen mit EGFP- bzw. CD178-mRNA transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Expression von EGFP bzw. CD178 gemessen. Die Histogramme zeigen die jeweilige Fluoreszenz der Transfektanten als Überlagerung mit der Fluoreszenz der jeweiligen Mock-Transfektanten (rote Kurven). Die Marker M1 und M2 markieren die Grenze zwischen fluoreszierenden und nichtfluoreszierenden Zellen.

Die Lipofektion führte im Vergleich zur Elektroporation zu keiner Verbesserung der Transfektionsergebnisse. Für EGFP-mRNA wurde eine deutlich schlechtere Transfektionseffizienz erzielt. Lediglich acht Prozent der DZ zeigten eine EGFP-Fluoreszenz. Für CD178-mRNA konnte mit dieser Methode keinerlei Expression erzielt werden. Darüber hinaus war davon auszugehen, daß die ausbleibende CD178-Expression nicht in ursächlichem Zusammenhang mit der Transfektionsmethode steht.

1.4.6. Stimulation allogener T-Lymphozyten mit DZ-CD178-mRNA-Transfektanten in der MLR

Da aus der Literatur bekannt ist, daß auch sehr geringe Transduktionseffizienzen bei humanen DZ nach adenoviraler Transduktion mit CD178-DNA zu einer deutlichen Reduktion der Proliferation alloreaktiver T-Lymphozyten führten (Hoves et al., 2003), wurden die in dieser Arbeit erzeugten murinen CD178-mRNA-Transfektanten ebenfalls auf ihre proliferationsinhibierende Wirkung getestet. Dies ist in Abbildung D15 dargestellt.

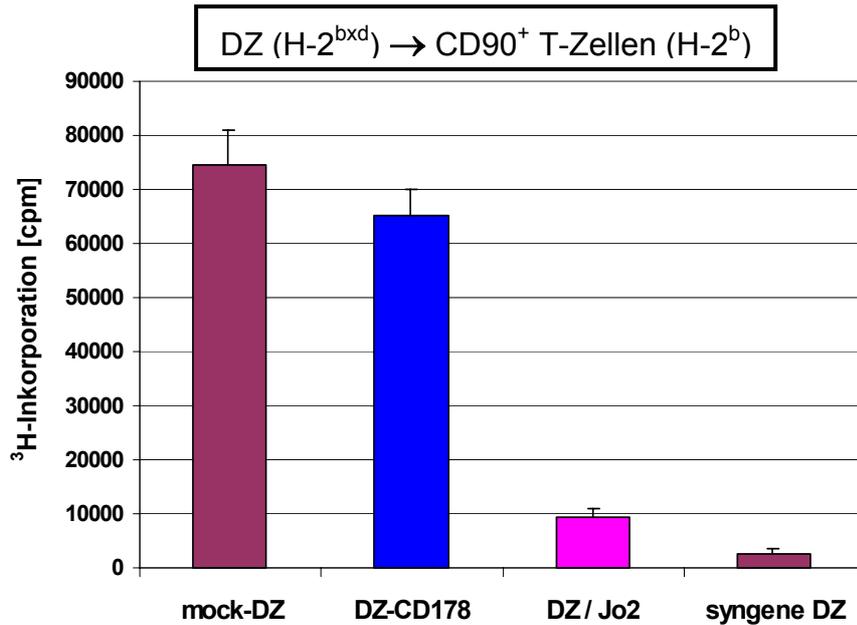


Abb. D15: Allo gene MLR zur Überprüfung der Stimulationseigenschaften von DZ-CD178-Transfektanten. DZ einer F₁-Maus (H-2^{bxd}) wurden an Tag 6 mit CD178-mRNA elektro poriert und direkt im Anschluß in einer allogenen MLR zur Stimulation alloreaktiver T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) eingesetzt. Als Positivkontrolle für die Stimulation dienten Mock-Transfektanten. Als syngene Kontrolle wurden T-Zellen aus einer F₁-Maus verwendet. Parallel hierzu wurde AICD in den alloreaktiven T-Zellen über agonistischen anti-CD95-Antikörper (Jo2; [200ng/ml]) induziert. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Wie Abbildung D15 verdeutlicht, konnte die Alloreaktivität der T-Lymphozyten durch die DZ-CD178-Transfektanten im Vergleich zu Jo2-Antikörper nur marginal reduziert werden. In Gegenwart von Jo2-Antikörper zeigten die T-Zellen weniger als 15% Inkorporation von ³H-Thymidin im Vergleich zur Mock-Kontrolle, wohingegen die mit den CD178-mRNA-Transfektanten stimulierten T-Zellen noch rund 85% residuelle Alloreaktivität im Vergleich zur Mock-Kontrolle aufwiesen (etwa 75.000cpm gegenüber 65.000cpm).

Dieses Experiment zeigte ferner, daß sich die Elektroporation per se nicht negativ auf die stimulatorischen Eigenschaften der DZ auswirkte.

1.5. Untersuchungen zur ausbleibenden CD178-Expression

Die insuffiziente CD178-Expression nach Transfektion wurde in den nachfolgenden Experimenten hinsichtlich molekularer Ursachen untersucht. Aufgrund der bislang erzielten Ergebnisse mit EGFP-mRNA war davon auszugehen, daß Elektroporation als Transfektionsmethode gut funktionierte. Es wurden daher Fragen zur Stabilität

der RNA Expression, zur Translation oder zu posttranslationalen Modifikationen von CD178-mRNA in DZ adressiert.

1.5.1. Kinetik der mRNA-Expression nach Elektroporation muriner DZ

Um zu untersuchen, wie lange in murine DZ transfizierte mRNA nachweisbar ist, wurden DZ zunächst an Tag 6 mit EGFP-mRNA elektroporiert und anschließend in Intervallen von 24 h die Expression von EGFP via Durchflußzytometrie gemessen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abbildung D16 dargestellt.

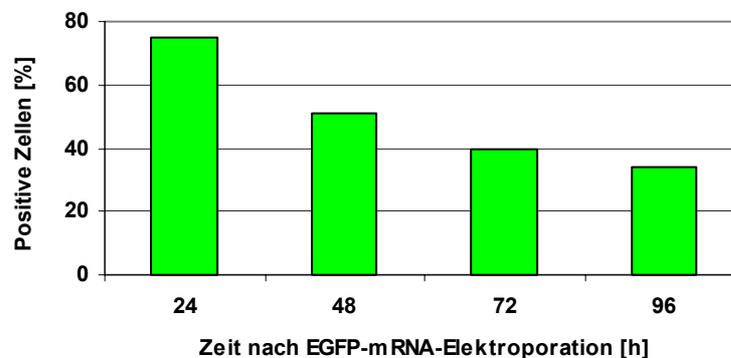


Abb. D16: Kinetik der EGFP-Expression in murinen DZ. Nach der Elektroporation der DZ an Tag 6 wurde in Intervallen von je 24 h die Expression von EGFP in den Zellen per Durchflußzytometrie gemessen. Bestimmt wurde der Anteil an Zellen, der eine EGFP-Autofluoreszenz zeigte.

Dabei zeigte sich, daß die EGFP-Fluoreszenz über einen Zeitraum von mehr als 96 h nach der Elektroporation nachweisbar war. Nach 24 h lag der Anteil der fluoreszierenden Zellen bei etwa 75%, nach 96 h bei 35%. Der Anteil fluoreszierender Zellen halbierte sich demnach in etwa in einem Zeitraum von rund 72 h. Dies spricht für eine hohe Stabilität der mRNA innerhalb der Zellen, so daß mit der eingebrachten mRNA über mehrere Tage hinweg Protein translatiert wird.

Im nächsten Schritt wurde nun die Stabilität von CD178-mRNA nach Transfektion überprüft. Zu diesem Zweck wurden DZ wieder an Tag 6 mit CD178-mRNA elektroporiert und Gesamt-RNA aus den Transfektanten 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h nach Elektroporation isoliert. Die so gewonnene RNA wurde unter Verwendung von Random-Hexamer-Primern einer RT-PCR unterzogen und die generierte cDNA anschließend in einer PCR unter Verwendung eines spezifischen hCD178-Oligonukleotidpaares eingesetzt. Als Positivkontrolle für den Nachweis der CD178-mRNA dienten K562-Zellen, deren Gesamt-RNA 24 h nach der Elektroporation mit

CD178-mRNA isoliert wurde. Darüber hinaus wurde auch jeweils Gesamt-RNA aus entsprechenden Mock-Transfektanten isoliert und in der RT-PCR eingesetzt. Als Verlaufskontrolle für die RT-PCR bzw. die anschließende PCR diente der Nachweis von murinem β -Actin, einem Protein, das konstitutiv exprimiert wird. Die Ergebnisse dieses CD178-mRNA-Nachweises sind in Abbildung D17 gezeigt.

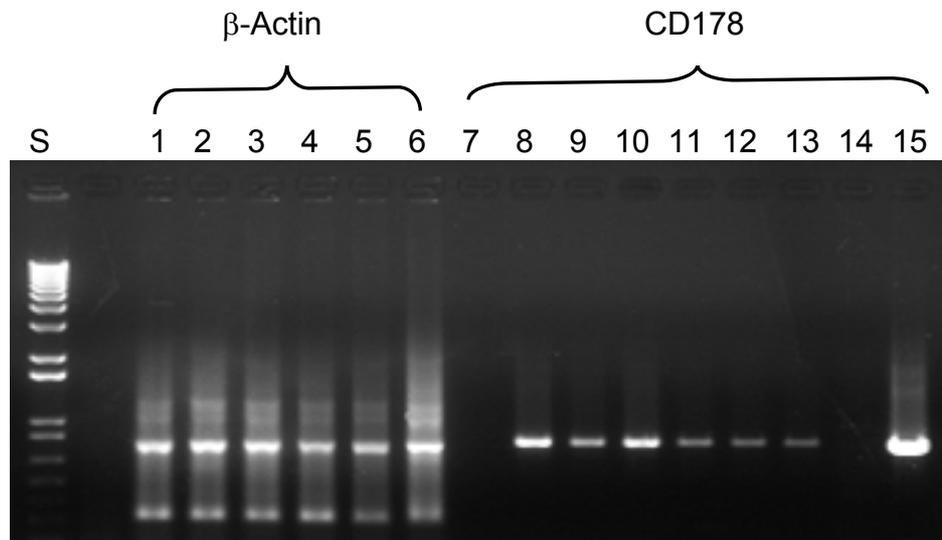


Abb. D17: Kinetik des CD178-mRNA-Nachweises nach Elektroporation in DZ. Aus DZ-CD178-mRNA-Transfektanten wurde nach 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h, aus einer K562-CD178-mRNA-Transfektante sowie aus Mock-Transfektanten 24 h nach der Elektroporation die gesamte RNA isoliert und diese jeweils in einer RT-PCR mit Random-Hexamerprimern eingesetzt. Aus der daraus generierten cDNA wurde anschließend mit spezifischen Primern hCD178 amplifiziert bzw. bei den Verlaufskontrollen mit spezifischen Primern murines β -Actin. Die Amplifikate wurden auf ein Agarosegel wie folgt aufgetragen: Spur [S]=DNA-Längenstandard, [1] bis [6]= β -Actin-Amplifikate aus den DZ für jeden der genannten Zeitpunkte, [7]=Mock-DZ: hCD178-Amplifikat, [8] bis [13]=DZ-CD178-Transfektanten: hCD178-Amplifikate für 2, 4, 6, 8, 10 und 24 h nach Elektroporation, [14]=Mock-K562: hCD178-Amplifikat, [15]=K562-CD178-Transfektante: hCD178-Amplifikat.

Aus dem Agarosegelbild in Abb. D17 geht hervor, daß sowohl die in DZ als auch in K562-Zellen transfizierte CD178-mRNA über den gesamten Zeitraum der Kinetik nachweisbar war. Die RT-PCR als auch die PCR wurden unter semiquantitativen Bedingungen durchgeführt (d.h. gleiche Anzahl an Transfektanten, die für die Isolation der Gesamt-RNA eingesetzt wurden etc.). Zwar scheint die Menge des Amplifikats für die DZ-Transfektanten mit zunehmendem zeitlichen Abstand zur Transfektion leicht abzunehmen, eine signifikante bzw. vollständige Degradierung der transfizierten mRNA lag für den beobachteten Zeitraum jedoch nicht vor.

1.5.2. Wird in DZ die Expression von CD178 durch posttranslationelle Modifikation reguliert?

Im Folgenden wurde analysiert, inwiefern die Expression von CD178 durch rasche intrazelluläre Proteolyse oder z.B. durch Abspaltung von CD178 von der Zellmembran mittels Proteinase inhibiert wird.

1.5.2.1. Einfluß von Proteasomeninhibitor

DZ prozessieren als professionelle APZ sehr rasch und aktiv viele endozytierte (exosomal) oder auch nach Phagozytose intrazellulär vorhandene Proteine (endosomal) durch multikatalytische Protease-Komplexe, sog. Proteasomen. Mit Lactacystin steht ein effizienter Proteasomenhemmer zur Verfügung, über den der intrazelluläre Proteinabbau durch selektive Inhibition des 20S-Proteasoms verhindert werden kann (Fenteany und Schreiber, 1998). Es wurden daher DZ-Transfektanten unmittelbar nach der Transfektion mit diesem Proteasomeninhibitor für 24 bzw. 48 h inkubiert und im Anschluß die CD178-Expression mittels Durchflußzytometrie gemessen. Auch hierbei konnte keine signifikante CD178-Expression nachgewiesen werden.

1.5.2.2. Einfluß von Matrixmetalloproteinase-Inhibitoren

Die biologische Aktivität von CD178 wird unter anderem durch Abspaltung der extrazellulären Region durch Matrixmetalloproteinasen (MMP) reguliert (Kayagaki et al., 1995; Cherradi und Shirwan, 2001). Dies kann dazu führen, daß CD178 trotz starker Expression nicht auf der Zelloberfläche nachweisbar ist.

Für die Klärung der Frage, ob im vorliegende Falle die nicht nachweisbare CD178-Expression auf die Aktivität von MMPs zurückzuführen war, wurden die DZ-Transfektanten ebenfalls für 24 bzw. 48 h nach Transfektion mit einem MMP-Inhibitoren-Cocktail inkubiert und danach die CD178-Expression wie üblich gemessen. Genau wie im Falle des Proteasomeninhibitors war auch hier kein CD178 auf der Zelloberfläche der DZ-Transfektanten nachweisbar.

1.5.2.3. Einfluß von Caspase-Inhibitoren

Aufgrund der in Abschnitt D1.4.3. dargestellten Experimente konnte gezeigt werden, daß die generierten DZ zwar eine starke Expression von CD95 aufwiesen, jedoch nicht suszeptibel für CD95-medierte Apoptose waren. Weitere Experimente zur Klärung zum Ausschluss einer mangelhaften CD178-Expression aufgrund apoptotischer Phänomene sollten diese Ergebnisse unterstützen.

Die CD95-abhängige Apoptose-Signaltransduktionskette kann mit Hilfe des Breitband-Caspase-Inhibitors Z-VAD-FMK unterbrochen und damit die Apoptose in den Zellen verhindert werden. Dieser Inhibitor bindet kompetitiv und irreversibel an Caspase 1 sowie weitere Caspasen (Slee et al., 1996).

Die DZ wurden auch hierbei für 24 bzw. 48 h nach der Transfektion mit dem Inhibitor inkubiert und die CD178-Expression via Durchflußzytometrie untersucht. Der Caspase-Inhibitor hatte keinen begünstigenden Einfluß auf die Expression, es konnte auch hier kein CD178 auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden.

1.5.2.4. Inhibitor der Apoptose-Signaltransduktionskette durch cFLIP

Eine weitere Möglichkeit zur Inhibition von Apoptose bietet das zelluläre FLICE Inhibitory Protein (cFLIP). Es wird vorwiegend von Muskelzellen und lymphoiden Zellen exprimiert und kommt dort in zwei verschiedenen Varianten vor: als cFLIP_S (kurze Form) und cFLIP_L (lange Form). In dieser Arbeit wurde cFLIP_L verwendet, das mit dem Adaptorprotein FADD sowie der Protease FLICE interagiert und potent Apoptose inhibiert, die durch Mitglieder der Todesrezeptorfamilie induziert wird (Irmeler, M. et al., 1997). Für cFLIP ist ferner beschrieben, daß es lediglich die durch Todesrezeptoren induzierte Apoptose inhibiert, nicht aber die durch Perforin, Granzym-B, ein Chemotherapeutikum oder Röntgenstrahlen induzierte Apoptose (Kataoka, T. et al., 1998).

Durch Kotransfektion von CD178-mRNA und cFLIP_L-mRNA sollte geklärt werden, ob die Transfektion von CD178-mRNA zu einem apoptotischen Prozeß in murinen DZ führt, an dem CD178 beteiligt ist, und der nicht durch Blockade der CD95-abhängigen Caspase-Kaskade inhibiert werden kann, weil er z.B. über Bid und den mitochondrialen CD95-Signaltransduktionsweg induziert wird.

Hierzu wurden zunächst für CD95-medierte Apoptose suszeptible murine A20 Zellen stabil mit dem in einem eukaryontischen Expressionskonstrukt klonierten cFLIP_L-Gen mittels Elektroporation transfiziert. Diese Transfektanten sowie Wildtyp A20-Zellen wurden anschließend für 24h mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper Jo2 inkubiert und anschließend mit dem Vitalfarbstoff 7-AAD gefärbt. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde per Durchflußzytometrie analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung D18 dargestellt.

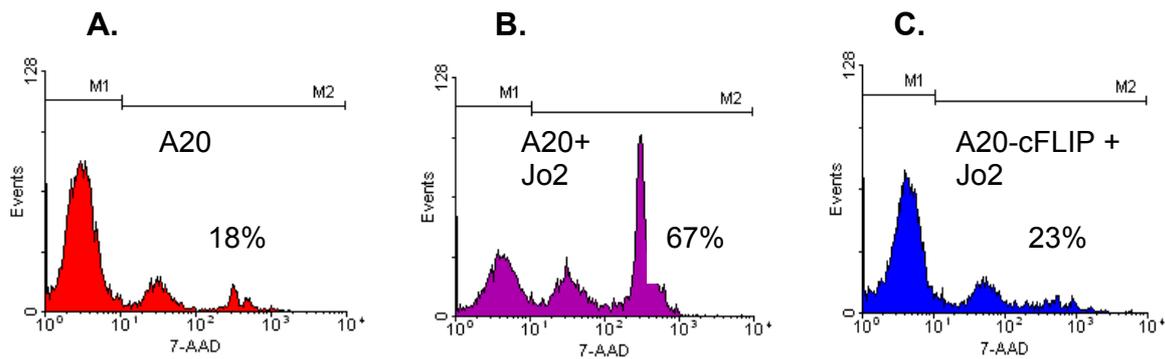


Abb. D18: Apoptose-Test mit stabilen A20-cFLIP-Transfektanten. Stabil mit dem cFLIP-Gen transfizierte A20-Zellen (Bild [C]) sowie untransfizierte A20-Zellen (Bild [B]) wurden mit agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2; [200ng/ml]) inkubiert und nach 24 h die Anzahl toter Zellen mit dem Vitalfarbstoff 7-AAD per Durchflußzytometrie ermittelt. Als Vergleich dienten unbehandelte A20-Zellen (Bild [A]). Der Marker M2 grenzt in den Histogrammen die toten Zellen von den lebenden Zellen (M1) ab. Gezeigt sind jeweils die Prozentzahlen toter Zellen.

Wie aus Abbildung D18 hervor geht, konnte aufgrund der Transfektion des cFLIP_L-Gens in A20-Zellen deutlich CD95-mediierte Apoptose inhibiert werden. Der prozentuale Anteil toter Zellen lag mit 23 Prozent bei den A20-cFLIP-Transfektanten nur marginal über der Anzahl toter Zellen einer unbehandelten A20-Kontrolle. Wildtyp A20-Zellen zeigten hingegen nach Behandlung mit Jo2-Antikörper eine CD95-vermittelte Apoptose, die zu 67% toten Zellen führte.

Ausgehend von dem in die A20-Zellen transfizierten cFLIP_L-Gen wurde nun cFLIP_L-mRNA synthetisiert und diese gemeinsam mit CD178-mRNA in DZ elektroporiert. Hierbei wurde auch die RNA-Menge variiert. Verwendet wurden sowohl je 20µg als auch 40µg von jeder der beiden mRNAs. 24h nach der Transfektion erfolgte wieder die Messung der CD178-Expression mittels Durchflußzytometrie. Auch die Transfektion von cFLIP_L-mRNA in DZ hatte keinen positiven Effekt auf die Expression von CD178.

1.5.2.5. Transfektion CD95-defizienter muriner DZ mit CD178-mRNA

In einem weiteren Experiment zum Ausschluß einer funktionellen Beteiligung von CD95 an der insuffizienten CD178-Expression in DZ wurden DZ aus dem Knochenmark einer MRL/lpr-Maus generiert. Diese Mäuse tragen aufgrund einer Punktmutation einen Defekt in ihrem CD95-Rezeptor. In den Zellen dieser Maus ist keine CD95/CD178-induzierte Apoptose möglich.

Die DZ dieser Maus wurden wieder an Tag 6 sowohl mit GFP- als auch mit CD178-mRNA elektroporiert und die Expression dieser beiden Gene 24h nach der Transfektion durchflußzytometrisch analysiert. Dies ist in Abbildung D19 dargestellt.

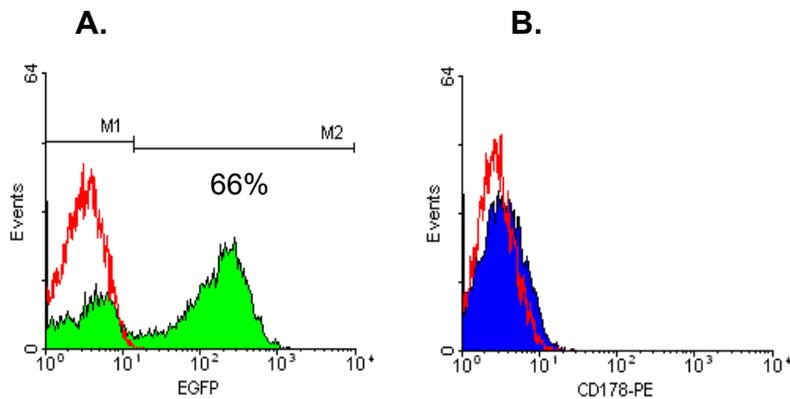


Abb. D19: Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse von EGFP- und CD178-Expression in CD95-defizienten DZ nach Elektroporation. Die aus einer MRL/lpr-Maus generierten DZ wurden mit je 20µg EGFP- bzw. CD178-mRNA mittels Elektroporation transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Expression der RNA gemessen. Im Falle des EGFP in Bild [A] erfolgte keine Färbung der Zellen, hier konnte die Autofluoreszenz des EGFP direkt gemessen werden. Bild [B] zeigt die Expression von CD178. Diese DZ-Transfektanten wurden mit anti-CD178-Biotin-Antikörper und SA-PE gefärbt. Die Histogramme zeigen die jeweilige Fluoreszenz der Transfektanten als Überlagerung mit der Fluoreszenz der jeweiligen Mock-Transfektanten (rote Kurven). Die Marker M1 und M2 markieren die Grenze zwischen fluoreszierenden und nichtfluoreszierenden Zellen.

In diesem Experiment zeigte sich, daß DZ aus den MRL/lpr-Mäusen ebenfalls mit hohen Effizienzen elektroporierbar sind. Für das GFP konnte eine Transfektionseffizienz von 66% erzielt werden. Im Gegensatz dazu konnte aber auch in funktionell CD95-defizienten DZ keine nennenswerte CD178-Expression nachgewiesen werden.

Aufgrund dieses und der vorangegangenen Experimente konnte daher davon ausgegangen werden, daß die insuffiziente Expression von CD178 in DZ nicht durch die Expression oder Funktion von CD95 bedingt war.

1.5.3. Regulation der Expression und biologischen Aktivität von CD178 in murinen DZ über die zytoplasmatische Region des Liganden

Neueste Untersuchungen zur zytotoxischen Funktion von CD178 haben ergeben, daß dessen zytoplasmatische N-terminale Region von 80 Aminosäuren eine regulatorische Funktion hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften von CD178 besitzt. Dabei wurde festgestellt, daß die Deletion der zytoplasmatisch lokalisierten Aminosäuren 2 bis 70 bzw. 2 bis 33 zum teilweisen Verlust der biologischen

Funktionalität führt. Bei diesen Deletionsmutanten lag eine 30 bis 100fache reduzierte Zytotoxizität vor, obgleich CD178 auf der Zelloberfläche der Transfektanten nachweisbar war (Satoshi, J. et al., 2005). Darüber hinaus konnte in einer weiteren Arbeit nachgewiesen werden, daß die zytoplasmatische CD178-Region einen Einfluß auf die Lokalisation von CD178 ausübt. Der N-Terminus des Liganden scheint ein Signal zu enthalten, welches das Protein entweder zu sekretorischen Lysosomen oder an die Zellmembran dirigiert (Bossi und Griffiths, 1999).

Ausgehend von diesen Erkenntnissen zur Regulation von CD178 wurde untersucht, ob die zytoplasmatische Region in murinen DZ ebenfalls eine Funktion bei der Expression von CD178 nach mRNA-Transfektion ausübt. Es wurde daher eine zytoplasmatisch um die für die N-terminal kodierenden Aminosäuren 2 – 79 deletierte Sequenz einer CD178-mRNA synthetisiert. Diese CD178 Δ zyt-mRNA wurde in DZ sowie in K562-Zellen transfiziert und vergleichend zu den vorangegangenen Experimenten 24 h nach der Elektroporation die Expression von CD178 im Durchflußzytometer gemessen. Außerdem wurde ein Teil der DZ mit MMP-Inhibitor-Cocktail inkubiert. Dies ist in Abbildung D20 illustriert.

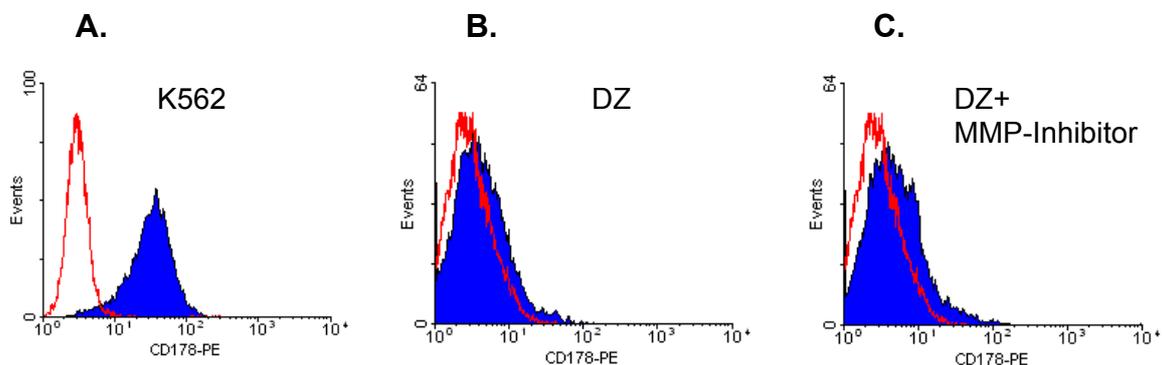


Abb. D20: Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse der CD178 Δ zyt -Expression in K562-Zellen und DZ nach Elektroporation. Die K562-Zellen bzw. DZ wurden mit je 20 μ g CD178 Δ zyt-mRNA mittels Elektroporation transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde die Expression der RNA gemessen. Bild [A] zeigt die Expression von CD178 Δ zyt in K562-Zellen, Bild [B] die Expression in DZ und Bild [C] die Expression in DZ, die mit MMP-Inhibitor behandelt wurden. Die Transfektanten wurden mit anti-CD178-Biotin-Antikörper und SA-PE gefärbt. Die Histogramme zeigen die jeweilige Fluoreszenz der Transfektanten als Überlagerung mit der Fluoreszenz der jeweiligen Mock-Transfektanten (rote Kurven).

Es konnte sowohl auf der Zelloberfläche der K562-Zellen als auch bei den DZ die Expression von CD178 Δ zyt nachgewiesen werden. Darüber hinaus führte die Behandlung der DZ mit MMP-Inhibitor zu einer Zunahme der Anzahl nachweisbarer Moleküle. Der Anteil dieser Zellen lag bei ca. 20% (Abb. D20C).

Die CD178 Δ zyt-positiven DZ wurden im nächsten Schritt in einer allogenen MLR eingesetzt, um zu testen, ob mit ihnen alloreaktive T-Zellen deletiert werden können. Hier wurde wieder ein MHC-disparates F₁ → P-Mausmodell angewandt, in dem DZ aus F₁ (Balb/c x C57BL/6; H-2^{bxd}) zur Stimulation von T-Zellen aus C57BL/6 Mäusen (H-2^b) verwandt wurden. Die Ergebnisse dieser MLR sind in Abbildung D21A dargestellt.

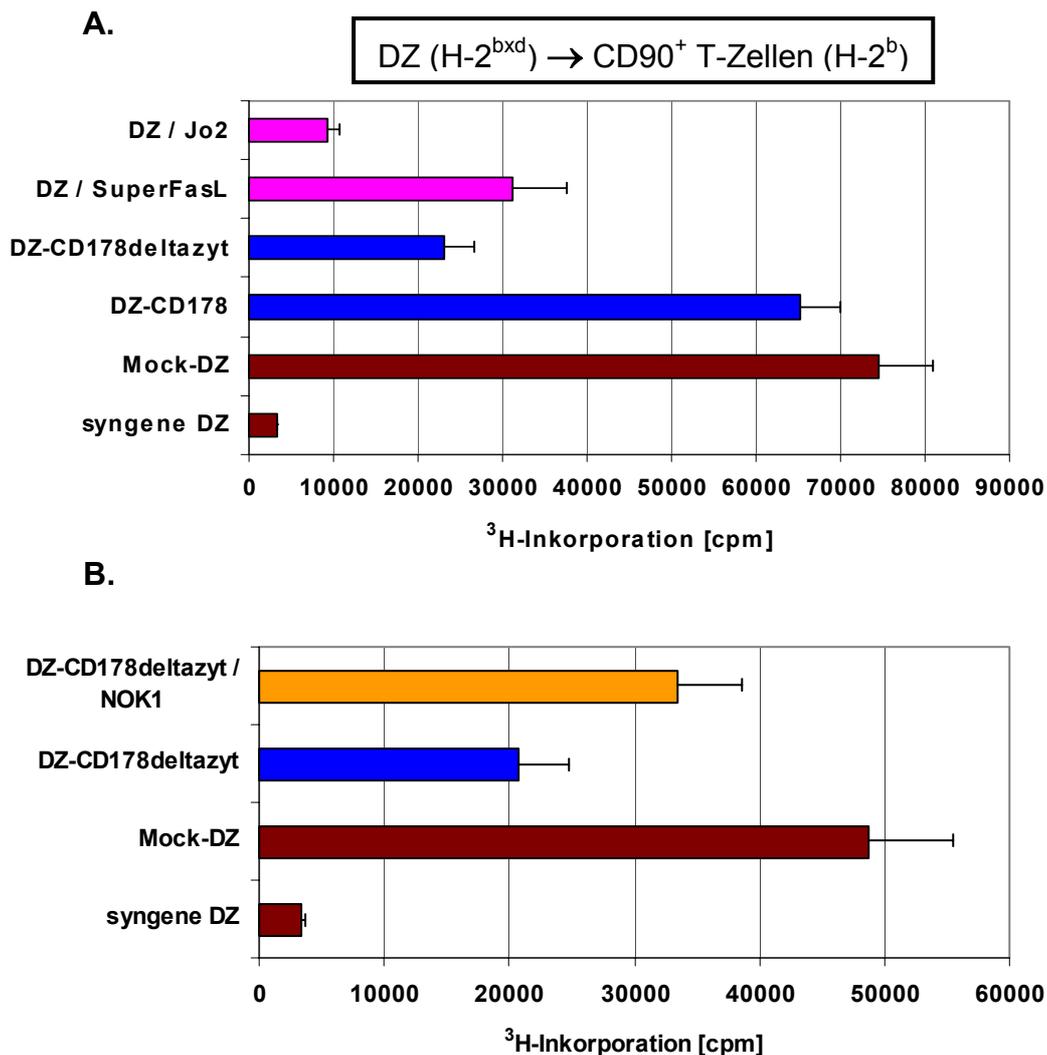


Abb. D21: Allogene MLR zur Überprüfung der Stimulationseigenschaften von DZ-CD178 Δ zyt - Transfektanten. DZ einer F₁-Maus (H-2^{bxd}) wurden mit CD178-mRNA bzw. CD178 Δ zyt-mRNA elektroporiert und direkt im Anschluß in einer allogenen MLR zur Stimulation alloreaktiver T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) eingesetzt. Als allogene Positivkontrolle für die Stimulation dienten Mock-Transfektanten. Als syngene Kontrolle wurden T-Zellen aus einer F₁-Maus verwendet. Parallel hierzu wurde AICD in den alloreaktiven T-Zellen über agonistischen anti-CD95-Antikörper (Jo2; [200ng/ml]) bzw. alternativ mit SuperFasL [10ng/ml] induziert (Graphik [A]). In einer weiteren MLR wurde über einen antagonistischen anti-CD178-Antikörper (NOK1; [1 μ g/ml]) CD178 blockiert (Graphik [B]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Es zeigte sich, daß die Transfektion von DZ mit CD178 Δ zyt-mRNA im Gegensatz zur Transfektion von CD178-mRNA deutlich zur Reduktion einer Proliferation alloreaktiver T-Zellen führte. Diese Reduktion war sogar stärker als bei T-Zellen, die in Gegenwart von SuperFasL als agonistischem anti CD95-Agens stimuliert wurden. Die mit den CD178 Δ zyt-Transfektanten stimulierten T-Zellen zeigten nur noch ca. 30% des ³H-Thymidineinbaus im Vergleich zur allogenen Stimulationskontrolle (Mock-DZ).

In einer weiteren MLR wurde schließlich untersucht, ob die Inhibition der Proliferation bei den mit CD178 Δ zyt-Transfektanten behandelten T-Zellen tatsächlich auf AICD zurückzuführen war (Abb. D21B). Hierzu wurde der extrazelluläre Teil von CD178 auf den CD178 Δ zyt-Transfektanten mit einem antagonistischen anti-CD178-Antikörper (NOK1) blockiert. Die Zugabe dieses Antikörpers führte zu einer deutlichen Zunahme der Proliferation in diesen T-Zellen, wenngleich hier nicht der Ausgangswert der allogenen Stimulationskontrolle erreicht wurde.

Damit konnte gezeigt werden, daß die zytoplasmatische Region von CD178 in DZ einen regulatorischen Einfluß auf die Expression von CD178 hat. Diese Form der Regulation von CD178 und einem unter Umständen damit assoziierten retrograden Signaltransduktionsweg wurde bislang noch nicht für DZ beschrieben und könnte eine Möglichkeit darstellen, mit der DZ eine Resistenz gegenüber CD95-induzierter Apoptose nach Maturierung erwerben.

2. Deletion alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten mit CD178-X-Fusionsproteinen

Die zweite Strategie zur Deletion alloreaktiver T-Zellen, die in dieser Arbeit untersucht wurde, war die Beladung von APZ oder auch von T-Zellen mit CD178-X-Fusionsproteinen, die an Oberflächenstrukturen auf diesen Zellen binden. Die Deletion sollte auch hier über AICD in den aktivierten alloreaktiven T-Zellen erfolgen. Dabei wurden wiederum zwei verschiedene Wege beschritten: die APZ wurden entweder mit den aufgereinigten Fusionsproteinen exogen beladen oder aber mit den für die Fusionsproteine kodierenden mRNA-Molekülen transfiziert.

2.1 Aufbau und Funktion der CD178-X-Fusionsproteine

Die verwendeten CD178-X-Fusionsproteine bestanden C-terminal aus der extrazellulären Region von humanem CD178 und N-terminal aus der humanen oder murinen extrazellulären Region eines Proteins, das an Oberflächenmoleküle auf APZ

oder T-Zellen bindet. Verknüpft sind diese beiden Proteinregionen über einen FLAG-tag, einem acht Aminosäuren langen Peptid, das zur Identifikation und Aufreinigung von Proteinen Verwendung findet (Kaltwasser et al., 2002). Die Struktur und Funktion der Fusionsproteine ist schematisch in Abbildung D22 anhand der Fusionsproteine hCD178-mCD28 und hCD178-hRANK dargestellt.

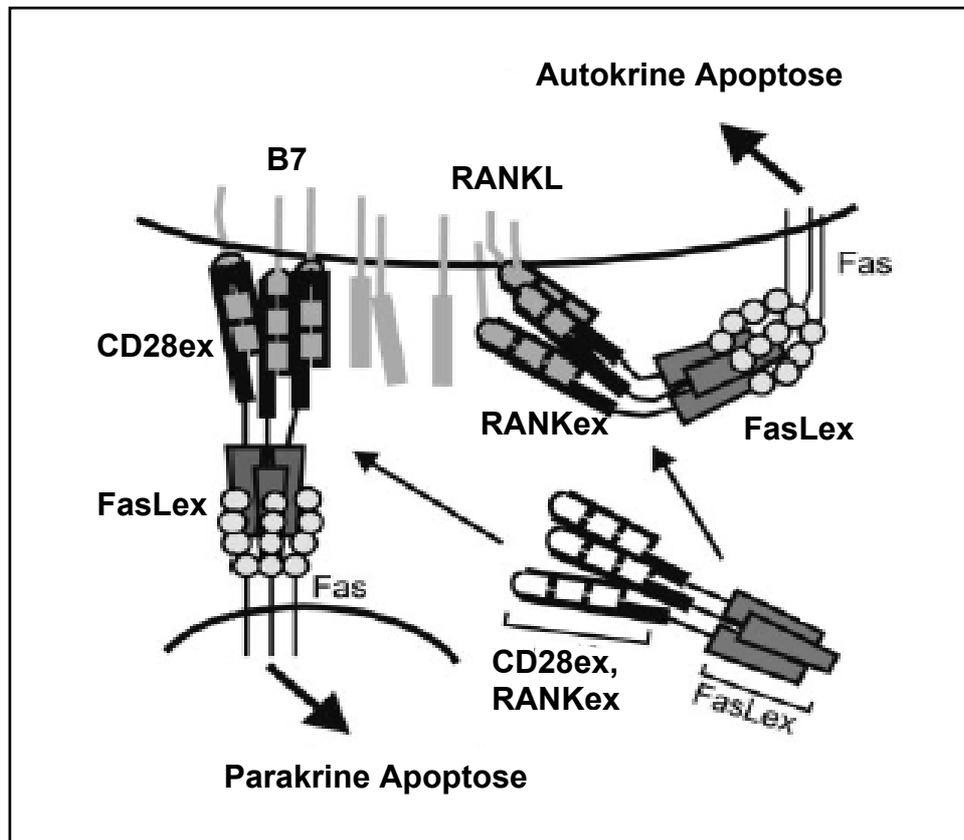


Abb. D22: Schematische Darstellung von Struktur und Funktion der CD178-X-Fusionsproteine. Gezeigt ist exemplarisch der Aufbau der Fusionsproteine hCD178-mCD28 und hCD178-hRANK. Sie bestehen beide aus der extrazellulären Region des hCD178-Moleküls sowie aus den extrazellulären Proteinbereichen von mCD28 bzw. hRANK. Sie sind über einen FLAG-tag miteinander verknüpft. Durch Bindung von monomeren Fusionsproteinen auf den APZ an CD80/86 (B7) oder auf den T-Zellen an RANK-Ligand (RANKL) sowie gleichzeitig von drei unmittelbar benachbarten Molekülen an CD95 auf aktivierten T-Zellen induzieren sie parakrine oder autokrine Apoptose in den T-Zellen (Abb. in Anlehnung an Samel, D. et al., 2003).

Für diese Arbeit standen im Rahmen eines Kooperationsprojektes neben murinen Fusionsprotein-Konstrukten humane Fusionsproteine zur Verfügung, die Kreuzreaktivität gegenüber den murinen zellulären Bindungspartnern aufweisen. So zeigt beispielsweise das murine und das humane CD178-Molekül eine 77%ige Homologie und beide Proteine sind über die Speziesbarriere hinweg biologisch aktiv (Takahashi et al., 1994).

2.2. Nachweis der Bindung der Fusionsproteine CD178-CD40 und CD178-CD28 an die membrangebundenen Rezeptoren/Liganden CD80/CD86 bzw. CD154

Der Nachweis der Bindung von hCD178-x-Fusionsproteinen auf membrangebundenen Oberflächenmolekülen erfolgte mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Hierfür wurden exemplarisch für die verwendeten CD178-X-Fusionsproteine sowohl stabil transfizierte K562-CD80-Transfektanten als auch murine DZ an Tag 10 mit dem Fusionsprotein hCD178-mCD28 beladen. Zusätzlich wurde die Bindung von hCD178-hCD40 an HT1080-CD154-Transfektanten untersucht. Dabei bindet CD28 jeweils auf CD80 bzw. CD86 und CD40 an CD154 (CD40-Ligand). Da die verwendeten Zellen in unbeladenem Zustand kein CD178 aufweisen, konnte ein anti-CD178-Antikörper verwendet werden.

Die Zellen wurden mit jeweils 1 µg/ml des entsprechenden Fusionsproteins für 1 h inkubiert und nach der Färbung der Zellen mit anti-CD178-Antikörper die durchflußzytometrische Analyse durchgeführt, die in den Histogrammen der Abbildung D23 dargestellt ist.

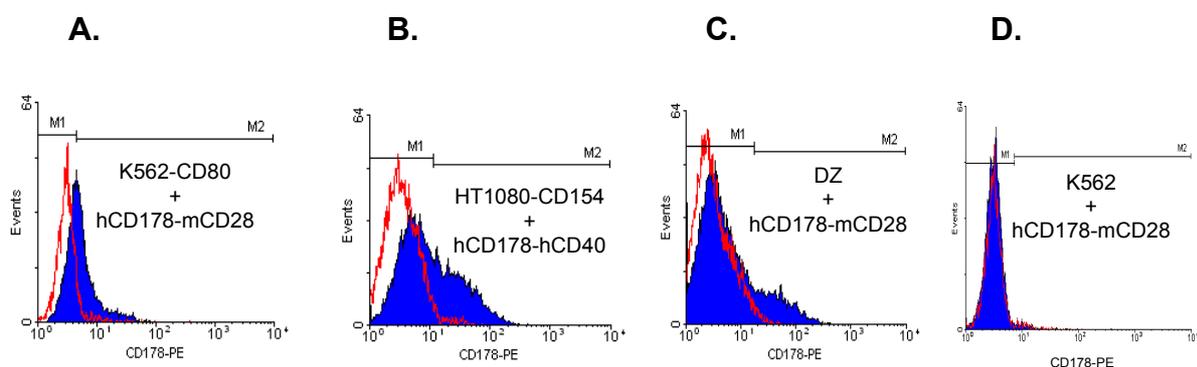


Abb. D23: Bindungsnachweis von hCD178-X-Fusionsproteinen an Zelloberflächenmolekülen.

Die Histogramme der durchflußzytometrischen Analyse zeigen die Bindung des Fusionsproteins hCD178-mCD28 auf K562-CD80-Transfektanten (Bild [A]) und auf DZ (Bild [C]) sowie von hCD178-hCD40 auf HT1080-CD154-Transfektanten (Bild [B]). Als Kontrolle dienten untransfizierte K562-Zellen (Bild [D]). Die blaue Kurve markiert dabei jeweils die Fluoreszenz von beladenen Zellen, die rote Kurve die Fluoreszenz von unbeladenen Zellen, die ebenfalls mit dem anti-CD178-Antikörper gefärbt wurden.

Wie in den Histogrammen in Abbildung D23 gezeigt, konnte die Bindung der Fusionsproteine auf der Zelloberfläche der CD80- bzw. CD40-Transfektanten sowie der DZ nachgewiesen werden. Die Fusionsproteine sind somit in der Lage, an ihren entsprechenden membrangebundenen Bindungspartnern auf den Zellen zu binden.

2.3. Bestimmung der CD178-X-Fusionsprotein Konzentrationen für *in-vitro*-Anwendungen

Um zu ermitteln, welche Konzentration der CD178-X-Fusionsproteine für eine wirksame Induktion des AICD in T-Zellen *in vitro* geeignet ist, wurden in allogenen MLRs CD90⁺ T-Zellen aus Balb/c Mäusen (H-2^d) mit DZ aus C57BL/6 Mäusen (H-2^b) in Anwesenheit verschiedener Konzentrationen der beiden Fusionsproteine hCD178-mCD28 und hCD178-hRANK stimuliert. Dies ist in Abbildung D24 dargestellt.

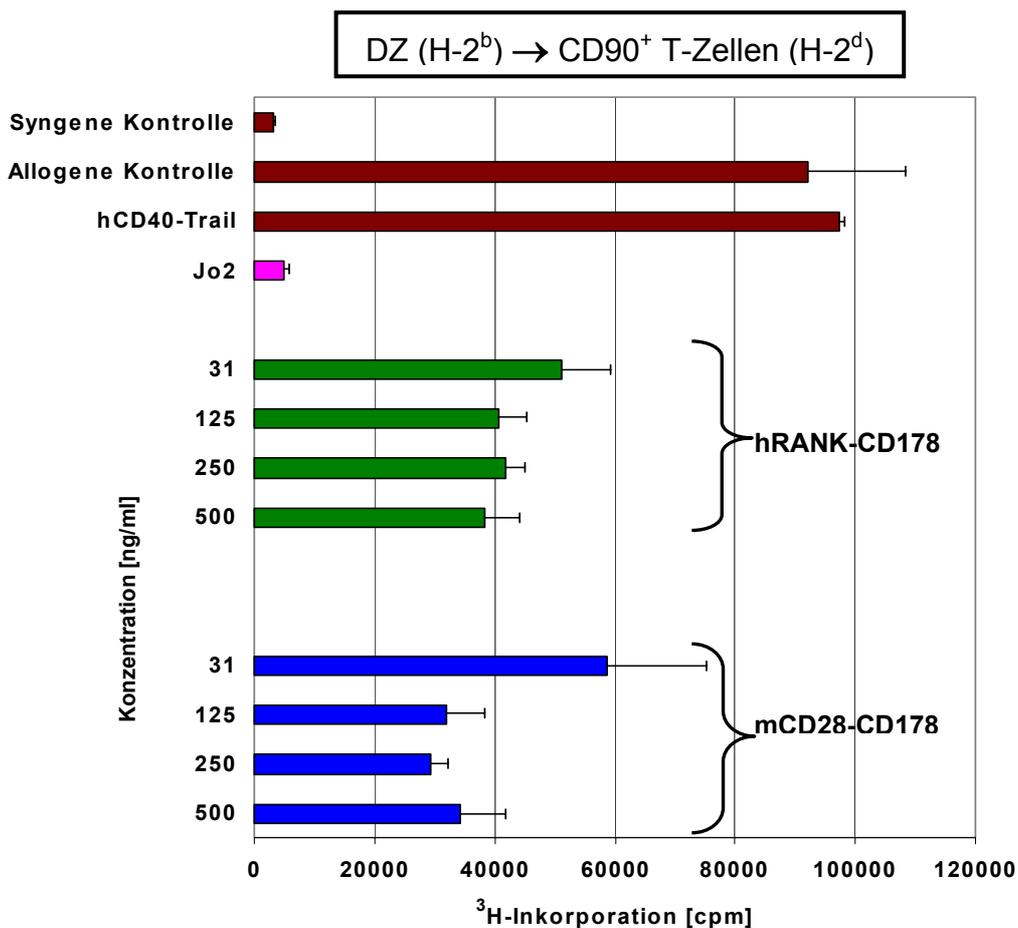


Abb. D24: Allogene MLR zur Bestimmung der wirksamen Fusionsproteinkonzentration. T-Zellen aus einer Balb/c-Maus (H-2^d) wurden mit DZ aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Fusionsproteine hCD178-mCD28 sowie hCD178-hRANK stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin nach 96 h gemessen. hCD40-TRAIL diente als irrelevantes Fusionsprotein. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Wie aus Abbildung D24 hervor geht, konnte die Proliferation alloreaktiver T-Zellen in Gegenwart der Fusionsproteine hCD178-mCD28 und hCD178-hRANK reduziert werden. In einer Titration konnte dabei mit einer Konzentration von mindestens 125ng/ml Fusionsprotein eine deutliche Reduktion der Alloreaktivität erreicht werden.

Bei niedrigeren Konzentration (wie z.B. 31ng/ml) konnte der inhibitorische Effekt der Fusionsproteine wieder austitriert werden. Da die Verwendung von 500 ng/ml zu keiner Steigerung der Effektivität führte, wurden bei allen nachfolgenden Experimenten die Fusionsproteine jeweils mit 250ng/ml eingesetzt, um in einem sättigenden Konzentrationsbereich zu arbeiten.

Neben den beiden bereits erwähnten Fusionsproteinen wurde in dieser MLR mit hCD40-hTRAIL auch ein irrelevantes Fusionsprotein als Spezifitätskontrolle verwandt, da TRAIL, ein Mitglied der TNF-Familie, in vielen Tumorzelllinien, jedoch nicht oder nur in viel geringerem Umfang in nicht-transformierten Zellen Apoptose induziert (Lunemann, J.D., et al., 2002). Mit hCD40-TRAIL konnte somit gezeigt werden, daß die Anwesenheit von gereinigtem Fusionsprotein per se keinen Einfluß auf die Proliferationseigenschaften der T-Zellen hatte. Darüber hinaus diente Jo2-Antikörper wieder als Positivkontrolle hinsichtlich der Suszeptibilität der T-Zellen für AICD unter den gegebenen Bedingungen.

2.4. Einfluß von hCD178-X-Fusionsproteinen auf die Alloreaktivität von T-Zellen in einem MHC-disparaten System

Im Folgenden wurden Fusionsproteine getestet, in denen hCD178 mit mCD28, hRANK, hCD152 und hIL-2 fusioniert worden war. Hierzu wurden wieder in allogenen MLRs gereinigte CD90⁺ T-Zellen mit MHC-disparaten DZ in Gegenwart dieser Fusionsproteine stimuliert. Dabei dienten syngene bzw. allogene Stimulatoren sowie das irrelevante Fusionsprotein hCD40-hTRAIL als entsprechende Kontrollen. Der als Medienkontrolle bezeichnete Ansatz enthielt alle Agenzien und Puffer, in denen die Fusionsproteine nach der Aufreinigung mittels Dialyse gelöst sind. Die Ergebnisse dieser MLR sind in Abbildung D25 aufgeführt.

In Gegenwart der Fusionsproteine CD178-mCD28, -hRANK sowie -hCD152 zeigten die T-Zellen nach Stimulation mit MHC-disparaten DZ im Proliferationstest eine um mehr als 60% verminderte Alloreaktivität. Im Falle des hRANK-Fusionsproteins wurde eine über 75 %ige Reduktion erreicht. Im Gegensatz dazu hatte hCD178-hIL-2 keinen negativen Effekt auf die T-Zell-Proliferation im Vergleich zur allogenen Kontrolle.

Keines der Fusionsproteine erreichte eine Inhibition, die mit dem agonistischen anti-CD95-Ak Jo2 vergleichbar war.

Das irrelevante Fusionsprotein hCD40-TRAIL wie auch die Medienkontrolle führten in diesem Experiment zu keiner Beeinflussung des T-Zell-Wachstums.

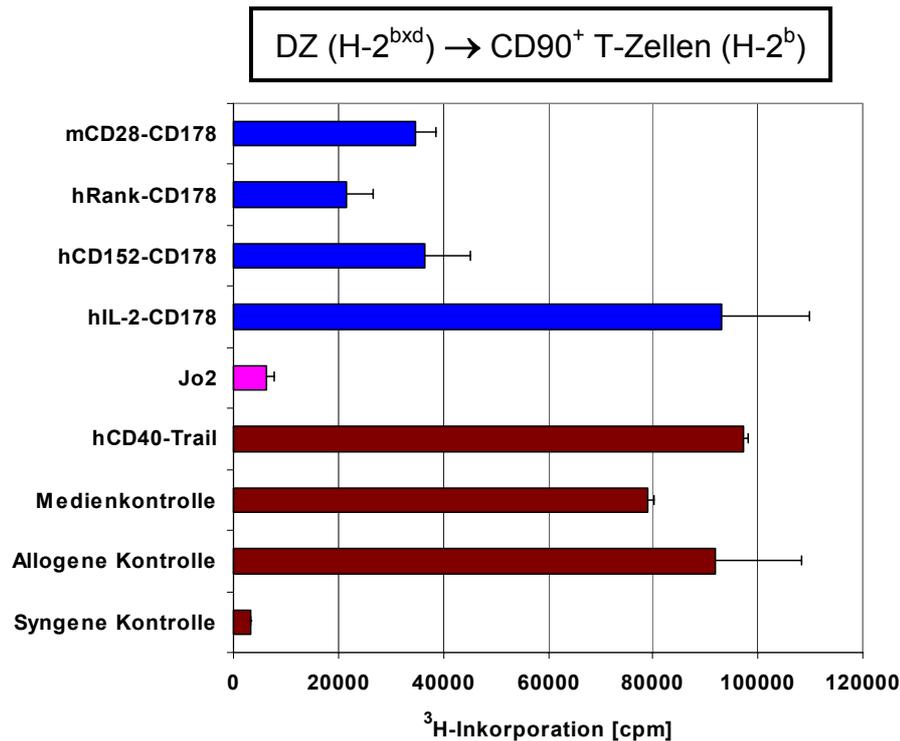


Abb. D25: Wirkung von hCD178-X-Fusionsproteinen auf alloreaktive, MHC-disparate T-Zellen. T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) wurden mit DZ aus einer F₁-Maus (H-2^{bxd}) in Gegenwart der Fusionsproteine hCD178-mCD28, hCD178-hRANK, hCD178-hCD152 sowie hCD178-hIL-2 (je [250ng/ml]) stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin nach 96 h gemessen. Als Vergleich für die Induktion von AICD diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2 ([200ng/ml]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

In weiteren Untersuchungen wurde die in Abbildung D25 dargestellte MLR wiederholt und die T-Zell-Proliferation in einer Kinetik über einen Zeitraum von sieben Tagen beobachtet. Diese in Abbildung D26 illustrierte Proliferationskinetik zeigte für die beiden Fusionsproteine hCD178-mCD28 und hCD178-hCD152 über den gesamten Beobachtungszeitraum vergleichbare Ergebnisse zu Abbildung D25. Für das hCD178-hIL2-Fusionsprotein konnte über einen Zeitraum von 7 Tagen keine reduzierte Alloreaktivität festgestellt werden. Vielmehr war das Proliferationsniveau dieser T-Zellen an Tag 5 auf dem Niveau der T-Zellen der allogenen Stimulationskontrolle und stieg darüber hinaus bis an Tag 7 noch beträchtlich an. Das hCD178-hIL-2-Fusionsprotein scheint daher ungeeignet, die Proliferation alloreaktiver T-Zellen über AICD zu inhibieren. Es führt offensichtlich durch Bindung von IL-2 an den IL-2 Rezeptor zur verstärkten Aktivierung der T-Zellen, die nicht über CD178 neutralisiert werden kann. Daher wurde es nicht weiter für Untersuchungen zur T-Zell-Deletion eingesetzt.

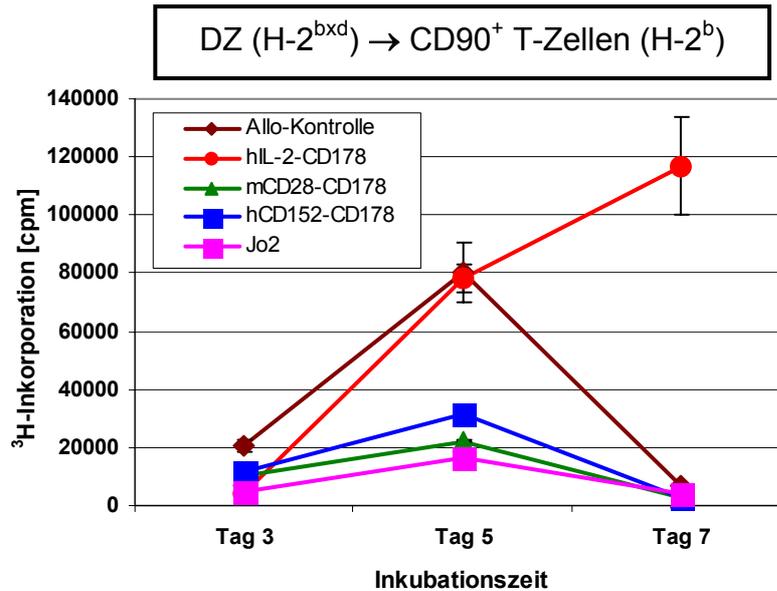


Abb. D26: Proliferationskinetik für allogene stimulierte T-Zellen in Gegenwart von hCD178-hIL-2-Fusionsprotein. T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus ($H-2^b$) wurden mit DZ aus einer F_1 -Maus ($H-2^{bxd}$) in Gegenwart der Fusionsproteine hCD178-hIL-2, hCD178-mCD28 sowie hCD178-hCD152 (je [250ng/ml]) stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von 3H -markiertem Thymidin nach 3, 5 und 7 Tagen gemessen. Als Vergleich für die Induktion von AICD diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2 ([200ng/ml]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

2.5. Einfluß von hCD178-X-Fusionsproteinen auf die Alloreaktivität von T-Zellen in einem minor-Histokompatibilitätsantigen- (mHAg) disparaten System

Da aus Sicht der allogenen Blutstammzelltransplantation MHC-ident, jedoch mHAg-disparate Spender-Empfänger-Systeme eine größere klinische Relevanz als MHC-disparate Systeme besitzen, wurde die Möglichkeit zur Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten mittels hCD178-X-Fusionsproteinen auch in einem MHC-identen, mHAg-disparaten Mausmodell untersucht. Hierzu wurden DZ aus dem Knochenmark einer DBA/2-Maus mit dem Haplotyp $H-2^d$ generiert und diese zur Stimulation von T-Zellen einer Balb/c-Maus mit dem gleichen Haplotyp in einer MLR eingesetzt. In diesem Modell werden T-Zellen durch zwischen den beiden Mausstämmen existierenden unterschiedlichen mHAg stimuliert. Für die Deletion der Alloreaktivität wurden die an die kostimulatorischen Moleküle der DZ bindenden Fusionsproteine hCD178-hCD152 und hCD178-mCD28 sowie der agonistische Antikörper Jo2 verwendet. Die Daten dieser MLR sind in Abbildung D27 gezeigt.

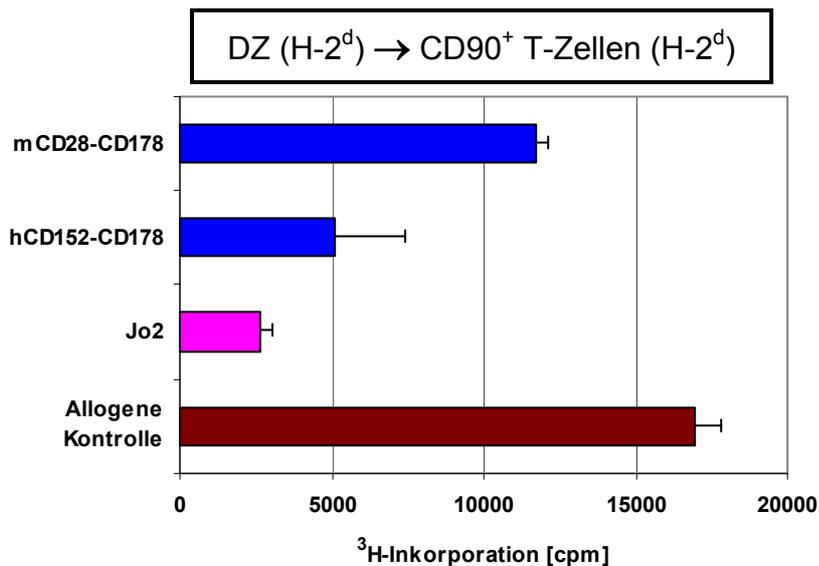


Abb. D27: Wirkung von hCD178-X-Fusionsproteinen auf MHC-identen, mHAg-disparaten T-Zellen. T-Zellen aus einer Balb/c-Maus (H-2^d) wurden mit DZ aus einer DBA/2-Maus (H-2^d) in Gegenwart der Fusionsproteine hCD178-mCD28 und hCD178-hCD152 (je [250ng/ml]) stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin nach 96 h gemessen. Als Vergleich für die Induktion von AICD diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2 ([200ng/ml]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Wie bereits im MHC-disparaten System konnte auch hier mit dem Antikörper Jo2 die Proliferation der allogehen T-Zellen am stärksten reduziert werden. Eine Reduktion der T-Zell-Proliferation war auch in Anwesenheit der beiden verwendeten Fusionsproteine nachweisbar. So konnten allogene Immunantworten unter Verwendung von sowohl hCD178-hCD152 als auch hCD178-mCD28 um etwa 30% reduziert werden.

2.6. Stimulation alloreaktiver T-Zellen mit DZ nach Transfektion hCD178-X-Fusionsprotein-kodierender mRNA

Ausgehend von den entsprechenden DNA-Konstrukten wurden die für die Fusionsproteine hCD178-mCD28 und hCD178-hRANK entsprechenden mRNA-Moleküle *in vitro* synthetisiert. Damit sollte untersucht werden, ob DZ, welche nach Transfektion mit mRNA hCD178-mCD28 bzw. hCD178-hRANK exprimieren, in gleichem Maße zur Inhibition von alloreaktiven T-Zellen verwendet werden können wie Fusionsprotein-beladene DZ. Direkt im Anschluß an die Elektroporation wurden die DZ in einem allogehen Proliferationstest eingesetzt. Als allogene Stimulationskontrolle dienten wieder DZ, die der Elektroporationsprozedur unterzogen wurden, aber keine mRNA erhielten (Mock-DZ). Als Vergleichskontrolle

für die Induktion von AICD wurde SuperFasL eingesetzt. Abbildung D28 zeigt die Resultate dieser MLR.

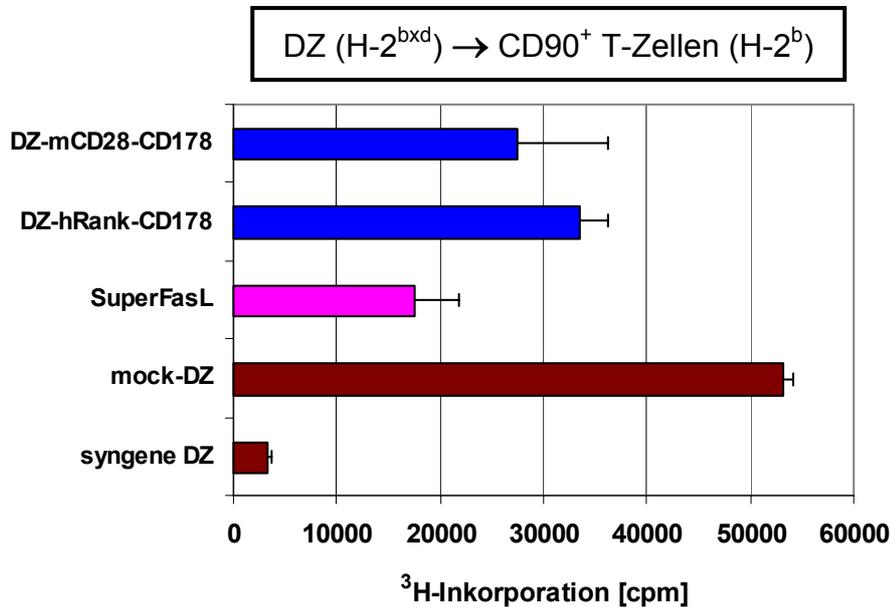


Abb. D28: Wirkung von hCD178-X-Fusionsprotein-mRNA transfizierten DZ auf alloreaktive T-Zellen. T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) wurden mit Fusionsprotein-mRNA-transfizierten DZ aus einer F₁-Maus (H-2^{bxd}) stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin nach 96 h gemessen. Als Vergleich für die Induktion von AICD diente SuperFasL ([10ng/ml]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Die Ergebnisse der in Abbildung D28 dargestellten MLR zeigen, dass mit den beiden mRNA-Transfektanten die Proliferation der alloreaktiven T-Zellen reduziert werden konnte, jedoch nicht so stark wie bei der Beladung der DZ mit den Fusionsproteinen. Mit den hCD178-mCD28-Transfektanten konnte die größte Reduktion von etwa 50 % im Vergleich mit der allogenen Kontrolle erzielt werden. Für die hCD178-hRANK-Transfektanten lag die Reduktion bei etwa 40%.

2.7. Ist die Reduktion von Alloreaktivität durch hCD178-X-Fusionsproteine auf AICD zurückzuführen?

Die in Abb. D22 illustrierte Hypothese für die Funktionsweise der CD178-X-Fusionsproteine geht davon aus, daß diese an Oberflächenstrukturen der DZ oder der T-Zellen binden und nach Aktivierung AICD in alloreaktiven T-Zellen über die Interaktion des Fusionspartners CD178 mit CD95 auslösen. Die Bindung eines antagonistischen anti-CD178-Antikörpers (NOK1) an den CD178-Molekülteil der

Fusionsproteine würde demnach die CD95-CD178-Interaktion blockieren und die Wirkung der Fusionsproteine inhibieren. Für die experimentelle Bestätigung dieser Hypothese wurden daher wieder im Rahmen einer allogenen MLR T-Zellen mit Fusionsproteinen behandelt, und zwar in Gegenwart bzw. Abwesenheit von NOK1-Antikörper. Dies ist in Abbildung D29 gezeigt.

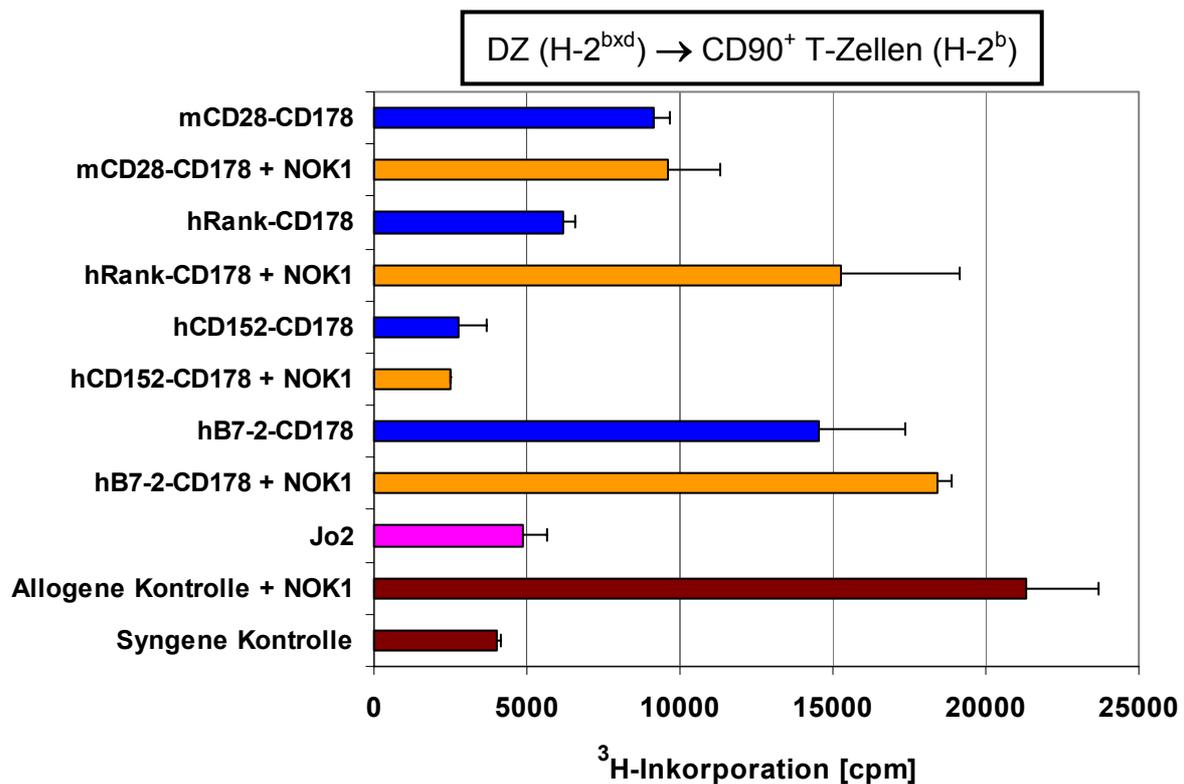


Abb. D29: Inhibition von hCD178-X-Fusionsproteinen mit antagonistischem anti-CD178-Antikörper (NOK1). T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus ($H-2^b$) wurden mit DZ aus einer F_1 -Maus ($H-2^{bxd}$) in Gegenwart von Fusionsproteinen (je [250ng/ml]) mit oder ohne NOK1-Antikörper [1 μ g/ml] stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von 3H -markiertem Thymidin nach 96 h gemessen. Als Vergleich für die Induktion von AICD diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2 ([200ng/ml]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Während bei den an T-Zellen bindenden Fusionsproteinen hCD178-hRANK und hCD178-hB7-2 die Wirkung von CD178 mit dem NOK1-Antikörper inhibiert werden konnte, gelang dies nicht für die an die kostimulatorischen Moleküle der DZ bindenden Fusionsproteine hCD178-hCD152 und hCD178-mCD28. Dort war in Gegenwart des NOK1-Antikörpers keinerlei Reversion der Proliferationsreduktion erkennbar. Diese Ergebnisse wiesen darauf hin, daß solche CD178-X-Fusionsproteine, die an kostimulatorische Moleküle auf DZ binden, partiell über AICD die T-Zell-Proliferation unterbinden und darüber hinaus Kostimulation von T-Zellen über z.B. CD28 inhibieren.

2.7.1. Inhibieren CD80/86-bindende hCD178-X-Fusionsproteine die Kostimulation zwischen DZ und T-Zelle?

Für die experimentelle Untersuchung der durch das vorangegangene Experiment aufgeworfenen Frage wurde ein weiterer allogener Proliferationstest mit T-Zellen aus einer CD95-defizienten MRL/lpr-Maus durchgeführt. In diesen T-Zellen dürfte für den Fall der Inhibition kostimulatorischer Signale durch an CD80/86 bindendes hCD178-CD28 ebenfalls eine AICD-unabhängige Proliferationsinhibition zu erwarten sein. Das Experiment ist in Abbildung D30 dargestellt.

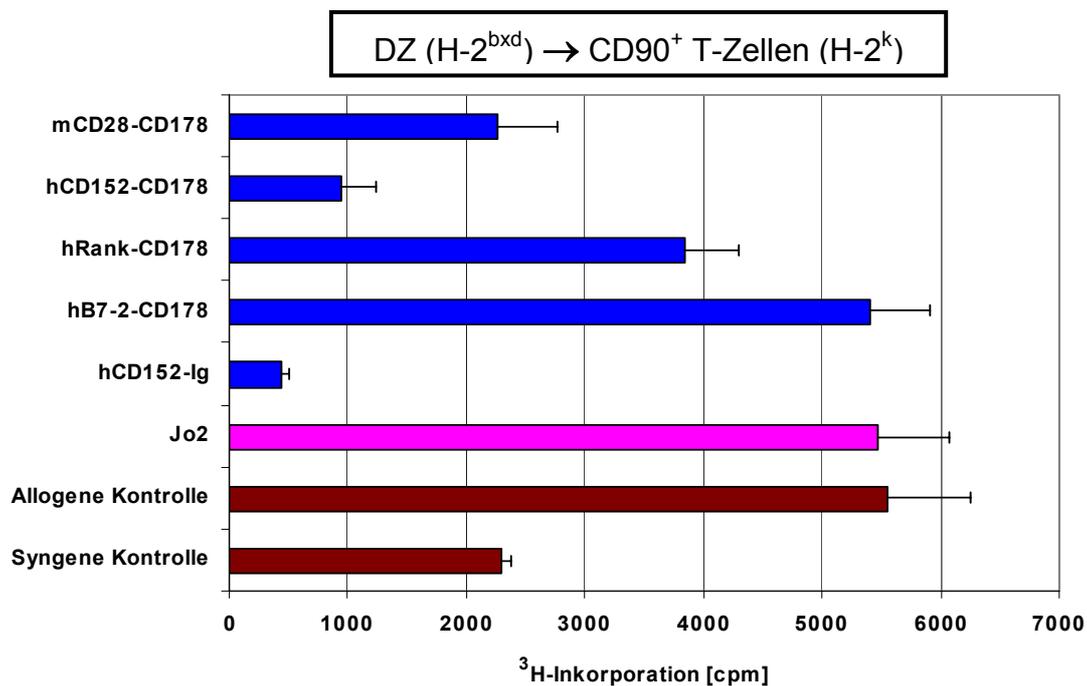


Abb. D30: Einfluß von CD80/CD86-bindenden hCD178-X-Fusionsproteinen auf die Kostimulation. T-Zellen einer CD95-defizienten MRL/lpr-Maus ($H-2^k$) wurden mit DZ aus einer F_1 -Maus ($H-2^{bxd}$) in Gegenwart von Fusionsproteinen (je [250ng/ml]) stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von 3H -markiertem Thymidin nach 96 h gemessen. Als Kontrolle für die Induktion von AICD diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2 ([200ng/ml]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Der in diesem Experiment mitgeführte Ansatz, in dem die T-Zellen in Gegenwart von Jo2-Antikörper stimuliert wurden, zeigt, daß die verwendeten T-Zellen nicht suszeptibel für CD95-medierten AICD waren. In Gegenwart von hCD178-B7-2-Fusionsprotein, das an CD28 auf T-Zellen bindet, war keinerlei Proliferationsreduktion erkennbar. Für das ebenfalls auf T-Zellen bindende hCD178-hRANK-Fusionsprotein war eine geringe Reduktion der T-Zell-Proliferation zu verzeichnen. Wesentlich stärker fiel diese für die beiden an CD80/86 bindenden Fusionsproteine hCD178-hCD152 und hCD178-mCD28 aus. Diese beiden APZ-

seitig bindenden Fusionsproteine scheinen tatsächlich einen inhibierenden Effekt auf die Kostimulation zwischen DZ und T-Zellen auszuüben.

2.8. Wie effizient ist die Inhibition der Alloreaktivität durch hCD178-X-Fusionsproteine?

In den bisherigen Untersuchungen konnte demonstriert werden, dass CD178-X-Fusionsproteine die Proliferation alloreaktiver T-Zellen in einer allogenen MLR reduzierten. In dem nachfolgend in Abbildung D31 aufgeführten Experiment wurde nun analysiert, in welchem Umfang diese Inhibition zur Deletion bzw. funktionellen Inaktivierung alloreaktiver T-Zellen führt bzw. wie viele der residuellen T-Zellen danach noch Alloreaktivität zeigen. Dies wurde durch Restimulation der T-Zellen mit Alloantigen in einer sogenannten sekundären MLR ermittelt und diente als Maßstab für die Effizienz der Inhibition *in vitro* (Abb. D31).

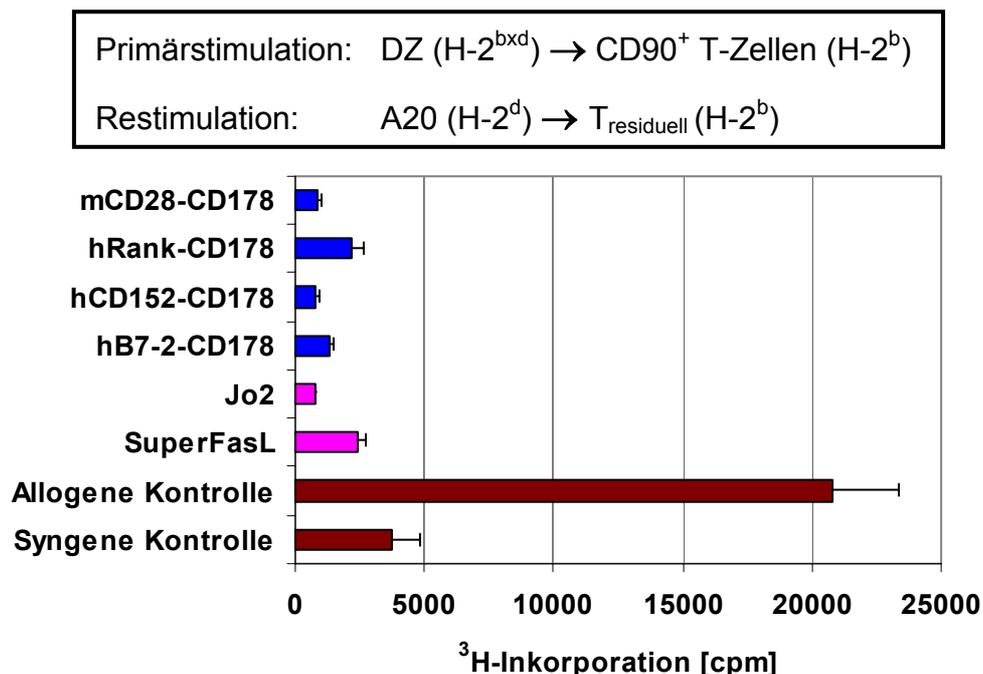


Abb. D31: Untersuchung der residuellen Alloreaktivität nach Deletion alloreaktiver T-Zellen mit hCD178-X-Fusionsproteinen. T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) wurden mit DZ aus einer F₁-Maus (H-2^{bxd}) stimuliert und durch hCD178-X-Fusionsproteine (je [250ng/ml]) depletiert. Als Vergleich für die Induktion von AICD dienen der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2 ([200ng/ml]) und SuperFasL [10ng/ml]. Die residuellen T-Zellen wurden nach 96 h in einer Sekundärstimulation mit A20-Zellen (H-2^d) restimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin gemessen. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Im Rahmen einer Primärstimulation wurden zunächst alloreaktive T-Zellen in 6-Loch-Platten in Gegenwart verschiedener Fusionsproteine mit allogenen DZ für 96 h

stimuliert und anschließend die noch vorhandenen T-Zellen ($T_{\text{residuell}}$) geerntet. Diese T-Zellen wurden nun in einer Sekundärstimulation in 96-Loch-Platten mit dem Primärantigen (H-2^d) restimuliert. Dazu wurden A20-Zellen als Effektor-Zellen eingesetzt. Gemessen wurde wieder Proliferation durch Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin in DNA. Als Deletionskontrollen wurden die beiden AICD-Induktoren Jo2 und SuperFasL verwendet. Die in Abbildung D31 gezeigten Ergebnisse der Sekundärstimulation residueller T-Zellen wiesen für die mit hCD178-X-Fusionsproteinen vorbehandelten T-Zellen nur noch eine Proliferation von ca. 10% gegenüber der allogenen Stimulationskontrolle auf und war damit vergleichbar mit der Inhibition der durch Jo2-Antikörper bzw. SuperFasL vorbehandelten T-Zellen.

Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, dass CD178-X-Fusionsproteine in vergleichbarer Weise zu den bekannten Inhibitoren anti-CD95-Ak oder SuperFasL in der Lage waren, eine über MHC-Alloantigen induzierte Alloreaktivität effizient zu reduzieren.

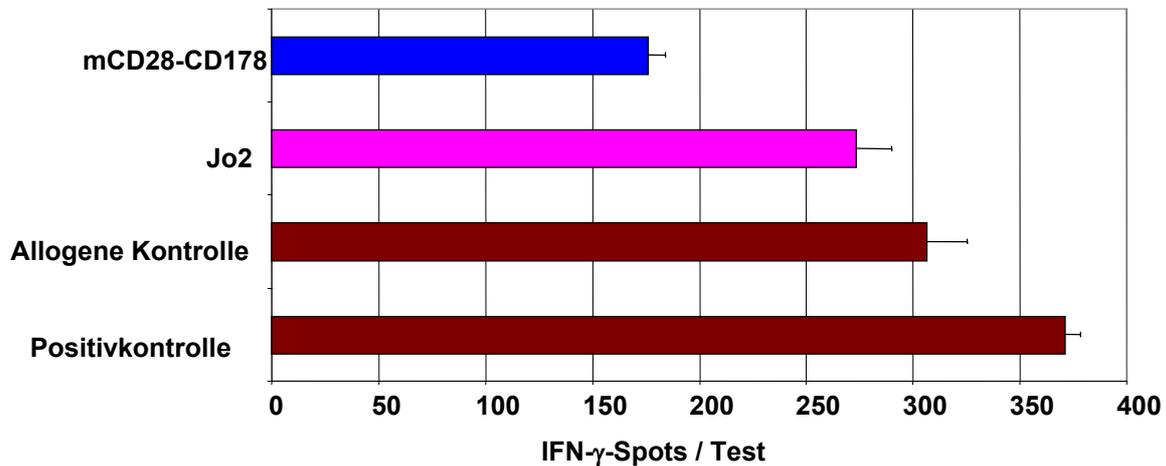
2.9. Spezifität der Deletion alloreaktiver T-Zellen durch hCD178-X-Fusionsproteine

Infolge des mit Chemotherapie bzw. Bestrahlung etc. verbundenen Verlustes der patienteneigenen Immunität stellen neben der GvHD insbesondere opportunistische Infektionen, beispielsweise durch Zytomegalovirus (CMV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV), ein häufiges Problem in der Blutstammzelltransplantation dar. Daher ist es im Hinblick auf eine klinische Anwendung einer Deletionsstrategie wichtig, nicht nur antileukämische sondern auch virale Antigenespezifitäten zu erhalten. In dieser Arbeit wurde zur Frage nach der Spezifität der zuvor gezeigten Deletionsstrategien der Erhalt von Ovalbumin (OVA)-spezifischen T-Zellen (T_{OVA}) nach Elimination alloreaktiver T-Lymphozyten untersucht. Dazu wurden zu T-Lymphozyten aus C57BL/6 Mäusen (H-2^b) 20% OVA-spezifische, CD8⁺ T-Zellen aus TZR-transgenen Mäusen (ebenfalls H-2^b) zugegeben und diese Zielzellen mit allogenen DZ (H-2^{bxd}) in An- bzw. Abwesenheit von CD178-CD28 bzw. anti-CD95-Ak (Jo2) stimuliert. Nach Deletion von Alloreaktivität wurden die residuellen T-Zellen mit MHC-identen, OVA-exprimierenden Tumorzellen (EL4G7_{OVA}, H-2^b) restimuliert und die Präsenz von T_{OVA} über ihre IFN- γ Sekretion nach Erkennung des OVA-Antigens mittels einer IFN- γ -Elispot-Analyse überprüft. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in den Abbildungen D32A und B aufgeführt.

A.

Primärstimulation: DZ (H-2^{bxd}) → CD90⁺ T-Zellen (H-2^b) + T_{OVA} (H-2^b)

Restimulation: EL4G7_{OVA} (H-2^b) → T_{residuell, OVA} (H-2^b)



B.

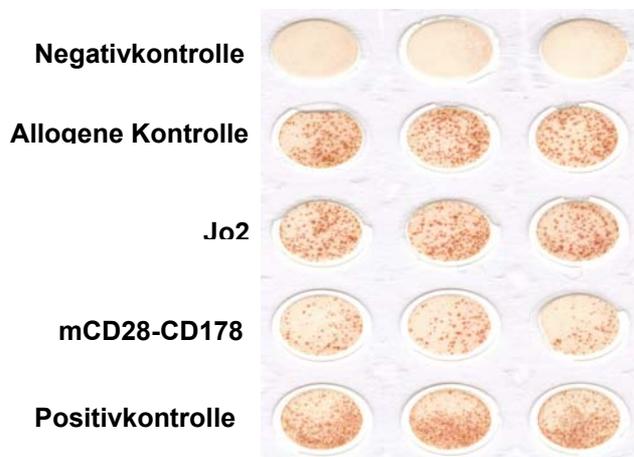


Abb. D32: IFN- γ -ELISpot: Erhalt von Antigen-spezifitäten nach Deletion alloreaktiver T-Zellen mit hCD178-X-Fusionsprotein. T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b), gemischt mit 25% T_{OVA} (H-2^b), wurden mit DZ aus einer F₁-Maus (H-2^{bxd}) stimuliert und durch hCD178-mCD28-Fusionsprotein [250ng/ml] deletiert. Kontrolle für die AICD-Induktion war Jo2-Antikörper [200ng/ml]. Die residuellen T-Zellen wurden nach 96 h in einer Sekundärstimulation mit EL4G7_{OVA}-Zellen (H-2^b) restimuliert und die IFN- γ -Produktion durch CD8⁺ T_{OVA} ermittelt. Bild [A] zeigt graphisch die mit dem ELISpot-Reader gezählte Spotzahl, Bild [B] die auf dem Nitrozellulosefilter entwickelten Spots. Als Positivkontrolle dienten reine CD8⁺ T_{OVA}, die Negativkontrolle enthielt keine T-Zellen.

Wie die Auswertung der IFN- γ -ELISpot-Analyse zeigt, blieben nach der Deletion alloreaktiver T-Zellen sowohl mit Jo2-Antikörper als auch mit dem hCD178-mCD28-Fusionsprotein OVA-spezifische T-Zellen erhalten. Dabei konnten nach Behandlung mit Jo2-Antikörper vergleichbar viele IFN- γ -Spots wie in der allogenen Kontrolle detektiert werden. Die mit Fusionsprotein vorbehandelte Zellpopulation zeigte einen

Verlust an OVA-Spezifität gegenüber der Kontrolle, aber es wurde mit einer Spotanzahl von mehr als 50% signifikant OVA-Spezifität nachgewiesen.

2.10. Adoptive T-Zell-Transferexperimente nach *in-vitro*-Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten

Nach Abschluss der *in vitro* Untersuchungen sollte abschließend durch adoptive Transfer-Experimente in einem murinen GvHD-Modell untersucht werden, inwiefern Spenderlymphozyten nach selektiver Deletion alloreaktiver T-Zellen mit hCD178-X-Fusionsproteinen bzw. Jo2-Antikörper *in vitro* noch in der Lage waren, GVHD im Tiermodell zu induzieren. Dies ist beispielhaft für das MHC-disparate System in Abbildung D33 skizziert.

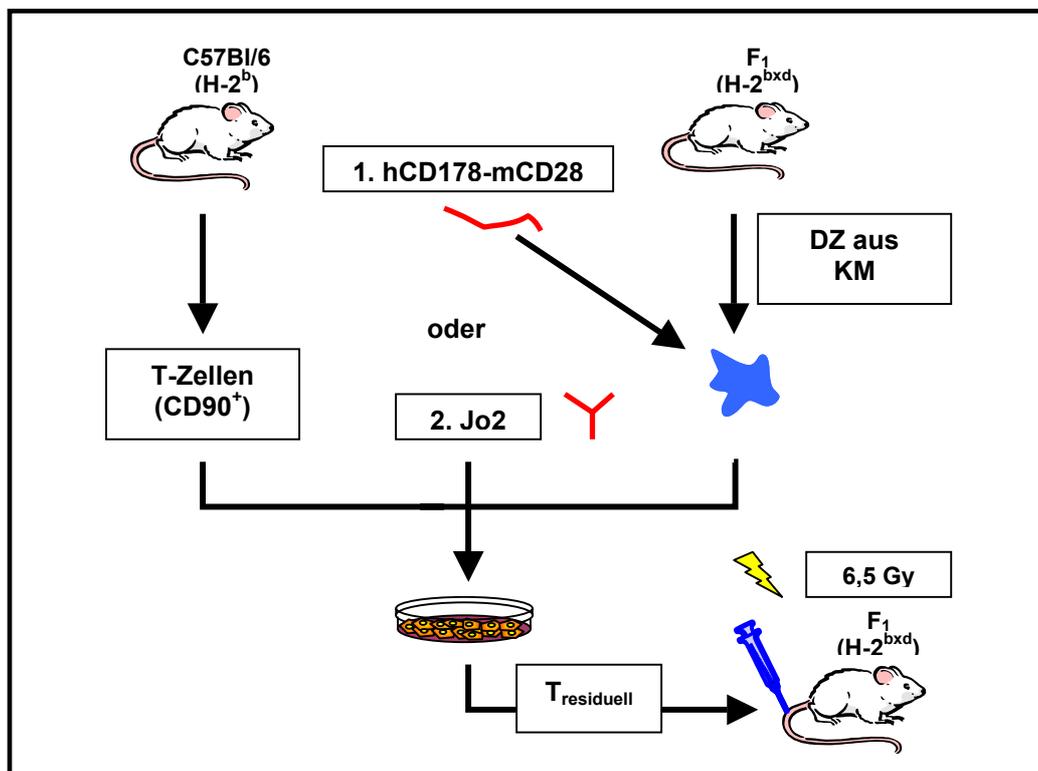


Abb. D33: Schematische Darstellung der *in-vitro*-Deletion mit anschließendem adoptivem T-Zell-Transfer. T-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) wurden mit aus dem Knochenmark (KM) einer F₁-Maus (H-2^{bxd}) generierten DZ *in vitro* stimuliert. Für die Deletion alloreaktiver T-Zellen wurden die DZ entweder mit hCD178-mCD28-Fusionsprotein [250ng/ml] beladen oder alternativ agonistischer anti-CD95-Antikörper (Jo2; [200ng/ml]) zugegeben. Nach 96 h wurden die lebenden residuellen T-Zellen (T_{residuell}) in mit 6,5 Gy subletal bestrahlte F₁-Mäuse i.v. injiziert.

Für diese adoptiven T-Zell-Transferexperimente wurden zunächst DZ aus dem Knochenmark einer Maus des Rezipientenstammes generiert. Die T-Zell-Deletion erfolgte in einer 6-Loch-Platte entweder über das hCD178-mCD28-Fusionsprotein

oder aber über Jo2-Antikörper. Die T-Zellen wurden mittels MACS aus der Milz einer Donor-Maus isoliert und für etwa 96 h in der 6-Loch-Platte mit den allogenen DZ stimuliert. Am Ende der Deletionszeit wurden die lebenden residuellen T-Zellen geerntet und jeweils $2,5 \cdot 10^6$ T-Zellen pro Maus in die Schwanzvene von Rezipientenmäusen injiziert, die zuvor mit 6,5Gy subletal bestrahlt worden waren. Die Bestrahlung der Mäuse diente zur Simulation des in der Einleitung beschriebenen inflammatorischen Milieus, welches die Entstehung einer GvHD begünstigt. Empfängertiere, die allogene stimulierte unbehandelte Donor-T-Zellen erhielten, dienten als Kontrolle. Darüber hinaus wurde in eine Kontrollgruppe von bestrahlten Mäusen Donor-T-Zellen injiziert, die zum Spezifitätsnachweis mit dem irrelevanten Fusionsprotein mCD28-TRAIL behandelt worden waren. Auch hier sollte GvHD induziert werden, da dieses Fusionsprotein keine Alloreaktivität inhibiert.

Die Beurteilung der Entstehung von GvHD erfolgte durch Untersuchung der Mäuse. Typische Anzeichen einer akuten GvHD bei Mäusen sind dabei eine stark verminderte Vitalität, ein struppiges Fell, eine im Vergleich zu gesunden Tieren untypisch stark gekrümmte Körperhaltung, rascher Gewichtsverlust und Diarrhöe. Unbehandelt führt diese Erkrankung zum Tod der Tiere zwischen Tag 11 und 20 nach adoptivem Transfer. Für jedes Tier wurde in regelmäßigen Abständen das Gewicht kontrolliert und das Versterben eines Tieres sowie die Zeit zwischen der T-Zell-Injektion und dem Todeszeitpunkt protokolliert. Tiere, deren Allgemeinzustand sehr kritisch war, wurden vorzeitig getötet. Anhand der eingetretenen Todesereignisse wurden Kaplan-Meier-Überlebenskurven angefertigt und hieraus die Überlebensrate der einzelnen Mausgruppen bestimmt.

Die T-Zell-Transferexperimente wurden in einem MHC-disparaten Mausmodell durchgeführt, in dem C57BL/6-Mäuse (H-2^b) als Donoren und F₁-Mäuse (Balb/c x C57BL/6; H-2^{bx^d}) als Rezipienten verwendet wurden. Weiterhin wurde ein klinisch relevanteres mHAg-disparates Mausmodell angewandt mit Balb/c-Mäusen (H-2^d) als T-Zell-Donoren und DBA/2-Mäusen (H-2^d) als Rezipienten. Die Ergebnisse der T-Zell-Transferexperimente sind in den Kaplan-Meier-Kurven der Abbildungen D34A und B aufgeführt.

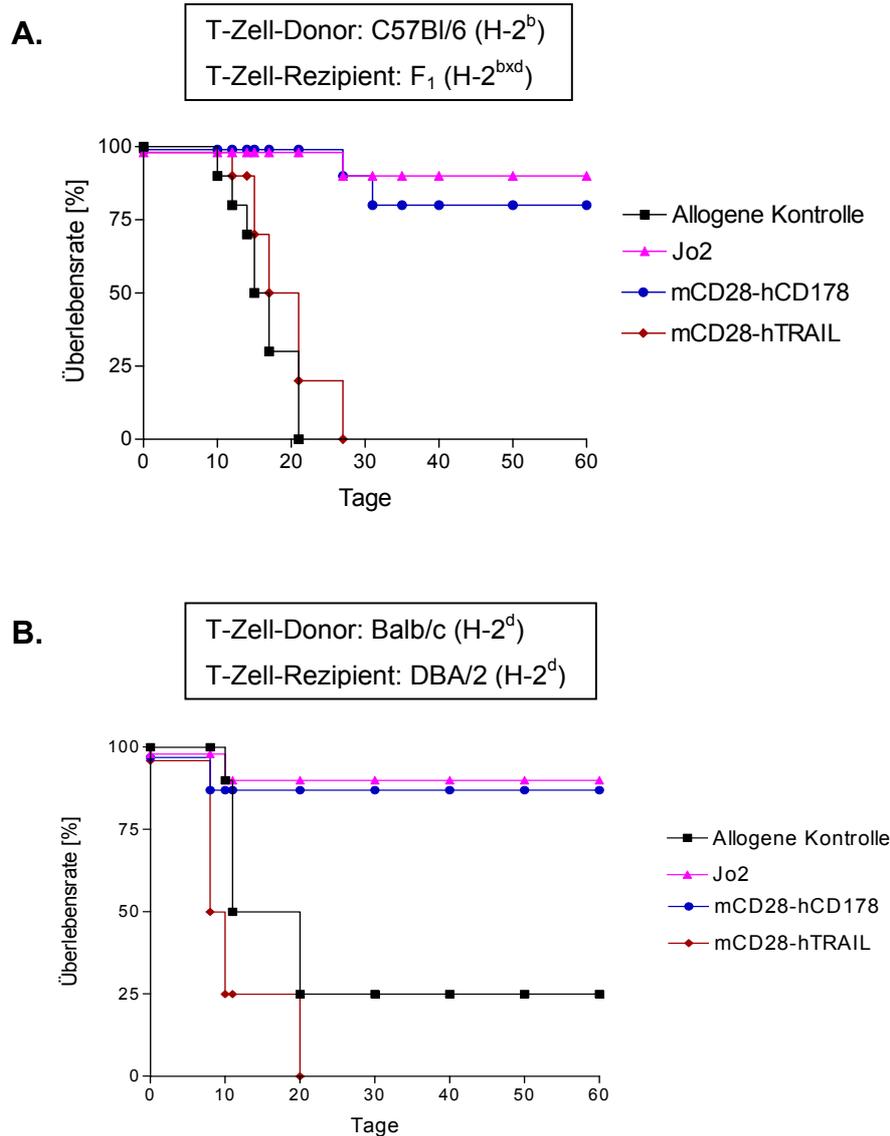


Abb. D34: Kaplan-Meier-Kurven für adoptiven T-Zell-Transfer in allogene Rezipienten. Dargestellt ist die Überlebensrate der jeweiligen T-Zell-Rezipienten für das MHC-disparate System (Bild [A]) sowie für das mHAg-disparate System (Bild [B]) gegen die Zeit, gerechnet ab Injektion der T-Zellen. Der T-Zell-Transfer erfolgte nach *in-vitro*-Deletion der alloreaktiven T-Zellen mit entweder hCD178-mCD28-Fusionsprotein oder agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2) in mit 6,5Gy subletal bestrahlte Rezipienten. Darüber hinaus wurden in Kontrollgruppen allogenen stimulierten bzw. mit irrelevantem mCD28-hTRAIL-Fusionsprotein (Spezifitätskontrolle) behandelte T-Zellen injiziert. Für [A] betrug n=10, für [B] war n=4.

Wie aus den Abbildungen D34A und B hervor geht, war die Überlebensrate für subletal bestrahlte Rezipienten, die T-Zellen aus den beiden Deletionsansätzen injiziert bekamen, sehr hoch. In beiden Versuchsgruppen, also sowohl im MHC- als auch im mHAg-disparaten System lebten rund 80% der Mäuse 60 Tage und mehr nach T-Zelltransfer. Im Gegensatz dazu verstarben die Mäuse der allogenen Kontrollgruppe sowie der Spezifitätsgruppe an einer akuten GvHD zwischen Tag 10

und Tag 30 nach T-Zell-Injektion. Damit konnte auch *in vivo* gezeigt werden, daß die *in-vitro*-Deletion alloreaktiver T-Zellen mit hCD178-mCD28-Fusionsprotein bzw. mit Jo2-Ak zu einer hohen Überlebensrate ohne erkennbare Anzeichen einer GvHD führt. Beim mHA_g-disparaten System entwickelten 25% der Versuchstiere der allogenen Kontrollgruppe auch Anzeichen einer chronischen GvHD (starker Gewichtsverlust), ohne daran innerhalb des Beobachtungszeitraumes zu versterben.

2.11. Chimärismusanalyse

Um zu überprüfen, ob die Rezipientenmäuse nach adoptivem T-Zell-Transfer einen T-Zell-Chimärismus entwickelten, d.h. überwiegend oder ausschließlich Zellen vom Donor im Blut bzw. in den sekundären lymphoiden Organen präsent waren, wurde eine Chimärismusanalyse durchgeführt. Verwendet wurden hierbei T-Zellen aus einer transgenen GFP-Maus (H-2^b), um die transferierten T-Zellen von den originären T-Zellen der Rezipienten abgrenzen zu können. An Tag 7 und 14 nach dem T-Zell-Transfer wurden je einer Maus pro Kontrollgruppe Blut, Milz und Lymphknoten entnommen, aus den Organen Einzelzellsuspensionen hergestellt und die Zellen mit anti-CD3-PE-Antikörper markiert. Die Analyse auf GFP- und CD3-positive Zellen erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Für beide Zeitpunkte der Analyse ergab sich ein identisches Bild, welches in Abb. D35 für Tag 14 dargestellt ist.

Sowohl die Mäuse, die depletierte T-Zellen erhielten als auch die Mäuse der allogenen Kontrollgruppe zeigten primär eine Präsenz von Donor T-Zellen in allen drei untersuchten Organen. Dabei war bei allen drei Mausgruppen der Anteil der GFP⁺ T-Zellen im Blut höher als in den lymphatischen Organen. Erwartungsgemäß war der Anteil an allogenen T-Zellen in den Rezipienten, die unbehandelte und allogene vorstimulierte T-Zellen injiziert bekommen hatten, in allen drei untersuchten Organen am größten. Die geringste Anzahl an GFP⁺ T-Zellen wurde in Mäusen gefunden, in die mit Jo2-Antikörper behandelte T-Zellen transferiert worden waren. Demgegenüber lag der Anteil GFP⁺ T-Zellen in den lymphatischen Organen der Rezipienten, die mit Fusionsprotein deletierte T-Zellen erhalten hatten, um ca. 10% höher. Entsprechend wiesen diese Tiere auch einen wesentlich höheren Anteil GFP⁺ T-Zellen im Blut auf.

Diese Ergebnisse unterstützten damit die unter D2.7 beschriebenen Daten, da CD178-X Fusionsproteine offenbar nicht nur alloreaktive T-Zellen deletieren, sondern in einen Zustand der funktionellen Inaktivierung (Anergie) bringen.

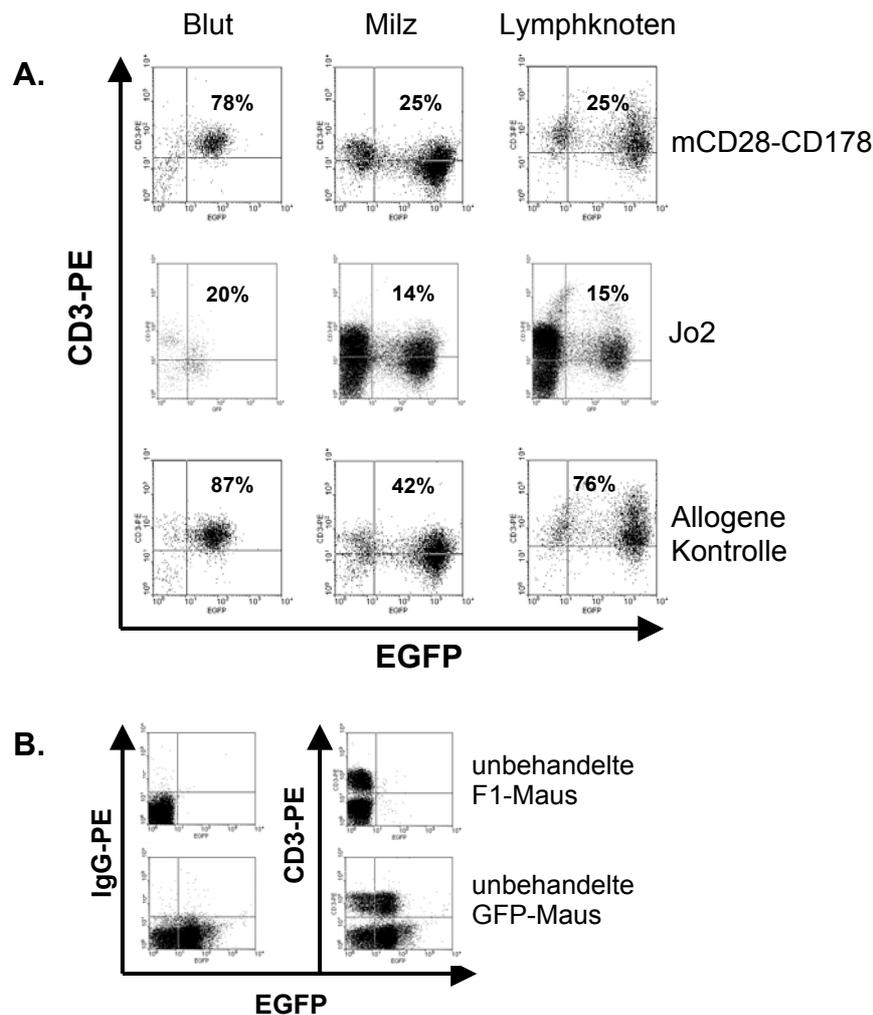


Abb. D35: Durchflußzytometrische Chimärismusanalyse nach adoptivem T-Zell-Transfer. Im FACS wurde 7 und 14 Tage nach Deletion und adoptivem Transfer der Anteil CD3/GFP-positiver T-Zellen in den verschiedenen Organen der Rezipienten ermittelt (Bild [A], Tag14). Die Einstellungen auf CD3- bzw GFP-positive Zellen erfolgte anhand einer IgG-PE-Isotypkontrolle, in Bild [B] exemplarisch gezeigt für Milzzellen aus einer unbehandelten F₁- bzw. einer GFP-Maus.

2.12. Verwendung von aktivierten B-Lymphozyten als Effektorzellen zur Deletion alloreaktiver T-Zellen mittels hCD178-X-Fusionsproteinen

Als Alternative für die Beladung von DZ mit hCD178-X-Fusionsproteinen wurden in dieser Arbeit auch B-Zellen getestet. Sie tragen ebenso wie DZ kostimulatorische Moleküle auf ihrer Zelloberfläche, an die Fusionsproteine binden können. Darüber hinaus exprimieren B-Zellen RANK-Ligand auf ihrer Zelloberfläche, so daß auch das hCD178-hRANK-Fusionsprotein verwendet werden kann.

Zunächst wurden B-Zellen aus der Milz einer Maus über MACS isoliert und diese naiven B-Zellen für 48 h Stunden gemeinsam mit einer NIH-3T3-CD154-

Transfektante für ihre Aktivierung über CD40 inkubiert. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle, MHC-Klassell, des B-Zell-typischen Markers CD19 sowie von RANK-Ligand wurde vor und nach der Aktivierung der B-Zellen mittels Durchflußzytometrie untersucht. Diese Analyse ist in Abbildung D36 gezeigt.

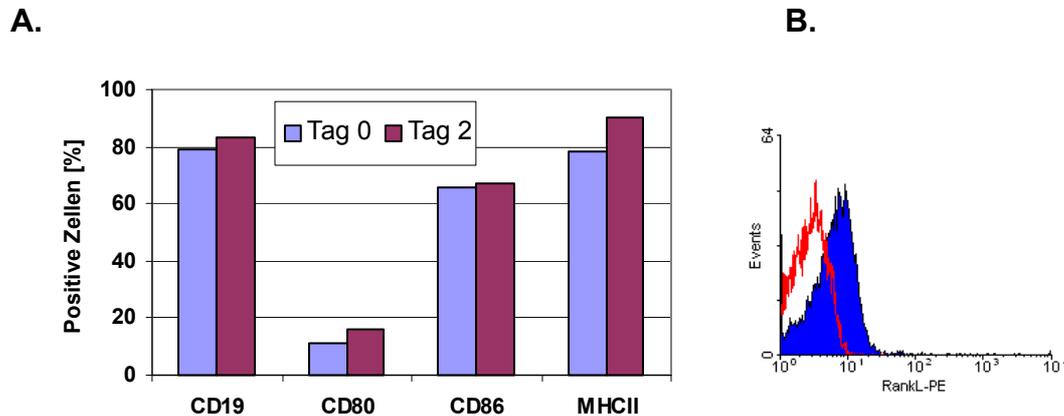


Abb. D36: Expression verschiedener Oberflächenmarker auf murinen B-Zellen. Aus einer Mausmilz wurden mittels MACS B-Zellen isoliert und anschließend durch Inkubation für 48 h mit NIH-3T3-CD154-Transfektanten aktiviert. Vor (Tag 0) und nach der Aktivierung (Tag 2) wurden die B-Zellen auf die Expression der in Bild [A] gezeigten Oberflächenmarker via Durchflußzytometrie untersucht. Gezeigt ist jeweils die Anzahl positiver Zellen. In Bild [B] ist das Histogramm für die Expression von RANK-Ligand (blaue Kurve) auf den B-Zellen nach deren Aktivierung dargestellt.

Die aus der Milz isolierten B-Zellen wiesen vor der Aktivierung bereits die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf, wobei CD86 mehr als dreifach stärker als CD80 von den naiven B-Zellen exprimiert wurde. Auch ein hohes Expressionsniveau von MHC-Klassell-Molekülen war bereits vor der Aktivierung der Zellen nachweisbar. Die Expression dieser Marker konnte durch die Aktivierung über CD40/CD154 noch etwas gesteigert werden.

Nach der Aktivierung wurden die B-Zellen mit hCD178-X-Fusionsproteinen beladen und in einer allogenen MLR zur Stimulation und Deletion alloreaktiver T-Zellen eingesetzt, identisch zu der Vorgehensweise mit DZ. Das Ergebnis ist in Abbildung D37 dargestellt.

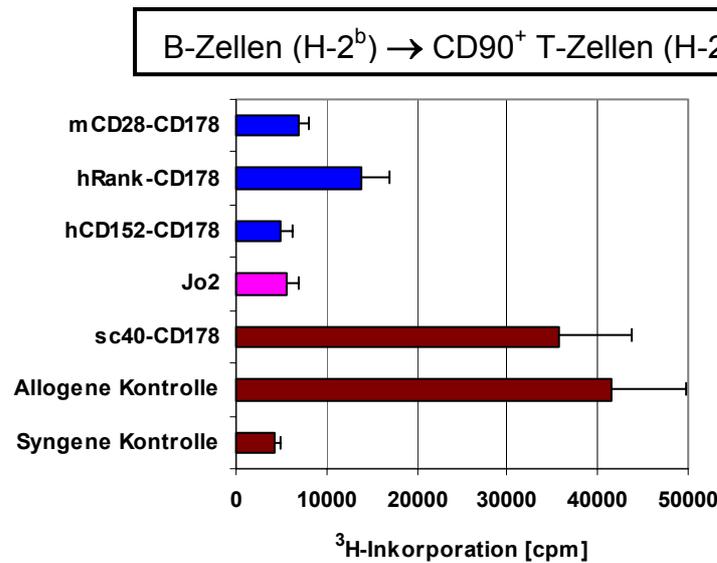


Abb. D37: Verwendung von hCD178-X-Fusionsprotein beladenen B-Zellen in der allogenen MLR. T-Zellen aus einer Balb/c-Maus (H-2^d) wurden mit aktivierten B-Zellen aus einer C57Bl/6-Maus (H-2^b) in Gegenwart der Fusionsproteine hCD178-mCD28, hCD178-hRANK und hCD178-hCD152 (je [250ng/ml]) stimuliert und die Proliferation der T-Zellen durch die Inkorporation von ³H-markiertem Thymidin nach 96 h gemessen. Als Vergleich für die Induktion von AICD diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2 ([200ng/ml]). Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von jeweils drei Meßwerten.

Der Proliferationstest zeigt, daß mit hCD178-X-Fusionsprotein beladenen B-Zellen ebenfalls die Proliferation alloreaktiver T-Zellen stark reduziert werden konnte. Alle drei verwendeten Fusionsproteine konnten auf B-Zellen binden, das hRANK-Fusionsprotein zusätzlich auch auf den stimulierten T-Zellen. Die stärkste Proliferationsreduktion trat wieder bei den T-Zellen ein, die mit den an die kostimulatorischen Moleküle bindenden Fusionsproteine behandelt wurden. Hier betrug die Proliferation weniger als 25% des Wertes der allogenen Kontrolle. Etwas schwächer fiel die Reduktion für das hRANK-Fusionsprotein aus, wobei hier die Proliferation aber immer noch um mehr als 50 % reduziert wurde. Als Spezifitätskontrolle wurde in dieser MLR das irrelevante Fusionsprotein hCD178-sc40 verwendet, das weder auf B- noch auf T-Zellen binden kann. Die T-Zellproliferation, die in Gegenwart dieses Fusionsproteins annähernd den Wert der allogenen Kontrolle erreichte, zeigt, daß die Reduktion der Proliferation spezifisch war. Somit erwiesen sich B-Zellen als eine alternative APZ für die Reduktion von T-Zell-Alloreaktivität mit CD178-X-Fusionsproteinen.

E Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der selektiven Deletion alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten. Die Deletion sollte unter Ausnutzung des AICD durch modifizierte allogene DZ induziert werden, die entweder mit CD178-mRNA transfiziert oder mit CD178-X-Fusionsproteinen beladen waren. Als Vergleichskriterium für die Induktion des AICD bzw. der Deletion von Alloreaktivität diente der agonistische anti-CD95-Antikörper Jo2.

1. Deletion alloreaktiver T-Zellen mittels hCD178-exprimierender allogener DZ

1.1. *In-vitro*-Synthese von hCD178-mRNA

Ein Ziel dieser Arbeit war es, murine DZ aus Knochenmark zu generieren und diese so zu modifizieren, daß sie sich zur Deletion alloreaktiver T-Zellen eignen. Daher sah einer der Modifikationsansätze vor, die DZ mit *in-vitro*-transkribierter hCD178-mRNA zu transfizieren, um diese in die Lage zu versetzen, allogene T-Lymphozyten via AICD in Apoptose zu bringen. Hierzu wurden zunächst für die mRNA-Synthese IVT-Vektoren auf Grundlage des IVT-Plasmids pGEM-3Z konstruiert. Die entsprechenden Gene (hCD178 und EGFP) wurden in die multiple Klonierungskassette des pGEM-3Z-Plasmids gerichtet inseriert. Für die mRNA-Synthese wurde ein IVT-System verwendet, bei dem sich nach der RNA-Synthese eine Polyadenylierung der RNA anschloß, um der RNA einen Poly-A-Schwanz anzuhängen, wie man ihn bei *in-vivo*-transkribierter RNA in Eukaryonten ebenfalls vorfindet. Er führt zu einer deutlichen Verlängerung der Halbwertszeit von mRNA *in vivo* (Schäfer, 1992; Wickens, 1990).

Die Überprüfung der Integrität der transkribierten polyadenylierten und nichtadenylierten mRNA wurde in denaturierenden RNA-Gelen mittels gelektrophoretischer Auftrennung untersucht. Die synthetisierte EGFP-mRNA sowie die hCD178-mRNA zeigten die erwarteten Moleküllängen. Zwischen der polyadenylierten und der nicht adenylierten RNA ergab sich ein Moleküllängenunterschied von etwa 200 bis 300bp, so daß von einer erfolgreichen Polyadenylierung der RNA ausgegangen werden konnte. Somit wurde für die *in-vitro*-

generierte mRNA nach Transfektion in Zellen eine vergleichbar hohe Haltbarkeit wie bei *in-vivo*-transkribierter RNA angenommen.

Für die Synthese der RNA wurde ein IVT-System verwendet, das eine 5'-Cap-Struktur, bestehend aus einem 7-Methylguanosin-Rest, an die mRNA durch eine Guanylyl-Transferase anhängt. Diese 5'-Cap-Struktur definiert die Translationsstartstelle (Banerjee, 1980).

Photometrische Messungen der mRNA-Konzentrationen nach der Synthese zeigten, daß gut reproduzierbare und vergleichbare Mengen an polyadenylierter mRNA, bezogen auf die eingesetzte Menge an IVT-Vektor-DNA, mit dem verwendeten IVT-System generiert werden konnten.

1.2. Untersuchungen zur biologischen Aktivität der *in vitro* transkribierten mRNA

Vor der eigentlichen Transfektion der generierten DZ wurde die *in-vitro*-transkribierte mRNA zunächst auf ihre biologische Funktionalität hin überprüft. Hierzu wurden K562-Zellen verwendet, in denen Elektroporationen mit hoher Reproduzierbarkeit und Effizienz durchgeführt werden konnten. Darüber hinaus eignete sich diese Zelle aufgrund ihrer fehlenden CD178-Expression für diesen Zweck. Die im Rahmen dieser Arbeit generierte EGFP-mRNA als auch die hCD178-mRNA konnten mit Transfektionseffizienzen von über 80% in diesen Zelltyp transfiziert werden. Der Nachweis der Expression von EGFP bzw. CD178 in den Transfektanten wurde mittels Durchflußzytometrie geführt (Kaltwasser et al., 2003).

Zur Bearbeitung der Frage, ob das von den K562-Zellen exprimierte CD178 auch in der Lage ist, CD95-vermittelte Apoptose zu induzieren, wurden die CD178⁺ K562-Transfektanten in einer allogenen MLR mit naiven T-Zellen kokultiviert, die durch allogene DZ stimuliert wurden. Die humanen K562-Zellen erzeugten per se keine Immunogenität in den murinen T-Zellen. In MLR-Kinetiken, in denen über einen Zeitraum von sechs Tagen das Proliferationsverhalten von T-Zellen beobachtet wurde, zeigte sich eine deutliche Proliferationsreduktion der T-Zellen in Gegenwart der CD178⁺ K562-Transfektanten gegenüber der Stimulationskontrolle, während in Anwesenheit von Mock-Transfektanten keinerlei Proliferationsreduktion zu verzeichnen war. Damit war die volle biologische Funktionalität der *in-vitro*-transkribierten hCD178-mRNA aufgrund der Expression in K562-Zellen nachgewiesen und die Proliferationsreduktion der T-Zellen konnte auf AICD zurückgeführt werden.

1.3. *In-vitro* generierte murine DZ aus Knochenmark als professionelle Stimulatorzellen

Die für die Deletion alloreaktiver T-Zellen zu modifizierenden DZ wurden aus Knochenmark von Mäusen generiert. Für die Bereitstellung entsprechender Mengen an DZ bedarf es einer spezifischen Methode für deren Generierung, weil aus der Milz oder dem Thymus einer Maus per se etwa nur $1-10 \times 10^5$ DZ isoliert werden können. Aus dem Blut einer Maus können nach spezieller Generierungsmethode ebenfalls nur etwa 1×10^6 DZ erhalten werden. Für die einzelnen experimentellen Ansätze in dieser Arbeit wurden DZ in einer Größenordnung von bis zu mehreren 10^7 Zellen benötigt. Daher wäre die Isolation von DZ sehr material- und zeitaufwändig und darüber hinaus wäre ein großer Bedarf an Versuchstieren gegeben (Vremec et al., 1992; Inaba et al., 1992a, Inaba et al., 1998; Lutz et al., 1999). 1992 wurde durch Inaba et al. erstmals eine Methode vorgestellt, mit der mehr als 5×10^6 murine DZ innerhalb einer Woche aus DZ-Vorläuferzellen des Knochenmarks mit Hilfe von GM-CSF erhalten werden konnten. Eine Verbesserung dieser Methode stellt ein von Lutz et al. erarbeitetes Protokoll dar, mit dem aus unseparierten Knochenmarkszellen einer Maus bis zu etwa $1-3 \times 10^8$ reife und unreife DZ mit einer Reinheit von 90-95% erhalten werden. Dabei kommt lediglich GM-CSF zum Einsatz, weitere Zytokine wie z.B. IL-4 und Flt-3-Ligand sind nicht notwendig und resultieren in keiner Erhöhung der Zellzahlen. Wie bereits im Material- und Methodenteil ausgeführt, wurde die Methode von Lutz et al. in dieser Arbeit aus den beschriebenen Gründen angewandt. Dabei konnten hohe Ausbeuten an DZ erzielt werden: aus dem Knochenmark einer Maus wurden etwa $5-10 \times 10^7$ DZ generiert.

Die DZ wurden hinsichtlich ihrer morphologischen und phänotypischen Eigenschaften untersucht. Wie lichtmikroskopische Aufnahmen belegen, zeigten diese Zellen eine Aggregatbildung der DZ, die etwa ab Tag 4 bis 5 der DZ-Kultur zu beobachten war, sowie die Ausbildung von charakteristischen Zellfortsätzen (sog. „veils“). Beides ist als morphologisches Charakteristikum für DZ in der Literatur beschrieben worden (Inaba et al., 1992).

Die phänotypische Untersuchung der DZ erfolgte per FACS-Analyse. Hierbei wurden die Zellen auf die Expression DZ-typischer Oberflächenmarker im Rahmen einer Kinetik zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten der Generierung untersucht. Darüber hinaus wurde der Einfluß des Maturierungszytokins TNF- α auf die Ausreifung der Zellen ermittelt. Es zeigte sich, daß die generierten Zellen die DZ-typischen Oberflächenmoleküle CD11c, CD40, CD54 sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimierten, des weiteren hohe Expressionslevel an MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen. Die Expressionsdichte dieser Moleküle nahm mit steigender Generierungsdauer zu und erreichte ca. am Tag 10 der Kultivierung ihr

Maximum. Die für B- und T-Zellen typischen Oberflächenmarker CD19 und CD90 nahmen im Verlauf der Generierung der DZ stark ab bzw. waren am Ende der 10 Tage Kultur nicht mehr detektierbar.

Der Vergleich des Expressionsmusters der mit und ohne TNF- α generierten DZ zeigte keinen deutlichen Unterschied der untersuchten Oberflächenmarker. Dies steht im Einklang mit den experimentellen Ergebnissen von Lutz et al (Lutz et al., 1999). Dort konnte gezeigt werden, daß murine DZ mit der dort beschriebenen Generierungsmethode auch ohne den Einfluß eines Maturierungsagens an Tag 10 der Kultivierung die Eigenschaften maturierter DZ aufweisen. Die in dieser Arbeit ermittelten morphologischen und phänotypischen Charakteristika für DZ stimmten damit mit den in der Literatur für Knochenmark-generierte murine DZ beschriebenen T-Zell-stimulatorischen Eigenschaften überein.

Die in dieser Arbeit ermittelten Eigenschaften der generierten DZ sind im Kontext der angewandten Generierungsmethode zu sehen, da diese und die dabei verwendeten Zytokine per se einen Einfluß auf die immunologischen Eigenschaften der DZ haben. So ist es unter Anwendung abgewandelter Generierungsmethoden möglich, Toleranz-induzierende regulatorische DZ zu erhalten oder auch solche DZ, die sich speziell für eine anti-Tumor-Zelltherapie eignen. Bei Behandlung von DZ beispielsweise mit IL-10 und TGF- β während der Maturierung lassen sich regulatorische DZ generieren (Sato et al., 2003; Masurier et al., 1999). Benötigt wurden in dieser Arbeit transfizierbare DZ mit einem hohen Expressionsniveau der kostimulatorischen Moleküle für die Beladung mit hCD178-X-Fusionsproteinen, die darüber hinaus eine hohe stimulatorische Kapazität gegenüber T-Lymphozyten aufweisen sollten. Diese konnten mit der dargestellten Methode generiert werden.

Die stimulatorische Kapazität der generierten DZ wurde an Tag 10 der Kultivierung in einem allogenen Proliferationstest untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, daß die Ausreifung von DZ mit den Maturierungsagenzien TNF- α bzw. LPS einen Einfluß auf die stimulatorischen Eigenschaften der DZ hat. Die besten stimulatorischen Eigenschaften zeigten unbehandelte DZ, während die mit TNF- α und LPS ausgereiften DZ deutlich hinter der stimulatorischen Kapazität der unbehandelten DZ zurück blieben. Diese Ergebnisse stehen wiederum in Einklang mit den Darstellungen bei Lutz et al., wo ebenfalls unbehandelte DZ zwischen Tag 8 und 12 der Generierung die besten Stimulationseigenschaften im Vergleich zu maturierten DZ zeigten (Lutz et al., 1999). Bei der Bearbeitung der Frage des optimalen E/T-Verhältnisses stellte sich ein DZ/T-Zell-Verhältnis von 1:10 als am effektivsten bei der T-Zell-Stimulation heraus.

1.4. Transfektion muriner DZ mit mRNA

Als Transfektionsmethode für die Modifikation der DZ wurde in dieser Arbeit die Elektroporation gewählt. Diese hat sich als eine sehr effiziente Methode für die Transfektion von mRNA in murine, Knochenmark-generierte DZ erwiesen. In der Literatur konnte gezeigt werden, daß durch Elektroporation DZ sowohl mit der mRNA des Reportergens EGFP als auch mit der mRNA des Transmembranproteins NGF-R mit Transfektionseffizienzen von 70-80% transfiziert werden konnten. Darüber hinaus erwies sich die Elektroporation in der zitierten Arbeit als wesentlich effektivere Transfektionsmethode als die Liposomen-vermittelte Transfektion und das passive Pulsen von DZ mit mRNA. Es konnte außerdem nachgewiesen werden, daß die Elektroporation keinen negativen Einfluß auf die stimulatorische Kapazität von DZ ausübt (Van Meirvenne et al., 2002).

Für die Modifikation der DZ wurde mRNA gewählt, weil deren Einbringung in die Zellen im Hinblick auf eine mögliche klinische Anwendung der angestrebten Deletionsstrategie keine gentechnische Veränderung des Empfängerorganismus (Patient) darstellt. Bislang für die therapeutische Modifikation von DZ angewandte Methoden wie etwa adenovirale Transduktionen riefen im Empfängerorganismus eine Immunogenität gegenüber viralen Partikeln hervor (Yang et al., 1994; Benihoud et al., 1999).

1.4.1. Murine DZ lassen sich effizient mit mRNA transfizieren, zeigen jedoch nur schwache CD178-Expression

Anhand der mRNA des Reportergens EGFP konnten die optimalen Elektroporationsbedingungen und die optimale mRNA-Menge für murine DZ experimentell ermittelt werden. Sie deckten sich weitestgehend mit den in der Literatur von Van Meirvenne et al. beschriebenen Parametern. Für EGFP konnte mittels durchflußzytometrischer Analyse der EGFP-Autofluoreszenz eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von 60% ermittelt werden. Die DZ waren reproduzierbar mit EGFP-mRNA durch Elektroporation transfizierbar (Kaltwasser et al., 2003). Für hCD178-mRNA war jedoch kaum eine CD178-Expression nach der Transfektion feststellbar. Wie durch FACS-Analysen mit Hilfe von PE-konjugiertem anti-CD178-Antikörper 24 h nach Transfektion von CD178-mRNA gezeigt, war die Expression von CD178 reproduzierbar insuffizient.

In der Literatur ist beschrieben, daß sowohl humane als auch murine DZ nach Transfektion bzw. Transduktion zur CD178-Expression gebracht wurden. Hierbei kamen adenovirale Vektorsysteme sowie verschiedene Expressionsplasmide zum Einsatz. Auch konnte die biologische Funktionalität des aufgrund der Transfektion bzw. Transduktion exprimierten CD178 nachgewiesen werden (Min et al., 2000;

Buonocore et al., 2003; Hoves et al., 2003; Wolfe et al., 2002; Matsue et al., 1999; Matsue et al., 2002; Zhang et al., 1999). Jedoch gibt es bis dato noch keine Beschreibungen in der Literatur, daß murine DZ erfolgreich mit hCD178-mRNA transfiziert wurden und deren Expression nachgewiesen werden konnte.

Über Änderungen der Transfektionsparameter (Variierung der mRNA-Mengen, Transfektion der DZ in unterschiedlichen Differenzierungsstadien etc.) bzw. durch Anwendung einer weiteren Transfektionsmethode, nämlich der Lipofektion, wurde versucht, die Expression von CD178 zu verbessern. Diese Maßnahmen führten jedoch nicht zu einer Verbesserung der CD178-Expression, sie blieb weiterhin insuffizient. Bei der Lipofektion war die erzielte Transfektionseffizienz für EGFP-mRNA sogar wesentlich geringer und betrug nur rund 15% dessen, was mit der Elektroporation erzielt werden konnte. Dies entsprach den Beschreibungen in der Literatur, wonach die Elektroporation muriner DZ wesentlich effizienter als Liposomen-vermittelte Transfektion ist (Van Meirvenne, 2002).

1.4.2. *In-vitro*-generierte murine maturaerte DZ sind resistent gegenüber CD95-induzierter Apoptose

Die in dieser Arbeit generierten DZ waren resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose. Für aus Knochenmark generierte, terminal differenzierte murine DZ ist beschrieben, daß diese sehr stark CD95 exprimieren (Yokota et al., 2003). Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. In der Literatur gibt es gegensätzliche Beschreibungen hinsichtlich CD95-vermittelter Apoptosesuszeptibilität von DZ. Einige Arbeiten berichten von Apoptoseresistenz bei DZ und zeigen sogar, daß die Behandlung von DZ mit löslichem CD178 zur Ausreifung der Zellen beiträgt und nicht zur Induktion von Apoptose führt (Yokota et al., 2003; Ashany et al., 1999; Rescigno et al., 2000). Leverkus et al. (2000) konnten zeigen, daß die Expression von cFLIP in ausgereiften DZ hochreguliert ist und diese so ihre Apoptoseresistenz erlangen. Ferner konnte gezeigt werden, daß DZ anstatt über CD95 über den Todesrezeptor TRAIL in Apoptose gebracht werden können (Wang et al., 1999). Andererseits existieren Arbeiten, die belegen, daß DZ sehr wohl suszeptibel für CD95-vermittelte Apoptose sein können (Kawamura et al., 1999; Matsue et al., 1999b). Hoves et al. (2003) berichteten, daß reife, jedoch nicht unreife humane DZ, die mit CD178 transduziert wurden, vor Apoptose geschützt sind. Ähnliche Beobachtungen lieferten die Arbeiten von Buonocore et al. (2002), die nach retroviraler Transduktion ein rasches Absterben muriner Wildtyp-DZ beobachteten, während CD95-defiziente MRL/lpr-DZ nach Transduktion zur CD178-Expression gebracht werden konnten.

In dieser Arbeit wurden DZ in dem Maturierungsstadium, in dem sie auch für die Transfektion verwendet wurden, sowohl mit dem agonistischen anti-CD95-Antikörper

Jo2 als auch mit dem Fusionsprotein SuperFasL behandelt. Für beide wurde in der Literatur die Induktion einer CD95-medierte Apoptose in CD95⁺ Zellen beschrieben (Ogasawara et al, 1993; Huang et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß in den Zellen weder mit Jo2 noch mit SuperFasL Apoptose induziert werden konnte. Es kann daher also davon ausgegangen werden, daß die in dieser Arbeit generierten DZ zum Zeitpunkt der Transfektion Apoptose-resistent gegenüber CD95-vermittelter Apoptose waren und die Induktion von parakriner Apoptose in den DZ daher als Grund für die mangelhafte CD178-Expression ausgeschlossen werden kann.

1.4.3. CD178-mRNA-DZ-Transfektanten induzieren in T-Zellen *in vitro* kein AICD

In der Arbeit von Hoves et al. (2003) sind mit CD178 retroviral transduzierte humane DZ dargestellt, die nach Transduktion eine geringe CD178-Expression zeigen, aber dennoch in der Lage sind, potent CD95-medierte Apoptose in Jurkat-Zellen zu induzieren. Daher wurden die in dieser Arbeit mit CD178-mRNA-transfizierten DZ trotz der sehr geringen CD178-Expression ebenfalls in einem Proliferationstest eingesetzt, um deren Potential zur Induktion von AICD zu überprüfen. Hierbei ergab sich nur eine marginale Reduktion der Proliferation in den T-Zellen, die mit den CD178-Transfektanten behandelt wurden, gegenüber entsprechenden Kontrollen. Die in dieser Arbeit generierten DZ konnten also durch die Transfektion mit CD178-mRNA nicht zu Killer-APZ modifiziert werden, wie dies von Hoves et al. im Fall viral transduzierter CD178⁺ DZ berichtet wurde.

1.4.4. Insuffiziente CD178-Expression in DZ nach Transduktion ist keine Folge CD95-vermittelter Apoptose

Aufgrund der geringen bzw. insuffizienten CD178-Expression nach Transfektion von CD178-mRNA wurden in dieser Arbeit weitere Fragestellungen experimentell bearbeitet. Zunächst wurde untersucht, wie lange eine Proteinexpression nach Transfektion von mRNA in DZ nachweisbar ist. Hierzu wurde eine Expressionskinetik für das Reporterprotein EGFP durchgeführt. Dabei stellte sich heraus, daß noch etwa 50% der Transfektanten 96 h nach Transfektion eine EGFP-Fluoreszenz zeigte. Dies ist konform mit Berichten aus der Literatur (Van Meirvenne et al., 2002).

Da für CD178 wegen der insuffizienten Expression keine Expressionskinetik durchgeführt werden konnte, wurde durch semiquantitative RT-PCR überprüft, ob die in die DZ transfizierte CD178-mRNA in den Zellen nachweisbar war. In den Transfektanten wurde CD178-mRNA über mindestens 24 h nach der Elektroporation

nachgewiesen, wobei die Menge der nachweisbaren RNA abnahm. Es ist möglicherweise von einer Degradierung der CD178-mRNA in DZ auszugehen, was ein Grund dafür sein könnte, daß in den Zellen kaum CD178 translatiert wird. Die geringe Halbwertszeit der CD178-mRNA ist vor dem Hintergrund zu betrachten, daß es sich bei DZ um Zellen handelt, die darauf spezialisiert sind, fremdartige Moleküle zu degradieren. Auch ein sehr schneller Abbau von bereits translatiertem CD178 ist denkbar, so daß dieses erst gar nicht in der Zellmembran verankert werden kann und somit auch nicht per durchflußzytometrischer Analyse auf der Zelloberfläche nachweisbar ist. Beides erklärt aber nicht, weshalb die EGFP-Fluoreszenz über mindestens 96h nachweisbar war, zumal es sich hierbei für die Zellen ebenfalls um ein transgenes Protein handelt. Auch die Frage, weshalb bei der Transduktion oder der Transfektion von CD178 mit Plasmid-DNA eine CD178-Expression von einigen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden konnte, bleibt damit unbeantwortet. Wahrscheinlich ist dies mit einer konstitutiven CD178-Expression zu begründen.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob Proteinabbau der Grund für die mangelhafte CD178-Expression ist. Für die Regulation der CD178-Funktion ist bekannt, daß die proteolytische Abspaltung durch MMPs eine Rolle spielt (Kayagaki et al., 1995). Durch Entfernung der Proteaseschnittstelle im CD178-Gen konnte der Einfluß von MMPs auf die Funktion von CD178 gezeigt werden (Cherradi und Shirwan, 2001).

Um proteolytischen CD178-Abbau durch MMPs zu verhindern, wurden die DZ in dieser Arbeit nach deren Transfektion mit CD178-mRNA für 24 h mit MMP-Inhibitoren in der Zellkultur behandelt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob ein Abbau von CD178-Protein durch das Proteasom in der Zelle stattfindet. Hierzu wurden die CD178-mRNA-Transfektanten mit dem Proteasomeninhibitor Lactacystin ebenfalls für einen Zeitraum von 24 h nach der Transfektion in der Zellkultur behandelt. Es ergab sich für beide Experimente bei anschließenden FACS-Analysen keine verbesserte CD178-Expression. Somit konnten diese beiden Arten des proteolytischen Proteinabbaus als Ursache für die fehlende CD178-Expression ausgeschlossen werden.

In weiteren Experimenten wurde die Frage adressiert, ob die Transfektion von CD178-mRNA in den DZ apoptotische Phänomene auslöst, in die die Caspasen-Kaskade involviert ist und die Zellen somit durch die Transfektion einem schnelleren Zelltod unterliegen. Dies wurde vor dem Hintergrund untersucht, daß nach der CD178-mRNA-Transfektion die Zahl toter DZ von 15% auf 32% im Vergleich zur Mock-Transfektante anstieg, was durch 7-AAD-Färbung der DZ 24 h nach der Transfektion und anschließender FACS-Analyse gezeigt werden konnte. Die Bearbeitung dieser Frage erfolgte durch zweierlei Ansätze: zum einen wurden die Zellen mit dem Caspasen-Inhibitor Z-VAD-FMK behandelt, dessen antiapoptotische

Wirkung beschrieben ist (Slee et al., 1996). Zum anderen wurde cFLIP_L-mRNA generiert und diese mit der CD178-mRNA in die DZ kotransfiziert. Die antiapoptotische Wirkung des Caspase-8-inhibierenden cFLIP_L in DZ ist in der Literatur beschrieben (Leverkus et al., 2000; Chang et al., 2002). Darüber hinaus wurde die Wirksamkeit des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten cFLIP_L-Konstruktes durch Transfektion in A20-Zellen nachgewiesen. Diese sind suszeptibel für CD95-vermittelte Apoptose, die mit dem cFLIP_L-Konstrukt in den A20-Zellen wirksam inhibiert werden konnte.

Bei den DZ-Transfektanten, die mit CD178-mRNA transfiziert wurden, konnte weder durch Inhibition von Caspase-8 mittels Z-VAD-FMK-Behandlung noch durch Kotransfektion mit cFLIP_L-mRNA eine Verbesserung der CD178-Expression erzielt werden. Dies führte zu der Annahme, daß die Transfektion von CD178-mRNA in murinen DZ keine CD95-abhängige Apoptose in den Zellen auslöste, in die die intrinsische Caspasenkaskade involviert ist.

Darüber hinaus wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, das untermauern sollte, daß das Problem insuffizienter CD178-Expression kein CD95-medierter Effekt ist. Hierbei wurden DZ aus dem Knochenmark einer CD95-defizienten MRL/lpr-Maus generiert. Buonocore et al. beschreiben, daß die Transduktion Knochenmark-generierter DZ mit CD178 zu schnellem Absterben der DZ führt, jedoch hingegen nicht bei DZ, die aus MRL/lpr-Mäusen generiert werden. In dieser Arbeit konnten MRL/lpr-DZ ebenfalls mit hoher Effizienz mit EGFP transfiziert werden. Die Transfektion von CD178-mRNA führte jedoch auch hier zu keiner nennenswerten CD178-Expression. Möglicherweise gibt es in murinen Knochenmark-generierten DZ einen Mechanismus, der die Expression von CD178 nach mRNA-Transfektion inhibiert. Dabei könnte es sich um einen DZ-spezifischen Effekt handeln, da mit *in-vitro*-generierter CD178-mRNA humane Keratinozyten im Rahmen einer weiteren Dissertation zur Expression von CD178 gebracht werden konnten. Für diese Keratinozyten konnte sogar die Induktion von AICD in allogenen T-Zellen nachgewiesen werden (Dissertation I. Link, unveröffentlicht).

1.4.5. Die zytoplasmatische Region von CD178 hat einen regulatorischen Einfluß auf die Lokalisation und Funktion von CD178

Es gibt experimentelle Evidenz dafür, daß die zytoplasmatische, N-terminale Region von CD178 einen regulatorischen Einfluß auf die Lokalisation und Funktion von CD178 ausübt. Durch Bossi und Griffiths wurde gezeigt, daß die zytoplasmatische CD178-Region ein Signal enthält, welches das CD178-Protein in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu sekretorischen Lysosomen dirigiert und CD178 daher trotz Expression nicht auf der Zelloberfläche erscheint. Erst die Degranulation dieser Lysosomen ermöglicht

dann den Transport von CD178 zur Zellmembran. Der Nachweis, daß die zytoplasmatische CD178-Region eine regulatorische Funktion besitzt, gelang Bossi und Griffiths in leukämischen RBL-Zellen aus der Ratte. Dort wurden zwei verschiedene Fusionsproteine eingebracht: ein CD69-CD178-Fusionsprotein, das den zytoplasmatischen Teil von CD178 und die extrazelluläre Region von CD69 enthielt, sowie ein Fusionsprotein, das hierzu invers aufgebaut war. Ersteres konnte nicht auf der Zelloberfläche der RBL-Zellen detektiert werden, jedoch in sekretorischen Lysosomen, letzteres hingegen auf der Zelloberfläche (Bossi und Griffiths, 1999).

Eine weitere Arbeit (Satoshi et al., 2005) spricht der zytoplasmatischen CD178-Region ebenfalls eine regulatorische Funktion zu. Aufgrund zytoplasmatisch deletierter CD178-Varianten konnte gezeigt werden, daß die zytoplasmatische CD178-Region die Zytotoxizität von CD178 reguliert.

Aufgrund dieser Berichte wurde im Rahmen dieser Arbeit eine zytoplasmatisch deletierte CD178-mRNA (CD178 Δ zyt-mRNA) synthetisiert, bei der die Aminosäuren 2 bis 79 deletiert waren. Diese trunkierte RNA wurde in K562-Zellen sowie in DZ transfiziert. Dabei konnte mittels Durchflußzytometrie CD178-Expression sowohl für die K562-Zellen als auch für die DZ nachgewiesen werden, wobei die CD178-Expression in den DZ schwächer ausgeprägt war als in den K562-Zellen.

Die CD178⁺ DZ-Transfektanten wurden dann in einer allogenen MLR eingesetzt, in der nachgewiesen wurde, daß diese die Proliferation der T-Zellen sehr stark reduzierten. Die Suppression der T-Zellproliferation war hier stärker als bei T-Zellen, die mit dem Fusionsprotein SuperFasL behandelt wurden. Mittels Blockade der CD178-Funktion durch den antagonistischen anti-CD178-Antikörper NOK1 konnte ferner der Nachweis geführt werden, daß die Proliferationsreduktion in den T-Zellen auf AICD zurückzuführen war. Damit konnte in dieser Arbeit die in der Literatur beschriebene Evidenz für eine regulatorische Funktion der zytoplasmatischen CD178-Region bestätigt werden. Diese hat offensichtlich auch in murinen DZ einen Einfluß auf die Lokalisation von CD178, weil nur die zytoplasmatisch deletierte Form auf der Zelloberfläche durch FACS-Analyse nachgewiesen werden konnte und auch nur diese Form zur Induktion von AICD in allogenen T-Zellen führte. Allerdings steht dies auch im Kontrast zu den Beschreibungen von Satoshi et al., die der zytoplasmatischen CD178-Region die Funktion eines Positivregulators hinsichtlich der zytotoxischen Eigenschaften von CD178 zuschreiben. Diese Annahme ist in der Literatur allerdings nicht ganz unumstritten, da Henkler et al. (2005) zeigen konnten, daß der extrazelluläre, membranverankerte Teil von CD178 auf Zellen ausreicht, um stabile supramolekulare CD178-CD95-Cluster zu bilden und Apoptose zu induzieren. Dies wiederum steht mit den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen in Einklang.

Zusammenfassend erscheint es damit als wahrscheinlich, daß die regulatorische Funktion der zytoplasmatischen CD178-Region ursächlich verantwortlich war für die fehlende Nachweisbarkeit des CD178-Moleküls auf der Zelloberfläche nach CD178-mRNA-Transfektion.

2. Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten mittels CD178-X-Fusionsproteinen sowie agonistischem anti-CD95-Antikörper

Die beiden weiteren in dieser Arbeit eingesetzten Strategien zur Deletion alloreaktiver T-Zellen waren die Verwendung von CD178-X-Fusionsproteinen sowie von agonistischem anti-CD95-Antikörper (Jo2) zur gezielten Induktion von AICD in T-Lymphozyten nach deren Aktivierung durch allogene DZ.

2.1. CD178-X-Fusionsproteine binden auf Zelloberflächenmolekülen und inhibieren die Proliferation allogener T-Zellen

Die verwendeten CD178-X-Fusionsproteine bestanden C-terminal aus dem extrazellulären Teil von CD178 und N-terminal aus der extrazellulären Region eines Fusionspartnerproteins, das entweder an Oberflächenmarker auf APZ oder auf T-Zellen bindet. Sie wurden mit dem Ziel konstruiert, entweder autokrin oder parakrin Apoptose in Zielzellen nach deren Antigen-restringierten Aktivierung zu induzieren. Samel et al. (2003) konnten erstmals zeigen, daß mit solchen CD178-X-Fusionsproteinen gezielt eine lokale CD95-Aktivierung erfolgen kann und auf diesem Wege neue Formen der Krebstherapie unter Ausnutzung des CD95-Signalweges eröffnet werden können.

In dieser Arbeit wurde zunächst erfolgreich die Bindung der Fusionsproteine an Oberflächenstrukturen auf Zellen mittels Durchflußzytometrie nachgewiesen. Dies gelang am Beispiel des hCD178-mCD28-Fusionsproteins, das mit CD80 einer K562-CD80-Transfektante interagiert, sowie mit hCD178-hCD40, dessen Bindung an CD154 (CD40-Ligand) auf einer HT1080-CD154-Transfektante nachgewiesen werden konnte.

Im Rahmen eines allogenen Proliferationstests wurde eine Mindestkonzentration an Fusionsprotein von 250ng/ml ermittelt, die notwendig ist, um wirksam die Proliferation in allogenen T-Zellen zu inhibieren.

In einem MHC-disparaten System wurden T-Zellen (H-2^b) mit allogenen DZ (H-2^{bxd}) in Gegenwart verschiedener CD178-X-Fusionsproteine oder aber in Gegenwart von Jo2-Antikörper stimuliert. Dabei zeigte sich, daß die Fusionsproteine zu einer starken

Reduktion der T-Zellproliferation im Vergleich zur allogenen Stimulationskontrolle führten. Dies war sowohl bei den an die kostimulatorischen Moleküle der DZ bindenden mCD28- und hCD152-Fusionsproteinen der Fall, als auch bei dem auf T-Zellen an den RANK-Ligand bindenden hRANK-Fusionsprotein. Daß diese Reduktion tatsächlich auf die Fusionsproteine zurückzuführen war, zeigte sich am Beispiel des irrelevanten Fusionsproteins hCD40-TRAIL, das keinerlei Reduktion der T-Zellproliferation hervorrief. TRAIL ist zwar ebenfalls wie CD178 ein Mitglied der Todesliganden-Familie, induziert aber nur in entarteten Tumorzellen Apoptose (Song et al., 2000).

Die in dieser Arbeit oftmals festgestellte stärkere inhibitorische Wirkung des CD152-Fusionsproteins im Vergleich zu dem CD28-Fusionsprotein läßt sich damit erklären, daß CD152 eine wesentliche höhere Affinität gegenüber CD80/CD86 besitzt als CD28 (Lenschow et al., 1996; Linsley et al., 1994).

Im Gegensatz dazu führte das Fusionsprotein hCD178-hIL-2, das an den IL-2-Rezeptor auf T-Zellen bindet, zu keiner Suppression der T-Zellproliferation. Daher wurde die Wirkung dieses Fusionsproteins auf die T-Zellproliferation im Rahmen einer Kinetik genauer untersucht. Es zeigte sich, daß es zu einer zusätzlichen Stimulation der T-Zellen führte. AICD konnte mit diesem Fusionsprotein in den T-Zellen nicht induziert werden. Daher eignete sich dieses Fusionsprotein nicht für die Verwendung im Rahmen der angestrebten Deletionsstrategie.

Zu einer noch stärkeren Proliferationsreduktion wie die Fusionsproteine führte der agonistische CD95-Antikörper Jo2. In dieser Arbeit wurde er daher als Positivkontrolle bei der Induktion von AICD eingesetzt.

Jo2-Antikörper konnte bereits erfolgreich für die selektive Deletion GvH-reaktiver T-Zellen eingesetzt werden, und zwar unter Stimulation der T-Zellen mittels allogener Milzzellblasten (Hartwig et al., 2002). Bei der Stimulation von T-Zellen mit Milzzellblasten unter gleichzeitiger Verwendung von Jo2-Antikörper zur Induktion von AICD kann es zu dem Phänomen der Kostimulation und einer daraus resultierenden starken T-Zellproliferation kommen (persönliche Mitteilung durch Dr. U. F. Hartwig). Dieses Phänomen der kostimulatorischen Wirkung des CD95-Signalsweges auf T-Zellen ist in der Literatur beschrieben und bis heute wenig verstanden (Suzuki et al., 2000). Kostimulation – bei Verwendung allogener DZ als Stimulatoren – wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet.

Sowohl die Fusionsproteine als auch der Jo2-Antikörper wurden in einem klinisch relevanteren MHC-identen, aber mHAg-disparaten System auf ihre Wirksamkeit untersucht, wobei T-Zellen und DZ beide den Haplotyp H-2^d besaßen. Auch hier konnte sowohl mit den Fusionsproteinen als auch mit dem agonistischen anti-CD95-

Antikörper die T-Zellproliferation signifikant reduziert werden. Die Suppression fiel mit dem Antikörper am stärksten aus und betrug rund 84%. Das CD152-Fusionsprotein erwies sich auch hier potenter als das CD28-Fusionsprotein, hier lag die Suppression der T-Zellproliferation bei rund 70%.

Damit konnte also sowohl in einem MHC-disparaten als auch in einem mHAg-disparaten Maussystem die T-Zellproliferation mit verschiedenen CD178-X-Fusionsproteinen und anti-CD95-Antikörper inhibiert werden (Kaltwasser et al., 2005).

2.1.1. Transfektion von CD178-X-Fusionsprotein-kodierender RNA in DZ führt zur Expression und Inhibition von Alloreaktivität

Alternativ zur Beladung von DZ bzw. T-Zellen mit Fusionsproteinen wurde die Transfektion von DZ mit mRNA, die für verschiedene Fusionsproteine kodiert, untersucht. Hierzu wurde zunächst, ausgehend von Plasmid-Konstrukten, die für die Fusionsproteine kodierten, die entsprechende mRNA durch IVT generiert und mittels Elektroporation in die DZ transfiziert. Diese Transfektanten führten in einem Proliferationstest zu einer Inhibition der Proliferation allogener T-Zellen. Diese fiel jedoch schwächer als im Vergleich zur Induktion von AICD mit dem Fusionsprotein SuperFasL aus. Transfiziert wurden die für das hCD178-mCD28 sowie für das hCD178-hRANK-Fusionsprotein kodierenden mRNA-Moleküle. Ersteres führte zu einer Suppression der T-Zellproliferation von rund 47%, bei letzterem betrug die Suppression etwa 36%. Diese Zahlen deuten im Vergleich zur erzielten Suppression bei Verwendung von gereinigtem Fusionsprotein darauf hin, daß die Beladung von DZ und T-Zellen mit den Fusionsproteinen effektiver hinsichtlich der Inhibition der T-Zellproliferation ist als die Transfektion der DZ mit der entsprechenden mRNA. Möglicherweise liegt die Konzentration an intaktem Fusionsprotein, das durch die DZ-Transfektanten in das Medium sezerniert wird, unter der Konzentration der Fusionsproteine, von denen je 250ng/ml eingesetzt wurden.

2.2. CD178-X-Fusionsproteine sind bifunktional

Aufgrund des Aufbaus der CD178-X-Fusionsproteine ist denkbar, daß diese eine bifunktionale Wirkung ausüben können. Sie können einerseits durch ihre Bindung an Oberflächenstrukturen auf Stimulatorzellen bzw. T-Zellen und gleichzeitiger Bindung an CD95 AICD in Zielzellen induzieren. Andererseits ist aber auch vorstellbar, daß durch ihre Bindung an die kostimulatorischen Moleküle auf Stimulatorzellen der

Kontakt und die Wechselwirkung zwischen Stimulatorzelle und T-Zelle gestört wird und es beispielsweise zu einer Inhibition der Kostimulation kommt, weil die B7-Moleküle der Stimulatorzelle für eine Bindung an CD28 bzw. CD152 der T-Zellen weitestgehend durch die Fusionsproteine blockiert sind.

Daher wurde untersucht, ob die Reduktion der T-Zellproliferation in Gegenwart der Fusionsproteine auf AICD zurückzuführen ist. Hierfür wurde der monoklonale antagonistische anti-CD178-Antikörper NOK1 eingesetzt. Dieser blockiert wirksam CD178 und verhindert damit die Induktion CD95-vermittelter Apoptose (Suda et al., 1997). Im Proliferationsexperiment zeigte sich in dieser Arbeit, daß die Wirkung der Fusionsproteine nicht vollständig mit dem Antikörper blockiert werden konnte. Am besten gelang die Blockade bei dem hCD178-hRANK-Fusionsprotein und bei dem hCD178-B7-2-Fusionsprotein, deren inhibierende Wirkung zu etwa 75% blockiert werden konnte. Beide binden an Oberflächenmoleküle auf T-Zellen (RANK-Ligand bzw. CD28 oder CD152). Weniger stark blockierbar waren die beiden Fusionsproteine, die an die kostimulatorischen Moleküle auf DZ binden: hCD178-mCD28 und hCD178-hCD152. Hierbei handelt es sich möglicherweise um eine Inhibition der Kostimulation. Auch bei den ausschließlich auf T-Zellen bindenden Fusionsproteinen (hCD178-hRANK und hCD178-hB7-2) konnte die proliferations-supprimierende Wirkung mit dem NOK1-Antikörper nicht vollständig revertiert werden. Auch dies deutet darauf hin, daß durch diese beiden Fusionsproteine der DZ-T-Zell-Kontakt gestört wird. Diese experimentellen Daten weisen auf eine bifunktionale Wirkung der CD178-X-Fusionsproteine hin.

2.2.1. Fusionsproteine können die Kostimulation zwischen T-Zellen und DZ inhibieren und Anergie in T-Zellen hervorrufen

In einem weiteren Experiment wurde unter Verwendung CD95-defizienter T-Zellen aus einer MRL/lpr-Maus die Bifunktionalität der Fusionsproteine untersucht. Aufgrund der CD95-Defizienz kann in diesen T-Zellen kein AICD induziert werden. Eine Inhibition der T-Zellproliferation in Gegenwart der Fusionsproteine wäre in diesen T-Zellen also nicht auf CD95-vermittelte Apoptose zurückzuführen. In diesem Experiment zeigte sich, daß auch für CD95-defiziente T-Zellen eine Suppression der T-Zellproliferation in Anwesenheit der hCD178-X-Fusionsproteine zu beobachten war. Am stärksten fiel dabei die Suppression in Gegenwart der beiden an die kostimulatorischen Moleküle der DZ bindenden Fusionsproteine, hCD178-mCD28 und hCD178-hCD152, aus. Im Vergleich dazu zeigte das hCD178-hRANK-Fusionsprotein eine weniger stark ausgeprägte Suppression der T-Zellproliferation, das hCD178-hB7-2-Fusionsprotein nur eine marginale Suppression.

Die Fusionsproteine führen demnach nicht nur zu einer Induktion von CD95-vermitteltem AICD, sondern zusätzlich auch zu einer Inhibition der Kostimulation. Die Blockade der Kostimulation kommt wahrscheinlich durch eine sterische Inhibition bzw. eine Ligand/Rezeptor-Kompetition bei der T-Zell-DZ-Wechselwirkung durch die Fusionsproteine zustande. Diese Beobachtungen werden durch Arbeiten mit einem CD152-Ig-Fusionsprotein gestützt, für das beschrieben wurde, daß es über Anergieinduktion in T-Zellen Allotoleranz bewirken kann (Perez et al., 1997). Ähnliches gilt für ein in einer humanen MLR eingesetztes CTLA-4-CD178-Fusionsprotein, welches sowohl zu T-Zell-Anergie als auch zur Deletion von T-Zellen via AICD führte und damit ebenfalls beide in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Effekte bewirkte (Elhalel et al., 2003).

2.3. CD178-X-Fusionsproteine deletieren selektiv alloreaktive T-Zellen

Da es – wie in der Einleitung bereits verdeutlicht – bei T-Zell-Deletionen im Rahmen der allogenen Stammzelltransplantation ganz wesentlich darauf ankommt, Alloreaktivität möglichst stark zu reduzieren und gleichzeitig T-Zellen mit beispielsweise antileukämischen und antiviralen Antigenspezifitäten zum Schutz des Patienten zu erhalten, wurde untersucht, in wiefern dies bei den in dieser Arbeit angewandten Deletionsstrategien der Fall war.

Anhand der Antigen-spezifischen Restimulation residueller T-Zellen nach der Deletion mit den CD178-X-Fusionsproteinen bzw. dem Jo2-Antikörper als Positivkontrolle wurde untersucht, wie effizient Alloreaktivität deletiert werden konnte. Hierzu wurden die residuellen T-Zellen im Anschluß an die Deletion mit dem Antigen der Primärstimulation restimuliert und die residuelle Alloreaktivität in einem T-Zell-Proliferationstest erfaßt. Das Experiment der Restimulation der residuellen T-Lymphozyten zeigte, daß nach *in-vitro*-Deletion mit CD178-X-Fusionsproteinen kaum noch Alloreaktivität im Proliferationstest im Vergleich zur allogenen Stimulationskontrolle detektiert werden konnte. Als Positivkontrolle für die Deletion fungierte hierbei wieder Jo2-Antikörper, der ebenfalls zu einer starken Reduktion der Alloreaktivität führte.

Um zu überprüfen, ob bei der Deletion alloreaktiver T-Zellen mit hCD178-X-Fusionsproteinen beispielsweise antivirale Antigenspezifitäten erhalten werden, wurde bei dem hier verwendeten murinen MHC-disparaten System der Erhalt OVA-spezifischer T-Zellen untersucht. Hierzu wurden OVA-spezifische T-Zellen zu den T-Zellen, die der *in-vitro*-Deletion mit hCD178-mCD28-Fusionsprotein und Jo2-Antikörper unterzogen wurden, zugegeben und die residuellen T-Zellen mit einer EL4G7-OVA-Transfektante restimuliert. Die ELISpot-Analyse der Restimulation

ergab, daß sowohl für die Fusionsprotein-deletierten residuellen T-Zellen als auch für die Jo2-deletierten T-Zellen eine deutliche OVA-spezifische T-Zellantwort CD8⁺ T-Zellen erhalten wurde. Für Jo2 konnte bereits experimentell gezeigt werden, daß bei einer Deletion mit diesem Antikörper Antigenspezifitäten erhalten werden können (Hartwig et al., 2002).

Mit diesen beiden Ergebnissen, einer stark reduzierten Alloreaktivität unter Erhalt von Antigenspezifitäten, waren die entscheidenden Anforderungen an eine geeignete Deletionsstrategie erfüllt und das immunreaktive Verhalten der residuellen T-Zellen konnte *in vivo* untersucht werden.

2.4. *In vitro* mit hCD178-mCD28-Fusionsprotein durchgeführte Deletion/Inhibition alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten führt *in vivo* zur effektiven GvHD-Prophylaxe

Zur Untersuchung, ob die *in-vitro*-Deletion alloreaktiver T-Zellen zur Elimination GvH-reaktiver T-Lymphozyten führte, wurden residuelle T-Zellen in subletal bestrahlte Rezipientenmäuse intravenös injiziert. Zur Anwendung kamen hierbei ein MHC-disparates sowie ein MHC-identen, aber mHAg-disparates Mausmodell. Die Deletion der T-Zellen erfolgte mittels hCD178-mCD28-Fusionsprotein sowie mit Jo2-Antikörper. Für diese *in-vivo*-Untersuchungen wurde das mCD28-Fusionsprotein angewandt, weil sich Fusionsproteine mit humanem Fusionsanteil in Vorversuchen in F₁-Mäusen als immunogen herausstellten und diese Mäuse nach repetitiver Injektion der Fusionsproteine verstarben, während NOD/SCID Mäuse, die keine Antikörper gegen die Fusionsproteine bilden können, keine immunogene Reaktion zeigten.

Nach der Injektion der residuellen T-Zellen wurden die Mäuse hinsichtlich der Entwicklung einer GvHD beobachtet und das Versterben von Rezipientenmäusen in einer Kaplan-Meier-Kurve festgehalten. Als Positivkontrolle dienten Mäuse, die unbehandelte allogene vorstimulierte T-Zellen erhielten. Als Spezifitätskontrolle erhielten einige Rezipienten T-Zellen, die mit dem irrelevanten Fusionsprotein hTRAIL-mCD28 vorbehandelt worden waren. Im MHC-disparaten Mausmodell zeigte sich, daß alle Rezipienten der Positivkontrollgruppe innerhalb von etwa 20 Tagen nach der Injektion eine akute GvHD entwickelten und verstarben. Ebenso verstarben in etwa dem gleichen Zeitraum alle Rezipienten, welche mit dem irrelevanten Fusionsprotein behandelte T-Zellen erhielten. Bei den beiden Rezipientengruppen, welche T-Zellen erhielten, die mit dem hCD178-mCD28-Fusionsprotein bzw. dem Jo2-Antikörper der Deletion unterzogen wurden, überlebten rund 80% der Versuchstiere ohne Anzeichen einer akuten GvHD. Dies traf auch auf diese beiden Rezipientengruppen des MHC-identen, aber mHAg-disparaten Mausmodells zu.

Hierbei starben allerdings nicht alle Rezipienten der Positivkontrollgruppe, 25% der Tiere dieser Gruppe entwickelten Anzeichen einer chronischen GvHD. Die Rezipienten, die die mit irrelevantem Fusionsprotein vorbehandelten T-Zellen erhielten, verstarben alle an akuter GvHD.

Die in der Einleitung bereits aufgeführten Daten zeigen, daß bei der allogenen Stammzelltransplantation, bei der lediglich eine einzige MHC-Disparität besteht, bereits etwa 50% der Patienten trotz immunsuppressiver Therapie eine akute GvHD entwickeln. Die Deletion allogener Spender-T-Lymphozyten mit hCD178-mCD28-Fusionsprotein und agonistischem anti-CD95-Antikörper minimierte in dieser Arbeit die Alloreaktivität der T-Zellen so weit, daß *in vivo* nach adoptivem Transfer dieser depletierten Spender-T-Lymphozyten eine wirksame GvHD-Prophylaxe entstand. Lediglich 20% der Rezipienten beider Maussysteme, die deletierte T-Zellen erhielten, entwickelten eine GvHD.

Im Hinblick auf die Entwicklung einer klinisch anwendbaren Strategie zur Deletion alloreaktiver T-Zellen ist jedoch die Verwendung von CD178-X-Fusionsproteinen der Verwendung von agonistischem anti CD95-Antikörper vorzuziehen, obgleich dieser Antikörper *in vitro* im Vergleich zu den Fusionsproteinen eine stärkere Reduktion der Alloreaktivität erzielt. Der Antikörper bedingt den Nachteil, daß er aufgrund der Zelltyp-unabhängigen Bindung an das CD95-Molekül Apoptose nicht nur in T-Zellen induziert. Er besitzt daher hepatotoxische Eigenschaften, wodurch sich eine *in-vivo*-Anwendung ausschließt. Auch die Anwendung im Rahmen einer *in-vitro*-Deletion ist problematisch, da der Antikörper trotz Auswaschen mit den residuellen T-Zellen durch adoptiven Transfer in den Transplantatrezipienten gelangen könnte und dort aufgrund seiner hohen Haltbarkeit noch immer hepatotoxisch wirken. Daher bietet der Einsatz von CD178-X-Fusionsproteinen entscheidende Vorteile gegenüber agonistischem anti CD95-Antikörper.

2.4.1. Nach adoptivem Transfer *in-vitro*-deletierter Spender-T-Lymphozyten entwickelten die Rezipienten einen T-Zell-Chimärismus

Anhand von Chimärismusanalysen wurde untersucht, ob die Mäuse nach adoptivem Transfer der *in-vitro*-deletierten Spender-T-Lymphozyten genügend dieser T-Zellen aufwiesen, um potentiell eine GvHD entwickeln zu können.

Für eine Diskriminierung von Spender-T-Lymphozyten und T-Zellen des Rezipienten wurden für den adoptiven Transfer T-Zellen aus einer allogenen GFP⁺ Maus verwendet. Diese wurden wie bei vorangegangenen T-Zell-Transferexperimenten der *in-vitro*-Deletion unterzogen. 7 bzw. 14 Tage nach dem adoptivem Transfer erfolgte die durchflußzytometrische Analyse der lymphatischen Organe sowie des Blutes der

Rezipiententiere hinsichtlich der Existenz CD3⁺/GFP⁺ Zellen. Bei den Chimärismusanalysen wurden die Spender-T-Zellen zu beiden Untersuchungszeitpunkten in allen untersuchten Organen gefunden. Die Rezipienten der Positivkontrollgruppe wiesen dabei den größten Anteil allogener Spender-T-Lymphozyten auf, aber auch die Rezipienten, die residuelle T-Zellen aus den *in-vitro*-Deletionen erhielten, zeigten einen deutlichen T-Zell-Chimärismus. Daher kann davon ausgegangen werden, daß in allen T-Zell-Rezipienten genügend T-Zellen injiziert wurden, um potentiell GvHD zu induzieren. Die drastische Reduktion der GvHD-Rate in den Rezipientengruppen, die deletierte T-Zellen erhielten, kann damit auf die selektive Elimination von GvHD-Reaktivität durch die Deletion zurückgeführt werden.

2.5. B-Lymphozyten eignen sich ebenfalls als APZ für die Beladung mit Fusionsproteinen

Bei myeloiden Leukämieformen können DZ prinzipiell antigene Strukturen der Leukämie koexprimieren. Sie können dann nicht zur Reduktion von GvH-Reaktivität in Form modifizierter APZ eingesetzt werden, da sie ebenfalls wertvolle GvL-Reaktivität eliminieren können. Daher wurden B-Zellen als alternativer Zelltyp für die Beladung mit Fusionsproteinen und Stimulation der T-Zellen untersucht. Stimulierte B-Zellen können als APZ fungieren, da sie kostimulatorische Moleküle konstitutiv exprimieren. Diese können analog den DZ mit den Fusionsproteinen beladen werden. In dieser Arbeit konnten naive murine B-Zellen aus der Milz isoliert und über CD40 aktiviert werden. Für die aktivierten B-Zellen wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80/CD86 sowie von RANK-Ligand durchflußzytometrisch nachgewiesen. Im Gegensatz zu DZ kann auf B-Zellen auch das hCD178-hRANK-Fusionsprotein binden.

Die aktivierten B-Zellen wurden mit verschiedenen CD178-X-Fusionsproteinen beladen und als APZ in einer allogenen MLR eingesetzt. Für alle Fusionsproteine ergab sich wieder eine deutliche Reduktion der T-Zellproliferation gegenüber der allogenen Stimulationskontrolle. Die Reduktion war am größten für die an die kostimulatorischen Moleküle bindenden CD28- und CD152-Fusionsproteine. Sie fiel mit dem RANK-Fusionsprotein etwas schwächer aus.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß sich auch B-Zellen für den Einsatz als APZ und die Beladung mit hCD178-X-Fusionsproteinen bei der *in-vitro*-Deletion alloreaktiver T-Lymphozyten eignen und eine Alternative zu der Verwendung von DZ darstellen.

3. Ausblick

In dieser Arbeit konnte dargelegt werden, daß dendritische Zellen mit Hilfe von hCD178-X-Fusionsproteinen für eine effektive GvHD Prophylaxe im Kontext von *in-vitro*-Deletionen alloreaktiver Spender-T-Lymphozyten modifiziert werden können. Damit ist im Tiermodell auf experimentellem Wege für die *in-vitro*-Deletion alloreaktiver T-Zellen ein vielversprechender therapeutischer Weg zur Vermeidung von GvHD bei der allogenen Blutstammzelltransplantation aufgezeigt worden, der weiter verfolgt werden sollte. Offen ist in diesem Zusammenhang beispielsweise die Fragestellung, ob sich die Modifikation von DZ mit hCD178-X-Fusionsproteinen auch für *in-vivo*-Deletionen GvH-reaktiver Spender-T-Lymphozyten eignet, und ob sowohl bei der *in-vitro*- als auch der *in-vivo*-Deletion GvL-reaktive Spender-T-Zellen erhalten bleiben. Dies wäre in weiteren Tiermodellen experimentell zu bearbeiten, beispielsweise anhand eines HA-Tumormodells. Hierbei würden Mäuse zunächst mit HA- (Hämagglutinin aus Influenzavirus) exprimierenden A20-Tumorzellen, einem murinen B-Zell-Lymphom, immunisiert und anschließend das GvH-reaktive bzw. GvL-reaktive Verhalten allogener Spender-T-Lymphozyten in Gegenwart von CD178-X-Fusionsprotein-beladenen DZ in diesen Mäusen untersucht. Dabei fungiert HA als spezifisches Tumorantigen.

Die in dieser Arbeit aufgezeigte insuffiziente CD178-Expression nach Transfektion von hCD178-mRNA in murine DZ wäre hinsichtlich ihrer Ursachen genauer zu untersuchen. Hierbei bedarf vor allem die sowohl in der Literatur als auch in dieser Arbeit aufgrund experimenteller Ergebnisse postulierte regulatorische Funktion der zytoplasmatischen CD178-Region weiterer Aufklärung. Darüber hinaus ist vorstellbar, murine DZ mit Hilfe lentiviraler Vektorsysteme zur Expression von hCD178 zu bringen und zu untersuchen, ob sich diese so modifizierten DZ ebenfalls für eine wirkungsvolle GvHD-Prophylaxe einsetzen lassen. Denkbar ist hierbei auch die Herstellung zytoplasmatisch deletierter hCD178-Lentivirenkonstrukte zur Untersuchung der regulatorischen Funktion der zytoplasmatischen hCD178-Region.

F Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin-D
Abb.	Abbildung
AICD	Activation Induced Cell Death=aktivierungs-induzierter Zelltod
AIF	Apoptosis Inducing Faktor=Apoptose-induzierender Faktor
Ak	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	cluster of differentiation=Differenzierungsgruppe
cDNA	complementary DNA=komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
cpm	counts per minute=Zerfälle pro Minute
dATP	desoxy-Adenosin-5'-Triphosphat
dCTP	desoxy-Cytosin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DD	Death Domain=Todesdomäne
DED	Death Effector Domain=Tod-Effektor-Domäne
dGTP	desoxy-Guanosin-5'-Triphosphat
d.h.	das heißt
DISC	Death Inducing Signaling Complex= Tod-induzierender-Signal-Komplex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotid-5'-Triphosphat
dTTP	desoxy-Thymidin-5'-Triphosphat
DZ	Dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
E. coli	Escherichia coli

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	enhanced GFP=verstärkt fluoreszierendes GFP
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme linked immuno spot
E/T-	effector/target-=Effektor/Ziel-
µF	Mikrofarad
FACS	fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas Associated Death Domain=Fas-Assoziierte-Todes-Domäne
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FLIP	FLICE Inhibitory Protein=FLICE-inhibierendes Protein
g	Fallbeschleunigung der Erde
G-CSF	Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	graft versus host disease=Transplantat gegen Wirt Erkrankung
GvL	graft versus leukemia=Transplantat gegen Leukämie
GvO	Gentechnisch veränderter Organismus
Gy	Gray
³ H	Tritium
h	1.) hour=Stunde; 2.) Präfix für "human"
HA	Hämagglutinin aus Invluenzavirus
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HLA	Human Leucocyte Antigen=humanes Leukozytenantigen
i.d.R.	in der Regel
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropylthiogalactosid
i.v.	intra venös
IVT	<i>in vitro</i> Transkription
kb	Kilobasen
KM	Knochenmark
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molarität

m	1.) Präfix für „murin“ 2.) Vorsatzzeichen „milli“
μ	Vorsatzzeichen „mikro“
mA	Milliamper
MACS	magnetic cell sorting=magnetische Zellsortierung
mcs	multiple cloning site=Multiple Klonierungsstellen
mHAg	minor histocompatibility antigene=„minor“-Histokompatibilitätsantigen
MHC	major histocompatibility complex=Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MLR	mixed lymphocyte reaction=gemischte Lymphozytenreaktion
MMP	Matrixmetalloproteinase
mol	Einheit der Stoffmenge
mRNA	messenger RNA=Botenribonukleinsäure
ms	Millisekunden
NGF	Nerve Growth Factor=Nervenwachstumsfaktor
NGF-R	Nerve Growth Factor Receptor=Nervenwachstumsfaktor-Rezeptor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction=Polymerasekettenreaktion
PE	R-Phycoerythrin
P/S	Penicillin/Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	1.) Reverse Transkription 2.) Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
SA	Streptavidin
Tab.	Tabelle
TGF	tumor growth factor=Tumorstwachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFRSF	TNF-Rezeptor-Superfamilie
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat
TZR	T-Zell-Rezeptor

U	1.) Umdrehungen 2.) unit (Einheit der Enzymaktivität; 1U=1µmol umgesetzt Substrat pro Minute)
ÜN	über Nacht
ÜNK	über Nacht Kultur
V	Volt
Verd.	Verdünnung
x	...fach, ...mal
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
z.B.	zum Beispiel
Z-VAD-FMK	Z-Val-Ala-Asp-(OMe)-Fluoromethylketone

G Literaturverzeichnis

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 2003 Sep;3(9):745-56.

Alderson MR, Tough TW, Davis-Smith T, Braddy S, Falk B, Schooley KA, Goodwin RG, Smith CA, Ramsdell F, Lynch DH. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J Exp Med.* 1995 Jan 1;181(1):71-7.

Appelbaum FR. The current status of hematopoietic cell transplantation. *Annu Rev Med.* 2003;54:491-512.

Apperley JF, Jones L, Hale G, Waldmann H, Hows J, Rombos Y, Tsatalas C, Marcus RE, Goolden AW, Gordon-Smith EC, et al. Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse. *Bone Marrow Transplant.* 1986 May;1(1):53-66.

Arber W. Related Articles Restriktionsendonukleasen. *Angew. Chem.* 1978; 90: 79-85.

Ashany D, Savir A, Bhardwaj N, Elkon KB. Dendritic cells are resistant to apoptosis through the Fas (CD95/APO-1) pathway. *J Immunol.* 1999 Nov 15;163(10):5303-11.

Atkinson K, Horowitz MM, Gale RP, van Bekkum DW, Gluckman E, Good RA, Jacobsen N, Kolb HJ, Rimm AA, Ringden O, et al. Risk factors for chronic graft-versus-host disease after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood.* 1990 Jun 15;75(12):2459-64.

Austyn JM. Antigen-presenting cells. Experimental and clinical studies of dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000 Oct;162(4 Pt 2):S146-50.

Baker MB, Riley RL, Podack ER, Levy RB. Graft-versus-host-disease-associated lymphoid hypoplasia and B cell dysfunction is dependent upon donor T cell-mediated Fas-ligand function, but not perforin function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Feb 18;94(4):1366-71.

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

Banerjee AK. 5'-Terminal cap structure in eukaryotic messenger ribonucleic acids. *Microbiol. Rev.* 1980, 44: 175-205

Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol.* 1999 Oct;10(5):440-7.

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature.* 1998 Jun 4;393(6684):478-80.

Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell.* 1996 Jun 14;85(6):803-15.

Bossi G, Griffiths GM. Degranulation plays an essential part in regulating cell surface expression of Fas ligand in T cells and natural killer cells. *Nat Med.* 1999 Jan;5(1):90-6.

Braun MY, Lowin B, French L, Acha-Orbea H, Tschopp J. Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease. *J Exp Med.* 1996 Feb 1;183(2):657-61.

Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH, Ware CF, et al. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature.* 1995 Feb 2;373(6513):441-4.

Buonocore S, Van Meirvenne S, Demoor FX, Paulart F, Thielemans K, Goldman M, Flamand V. Dendritic cells transduced with viral interleukin 10 or Fas ligand: no evidence for induction of allotolerance in vivo. *Transplantation.* 2002 Jan 15;73(1 Suppl):S27-30.

Buonocore S, Paulart F, Le Moine A, Braun M, Salmon I, Van Meirvenne S, Thielemans K, Goldman M, Flamand V. Dendritic cells overexpressing CD95 (Fas) ligand elicit vigorous allospecific T-cell responses in vivo. *Blood.* 2003 Feb 15;101(4):1469-76. *Epub* 2002 Oct 17.

Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature.* 1992 Nov 19;360(6401):258-61.

Chang DW, Xing Z, Pan Y, Algeciras-Schimmich A, Barnhart BC, Yaish-Ohad S, Peter ME, Yang X. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *EMBO J.* 2002 Jul 15;21(14):3704-14.

Cherradi SL, Shirwan H. Expression of FasL as a stable cell-surface molecule is important to its apoptotic function. *Transplant Proc.* 2001 Feb-Mar;33(1-2):259. *No abstract available.*

Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell.* 1995 May 19;81(4):505-12.

Chu JL, Ramos P, Rosendorff A, Nikolic-Zugic J, Lacy E, Matsuzawa A, Elkon KB. Massive upregulation of the Fas ligand in lpr and gld mice: implications for Fas regulation and the graft-versus-host disease-like wasting syndrome. *J Exp Med.* 1995 Jan 1;181(1):393-8.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent Escherichia coli: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Apr;86(7):2172-5.

Cohen SN, Chang AC, Hsu L. Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1972 Aug;69(8):2110-4.

Datta AR, Barrett AJ, Jiang YZ, Guimaraes A, Mavroudis DA, van Rhee F, Gordon AA, Madrigal A. Distinct T cell populations distinguish chronic myeloid leukaemia cells from lymphocytes in the same individual: a model for separating GVHD from GVL reactions. *Bone Marrow Transplant.* 1994 Oct;14(4):517-24.

Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature.* 1995 Feb 2;373(6513):438-41.

Dicke, K.A. The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphatic cell mixtures; II: mouse spleen cell fraction on a discontinuous albumin gradient. *Transplantation* 1968; 6: 562-570

Dolstra H, Fredrix H, Preijers F, Goulmy E, Figdor CG, de Witte TM, van de Wiel-van Kemenade E. Recognition of a B cell leukemia-associated minor histocompatibility antigen by CTL. *J Immunol.* 1997 Jan 15;158(2):560-5.

Dong Z, Saikumar P, Weinberg JM, Venkatachalam MA. Internucleosomal DNA cleavage triggered by plasma membrane damage during necrotic cell death. Involvement of serine but not cysteine proteases. *Am J Pathol.* 1997 Nov;151(5):1205-13.

Elhalel MD, Huang JH, Schmidt W, Rachmilewitz J, Tykocinski ML. CTLA-4-FasL induces alloantigen-specific hyporesponsiveness. *J Immunol.* 2003 Jun 15;170(12):5842-50.

Falkenburg JH, Wafelman AR, Joosten P, Smit WM, van Bergen CA, Bongaerts R, Lurvink E, van der Hoorn M, Kluck P, Landegent JE, Kluin-Nelemans HC, Fibbe WE, Willemze R. Complete remission of accelerated phase chronic myeloid leukemia by treatment with leukemia-reactive cytotoxic T lymphocytes. *Blood.* 1999 Aug 15;94(4):1201-8.

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Nov;84(21):7413-7.

Fenteany G, Schreiber SL. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J Biol Chem.* 1998 Apr 10;273(15):8545-8.

Ferrara JL, Levy R, Chao NJ. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 1999;5(6):347-56. Review.

Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med.* 2004 May;10(5):475-80.

Fournel S, Genestier L, Robinet E, Flacher M, Revillard JP. Human T cells require IL-2 but not G1/S transition to acquire susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J Immunol.* 1996 Nov 15;157(10):4309-15.

Girolomoni G. and Corinti, S. Dendritic Cells (T-Lymphocyte Stimulating). *Encyclopedia of Life Sciences 2001: 1-6*

Goodman JL, Winston DJ, Greenfield RA, Chandrasekar PH, Fox B, Kaizer H, Shadduck RK, Shea TC, Stiff P, Friedman DJ, et al. A controlled trial of fluconazole to prevent fungal infections in patients undergoing bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1992 Mar 26;326(13):845-51.

Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med.* 1993 Feb 1;118(3):173-8.

Goulmy E, Schipper R, Pool J, Blokland E, Falkenburg JH, Vossen J, Gratwohl A, Vogelsang GB, van Houwelingen HC, van Rood JJ. Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1996 Feb 1;334(5):281-5.

Green DR, Bissonnette RP, Glynn JM, Shi Y. Activation-induced apoptosis in lymphoid systems. *Semin Immunol.* 1992 Dec;4(6):379-88.

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 1995 Nov 17;270(5239):1189-92.

Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 1999 Aug 1;13(15):1899-911.

Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Millman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem.* 1999b Jan 8;274(2):1156-63.

Gruss HJ. Molecular, structural, and biological characteristics of the tumor necrosis factor ligand superfamily. *Int J Clin Lab Res.* 1996;26(3):143-59.

Hackstein H, Thomson AW. Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs. *Nat Rev Immunol.* 2004 Jan;4(1):24-34.

Hartwig UF, Robbers M, Wickenhauser C, Huber C. Murine acute graft-versus-host disease can be prevented by depletion of alloreactive T lymphocytes using activation-induced cell death. *Blood.* 2002 Apr 15;99(8):3041-9.

Hengartner MO. Apoptosis: corralling the corpses. *Cell.* 2001 Feb 9;104(3):325-8.

Henkler F, Behrle E, Dennehy KM, Wicovsky A, Peters N, Warnke C, Pfizenmaier K, Wajant H. The extracellular domains of FasL and Fas are sufficient for the formation of supramolecular FasL-Fas clusters of high stability. *J Cell Biol.* 2005 Mar 28;168(7):1087-98

Hildeman DA, Mitchell T, Teague TK, Henson P, Day BJ, Kappler J, Marrack PC. Reactive oxygen species regulate activation-induced T cell apoptosis. *Immunity.* 1999 Jun;10(6):735-44.

Ho VT, Soiffer RJ. The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3192-204.

Hoves S, Krause SW, Halbritter D, Zhang HG, Mountz JD, Scholmerich J, Fleck M. Mature but not immature Fas ligand (CD95L)-transduced human monocyte-derived dendritic cells are protected from Fas-mediated apoptosis and can be used as killer APC. *J Immunol.* 2003 Jun 1;170(11):5406-13.

Huang DC, Hahne M, Schroeter M, Frei K, Fontana A, Villunger A, Newton K, Tschopp J, Strasser A. Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-x(L). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Dec 21;96(26):14871-6.

Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, Wolpe S, Schuler G. Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood. *J Exp Med.* 1992a May 1;175(5):1157-67.

Inaba K, Inaba M, Romani N, Aya H, Deguchi M, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med.* 1992 Dec 1;176(6):1693-702.

Inaba K, Inaba M, Deguchi M, Hagi K, Yasumizu R, Ikehara S, Muramatsu S, Steinman RM. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 1;90(7):3038-42.

Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 1997 Jul 10;388(6638):190-5.

Jainchill JL, Aaronson SA, Todaro GJ. Murine sarcoma and leukemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J Virol*. 1969 Nov;4(5):549-53.

Janssen O, Sanzenbacher R, Kabelitz D. Regulation of activation-induced cell death of mature T-lymphocyte populations. *Cell Tissue Res*. 2000 Jul;301(1):85-99.

Jiang YZ, Mavroudis DA, Dermime S, Molldrem J, Hensel NF, Barrett AJ. Preferential usage of T cell receptor (TCR) V beta by allogeneic T cells recognizing myeloid leukemia cells: implications for separating graft-versus-leukemia effect from graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant*. 1997 May;19(9):899-903.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, Ettinger R, el-Khatib M, Sherr DH, Stanger BZ, Marshak-Rothstein A. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature*. 1995 Feb 2;373(6513):444-8.

Kaltwasser M, Wiegert T, Schumann W. Construction and application of epitope- and green fluorescent protein-tagging integration vectors for *Bacillus subtilis*. *Appl Environ Microbiol*. 2002 May;68(5):2624-8.

Kaltwasser M, Nonn M, Huber C, Hartwig UF. Selective depletion of GvH-reactive T-lymphocytes by CD178 (FasL) expressing allogeneic stimulator cells for preventing Graft-versus-Host Disease (GvHD) in allo BMT. *Immunobiol*. 2003; 208: 252

Kaltwasser M, Lehne M, Metz C, Wajant H, Huber C, Hartwig UF. Selective depletion of alloreactive donor T-lymphocytes by CD178-based chimeric molecules with proapoptotic and costimulatory inhibiting properties. *Immunobiol*. 2005; 210: 512

Kampgen E, Koch F, Heufler C, Eggert A, Gill LL, Gillis S, Dower SK, Romani N, Schuler G. Understanding the dendritic cell lineage through a study of cytokine receptors. *J Exp Med*. 1994 Jun 1;179(6):1767-76.

Kataoka T, Schroter M, Hahne M, Schneider P, Irmeler M, Thome M, Froelich CJ, Tschopp J. FLIP prevents apoptosis induced by death receptors but not by perforin/granzyme B, chemotherapeutic drugs, and gamma irradiation. *J Immunol*. 1998 Oct 15;161(8):3936-42.

Kawamura T, Azuma M, Kayagaki N, Shimada S, Yagita H, Okumura K. Fas/Fas ligand-mediated elimination of antigen-bearing Langerhans cells in draining lymph nodes. *Br J Dermatol*. 1999 Aug;141(2):201-5.

Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*. 1995 Dec 1;182(6):1777-83.

Kepler OT, Peter ME, Hinderlich S, Moldenhauer G, Stehling P, Schmitz I, Schwartz-Albiez R, Reutter W, Pawlita M. Differential sialylation of cell surface glycoconjugates in a human B lymphoma cell line regulates susceptibility for CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis and for infection by a lymphotropic virus. *Glycobiology*. 1999 Jun;9(6):557-69.

Kim KJ, Kanellopoulos-Langevin C, Merwin RM, Sachs DH, Asofsky R. Establishment and characterization of BALB/c lymphoma lines with B cell properties. *J Immunol*. 1979 Feb;122(2):549-54.

Klas C, Debatin KM, Jonker RR, Krammer PH. Activation interferes with the APO-1 pathway in mature human T cells. *Int Immunol*. 1993 Jun;5(6):625-30.

Kneitz B, Herrmann T, Yonehara S, Schimpl A. Normal clonal expansion but impaired Fas-mediated cell death and anergy induction in interleukin-2-deficient mice. *Eur J Immunol*. 1995 Sep;25(9):2572-7.

Kolb HJ, Schattenberg A, Goldman JM, Hertenstein B, Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrant A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T, Holler E, Ansari H; European Group for Blood and Marrow Transplantation Working Party Chronic Leukemia. Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*. 1995 Sep 1;86(5):2041-50.

Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol*. 1999;71:163-210.

Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*. 2000 Oct 12;407(6805):789-95.

Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev*. 2003 Jun;193:58-69.

Lenardo MJ. Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. *Nature*. 1991 Oct 31;353(6347):858-61.

Lenardo M, Chan KM, Hornung F, McFarland H, Siegel R, Wang J, Zheng L. Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:221-53. *Review*.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-58.

Leverkus M, Walczak H, McLellan A, Fries HW, Terbeck G, Brocker EB, Kampgen E. Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis. *Blood*. 2000 Oct 1;96(7):2628-31.

Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood*. 1994 Apr 1;83(7):1971-9.

Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*. 1994 Dec;1(9):793-801.

Loveland, B., Simpson, E. The non-MHC transplantation antigens: neither weak nor minor. *Immunol. Today* 1986; 7:223.

Lozzio CB, Lozzio BB. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 1975 Mar;45(3):321-34.

Lunemann JD, Waiczies S, Ehrlich S, Wendling U, Seeger B, Kamradt T, Zipp F. Death ligand TRAIL induces no apoptosis but inhibits activation of human (auto)antigen-specific T cells. *J Immunol*. 2002 May 15;168(10):4881-8.

Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rossner S, Koch F, Romani N, Schuler G. An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods*. 1999 Feb 1;223(1):77-92.

Mandel M, Higa A. Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. 1970. *Biotechnology*. 1992;24:198-201.

Maraskovsky E, Brasel K, Teepe M, Roux ER, Lyman SD, Shortman K, McKenna HJ. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J Exp Med*. 1996 Nov 1;184(5):1953-62.

Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, Sanders JE, Deeg HJ, Stewart P, Appelbaum FR, Clift R, Fefer A, Witherspoon RP, et al. Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood*. 1985 Sep;66(3):664-72.

Martin P, Nash R, Sanders J, Leisenring W, Anasetti C, Deeg HJ, Storb R, Appelbaum F. Reproducibility in retrospective grading of acute graft-versus-host disease after allogeneic marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 1998 Feb;21(3):273-9.

Masurier C, Pioche-Durieu C, Colombo BM, Lacave R, Lemoine FM, Klatzmann D, Guigon M. Immunophenotypical and functional heterogeneity of dendritic cells generated from murine bone marrow cultured with different cytokine combinations: implications for anti-tumoral cell therapy. *Immunology*. 1999 Apr;96(4):569-77.

Matsue H, Matsue K, Walters M, Okumura K, Yagita H, Takashima A. Induction of antigen-specific immunosuppression by CD95L cDNA-transfected 'killer' dendritic cells. *Nat Med.* 1999 Aug;5(8):930-7.

Matsue H, Edelbaum D, Hartmann AC, Morita A, Bergstresser PR, Yagita H, Okumura K, Takashima A. Dendritic cells undergo rapid apoptosis in vitro during antigen-specific interaction with CD4+ T cells. *J Immunol.* 1999b May 1;162(9):5287-98.

Matsue H, Matsue K, Kusuhara M, Kumamoto T, Okumura K, Yagita H, Takashima A. Immunosuppressive properties of CD95L-transduced "killer" hybrids created by fusing donor- and recipient-derived dendritic cells. *Blood.* 2001 Dec 1;98(12):3465-72.

Matyszak MK, Citterio S, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 2000 Apr;30(4):1233-42.

Meinl E, Fickenscher H, Thome M, Tschopp J, Fleckenstein B. Anti-apoptotic strategies of lymphotropic viruses. *Immunol Today.* 1998 Oct;19(10):474-9.

Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1986 Mar;153(3):478-88.

Min WP, Gorczynski R, Huang XY, Kushida M, Kim P, Obataki M, Lei J, Suri RM, Cattral MS. Dendritic cells genetically engineered to express Fas ligand induce donor-specific hyporesponsiveness and prolong allograft survival. *J Immunol.* 2000 Jan 1;164(1):161-7.

Miller G, Pillarisetty VG, Shah AB, Lahrs S, DeMatteo RP. Murine Flt3 ligand expands distinct dendritic cells with both tolerogenic and immunogenic properties. *J Immunol.* 2003 Apr 1;170(7):3554-64.

Moldrem J, Dermime S, Parker K, Jiang YZ, Mavroudis D, Hensel N, Fukushima P, Barrett AJ. Targeted T-cell therapy for human leukemia: cytotoxic T lymphocytes specific for a peptide derived from proteinase 3 preferentially lyse human myeloid leukemia cells. *Blood.* 1996 Oct 1;88(7):2450-7.

Moore MW, Carbone FR, Bevan MJ. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell.* 1988 Sep 9;54(6):777-85.

Moser M, De Smedt T, Sornasse T, Tielemans F, Chentoufi AA, Muraille E, Van Mechelen M, Urbain J, Leo O. Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol.* 1995 Oct;25(10):2818-24.

Muller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J Exp Med.* 1998 Dec 7;188(11):2033-45.

Nash RA, Pepe MS, Storb R, Longton G, Pettinger M, Anasetti C, Appelbaum FR, Bowden RA, Deeg HJ, Doney K, et al. Acute graft-versus-host disease: analysis of risk factors after allogeneic marrow transplantation and prophylaxis with cyclosporine and methotrexate. *Blood*. 1992 Oct 1;80(7):1838-45.

Noel PJ, Boise LH, Green JM, Thompson CB. CD28 costimulation prevents cell death during primary T cell activation. *J Immunol*. 1996 Jul 15;157(2):636-42.

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*. 1993 Aug 26;364(6440):806-9.

Okamoto I, Kohno K, Tanimoto T, Iwaki K, Ishihara T, Akamatsu S, Ikegami H, Kurimoto M. IL-18 prevents the development of chronic graft-versus-host disease in mice. *J Immunol*. 2000 Jun 1;164(11):6067-74.

Okamura H, Tsutsi H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature*. 1995 Nov 2;378(6552):88-91.

Pedersen AE, Gad M, Walter MR, Claesson MH. Induction of regulatory dendritic cells by dexamethasone and 1alpha,25-Dihydroxyvitamin D(3). *Immunol Lett*. 2004 Jan 30;91(1):63-9.

Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*. 1997 Apr;6(4):411-7.

Perreault C, Roy DC, Fortin C. Immunodominant minor histocompatibility antigens: the major ones. *Immunol Today*. 1998 Feb;19(2):69-74.

Piemonti L, Monti P, Allavena P, Sironi M, Soldini L, Leone BE, Socci C, Di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol*. 1999 Jun 1;162(11):6473-81.

Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol*. 1994 Oct;6(10):1545-53.

Rea D, van Kooten C, van Meijgaarden KE, Ottenhoff TH, Melief CJ, Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3162-7.

Reddy P, Teshima T, Kukuruga M, Ordemann R, Liu C, Lowler K, Ferrara JL. Interleukin-18 regulates acute graft-versus-host disease by enhancing Fas-mediated donor T cell apoptosis. *J Exp Med*. 2001 Nov 19;194(10):1433-40.

Rescigno M, Piguet V, Valzasina B, Lens S, Zubler R, French L, Kindler V, Tschopp J, Ricciardi-Castagnoli P. Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1 β , and the production of interferon gamma in the absence of IL-12 during DC-T cell cognate interaction: a new role for Fas ligand in inflammatory responses. *J Exp Med.* 2000 Dec 4;192(11):1661-8.

Rowley PT, Ohlsson-Wilhelm BM, Farley BA, LaBella S. Inducers of erythroid differentiation in K562 human leukemia cells. *Exp Hematol.* 1981 Jan;9(1):32-7.

Russell JH, White CL, Loh DY, Meleedy-Rey P. Receptor-stimulated death pathway is opened by antigen in mature T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 15;88(6):2151-5.

Salvesen GS. Caspase 8: igniting the death machine. *Structure.* 1999 Oct 15;7(10):R225-9.

Sambrook, J. Molecular cloning. Cold Spring Harbour Press 1989, Cold Spring Harbour, New York

Samel D, Muller D, Gerspach J, Assouhou-Luty C, Sass G, Tiegs G, Pfizenmaier K, Wajant H. Generation of a FasL-based proapoptotic fusion protein devoid of systemic toxicity due to cell-surface antigen-restricted Activation. *J Biol Chem.* 2003 Aug 22;278(34):32077-82. Epub 2003 May 28.

Sato K, Yamashita N, Yamashita N, Baba M, Matsuyama T. Regulatory dendritic cells protect mice from murine acute graft-versus-host disease and leukemia relapse. *Immunity.* 2003 Mar;18(3):367-79.

Satoshi Jodo, Vyankatesh J. Pidiyar, Sheng Xiao, Akira Furusaki, Rahul Sharma, Takao Koike, and Shyr-Te Ju. Cutting Edge: Fas Ligand (CD178) Cytoplasmic Tail Is a Positive Regulator of Fas Ligand-Mediated Cytotoxicity. *J. Immunol.* Apr 2005; 174:4470-4474.

Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J.* 1998 Mar 16;17(6):1675-87.

Scaffidi C, Schmitz I, Krammer PH, Peter ME. The role of c-FLIP in modulation of CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1541-8.

Schäfer, M. Das poly(A)-Ende der mRNA. Seine Rolle in der Gen-Expression. *Biol. i. u. Zeit* 1992; 22: 39

Schenborn ET, Mierendorf RC Jr. A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* 1985 Sep 11;13(17):6223-36.

Schneider P, Holler N, Bodmer JL, Hahne M, Frei K, Fontana A, Tschopp J. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 1998 Apr 20;187(8):1205-13.

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Ofringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 1998 Jun 4;393(6684):480-3.

Shi YF, Sahai BM, Green DR. Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and thymocytes. *Nature.* 1989 Jun 22;339(6226):625-6.

Singer GG, Abbas AK. The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity.* 1994 Aug;1(5):365-71.

Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM. Benzylloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J.* 1996 Apr 1;315 (Pt 1):21-4.

Song K, Chen Y, Goke R, Wilmen A, Seidel C, Goke A, Hilliard B, Chen Y. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is an inhibitor of autoimmune inflammation and cell cycle progression. *J Exp Med.* 2000 Apr 3;191(7):1095-104.

Sprent J, Miller JF. Fate of H2-activated T lymphocytes in syngeneic hosts. III. Differentiation into long-lived recirculating memory cells. *Cell Immunol.* 1976 Feb;21(2):314-26.

Sprent J, Tough DF. T cell death and memory. *Science.* 2001 Jul 13;293(5528):245-8.

Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9:271-96.

Suda T, Tanaka M, Miwa K, Nagata S. Apoptosis of mouse naive T cells induced by recombinant soluble Fas ligand and activation-induced resistance to Fas ligand. *J Immunol.* 1996 Nov 1;157(9):3918-24.

Suda T, Hashimoto H, Tanaka M, Ochi T, Nagata S. Membrane Fas ligand kills human peripheral blood T lymphocytes, and soluble Fas ligand blocks the killing. *J Exp Med.* 1997 Dec 15;186(12):2045-50.

Suzuki H, Kundig TM, Furlonger C, Wakeham A, Timms E, Matsuyama T, Schmits R, Simard JJ, Ohashi PS, Griesser H, et al. Deregulated T cell activation and autoimmunity in mice lacking interleukin-2 receptor beta. *Science.* 1995 Jun 9;268(5216):1472-6.

Suzuki I, Martin S, Boursalian TE, Beers C, Fink PJ. Fas ligand costimulates the in vivo proliferation of CD8+ T cells. *J Immunol.* 2000 Nov 15;165(10):5537-43.

- Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol.* 1994 Oct;6(10):1567-74.
- Takahashi T, Tanaka M, Brannan CI, Jenkins NA, Copeland NG, Suda T, Nagata S. Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand. *Cell.* 1994 Mar 25;76(6):969-76.
- Tanaka J, Imamura M, Kasai M, Hashino S, Kobayashi S, Noto S, Higa T, Sakurada K, Asaka M. The important balance between cytokines derived from type 1 and type 2 helper T cells in the control of graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.* 1997 Mar;19(6):571-6.
- Theofilopoulos AN, Balderas RS, Gozes Y, Aguado MT, Hang LM, Morrow PR, Dixon FJ. Association of *Ipr* gene with graft-vs.-host disease-like syndrome. *J Exp Med.* 1985 Jul 1;162(1):1-18. Review.
- Tucek-Szabo CL, Andjelic S, Lacy E, Elkon KB, Nikolic-Zugic J. Surface T cell Fas receptor/CD95 regulation, in vivo activation, and apoptosis. Activation-induced death can occur without Fas receptor. *J Immunol.* 1996 Jan 1;156(1):192-200.
- Uharek L, Glass B, Zeis M, Dreger P, Steinmann J, Loffler H, Schmitz N. Abrogation of graft-vs.-leukemia activity after depletion of CD3+ T cells in a murine model of MHC-matched peripheral blood progenitor cell transplantation (PBPCT). *Exp Hematol.* 1998 Feb;26(2):93-9.
- Van Meirvenne S, Straetman L, Heirman C, Dullaers M, De Greef C, Van Tendeloo V, Thielemans K. Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA. *Cancer Gene Ther.* 2002 Sep;9(9):787-97.
- Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell.* 1999 Jan 22;96(2):245-54.
- Verfaillie CM. Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat Immunol.* 2002 Apr;3(4):314-7.
- Via CS, Nguyen P, Shustov A, Drappa J, Elkon KB. A major role for the Fas pathway in acute graft-versus-host disease. *J Immunol.* 1996 Dec 15;157(12):5387-93.
- Vogelsang GB, Lee L, Bensen-Kennedy DM. Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant. *Annu Rev Med.* 2003;54:29-52. *Epub* 2001 Dec 3.
- Vremec D, Zorbas M, Scollay R, Saunders DJ, Ardavin CF, Wu L, Shortman K. The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells. *J Exp Med.* 1992 Jul 1;176(1):47-58.

Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, Yao X, Puck JM, Straus SE, Lenardo MJ. Inherited human Caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999 Jul 9;98(1):47-58.

Wickens M. How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci*. 1990 Jul;15(7):277-81.

Willerford DM, Chen J, Ferry JA, Davidson L, Ma A, Alt FW. Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment. *Immunity*. 1995 Oct;3(4):521-30.

Wolfe T, Asseman C, Hughes A, Matsue H, Takashima A, von Herrath MG. Reduction of antiviral CD8 lymphocytes in vivo with dendritic cells expressing Fas ligand-increased survival of viral (lymphocytic choriomeningitis virus) central nervous system infection. *J Immunol*. 2002 Nov 1;169(9):4867-72.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*. 1980;68:251-306.

Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D. Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol*. 1984 Jan;142(1):67-77.

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull*. 1997;53(3):451-65.

Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Furth EE, Gonczol E, Wilson JM. Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 May 10;91(10):4407-11.

Yang YG, Sergio JJ, Pearson DA, Szot GL, Shimizu A, Sykes M. Interleukin-12 preserves the graft-versus-leukemia effect of allogeneic CD8 T cells while inhibiting CD4-dependent graft-versus-host disease in mice. *Blood*. 1997 Dec 1;90(11):4651-60.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; 33:103-19.

Yokota A, Oikawa A, Matsuda C, Shinohara N, Eshima K. Cell-mediated fas-based lysis of dendritic cells which are apparently resistant to anti-Fas antibody. *Microbiol Immunol*. 2003;47(4):285-93.

Zhang X, Brunner T, Carter L, Dutton RW, Rogers P, Bradley L, Sato T, Reed JC, Green D, Swain SL. Unequal death in T helper cell (Th)1 and Th2 effectors: Th1, but not Th2, effectors undergo rapid Fas/FasL-mediated apoptosis. *J Exp Med*. 1997 May 19;185(10):1837-49.

Zhang HG, Su X, Liu D, Liu W, Yang P, Wang Z, Edwards CK, Bluethmann H, Mountz JD, Zhou T. Induction of specific T cell tolerance by Fas ligand-expressing antigen-presenting cells. *J Immunol.* 1999 Feb 1;162(3):1423-30.

Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature.* 1995 Sep 28;377(6547):348-51.

Zheng L, Trageser CL, Willerford DM, Lenardo MJ. T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *J Immunol.* 1998 Jan 15;160(2):763-9.

Zou H, Li Y, Liu X, Wang X. An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem.* 1999 Apr 23;274(17):11549-56.