

**Untersuchungen zur Effizienz von
DNA-und Protein-Trägersystemen zur
Induktion von zellulären Immunantworten
durch Dendritische Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades des
Doktors der Naturwissenschaften
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III
Chemie, Pharmazie, Bio- und Werkstoffwissenschaften
der Universität des Saarlandes

von

Diplom Biologin
Nicoletta Scheller

Saarbrücken

2006

Tag des Kolloquiums:

Dekan: Prof. Dr. K. Hegetschweiler

Berichterstatter: Prof. Dr. A. Meyerhans

Prof. Dr. E. Meese

Hägar: Warum ich?

Gott: Warum nicht?

Dik Browne

Für meine Familie

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Manuskripte:

Schütz, A., Scheller, N., Breinig, T., Meyerhans, A.

The *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus AcNPV induces functional maturation of human primary Monocyte-Derived Dendritic Cells

(Vaccine; zur Publikation eingereicht)

Scheller, N., Furtwängler, R., Tänzer, T., Holzer, D., Sester, U., Maier, R., Breinig, T., Meyerhans, A.

The Human Cytomegalovirus protein pp65: A transport vehicle for antigens

(Manuskript in Vorbereitung)

Scheller, N., Schütz, A., Maier, R., Breinig, T., Meyerhans, A.

***Autographa californica* Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus AcMNPV as vaccine vector: Human primary Monocyte-Derived Dendritic Cells are no main targets for infection**

(Manuskript in Vorbereitung)

Aus Kooperationsprojekten hervorgegangene Manuskripte:

Maier, R., Holzer, D., Scheller, N., Bartolome Rodriguez, M.M., Sester, M., Phillipp, S., Meyerhans, A.

Expansion of antiviral effector function by bystander activation

(Journal of Immunology; zur Publikation eingereicht)

Scheller, N., Resa, P., Grässer, F., Mina, L., Galao, R., Kästner, L., Lipp, P., Meyerhans, A., Diez, J.

Identification of the human homologue of the yeast decapping activator Pat1

(Manuskript in Vorbereitung)

Teile dieser Arbeit wurden auf folgenden Kongressen vorgestellt:

- 2002 6th Saar-Lor-Lux workshop on Virus research, Luxemburg
- 2003 34th Annual Meeting of the „German Society of Immunology“, Berlin
- 2003 Annual Meeting of the „Gesellschaft für Virologie“, Berlin
- 2004 Annual Meeting of the „Gesellschaft für Virologie“ Joint Meeting with „Società Italiana di Virologia“, Tübingen
- 2004 8th Sar-Lor-Lux workshop on Virus research, Homburg/ Saar
- 2005 Annual Meeting of the „Gesellschaft für Virologie“, Hannover
- 2005 Joint meeting of the German and Scandinavian Societies of Immunology, Kiel
- 2006 Annual Meeting of the „Gesellschaft für Virologie“, München

Im Laufe dieser Arbeit wurden praktisch betreut:

Rhoikos Furtwängler, Medizinische Doktorarbeit

Anke Schultz, Fortgeschrittenen-Praktikum

Birgit Kreutzer, Fortgeschrittenen-Praktikum

Patricia Resa; Praktische Studienarbeit

Abkürzungen:

| | |
|---------------------|--|
| α CD4 (Bsp.) | anti-CD4 (gegen CD4 gerichtet) |
| Ag | Antigen |
| AIDS | „aquired immune deficiency syndrome“, Erworbenes Immunschwächesyndrom |
| APC | „antigen presenting cells“ antigenpräsentierende Zellen |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| BCR | B Zellrezeptor |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| CASY | „cell counter and analyser system“ |
| CCR | C-C Chemokin Rezeptor |
| CD | „cluster of differentiation“ |
| CLA | „cutaneous lymphocyte antigen“ |
| HCMV | humanes Zytomegalievirus |
| Con A | Concanavalin A |
| CTL | „cytotoxic T lymphocyte“ zytotoxische T-Zellen |
| CXCR | CXC Chemokin Rezeptor |
| DCs | „dendritic cells“ Dendritische Zellen |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dNPT | Desoxynukleotidtriphosphat |
| dsRNA | doppelsträngige Ribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethyldiamintetraacetat |
| EGFP | „enhanced green fluorescent protein“ grün fluoreszierendes Protein |
| FACS | „fluorescence activated cell sorting“ |
| Fc | „fragment crystallisable“ |
| FDA | „Food and Drug Administration“ |
| FITC | Fluoresceinisothiocyanat |

| | |
|-----------|--|
| FKS | Fetales Kälberserum |
| GM-CSF | „granulocyte macrophages-colony stimulating factor“ |
| g | „gravity“, Erdanziehungskraft |
| HAART | „highly active antiretroviral therapy“ |
| HBV | Hepatitis B Virus |
| HCV | Hepatitis C Virus |
| HIV | „human immunodeficiency virus“ Humanes Immundefizienz Virus |
| HLA | „human leukocyte antigen“ |
| HSV | Herpes simplex Virus |
| HTLV | „human T cell leukemia virus“ |
| IE | „immediate early“ |
| iDCs | „immature Dendritic Cells“ unreife Dendritische Zellen |
| IPC | „interferone producing cells“ Interferon-produzierende Zellen |
| IFN | Interferon |
| Ig | Immunglobulin |
| IL | Interleukin |
| LCMV | Lymphozytäres Choriomeningitis Virus |
| LPS | Lipopolysaccharid |
| LSM | „lymphocyte separation medium“ |
| MCMV | murines Zytomegalie Virus |
| M-CSF | „macrophages-colony stimulating factor“ |
| mDCs | „mature Dendritic Cells“ reife Dendritische Zellen |
| MHC | „major histocompatibility complex“ Haupthistokompatibilitätskomplex |
| mRNA | „messenger" Ribonukleinsäure |
| MxA | „myxovirus (influenza) resistance protein A“ |
| NK Zellen | „natural killer cells“ |
| PBL | „peripheral blood lymphocytes“ Lymphozyten des peripheren Blutes |

| | |
|--------------------|---|
| PBMC | „peripheral blood mononuclear cells“ mononukleäre Zellen des peripheren Blutes |
| PBS | „phosphate buffered saline“ |
| PE | Phycoerythrin |
| PE-Cy5 | Phycoerythrin, kovalent mit Cyanin 5 verknüpft |
| PerCP | Peridinin Chlorophyll Protein |
| poly(I:C) | „polyriboinosinic polyribocytidylic acid“ Polyriboinosyl-Polyribocytidyl-Säure |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | „rotations per minute“ |
| SEB | <i>Staphylococcus</i> Enterotoxin B |
| SDS | „sodium dedecyl sulfate“ |
| SIV | „simian immunodeficiency virus“ |
| TCID ₅₀ | „tissue culture infectious dosis“ |
| TCR | T Zellrezeptor |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin Th Zellen T Helferzellen TLR „Toll-Like receptors“ Toll-Like Rezeptoren |
| TNF | Tumornekrosefaktor |
| TRIS | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| EU | „european unit“, Einheit der (Enzym-)Aktivität, europäisch |
| U/IU | „international unit“, Einheit der (Enzym-)Aktivität, international |
| v/v | Volumen/Volumen |
| VLP | „virus like particle“ |
| w/v | „weight“, Gewicht/Volumen |

Inhaltsverzeichnis:

| | | |
|-----------|--|----------|
| 1. | Einleitung | 1 |
| 1.1. | Das Immunsystem | 1 |
| 1.2. | Funktion der T Zellen und Entstehung von adaptiven Immunantworten gegen intrazelluläre Erreger | 3 |
| 1.2.1. | Funktionen der CD4 ⁺ T Zellen | 4 |
| 1.2.2. | Funktionen der CD8 ⁺ T Zellen | 5 |
| 1.2.3. | Induktion von adaptiven T Zell-Immunantworten | 6 |
| 1.3. | Funktionen der Dendritische Zellen | 7 |
| 1.3.1. | Subtypen Dendritischer Zellen | 7 |
| 1.3.2. | Antigenaufnahme, Reifung und Wanderung von myeloiden Dendritischen Zellen | 9 |
| 1.3.3. | T Zellstimulation durch Dendritische Zellen | 11 |
| 1.4. | Dendritische Zellen und ihre Bedeutung für Immunisierungs-Strategien | 13 |
| 1.4.1. | Dendritische Zellen als Ziel einer Immunisierung <i>in vivo</i> | 14 |
| 1.4.2. | Einsatz von Dendritischen Zellen bei Immunisierungs-Strategien mittels adoptivem Transfer | 15 |
| 1.4.3. | DNA-Immunisierung | 18 |
| 1.4.3.1. | Nicht-virale Trägersysteme zum Transfer von DNA in Dendritische Zellen | 20 |
| 1.4.3.2. | Modifizierte human-pathogene Viren als Trägersysteme zum Transfer von DNA in Dendritische Zellen | 21 |
| 1.4.3.3. | Nicht-human-pathogene Viren als Trägersysteme zum Transfer von DNA in Dendritische Zellen | 23 |
| 1.4.4. | Protein-Immunisierung | 25 |
| 1.4.4.1. | Cross-Präsentation exogener Proteine durch Dendritische Zellen | 26 |
| 1.4.4.2. | Protein-Transduktions-Domänen und Translokatorische Proteine zur Erhöhung der Effizienz von Cross-Präsentation durch Dendritische Zellen | 30 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1.5. | Ziele der Arbeit | 34 |
| 2. | Material und Methoden | 36 |
| 2.1. | Chemikalien | 36 |
| 2.2. | Antikörper | 38 |
| 2.3. | Plasmide | 40 |
| 2.4. | Zellen/Viren/Bakterien | 41 |
| 2.4.1. | Zelllinien | 41 |
| 2.4.2. | Viren | 42 |
| 2.4.3. | Bakterien und Bakterien-Kultivierung | 42 |
| 2.5. | Zellkultur | 43 |
| 2.5.1. | Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit | 44 |
| 2.5.2. | Zellkulturmedien | 44 |
| 2.5.3. | Subkultivierung adhärenter Zellen | 45 |
| 2.5.4. | Einfrieren und Auftauen von Zellen | 46 |
| 2.5.5. | Mycoplasmentest | 47 |
| 2.6. | Transformation von Bakterien | 48 |
| 2.7. | Präparation von Plasmid-DNA | 49 |
| 2.7.1. | Plasmid-Isolation mittels alkalischer Lyse | 49 |
| 2.7.2. | Plasmid-Isolation mittels "QIAGEN Plasmid Kit" | 50 |
| 2.8. | Bestimmung der DNA-Konzentration | 51 |
| 2.9. | Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen | 51 |
| 2.10. | "Polymerase Chain Reaction" - PCR | 52 |
| 2.11. | Agarose-Gelelektrophorese | 55 |
| 2.12. | Ligation von DNA-Fragmenten | 56 |
| 2.13. | Darstellung rekombinanter AcMNPV und Expression in Insektenzellen | 57 |
| 2.13.1. | Plaque-Pick-Assay | 58 |
| 2.13.2. | Herstellung von hochtitrigen AcMNP-Virusstocks | 59 |
| 2.13.3. | Plaque-Assay | 59 |
| 2.13.4. | Neutralrotfärbung | 61 |
| 2.13.5. | Expressionskinetik rekombinanter Proteine in rAcMNPV-infizierten SF158 | 62 |
| 2.13.6. | Präparative Expression rekombinanter Proteine in rAcMNPV-infizierten SF158 | 62 |

| | | |
|-------|---|----|
| 2.14. | Herstellen von Zellysaten | 63 |
| 2.15. | Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen | 63 |
| 2.16. | Aufreinigung von Proteinen über Affinitäts- Chromatographie an immobilisierten Metall-Ionen (IMAC) | 63 |
| 2.17. | Protein-Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese | 64 |
| | 2.17.1. Coomassie-Blue-Färbung von Polyacrylamidgelen | 67 |
| | 2.17.2. Proteintransfer durch Semi-Dry Western Blot | 67 |
| 2.18. | Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen | 69 |
| 2.19. | Detektion mit der „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Reaktion | 70 |
| 2.20. | Isolierung peripherer Blutzellen | 71 |
| | 2.20.1. Blutspender | 71 |
| | 2.20.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation | 71 |
| | 2.20.3. Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen | 72 |
| 2.21. | Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY® | 73 |
| 2.22. | In-Vitro-Differenzierung von humanen Dendritischen Zellen | 75 |
| 2.23. | In-Vitro-Stimulation primärer Zellen | 76 |
| | 2.23.1. Stimulation von T Zellen in humanen PBMC | 77 |
| | 2.23.2. Stimulation von T Zellen durch autologe Dendritischen Zellen | 78 |
| | 2.23.3. Fixieren von PBMC und PBL-DC | 79 |
| 2.24. | Durchflußzytometrie | 79 |
| | 2.24.1. Allgemeines zur Durchflußzytometrie | 79 |
| | 2.24.2. Färbung von Oberflächenantigenen zum durchflußzytometrischen Nachweis | 85 |
| | 2.24.3. Färbung von intrazellulären Antigenen zum durchflußzytometrischen Nachweis | 86 |
| 2.25. | Fluoreszenz-Mikroskopie | 87 |
| | 2.25.1. Färbung von intrazellulären Antigenen zum fluoreszenz-mikroskopischen Nachweis | 87 |

| | |
|---|-----------|
| 2.25.2. Fluoreszenz-markierung von Zellkernen | 88 |
| 2.25.3. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen | 89 |
| 3. Ergebnisse | 90 |
| 3.1. Rekombinantes „Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus“ (AcMNPV) als Genvektor zur Expression von Antigenen in Dendritischen Zellen | 90 |
| 3.1.1. Darstellung und Charakterisierung rekombinanter AcMNPV | 91 |
| 3.1.2. Expression des EGFP-Reportergens in rAcMNPV-infizierten Säugerzellen | 94 |
| 3.1.2.1. Rekombinantes AcMNPV infiziert sehr effizient 293 Zellen und führt zu einer transienten Expression des Reportergens | 97 |
| 3.1.2.2. Rekombinantes AcMNPV infiziert humane Dendritische Zellen mit geringer Effizienz | 99 |
| 3.1.2.3. Die Infektion von Dendritischen Zellen mit rekombinanten AcMNPV ist abhängig vom Reifegrad der Dendritischen Zellen | 101 |
| 3.1.2.4. Die durch Infektion mit rekombinantem AcMNPV vermittelte Reportergen-Expression ist in Dendritischen Zellen transient | 102 |
| 3.1.2.5. Die Anzahl EGFP-positiver Dendritischer Zellen wird durch Aufzentrifugieren von rAcMNPV nicht gesteigert | 104 |
| 3.1.2.6. Die Hemmung der Expression des Reportergens durch Nucleokapsidproteine in rAcMNPV-infizierten Dendritischen Zellen ist im Gegensatz zu rAcMNPV-infizierten 293 Zellen gering | 107 |
| 3.1.2.7. Die Infektion humaner Dendritischer Zellen durch rekombinantes AcMNPV wird über das virale Glykoprotein gp64 vermittelt | 111 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.2. | HCMV-pp65, ein virales Protein als Transportmittel für Antigene | 114 |
| 3.2.1. | Darstellung und Charakterisierung von Immunogenen mit Hilfe rAcMNPV-infizierter Insektenzellen | 116 |
| 3.2.2. | Das pp65-EGFP-Fusionsprotein bindet effizient an Monocyten | 122 |
| 3.2.3. | Vergleich von pp65 und den Transduktionsdomänen TatPTD und Penetratin bei der Bindung an unreife humane Dendritische | 124 |
| 3.2.4. | Effiziente Aufnahme von pp65 mit N- und C-terminalem Fusionsanteil in unreife humane Dendritische Zellen | 128 |
| 3.2.5. | Durch unreife humane Dendritische Zellen präsentierte pp65 induziert eine antigenspezifische CD4 ⁺ und CD8 ⁺ Gedächtnis-T Zell-Stimulation | 132 |
| 3.2.6. | Rekombinantes exogenes pp65 hat keinen Einfluß auf die phänotypische Reifung unreifer humaner Dendritischer Zellen | 139 |
| 4. | Diskussion | 148 |
| 4.1 | Rekombinantes „Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus“ (AcMNPV) als Genvektor zur Expression von Antigenen in Dendritischen Zellen | 153 |
| 4.2 | HCMV-pp65, ein virales Protein als Transportmittel für Antigene | 158 |
| 5. | Zusammenfassung | 164 |
| 6. | Summary | 166 |
| 7. | Literatur | 168 |

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Im Laufe der Evolution haben mehrzellige Organismen ein Verteidigungssystem gegen körperfremde Substanzen und Krankheitserreger wie Viren, Bakterien, Pilze und Parasiten entwickelt, das als Immunsystem (lat. immunis = gefeit, frei, unberührt) bezeichnet wird. Es umfasst die Gesamtheit der Organe, Zellen und Proteine, deren Funktion im Erkennen und in der Bekämpfung körperfremder Strukturen liegt. Unter „normalen“ Bedingungen findet keine Immunreaktionen gegen den eigenen Organismus statt („immunologische Toleranz“). Bei der Abwehr fremder Strukturen lässt sich zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem unterscheiden. Das angeborene Immunsystem ist in der Lage, schnell und relativ unspezifisch auf eindringende Pathogene zu reagieren. Zur angeborenen Immunität zählen zunächst physikalische und chemische Barrieren, wie Schleimhäute oder der saure pH von Magensäure oder Schweiß. Lösliche Faktoren des angeborenen Immunsystems, die bei einer Infektion sehr schnell rekrutiert werden, sind Lysozym, Akutphaseproteine, Zytokine, Komplementproteine und Typ-I Interferone (IFN- α und IFN- β). Neben löslichen Faktoren verfügt das angeborene Immunsystem auch über phagozytierende Zellen wie Makrophagen und Neutrophile, die bei der Bekämpfung von bakteriellen Infektionen von grundlegender Bedeutung sind. Natürliche Killerzellen (NK Zellen) können beispielsweise bei viralen Infektionen, die oft das Herunterregulieren von MHC-I-Molekülen auf den infizierten Zellen induzieren, die „abnormen“ Zellen erkennen und gezielt abtöten. Diese Mechanismen ermöglichen es dem angeborenen Immunsystem, schnell auf eindringende Pathogene zu reagieren und eine Infektion während der vier bis sieben Tage, die bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort vergehen, zu kontrollieren.

Die adaptive Immunantwort beginnt mit der Aufnahme von Antigen durch antigenpräsentierende Zellen (APC), wie Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B Zellen im infizierten Gewebe. Als Antigen wird ein körperfremder Stoff bezeichnet, der vom adaptiven Immunsystem erkannt wird. DCs sind hoch spezialisierte APC und besonders geeignet, äußerst effizient Antigen aufzunehmen und zu prozessieren. Sie wandern dann in die sekundären lymphatischen Organe und präsentieren das Antigen im Kontext mit MHC-I- und MHC-II-Molekülen naiven $CD8^+$ bzw. $CD4^+$ T Zellen. Die T Zellen erkennen über ihren T Zell-Rezeptor (TCR) Peptidfragmente im Kontext mit MHC-Molekülen. Dies führt zu einer Proliferation der Zellen. Die antigenspezifischen T Zellen werden auch als zellulärer Arm des adaptiven Immunsystems bezeichnet. Man unterscheidet zwischen $CD8^+$ zytotoxischen T Zellen (CTL), die durch das Ausschütten von lytischen Granula und Rezeptorbindung in der Lage sind, antigenspezifisch Zielzellen zu zerstören, und $CD4^+$ T Helferzellen (Th Zellen). Th Zellen produzieren nach antigenspezifischem Kontakt Zytokine, durch die sie in der Lage sind, eine Effektorfunktion auszuüben und andere Zellen bei deren Differenzierung und Funktion zu unterstützen („zu helfen“). Neben dem zellulären verfügt das adaptive Immunsystem über einen humoralen Arm. Dazu zählt die Produktion von spezifischen Antikörpern oder Immunglobulinen (Ig) durch B Zellen. Im Gegensatz zu T Zellen erkennen B Zellen über den B Zell-Rezeptor (BCR) sowohl zellassozierte als auch lösliche Antigene. Dazu gehören neben Proteinen auch Lipide, DNA und Zucker, aber auch andere dreidimensionale Strukturen. Nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen kommt es zur Aktivierung der B Zelle und zur nachfolgenden Differenzierung in eine Antikörper-sekretierende Plasmazelle. Die sezernierten Antikörper haben unter anderem die Funktion, Bakterien zu opsonisieren und sie so für das Immunsystem als körperfremd zu markieren. Darüber hinaus können neutralisierende Antikörper durch Bindung an Viren deren Infektiosität hemmen. Zu einer Produktion solcher hoch spezifischer Antikörper bedarf es jedoch der Hilfe von Th Zellen, was die enge Verbindung zwischen den beiden Armen des adaptiven Immunsystems verdeutlicht.

Eng verbunden ist auch das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem. So sind die Makrophagen des angeborenen Immunsystems von entscheidender Bedeutung bei der Induktion und anschließender Steuerung der adaptiven Immunantwort. Dem gegenüber greift das adaptive Immunsystem auf Mechanismen des angeborenen Immunsystems zurück. So vermitteln NK Zellen des angeborenen Immunsystems eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC). Durch das Ineinandergreifen von angeborenem und adaptivem Immunsystem kann in den meisten Fällen die Infektion kontrolliert und das Pathogen aus dem Organismus entfernt werden. Nach überstandener Infektion entwickelt sich langlebige T und B Gedächtniszellen. Sie sind bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen in der Lage, wesentlich schneller und effizienter zu reagieren (Janeway *et al.*, 2001).

1.2. Funktion der T Zellen und Entstehung von adaptiven Immunantworten gegen intrazelluläre Erreger

Die Zellpopulation der T Lymphozyten kann anhand der T Zell-Rezeptor (TCR)-assoziierten Membranproteine in $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen unterteilt werden. Diese Korezeptormoleküle sind in der Lage, mit konstanten Regionen der MHC-II- bzw. MHC-I-Moleküle auf APC zu interagieren. $CD4^+$ T Lymphozyten erkennen Peptidfragmente von Antigenen im Kontext mit MHC-II-Molekülen, welche auf der Oberfläche von professionellen APC, wie DCs, Makrophagen, B Zellen und aktivierten T Zellen exprimiert werden. Die auf diesem Weg präsentierten Peptide stammen vorwiegend von exogenen Antigenen, die in die vesikulären Kompartimente der Zellen gelangen. Dies geschieht im Fall intravesikulärer Pathogene oder durch die Endozytose von Proteinen und Abbauprodukten extrazellulärer Erreger. Im Gegensatz dazu erkennen $CD8^+$ T Zellen Peptidfragmente im Kontext von MHC-I-Molekülen. Die auf diesem Weg präsentierten Peptide stammen vorwiegend von endogenen Antigenen. Zur Präsentation endogener Antigene sind professionelle APC und alle kernhaltigen Körperzellen befähigt. Adaptive Immunantworten werden allerdings nur von professionellen APC induziert,

wobei den DCs bei der Induktion von T Zell-Immunantworten eine besondere Bedeutung zukommt (Janeway *et al.*, 2001).

1.2.1. Funktionen der CD4⁺ T Zellen

Die Funktion der CD4⁺ T Zellen besteht nach der Erkennung ihres Antigens darin, durch die Ausschüttung von Zytokinen andere Zellen des Immunsystems bei ihrer Differenzierung und Funktion zu unterstützen. Dabei sezernieren Th Zellen nach Aktivierung verschiedene Muster an Zytokinen, woraufhin sie in die drei Subpopulationen Th1, Th2 und regulatorische T Zellen (Th3) eingeteilt werden (de Jong *et al.*, 2005). Th1 Zellen produzieren vor allem IFN- γ , TNF- α und IL-2, Th2 Zellen vorwiegend IL-4, IL-5 und IL-13, wohingegen Th3-Zellen IL-10 und TGF- β sezernieren (Jonuleit & Schmitt, 2003; Robinson & O'Garra, 2002). Th1-Zytokine sind an der Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T Lymphozyten beteiligt, während Th2-Zytokine bei der Induktion einer B Zellantwort benötigt werden (Depoil *et al.*, 2005; Kupfer *et al.*, 1991; Schoenberger *et al.*, 1998). Th3-Zytokine dagegen verhindern die Proliferation von Th1- und Th2- Zellen und bewirken daher die Entstehung von Toleranz (Jonuleit & Schmitt, 2003). Die Differenzierung naiver CD4 T Zellen zu Th1-, Th2- oder Th3 Zellen wird durch die Anwesenheit bestimmter Zytokine beeinflusst und ist daher von der zytokinproduzierenden APC abhängig. So findet durch IFN- γ und IL-12 eine Differenzierung zu Th1 statt, durch IL-4 dagegen zu Th2 und durch IL-10 und gleichzeitigem Fehlen von IL-12 eine Differenzierung in Th3 (de Jong *et al.*, 2005; Hurez *et al.*, 2003; Maldonado *et al.*, 2003). *In vivo* wurde die Bedeutung der CD4⁺ T Lymphozyten an CD4-defizienten „knockout“-Mäusen untersucht. Diese Tiere zeigten ein normales B/T Zellverhältnis, keine Atrophie der lymphatischen Organe, jedoch eine stark reduzierte Antikörper-Antwort. Im Zuge einer Infektion mit dem lymphozytären Choriomeningitis-Virus (LCMV) wurde eine antivirale CTL-Antwort induziert. Allerdings wurden vergleichsweise geringe Mengen LCMV-spezifischer CD8⁺ T Gedächtnis-Zellen ausgebildet (Rahemtulla *et al.*, 1991). CD4⁺ T Zellen tragen somit zu der Induktion der CD8⁺ T Gedächtnis-Zellen bei, als auch zu der Bildung von Antikörpern durch

zu Plasmazellen differenzierte B Zellen (Behrens *et al.*, 2004; Janssen *et al.*, 2003; Shedlock & Shen, 2003).

Die Bedeutung der CD4⁺ T Zellen für die Aufrechterhaltung eines intakten Immunsystems zeigt sich bei einer Infektion mit dem humanen Cytomegalievirus (HCMV). Die zur Kontrolle der Infektion nötige CTL-Antwort ist abhängig von der Hilfe der CD4⁺ T Zellen (Li *et al.*, 1994). Auch im Verlauf einer Infektion mit humanen Immundefizienz-Viren (HIV) führt der Verlust der infizierten CD4⁺ T Zellen dazu, dass sich opportunistische Erreger ungehindert im Organismus ausbreiten.

1.2.2. Funktionen von CD8⁺ T Zellen

Naive CD8⁺ T Zellen differenzieren bei Bindung ihres TCR an MHC-I-Peptid-Moleküle auf APC in CTL. Die Aufgabe der CTL besteht in dem gezielten Abtöten infizierter Zellen, um so die intrazelluläre Vermehrung der Pathogene zu verhindern. Erkannt werden diese Zellen ebenfalls über MHC-I-Peptid-Moleküle. Nahezu alle kernhaltigen Zellen exprimieren MHC-I-Moleküle und stehen so unter Kontrolle der CTL. Die CTL schütten dann bei Zellkontakt den Inhalt lytischer Granula in den Zwischenraum zur Zielzelle aus (Barry & Bleackley, 2002). Eine wichtige Komponente der Abtötungsmaschinerie von CTL, aber auch von NK Zellen ist das Effektormolekül Perforin. Dieses Protein ist in der Lage, in Anwesenheit von Calcium zu polymerisieren und in der Membran der Zielzelle Poren auszubilden. Daraufhin können weitere Komponenten der lytischen Granula in die Zelle gelangen. Zu diesen gehören die Granzyme A, B und C, sowie Granulysin und Serinproteasen (Lieberman, 2003). Sie lösen letztendlich die Apoptose der Zielzelle aus (Shresta *et al.*, 1998; Stenger *et al.*, 1999). Die Bedeutung von Perforin wird an Perforindefizienten Mäusen deutlich. Diese Tiere zeigen eine schwere Dysfunktion der CTL-Aktivität und sind nicht in der Lage, eine Infektion mit nicht-zytotoxischem LCMV zu eliminieren (Kagi *et al.*, 1994; Kagi *et al.*, 1995a; Walsh *et al.*, 1994). In Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Zytotoxizität der CD8⁺ T Zellen *in vivo* nahezu vollständig von dem

Perforin/Granzym-System abhängt (Graubert *et al.*, 1997; Kagi *et al.*, 1994; Kagi *et al.*, 1995b).

Bei der Abwehr viraler Infektionen spielen $CD8^+$ T Lymphozyten eine zentrale Rolle. Zur Kontrolle einer Infektion mit HCMV sind CTL essentiell, können aber das Pathogen nicht komplett eliminieren (Reusser *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1995). Im Fall einer HIV-Infektion tragen CTL sowohl während der primären Phase als auch während der nachfolgenden Persistenzphase entscheidend zur Kontrolle der Virämie bei (Musey *et al.*, 1997; Ogg *et al.*, 1998). Dabei geht eine starke CTL-Antwort mit einer geringeren Viruslast und einem verlängerten Überleben einher, obwohl sie nicht zu einer Eliminierung des Virus führt (Greenough *et al.*, 1997; Harrer *et al.*, 1996; Pontesilli *et al.*, 1998).

1.2.3. Induktion von adaptiven T Zell-Immunantworten

Bei Induktion einer adaptiven Immunantwort kommt es in den peripheren lymphatischen Organen zur einer antigenspezifischen T Zellantwort und zur nachfolgenden Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Den DCs kommt bei der Induktion adaptiver Immunantworten eine besondere Bedeutung zu, da sie am effizientesten in der Lage sind, naive T Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu stimulieren (Steinman, 1991). Zusätzlich zu dem primären Stimulationssignal über den TCR ist nämlich eine über CD28 vermittelte Kostimulation notwendig, welche von reifen DCs über die Membranproteine CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) im hohen Maße bereitgestellt wird (vgl. 1.3.3.). Erkennt dagegen eine naive T Zelle ihr Antigen ohne Kostimulation, geht sie in einen anergen Zustand über (Bachmann *et al.*, 1999). Nach Aktivierung der naiven T Zellen folgt eine Phase der klonalen Expansion und der Differenzierung zu $CD4^+$ Th Zellen beziehungsweise $CD8^+$ CTL. Die T Zelle durchläuft dabei mindestens sieben bis zehn Zellteilungen und entwickelt sich zu einer Effektor- oder Gedächtniszelle, ohne dass weiterer Antigen-Kontakt für die Tochterzellen notwendig ist (Kaech & Ahmed, 2001). Durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine bzw. das Abtöten infizierter

Zellen, wird beispielsweise eine akute virale Infektion in den meisten Fällen innerhalb von sieben bis zehn Tagen durch die Effektorzellen eliminiert. Daraufhin sterben in der nachfolgenden Kontraktionsphase über 90 % der Zellen ab, während die langlebigen Gedächtnis-T Zellen für lange Zeit im Organismus überdauern. Bei erneutem Antigen-Kontakt können sie auch ohne Kostimulation schneller und effektiver als naive T Zellen reagieren (Homann *et al.*, 2001; Kaech *et al.*, 2002; Sprent & Surh, 2001; Sprent & Surh, 2002).

1.3. Funktion der Dendritischen Zellen

Die erstmals als Langerhans Zellen in der Haut beschriebenen DCs (gr. dendros = verzweigt) sind neben Makrophagen und B Zellen die effizientesten APC des Immunsystems und in der Lage, durch die Stimulierung naiver T Zellen Gedächtniszellen zu generieren (Steinman, 1991). Die verschiedenen Funktionen der DCs verteilen sich auf die unterschiedlichen Subtypen, die aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks differenzieren (Shortman & Liu, 2002). Allgemein existieren bei den DCs zwei Stadien. Unreife DCs sind sehr effizient in der Lage, Antigen in der Peripherie aufzunehmen und zu prozessieren. Durch einen Reifungsstimulus gereifte DCs wandern in die sekundären lymphatischen Organe und präsentieren das prozessierte Antigen im Kontext mit MHC-Molekülen den CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen. Im Zusammenhang mit einem kostimulatorischen Signal, welches von den reifen DCs geliefert wird, werden so naive T Zellen antigenspezifisch stimuliert. Je nach Subtyp und Aktivierungsgrad der DCs werden T Helferzellen zur Differenzierung in Th1, Th2 oder Th3 stimuliert und die Immunantwort so polarisiert (de Jong *et al.*, 2005).

1.3.1. Subtypen Dendritischer Zellen

Die unterschiedlichen Subtypen von DCs besitzen charakteristische Eigenschaften und unterscheiden sich sowohl funktionell, als auch morphologisch. Sie differenzieren sich aus CD34⁺ Zellen des Knochenmarks

über mehrere Zwischenstufen zu Langerhans Zellen der Haut, interstitiellen DCs, myeloiden DCs (DC1) und plasmacytoiden DCs (DC2) (Brasel *et al.*, 2000; Shortman & Liu, 2002; Traver *et al.*, 2000). Während Langerhans Zellen die Expression von CD1a, Lag-Antigen, E-Cadherin und die charakteristischen Birbeck Granula aufweisen (Romani *et al.*, 1994), exprimieren interstitielle DCs CD2, CD9, CD68 und Faktor XIIIa. Im Gegensatz zu Langerhans Zellen sind interstitielle DCs in der Lage, über Mannose-Rezeptoren große Mengen an Antigen aufzunehmen und IL-10 zu produzieren. IL-10 führt im Zusammenhang mit CD40-Ligand und IL-2 zur Aktivierung naiver B-Zellen (Caux *et al.*, 1997). Die Vorläuferzellen der DC1, die so genannten „Pre“-DC1 (Monozyten) sind durch ihre hohe phagozytotische Aktivität in der Lage, zahlreiche Bakterien und Pilze aufzunehmen und auf diese Weise zu zerstören. Sie exprimieren große Mengen an Mannose-Rezeptoren, die bei der Präsentation von Lipid-Antigenen eine Rolle spielen. CD2⁺ Monozyten differenzieren *in vitro* nach Kultivierung mit IL-4 und GM-CSF zu unreifen myeloiden DCs und produzieren in der Hauptsache TNF- α , IL-6 und IL-12 (Caux *et al.*, 1997; Crawford *et al.*, 1999; Palucka *et al.*, 1998). DC1 induzieren daher starke Th1- und CTL-Antworten. „Pre“-DC2 dagegen stellen die Schlüsselzellen der frühen antiviralen Immunantwort dar, indem sie nach einer viralen Infektion große Mengen an Typ-I Interferonen produzieren (Liu, 2001). „Pre“-DC2 können zum einen durch IL-3 und CD40-Ligand oder durch virale Infektionen zu DC2 differenzieren. Die Differenzierung wird dabei durch TNF- α vermittelt, das autokrin auf die Differenzierung der „pre“-DC2 wirkt. Im Gegensatz zu IL-3-induzierten DC2, die hauptsächlich Th2-Antworten induzieren, sind Virus-induzierte DC2 in der Lage, T Zellen zur Produktion von großen Mengen an IFN- γ und IL-10 zu stimulieren (Kadowaki *et al.*, 2000). Die Spezifität von Monozyten und „pre“-DC2 wird durch die differentielle Oberflächenexpression von „Toll-Like“-Rezeptoren (TLR) festgelegt. Während Monozyten vornehmlich TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR8 exprimieren, finden sich auf „pre“-DC2 hauptsächlich TLR7 und TLR9 (Kadowaki *et al.*, 2001).

1.3.2. Antigenaufnahme, Reifung und Wanderung von myeloiden Dendritischen Zellen

Myeloide DCs (DC1) wandern in einem unreifen Stadium aus dem Knochenmark ins Blut, von dort in nicht-lymphatisches Gewebe und an die äußeren Barrieren des Körpers, wie die Haut oder mukosale Oberflächen. Nach Kontakt mit einem Antigen und erfolgter Reifung wandern sie über die afferenten lymphatischen Gefäße in die sekundären lymphatischen Organe. Allerdings scheinen auch unreife DC1 in geringem Umfang in die Lymphknoten zu wandern, ohne einer vorherigen Reifung zu unterliegen. Diese Zellen haben eine kurze Lebensspanne von drei bis vier Tagen und scheinen bei der Induktion der zentralen Toleranz eine wichtige Rolle zu spielen (Brocker *et al.*, 1997; Fossum, 1989; Shortman, 2000). In den peripheren Geweben liegen die DC1 in einem unreifen Stadium vor und sind äußerst effizient in der Lage, Antigen aufzunehmen und zu prozessieren (Mellman & Steinman, 2001). Unreife DC1 besitzen eine Reihe von Mechanismen zur Antigenaufnahme, dazu gehören rezeptorvermittelte Endozytose, Makropinozytose und Phagozytose. Durch Makropinozytose können nicht-selektiv große Mengen von Flüssigkeit endozytiert werden. Unreife DC1 sind konstitutiv zur Makropinozytose befähigt (Austyn, 1996; Sallusto *et al.*, 1995; Steinman & Swanson, 1995).

Die Reifung und Aktivierung von DC1 wird über unterschiedliche Signalwege induziert. Bakterien und Viren sowie ihre einzelnen Komponenten, wie LPS, dsRNA, CpG-Motive oder Toxine aktivieren DC1 in der Hauptsache über TLR. TLR sind in der Keimbahn kodierte Rezeptoren, die konservierte pathogen-assoziierte molekulare Strukturen, die „pathogen-associated molecular pattern“ (PAMPs) erkennen (Armant & Fenton, 2002). Die Interaktion zwischen TLR und PAMPs führen zu einer Reifung und Aktivierung der DC1 und zu einer Herunterregulation der TLR. Dagegen werden durch Antikörper opsonisierte Pathogene von den Fc-Rezeptoren gebunden (Mellman & Steinman, 2001; Rescigno *et al.*, 2000). Die anschließende Aufnahme erfolgt dann durch rezeptorvermittelte Endozytose. Endogene Faktoren, die lokal begrenzt nach einem inflammatorischen Stimulus

gebildet werden, sind TNF- α , IFN- γ und IL-1 β , sowie Prostaglandine (Jonuleit *et al.*, 1997). Sie werden auch als „danger“-Signale bezeichnet (Banchereau & Steinman, 1998; Gallucci *et al.*, 1999; Steinman & Nussenzweig, 2002). Nach Reifung und Aktivierung von DC1 werden vermehrt MHC-Peptid-Moleküle an der Oberfläche der Zellen präsentiert. Parallel dazu kommt es zum Verlust der Fähigkeit zur Antigenaufnahme und zur erhöhten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 (Mellman & Steinman, 2001). Eine Interaktion zwischen CD40 und CD40-Ligand führt zu einer weiteren Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle auf DC1. Des Weiteren kommt es zu einer gesteigerten Expression von Oberflächenmolekülen, die für eine Migration verantwortlich sind, wie CD44 und $\alpha_6\beta_1$ Integrin (Price *et al.*, 1997; Weiss *et al.*, 1997).

Unreife DC1 exprimieren die Chemokin-Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1 und können damit auf Entzündungsmediatoren wie „macrophage inflammatory protein 1 α “ (MIP-1 α), „regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted“ (RANTES) und „monocyte chemoattractant protein 1“ (MCP-1) reagieren (Sallusto *et al.*, 1998; Sozzani *et al.*, 1998). Auf diese Weise kommt es zu einer Wanderung der Zellen entlang eines Chemokin-Gradienten zum Ort der Entzündung. Bei der Reifung werden diese „inflammatorischen“ Chemokin-Rezeptoren herunterreguliert. Reife DC1 exprimieren verstärkt CCR7. CCR7 interagiert mit „secondary lymphoid-tissue chemokine“ (SLC) und „EBI1 ligand chemokine“ (ELC). Diese Chemokine werden von lymphatischen Endothelzellen und reifen DCs in den T Zell-Arealen der lymphatischen Organe gebildet (Sozzani *et al.*, 1998). Die reifungsinduzierte Änderung des Expressionsmusters der Chemokin-Rezeptoren reguliert somit die Wanderung der DC1 aus dem inflammatorischen Gewebe in die T Zell-Areale der sekundären lymphatischen Organe.

1.3.3. T Zellstimulation durch Dendritische Zellen

Die T Zellstimulation durch DCs findet in den peripheren Lymphknoten statt und gliedert sich in insgesamt fünf Phasen (Friedl *et al.*, 2005). Die erste Phase wird als das sogenannte „scanning“ bezeichnet und beschreibt den Vorgang des langsamen „Durchwanderns“ der T Zellen durch das dichte Netzwerk von DCs in den peripheren Lymphknoten, bei dem es zu kurzlebigen Kontakten zwischen den Zellen kommt (Hugues *et al.*, 2004; Mempel *et al.*, 2004; Miller *et al.*, 2004). Die T Zellen bilden bei diesen kurzen Kontakten dynamische Synapsen aus, und binden mit dem TCR und „leukocyte functional antigen-1“ (LFA-1) an Peptid-MHC-Moleküle und „intracellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) auf den DCs. Ist das Signal, was dadurch an die T Zellen vermittelt wird ausreichend, um einen Kalzium-Influx zu bewirken, erhält die T Zelle ein „Stop-Signal“ (Bhakta *et al.*, 2005; Negulescu *et al.*, 1996). In der zweiten Phase kommt es zu einer sogenannten Reifung der immunologischen Synapse. Das heißt durch Ausrichtung des Zytoskeletts oder durch Transport von endozytierten Vesikeln entlang der Mikrotubuli transportiert die T Zelle sowohl TCR-Moleküle, als auch CD3, CD28 und CD4 oder CD8 zur Kontaktstelle (Das *et al.*, 2004; Freiberg *et al.*, 2002; Holdorf *et al.*, 2002; Huppa & Davis, 2003; Krummel *et al.*, 2000; Moss *et al.*, 2002). Die Reifung führt somit in der dritten Phase zur Etablierung einer langlebigen stabilen Synapse, die als „supramolecular activation cluster“ (SMAC) bezeichnet wird (Dustin & Chan, 2000; Grakoui *et al.*, 1999; Monks *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 2000). Sie ist bis zu 30 Minuten stabil und gliedert sich bei der T Zelle in drei konzentrisch angeordnete Bereiche. Die zentrale SMAC (cSMAC) enthält TCR, CD3, CD28, CD2, CD4 oder CD8, die periphere (pSMAC) dagegen LFA-1 und Talin und die distale (dSMAC) CD45 (Andres *et al.*, 2004; Freiberg *et al.*, 2002; Krummel *et al.*, 2000; Monks *et al.*, 1998). Die Interaktion zwischen TCR und dem MHC-Peptid-Molekül führt außerdem zur Expression von CD40-Ligand und zum Transport von IFN- γ R, sowie IL-4R auf die Oberfläche der T Zelle (Behrens *et al.*, 2004; Purtic *et al.*, 2005). Durch die Bindung von CD40 an CD40-Ligand kommt es zu einer verstärkten Expression der kostimulatorischen Moleküle im Bereich der cSMAC auf der reifen DCs.

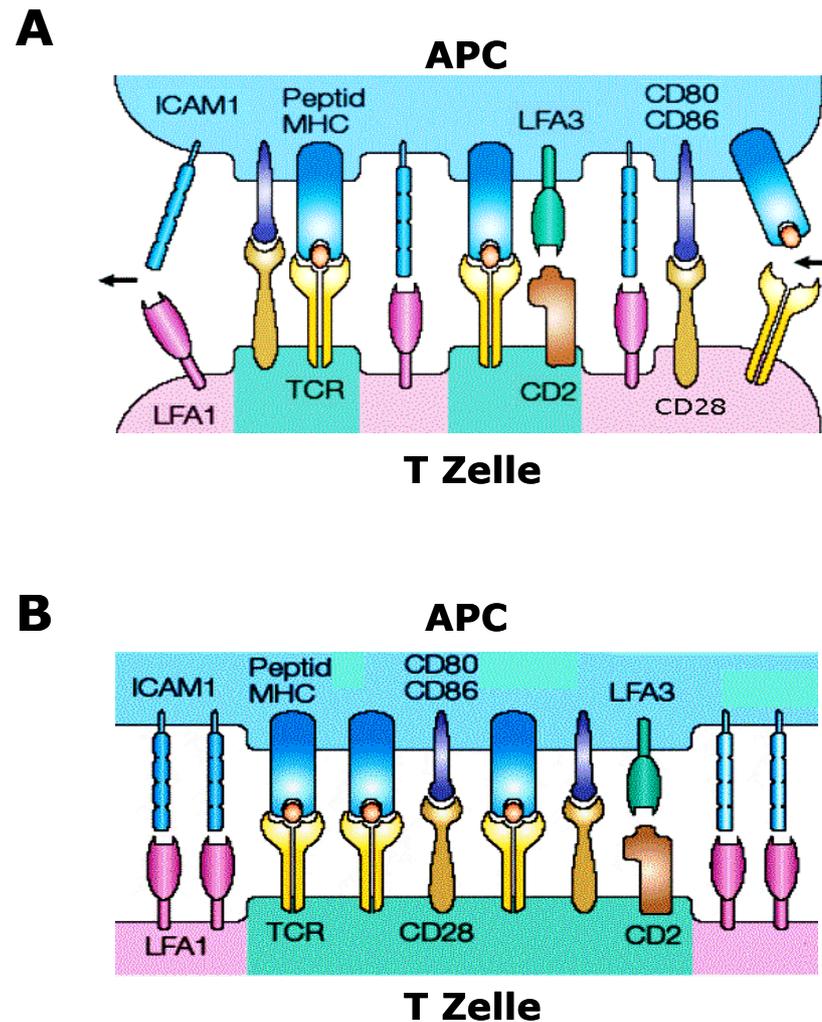


Abb. 1.1. Darstellung der dynamischen Synapse des T-Zell-„scannings“ (A) und der stabilen reifen immunologischen Synapse = „supramolecular activation cluster“ (SMAC) (B) (modifiziert nach Friedl *et al.*, 2005)

Durch die Formierung der immunologischen Synapse werden in der T-Zelle mehrere Signalkaskaden induziert. Die Stärke des Signals kontrolliert die Aktivierung der naiven T-Zelle und ist abhängig von der Menge an gebundenen MHC-Peptid-Molekülen. Das Signal wird erheblich verstärkt durch das kostimulatorische Signal und ist damit auch von der Menge der CD80- und CD86-Moleküle abhängig. Schließlich bestimmt auch die Stabilität der Synapse, wie lange die Signaltransduktion anhält. So können Effektor- und

Gedächtnis- T Zellen auch in Abwesenheit von Kostimulation schnell auf geringe Peptid-MHC-Moleküle reagieren. Bei naiven T-Zellen dagegen ist die Signaltransduktion durch den TCR ineffizient an die nachfolgenden Signalkaskaden gekoppelt. Eine Stimulation von CD28 durch die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 führt zu einer Rekrutierung von verschiedenen Kinasen und Adaptermolekülen in den Bereich der immunologischen Synapse und verstärkt so das vom TCR erhaltene Signal um das 100-fache (Lanzavecchia & Sallusto, 2001a). In der vierten Phase der Stimulation wird auf der T Zelle der TCR internalisiert und die Bindung zur DC geschwächt (Lee *et al.*, 2003). Daraufhin kann die T Zelle in der fünften Phase ihre Wanderung fortführen und Kontakt mit weiteren DCs aufnehmen. In Abhängigkeit von der Antigen-Dosis und dem Maß an Kostimulation benötigen naive T-Zellen über zehn Stunden Stimulation durch den TCR, um aktiviert zu werden. Gedächtnis- und Effektor-T Zellen benötigen dagegen nur eine halbe bis zwei Stunden (Gunzer *et al.*, 2004). Daher interagieren naive T Zellen bis zur vollständigen Aktivierung mit mehreren DCs (Lanzavecchia & Sallusto, 2001b).

1.4. Dendritische Zellen und ihre Bedeutung für Immunisierungsstrategien

Die Induktion einer adaptiven Immunität durch eine Immunisierung hat das Ziel, effektiven Schutz gegen Pathogene *in vivo* zu bieten (Gamvrellis *et al.*, 2004). Erstmals wurde die Immunisierung gegen Pocken 1796 durch Jenner eingesetzt und wissenschaftlich verfolgt (Razzell, 1965). Ihren Siegeszug trat die Immunisierung jedoch erst das letzte Jahrhundert an und hatte dabei signifikante Auswirkungen auf die Gesundheit der Weltbevölkerung. Bereits 1977 konnten aufgrund konsequent durchgeführter Immunisierungs-Programme die Pocken weltweit ausgerottet werden (Fenner, 1982). Darüber hinaus wurden traditionelle Immunisierungs-Methoden, beispielsweise mit attenuierten oder inaktivierten Pathogenen zur erfolgreichen Bekämpfung von Polio oder Diphtherie eingesetzt (Ward *et al.*, 1993). Dennoch gibt es auch heute

noch Infektionskrankheiten, gegen die kein effektiver Impfschutz existiert, wie beispielsweise gegen Malaria oder HIV.

Für einen effizienten Schutz gegen Infektionen wird sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunität benötigt. Nur die Präsentation von Antigen durch reife DCs führt zur effizienten Stimulation und Differenzierung naiver $CD4^+$ und $CD8^+$ T Zellen in Effektor- und Gedächtnis-Zellen. Eine Stimulation von naiven T Zellen durch unreife DCs induziert dagegen Toleranz (Dhodapkar & Bhardwaj, 2000; Dhodapkar *et al.*, 2000; Dhodapkar *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000a). Reife DCs stellen daher wichtige Zielzellen für die Entwicklung neuer Immunisierungs-Strategien dar. Die DCs müssen dabei drei Signale auf die T Zellen übertragen. Zunächst müssen sie durch die effektive Antigen-Aufnahme und Prozessierung die Präsentation der Peptid-MHC-Moleküle leisten. Zusätzlich muss von ihnen ein kostimulatorisches Signal vermittelt werden und schließlich müssen sie die Immunantwort durch Signaltransduktion an die T Zellen polarisieren (Kis *et al.*, 2004). Die Optimierung dieser Prozesse in DCs ist daher das Ziel bei der Entwicklung neuer Immunisierungs-Strategien.

1.4.1. Dendritische Zellen als Ziel einer Immunisierung *in vivo*

Trotz der beachtlichen Erfolge, die mit den „klassischen“ attenuierten Pathogenen erzielt wurden, sind für einige Anwendungen die Sicherheitsrisiken zu hoch, zum Beispiel gibt es bisher keinen sicheren HIV-Lebendimpfstoff. Inaktivierte Pathogene sind in der Regel nur nach wiederholter Immunisierung in der Lage, Immunität zu erzeugen. Dabei werden meist nur schwache MHC-I restringierte CTL-Antworten induziert (Chanock *et al.*, 1988). Alternative Immunisierungs-Strategien mit sicheren Trägersystemen zielen daher auf die Optimierung der Prozesse der antigenspezifischen Stimulation durch DCs und weisen dabei drei Gemeinsamkeiten auf (Apostolopoulos & Plebanski, 2000; Jeannin *et al.*, 2000). Zunächst wird versucht, das Antigen selektiv möglichst effektiv in DC zu transportieren, um eine effiziente Präsentation des Antigens zu erreichen.

Dazu wird das Antigen in den meisten Fällen durch ein Trägersystem transportiert, das das Antigen im Organismus stabilisiert. Heutzutage gibt es eine beachtliche Vielfalt an DNA- und Protein-Trägersystemen, die das Antigen stabilisieren und von DCs aufgenommen werden. Außerdem kann, ebenfalls an das Trägersystem gekoppelt, ein „danger“-Signal auf die DCs übertragen werden, um sie zu aktivieren. In einigen Fällen liefert das Signal das Trägersystem selbst, wie bei Protein-Fusionskonstrukten mit dem „heat-shock“-Protein gp96, das eine Reifung der transduzierten DCs auslöst (Basu *et al.*, 2000). Viele Trägersysteme werden hingegen zusätzlich mit einem Signal gekoppelt, beispielsweise werden bei der DNA-Immunisierung Cystidin-Guanidin-Wiederholungen, so genannte CpG-Sequenzen verwendet, da sie über TLR-9 die Reifung von DCs auslösen (Krieg, 2002). Außerdem wird systemisch ein Signal über Adjuvantien auf die DCs übertragen, wie beispielsweise durch gleichzeitige Gabe von Aluminium-Phosphat (Ulmer *et al.*, 1999). Schließlich kann auf demselben Wege eine Polarisation der Immunantwort erreicht werden, indem Cytokine an das Trägersystem gekoppelt oder systemisch gegeben werden. Ein Beispiel ist hier die gentechnische Kopplung des IL-12-Gens an die Antigen-kodierende DNA, die zu einer erhöhten Th1-Immunantwort führt (Calarota & Weiner, 2004). Die einzelnen Strategien werden auch in Kombinationen eingesetzt, um einen optimalen Schutz oder therapeutischen Nutzen durch die Immunisierung zu erzielen (Gamvrellis *et al.*, 2004; Shedlock & Weiner, 2000).

1.4.2. Einsatz von Dendritischen Zellen bei Immunisierungs-Strategien mittels adoptivem Transfer

In vivo scheitert die Induktion einer Immunantwort gegen Tumor-Antigene meist an deren Unfähigkeit, eine Aktivierung der antigenpräsentierenden DCs herbeizuführen (Banchereau & Steinman, 1998). Besonders für die Induktion einer Immunantwort gegen Tumor-Antigene ist daher die Immunisierung mit *ex vivo* differenzierten und mit Antigen beladenen aktivierten DCs zur Tumor-Therapie sehr vielversprechend (Bedrosian *et al.*, 2003; Godelaine *et al.*, 2003; Mullins *et al.*, 2003; Thumann *et al.*, 2003a; Thumann *et al.*, 2003b; Thurner *et*

al., 1999). *Ex vivo* differenzierte und mit Antigen beladene DCs sind grundsätzlich auch in der Lage, protektive Immunantworten gegen Pathogene zu induzieren (Dhodapkar & Bhardwaj, 2000; Steinman, 1991). Vor der Induktion einer Immunantwort durch Rückgabe der DCs in den Patienten können die Zellen auf Präsentation des Antigens, Reifegrad und immunstimulatorisches Potential getestet werden (Banchereau *et al.*, 2001).

Größere Mengen DCs lassen sich aus CD34⁺ Vorläuferzellen durch die Gabe von IL-3 und TNF- α oder aus CD14⁺ Monozyten durch Inkubation mit GM-CSF, IL-4 und TNF- α differenzieren (Caux *et al.*, 1992; Caux *et al.*, 1996; Inaba *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1991; Romani *et al.*, 1994; Sallusto & Lanzavecchia, 1994). Aufgrund der leichten Zugänglichkeit und der gut charakterisierten phänotypischen und funktionellen Eigenschaften wird die Mehrheit der klinischen Studien mit aus CD14⁺ Monozyten differenzierten Ds („monocyte-derived DC“, MD-DC) durchgeführt.

Der optimale Reifegrad der DCs ist entscheidend bei einem therapeutischen Einsatz. Im Gegensatz zu T Zell-stimulatorischen reifen DCs induzieren unreife DCs Toleranz. So führt beispielsweise das Verabreichen von mit Influenza Matrix-Protein M1 beladenen unreifen DCs zu einer Induktion von M1-spezifischen IL-10-produzierenden regulatorischen T Zellen und damit zu einer Unterdrückung der spezifischen CTL-Antwort (Dhodapkar *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000b). Daher ist die Ausreifung der DCs vor der Rückgabe in den Patienten essentiell. Mehrere Systeme führen dabei zu einer Ausreifung der DCs *ex vivo*. Beispielsweise sind TNF- α oder PGE-2 in der Lage, eine Reifung von DCs zu induzieren. PGE-2 induziert eine vollständige Reifung von DCs und führt zur Induktion von starken Th1-Antworten (Kalinski *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2003). Die durch TNF- α induzierte Reifung dagegen ist unvollständig und führt nur in Kombination mit IL-1 β , IL-6 und PGE-2 zu einer vollständigen Reifung und zur Induktion von CD8⁺ T Zellen und Th1-Antworten (Jonuleit *et al.*, 1997; Jonuleit *et al.*, 2001). Außerdem wird zur physiologischen Reifung von DCs der Kulturüberstand von autologen Monozyten („monocyte conditioned medium“, MCM) verwendet. MCM

enthält unterschiedliche Konzentrationen an TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN- α und induziert eine irreversible Reifung von DCs (Reddy *et al.*, 1997). Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Bestandteil der Zellwand von gram-negativen Bakterien und einer der stärksten bisher bekannten Reifungsstimuli für DCs. LPS kann jedoch aufgrund seiner starken immunogenen Eigenschaften nicht in der Klinik eingesetzt werden (Nersting *et al.*, 2003). Eine Alternative zu LPS sind Lipopeptide (LP). Sie bestehen aus dem N-terminalen Bereich bakterieller Lipoproteine und werden *in vivo* häufig als Adjuvanz für eine Vielzahl von Immunisierungs-Strategien, darunter auch für die DNA-Immunisierung, eingesetzt (Mittenbuhler *et al.*, 2003). Außerdem kann auch eine Reifung von DCs durch synthetische dsRNA „polyriboinosinic polyribocytidylic acid“ (Poly (I:C)) induziert werden (Verdijk *et al.*, 1999). DNA, die bakterielle CpG-Sequenzen enthält, führt ebenfalls zu einer funktionellen Reifung von DCs und zur Induktion von starken Th1-Antworten *in vivo* (Brunner *et al.*, 2000a; Jakob *et al.*, 1998; Jakob *et al.*, 1999).

1.4.3. DNA-Immunisierung

Die Immunisierung mit DNA erlaubt *in vivo* die Expression von Genen, die das entsprechende Antigen kodieren und imitiert eine Infektion durch intrazelluläre Erreger (Shedlock & Weiner, 2000). Durch die Expression des Antigens kann somit sowohl eine humorale als auch eine zelluläre antigenspezifische Immunantwort induziert werden (Donnelly *et al.*, 2005). Für die Induktion zellulärer Immunantworten durch eine DNA-Immunisierung sind DCs notwendig (Corr *et al.*, 1996; Fu *et al.*, 1997; Takashima & Morita, 1999). Sie können in geringem Umfang direkt mit DNA transfiziert werden, wobei die Expression der Gene dann zu einer MHC-I-vermittelten Präsentation führt. Andererseits können DCs aber auch Antigen aufnehmen, welches von DNA-transfizierten Körperzellen stammt (Abb. 1.2). Dieses wird dann endozytiert und im Kontext mit MHC-II präsentiert. Aufgenommenes Antigen kann von DCs auch über eine Cross-Präsentation in Kontext von MHC-I präsentiert werden (vgl. 1.4.4.1). Ein mögliches Sicherheitsproblem bei der Immunisierung mit DNA ergibt sich dadurch, dass sie in das Wirtsgenom integrieren kann und so ein onkogenes Potential besitzt (Nichols *et al.*, 1995).

Das Einbringen von DNA in Zellen kann auf unterschiedlichen Wegen geschehen. Grundsätzlich wird DNA an Trägermaterial gebunden über Endozytose in die Zelle eingebracht. Alternativ kann über eine Destabilisierung der Zytoplasmamembran die DNA direkt in das Zytoplasma gelangen (Donnelly *et al.*, 2005). Nach der Aufnahme liegt die DNA daher entweder in den endosomalen Kompartimenten oder direkt im Zytoplasma der Zelle vor. Im Anschluss muss die DNA in den Zellkern gelangen, um exprimiert zu werden. In sich teilenden Zellen erhält die DNA durch das Auflösen der Kernmembran während der Mitose Zugang zur im Kern befindlichen Transkriptions-Maschinerie (Brunner *et al.*, 2000b; Wilke *et al.*, 1996). In mitotisch inaktiven Zellen wie Neuronen oder DCs dagegen muss die DNA entweder durch aktiven Transport oder durch freie Diffusion durch die Kernporen in den Kern gelangen. Die Kernpore selbst erlaubt aufgrund ihres Durchmessers nur den Durchtritt von Partikeln mit einem Durchmesser von 9

nm (Pante & Kann, 2002). Plasmid-DNA hat einen Durchmesser von etwa 25 nm, so dass eine freie Diffusion der DNA alleine ineffizient ist.

DNA-Impfstoffe auf der Basis von Plasmid-DNA haben den Vorteil, dass sie leicht und günstig zu generieren sind und eine Immunisierung gegen mehr als ein Antigen erlauben. Im Gegensatz zu den meisten anderen Impfstoffen sind sie äußerst Temperatur-stabil und haben eine lange Halbwertszeit (Shedlock & Weiner, 2000). *In vivo* beobachtete primäre Immunantworten nach Gentransfer von Plasmid-DNA entstehen wahrscheinlich hauptsächlich durch Transfektion verschiedener Körperzellen. Je nach Applikationsort kommt es hierbei nach Transfektion zu einer Expression des Antigens in den sich teilenden Fibroblasten, Keratinozyten, Haarfollikeln oder Muskelzellen (Boyle *et al.*, 1997; Fan *et al.*, 1999; Fuller & Haynes, 1994; Sin *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 1999). Im Gewebe befindliche interstitielle unreife DCs sind in der Lage, das von Körperzellen exprimierte Antigen aufzunehmen und zu präsentieren (Akbari *et al.*, 1999; Albert *et al.*, 1998; Harshyne *et al.*, 2001). In geringem Umfang werden DC, wie Langerhans-Zellen der Haut, auch direkt mit Plasmid-DNA transfiziert (Banchereau & Steinman, 1998; Chattergoon *et al.*, 1998; Condon *et al.*, 1996). Die Immunisierung mit Plasmid-DNA wurde im Tiermodell bereits erfolgreich getestet (Donnelly *et al.*, 2005). Bei Adaption auf höhere Primaten und klinischen Tests am Menschen wurde jedoch festgestellt, dass bei einer intramuskulären bzw. intradermalen Injektion enorm große Mengen an Plasmid-DNA verabreicht werden müssen, um eine entsprechende protektive Immunität zu erzielen (Mwau *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 1998). Die durchaus effiziente Injektion von Plasmid-DNA mittels "Gene-Gun" beim Menschen ist aufgrund der schmerzhaften Prozedur unpraktikabel. Außerdem kann freie Plasmid-DNA die Bildung von Auto-Antikörpern gegen DNA induzieren (Donnelly *et al.*, 1997; Katsumi *et al.*, 1994). Aus diesem Grund ist die Entwicklung von Trägersystemen nötig, die in der Lage sind, DNA geschützt und effizient in DCs einzuschleusen.

1.4.3.1. Nicht-virale Trägersysteme zum Transfer von DNA in Dendritische Zellen

Zum Überwinden der extrazellulären und intrazellulären Barrieren, sowie zur Stabilisierung von DNA und RNA existieren eine Reihe von synthetischen und natürlichen Trägersystemen. Zu den synthetischen Trägersystemen gehören vor allem Liposomen (D'Souza *et al.*, 2002) und kolloidale Trägersysteme wie Mikro- oder Nanopartikel. Nanopartikel sind Komplexe aus kationischen Polymeren, wie Poly-L-Lysin, Protamin, Polyethylenimin (PEI) und DNA mit einem Durchmesser von 1-2000 nm (Boussif *et al.*, 1995; Haensler & Szoka, 1993a; Haensler & Szoka, 1993b). Sie werden bereits als Trägerstoffe für Arzneimittel und Impfstoffe verwendet (Pandey & Khuller, 2004; Seki *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2004). Die DNA wird durch Komplexieren mit dem Trägermaterial vor Abbau geschützt, allerdings können nicht-biodegradierbare Polymere *in vivo* akkumulieren und möglicherweise toxisch wirken (Gamvrellis *et al.*, 2004). Ein Beispiel für ein biodegradierbares Trägersystem ist Chitosan (Georgantas *et al.*, 2000). Chitosan ist ein natürliches, aus der Schale von Crustaceen gewonnenes Polysaccharid. Es zeichnet sich durch geringe Immunogenität und Toxizität aus, ist biokompatibel und leicht abbaubar (Borchard, 2001). Chitosan-DNA-Nanopartikel sind im Vergleich zu beispielsweise PEI-Nanopartikeln eher klein (etwa 375 nm). Bisher konnte durch Immunisierung mit Chitosan-DNA-Nanopartikeln eine mukosale Immunität induziert werden (Kumar *et al.*, 2002; Roy *et al.*, 1999).

Ein weiteres Beispiel nicht viraler Trägersysteme zum Transfer von DNA sind Protein-Transduktions-Domänen (PTDs) (vgl. 1.4.4.2.). Dies sind kurze Peptidsequenzen innerhalb viraler und zellulärer Proteine, die das Internalisieren in die unterschiedlichsten Zelltypen vermitteln können (Leifert & Whitton, 2003). Sie können außerdem einen rezeptorabhängigen Kerntransport vermitteln, wie beispielsweise die PTD vom "Transaktivator of transcription"-Protein Tat von HIV-1 (TatPTD) oder vom Antennapedia-Protein von *Drosophila melanogaster* (Penetratin) (Ford *et al.*, 2001; Lindgren *et al.*, 2000; Prochiantz, 2000). An PTDs fusionierte DNA kann so erleichtert in den Zellkern eingeschleust werden.

1.4.3.2. Modifizierte human-pathogene Trägersysteme zum Transfer von DNA in Dendritische Zellen

Zur Zeit werden virale Vektoren basierend auf human-pathogenen Viren, wie zum Beispiel Adenoviren, Vacciniaviren, Influenza und Lentiviren zur Transduktion von DCs eingesetzt, da sie dabei eine hohe Effizienz aufweisen. Die Verwendung von modifizierten human-pathogenen Viren als Transportmittel für DNA ist in vielen Fällen durch die Inhibition der immunstimulatorischen Kapazität der infizierten DCs limitiert. Abhängig von verwendetem Virus kann die Reifung der infizierten DCs inhibiert werden, außerdem führt in manchen Fällen die Infektion von DCs zu einem Absterben (El-Aneed, 2004; Jenne *et al.*, 2001). Die Induktion von protektiven Immunantworten wird dabei unter Zugabe von immunstimulatorischer Substanzen erreicht (Gamvrellis *et al.*, 2004).

Durch Infektion mit rekombinanten Adenoviren können *in vitro* circa 90 % der unreifen DCs transfiziert werden (Dietz & Vuk-Pavlovic, 1998). Die Expression der eingebrachten Gene ist allerdings transient, da die virale DNA episomal vorliegt und nach einiger Zeit abgebaut wird (Jonuleit *et al.*, 2000b; Rea *et al.*, 1999; Rouard *et al.*, 2000). *In vivo* infizieren Adenoviren nur zu einem geringen Umfang DCs (Larsson *et al.*, 2004). Die Induktion adaptiver T Zell-Antworten wird daher wahrscheinlich zum größten Teil von nicht-infizierten DCs geleistet. Sie cross-präsentieren Proteine infizierter Körperzellen (Prasad *et al.*, 2001). Außerdem besitzt die Mehrzahl der Bevölkerung Adenovirus-spezifische Antikörper, durch die adenovirale Vektoren inaktiviert werden (Verma & Somia, 1997). Daher ist der Einsatz von adenoviralen Vektoren zur Immunisierung *in vivo* wahrscheinlich nur in Einzelfällen sinnvoll, bei denen der Immunstatus bekannt ist. Während einer Impfstudie adenoviraler Vektoren kam es bei der irrtümlich überhöhten Dosierung der Viren zu einem Todesfall durch Multiorganversagen (Grosshans, 2000). Seitdem sind Adenoviren als virale Vektoren umstritten. Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind dagegen nicht pathogen und gewährleisten eine lang anhaltende Expression durch Integration in das Chromosom 19. Bisher konnte allerdings noch keine Infektion von DCs durch

AAV nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2000). Außerdem ist die Herstellung der AAV sehr aufwändig, da für die Replikation der Viren in Zellkultur Helferviren notwendig sind (Merten *et al.*, 2005).

Lentiviren sind mit hoher Effizienz *in vitro* in der Lage, unreife DCs zu infizieren. Die DNA wird in das Wirtsgenom integriert und ermöglicht so eine lang anhaltende Expression (Chinnasamy *et al.*, 2000; Mangeot *et al.*, 2000; Negre *et al.*, 2000; Schroers *et al.*, 2000). Infizierte unreife DCs werden durch die Infektion *in vitro* nicht ausgereift, können allerdings durch Inkubation mit CD40-Ligand oder LPS ausgereift werden (Chinnasamy *et al.*, 2000; Negre *et al.*, 2000). Attenuierte Lentiviren können rückmutieren und weisen daher ein pathogenes Potential auf. Dem versucht man mit aufwändigen genetischen Modifikationen der Viren zu begegnen versucht, beispielsweise durch Deletion mehrerer viraler Gene Nef, Vif, Vpu, Vpr und Env (El-Aneed, 2004). Darüber hinaus sind Lentiviren aufgrund ihrer zufälligen Integration in das Genom der infizierten Zellen potentiell onkogen (Gorecki & Simons, 1999).

Vacciniaviren sind bereits lange als virale Trägersysteme im Gebrauch. Die Viren bringen *in vitro* transgene DNA-Sequenzen bis zu 25000 Basen Länge mit einer hohen Effizienz in DCs ein (Brown *et al.*, 1999; Di Nicola *et al.*, 1998; Strobel *et al.*, 2000). Eine Infektion mit Vaccinaviren verhindert allerdings die Reifung von DCs (Drillien *et al.*, 2000; Engelmayer *et al.*, 1999; Jenne *et al.*, 2000). Die Induktion adaptiver T Zell-Antworten wird daher wahrscheinlich zum größten Teil von nicht-infizierten DCs geleistet. Sie cross-präsentieren Proteine infizierter Körperzellen (Ramirez & Sigal, 2002).

Influenza-Virosomen können effizient RNA in DCs transportieren. In Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass 30 % aller durch Influenza transfizierten Zellen im Lymphknoten DCs sind (Cusi *et al.*, 2004). Nach Infektion mit auf Influenza-Virus basierenden Vektoren reifen DCs *in vitro* ohne einen weiteren exogenen Stimulus zu reifen DCs aus (Brimnes *et al.*, 2003; Strobel *et al.*, 2000). Dieser Umstand der effizienten Expression in Kombination mit einer Reifungsinduktion macht Influenzaviren zu geeigneten viralen Vektoren zur Transfektion von DCs *in vivo*. Allerdings birgt Influenza durch sein

segmentiertes Genom die Möglichkeit der Reassortantenbildung, wodurch neue reassortierte Viren aus Impfstamm- und Wildstamm-Influenza mit unbekannter Pathogenität entstehen könnten (Louz *et al.*, 2005).

1.4.3.3. Nicht-human-pathogene Viren als Trägersysteme zum Transfer von DNA in Dendritische Zellen

Im Gegensatz zu human-pathogenen Viren als Vektoren bieten nicht-human-pathogene Viren ein hohes Maß an Sicherheit, was allerdings meist mit geringerer Immunogenität gekoppelt ist, da diese Viren nur gering oder gar nicht im Wirtsorganismus replizieren (Ada & Blanden, 1994). Ein Beispiel für nicht-human-pathogene Viren ist das Baculovirus AcMNPV ("*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus"). AcMNPV infiziert Lepidopterenlarven und wird in der Forschung als Vektor zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen benutzt (Hu, 2005). 1983 wurde erstmals eine Infektion von Säugerzellen mit AcMNPV beobachtet (Volkman & Goldsmith, 1983). Die Infektion wird dabei durch das virale Glykoprotein gp64 vermittelt, das auch für die Infektion von Insektenzellen verantwortlich ist. Das gp64 bindet an bislang unbekannte Rezeptoren auf Säugerzellen und induziert so die Rezeptor-vermittelte Endozytose (Duisit *et al.*, 1999; Hofmann & Strauss, 1998; Tani *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2001). Nach der Aufnahme kommt es zu einem gp64-vermittelten, pH-abhängigen Freisetzen des Nukleokapsids aus dem Endosom in das Zytoplasma der Zelle (Dee & Shuler, 1997). Im Anschluss gelangt das Nukleokapsid entlang der Aktinfilamente zum Kern und wird hier aktiv über die Kernporen in den Kern transportiert. Im Kern wird die DNA aus dem Kapsid freigesetzt und fragmentiert (Ghosh *et al.*, 2002; van Loo *et al.*, 2001). Eine Infektion von Säugerzellen mit rekombinantem AcMNPV, dessen Gene unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors stehen, führt zu einer effizienten Expression (Boyce & Bucher, 1996; Hofmann *et al.*, 1995). Bisher konnten zahlreiche Zelllinien humanen Ursprungs oder die anderer Säuger *in vitro* mit rekombinantem AcMNPV transfiziert werden (Kost & Condreay, 2002; Leisy *et al.*, 2003). Neben der Infektion von mitotisch aktiven Zellen konnte auch

eine Infektion mitotisch inaktiver Zellen und primärer Zellen durch AcMNPV *in vitro* gezeigt werden (Ho *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2000; Sarkis *et al.*, 2000; van Loo *et al.*, 2001; Wagle & Jesuthasan, 2003).

Rekombinante Baculoviren sind einfach und in großen Mengen herzustellen (Hu, 2005). Da AcMNPV-spezifische Promotoren in Säugerzellen nicht oder nur schwach aktiv sind, kommt es zu keiner Expression viraler Proteine und zu keiner Replikation des Virus (Knebel & Doerfler, 1987). Unter diesem Aspekt sind sie sichere Vektoren zur *in vivo* Transfektion von DC. Tatsächlich wird AcMNPV bereits zur In-Vivo-Immunisierung von Mäusen eingesetzt und ist in der Lage, antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T Zell-, sowie humorale Immunantworten zu induzieren (Aoki *et al.*, 1999; Facciabene *et al.*, 2004; Huser *et al.*, 2001). Grundsätzlich hat AcMNPV einen massiven Einfluß auf die unspezifische Aktivierung des Immunsystems, so induziert die AcMNPV-Infektion IFN- α -, IFN- β - und TNF- α -Produktion, sowie die Expression von IL-1 α und IL-1 β in infizierten Zellen (Beck *et al.*, 2000; Gronowski *et al.*, 1999). Außerdem ist AcMNPV in der Lage, *in vitro* aus Monozyten differenzierte DCs auszureifen (Schuetz *et al.*, zur Publikation eingereicht). Tatsächlich schützt die Immunisierung mit AcMNPV antigen-unabhängig vor einer Infektion von Mäusen mit Enzephalomyokarditis- oder Influenza-Virus (Abe *et al.*, 2003; Gronowski *et al.*, 1999). Diese unspezifische Aktivierung könnte unerwünschte Nebeneffekte bei einer In-Vivo-Immunisierung auslösen, wie beispielsweise Schädigung von Körperzellen oder Durchbrechen von Toleranz (Hu, 2005). Ein weiteres Problem bei der In-Vivo-Immunisierung stellt die Inaktivierung des Virus durch das Komplementsystem dar (Hofmann & Strauss, 1998). Dies lässt sich allerdings durch Pseudotypisierung oder Schutz der Virushülle mit „decay accelerating factor“ teilweise umgehen (Huser *et al.*, 2001; Pieroni *et al.*, 2001). Außerdem ist AcMNPV potentiell onkogen, da in teilenden Zellen eine zufällige Integration viraler DNA beobachtet wird (Condreay *et al.*, 1999; Merrihew *et al.*, 2001). Durch eine Infektion von DCs *ex vivo* oder ein effektives Targeting von DCs *in vivo* ließen sich diese Sicherheitsprobleme umgehen. Bislang ist allerdings unklar, ob AcMNPV in der Lage ist, DCs direkt zu infizieren und so eine antigenspezifische Aktivierung von T Zellen auszulösen, oder ob die Cross-Präsentation von

Antigenen infizierter Körperzellen zur Immunisierung nötig ist (Aoki *et al.*, 1999; Facciabene *et al.*, 2004; Huser *et al.*, 2001).

1.4.4. Protein-Immunisierung

Protein-Impfstoffe induzieren vornehmlich eine Th2-Immunantwort (Shedlock & Weiner, 2000). Dabei spielt die Präsentation des exogenen Antigens für die Induktion der hauptsächlich humoralen Immunantwort eine entscheidende Rolle. Während Peptide endogener Proteine meist im Zusammenhang mit MHC-I-Molekülen präsentiert werden, werden MHC-II-Moleküle vornehmlich mit Peptiden exogener Proteine beladen. Die exogenen Proteine werden endozytiert und in den Lysosomen gespalten. Die unbeladenen MHC-II-Moleküle werden im ER von der sogenannten invarianten Kette vor Beladung mit zellulären Peptiden geschützt und über den Golgi-Apparat in die Endosomen transportiert. Durch Verschmelzen von Lysosomen und Endosomen kommt es zu Bildung von Endolysosomen. In ihnen wird die invariante Kette abgebaut und die prozessierten Peptide auf die MHC-II-Moleküle geladen, die dann an die Zelloberfläche gelangen können (Cresswell, 1994). Der Schutz vor den meisten Infektionskrankheiten wird allerdings nur durch eine Kombination zellulärer und humoraler Immunantwort erreicht. Daher zielen neue Immunisierungsstrategien auf der Basis von Proteinen oder Peptiden auf eine Stimulation der Th1-Immunantwort ab. Als Beispiel sei hier die Beladung von MHC-I- und MHC-II-Molekülen mit Peptiden angeführt. Mit auf diese Weise „gepulsten“ DCs können neben Th2- auch Th1-Antworten induziert werden (Bedrosian *et al.*, 2003; Godelaine *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003). Allerdings hat die Stimulation von Immunantworten durch Peptid-beladene DCs einige entscheidende Nachteile. Peptide binden nur an bestimmte HLA-Typen, auf deren Vorhandensein der Patient in jedem einzelnen Fall getestet werden muss. Außerdem ist nur eine begrenzte Zahl von MHC-I- bzw. MHC-II-restringierten Peptiden der einzelnen Antigene bekannt. Zusätzlich kann die Qualität und Dauer der Peptid/MHC-Interaktion nach exogener Beladung nur schwer kontrolliert werden (Banchereau *et al.*, 2001). Eine Alternative dazu bietet sich durch die Fähigkeit der DCs, exogene

Proteine *in vivo* auch über MHC-I-Moleküle zu präsentieren (Cross-Präsentation) und somit CD8⁺ T Zellen zu stimulieren (Cross-Priming) (Heath *et al.*, 2004). Die Optimierung der Protein-Impfstoffe zur effektiven Cross-Präsentation ist daher das vornehmliche Ziel neuer Immunisierungs-Strategien.

1.4.4.1. Cross-Präsentation exogener Proteine durch Dendritische Zellen

Zahlreiche Viren, die eine effektive CD8⁺ T Zell-Antwort induzieren können, infizieren DCs entweder nicht oder verhindern bei direkter Infektion der DCs eine effektive Präsentation oder Kostimulation (Larsson *et al.*, 2004). Dies sind beispielsweise Adenoviren (Rea *et al.*, 1999), Vaccinia Viren (Engelmayer *et al.*, 1999), HIV (Andrieu *et al.*, 2003; Donaghy *et al.*, 2003; Larsson *et al.*, 2002; Lore *et al.*, 2003), EBV (Li *et al.*, 2002) und CMV (Beck *et al.*, 2003; Hahn *et al.*, 1998; Halary *et al.*, 2002; Raftery *et al.*, 2001; Riegler *et al.*, 2000). Da DCs als einzige in der Lage sind, effektiv primäre T Zell-Antworten zu induzieren, müssen nicht-infizierte DCs in der Lage sein, exogene Antigene nach der Aufnahme in den MHC-I Präsentationsweg zu schleusen. Tatsächlich wurde bei zahlreichen Viren nachgewiesen, dass sie eine MHC-I-Präsentation exogener Antigene induzieren können (Beck *et al.*, 2003; Holtappels *et al.*, 2004; Larsson *et al.*, 2002; Prasad *et al.*, 2001; Ramirez & Sigal, 2002; Subklewe *et al.*, 2001). Das Phänomen der Cross-Präsentation, d.h. die Präsentation eines exogenen prozessierten Antigens im Kontext von MHC-I, wurde bereits 1994 für DCs beschrieben (Huang *et al.*, 1994). Seitdem konnte Cross-Präsentation *in vitro* außerdem für Makrophagen (Ramirez & Sigal, 2002), B-Zellen (Ke & Kapp, 1996), Monozyten, Keratinozyten (Neijssen *et al.*, 2005) und Endothelzellen (Limmer *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. *In vivo* beschränkt sich die Population der Zellen, die durch Cross-Präsentation von exogenem Antigen eine CD8⁺ T Zell-Antwort in der Maus induzieren können, auf CD8⁺ CD205⁺ CD11c⁺ DCs. Die besondere Bedeutung der DCs bei der Induktion zellulärer Immunantworten gegen intrazelluläre Pathogene durch Cross-Präsentation *in vivo* ist daher klar belegt.

Bisher wurde eine Reihe von Antigenen beschrieben, die in den MHC-I-Präsentationsweg geschleust werden können. Es kann sowohl Material apoptotischer Zellen, als auch das lebender Zellen cross-präsentiert werden (Albert *et al.*, 1998; Harshyne *et al.*, 2001). Außerdem werden „Heat Shock“ Proteine (Hsp) (Srivastava, 2002), Exosomen (Zitvogel *et al.*, 1998), sowie Immunkomplexe oder lösliches Antigen (Li *et al.*, 2001) cross-präsentiert. Die Aufnahme der exogenen Antigene in die DCs wird durch die Struktur des Antigens bestimmt und ist entweder Rezeptor-vermittelt oder -unabhängig (Brode & Macary, 2004). Zahlreiche Antigene können über spezifische Rezeptoren aufgenommen werden. So werden bakterielle Antigene beispielsweise über Scavenger-Rezeptoren, Mannose-Rezeptoren und Dectin-1 aufgenommen (Brown & Gordon, 2001; Ezekowitz *et al.*, 1990; Hampton *et al.*, 1991), wohingegen Material apoptotischer Zellen und „Heat Shock“ Proteine über CD91, CD36 und Scavenger-Rezeptor A und LOX-1 aufgenommen werden (Albert *et al.*, 1998; Berwin *et al.*, 2003; Delneste *et al.*, 2002; Fadok *et al.*, 2000). Rezeptor-vermittelt können partikuläre Antigene von DCs über Phagozytose oder Endozytose aufgenommen werden, lösliche Antigene dagegen über Pinozytose (Brode & Macary, 2004). Große Mengen löslichen Materials können von DCs auch über Makropinozytose aufgenommen werden, allerdings ist dieser Mechanismus nicht Rezeptor-vermittelt und daher für die gerichtete Aufnahme löslicher Antigene ineffizient (Li *et al.*, 2001).

Die Prozessierung der exogenen Antigene nach der Aufnahme ist bisher nur für partikuläre Antigene aufgeklärt, allerdings weisen erste Ergebnisse auf einen vergleichbaren Mechanismus bei der Prozessierung löslichen Antigens hin (Brode & Macary, 2004). Demnach fusioniert nach der Antigen-Aufnahme die Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) mit der Membran der frühen Phagosomen. Dabei entsteht ein frühes „Mixed ER-Phagosom“, das im Lumen ER-Aminopeptidasen und Disulfid-Isomerasen beherbergt. Die Membran selbst enthält ER-Transportermoleküle, wie den „Transporter associated with antigen processing“ (TAP) und Sec61, sowie Moleküle des MHC-Lade-Komplexes, Calreticulin und Tapasin (Gagnon *et al.*, 2002). Die Fusion des „Mixed ER-Phagosoms“ mit späten Lysosomen ermöglicht

anschließend die Spaltung der partikulären Proteine durch lysosomale Hydrolasen und ER-Disulfid-Peptidasen in Polypeptide, die schließlich durch das Sec61 Transportmolekül in das Zytoplasma transportiert werden (Fonteneau *et al.*, 2003). Im Zytoplasma werden die Polypeptide durch den Ubiquitinylierungskomplex polyubiquitinyliert und zu einem Substrat für den proteasomalen Abbau in Peptide (Rodriguez *et al.*, 1999), die dann über TAP direkt in die „Mixed ER-Phagosomen“ rücktransportiert werden (Ackerman & Cresswell, 2003). Die Peptide werden von der ER-Amino-peptidase verkürzt und durch den MHC-Lade-Komplex auf MHC-I geladen. Vermutlich gelangt das beladene MHC-Molekül dann durch Exozytose an die Zelloberfläche. Ein alternativer Mechanismus der Prozessierung ist die Spaltung der aufgenommenen Proteine und spätere Beladung der MHC-I-Moleküle ohne Umweg über das Zytosol direkt in den „Mixed ER-Phagosomen“ (Lizee *et al.*, 2003). Dieser Weg wird allerdings seltener beobachtet (Brode & Macary, 2004). Der gesamte Vorgang der Antigen-Prozessierung ist nach ein bis zwei Stunden abgeschlossen (Ackerman *et al.*, 2005).

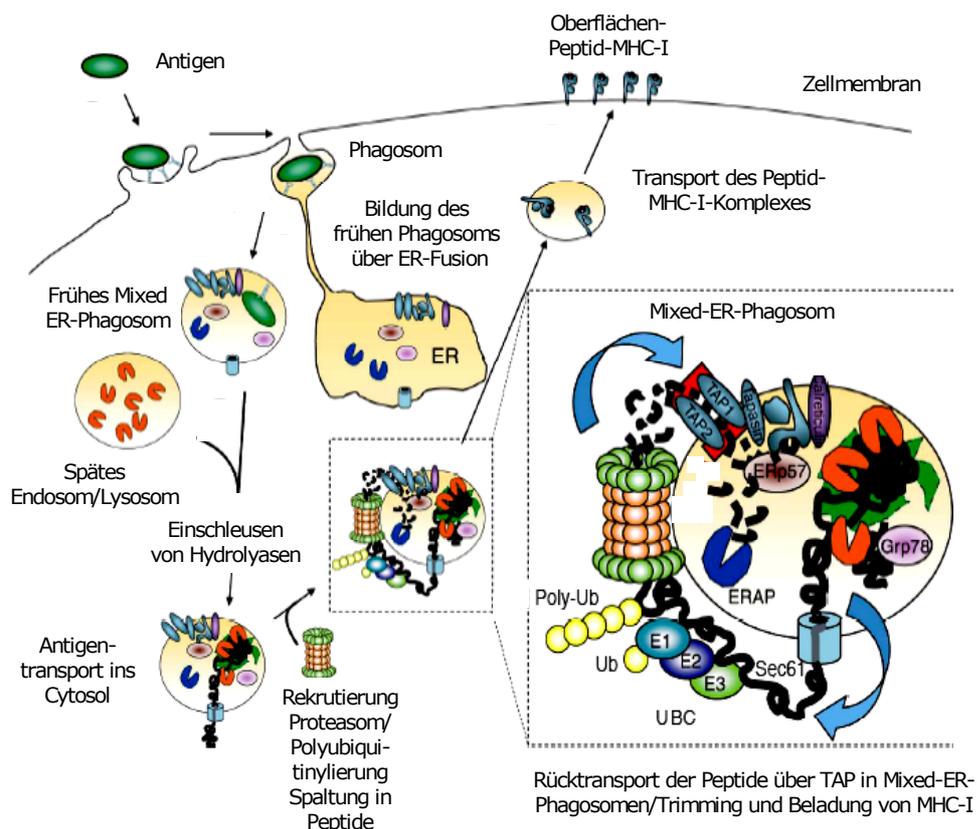


Abb. 1.2. Cross-Präsentationsweg über „mixed“ ER-Phagosomen
(verändert nach Brode & Macary, 2004)

Die Induktion einer $CD8^+$ T Zell-Antwort ist nicht nur abhängig von einer effizienten Cross-Präsentation des Antigens, sondern auch von einer adäquaten Aktivierung der DCs. Dies verhindert die Induktion einer Toleranz gegen das Cross-präsentierte Antigen. Daher wird effizientes Cross-Priming im Zusammenhang mit endogenen und exogenen Signalen für DCs beobachtet. Endogene Signale, das heißt Signale, die körpereigen sind, induzieren zum Beispiel die von T Helferzellen geleistete Hilfe, die so genannte „Cognate help“ (Behrens *et al.*, 2004), aber auch lösliche Faktoren, wie Hsp (Srivastava, 2002) oder Interferon-alpha (Cho *et al.*, 2002). Exogene Signale induzieren dagegen beispielsweise LPS (van Mierlo *et al.*, 2004) oder CpG-DNA (Kuchty *et al.*, 2005), die unterschiedliche TLR auf den DCs binden. Sie erhöhen durch Auslösen einer Signalkaskade die Expression von MHC und

CD80, sowie CD86 (vgl. 1.3.2). Dieser als Reifung der DCs bezeichnete Vorgang führt ebenfalls zu einem Einstellen der Antigenaufnahme. Jüngere Untersuchungen zeigen jedoch, dass 30 bis 45 Minuten nach Stimulation mit LPS, CpG und Poly (I:C) zunächst eine Steigerung der Antigenaufnahme beobachtet wird (West *et al.*, 2004), die später wieder abnimmt. Möglicherweise kann auch durch andere TLR-Liganden ein vergleichbares Phänomen induziert werden. Die gesteigerte Aufnahme der Immunogene unter Reifung der DCs hätte daher einen positiven Einfluß auf die Cross-Präsentations-Kapazität, wohingegen die Hochregulation von MHC und CD80, sowie CD86 einen positiven Effekt auf die folgende Cross-Priming-Kapazität der DCs hätte.

1.4.4.2. Protein-Transduktions-Domänen und Translokatorische Proteine zur Erhöhung der Effizienz von Cross-Präsentation durch Dendritische Zellen

Protein-Transduktions-Domänen (PTDs) sind kurze Peptidsequenzen innerhalb viraler und zellulärer Proteine, die aufgrund eines hohen Anteils an Lysinen und Argininen einen extrem hohen isoelektrischen Punkt zwischen pI 12,7 und 12,9 aufweisen (Leifert & Whitton, 2003). Dagegen sind Translokatorische Proteine verhältnismäßig kleine Proteine, wie beispielsweise das 22 kDa große Tegumentprotein von Herpes Simplex Virus Typ I (HSV-1) Vp22, die ebenfalls Regionen mit hohem isoelektrischen Punkt aufweisen, welche selbst PTDs darstellen (Elliott & O'Hare, 1997; Elliott & Meredith, 1992). PTDs und Translokatorische Proteine sind in der Lage, in die unterschiedlichsten Zelltypen zu internalisieren. Mehrere PTDs können einen rezeptorabhängigen Kerntransport vermitteln, da sie gleichzeitig „Nuclear Localization Signals“ (NLS) beherbergen, wie beispielsweise das vom "Transaktivator of transcription"-Protein Tat von HIV-1 (TatPTD) oder vom Antennapedia-Protein von *Drosophila melanogaster* (Penetratin) (Ford *et al.*, 2001; Lindgren *et al.*, 2000; Prochiantz, 2000). An Translokatorische Proteine und PTDs fusionierte Peptide, Proteine oder DNA können erleichtert in Zellen eingeschleust werden (Leifert & Whitton, 2003). Dabei binden sowohl PTDs,

als auch PTD-Fusionskonstrukte wahrscheinlich an Heparansulfatreste auf der Zelle. Die Aufnahme erfolgt bei hoher Proteinkonzentration bis zu 0,1 μM Rezeptor-unabhängig (Bennett *et al.*, 2002; Falnes *et al.*, 2000; Falnes *et al.*, 2001; Mai *et al.*, 2002; Nagahara *et al.*, 1998; Peitz *et al.*, 2002; Shibagaki & Udey, 2002). Neben einer Reihe von natürlichen PTDs werden auch artifizielle Transduktionsdomänen aus kurzen kationischen Aminosäureabfolgen mit hohem isoelektrischem Punkt beschrieben, die eine gesteigerte Aufnahme vermitteln (Laus *et al.*, 2000; Mi *et al.*, 2000; Rothbard *et al.*, 2000).

Die Effizienz einer Cross-Präsentation von Proteinen durch DCs kann wahrscheinlich durch eine Steigerung der Aufnahme der Cross-präsentierten Proteine erhöht werden. Die Eigenschaften der PTDs und Translokatorischen Proteine, fusionierte Peptide und Proteine in Zellen zu schleusen, machen sie zu interessanten Kandidaten für Protein-Vakzinierungs-Strategien auf der Basis von Cross-Präsentation. In der Vergangenheit wurden bereits mehrere an PTDs und an Translokatorische Proteine fusionierte Immunogene erfolgreich zu einer *in vivo* Stimulierung von antigenspezifischen CTL eingesetzt. Beispielsweise führt die TatPTD zu einer erhöhten Prozessierung gekoppelter Proteine im MHC-I-Präsentationsweg (Kim *et al.*, 1997). Dabei erfolgt die Prozessierung des Proteins hauptsächlich im Zytosol, da gleichzeitig die Höhe der MHC-II-abhängigen Stimulierung vom Koppeln der TatPTD unbeeinflusst bleibt (Leifert *et al.*, 2001; Shibagaki & Udey, 2002; Wang *et al.*, 2002). Ebenfalls konnte durch Koppeln eines Ovalbumin-Epitopes an Penetratin eine Präsentation über MHC-I *in vivo* und sogar ein dabei induzierter Schutz gegenüber Ovalbumin exprimierenden Tumorzellen gezeigt werden (Pietersz *et al.*, 2001). Ein Beispiel für ein zur Vakzinierung eingesetztes Translokatorisches Protein ist VP22. Das Protein wurde erfolgreich als Fusionsprotein zur effizienteren Stimulation von CD8^+ T Zellen gegen das E7-Protein des Humanen Papilloma Virus Typ 16 (HPV-16) in Mäusen eingesetzt (Pietersz *et al.*, 2001). Ähnliche Effekte konnten mit zu VP22 homologen Proteinen anderer Herpesviren beobachtet werden, so zum Beispiel mit dem VP22 des Mareks Disease Virus (Hung *et al.*, 2002) oder mit dem BVP22 des Bovine Herpes Virus 1 (Oliveira *et al.*, 2001).

Da beschriebene PTDs und Translokatorische Proteine nur bei hoher Proteinkonzentration eine Aufnahme in die Zielzellen vermitteln, bleibt die Stimulation der CD8⁺ T Zellen im Vergleich zu einer Peptidstimulation ineffizient. Proteine, die rezeptorvermittelt internalisiert werden, vermitteln dagegen eine deutlich effizientere Aufnahme (Arora & Leppla, 1994; Arora *et al.*, 1994; Falnes *et al.*, 2001; Wiedlocha *et al.*, 1994). Um die Proteinaufnahme und damit die Cross-Präsentation zu steigern, müssen neue Translokatorische Proteine identifiziert werden.

Ein potentieller Kandidat für ein Translokatorisches Protein stellt das Tegumentprotein des Human Cytomegalovirus (HCMV) pp65 dar. Das Phosphoprotein pp65 macht 18% der Proteinmasse des Virions von HCMV aus, ist allerdings für die Replikation des Virus nicht essentiell (Schmolke *et al.*, 1995). Pp65 wird erst in der Spätphase des Replikationszyklus von HCMV gebildet, in der HCMV-Proteine die immunstimulatorische Kapazität der infizierten DCs reprimieren (Andrews *et al.*, 2001; Moutaftsi *et al.*, 2002). Die Präsentation von endogen exprimiertem pp65 in HCMV infizierten Zellen ist daher ineffizient (Arrode *et al.*, 2002). Außerdem wurde festgestellt, dass endogen exprimiertes pp65 die Expression Interferon-alpha responsibler Proteine, wie beispielsweise MxA hemmt (Browne & Shenk, 2003). Pp65 könnte daher möglicherweise selbst einer effektiven Stimulation von HCMV-infizierten DCs entgegenwirken. Da pp65 allerdings das Hauptantigen für eine HCMV-spezifische CD8⁺ und CD4⁺ T Zell-Antwort darstellt (Beninga *et al.*, 1995; Boppana & Britt, 1996; Britt *et al.*, 1995; Diamond *et al.*, 1997; Gyulai *et al.*, 2000; Jahn *et al.*, 1987; Khattab *et al.*, 1997; Riddell *et al.*, 1991; Schmolke *et al.*, 1995; van Zanten *et al.*, 1995; Wills *et al.*, 1996), muss pp65 auf anderen Wegen, als durch *de novo* Synthese bei Infektion in den MHC-I und den MHC-II Präsentationsweg gelangen. Interessanterweise konnte *in vitro* gezeigt werden, dass pp65 aus kokultivierten infizierten Fibroblasten von nicht-infizierten DC cross-präsentiert werden kann (Tabi *et al.*, 2001). Ebenfalls wurde bereits gezeigt, dass pp65 zur Induktion von pp65-spezifischen CTL Antworten nicht *de novo* von HCMV-infizierten DCs synthetisiert werden muss, sondern durch Freisetzung aus dem Virion in das Zytoplasma gelangt und im MHC-I-Präsentationsweg prozessiert wird (Gilbert

et al., 1996; Grefte *et al.*, 1992; Riddell *et al.*, 1991). Daher ist wahrscheinlich, dass auch *in vivo* DCs pp65 aufnehmen und im MHC-I-Präsentationsweg prozessieren. Ob dies auch unabhängig von Virionen geschehen kann, ist bislang *in vitro* und *in vivo* ungeklärt. Allerdings besitzt pp65, wie andere Translokatorische Proteine, eine Region mit hohem Anteil an kationischen Aminosäuren. Sie stellt die zweigeteilte NLS des Proteins dar und befindet sich im hinteren Bereich des Proteins, von Aminosäure 538 bis 561 (Gallina *et al.*, 1996; Schmolke *et al.*, 1995). Daher ist denkbar, dass pp65 ähnlich anderen Translokatorischen Proteinen über diese Region an die DCs bindet und aufgenommen werden kann. Ob diese Region allerdings einen Transport des Proteins oder anderer Proteine direkt in DCs vermitteln kann, ist bislang ebenfalls ungeklärt.

1.5. Ziele der Arbeit

Nach wie vor stellen Infektionskrankheiten ein weltweites Problem dar. Gegenwärtig sterben jährlich etwa 15 Millionen Menschen an ihnen. Die meisten Todesfälle ereignen sich in Entwicklungsländern, in denen Therapiemöglichkeiten nur eingeschränkt vorhanden sind. Gerade für diese Länder ist die Entwicklung von Impfstoffen essentiell. Gegen viele Infektionskrankheiten existiert allerdings auch heute noch kein wirksamer Impfschutz. Klassische Immunisierungsstrategien, die auf der Immunisierung durch attenuierte Pathogene beruhen, beinhalten bei Pathogenen, die eine hohe Mutationsrate aufweisen, wie beispielsweise bei HCV und HIV, das Risiko der Reversion zum pathogenen Wildtyp. Alternative Strategien beruhen einerseits auf einer Immunisierung durch nackte oder an Trägersystemen gekoppelte DNA, andererseits die Immunisierung durch Proteine. Mit ihnen sollen vornehmlich zelluläre Immunantworten induziert werden, da nur sie Schutz gegen intrazelluläre Erreger verleihen. Die Induktion zellulärer Immunantworten wird *in vivo* hauptsächlich von DCs geleistet. Daher ist die Präsentation von Antigenen über aktivierte DCs auch das Ziel alternativer Immunisierungs-Strategien. Während jedoch eine DNA-Immunisierung, je nach verwendetem Trägersystem, effiziente zelluläre Immunantworten induziert, sind die durch Protein-Immunisierung induzierten zellulären Immunantworten meist schwach. Dennoch sind gerade die hoch effizienten viralen DNA-Trägersysteme, die auf modifizierten pathogenen Viren beruhen, risikobehaftet.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, das nicht-pathogene virale DNA-Trägersystem „*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus“ (AcMNPV) näher zu charakterisieren. Rekombinante AcMNPV wurden bereits zur In-Vivo-Immunisierung von Mäusen eingesetzt, wobei die Induktion zellulärer Immunantworten beobachtet wurde. Dabei ist allerdings noch unklar, ob rAcMNPV die DCs direkt infizieren, oder ob die Induktion der zellulären Immunantwort über die Cross-Präsentation von Antigenen aus infizierten Körperzellen erfolgt. Die Identifikation der Zielzellen wäre eine wichtige Voraussetzung für die Optimierung des Trägersystems für die In-Vivo-

Immunisierung. Daher sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang rAcMNPV in der Lage ist, humane DCs zu infizieren.

In einem weiteren Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob das HCMV-Tegumentprotein pp65 Eigenschaften aufweist, das es als potentielles Trägersystem für Proteinantigene in den Cross-Präsentationsweg von iDCs geeignet macht. Dies wäre eine Voraussetzung für die effiziente Induktion zellulärer Immunantworten durch Protein-Immunisierungen. Dazu müssten an pp65 fusionierte Proteine nicht nur effizient an DCs binden und aufgenommen werden. Vielmehr müsste aufgenommenes pp65 effektiv im MHC-I- und MHC-II-Präsentationsweg prozessiert werden. Darüber hinaus sollte pp65 idealerweise in der Lage sein, iDCs zu aktivieren oder eine Aktivierung von pp65-präsentierenden iDCs über Adjuvantien zuzulassen, da nur die Präsentation durch aktivierte DCs zelluläre Immunantworten induziert.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien

| | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Acrylamid | Serva, Heidelberg |
| Agarose | SeaKem, Rockland |
| APS | Serva, Heidelberg |
| Ampicillin (Binotal™) | Bayer, Leverkusen |
| Bisacrylamid | Serva, Heidelberg |
| Brefeldin A | Sigma, Deisenhofen |
| Bromphenolblau | Serva, Heidelberg |
| BSA | PAA Laboratories, Linz |
| Casyton | Schärfe, Reutlingen |
| Coomassie Brilliant Blue™ R-250 | Serva, Heidelberg |
| DMEM (1x) High Glucose | PAA Laboratories, Linz |
| DMSO | Merck, Darmstadt |
| EDTA | Merck, Darmstadt |
| Essigsäure | Merck, Darmstadt |
| Ethanol | Merck, Darmstadt |
| Ethidiumbromid | Sigma Chemie |
| FKS (Endotoxin < 5 EU/ml) | Biochrom KG, Berlin |
| FKS | GibcoBRL, Karlsruhe |
| LSM | PAA Laboratories, Linz |
| Glycerol | Serva, Heidelberg |
| Glycin | Serva, Heidelberg |
| GM-CSF (Leucomax®) | AESCA, Traiskirchen |
| GM-CSF (Leukine®) | Berlex Laboratories, Richmond |
| IL-4 | Strathmann, Hamburg |
| IFN- α 2a (Roferon®) | Roche, Mannheim |
| Isopropanol | Merck, Darmstadt |
| LB-Agar | Invitrogen, Paisley |
| LB-Medium | Invitrogen, Paisley |
| LPS | Sigma, Deisenhofen |

| | |
|-------------------------|------------------------------|
| β-Mercaptoethanol | Serva, Heidelberg |
| Natriumjodid | Sigma, Deisenhofen |
| Nytran-M | Schleicher & Schuell, Dassel |
| Penicillin/Streptomycin | Biochrom AG, Berlin |
| RPMI 1640 | BioWhittaker, Verviers |
| Saponin | Sigma, Deisenhofe |
| SDS | Roth, Karlsruhe |
| SEB | Toxin Technologies, Florida |
| TC100 1x Medium | Gibco, Karlsruhe |
| TEMED | Serva, Heidelberg |
| TRIS | Serva, Heidelberg |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Tween 20 | Serva, Heidelberg |
| Trypsin | PAA Laboratories, Linz |

2.2. Antikörper

Tab. 2.1.: Verwendete Antikörper

[b], gegen Baculovirus AcMNPV Antigene gerichtet, [h], gegen humane Antigene gerichtet; [c], gegen Cytomegalievirus gerichtet [m], aus Maus gewonnen; [g], aus Ziege gewonnen; FITC, Fluoresceinisothiocyanat, PE, Phycoerythrin, PE-Cy5, "Tandem"-Farbstoff, bestehend aus Phycoerythrin kovalent mit Cyanin 5 verknüpft, PerCP, Peridinin Chlorophyll Protein, POX, Peroxidasegekoppelt

| Antigen bzw. Isotyp-Kontrolle | Klon | Konjugation | Isotyp | Hersteller |
|-------------------------------|--------|-------------|--------------------|-----------------------|
| CD1a [h] | NA1/34 | FITC | IgG2a κ [m] | DAKO |
| CD1a [h] | BL6 | PE-Cy5 | IgG1 | Coulter Immunotech |
| CD3 [h] | UCHT1 | FITC | IgG1 [m] | Coulter Immunotech |
| CD4 [h] | 13B8.2 | PE-Cy5 | IgG1 κ [m] | Coulter Immunotech |
| CD8 [h] | B9.11 | PE-Cy5 | IgG1 [m] | Coulter Immunotech |
| CD14 [h] | TÜK 4 | PE | IgG2a κ [m] | DAKO |
| CD16 [h] | 3G8 | PE | IgG1 [m] | Coulter Immunotech |
| CD19 [h] | J4.119 | PE | IgG1 [m] | Coulter Immunotech |
| CD56 [h] | B159 | PE | IgG1 κ [m] | PharMingen |
| CD28 [h] | L293 | - | IgG1 [m] | Becton Dickinson |
| CD49d [h] | 9F10 | - | IgG1 κ [m] | PharMingen |

Tab. 2.1.: Verwendete Antikörper (Fortsetzung)

| Antigen bzw. Isotyp-Kontrolle | Klon | Konjugation | Isotyp | Hersteller |
|-------------------------------|------------------|-------------|--------------------|----------------------|
| CD69 [h] | TP1.55.3 | PE | IgG2b [m] | Coulter Immunotech |
| CD80 [h] | MAB104 | PE | IgG1 [m] | PharMingen |
| CD83 [h] | HB15a | PE | IgG2b κ [m] | Coulter Immunotech |
| CD86 [h] | 2331 (FUN-1) | FITC | IgG1 κ [m] | PharMingen |
| gp64 [b] | AcV ₁ | - | IgG2a [m] | eBioscience |
| HLA-DR [h] | CR3/43 | FITC | IgG1 κ [m] | DAKO |
| HLA-I [h] | W6/32 | PE | IgG2a κ [m] | DAKO |
| IFN- γ [h] | 4S.B3 | FITC | IgG1 κ [m] | PharMingen |
| EGFP | 7.3+13.1 | - | IgG1 κ [m] | Roche |
| pp65 [c] | 2+6 | - | IgG1 κ [m] | Novocastra |
| Isotypkontrolle | 679.1Mc7 | FITC | IgG1 [m] | Coulter Immunotech |
| Isotyp-Kontrolle | 679.1Mc7 | PE | IgG1 [m] | Coulter Immunotech |
| Isotyp-Kontrolle | 679.1Mc7 | PE-Cy5 | IgG1 [m] | Coulter Immunotech |
| Isotyp-Kontrolle | HOPC-1 | - | IgG2a [m] | SouthernBiotech |
| Isotyp-Kontrolle | CBL601F | FITC | IgG2a [m] | Cymbus Biotechnology |
| Isotyp-Kontrolle | 7.27 | PE | IgG2a [m] | Coulter Immunotech |

Tab. 2.1.: Verwendete Antikörper (Fortsetzung)

| Antigen bzw. Isotyp-Kontrolle | Klon | Konjugation | Isotyp | Hersteller |
|--------------------------------------|-------------|--------------------|---------------|--------------------|
| Isotyp-Kontrolle | 20116.11 | PE | IgG2b [m] | R&D Systems |
| Mouse-IgG | polyklonal | PE | [g] | Coulter Immunotech |
| Mouse-IgG | polyklonal | FITC | [g] | Sigma |
| Mouse-IgG | polyklonal | POX | [g] | Sigma |

2.3. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden der Stammsammlung des Instituts für Virologie, der Universitätskliniken Homburg entnommen oder dargestellt (siehe 3.1.1. und 3.2.1.). Die Herkunft und die Eigenschaften dieser Plasmide, sowie die im Rahmen dieser Arbeit konstruierten Plasmide, sind in Tab. 2.2. aufgeführt.

Tab. 2.2.: Herkunft und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide

| Plasmid | Beschreibung | Herkunft |
|----------------|--|-----------------|
| pEGFP-C1 | Expressionsvektor; EGFP-Gen; HCMV-IE Promotor | BD-Clontech |
| pEGFP-1 | Expressionsvektor; EGFP-Gen; kein Promotor | BD-Clontech |
| pAcGHLT-C3 | Transfervektor; GST-6xHis-Fusionsgen; Polyhedrinpromotor | BD-Pharmingen |
| pTYB-PE | Expressionsvektor; pp65-EGFP-Fusionsgen; | (1) |
| pAcMT | Transfervektor, MCSpTYB; Polyhedrinpromotor | (1) |

Tab. 2.2: Herkunft und Beschreibung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide (Fortsetzung)

| Plasmid | Beschreibung | Herkunft |
|------------|--|----------|
| pAc373 | Transfervektor; Polyhedrinpromotor | (1) |
| pAcGHLT-E | Transfervektor; GST-6xHis-EGFP-Fusionsgen; Polyhedrinpromotor | (2) |
| pAcGHLT-PE | Transfervektor; GST-6xHis-pp65-EGFP-Fusionsgen; Polyhedrinpromotor | (2) |
| pAcPE | Transfervektor; pp65-EGFP-Fusionsgen; Polyhedrinpromotor | (2) |

(1) Der Stammsammlung des Instituts für Virologie Homburg entnommene Plasmide

(2) Im Laufe dieser Arbeit dargestellte Plasmide

2.4. Zellen/Viren/Bakterien

2.4.1. Zelllinien

293

Die Zelllinie 293 ist eine permanente Linie von humanen, primären, embryonalen Nierenzellen. Die Zellen wurden mit dem humanen Adenovirus Typ 5 transformiert und enthalten Sequenzen des Virusgenoms. Des Weiteren exprimieren die Zellen den Oberflächenrezeptor für Vitronectin, zusammengesetzt aus der Integrin beta-I Untereinheit und der Vitronectin alpha-V Untereinheit.

SF158

Die Zelllinie SF158 stellt einen Subklon der Zelllinie TPLB-SF-21-AE dar. Diese leitet sich von ovarialem Gewebe der Lepidopterenlarve *Spodoptera frugiperda* (Familie *Sciaridae*) ab. Die Zellen sind empfänglich für eine Infektion mit MNPV („multiple nuclear polyhedrosis virus“) und andere

Bakuloviren und können zur Proteinexpression mit Bakuloexpressionsvektoren verwendet werden (Fiebich *et al.*, 1993).

2.4.2. Viren

Rekombinantes AcMNPV

Rekombinante AcMNPV leiten sich vom *Autographa californica* „multiple nuclear polyhedrosis“ Virus ab (vgl. 3.1.) In rekombinanten AcMNPVs wird das Polyhedringen durch Fremdgene ersetzt. Der hoch effiziente Polyhedringenpromotor steuert statt des Polyhedringens daher die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Das rekombinante Protein wird nach Infektion in hohen Mengen innerhalb der Zelle angehäuft und kann durch Aufschluß der Zellen geerntet werden (siehe 2.13. und 2.14.).

Eine Übersicht der verwendeten rAcMNPV ist in Tab. 2.3. dargestellt.

Tab.2.3. Übersicht rekombinanter AcMNPV und deren Beschreibung

| Bezeichnung | Expressionskassette | Herkunft |
|--------------|--|----------|
| AcpP-EGFP | EGFP-Gen; Polyhedrin-Promotor | (1) |
| AcpP-TEGFP | TatPTD-EGFP-Gen; Polyhedrin-Promotor | (1) |
| AcpP-AEGFP | AnthHD-EGFP-Gen; Polyhedrin-Promotor | (1) |
| AcpP-PEGFP | pp65-EGFP-Gen; Polyhedrin-Promotor | (2) |
| AcpP-P | pp65-Gen; Polyhedrin-Promotor | (1) |
| AcpC-EGFP | EGFP-Gen; HCMV IE-Promotor | (2) |
| AcpP-GHLT-E | GST-6xHis-EGFP-Gen; Polyhedrin-Promotor | (2) |
| AcpP-GHLT-PE | GST-6xHis-pp65-EGFP-Gen; Polyhedrin-Promotor | (2) |

(1) Der Virensammlung des Instituts für Virologie Homburg entnommene rekombinante Viren

(2) Im Laufe dieser Arbeit dargestellte rekombinante Viren

2.4.3. Bakterien und Bakterien-Kultivierung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Bakterien wurden der Stammsammlung des Institutes für Virologie, der Universitätskliniken Homburg entnommen. Ein Überblick über die eingesetzten Stämme und deren genotypischen Hintergrund findet sich in Tabelle 2.4.

Tab. 2.4.: Herkunft und Eigenschaften der verwendete *Escherichia coli*-Stämme

| Stamm | Genotyp | Herkunft |
|----------------------------------|--|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> HB101 | F- leuB6 proA2 recA13 thi-1 ara-14 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20 supE44 hsdS20 (r- B m- B at least thi-hsd from <i>Escherichia coli</i> B) | Bolivar <i>et al.</i> , 1979 |
| pMOS | endA1 hsdR17(r _{k12} -m _{k12})supE44 thi -1 recA1 gyrA96 relA1 lac[F' proA ⁺ B ⁺ lacI ^q ZΔM15 :Tn10(Tc ^R)] | Amersham |
| XL1-Blue | recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI ^q ZDM15 Tn10 (Tet ^r)] | Stratagene |

Die aus der Stammsammlung entnommenen *E. coli* Stämme wurden in flüssigem LB-Medium über Nacht bei 37°C kultiviert. Einzelne Klone wurden gewonnen, indem Teile einer Kultur auf LB-Agarplatten ausgestrichen wurden. Mit Plasmiden transformierte *E. coli*-Kulturen wurden in LB-Medium kultiviert, dem je nach verwendetem Selektionsmarker Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml, bzw. Kanamycin in einer Konzentration von 30 µg/ml, zugesetzt wurde.

2.5. Zellkultur

Die Kultivierung humaner Zellen erfolgte grundsätzlich bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

2.5.1. Puffer und Lösungen für die Zellkulturarbeit

PBS

| | |
|--|---------|
| NaCl | 8,0 g/l |
| KCl | 0,2 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O | 2,9 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 0,2 g/l |

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt. Für die Arbeit mit humanen Zellen muss grundsätzlich PBS ohne Mg²⁺ und Ca²⁺ verwendet werden, damit es zu keiner Vorstimulation der Zellen schon beim Waschen kommt.

2.5.2. Zellkulturmedien

Das Inaktivieren der den Medien zugesetzten Seren erfolgte grundsätzlich für eine Stunde bei 55°C.

Standard-Medium zur Kultivierung von Suspensionszellen

| | |
|------------------------|------------|
| RPMI 1640 | |
| hitzeinaktiviertes FKS | 10 % (v/v) |
| Penicillin | 50 U/ml |
| Streptomycin | 50 µg/ml |

Standard-Medium zur Kultivierung von adhärennten Zellen

| | |
|------------------------|------------|
| DMEM (1x) High Glucose | |
| hitzeinaktiviertes FKS | 10 % (v/v) |
| Penicillin | 50 U/ml |
| Streptomycin | 50 µg/ml |

Medium zur Kultivierung Dendritischer Zellen

RPMI 1640

hitzeinaktiviertes FKS 10 % (v/v)

(Endotoxin < 5 EU/ml)

GM-CSF 800 U/ml

IL-4 1000 U/ml

Medium zur Kultivierung der Insektenzelllinie SF158

TC100 1x Medium

hitzeinaktiviertes FKS 10 % (v/v)

(Endotoxin < 5 EU/ml)

Penicillin 50 U/ml

Streptomycin 50 µg/ml

Einfriermedium

RPMI 1640; DMEM (1x) High Glucose; TC100 1x Medium

FKS 30 % (v/v)

DMSO 10 % (v/v)

2.5.3. Subkultivierung adhärenter Zellen

293

Adhärente 293 Zellen wurden 70-80 % konfluent in Kultur gehalten. Zweimal pro Woche wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst, in frischem DMEM Medium aufgenommen und zur Stammhaltung 1:4 gesplittet. Die verwendeten Zellen wurden mit der VenorGem Mycoplasmen-PCR (siehe 2.5.5.) untersucht und waren Mycoplasmen-negativ.

SF158

Die Insektenzelllinie SF158 wurde standardmässig bei einer Temperatur von 27°C kultiviert. Zum Subkultivieren wurde der Zellmonolayer zweimal pro Woche mit einem Zellschaber abgelöst und in einem Verhältnis von 1:3 mit

frischem TC100 Medium versetzt. Die zur Virusproduktion verwendeten SF158 wurden mittels der VenorGem Mycoplasmen-PCR (siehe 2.5.5.) untersucht und waren Mycoplasmen-negativ.

2.5.4. Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einfrieren

Die Zellen wurden in kaltem Einfriermedium in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen / ml aufgenommen und in Einfrierröhrchen überführt. Um ein langsames Absinken der Temperatur zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst einen Tag in einem Styroporbehälter bei -70°C , danach in der Gasphase über flüssigem Stickstoff auf Dauer gelagert.

Auftauen

Eingefrorene Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und sofort in warmes Medium überführt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml Medium in Kultur genommen.

2.5.5. Mycoplasmentest

Mycoplasmen sind zellwandlose Parasiten, die in der Natur unter anderem als Kommensalen der Schleimhäute von Säugetieren auftreten. Kontaminationen stellen in kontinuierlichen Zellkulturen ein großes Problem dar. Als chronische Infektion beeinflussen sie auf vielfältige Weise die Funktionen von Zellen. Sie nehmen Einfluss auf den Metabolismus der Zellen und verändern so deren Wachstumsverhalten, ihre immunologischen und biochemischen Eigenschaften, sowie deren Lebensfähigkeit. Die Infektion einer Zellkultur mit Mycoplasmen ist visuell oder lichtmikroskopisch nicht zu erkennen. Zur Kontrolle der verwendeten Zelllinien wurde ein Kit der Firma Minerva Biolabs (VenorGem) eingesetzt. Der Nachweis erfolgte hierbei über eine Mycoplasmensequenz-spezifische PCR aus dem Überstand der Zellkulturen. Der Kit enthält PCR-Primer, die spezifisch für ein breites Spektrum von Mycoplasmen, einschließlich der Spezies *Acholeplasma laidawii*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma hyorhinis*, *Mycoplasma arginini*, *Mycoplasma orale*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma hominis* und *Mycoplasma salivarium* sind. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers, wobei die Aufreinigung der Überstände von Suspensionszellen vor der Durchführung der PCR mit dem QIAamp DNA Mini Kit der Firma Qiagen nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.6. Transformation von Bakterien

Die Transformation von Bakterienzellen nach der RbCl-Methode beruht darauf, dass die im Transformationspuffer vorhandenen Alkaliionen die Kompetenz der Bakterienzellen zur DNA-Aufnahme stark erhöhen.

Verwendete Lösungen:

Puffer 1:

| | |
|-------------------------------|------------|
| RbCl | 0,1 M |
| MnCl ₂ | 0,05 M |
| CaCl ₂ | 0,01 M |
| CH ₃ COOH (pH 7,5) | 0,03 M |
| Glycerin | 15 % (v/v) |

Der Puffer wurde mit Aqua_{bidest.} ad 1000 ml aufgefüllt, der pH auf 5,8 eingestellt und die Lösung im Anschluss sterilfiltriert.

Puffer 2:

| | |
|-------------------|------------|
| MOPS (pH 6,8) | 0,01 M |
| RbCl | 0,01 M |
| CaCl ₂ | 0,075 M |
| Glycerin | 15 % (v/v) |

Der Puffer wurde mit Aqua_{bidest.} ad 1000 ml aufgefüllt und im Anschluss sterilfiltriert.

Durchführung:

Zunächst wurden 100 µl der Bakterien in 30 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit 8 ml dieser Vorkultur wurden 200 ml Hauptkultur angeimpft und ein bis zwei Stunden inkubiert. Nach dem Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,3 wurden die Zellen 15 Minuten auf Eis abgekühlt und im Anschluss fünf Minuten lang bei 2000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet

wurde in 16 ml des Puffer 1 resuspendiert, 15 Minuten auf Eis inkubiert und dann erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 4 ml Puffer 2 aufgenommen und zu 200 µl aliquotiert. Zu 50 µl der kompetenten Zellen wurden 10 µl Ligationsansatzes oder 10-50 ng Plasmid-DNA gegeben und 30 Minuten lang auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transformation der Bakterienzellen erfolgte mittels Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42°C. Die Zellen wurden anschließend fünf Minuten auf Eis inkubiert und danach für eine Stunde in 1 ml LB-Medium vorinkubiert. Die Selektion erfolgte durch Ausplattieren der transformierten Zellen auf dem entsprechenden Selektionsmedium.

2.7. Präparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung der in Bakterien vermehrten Plasmid-DNA müssen die Bakterien aufgeschlossen und die Plasmid-DNA von Zellbestandteilen und der genomischen Bakterien-DNA getrennt werden. Die verschiedenen Methoden ermöglichen eine Isolation der Plasmid-DNA mit unterschiedlichem Reinheitsgrad. Die alkalische Lyse eignet sich zur schnellen Isolation von Plasmiden, wie sie bei der Isolation multipler Bakterienklone nötig ist, wohingegen die Aufreinigung über eine Ionenaustauschersäule DNA-Plasmide hoher Reinheit liefert.

2.7.1. Plasmid-Isolation mittels alkalischer Lyse

Verwendete Lösungen:

STET-Puffer:

| | |
|-------------------|-------------|
| Saccharose | 8% (w/v) |
| Tris-HCl (pH 8,0) | 50 mM |
| EDTA | 50 mM |
| Triton X-100 | 0,1 % (v/v) |

Lösung 1:

| | |
|------|-----------|
| NaOH | 0,2 N |
| SDS | 1 % (w/v) |

Lösung 2:

| | |
|-------------------|-------|
| K-Acetat (pH 4,8) | 0,3 M |
| LiCl | 9,0 M |

Durchführung:

1,5 ml einer Bakterien-Übernachtskultur wurden fünf Minuten bei 5.000 rpm abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl STET Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von 200 µl Lösung 1 und Inkubation bei Raumtemperatur für fünf Minuten wurden die Zellen lysiert. Die Neutralisation der Lösung erfolgte durch 300 µl Lösung 2 für 30 Minuten auf Eis. Durch Zentrifugation wurden die ausgefällten Proteine und chromosomale DNA entfernt und die Plasmid-DNA durch Zugabe von 95%-igem Ethanol gefällt.

2.7.2. Plasmid-Isolation mittels "QIAGEN Plasmid Kits"

Zur Isolation von hochreiner Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde der "QIAGEN Plasmid Mini Kit" bzw. "QIAGEN Plasmid Maxi Kit" verwendet. Die Isolierung erfolgte gemäß der Anleitung des Herstellers, wobei die durchgeführte Methode auf einer modifizierten Form der alkalischen Lyse basiert. Nach dem Entfernen der Zelltrümmer und denaturierten Proteine wurde die Plasmid-DNA auf "QIAGEN" Anionen-Austauschersäulen gegeben. Nach der Bindung der DNA an die Säulenmatrix wurden durch Waschen mit einem Puffer mittlerer Salzkonzentration RNA und Verunreinigungen mit niedermolekularen Komponenten entfernt. Durch Zugabe eines Puffers mit höherer Salzkonzentration wurde anschließend die Plasmid-DNA eluiert. Nach

der Fällung der DNA mit Isopropanol und einmaligem Waschen mit 70%-igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und in Aqua_{bidest.} resuspendiert.

2.8. Bestimmen der DNA-Konzentration

Nukleinsäuren absorbieren aufgrund ihrer Basenzusammensetzung Licht zwischen einer Wellenlänge von 250 nm und 270 nm. Proteine absorbieren hingegen aufgrund ihrer Tyrosin- und Tryptophanreste am stärksten bei 280 nm. Zur Bestimmung der DNA-Konzentration und des Grades der Verunreinigung mit Proteinen wurden sich diese Eigenschaften zu Nutze gemacht.

Durchführung:

Die Messung der Absorption einer wässrigen DNA-Lösung gegen Aqua_{bidest.} erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm. Ein Maß für die Reinheit der DNA errechnet sich aus dem Quotient A_{260}/A_{280} , wobei ein Wert von 1,8 optimal ist. Werte kleiner als 1,8 weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin, während Werte größer als 1,8 auf das Vorhandensein von RNA schließen lassen. Eine DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht bei einer Schichtdicke von 1 cm und einer Wellenlänge von 260 nm einer Extinktion von 1, so dass sich die Konzentration der isolierten DNA nach folgender Formel errechnet:

$$A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times V = \text{DNA-Konzentration der Probe } [\mu\text{g/ml}]$$

A_{260} : Absorption bei 260 nm
V : Verdünnungsfaktor

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Photometer Ultraspec 3000 der Firma Pharmacia Biotech.

2.9. Verdau von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen

Der Verdau der DNA erfolgte mittels Typ II Restriktionsendonukleasen, die in der Lage sind, in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen beide Stränge eines DNA-Doppelstranges an spezifischen Erkennungssequenzen so zu schneiden, dass entweder überstehende 5'- bzw. 3'-Enden ("sticky ends") oder glatte Enden ("blunt ends") entstehen. Die durch Restriktion erhaltenen DNA-Fragmente können dann anhand ihrer Größe identifiziert und im Anschluß weiterverwendet werden.

Verwendete Lösungen:

"Blaumarker":

| | |
|----------------|--------------|
| Bromphenolblau | 0,25 % (w/v) |
| Glycerin | 50 % (v/v) |
| EDTA | 0,05 M |

Durchführung:

Zum Restriktionsverdau wurden jeweils 0,5 µg bis 1 µg der jeweiligen Plasmid-DNA, 1 U des entsprechenden Enzyms und 2 µl des vom Hersteller für die verwendeten Enzyme empfohlenen zehnfach konzentrierten Puffers eingesetzt. Der Reaktionsansatz wurde mit Aqua_{bidest.} auf 20 µl aufgefüllt und für maximal zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Da die Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsendonukleasen bei PCR-Fragmenten nur von zwei bis vier Basen flankiert werden, wurden diese Ansätze mit 5 U des entsprechenden Enzyms für zwei Stunden verdaut. Der Restriktionsverdau wurde durch Zugabe von 5 µl "Blaumarker" abgestoppt, indem das darin enthaltene EDTA die für die Restriktionsendonukleasen notwendigen Mg^{2+} -Ionen komplexiert.

2.10. "Polymerase Chain Reaction" - PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein In-Vitro-Verfahren, um spezifische DNA-Fragmente aus einem Pool von DNA selektiv zu amplifizieren. Die doppelsträngige DNA wird zunächst denaturiert, so dass sich die Primer an die 5'-Bereiche der zu amplifizierenden DNA anlagern können und als Startpunkt für die DNA-Polymerase dienen. Durch mehrmaliges Wiederholen von Denaturieren, Primer-Annealing und Primer-Elongation kommt es zur exponentiellen Vermehrung der DNA.

Durchführung:

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurden einem PCR-Ansatz die folgenden Komponenten zugesetzt:

| Komponenten | Endkonzentration |
|--|------------------|
| 10 x PCR-Puffer ohne MgCl ₂ | 1 x |
| Primer 1 | 20 pmol/μl |
| Primer 2 | 20 pmol/μl |
| dNTP-Mix | 0,2 mM |
| MgCl ₂ | 2,5 mM |
| Pfu-Polymerase | 1,25 U |
| „Template“-DNA | 50 ng |
| Aqua _{bidest.} | ad 50 μl |

Die hier verwendete hitzestabile Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* DSM3638 (Promega) besitzt neben der 5'-3'-Polymeraseaktivität auch eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität und arbeitet mit geringerer Fehlerrate als die herkömmliche Taq-Polymerase. Für eine optimale Funktion der Pfu-Polymerase muss die Extensionszeit auf zwei Minuten heraufgesetzt werden, da sie zur Synthese von 1 kb großen Fragmenten doppelt so lange braucht wie die herkömmliche Taq-Polymerase. Die PCR wurde in einem Thermocycler

Thermal Cycler PTC 200 der Firma Peltier durchgeführt. Zur Amplifikation der verschiedenen DNA-Fragmente wurden je nach Primer und Template-DNA im Verlauf dieser Arbeit unterschiedliche PCR Programme verwendet.

Primer PCR-Reaktion Amplifikation pp65-EGFP aus pTYB-PE (vgl. Tab.2.2.)

pTYB-PE-for:

5'-GGGAATTCAGCCACCATGATATCCGTACTGGGTCCCATTTC-3'

pTYB-PE-rev:

5'-CGAGCTCGCCGCGCCGCTTTACTTGT-3'

Primer PCR-Reaktion Amplifikation EGFP aus pEGFP-1 (vgl. Tab. 2.2.)

pEGFP-1-for:

5'-GGGAATTCACCCACCATGGTGAGC-3'

pEGFP-1-rev:

5'-CGAGCTCGCGCCGCTTTACTT-3'

PCR-Programm Amplifikation pp65-EGFP aus pTYB-PE

1. 3 Minuten 95°C;
2. 30 Zyklen aus 45 Sekunden 95°C, 45 Sekunden 67°C, 2 Minuten 72°C;
3. 10 Minuten 72°C
4. bis Weiterverarbeitung 4°C

PCR-Programm Amplifikation EGFP aus pEGFP-1

1. 3 Minuten 95°C;
2. 30 Zyklen aus 1Minute 95°C, 1 Minute 61°C, 1 Minute 72°C;
3. 10 Minuten 72°C
4. bis Weiterverarbeitung 4°C

2.11. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung geladener Moleküle im elektrischen Feld und basiert darauf, dass die DNA bei neutralem pH polyanionisch ist. Das Wanderungsverhalten ist dabei abhängig von der Nettoladung, der Größe und der Form der Nukleinsäuren, sowie von der Porengröße der verwendeten Matrix. Im Agarose-Gel wird die Porengröße durch die Menge an zugesetzter Agarose definiert und wirkt so als Molekularsieb.

Verwendete Lösungen:

50 x TAE-Puffer:

| | |
|------------------|--------|
| Tris/HCl (pH7,8) | 2 M |
| NaAcetat | 0,25 M |
| EDTA | 0,5 M |

Durchführung:

Zur Gelelektrophorese wurden standardmässig 1 %-ige Agarose-Gele in 1 x TAE-Puffer verwendet. Um Fragmente mit einer Größe zwischen 5000 bp und 10000 bp aufzutrennen, wurden 0,6 %-ige, um Fragmente bis zu 300 bp aufzutrennen 1,5 %-ige Agarose-Gele eingesetzt. Angefärbt wurde die DNA durch das in doppelsträngige DNA/RNA interkalierende Ethidiumbromid, welches mit einer Endkonzentration von 0,7 µg/ml der in 1 x TAE-Puffer gelösten Agarose zugesetzt wurde. Zur Markierung der Lauffront und Erhöhung der Dichte der DNA-Proben wurden diese mit 1/5 Volumen Blaumarker versetzt. Dabei entspricht das Wanderungsverhalten von Bromphenolblau einem doppelsträngigen linearisierten 300 bp-Fragment. Die Elektrophorese erfolgte bei 8 V/cm in 1 x TAE-Puffer. Die Anregung der DNA-Ethidiumbromid-Komplexe erfolgte unter UV-Licht, dieser ist daraufhin Licht emittierend. Zur anschließenden fotografischen Detektion diente ein

Bildverarbeitungssystem mit angeschlossenem Drucker Gel Print 2000i der Firma MWG Biotech.

2.12. Ligation von DNA-Fragmenten

DNA-Ligasen katalysieren die Bildung von Phosphodiester-Bindungen zwischen der freien 5'-Phosphatgruppe und der freien 3'-Hydroxylgruppe der DNA unter Verbrauch von ATP. Diese Reaktion ermöglicht die Klonierung von speziellen DNA-Fragmenten in einen mittels Restriktionsendonukleasen-Verdau geöffneten Vektor.

Durchführung:

Die zur Ligation eingesetzte DNA sowie der Vektor wurden mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut, über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels eines „Gel-Extraction“ Kits der Firma QIAGEN aus dem Gel eluiert (nach Anweisungen des Herstellers). Wurde bei dem Verdau von Plasmid-DNA mit zwei Enzymen gearbeitet, deren Schnittstellen kompatibel waren, so wurde 30 Minuten vor Beendigung des Verdaus noch 1 U alkalische Phosphatase zugesetzt. Dieses Enzym spaltet die 5'-Phosphatgruppen der DNA hydrolytisch ab und verhindert somit die Religation des Vektors. Der Ligationsansatz bestand aus 2 µl 10 x Ligationspuffer, 0,5 U T₄-DNA-Ligase, 250 ng Vektor-DNA und der entsprechenden Menge an Insert-DNA, die nach folgendem Schema bestimmt wurde:

$$\frac{\text{Vektor [ng]} \times \text{Insert-Größe [kb]}}{\text{Vektor-Größe [ng]}} \times \text{molare Verhältnis} \frac{\text{Vektor}}{\text{Insert}} = \text{Insert [ng]}$$

Das molare Verhältnis von Vektor zu Insert wurde je nach Ligation von 1:2 bis 1:5 variiert, um ein optimales Ergebnis zu erhalten. Der Ansatz wurde dann auf ein Endvolumen von 20 µl mit Aqua_{bidest.} aufgefüllt und über Nacht bei 14°C inkubiert. Zur Transformation wurden 2 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.13. Darstellung rekombinanter AcMNPV und Expression in Insektenzellen

Zur Herstellung rekombinanter replikationsfähiger Viren werden die SF158-Insektenzellen mit linearisierten *Autographa californica*-Bakulovirus der Firma BD Pharmingen (Bakulo-Gold-Vektor) und den Transfervektoren (siehe Tab. 2.2.) durch Lipofektion kotransfiziert. In den Insektenzellen kommt es zu homologer Rekombination beider Vektoren, da im Transfervektor geringe Anteile zu AcMNPV homologer Sequenzen flankierend zu den rekombinanten Genen enthalten sind. Die entstandenen rekombinanten Bakuloviren sind replikationsfähig und enthalten die rekombinanten Gene und geringe Anteile des Transfervektors.

Verwendete Lösungen:

Vektormix:

| | |
|---------------------------------|----------|
| Expressionsvektor-DNA | 0,5-1 µg |
| Bakulo-Gold-Vektor (Pharmingen) | 2 µl |
| in H ₂ O bidest. | ad 20 µl |

Lipofectin-Lösung:

| | |
|-----------------------------|---------|
| Lipofectin (Invitrogen) | 13,4 µl |
| in H ₂ O bidest. | 6,6 µl |

Durchführung:

Die Insektenzellen werden zu $1,5 \times 10^6$ pro Loch einer 6-Loch Kulturschale für eine Stunde kultiviert, mit TC-100 gewaschen und dann mit 1 ml TC-100 überschichtet. Der Vektormix und die Lipofectin-Lösung werden getrennt in 5ml-Polystyrenröhrchen angesetzt und dann zusammenpipettiert. Die Lösung wird für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss zu den Insektenzellen gegeben. Nach 24 h Inkubation in einer sterilen feuchten Kammer bei 27°C werden die Lipofektionsansätze mit je 2 ml

Insektenzellmedium aufgefüllt. Die Virusernte erfolgt nach 4-5 Tagen, nachdem sich Zellklumpen gebildet haben. Der Überstand wird abgenommen und mit 0,2 µm Sterilfiltern sterilfiltriert. Der Überstand dient zur Infektion einer 25 cm²-Zellkulturflasche mit 2,5x10⁶ SF158 in 5ml Medium. Nach 3-4 Tagen kann der Überstand der 25 cm² Flasche sterilfiltriert und zur Infektion einer 75 cm²-Flasche mit 1,0x10⁷ SF158-Zellen in 20 ml Medium benutzt werden. Nach 3-4 Tagen werde die Zellen aufgeschlossen (siehe 2.14.) und auf die Expression der rekombinanten Proteine durch SDS-PAGE (siehe 2.17.) mit anschließendem Semi-Dry Western Blot getestet (siehe 2.18.). Die Überstände werden benutzt, um rAcMNPV Einzelklone zu gewinnen (siehe 2.13.1.).

2.13.1. Plaque-Pick-Assay

Um einzelne Klone von rAcMNPV zu gewinnen und zu expandieren, bedient man sich einer Vereinzelnung der Viren durch Infektion von immobilisierten Monolayerkultur von Insektenzellen. Die Infektion kann bei durch Agarose immobilisierten Zellen nur über langsame Diffusion und Zell-Zell-Kontakt erfolgen, deshalb geht man davon aus, dass ein örtlich begrenzter Cytopathischer Effekt (Plaque) der Ausgangszelle und der unmittelbar benachbarten Zellen durch die Infektion eines infektiösen Partikels verursacht wurde. Die einzelnen Viren des Plaque können dann isoliert und expandiert werden. Die Durchführung erfolgt analog zum Plaque-Assay (siehe 2.13.3.). Nach der Neutralrotfärbung schließt sich dann die Isolierung und Expansion der rAcMNPV-Klone an.

Durchführung:

Die Infektion und Inkubation mit anschließender Neutralrotfärbung (siehe 2.13.4.) erfolgt analog zum Plaque-Assay. Für das Picken einzelner Plaques wird eine sterile Pasteur-Pipette benutzt, die man vorsichtig durch die Agarose zur Plaque treibt. Das Agarosestück wird in 500 µl Medium aufgeschüttelt und über Nacht bei 4°C gelöst, um das Virus ins Medium diffundieren zu lassen.

Zur Analyse der Klone werden 5×10^5 Insektenzellen in 6-Loch Kulturschalen eingesät und für zwei Stunden inkubiert, danach wird das Medium abgenommen und die Zellen mit 100 μ l der des Mediums mit Agarosestück überschichtet. Nach drei bis vier Tagen werden die Zellen aufgeschlossen (siehe 2.14.) und die Expression der rekombinanten Proteine durch SDS-Page (siehe 2.17.) mit anschließendem Semi-Dry Western Blot getestet (siehe 2.18.).

2.13.2. Herstellung von hochtitrigen AcMNP-Virusstocks

Die rekombinanten Baculoviren rAcMNPV wurden durch Infektion von SF158 Zellen vermehrt (St Angelo *et al.*, 1987). Zur Herstellung eines Stocks wurde die Zelllinie SF158 mit einer MOI von 0,1 mit dem rAcMNPV infiziert und für zwei bis vier Tage bei 27°C inkubiert. Danach wurde der Überstand der infizierten Zellen abgenommen, und nach Entfernen der Zellbestandteile durch einen 0,2 μ m Sterilfilter für die Infektion von SF158 bei -20°C gelagert. Die Charakterisierung der Virusstocks erfolgt mittels einer Expressionskinetik auf SF158 (siehe 2.13.5.). Für die Infektion humaner Zellen wurde der Überstand weiter durch Ultrazentrifugation über Nacht (100000g) aufkonzentriert und in PBS aufgenommen, erneut durch Ultrazentrifugation über Nacht (100000g) pelletiert und in Medium für Suspensionszellen (siehe 2.5.2.) aufgenommen. Die Charakterisierung der Virusstocks erfolgt mittels eines Plaque-Assays (siehe 2.13.3.).

2.13.3. Plaque-Assay

Die Anzahl infektiöser Viren innerhalb einer rAcMNPV-Suspension kann mithilfe der Quantifizierung von Plaqueformationen innerhalb einer immobilisierten Monolayerkultur von Insektenzellen ermittelt werden. Dabei macht man sich zunutze, dass die Viren im Laufe der Infektion in den infizierten Zellen einen Cytopathischen Effekt auslösen und die Zellen schließlich absterben. Die Infektion kann bei durch Agarose immobilisierten

Zellen nur über langsame Diffusion und Zell-Zell-Kontakt erfolgen. Beim Mikroskopieren der Insektenzellen können Plaques infizierter Zellen beobachtet werden, die granuliert und vergrößert erscheinen, der typische Cytopathische Effekt von rAcMNPV. Idealerweise wird ein Plaque in dieser immobilisierten Zellkultur von der Infektion eines infektiösen Partikels verursacht. Zur besseren Visualisierung der Plaques wird eine Lebendzellfärbung mit einer Neutralrotlösung durchgeführt, bei der abgestorbene Zellen ungefärbt bleiben. Die Plaques werden ausgezählt und in Relation zur Menge des zur Infektion eingesetzten rAcMNPV gesetzt. Dabei ergibt sich der Virustiter nach folgender Formel:

$$\text{pfu/ml} = (\text{P/V [ml]})/10^f$$

P: Plaqueanzahl

V: Infektionsvolumen der Virussuspension

f: Verdünnungsfaktor der Virussuspension

Zur Verbesserung der Genauigkeit der Titerbestimmung eines Virusstocks setzt sich das Ergebnis stets aus dem Mittelwert der Titerbestimmungen mit zwei unabhängigen Virus-Verdünnungsreihen zusammen.

Verwendete Lösungen:

Plaquing overlay Medium:

low melting Agarose 1 % (w/v)

in Medium für SF158 (siehe 2.5.2.)

Durchführung:

Von den Virusstocks werden in Insektenzellmedium (siehe 2.5.2.) zwei Verdünnungsreihen mit einem Endvolumen von 2,5 ml hergestellt. Die Insektenzellen SF158 werden in 3 ml in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in 6-Loch Kulturschalen ausgesät und für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Das Medium wird von den SF158 abgesaugt und die Zellen für eine Stunde bei

27°C mit 2 ml der Verdünnungen der Virusstocks inkubiert. Danach werden die Virusverdünnungen abgesaugt und die Zellen mit dem 37°C warmen Plaquing Overlay Medium überschichtet. Das Medium härtet bei Raumtemperatur für 10min aus. Die Inkubation der Zellen erfolgt desweiteren bei 27°C in einer feuchten Kammer. Nach 4-10 Tagen sind die Zellen zu 100 % konfluent und es lassen sich lichtmikroskopisch Plaques erkennen. Zu diesem Zeitpunkt erfolgt die Neutralrotfärbung (siehe 2.13.4.), um die Plaques makroskopisch darzustellen.

2.13.4. Neutralrotfärbung

Zur Verbesserung der Visualisierung der virusinduzierten Plaques in immobilisierten Monolayerkulturen von SF158 werden die lebenden Zellen mit Neutralrotlösung angefärbt. Das Neutralrot diffundiert durch das Plaquing Overlay Medium und wird dann über Nacht von den lebenden Zellen aufgenommen, so dass die toten Zellen in den Plaques mit bloßem Auge als heller Punkt sichtbar sind.

Verwendete Lösungen:

Neutralrotlösung:

Neutralrot 0,03 % (w/v)
in PBS (siehe 2.5.1.)

Durchführung:

Ein Milliliter der Neutralrotlösung wird für 2-3 Stunden bei 27°C auf jedes Loch der 6-Loch Platte mit den immobilisierten Insektenzellen gegeben. Danach wird der Überstand abgenommen. Die Kulturplatten werden umgedreht und bei Raumtemperatur in Dunkeln über Nacht inkubiert. Danach können die Plaques ausgezählt werden.

2.13.5. Expressionskinetik rekombinanter Proteine durch rAcMNPV infizierte SF158:

Da rAcMNPV nicht mit derselben Effizienz und Kinetik die Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen ermöglichen, wird der Zeitpunkt maximaler Proteinausbeute aus infizierten Zellen für jeden Virusstock vor der Herstellung großer Proteinmengen in der präparativen Expression (siehe 2.13.6.) bestimmt. Die Insektenzellen werden in 3ml in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in 6-Loch Kulturschalen ausgesät und für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Die Zellen werden dann mit einer MOI von 0,1 der rAcMNPV Virusstocks infiziert. Nach standardmäßig 24, 48 und 72 Stunden werden die Zellen aufgeschlossen (siehe 2.14.) und die Expression der rekombinanten Proteine durch SDS-Page (siehe 2.17.) mit anschließendem Semi-Dry Western Blot getestet (siehe 2.18.).

2.13.6. Präparative Expression rekombinanter Proteine mit rAcMNPV infizierten SF158

Insektenzellen werden in 30 ml in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml in acht 182 cm² Zellkulturflaschen eingesät und für zwei Stunden bei 27°C inkubiert. Die Zellen werden dann mit einer MOI von 0,1 der rAcMNPV-Virusstocks infiziert und für den in der Expressionskinetik (siehe 2.13.5.) ermittelten Zeitraum bei 27°C inkubiert. Danach werden die Zellen aufgeschlossen (siehe 2.14.), die Zellysate bei 10000g abzentrifugiert und die Überstände gepoolt. Aliquotiert werden die Lysate dann eingefroren bei -70°C gelagert.

2.14. Herstellen von Zellysaten

Zur Herstellung von Zellysaten wurden 1×10^6 Zellen zweimal mit PBS (siehe 2.5.1.) gewaschen. Im Anschluss wurden die pelletierten Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendes Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Die Fragmentierung der DNA erfolgte durch Inkubation der Zellysate für zehn Minuten im Ultraschallbad. Danach wurden die Zellwandtrümmer sechs Minuten bei 1.600 rpm abzentrifugiert.

2.15. Bestimmung der Proteinkonzentration von Lösungen

Im Laufe dieser Arbeit wurde zur Proteinkonzentrationsbestimmung in Lösungen ein Test der Firma Roth (Roti-Nanoquant) verwendet.

Das Prinzip des Tests nach Bradford beruht auf der Verschiebung des Adsorptionsmaximums von Coomassie-Brilliant-Blue G250 von 465nm auf 595nm unter Bindung von Protein. Der Quotient der Adsorption bei 595nm zu 465nm ist dabei proportional zur Proteinkonzentration der vermessenen Lösung. Nach Herstellen einer Eichgerade einer Standardproteinlösung bekannter Konzentration konnte so die Konzentration des zu testenden Proteins ermittelt werden. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt und die Adsorption an einem Photometer (Ultrospec 300/ Pharmacia Biotech) bestimmt.

2.16. Aufreinigung von Proteinen über Affinitäts-Chromatographie an immobilisierten Metall-Ionen (IMAC)

Zum Aufreinigen von Proteinen wurde im Verlauf dieser Arbeit eine Affinitäts-Chromatographie an Sepharose immobilisierten Kobalt-Ionen der Firma Becton Dickinson Clontech (TALON spin columns) durchgeführt. Unter physiologischem pH-Wert bindet Histidin über ionische Wechselwirkung des Stickstoffatoms seines Imidazolrings mit freien Orbitalen der Übergangsmetalle, wie Kobalt oder Nickel. Unter Senken des pH-Wertes kann

diese Bindung wieder gelöst werden. Proteinanhänge, sogenannte “Tags“ mit aufeinanderfolgenden Histidinen können so die Aufreinigung des Proteins über immobilisierte Sepharose gekoppelt mit Nickel- oder Kobalt-Ionen ermöglichen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben, wobei die Bindung der Proteine bei einem pH-Wert von 7,0 erfolgte und sie bei einem pH-Wert von 5,0 von der Säule gelöst wurden.

Verwendete Lösungen:

Bindungs-/Waschpuffer:

| | |
|---------------------------------|--------|
| Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,0) | 50 mM |
| NaCl | 300 mM |

Elutionspuffer:

| | |
|---------------------------------|--------|
| Natrium-Phosphatpuffer (pH 5,0) | 50 mM |
| NaCl | 300 mM |

2.17. Protein-Auftrennung durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die meisten Proteine binden nach Behandlung mit Reduktionsmitteln Natrium-Dodecylsulfat (SDS) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung/ Masse-Verhältnis (1,4g SDS/ g Protein in 1%iger SDS-Lösung). Beim Anlegen einer Spannung an eine poröse Matrix aus mit N`N`-Methyl-Bisacrylamid quervernetztem Acrylamid wandern die SDS-Protein-Komplexe daraufhin zur Kathode. Sie werden dabei abhängig von ihrem Stokes-Radius und damit von ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die SDS-Gelelektrophorese wurde mit einem Elektrophoresesystem der Firma BioRad durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

Laufpuffer:

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| Tris/HCl | 0,025 M |
| SDS | 0,1 % (w/v) |
| Glycin | 0,192 M |
| in H ₂ O _{dd} | |

2xProbenpuffer:

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Glycerol | 20 % |
| SDS | 4 % |
| Mercaptoethanol | 10 % |
| Tris (pH 6,8 mit HCl) | 0,125 % |
| in H ₂ O _{dd} | |

Trenngel (10 %):

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Trenngelstock | |
| (1,5 M Tris, 0,4% SDS (w/v), pH 8,8) | 1,25 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30%) | 1,66 ml |
| H ₂ O bidest. | 2,03 ml |
| 10% (w/v) Ammoniumpersulfat | 50 µl |
| TEMED | 5 µl |

Trenngel (12 %):

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Trenngelstock | |
| (1,5 M Tris, 0,4% SDS (w/v), pH 8,8) | 1,25 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30%) | 2,00 ml |
| H ₂ O bidest. | 1,70 ml |
| 10% (w/v) Ammoniumpersulfat | 50 µl |
| TEMED | 5 µl |

Sammelgel:

Sammelgelstock

| | |
|--------------------------------------|---------|
| (0,5 M Tris, 0,4% SDS (w/v), pH 6,8) | 1,25 ml |
| Acrylamid/Bisacrylamid (30%) | 0,66 ml |
| H ₂ O bidest. | 3,06 ml |
| 10% (w/v) Ammoniumpersulfat | 25 µl |
| TEMED | 5 µl |

Durchführung:

Beim Gießen des Gels wird Acrylamid mit N',N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt. Die Polymerisation wird durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (10% APS (w/v)) und Tetramethylethylen-diamin (TEMED) gestartet und katalysiert. Die Glasplatten werden in die Gießapparatur gespannt und das Trenngel bis 2 cm unter den Rand in den Zwischenraum gefüllt. Auf das auspolymerisierte Trenngel wird dann das Sammelgel geschichtet. In das Sammelgel wird ein Teflonkamm gesetzt, um Taschen für die einzelnen Proben im Gel zu erzeugen.

Vor dem Auftrennen werden die Proteinlösungen mit 2 x Probenpuffer versetzt und bei 94°C denaturiert, wobei die im Probenpuffer enthaltenen Detergenzien Mercaptoethanol und SDS stark reduzierend wirken und so die Disulfidbrücken der Proteine aufbrechen.

Zur Elektrophorese spannt man das Gel in eine Laufkammer und füllt ihr Pufferreservoir mit Laufpuffer, so dass ein Stromfluß von der Anode zur Kathode durch Gel und Puffer gewährleistet ist. In die Geltaschen werden dann 10-20 µl der Proteinlösungen (bis zu 15 µg Protein) eingefüllt. In eine der Geltaschen wird 5 µl Color-Marker der Firma BioRad (RainbowMarker) aufgetragen. Bei maximaler Stromstärke wird eine Spannung von 100 V eingestellt und nach Erreichen der Trenngelschicht auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese stoppt man nach ca. einer Stunde, wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hat.

2.17.1. Coomassie Blue-Färbung von Polyacrylamidgelen

Coomassie Blue färbt unspezifisch nahezu stöchiometrisch Proteine an. Während der Färbeprozedur diffundiert Coomassie Blue in das Polyacrylamidgel und kann so an die im Gel aufgetrennten Proteine binden. Bei der anschließenden Entfärbung wird nichtgebundenes Coomassie Blue aus dem Gel wieder ausgewaschen und die Proteine werden als blaue Banden vor einem klaren Hintergrund sichtbar.

Verwendete Lösungen:

Färbelösung:

| | |
|------------------------------|-------------|
| Isopropanol | 25 % (v/v) |
| Essigsäure | 10 % (v/v) |
| Coomassie Brilliant Blue 250 | 0,5 % (w/v) |

Durchführung:

Das Gel wird für 30 min bei Raumtemperatur in der Färbelösung auf dem Schüttler inkubiert. Nach Überführen des Gels in H_2O_{dd} wird es durch Erhitzen in der Mikrowelle entfärbt.

2.17.2. Proteintransfer durch Semi Dry Western-Blot

Bei Durchführung eines Western-Blots nach der Proteinauftrennung durch SDS-PAGE werden die durch gebundenes SDS stark negativ geladenen Proteine elektrophoretisch aus dem Trenngel auf eine Membran übertragen (z.B. Nitrozellulosemembran). Der Ausdruck "Semi Dry Blot" bezieht sich auf die speziell konzipierte Blot-Apparatur (BioRad), die im Gegensatz zum herkömmlichen "Naß-Blot" mit sehr wenig Transferpuffer auskommt. Die übertragenen Proteine binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Da die Immunreaktivität trotz

Immobilisierung weitgehend erhalten bleibt, können die Proteine danach immunologisch durch die Bindung spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Verwendete Lösungen:

Transferpuffer:

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Tris-HCl | 0,025 M |
| Glyzerin | 0,192 M |
| Methanol | 20 % (v/v) |
| in H ₂ O _{dd} | |

Ponceau-Färbelösung:

| | |
|-----------------------------------|-------------|
| Ponceau S | 2 % (w/v) |
| Essigsäure | 2,5 % (v/v) |
| in H ₂ O _{dd} | |

Durchführung:

Für den Proteintransfer wird das Trenngel der SDS-Gelelektrophorese und die Nitrozellulosemembran zunächst für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Der Aufbau des "Blot-sandwiches" erfolgt direkt in der Semi Dry Blotkammer. Die Anodenplatte wird mit in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren überschichtet und die Membran aufgelegt. Über die Membran wird das Trenngel der SDS-Gelelektrophorese geschichtet und nach einer weiteren Schicht von in Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren wird schließlich die Kathodenplatte darübergelegt. Das "Blot-sandwich" wird dann luftblasenfrei fixiert. Der Transfer erfolgt bei maximaler Stromstärke und 10 V angelegter Spannung für 45 Minuten. Nach dem Transfer kann man die immobilisierten Proteine durch Inkubation der Membran mit der Ponceau-Färbelösung anfärben. Dabei bindet Ponceau S reversibel an positiv geladene Aminogruppen der Proteine. Abschließend wird die Membran in Wasser entfärbt, dabei treten die Proteine als stärker gefärbte Bereiche hervor.

2.18. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Der immunologische Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen erfolgt mit Protein-spezifischen Antikörpern, die die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulosemembran binden. Diese werden wiederum mit IgG-spezifischen Peroxidase-gebundenen Zweitantikörpern gebunden. Durch eine Chemilumineszenzreaktion, die durch Peroxidase vermittelt wird, kann schließlich das Protein identifiziert werden.

Blockingpuffer:

Magermilchpulver 5 % (w/v)
in PBS (siehe 2.5.1.)

Durchführung:

Die Nitrozellulosemembran mit den gebundenen Proteinen wird in Blockingpuffer überführt und für 30 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzublocken. Die Membran wird danach für eine Stunde bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht mit einem spezifischen Erstantikörper in Blockingpuffer inkubiert.. Im Anschluss wird die Membran dreimal für jeweils fünf Minuten in PBS mit 0,1% Tween-20 gewaschen, um unspezifische Bindungen wieder zu lösen. Danach erfolgt für eine Stunde bei Raumtemperatur die Inkubation mit einem Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper. Abschließend wird die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBS-Puffer gewaschen.

2.19. Detektion von Proteinen mit der „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Reaktion

Die ECL-Reaktion stellt eine Nachweismethode für Peroxidase-gekoppelte Antikörperbindung im Western Blot dar. Die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase oxidiert das im ECL-Kit (ECLTM Western Blotting Detection Reagents) von Amersham Pharmacia Biotech vorhandene Substrat Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Das dabei angeregte Luminol fällt unter Lichtemission in den Grundzustand zurück. Das Licht ist visuell durch Auflegen eines grünlichtempfindlichen Films von Amersham Pharmacia Biotech (ECL-Hyperfilm) nachweisbar. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

2.20. Isolierung peripherer Blutzellen

2.20.1. Blutspender

Leukozyten-Konzentrate („buffy coats“) wurden von der Blutbank der Winterbergklinik in Saarbrücken zur Verfügung gestellt. Die Blutspender waren HIV-1-, HIV-2- sowie Hepatitis B- und -C-Virus-negativ.

2.20.2. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, "peripheral blood mononuclear cells") wurden aus Leukozyten-Konzentraten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation isoliert. "buffy coats" fallen bei der Herstellung von Blutkonserven durch Zentrifugation und Abnahme des Plasmas an und enthalten neben PBMC Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Die Konservenbeutel, in die das Blut abgenommen wird, enthalten Antikoagulantien, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Durchführung:

Der Inhalt eines "buffy coat" wurde zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. 15 ml Lymphocyte Separation Medium (=Ficoll, Dichte $1,077 \pm 0,001$ g/ml) wurden in einem 50 ml-Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml der verdünnten Suspension überschichtet. Um den Gradienten nicht zu zerstören, wurde 20 Minuten bei 1.800 rpm ohne Bremse zentrifugiert. Dabei trennten sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Die Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine hohe Dichte und sedimentieren während sich die PBMC in der Interphase zwischen Serum/PBS und Ficoll befinden. Da Thrombozyten die geringste Dichte besitzen sammeln sie sich im Überstand über der Zwischenschicht. Die PBMC-enthaltende Zwischenschicht wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Die Zellen wurden dreimal mit PBS

gewaschen, um Ficoll-Rückstände zu entfernen. Verbleibende Erythrozyten wurden entfernt, indem die PBMC zwischen den Waschschritten für ca. 15 Sekunden in 5 ml Aqua_{bidest.} resuspendiert und unmittelbar danach mit 45 ml PBS versetzt wurden. Diese Behandlung ermöglicht die selektive Lyse der Erythrozyten, während die PBMC intakt bleiben. Beim Aufnehmen der Zwischenschicht wird stets ein Teil des Überstandes mitüberführt, so dass die PBMC mit Thrombozyten verunreinigt sind. Um diese zu entfernen wurde am Ende ein Waschschriff mit 10-minütiger Zentrifugation bei 800 rpm durchgeführt. Das Pellet wurde in 30-50 ml RPMI mit 10 % FKS (Endotoxin < 5 EU/ml) aufgenommen und die Zellzahl im CASY[®] bestimmt (siehe 2.21.).

2.20.3. Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen

PBMC wurden mittels Adhärenz an Plastik weiter in unterschiedliche Zellpopulationen getrennt. Hierzu wurden die PBMC in einer Dichte von $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI mit 10 % FKS (Endotoxin < 5 EU/ml) aufgenommen. Pro 185 cm²-Zellkulturflasche wurden 20 ml dieser Zellsuspension zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärenen Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL, "peripheral blood lymphocytes") wurden abgenommen, mit PBS gewaschen und weiterverarbeitet. Die adhärenen Monozyten wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und durch Zugaben von Zytokinen zu DCs ausdifferenziert (siehe 2.22.).

2.21. Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY®

Die Zelldichte einer Kultur wurde routinemässig im "cell counter and analyser system" CASY® (Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Bei der Passage der Zellen durch eine Leitfähigkeitsmeßzelle bestimmt dieses Gerät die Änderung des Widerstandes in Abhängigkeit von der Zeit. Es verbindet computertechnisch die Widerstandsmessung mit der Signalauswertung über Pulsflächenanalyse. Bei der Messung ist die Fläche des gemessenen Impulses proportional zum Zellvolumen. Daher können gleichzeitig die Zelldichte und die Größenverteilung einer Zellpopulation analysiert werden.

Durchführung:

Zur Messung wurde eine Zellsuspension definierten Volumens 1:1000 oder 1:100 in der Elektrolytlösung (Casyton) verdünnt und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare bekannter Geometrie gesaugt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge der Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolatoren betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Unter der Voraussetzung, dass die Zellen die Kapillare einzeln passieren, ist diese Widerstandsänderung ein Maß für das Volumen der Zelle. Der Computer errechnet aus drei Messsignalen einen Mittelwert in Form eines Integrals, das dem Zelldurchmesser proportional ist. Das Ergebnis der Messung ergibt ein Histogramm, bei dem die relative Zellzahl gegen den Zelldurchmesser aufgetragen wird (Abb. 2.1.).

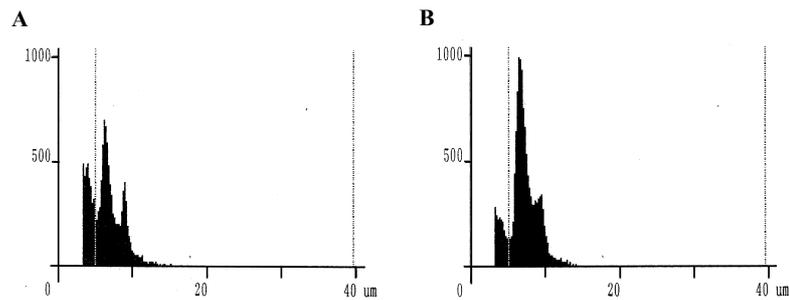


Abb. 2.1. Populationen der kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes nach Isolierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (A) und anschließender Adhärenz (B)

Dargestellt sind die Histogramme (A) von PBMC nach der Isolierung über einen Ficoll-Gradienten und (B) von Zellen (PBL) der entsprechenden Suspension nach Adhärenz an Plastik. Die Histogramme zeigen eine Auftrennung dreier Populationen anhand der relativen Zellgröße. Die Population mit der geringsten Größe umfaßt die Thrombozyten und Zellbruchstücke. Die mittlere stellt die Lymphozyten- und die rechte die Monozyten-Population dar. Nach der Adhärenz hat sich das Verhältnis deutlich zu Gunsten der Lymphozyten verschoben. Die Messung und Auswertung wurde mit Hilfe des "cell counter and analyser system" CASY® (Schärfe) durchgeführt.

Diese Methode wurde für die Bestimmung der Zellzahl der PBMC nach der Isolierung eingesetzt. Weiterhin konnte der Erfolg der anschließend durchgeführten Adhärenz über die relative Zellgröße bestimmt werden, da Lymphozyten einen kleineren Zelldurchmesser besitzen als Monozyten. Darüber hinaus wurde die Zellzahl aller anderen im Verlaufe dieser Arbeit benutzten Zellen mit Hilfe des CASY® bestimmt.

2.22. In-Vitro-Differenzierung von humanen Dendritischen Zellen

DCs kommen *in vivo* in zwei verschiedenen Reifungsstadien vor, als unreife DCs (iDCs) und reife DCs (mDCs). *In vitro* können diese Zellen aus CD34⁺ Vorläuferzellen oder aus CD14⁺ Monozyten differenziert werden. Im Verlaufe dieser Arbeit wurden iDCs aus CD14⁺ Monozyten durch Inkubation mit IL-4 und GM-CSF differenziert und unter Verwendung verschiedener Reifungsstimuli zu mDCs ausgereift.

Durchführung:

Die zur Differenzierung bzw. Reifung von DCs verwendeten Reagenzien sowie deren Konzentrationen sind in Tabelle 2.4. aufgeführt.

Tab. 2.4: Verwendete Reagenzien zur Differenzierung und Reifung von DCs

| Substanz | Beschreibung | Konzentration |
|---------------|--|---------------|
| GM-CSF | “granulocyte macrophage-colony stimulating factor” | 800 U/ml |
| IL-4 | Interleukin-4 | 40 U/ml |
| LPS | Lipopolysaccharide der Zellwand gram-negativer Bakterien | 100 ng/ml |
| IFN- α | Interferon-alpha2a | 1000 U/ml |

Zur Differenzierung von DCs wurden Monozyten in einer 185 cm²-Zellkulturflasche mit 20 ml RPMI zur Kultivierung von DCs (siehe 2.5.2) überschichtet. Die Zellen wurden sechs Tage bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am Tag drei wurden 5 ml des Mediums abgenommen und die darin enthaltenen Zellen sechs Minuten bei 1.200 rpm abzentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Aufnahme der Zellen in 5 ml frischem RPMI mit

insgesamt 4×10^4 U IL-4 und $2,8 \times 10^5$ U GM-CSF. Im Anschluss wurden die Zellen in die Zellkulturflaschen zurückgegeben. Am Tag sechs wurden die iDCs für weitere Versuche mit einer Dichte von 1×10^6 iDCs in 5 ml frischem Medium mit den oben angegebenen Cytokinen zur Kultivierung von DCs in 6-Lochplatten ausgesät. Die Ausdifferenzierung der iDCs zu mDCs erfolgte durch Kultivierung für zwei Tage mit den verschiedenen Stimuli bei 37°C und 5 % CO_2 .

2.23. In-Vitro-Stimulation primärer Zellen

Die Methode der In-Vitro-Stimulation primärer Zellen ermöglicht die simultane Quantifizierung und Charakterisierung von antigenspezifisch stimulierten CD4^+ und CD8^+ Gedächtnis- T Zellen direkt in humanem Vollblut, in PBMC oder DC-PBL-Fraktionen stimuliert (Sester et al., 2001; Sester et al., 2000; Tabi et al., 2001). Grundlage hierfür ist der intrazelluläre Nachweis der Zytokinproduktion in den aktivierten Zellen. Brefeldin A, eine aus *Penicillium brefeldianum* gewonnene Substanz, führt zur Zerstörung der Struktur und Funktion des Golgi-Apparates und somit zur Hemmung der Zytokinsekretion (Dinter and Berger, 1998). Dies ermöglicht nach Permeabilisierung der Zellen den intrazellulären Zytokin-Nachweis mittels Durchflußzytometrie.

Verwendete Lösungen:

FACS-Puffer

PBS (siehe 2.4.1)

FKS 5 % (v/v)

BSA 0,5 % (w/v)

Natriumazid 0,07 % (w/v)

Fixierlösung PBMC/PBL-DC:

PBS (siehe 2.4.1)

Paraformaledehyd 4 % (v/v)

2.23.1. Stimulation von T Zellen in humanem PBMC

Die PBMC-Stimulation bietet die Möglichkeit, eine Stimulation von Gedächtnis T-Zellen durch Antigenzugabe unter weitgehend physiologischen Bedingungen zu simulieren. Die PBMC gewinnt man aus Blut oder Blutkonserven (siehe 2.20.1.), die man über Dichtegradientenzentrifugation (siehe 2.20.2.) von Granulozyten, Erythrozyten und Serumbestandteilen gereinigt hat. PBMC enthalten dabei die meisten im Blut vorhandenen Zellen, wie B- und T-Lymphocyten, Makrophagen, DCs und Monozyten, die eine Stimulation beeinflussen können.

Durchführung:

Zur Durchführung der PBMC-Stimulation werden die Zellen in normalen Medium für Suspensionszellkultur (siehe 2.5.2.) aufgenommen. Pro FACS-Färbung benötigt man circa 5×10^5 PBMC, wobei pro Ansatz 2×10^6 PBMC für drei Färbungen stimuliert wurde (400 μ l Volumen). Bei der Stimulation von T-Zellen wurden die kostimulatorischen Antikörper α CD28 und α CD49d in einer Konzentration von jeweils 1 μ g/ml in ein 5 ml-Polypropylenröhrchen (trüb) vorgelegt und die PBMC zugegeben. Anschließend wurden die zu untersuchenden Substanzen in den im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen zugegeben. Um eine unspezifische Aktivierung auszuschließen, wurde ein Ansatz ohne jegliche Stimulation belassen. Für 30 Minuten wird bei 37°C im Brutschrank mit 5 % CO₂ inkubiert und die PBMC danach 5 min bei 1100 rpm abzentrifugiert, um Zell-Zell-Kontakte zu erleichtern. Die Ansätze wurden insgesamt sechs Stunden bzw. 24 Stunden aufrecht und mit lose angeschraubtem Deckel bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

Während der letzten vier Stunden der Inkubationszeit wurde Brefeldin A in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben

2.23.2. Stimulation von T Zellen durch autologe Dendritische Zellen

Analog zur beschriebenen Stimulation von T Zellen in PBMC (siehe 2.23.1.) können Gedächtnis T Zellen auch in PBL-Fraktionen durch Zugabe autologer DCs als Antigen-Präsentierende-Zellen aktiviert werden. Die PBL werden von PBMC durch Adhärenz gewonnen und bis zur Stimulation eingefroren (siehe 2.5.4.), die dabei gleichzeitig gewonnenen Monozyten werden über sechs Tage zu DCs ausdifferenziert (siehe 2.22.) und vor der Zugabe zu den PBL mit den Antigenen inkubiert.

Durchführung:

Zur Durchführung der PBL-Stimulation mit Dendritischen Zellen werden die PBL in normalen Medium für Suspensionszellkultur (siehe 2.5.2.) aufgenommen. Pro FACS-Färbung benötigt man circa 5×10^5 PBL, wobei pro Ansatz 2×10^6 PBL für drei Färbungen stimuliert wurde (400 µl Volumen). Bei der Stimulation von T-Zellen wurden die kostimulatorischen Antikörper α CD28 und α CD49d in einer Konzentration von jeweils 1 µg/ml in ein 5 ml-Polypropylenröhrchen (trüb) vorgelegt und die PBL zugegeben. Anschließend wurden die DCs im Verhältnis 1:10 und 1:1 (bezogen auf die T Zellen) zu den PBL gegeben. Um eine unspezifische Aktivierung auszuschließen, wurde ein Ansatz mit DCs inkubiert, die ohne Antigen vorbehandelt waren. Für 30 Minuten wurde bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert und die PBL mit den DCs (PBL-DC) danach 5 min bei 1100 rpm abzentrifugiert, um Zell-Zell-Kontakte zu erleichtern. Die Ansätze wurden insgesamt sechs Stunden aufrecht und mit lose angeschraubtem Deckel bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Während der letzten vier Stunden der Inkubationszeit wurde Brefeldin A in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben

2.23.3. Fixierung der Zellen aus PBMC und PBL-DC

Die Zellen wurden mit 2 mM EDTA versetzt und kräftig durchmischt. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 2 ml PBS mit 0,02 % EDTA hinzugefügt und die Ansätze abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen exakt fünf Minuten bei Raumtemperatur in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Der Fixiervorgang wurde durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer pro Ansatz abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und bis zur FACS-Färbung bei 4°C gelagert (siehe 2.24.3.).

2.24. Durchflusszytometrie

2.24.1. Allgemeines zur Durchflusszytometrie

Die Durchflußzytometrie oder „fluorescence activated cell sorting“ FACS-Analyse stellt eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften dar. Während des Meßvorgangs werden die Zellen durch Überdruck stark beschleunigt, so dass sie beim Eintreten in die Meßkammer vereinzelt und am Meßpunkt fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Durch gleichzeitige Messung des Vorwärts- und des 90°-Seitwärtsstreulichtes wird die relative Zellgröße beziehungsweise die relative Zellgranularität von Einzelzellen bestimmt, wobei sowohl die Granularität als auch die Größe direkt mit der Lichtintensität korreliert sind (Abb. 2.2.). Die Einheit der FACS-Analyse ist somit die relative Lichtintensität. Diese Darstellung erfolgt mit Hilfe eines sogenannten Punktwolkendiagramms, „dot blot“, bei dem die beiden Werte gegeneinander aufgetragen werden. Mit Hilfe eines „gates“ ist es weiter möglich, die zu analysierende Zellpopulation weiter einzugrenzen (Abb. 2.2.).

Die zu untersuchenden Zellen werden entweder direkt mit spezifischen monoklonalen mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugierten Antikörpern oder mit spezifischen Antikörpern, gefolgt von fluoreszenzgekoppelten Anti-Immunglobulinen, markiert. Mit Hilfe eines Argon-Lasers, der Licht mit einer

Wellenlänge von 488 nm generiert, werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und das jeweils emittierte Licht schließlich über ein optisches System gemessen. Der Meßbereich in der FACS-Analyse gliedert sich in 1024 Kanäle, in welche die Zellen nach unterschiedlicher Expression der Oberflächenantigene, die sich in der Intensität der Fluoreszenz widerspiegelt, eingeteilt werden. Die Ergebnisse der Messungen wurden durch Erstellen von Histogrammen beziehungsweise Punktwolkendiagrammen der Fluoreszenz 1 für FITC (Fluorescein-Isothiocyanat) und „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP), Fluoreszenz 2 für PE (Phycoerythrin) und Fluoreszenz 3 für PE-Cy5 (Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin 5) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson benutzt. Die Messung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des CellQuest™ Programm Version Mac App^R 3.0.1.

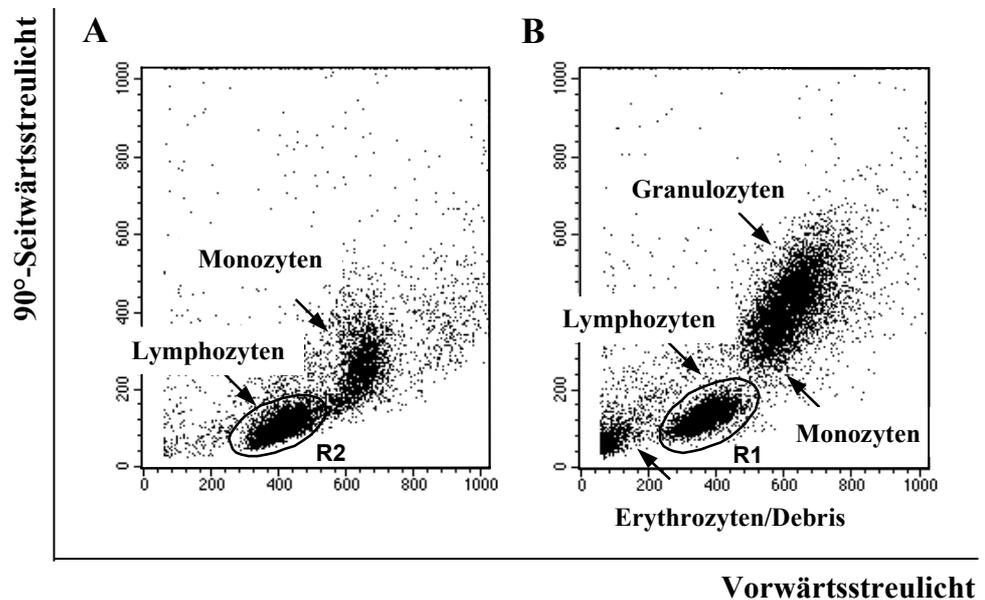


Abb. 2.2. Darstellung der Größe und Granularität von PBMC (A) und Vollblut (B) im Punktwolkendiagramm ("dot plot")

Das Vorwärtsstreulicht (FSC) korreliert mit der Größe der Zellen, während das 90°-Seitwärtsstreulicht (SSC) proportional zur Granularität der Zellen ist. Aufgrund dieser Eigenschaften lassen sich gemischte Zellpopulationen durch das Setzen von Analysefenstern, sogenannten "gates", in einzelne Populationen unterteilen und getrennt analysieren. Hier wurde jeweils die Lymphozytenpopulation mit dem "gate" R2 bzw. R1 markiert.

Die in Abbildung 2.3. dargestellten Histogramme zeigen am Beispiel der CD4-Expression von Monozyten und Lymphozyten, dass das Eingrenzen der zu analysierenden Zellpopulation mit Hilfe eines "gates" essentiell für eine korrekte Analyse der FACS-Rohdaten ist (siehe Abb. 2.2.). Bezüglich der CD4-Expression besteht die gesamte Zellsuspension der PBMC aus drei Zellpopulationen (Abb. 2.3.(A)). Zellen unterhalb einer Fluoreszenzintensität von ca. zehn sind CD4-negativ, während die Population mit einer mittleren Fluoreszenzintensität aus Monozyten besteht. Die Population mit der hohen CD4-Expression wird von den Lymphozyten gebildet. Werden die Monozyten, wie in Abbildung 2.2.(A) gezeigt, aufgrund ihrer Größe bei der Analyse ausgeschlossen, indem die Lymphozyten in "gate" R2 erfaßt werden, verschwindet die Monozytenpopulation im Histogramm der CD4-Expression nahezu vollständig (Abb. 2.3.(B)).

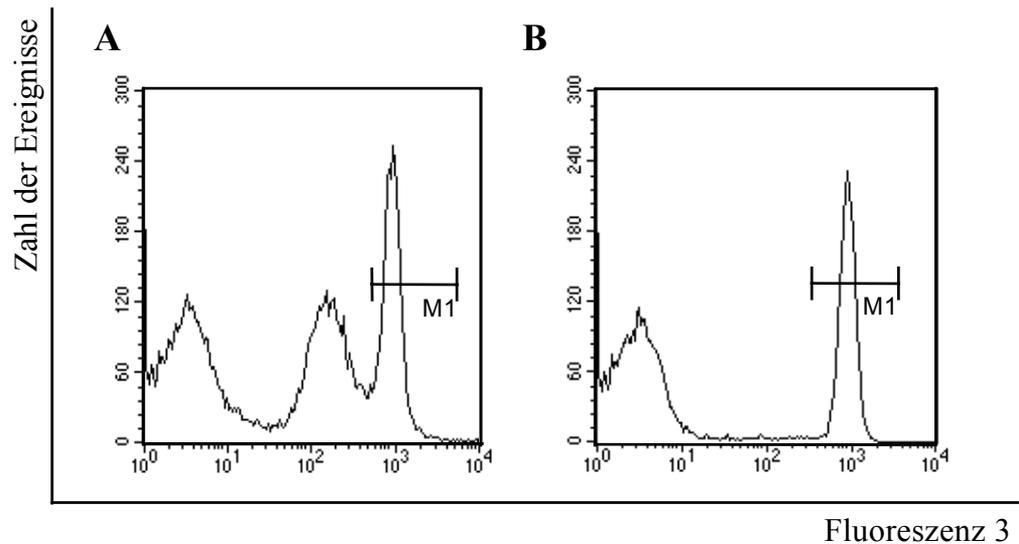


Abb. 2.3. Vergleich der CD4-Expression in PBMC und in der Lymphozytenpopulation

PBMC wurden mittels α CD4-PE-Cy5-Antikörpern gefärbt. Die CD4-Expression der PBMC (**A**) und der in "gate 2" (R2) in Abb. 2.2 eingefassten Lymphozytenpopulation (**B**) wurde als Histogramm der Fluoreszenz 3 dargestellt. Durch das Setzen von "Markern" (M1) läßt sich eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils und der Fluoreszenzintensität der Population berechnen.

Die Auswertung der Expression zweier verschiedener Moleküle in einer Zellpopulation erfolgt mit Hilfe eines "dot plot", bei dem die beiden Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen werden. Durch das Setzen eines Quadranten können die einzelpositiven von den doppelpositiven Zellen getrennt analysiert werden (Abb. 2.4.(A)). Dieselbe FACS-Analyse ist in Abbildung 2.4.(B) in Form eines "contour plot" gezeigt. Diese Darstellungsmethode erleichtert die Eingrenzung nahe beieinander liegender Populationen. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit benutzten Gerät ist es möglich, drei Fluoreszenzen parallel in einem Ansatz zu verwenden.

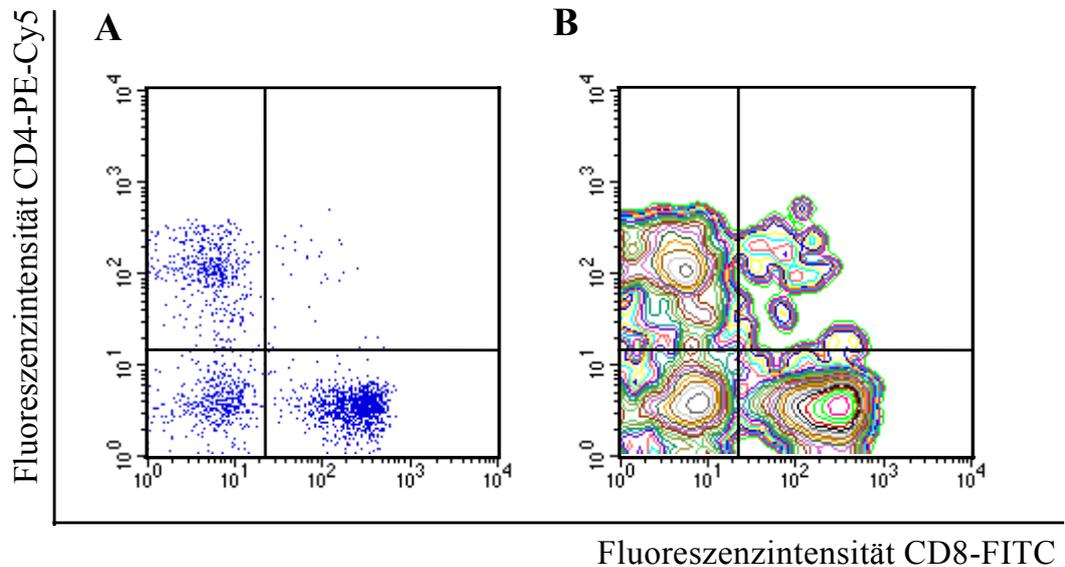


Abb. 2.4. Darstellung der CD4- und CD8-Expression auf Lymphozyten am Beispiel eines Punktwolkendiagrammes beziehungsweise eines "contour plots"

Die Zwei-Kanal-Analyse in Form eines "dot plot" (A) bzw. in Form eines "contour plot" (B) zeigt die Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 auf PBMC. Der Einsatz eines Quadranten ermöglicht die statistische Analyse der einzelnen Zellpopulationen bezüglich ihres prozentualen Anteils und Fluoreszenzintensität.

Die Analyse von iDCs bzw. mDCs erfolgte, indem die Grösse gegen die Granularität aufgetragen und ein „gate“ über die Population der lebenden Zellen gesetzt wurde (Abb. 2.5.(A)). Die Oberflächenexpression der verschiedenen Antigene wurde direkt mit PE oder FITC markierten Antikörpern untersucht. Die Darstellung erfolgte in einem Histogramm. Zusätzlich wurden unmarkierte Zellen als Negativkontrolle über das eigentliche Histogramm gelegt, um die Zellen eindeutig als positiv identifizieren zu können (siehe Abb 2.5.(B)). Durch das Setzen eines "Markers" lässt sich dann eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils und der Fluoreszenzintensität der Population berechnen.

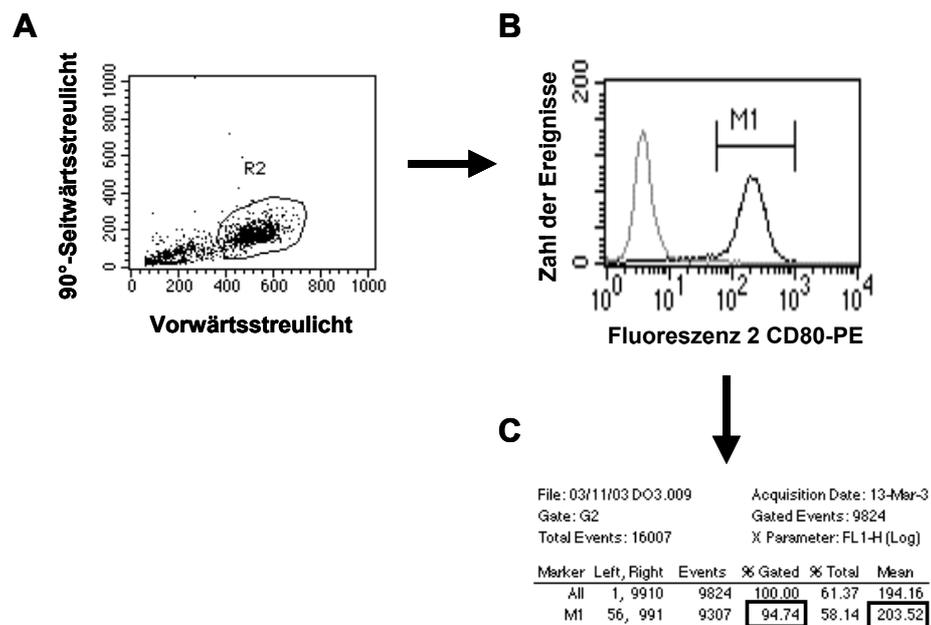


Abb. 2.5: Darstellung der Größe und Granularität von mDCs (A), der Expression von CD80 innerhalb der mDCs Population (B) und der statistischen Auswertung (C)

Bei der Darstellung der Größe gegen die Granularität können mit Hilfe eines „gates“ nur die lebenden mDCs in die Messung eingeschlossen werden (A). Innerhalb der Population wurden als Histogramm die CD80-positiven Zellen dargestellt, zusätzlich wurde als Negativkontrolle das Histogramm von unmarkierten Zellen darüber gelegt (B). Durch das Setzen eines Markers (M1) lässt sich eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils und der Fluoreszenzintensität der Population berechnen (C). In diesem Fall sind 94,74 % der mDCs CD80 positiv und exprimieren CD80 mit einer Intensität von 203,52.

Zur Auswertung der Histogramme wurde der prozentuale Anteil an Oberflächenantigen-positiven Zellen oder der "mean", die mittlere Fluoreszenzintensität benutzt. Der "mean" ist der Kanal, bei dem die Summe aller Punkte geteilt durch die Zahl an Ereignissen berechnet wird. Gezählt wurden in der Regel 30.000 Ereignisse, mindestens jedoch 5.000. Bei

Zellpopulationen, die über ein Analysefenster ausgewertet wurden, standen mindestens noch 5000 Zählereignisse für eine Analyse zur Verfügung.

2.24.2. Färbung von Oberflächen-Antigenen zum durchfluß-zytometrischen Nachweis

Um Proteine an der Zelloberfläche nachweisen zu können, können Zellen direkt lebend mit Protein-spezifischen Antikörpern gefärbt werden. Alternativ kann allerdings ebenfalls ein Nachweis auf fixierten Zellen erfolgen.

Verwendete Lösungen:

FACS-Puffer

PBS (siehe 2.5.1)

FKS 5 % (v/v)

BSA 0,5 % (w/v)

Natriumazid 0,07 % (w/v)

Fixierlösung (FACS-FIX)

NaCl 8,5 g/l

Paraformaldehyd (1 %) 10 g/l

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Durchführung:

1×10^5 bis 1×10^6 der zu untersuchenden Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit PBS mit 10 % FKS oder FACS-Puffer (siehe 2.23.) gewaschen. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen, und die Zellen wurden in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die benötigten Mengen an Antikörpern wurden in Vorexperimenten durch Titration bestimmt. Nach Zugabe der erforderlichen Antikörper wurde der Ansatz gründlich

gemischt und 30 bis 60 Minuten lang auf Eis im Dunkeln inkubiert. Bei fixierten Zellen erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln. Anschließend wurden die Zellen in PBS mit 10 % FKS oder FACS-Puffer gewaschen. Wurde während des ersten Färbeschrittes ein unmarkierter Antikörper verwendet, so folgte nun eine weitere Inkubation mit einem markierten Zweitantikörper. Nach erneutem Waschen der Zellen wurden diese in 100 µl Fixierlösung aufgenommen. Die fixierten Zellen konnten bis zur FACS-Analyse für mehrere Tage im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt werden.

2.24.3. Färbung von intrazellulären Antigenen zum durchflußzytometrischen Nachweis

Um intrazelluläre Proteine nachweisen zu können, ist eine Permeabilisierung der Zellmembran fixierter Zellen notwendig, die dem Antikörper den Eintritt in die Zelle ermöglicht. Hierzu wurde Saponin, ein aus der Rinde des Baumes *Quillaya saponaria* stammendes Protein, verwendet, welches in der Lage ist, die Zellmembran zu permeabilisieren ohne die Morphologie der Zellen zu beeinflussen (Jacob *et al.*, 1991).

Durchführung:

Fixierte Zellen wurden in 2 ml FACS-Puffer mit 0,1 % Saponin resuspendiert und genau 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz sechs Minuten lang bei 1.600 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Antikörper wurden direkt in die verbleibende Flüssigkeit pipettiert, und die nachfolgende Färbung wurde, wie unter 2.24.2. beschrieben, durchgeführt. Zentrifugationsschritte mit fixierten Zellen wurden grundsätzlich bei 1.600 rpm durchgeführt.

2.25. Fluoreszenzmikroskopie

2.25.1. Färbung von intrazellulären Antigenen zum fluoreszenz-mikroskopischen Nachweis

Bei der von Coons (Weller and Coons, 1954) entwickelten Methode wird die Nachweisempfindlichkeit fluoreszenzmikroskopischer Methoden mit der strengen Spezifität einer Antikörperbindung verbunden. Somit lassen sich Antigene im Gewebe oder innerhalb von Zellen lokalisieren. Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet dabei ein Antigen-spezifischer Antikörper an das Antigen, der in einer darauffolgenden Reaktion von einem IgG-spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper gebunden wird. Mithilfe von strukturspezifischen Farbstoffen oder anderen spezifischen Antikörpern kann so das Antigen in der Zelle lokalisiert werden.

Verwendete Lösungen:

Fixierlösung

Paraformaldehyd (4 %) 40 g/l
in PBS (siehe 2.5.1.)

Der pH-Wert wurde mit 1 N NaOH auf 7,4 eingestellt.

Permeabilisierungslösung

Triton X 100 0,2 % (v/v)
PBS (siehe 2.5.1)

Blockierlösung

FKS 10 % (v/v)
PBS (siehe 2.5.1.)

Durchführung:

Die Zellen wurden auf Silan-beschichtete Objektträger adhärirt. Nach einmaligem Waschen in PBS wurden die Zellen in der Fixierlösung für 20 Minuten fixiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen dann für 20 Minuten mit der Permeabilisierungslösung auf Eis inkubiert. Daraufhin erfolgte nach erneutem Waschen das Blockieren unspezifischer Bindungsstellen innerhalb der Zellen mit der 30 minütigen Inkubation der Blockierlösung bei Raumtemperatur. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen dann mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper in Blockierlösung unter Lichtabschluss für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen durch jeweils 3 minütiger Inkubation in 70%, dann 80% und schließlich 100% Ethanol in H₂O dehydratisiert. Daraufhin erfolgte die Fluoreszenzmarkierung der Zellkerne (siehe 2.25.1.)

2.25.2. Fluoreszenzmarkierung von Zellkernen

Zum Markieren der Zellkerne von fixierten Zellen wurde „VECTASHIELD[®] mounting medium with DAPI“ der Firma Vector Laboratories verwendet. Das darin enthaltene Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) besitzt eine hohe Affinität zu Nukleinsäuren und ist in der Lage, die Zellmembranen zu durchdringen. Die durch indirekte Immunfluoreszenz (siehe 2.25.) gefärbten Zellen wurden mit einem Tropfen des „VECTASHIELD[®] mounting medium with DAPI“ überschichtet. Zur Versiegelung wurden die Zellen mit dem Deckgläschen bedeckt. Die so behandelten Zellen konnten bis zur Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop bei 4°C gelagert werden.

2.25.3. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen

Die Mikroskopie wurde mit einem Leica DM IRB/E (Institut für Virologie, Universitätskliniken Homburg)) durchgeführt. Die Dokumentation erfolgte mit einer Digitalkamera AxioCam Color der Firma Zeiss, die Auswertung mittels der AxioVision 3.0 Dokumentations-Software der Firma Zeiss.

3. *Ergebnisse*

3.1. **Rekombinantes „*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus“ (AcMNPV) als Genvektor zur Expression von Antigenen in Dendritischen Zellen**

Das „*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus“ (AcMNPV) besitzt ein zirkuläres doppelsträngiges DNA-Genom von ungefähr 130000 Basen Länge, das mit einem Protamin- ähnlichen Protein zum „Core“ des Virions kondensiert ist und im Nukleokapsid verpackt vorliegt. Die Nukleokapside werden in den Kernen der infizierten Zellen synthetisiert und membranumhüllt als Virionen aus der Cytoplasmamembran ausgeschleust („budded virus“). Spät in der Infektionsphase werden die Nukleokapside dagegen auch im Kern von einer Matrix aus Polyhedrin umhüllt und bilden so "occlusion-derived viruses" (ODVs), die durch Zellyse freigesetzt werden. ODVs werden nach Aufnahme mit der Nahrung durch Alkalisieren im Mitteldarm von Lepidopterenlarven vom Polyhedrin gelöst und infizieren daraufhin die Epithelzellen. Die „budded viruses“ (BVs) sind dagegen verantwortlich für die systemische Infektion der Insekten und beherbergen in ihrer Membranhülle dazu das vom Virus codierte Glykoprotein gp64.

Rekombinantes AcMNPV wird in der Forschung als Vektor zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen benutzt (Hu, 2005). Da bei ihnen das Polyhedringen deletiert ist, können rAcMNPV nur BVs bilden. 1983 wurde erstmals eine Infektion von Säugerzellen mit rAcMNPV beobachtet (Volkman & Goldsmith, 1983). Die Infektion wird dabei wie bei der Infektion von Insektenzellen durch gp64 vermittelt. Eine Infektion von Säugerzellen mit rAcMNPV, dessen Gene unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors stehen, führt zu einer effizienten Expression (Boyce & Bucher, 1996; Hofmann *et al.*, 1995).

Rekombinantes AcMNPV ist in der Lage, in Mäusen antigenspezifische Immunantworten zu induzieren (Aoki *et al.*, 1999; Facciabene *et al.*, 2004; Huser *et al.*, 2001). Die Infektion mit AcMNPV schützt Mäuse außerdem antigen-unabhängig vor einer Infektion mit Enzephalomyokarditis- oder Influenza-Viren (Abe *et al.*, 2003; Gronowski *et al.*, 1999). Wahrscheinlich wird dies unter anderem durch die Freisetzung von Typ-I Interferonen und TNF- α , sowie IL-1 α und IL-1 β in infizierten Zellen ausgelöst (Beck *et al.*, 2000; Gronowski *et al.*, 1999). AcMNPV führt darüber hinaus zu einer antigen-unabhängigen Aktivierung von DCs (Schuetz *et al.*, zur Publikation eingereicht). Bei der In-Vivo-Immunisierung durch rAcMNPV könnte die unspezifische Aktivierung des Immunsystems allerdings auch unerwünschte Nebeneffekte auslösen, wie beispielsweise Schädigung von Körperzellen oder Durchbrechen von Toleranz (Hu, 2005).

Bei der Nutzung von rAcMNPV als Genvektor für eine DNA-Immunisierung ist bislang ungeklärt, ob rAcMNPV DCs direkt infiziert oder ob Proteine rAcMNPV-infizierter Körperzellen cross-präsentiert werden (Aoki *et al.*, 1999; Facciabene *et al.*, 2004; Huser *et al.*, 2001). Dies wäre vor allem hinsichtlich der Nutzung von rAcMNPV bei Immunisierungen von Bedeutung, die auf direkter Infektion von DCs beruhen. Dementsprechend wurde im vorliegenden Teil der Arbeit untersucht, ob rAcMNPV in der Lage ist, humane DCs zu infizieren.

3.1.1. Darstellung und Charakterisierung rekombinanter AcMNPV

Da rAcMNPV in der Forschung seit langem zur Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen eingesetzt wird, stehen eine Fülle von Systemen zur Darstellung rAcMNPV zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurde das Bakulo-Gold-Vektor-Kit der Firma BD Pharmingen verwendet. Er enthält ein linearisiertes Virusgenom, das eine Deletion des Polyhedringens aufweist.

Die rekombinanten Gene werden in so genannte Transfervektoren ligiert, in denen flankierend zu den rekombinanten Genen geringe Anteile AcMNPV-

homologer Sequenzen enthalten sind (Abb. 3.1.1. (1)). In den Insektenzellen kommt es nach Kotransfektion von Transfervektor und linearisiertem Virusgenom zu homologen Rekombinationen (Abb. 3.1.1. (2)). Dadurch entsteht vielfach ein zirkuläres rAcMNPV-Genom. Es enthält die rekombinanten Gene und geringe Anteile des Transfervektors (Abb. 3.1.1. (3)). Durch Budding gelangen Viren, die das rekombinante Genom enthalten, in den Zellkulturüberstand. Dieser wird im Plaque-Pick-Assay (Abb. 3.1.1. (4)) (siehe 2.13.1.) zur Gewinnung rAcMNPV-Klone herangezogen. Nach Überprüfung der Expression dieser Klone werden diese durch Neuinfektion von Insektenzellen expandiert. Die hochtitrigen Virusstocks werden dann durch Bestimmung des Virustiters im Plaque-Assay charakterisiert (Abb. 3.1.1. (5)) (siehe 2.13.3.). Zur Infektion von Säugierzellen werden die hochtitrigen Virusstocks in Säugierzellmedium oder PBS aufgenommen. Dazu müssen sie zunächst pelletiert werden. Nach einmaligem Waschen in PBS und erneutem Pelletieren wird das Virus in 1/10 des ursprünglichen Volumens in Säugierzellkulturmedium aufgenommen. So erreicht man neben einer Umpufferung auch eine Aufkonzentrierung des Virus. Die erhaltenen Virusstocks wurden erneut im Plaque-Assay quantifiziert und enthielten 10^7 - 10^9 „plaque-forming units“ (Pfu)/ml rAcMNPVs.

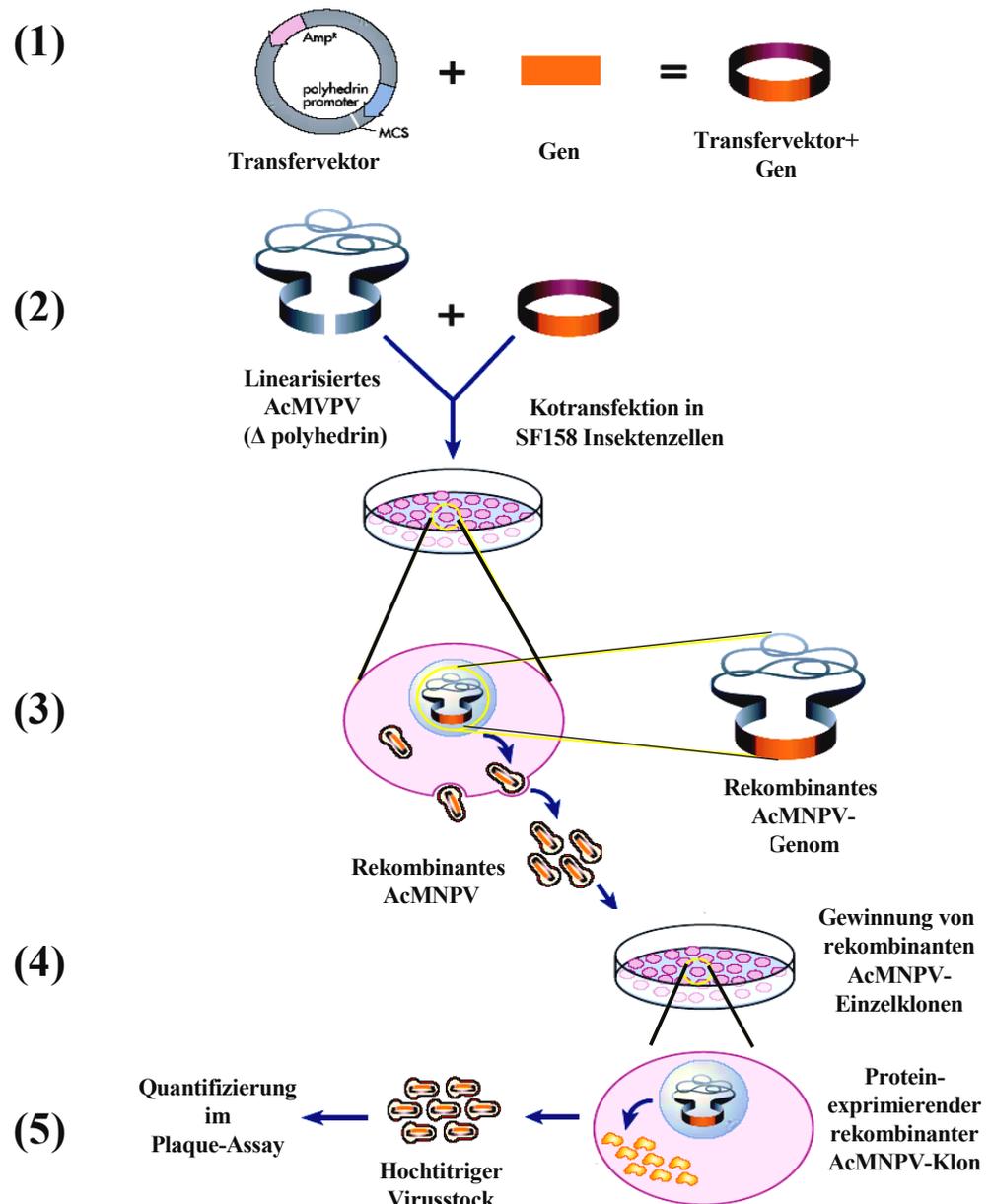


Abb. 3.1.1. Übersicht über die Darstellung rekombinanter AcMNPV

Nach Einbringen der Gene in die Transfektoren (1) wird über homologe Rekombination nach Kotransfektion eines linearisierten AcMNPV-Genoms (Δ polyhedrin) in SF158-Insektzellen (2) ein rekombinantes AcMNPV (rAcMNPV) hergestellt (3). Dies wird über Budding aus der Zelle geschleust und infiziert wiederum weitere SF158-Insektzellen. Im Plaque-Pick-Assay werden einzelner Virusklone isoliert (4), die schließlich zur Herstellung eines hochtitrigen Virusstocks herangezogen und im Plaque-Assay quantifiziert werden (5) (siehe 2.13.).

3.1.2. Expression von EGFP-Reportergens in rAcMNPV-infizierten Säugerzellen

Eine Infektion von Säugerzellen mit rAcMNPV, dessen Gene unter der Kontrolle eines eukaryontischen Promotors stehen, führt zu einer effizienten Expression (Boyce & Bucher, 1996; Hofmann *et al.*, 1995). Bisher konnten zahlreiche Zelllinien humanen Ursprungs oder die anderer Säuger *in vitro* mit rAcMNPV transfiziert werden (Kost & Condreay, 2002; Leisy *et al.*, 2003). Neben der Infektion von mitotisch aktiven Zellen konnte auch eine Infektion mitotisch inaktiver Zellen und primärer Zellen durch rAcMNPV *in vitro* gezeigt werden (Ho *et al.*, 2004; Ho *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2000; Sarkis *et al.*, 2000; van Loo *et al.*, 2001; Wagle & Jesuthasan, 2003). Bei der Nutzung von rAcMNPV als Genvektor für eine DNA-Immunisierung ist bislang ungeklärt, ob rAcMNPV DCs direkt infiziert oder ob Proteine rAcMNPV-infizierter Körperzellen cross-präsentiert werden (Aoki *et al.*, 1999; Facciabene *et al.*, 2004; Huser *et al.*, 2001).

Um aufzuklären, ob humane DCs durch rAcMNPV infiziert werden können, wurde ein rekombinantes AcMNPV hergestellt, dessen EGFP-Reportergen unter der Kontrolle des HCMV-„immediate early“ (IE) Promotors gestellt wurde. Der HCMV-IE Promotor ermöglicht die Expression in einer Vielzahl von Säugerzellen, darunter auch in humanen DCs (Linette *et al.*, 2000; Mangeot *et al.*, 2000). Dazu wurde aus dem pEGFP-C1 Plasmid der Firma BD-Clontech der HCMV-IE-Promotor mitsamt dem EGFP-Gen über das Restriktionsenzym *Nsi*I ausgeschnitten und in den mit dem Restriktionsenzym *Pst*I linearisierten Transfervektor pAcYMT der Stammsammlung des Instituts für Virologie in Homburg ligiert. Dieser diente zur Herstellung eines rAcMNPV, des so bezeichneten AcpC-EGFP (vgl. 3.1.1.). Zur Kontrolle der Promoterspezifität diente ein rekombinantes AcMNPV, dessen EGFP-Reportergen unter Kontrolle des nur in Insektenzellen funktionellen Promotors für Polyhedrin gestellt war, das AcpP-EGFP (Knebel & Doerfler, 1987) (siehe Tab. 2.3.) (Abb. 3.1.2.).

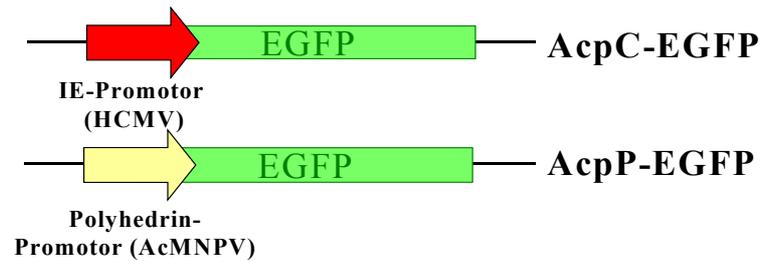


Abb. 3.1.2. Verwendete rekombinante AcMNPVs

Das AcpC-EGFP-Virus beherbergt das EGFP-Reportergen unter der Kontrolle des HCMV-„immediate early“ (IE) Promotors. Dieser ermöglicht die Expression des Reportergens in Säugerzellen. Im Vergleich dazu beherbergt AcpP-EGFP das EGFP-Reportergen unter Kontrolle des nur in Insektenzellen funktionellen Promotors für Polyhedrin.

Im Blut sind nur geringe Mengen DCs zu finden, da sie hauptsächlich in der Peripherie und in den lymphatischen Organen lokalisiert sind (Janeway *et al.*, 2001). Zur Untersuchung an humanen DCs wurden daher CD14⁺ Monozyten mit GM-CSF und IL-4 innerhalb von sechs Tagen zu iDCs differenziert. Diese iDCs haben eine hohe endozytotische und geringe T Zell-stimulatorische Kapazität. Durch verschiedene inflammatorische Zytokine können sie innerhalb von zwei Tagen zu T Zell-stimulatorischen mDCs ausgereift werden. Zur Bestimmung des Reifungsstadiums wurden im Verlauf dieser Arbeit phänotypische Charakteristika der iDCs bzw. mDCs herangezogen. Die DCs besitzen je nach Aktivierungsstatus typische Expressionsmuster verschiedener Oberflächenantigene. Die Oberflächenantigene CD1a und CD14 dienen zur Bestimmung des Reinheitsgrades der untersuchten DC-Populationen. CD1a vermittelt die Präsentation von Lipid-Antigenen und wird sowohl auf iDCs als auch auf mDCs stark exprimiert (Blumberg *et al.*, 1995; Brigl & Brenner, 2004; Pena-Cruz *et al.*, 2003). CD14 ist ein charakteristischer Marker für Monozyten, wird aber nach erfolgter Differenzierung zu DCs vollständig herunterreguliert (Caux *et al.*, 1996; Palucka *et al.*, 1998). Darüber hinaus wurde durch Bestimmung der CD3- und CD19-Expression in den DC-Populationen eine Verunreinigung mit T Zellen bzw. B Zellen ausgeschlossen

(Moretta *et al.*, 1989; Tedder *et al.*, 1994). Weitere wichtige Oberflächenantigene, die zur Charakterisierung des Reifungsstadiums herangezogen wurden, waren die kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), sowie CD83 (Banchereau & Steinman, 1998; Bedrosian *et al.*, 2000) und die für die Antigenpräsentation verantwortlichen HLA-I- (HLA-A/B/C) und HLA-II- (HLA-DR/DP/DQ) Moleküle. Die Expression der Reifungsmarker wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Nach einer Aktivierung und damit einhergehenden Reifung kommt es auf mDCs, im Vergleich zu iDCs, zu einer drastischen Erhöhung der Expressionsstärke der HLA- und kostimulatorischen Oberflächenantigene, so dass zur Auswertung die mittlere Fluoreszenzintensität herangezogen werden konnte. CD83 dagegen wird ausschließlich auf mDCs exprimiert (Bedrosian *et al.*, 2000). In diesem Fall wurde der prozentuale Anteil CD83-positiver Zellen als Parameter für eine Reifung verwendet. In Abbildung 3.1.3. ist eine Übersicht der Parameter von Differenzierung, Reifung und Infektion der verwendeten DCs dargestellt.

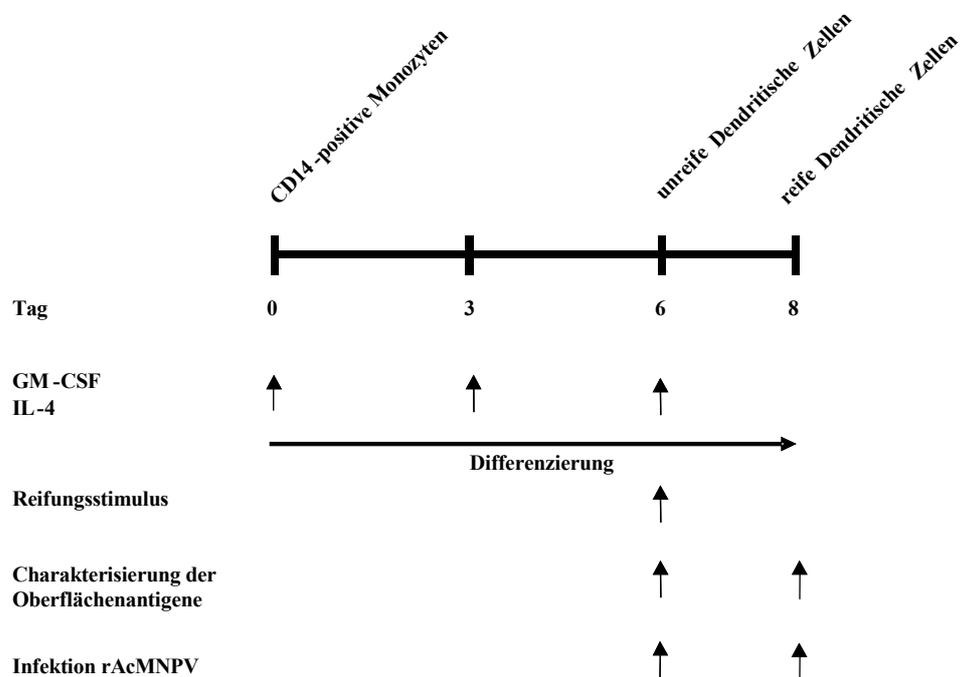


Abb. 3.1.3. Übersicht über die Parameter von Differenzierung, Reifung und Infektion der verwendeten Dendritischen Zellen

3.1.2.1. Rekombinantes AcMNPV infiziert effizient 293 Zellen und führt zu einer transienten Expression des Reportergens

Die Parameter und Effizienzen der Infektion von 293 Zellen durch rAcMNPVs sind aus der Literatur bereits bekannt (Boyce & Bucher, 1996; Duisit *et al.*, 1999), daher diente die Infektion von 293 Zellen als Kontrolle des Infektionssystems für weiterführende Experimente. Dazu wurden zwei rAcMNPV verwendet, AcpP-EGFP, dessen Reportergen unter der Kontrolle des Polyhedringen-Promotors steht und AcpC-EGFP, dessen HCMV-IE Promotor die Expression des EGFP Gens in Säugerzellen erlaubt.

Zunächst wurden dazu $2,5 \times 10^5$ 293 Zellen ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen dann für zwei Stunden mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP mit einer „multiplicity of infection“ (MOI) von 1, 10 und 100 bei 37°C infiziert. Danach wurden die Zellen mit frischen Medium überschichtet und für weitere 24 oder 48 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden anschließend durchflußzytometrisch analysiert. Dabei wurde der Prozentsatz von 293 Zellen bestimmt, die EGFP-positiv waren. Dabei zeigte sich, dass nach 24 Stunden 16 % der mit einer MOI von 1 AcpC-EGFP-infizierten 293 Zellen EGFP exprimierten. Die Anzahl der EGFP positiven 293 Zellen konnte durch den Einsatz größerer Mengen an Virus bis auf 92 % bei einer MOI von 100 gesteigert werden. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit AcpP-EGFP bei keiner der verwendeten MOI zu einer Expression von EGFP. Hier blieben die Prozentzahlen fluoreszenzpositiver Zellen unter der Prozentzahl fluoreszenzpositiver nicht-infizierter Zellen. Nach 48 Stunden kam es in den AcpC-EGFP-infizierten Zellen generell zu einer Abnahme der EGFP-Expression um durchschnittlich 10 % der Expression nach 24 Stunden. Das in Abbildung 3.1.5. dargestellte Experiment ließ sich in drei unabhängigen Wiederholungen bestätigen, obwohl die Anzahl EGFP-positiver 293 Zellen nach AcpC-EGFP-Expression nicht immer so hoch war, wie im gezeigten Experiment. Vermutlich hängt die Infizierbarkeit mit der Teilungsrate der Zellen zusammen und schwankt dementsprechend zwischen den einzelnen Experimenten. Dennoch konnte man aus dem Experiment schließen, dass die verwendeten rAcMNPV, wie entsprechend aus der Literatur zu erwarten, effektiv 293 Zellen infizieren und

die transiente Expression des Reportergens von in Säugerzellen funktionellen Promotoren abhängt (Boyce & Bucher, 1996; Duisit *et al.*, 1999; Knebel & Doerfler, 1987). Damit stand ein System zur Verfügung, um die Infektion von humanen DC durch rAcMNPV zu untersuchen.

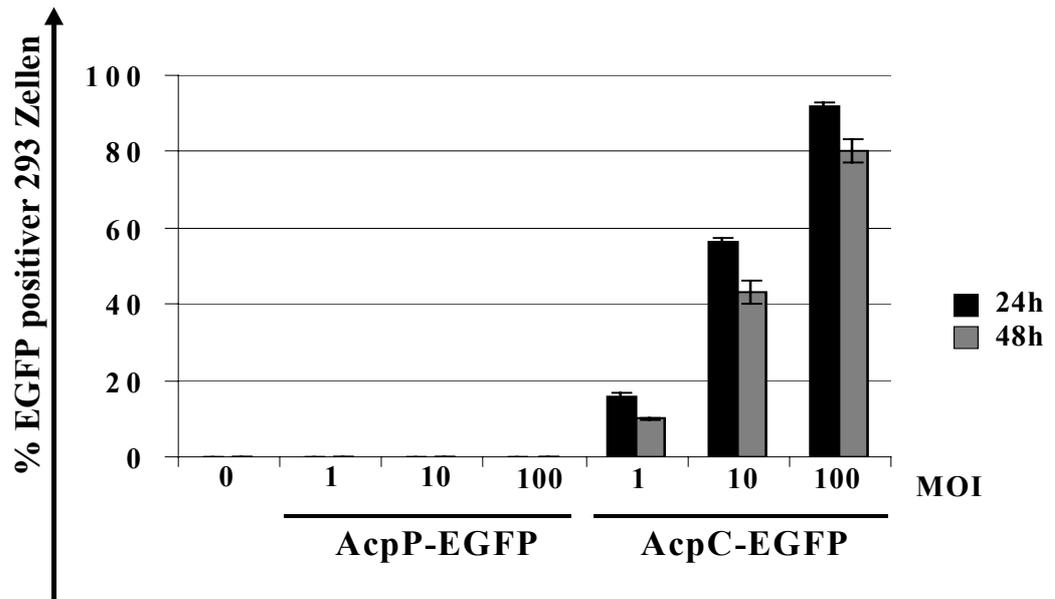


Abb 3.1.4. Effizienz der Infektion von 293 Zellen durch rekombinantes AcMNPV

5×10^5 293 Zellen wurden zur Infektion für 2 Stunden mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP mit einer MOI von 1, 10 und 100 bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten nicht infizierte Zellen (MOI 0). Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Die Inkubation erfolgte für 24 und 48 Stunden. Die Zellen wurden fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz EGFP-positiver 293 Zellen an der Gesamtzellzahl. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen

3.1.2.2. Rekombinantes AcMNPV infiziert humane Dendritische Zellen mit geringer Effizienz

Zur Induktion einer Immunantwort durch infizierte DCs ist neben anderen Parametern vor allem die Expression des Immunogens in den DCs entscheidend. Sie sollte möglichst effizient sein, da so möglichst viele MHC-Moleküle mit Peptiden des prozessierten Immunogens an der Oberfläche präsentiert werden (Benvenuti *et al.*, 2004; Wulfig *et al.*, 2000). Nach Überprüfung des Infektionssystems in 293 Zellen sollte die Effizienz der Infektion deshalb in humanen DCs getestet werden. Dazu wurden 2×10^5 iDCs zweier Blutspender mit AcpC-EGFP und AcpP-EGFP mit einer MOI von 1, 10 und 100 für zwei Stunden bei 37°C infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte humane iDCs der Blutspender. Die Zellen wurden nach Infektion in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Es zeigte sich, dass in Abhängigkeit der untersuchten Blutspender 0,29 % (Spender 1) und 1 % (Spender 2) der mit einer MOI von 1 AcpC-EGFP-infizierter DCs EGFP exprimierten. Die Anzahl der EGFP positiven DCs konnte durch den Einsatz größerer Mengen an Virus bis auf 0,4 % (Spender 1) und 6,2 % (Spender 2) bei einer MOI von 10 gesteigert werden. Bei einer MOI von 100 kam es allerdings nur bei einem Blutspender zu einer gesteigerten EGFP-Expression (1,5 % bei Spender 1), während der andere Blutspender keine EGFP-Expressionssteigerung zeigte (5,4 % bei Spender 2). Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit AcpP-EGFP bei keiner der verwendeten MOI zu einer Expression von EGFP in den DCs. Hier blieben die Prozentzahlen fluoreszenzpositiver Zellen unter der Prozentzahl fluoreszenzpositiver nicht-infizierter Zellen. Daher konnte man aus dem Experiment schließen, dass die verwendeten rAcMNPV DCs nur mit geringer Effizienz infizieren und die Expression des Reportergens auch in DCs von in Säugerzellen funktionellen Promotoren abhängt. Dabei waren die Effizienzen der EGFP-Expression von den DCs der untersuchten Blutspender sehr unterschiedlich. Außerdem führte die Infektion durch den Einsatz großer Mengen an rAcMNPV nicht in jedem Fall zu einer Expressionssteigerung, da bei eine MOI von 100 nur ein

Blutspender eine Erhöhung EGFP-positiver DCs aufweist. Durch die hohe Anzahl fluoreszenzpositiver DCs in den Kontrollansätzen (bis zu 0,6 % fluoreszenzpositiver Zellen bei nicht-infizierten DCs) kann bei einer MOI von 1 nur schwer zwischen EGFP-positiven Zellen und dem Hintergrund durch die Eigenfluoreszenz der Zellen unterschieden werden. Daher wurden die folgenden Untersuchungen rAcMNPV-infizierter Zellen bei einer MOI von 10 durchgeführt.

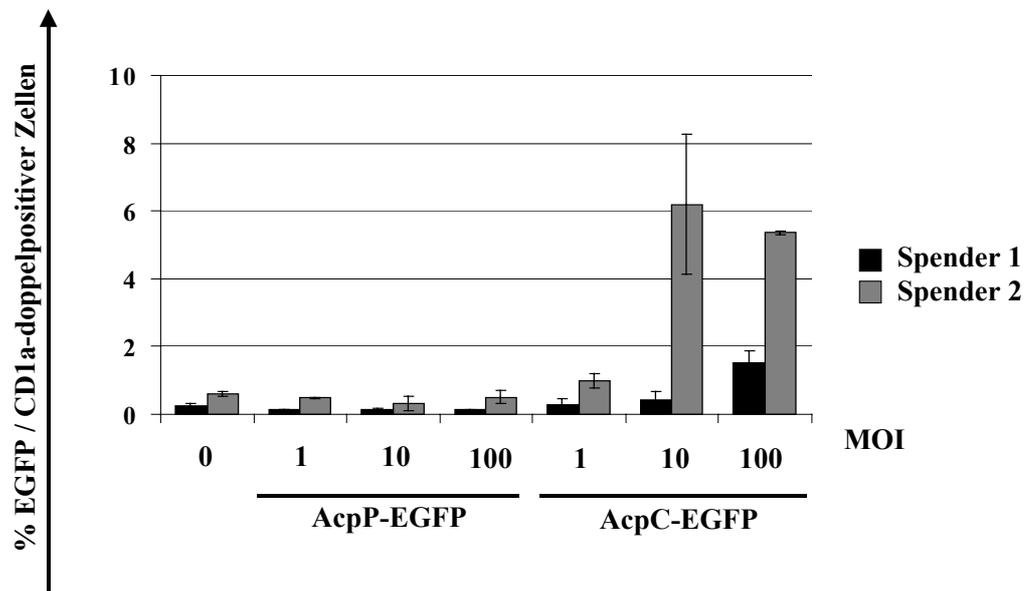


Abb 3.1.5. Effizienz der Infektion humaner Dendritischer Zellen durch rekombinantes AcMNPV

2×10^5 humane iDCs von zwei Blutspendern wurden zur Infektion für zwei Stunden mit AcpC-EGFP und AcpP-EGFP mit einer MOI 1, 10 und 100 bei 37°C infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte humane iDCs der Blutspender (MOI 0). Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Nach erfolgter Inkubation für 24 Stunden bei 37°C wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt. Die Zellen wurden fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz CD1a-positiver DC, die gleichzeitig EGFP-positiv waren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

3.1.2.3. Die Infektion von Dendritischen Zellen mit rekombinanten AcMNPV ist abhängig vom Reifestadium der Dendritischen Zellen

Rekombinantes AcMNPV führte in humanen iDCs mit geringer Effizienz zu einer Reporter-gen-Expression (vgl. 3.1.2.2.). Aufgrund ihres T Zell-stimulatorischen Potentials können jedoch nur mDCs für Immunisierungs-Strategien eingesetzt werden, da iDCs Toleranz induzieren (Dhodapkar *et al.*, 2000; Dhodapkar *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000; Steinman *et al.*, 2000). Daher sollte untersucht werden, ob LPS-gereifte mDCs in demselben Maße wie iDCs durch rAcMNPV infiziert werden können. Dazu wurden humane iDCs und mDCs von drei Blutspendern mit AcpC-EGFP und AcpP-EGFP mit einer MOI von 10 infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte humane iDCs und mDCs derselben Blutspender. Die Zellen wurden nach 24 Stunden mit Antikörpern gegen CD1a gefärbt und durchflußzytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.6. dargestellt. Die AcpC-EGFP-infizierten iDCs der Blutspender exprimierten EGFP vergleichbar zum vorausgegangenen Experiment mit geringer Effizienz. Im Gegensatz dazu führte die Infektion von mDC derselben Blutspender zu keiner Expression von EGFP. Daher konnte man aus dem Experiment schließen, dass rAcMNPV iDCs zwar mit geringer Effizienz infizieren, aber gleichzeitig nicht in der Lage sind, mDCs zu infizieren.

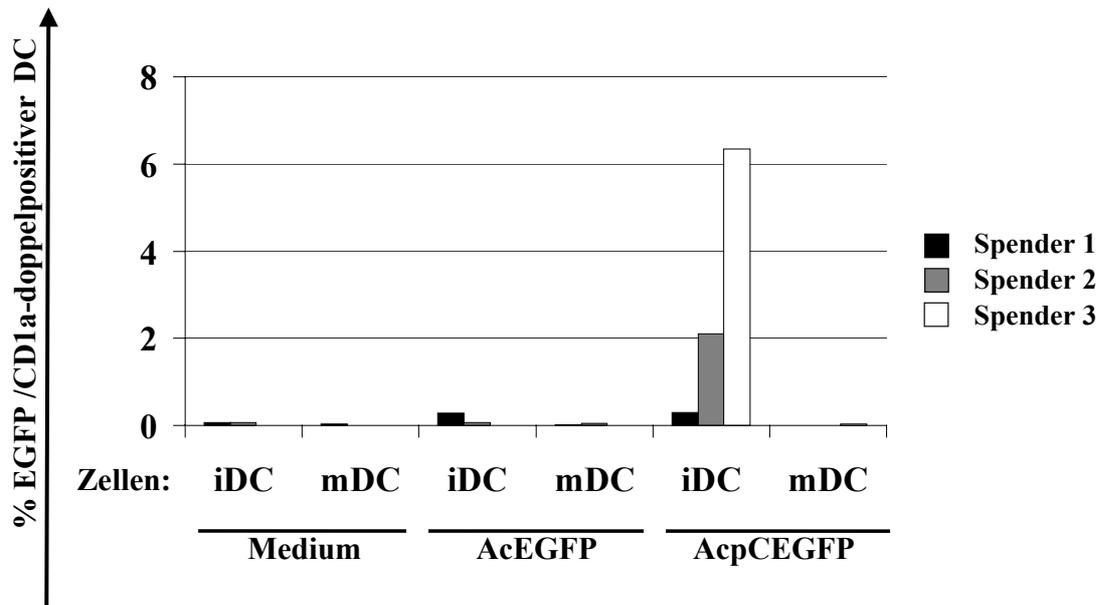


Abb. 3.1.6. Reife Dendritische Zellen sind nicht durch rAcMNPV infizierbar
 2×10^5 humane iDCs und mDCs von drei Blutspendern wurden zur Infektion für 2 Stunden mit AcpC-EGFP und AcpP-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte humane iDCs und mDCs derselben Blutspender. Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Nach erfolgter Inkubation für 24h bei 37°C wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt. Die Zellen wurden fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz CD1a-positiver DCs, die gleichzeitig EGFP-positiv waren.

3.1.2.4. Die durch Infektion mit rekombinantem AcMNPV vermittelte Reporter-gen-Expression ist in Dendritischen Zellen transient

Die Ausreifung von iDCs zu voll stimulatorischen mDCs wird *in vitro* über verschiedene Faktoren erreicht. Der Prozess der Reifung dauert dabei bis zu 48 Stunden, erst dann sind beispielsweise die kostimulatorischen Moleküle vermehrt auf den DCs exprimiert (Langenkamp *et al.*, 2000). Nach der

Ausreifung müssen die DCs mit den naiven T Zellen in Kontakt treten, um deren Differenzierung und Proliferation zu induzieren. Unter der Voraussetzung, dass eine hohe Menge kostimulatorischer Moleküle von den DCs zur Verfügung gestellt wird, muss eine T Zelle bei hoher Antigen-Dosis bis zu 20 Stunden mit unterschiedlichen DCs zusammentreffen, um voll stimuliert zu werden. Bei geringen Antigen-Dosen, wie im Falle der wenig effizienten Expression durch rAcMNPV, erhöht sich die Zeit bis zur vollen Stimulation der T Zellen sogar auf 30 Stunden. Dabei werden die MHC-I-Peptid-Moleküle an der Oberfläche der DCs ständig erneuert (Iezzi *et al.*, 1998). Die Langlebigkeit der rAcMNPV-induzierten EGFP-Expression ist also ein entscheidender Faktor für die langlebige Präsentation der Immunogene und der anschließenden Differenzierung und Proliferation der T Zellen.

Im Folgenden wurde daher getestet, ob die durch rAcMNPV-induzierte Reporter-gen-Expression in den mitotisch nicht aktiven unreifen DCs langlebig oder transient ist. Dazu wurden humane iDCs von drei Blutspendern für zwei Stunden mit AcpC-EGFP und AcpP-EGFP infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte humane iDCs derselben Blutspender. Die Inkubation erfolgte für 24 und 48 Stunden. Die infizierten iDCs wurden dann, wie unter 3.1.2.2. beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.1.7. dargestellt. Humane iDCs exprimierten nach Infektion mit AcpC-EGFP in geringem Umfang EGFP, allerdings ist nach 48 Stunden die Reporter-gen-Expression noch geringer, als nach 24 Stunden. Bei einem Blutspender sank die Expression um ca. 50 % (von 2,1 % auf 1,1 %), bei einem anderen sogar um ca. 70 % (von 6,3 % auf 2,1 %). Daher kann man aus dem Experiment schließen, dass die AcpC-EGFP-abhängige Reporter-genexpression in iDCs nur transient ist und schnell absinkt.

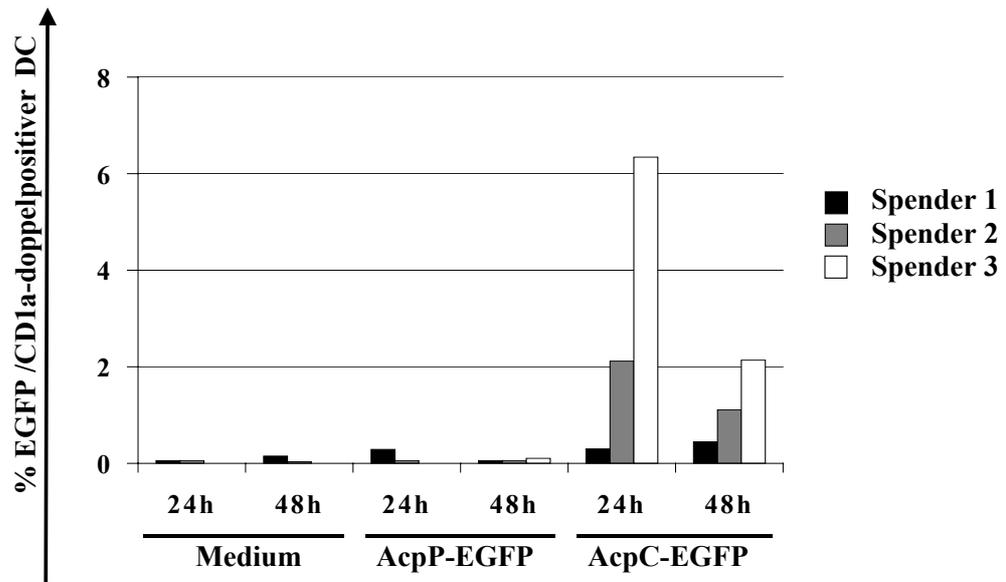


Abb. 3.1.7. Mit rekombinantem AcMNPV infizierte humane Dendritische Zellen exprimieren das Reportergen nur transient

2×10^5 humane iDCs von drei Blutspendern wurden zur Infektion für 2 Stunden mit AcpC-EGFP und AcpP-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte humane iDCs derselben Blutspender. Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Nach erfolgter Inkubation für 24 und 48 Stunden bei 37°C wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt. Die Zellen wurden fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz CD1a-positiver DCs, die gleichzeitig EGFP-positiv waren.

3.1.2.5. Die Anzahl EGFP-positiver Dendritischer Zellen wird durch Aufzentrifugieren von rAcMNPV auf die Zellen nicht gesteigert

Rekombinantes AcMNPV führt in humanen iDCs mit geringer Effizienz zu einer transienten Reportergen-Expression, nicht aber in humanen mDCs. Sie vermitteln jedoch eine effektive T Zell-Stimulation. Um bei einer Ausreifung der mit rAcMNPV-infizierten iDCs die Expression möglichst lange zu erhalten, sind zwei Strategien denkbar. Zunächst kann initial die Anzahl der

Reporter-gen-exprimierenden Zellen erhöht werden. Zum zweiten kann die Dauer der Expression in den infizierten Zellen verlängert werden. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass aus Monozyten differenzierte DCs durch Aufzentrifugieren von beispielsweise rekombinanten Adenoviren die eingebrachten Reportergene in erhöhtem Maße exprimieren. Dabei ist unklar, ob das Virus verbessert in die DCs gelangt oder ob die Zentrifugation generell die Expressionsstärke beeinflusst. Die dabei verwendeten DCs überstehen die Prozedur allerdings unbeschadet und verändern ihre Morphologie nicht (Nishimura *et al.*, 2001).

Im Folgenden wurde daher getestet, ob durch Aufzentrifugieren von rAcMNPV auf iDCs die induzierte Reporter-gen-Expression gesteigert werden kann. Dazu wurden iDCs zusammen mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP einer MOI von 10 für 2 Stunden bei 2000g und 37°C zentrifugiert. Als Kontrolle dienten iDCs derselben Blutspender, die bei der Inkubation mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP nicht zentrifugiert wurden. Nach dem Waschen der iDCs erfolgte dann die Inkubation für 24 und 48 Stunden. Die infizierten iDCs wurden dann wie unter 3.1.2.2. beschrieben, analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.8. dargestellt. Im Gegensatz zu der beschriebenen Expressionssteigerung bei rekombinanten Adenoviren führte das Aufzentrifugieren von rAcMNPV auf die iDCs zu keiner Steigerung der Expression des EGFP-Reportergens. Vielmehr sank die Anzahl der EGFP-positiven Zellen im Vergleich zu nicht-zentrifugierten infizierten iDCs nach 24 Stunden um ca. 50 % ab. Nach 48 Stunden war die Abnahme mit ca. 75 % noch höher. Daher ist das Aufzentrifugieren von rAcMNPV auf iDCs keine geeignete Methode, um die Reporter-gen-expression zu steigern.

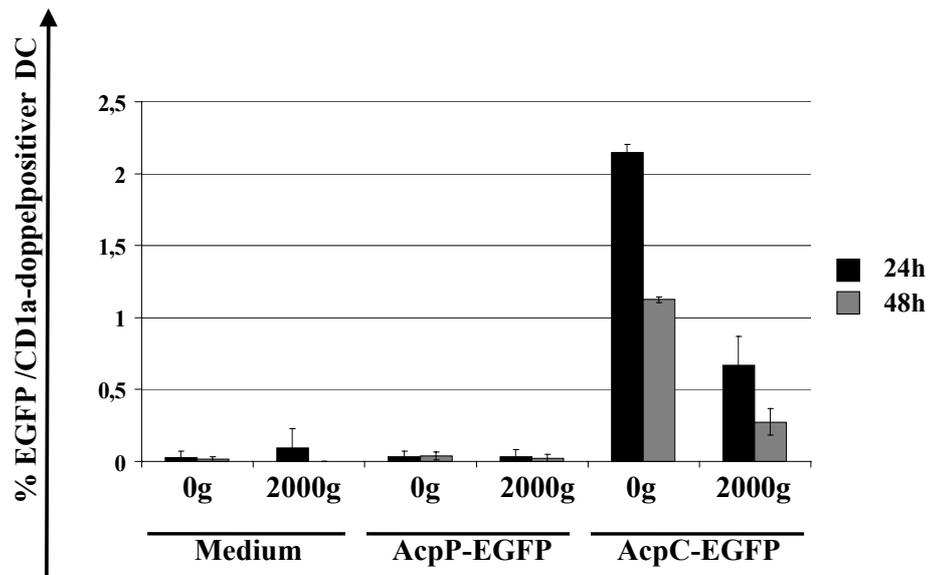


Abb. 3.1.8. Die Anzahl EGFP-positiver Dendritischer Zellen wird durch Aufzentrifugieren von rAcMNPV nicht gesteigert

5×10^5 humane DC wurden zusammen mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP für 2 Stunden bei 2000g und 37°C zentrifugiert oder alternativ mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP einer MOI von 10 bei 37°C inkubiert (0g). Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24 Stunden. Danach wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt. Die Zellen wurden fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz CD1a-positiver DCs, die gleichzeitig EGFP-positiv waren. Das Ergebnis ist repräsentativ für insgesamt vier durchgeführte Experimente mit DCs unterschiedlicher Blutspender. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

3.1.2.6. Die Hemmung der Expression des Reportergens durch Nukleokapsidproteine in rAcMNPV-infizierten Dendritischen Zellen ist im Gegensatz zu rAcMNPV-infizierten 293 Zellen gering

Durch Verstärkung der initialen Expressionsstärke oder der Expressionsdauer der rAcMNPV infizierten iDCs kann die Expression rekombinanter Gene bis zum Zeitpunkt der optimalen Aktivierung der DCs möglicherweise erhalten. Für rAcMNPV ist bereits beschrieben, dass die Aktivität der viral kodierten Säugerzellpromotoren durch Histon-Deacetylase-Hemmer, wie Trichostatin A und n-Butyrat signifikant gesteigert werden kann (Condreay *et al.*, 1999). Außerdem kann damit die Expressionsdauer der rekombinanten Gene erhöht werden (Hu *et al.*, 2003). Dies zeigt, dass die Lockerung der Bindung der Nukleokapsidprotein an das AcMNPV-Genoms die transienten Expression der rekombinanten Reportergene steigern kann. Allerdings haben Histon-Deacetylase-Hemmer auch einen massiven Einfluß auf die Zellregulation, beispielsweise führt n-Butyrat zu einem Zellzyklusarrest (Kruh, 1982).

Im folgenden sollte zunächst im 293 Zell-Modellsystem getestet werden, ob n-Butyrat über längere Zeit die Expression des Reportergens in rAcMNPV-infizierten Zellen erhöhen kann. Dazu wurden 293 Zellen für zwei Stunden mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und in Anwesenheit von 600 µM n-Butyrat für 24, 48 oder 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Medium-inkubierte virusinfizierte Zellen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.9. dargestellt.

Tatsächlich führte die Applikation von n-Butyrat bei den 293 Zellen zu einer Erhöhung der EGFP-Expression AcpC-EGFP-infizierter Zellen. Sie ist nach 24 Stunden 13fach erhöht gegenüber der virusinduzierten Expression ohne n-Butyrat. Dies steigert sich nach 48 Stunden auf eine 19fache EGFP-Expression n-Butyrat-behandelter gegenüber unbehandelter Zellen. Die Gesamtzahl EGFP-positiver, n-Butyrat-behandelter Zellen blieb dabei gleich. Nach 72 Stunden nahm auch die EGFP-Expression der n-Butyrat behandelten Zellen ab.

In den unbehandelten Zellen sank die Expression allerdings schneller. Die EGFP-Expression n-Butyrat behandelter Zellen war somit 23mal höher, als die unbehandelter Zellen. N-Butyrat führte dabei nicht generell zu einer Transkription rekombinanter Gene, denn bei AcpP-EGFP-infizierten 293 Zellen wurde zu keinem Zeitpunkt eine Induktion von EGFP durch n-Butyrat festgestellt.

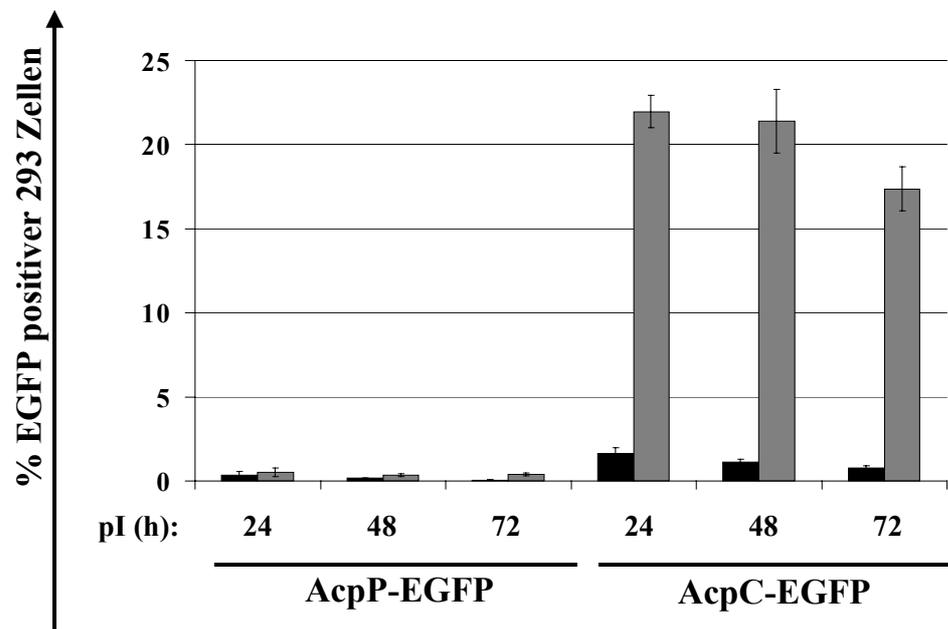


Abb. 3.1.9. Die Expression des Reportergens in mit rekombinanten AcMNPV-infizierten 293 Zellen kann durch den Histone-Deacetylasehemmer n-Butyrat langfristig gesteigert werden

5×10^5 293 Zellen wurden zur Infektion für 2 Stunden mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und in Anwesenheit von Medium (schwarze Balken) oder 600 μM n-Butyrat (graue Balken) für 24, 48 oder 72 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden dann fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz EGFP-positiver 293 Zellen an der Gesamtzellzahl. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

Da n-Butyrat in 293 Zellen zu einer langanhaltenden Steigerung der Expression des Reportergens in rAcMNPV-infizierten Zellen führte, wurde getestet, ob n-Butyrat auch die Expression in iDCs für längere Zeit erhöhen kann. Dazu wurden humane iDCs von drei Blutspendern für zwei Stunden mit AcpP-EGFP und AcpC-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und in Anwesenheit von 600 µM n-Butyrat im Medium für 24 oder 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten Medium-inkubierte, virusinfizierte iDCs. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.10.(A) dargestellt.

Vergleichbar zu den Effekten der Applikation von n-Butyrat bei den 293 Zellen führte auch bei iDCs die n-Butyrat-Zugabe zu einer Erhöhung der EGFP-Expression AcpC-EGFP-infizierter Zellen. Sie ist allerdings bei allen betrachteten Blutspendern nach 24 Stunden nur schwach erhöht. Dabei reichte sie von einer 1,1 fachen bis zu einer 7 fachen Expressionserhöhung. N-Butyrat führte dabei auch in iDCs nicht generell zu einer Transkription rekombinanter Gene. Bei AcpP-EGFP-infizierten iDCs wurde zu keinem Zeitpunkt eine Induktion von EGFP durch n-Butyrat festgestellt. Nach 48 Stunden allerdings nahm die EGFP-Expression in n-Butyrat-behandelten, AcpC-EGFP-infizierten iDCs drastisch ab und war bei allen Blutspendern geringer, als in unbehandelten Zellen. Dies war gekoppelt mit einem Verlust lebender iDCs in der Kultur (Abb 3.1.10.(B)). Offensichtlich wirkte n-Butyrat auf iDCs cytotoxisch.

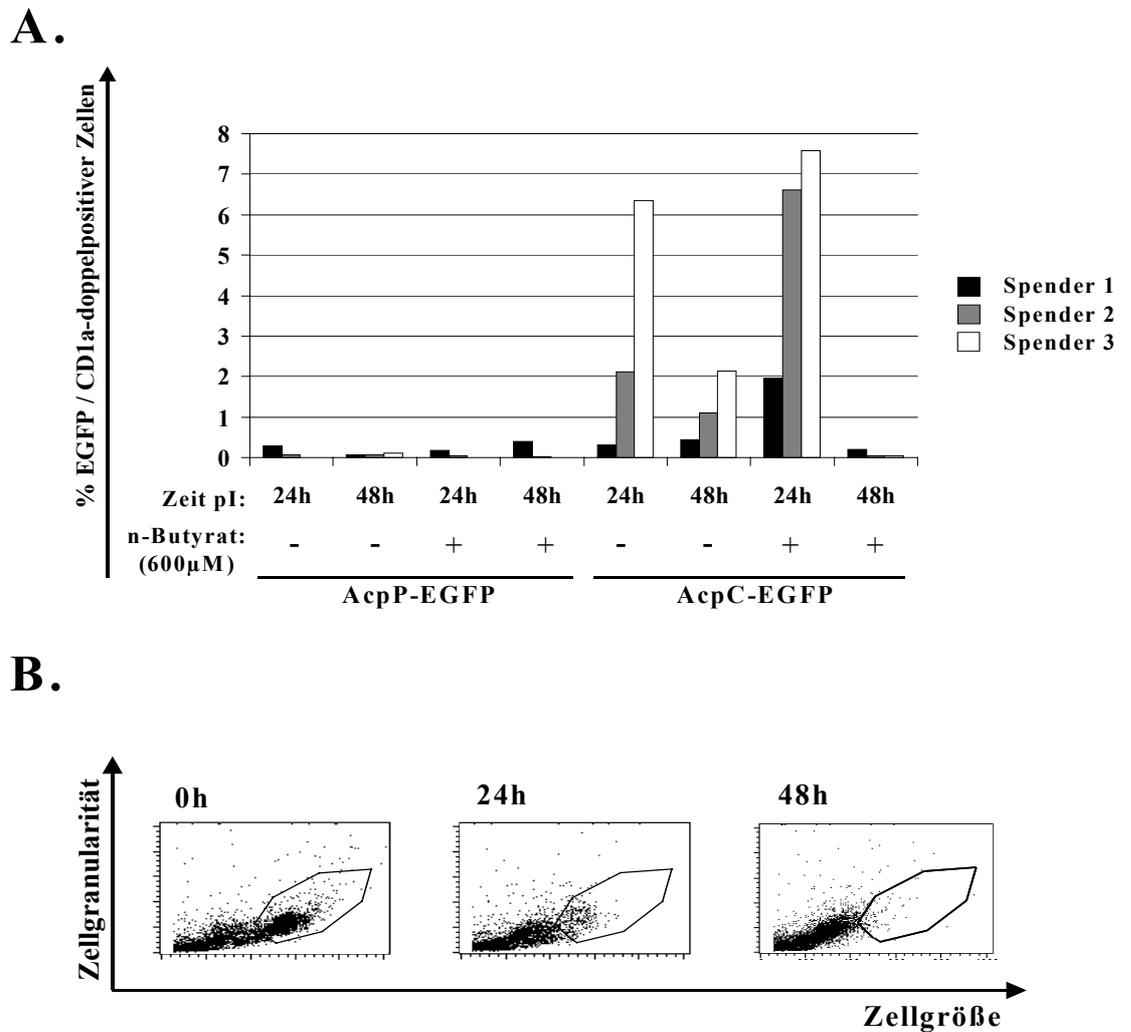


Abb. 3.1.10. Die Expression des Reportergens in mit rekombinantem AcMNPV-infizierten humanen Dendritischen Zellen kann durch den Histon-Deacetylasehemmer n-Butyrat nur transient gesteigert werden

2×10^5 humane iDC von drei Blutspendern wurden zur Infektion für 2 Stunden mit AcpC-EGFP und AcpP-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C infiziert. Die Zellen wurden in frischem Medium gewaschen und in Anwesenheit von Medium oder $600 \mu\text{M}$ n-Butyrat für 24 und 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkiertem Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt. Die Zellen wurden daraufhin fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz CD1a-positiver DC, die gleichzeitig EGFP-positiv waren (A) und die Größe und Granularität der n-Butyrat-behandelten Zellen im Experimentverlauf (B).

3.1.2.7. Die Infektion humaner Dendritischer Zellen durch rekombinantes AcMNPV wird über das virale Glykoprotein gp64 vermittelt

Bisher konnte nur eine geringe transiente Expression rekombinanter Gene in rAcMNPV-infizierten iDCs nachgewiesen werden. Der virale Faktor, der bei Infektion spezifisch von einer Vielzahl von Säugerzellen gebunden wird, ist das Glykoprotein gp64 (Duisit *et al.*, 1999; Hofmann & Strauss, 1998; Tani *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2001). Dieser Faktor ermöglicht das Überführen des Viruskapsids von den Endosomen in das Zytoplasma (Dee & Shuler, 1997). Durch Überexpression von gp64 auf der Virusoberfläche konnten Säugerzellen mit bis zu 100facher Effizienz infiziert werden (Tani *et al.*, 2001). Da iDCs besonders spezialisiert sind, große Mengen an Proteinen und komplexen Partikeln aufzunehmen, ist denkbar, dass iDCs rAcMNPV nicht wie andere Zellen Rezeptor-spezifisch, sondern ineffizient Rezeptor-unspezifisch über beispielsweise Makropinozytose aufnehmen (Li *et al.*, 2001).

Um aufzuklären, ob iDCs rAcMNPV Rezeptor-spezifisch über gp64 aufnehmen, wurde AcpC-EGFP bei einer Pfu von 5×10^6 mit jeweils 0,5 μg , 5 μg und 10 μg von anti-gp64 oder 10 μg des Antikörper-Isotyps für eine Stunde bei 27°C inkubiert. Humane iDCs zweier Blutspender wurden danach zur Infektion für zwei Stunden mit den Antikörper-inkubierten AcpC-EGFP und unbehandeltem AcpP-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte und AcpP-EGFP-infizierte humane iDCs derselben Blutspender. Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24 Stunden. Danach wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt. Die Zellen wurden daraufhin fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.1.11. dargestellt.

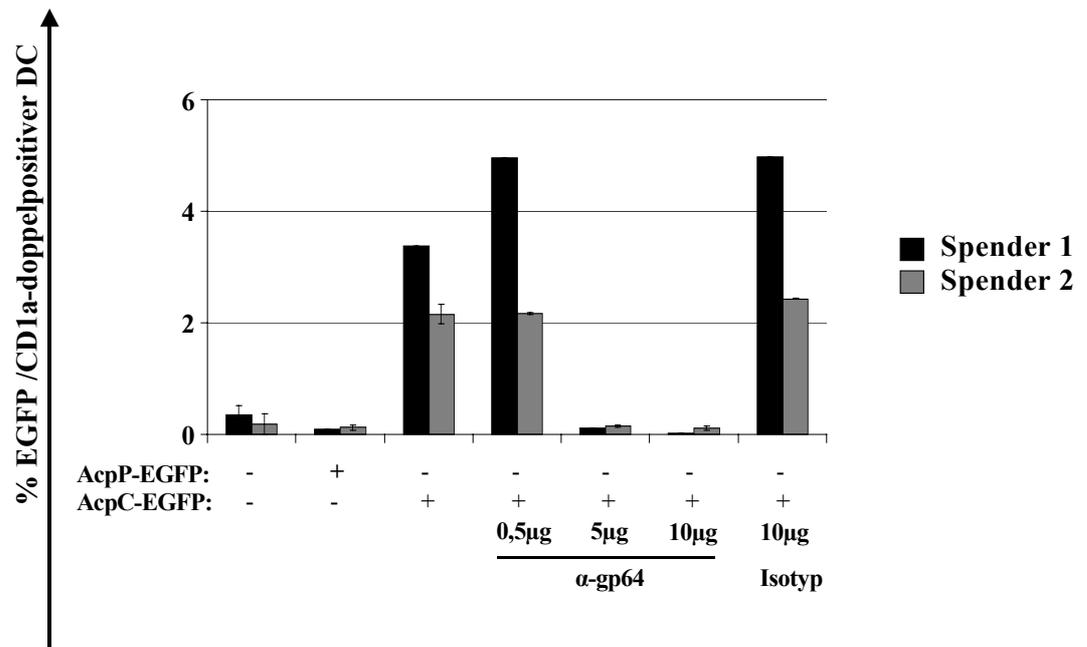


Abb. 3.1.11. Die Infektion von humanen Dendritischen Zellen durch rekombinantes AcMNPV ist abhängig vom viralen Glykoprotein gp64

AcpC-EGFP wurde bei einer Pfu von 5×10^6 mit jeweils 0,5 µg, 5 µg und 10 µg von anti-gp64 (AcV1) oder 10 µg des Isotyps (Maus-IgG2a) für eine Stunde bei 27°C inkubiert. 3×10^5 humane iDCs zweier Blutspender wurden danach zur Infektion für 2 Stunden mit den Antikörper-inkubierten AcpC-EGFP und unbehandeltem AcpP-EGFP mit einer MOI von 10 bei 37°C infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte humane iDCs derselben Blutspender. Danach wurden die Zellen in frischem Medium gewaschen und ausgesät. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 24 Stunden. Danach wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für CD1a gefärbt. Die Zellen wurden fixiert und durchflußzytometrisch analysiert. Dargestellt ist der Prozentsatz CD1a-positiver DCs, die gleichzeitig EGFP-positiv waren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

Die Infektion von humanen iDCs kann durch Vorinkubation von AcpC-EGFP mit Antikörper gegen gp64 vollständig gehemmt werden. Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration des Antikörpers. Bei Einsatz von 0,5 µg anti-gp64 zur Neutralisierung einer Viruslösung mit einer Pfu von 5×10^6 ist der Effekt auf die Infektiosität nicht detektierbar. Bei Einsatz der 10 und 20fachen Antikörpermenge wird die Infektion von iDCs durch AcpC-EGFP komplett gehemmt. Durch den Antikörper-Isotyp wird die Infektion durch AcpC-EGFP nicht gehemmt, daher handelt es sich um einen spezifischen Effekt.

Die Ergebnisse zeigen, dass humane iDCs in geringem Umfang gp64-abhängig durch rAcMNPV infiziert werden können. Die Infektion erlaubt dabei eine transiente Expression von Reportergenen in iDCs und sinkt schnell ab, so dass bei dem Zeitpunkt optimaler Aktivierung von DCs die Expressionsstärke gering ist. Dabei ist die Reportergenexpression nur in geringem Umfang von der Bindung der Nukleokapsidproteine an das virale Genom gehemmt. Im Gegensatz dazu können optimal aktivierte mDCs nicht von rAcMNPV infiziert werden.

3.2. HCMV-pp65, ein virales Protein als Transportmittel für Antigene

Impfstoffe auf der Basis von Proteinen induzieren vornehmlich eine Th2-Immunantwort (Shedlock & Weiner, 2000). Dabei spielt die Präsentation des exogenen Antigens für die Induktion der hauptsächlich humoralen Immunantwort eine entscheidende Rolle. Während Peptide endogener Proteine meist im Zusammenhang mit MHC-I-Molekülen präsentiert werden, werden MHC-II-Moleküle vornehmlich mit Peptiden exogener Proteine beladen. Der Schutz vor den meisten Infektionskrankheiten wird allerdings nur durch eine Kombination zellulärer und humoraler Immunantworten erreicht. Die Fähigkeit der DCs, exogene Proteine *in vivo* auch über MHC-I-Moleküle zu präsentieren (Cross-Präsentation) und somit CD8⁺ T Zellen zu stimulieren (Cross-Priming) (Heath *et al.*, 2004), legt die Optimierung der Protein-Impfstoffe zur effektiven Cross-Präsentation nahe.

Die Induktion einer CD8⁺ T Zell-Antwort ist allerdings nicht nur abhängig von einer effizienten Cross-Präsentation des Antigens, sondern auch von einer adäquaten Aktivierung der DCs. Es konnte bereits gezeigt werden, dass lösliche Faktoren, wie IFN- α (Cho *et al.*, 2002) oder TLR-Liganden, wie beispielsweise LPS (van Mierlo *et al.*, 2004) in DCs eine Signalkaskade auslösen. Sie führt schließlich zu einer Expression von MHC und CD80, sowie CD86 auf der DCs und erhöht die T Zell- stimulatorische Kapazität der DCs um etwa das 100-fache (Lanzavecchia & Sallusto, 2001). Daher sollte ein ideales Protein zur Immunisierung neben einer effektiven Cross-Präsentation außerdem eine Aktivierung der DCs auslösen oder eine Aktivierung durch andere Faktoren zulassen.

Die effektive Cross-Präsentation eines Proteins wird zunächst durch eine effektive Aufnahme in das Zytoplasma vermittelt. Proteine, die aufgrund einer sogenannten „Protein-Transduktions-Domäne“ (PTD) mit hohem isoelektrischen Punkt eine Aufnahme in Zellen vermitteln, werden als Translokatorische Proteine bezeichnet. Mithilfe von PTDs und

Translokatorischen Proteinen konnte die Prozessierung gekoppelter Immunogene im MHC-I-Präsentationsweg signifikant erhöht werden (Leifert *et al.*, 2001; Pietersz *et al.*, 2001; Shibagaki & Udey, 2002; Wang *et al.*, 2002). Da beschriebene PTDs und Translokatorische Proteine nur bei hoher Proteinkonzentration eine Aufnahme in die Zielzellen vermitteln, bleibt die Stimulation der CD8⁺ T Zellen im Vergleich zu einer Peptidstimulation ineffizient. Proteine, die rezeptorvermittelt internalisiert werden, vermitteln dagegen eine deutlich effizientere Aufnahme (Arora & Leppla, 1994; Arora *et al.*, 1994; Falnes *et al.*, 2001; Wiedlocha *et al.*, 1994). Daher ist die Identifikation effizienterer Translokatorischer Proteine und PTDs vonnöten. Ein potentieller Kandidat für ein Translokatorisches Protein stellt das Tegumentprotein des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) pp65 dar. Pp65 besitzt, wie andere Translokatorische Proteine, eine Region mit hohem Anteil an kationischen Aminosäuren. Sie stellt die zweigeteilte NLS des Proteins dar und befindet sich im hinteren Bereich des Proteins, von Aminosäure 538 bis 561 (Gallina *et al.*, 1996; Schmolke *et al.*, 1995). Pp65 muss zur Induktion von pp65-spezifischen CTL Antworten nicht *de novo* von HCMV-infizierten DCs synthetisiert werden, sondern kann durch Freisetzung aus dem Virion in das Zytoplasma gelangen und im MHC-I-Präsentationsweg prozessiert werden (Gilbert *et al.*, 1996; Grefte *et al.*, 1992; Riddell *et al.*, 1991). Es konnte *in vitro* bereits gezeigt werden, dass pp65 aus infizierten Fibroblasten von nicht-infizierten DCs cross-präsentiert werden kann (Tabi *et al.*, 2001). Daher ist wahrscheinlich, dass DCs auch *in vivo* pp65 aufnehmen und im MHC-I-Präsentationsweg prozessieren. Dieser Mechanismus muss extrem effizient sein, da pp65 das Hauptantigen für eine HCMV-spezifische CD8⁺ und CD4⁺ T Zell-Antwort darstellt und die Präsentation von endogen exprimiertem pp65 in HCMV-infizierten DCs ineffizient ist (Arrode *et al.*, 2002; Beninga *et al.*, 1995; Boppana & Britt, 1996; Britt *et al.*, 1995; Diamond *et al.*, 1997; Gyulai *et al.*, 2000; Jahn *et al.*, 1987; Khattab *et al.*, 1997; Riddell *et al.*, 1991; Schmolke *et al.*, 1995; van Zanten *et al.*, 1995; Wills *et al.*, 1996). Ob die Cross-Präsentation von pp65 auch unabhängig von Virionen geschehen kann, und ob das Protein einen Transport anderer Proteine direkt in DCs vermittelt, ist bislang *in vitro* und *in vivo* ungeklärt. Daher sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob pp65 unabhängig von HCMV-Virionen in der Lage ist,

an DCs zu binden und eine Aufnahme fusionierter Proteine in die Zellen zu vermitteln. Ferner sollte geklärt werden, ob das Protein außerdem effektiv von DCs cross-präsentiert werden kann und deren Aktivierung beeinflusst.

3.2.1. Darstellung und Charakterisierung von Immunogenen mit Hilfe rekombinanter AcMNPV-infizierter Insektzellen

Rekombinante AcMNPVs werden als Werkzeug zur rekombinanten Expression von Proteinen in Insektzellen eingesetzt und ermöglichen so die Expression großer Mengen rekombinanter Proteine mit post-translationalen Modifikationen von höheren Eukaryonten (Hu, 2005). Dabei besitzen sie ein äußerst flexibles Genom, das die Insertion großer Mengen rekombinanter DNA erlaubt. Beispielsweise eignen sie sich ideal zur simultanen Synthese von multiplen strukturellen Proteinen, die zum „self-assembly“ von „Virus-like particles“ (VLP) benötigt werden (Ho *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2001; Schiller & Lowy, 2001; Tegerstedt *et al.*, 2003; Xiang *et al.*, 2002). Diese Partikel werden bereits als vielversprechende Kandidaten für eine Immunisierung auf der Basis von Proteinen diskutiert (Schiller & Lowy, 2001). Insektzellen weisen teilweise ein anderes Glykosylierungsmuster der Proteine als Säugerzellen auf, daher sollte in Einzelfällen stets überprüft werden, ob die exprimierten Proteine Immunantworten auslösen können (Kost *et al.*, 2005; Mori *et al.*, 2005).

Im vorliegenden Teil der Arbeit wurden daher zunächst hochtitrige Virusstocks rekombinanter AcMNPVs hergestellt (siehe 2.13. und 3.1.1.). Sie ermöglichen die Expression rekombinanter Proteine unter der Kontrolle des viralen Polyhedrin-Promotors in den Insektzellen. Die nötigen rAcMNPVs wurden der Stammsammlung des Instituts für Virologie in Homburg entnommen oder selbst generiert (Tab. 2.3.). Der Transfervektor zur Darstellung von AcpP-GHLT-E wurde erhalten, indem zunächst das pp65-EGFP mit den sequenzspezifischen Oligonukleotiden pTYB-PE-for und pTYB-PE-rev aus pTYB-PE amplifiziert wurde (siehe Tab. 2.3. und 2.10.). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *EcoRI* verdaut und in den durch

SacI und *EcoRI* linearisierten pACGHLT-C3 ligiert (siehe 2.9. und 2.12.). Der Transfervektor AcpP-GHLT-PE wurde erhalten, indem das EGFP-Gen mit den sequenzspezifischen Oligonukleotiden pEGFP-1-for und pEGFP-1-rev aus pEGFP-1 amplifiziert wurde (siehe Tab. 2.3. und 2.10.). Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *SacI* und *EcoRI* verdaut und in den durch *SacI* und *EcoRI* linearisierten pACGHLT-C3 ligiert (siehe 2.9. und 2.12.). Der Transfervektor AcpP-PE wurde erhalten, indem das pp65-EGFP-Gen aus dem prokaryontischen Expressionsvektor pTYB-PE mit den Restriktionsenzymen *BamHI* herausgeschnitten und in den durch *BamHI* linearisierten pAc373 ligiert wurde (siehe 2.9. und 2.12. und Tab. 2.3.). Nach Darstellung der rekombinanten Viren in hochtitrigen Virusstocks wurde zunächst der Zeitpunkt maximaler Expression bei Infektion von SF158-Insektzellen in einer Expressionskinetik ermittelt (siehe 2.13.5.). Der hochtitrige Virusstock diente danach zur Infektion von ca. 4×10^8 SF158-Insektzellen (siehe 2.13.6.). Die Zellen wurden zum Zeitpunkt optimaler Expression lysiert und entweder aliquotiert und bei -80°C in PBS gelagert (siehe 2.14.) oder über eine Affinitäts-Chromatographie an Metallionen aufgereinigt und danach bei -80°C gelagert (siehe 2.16.).

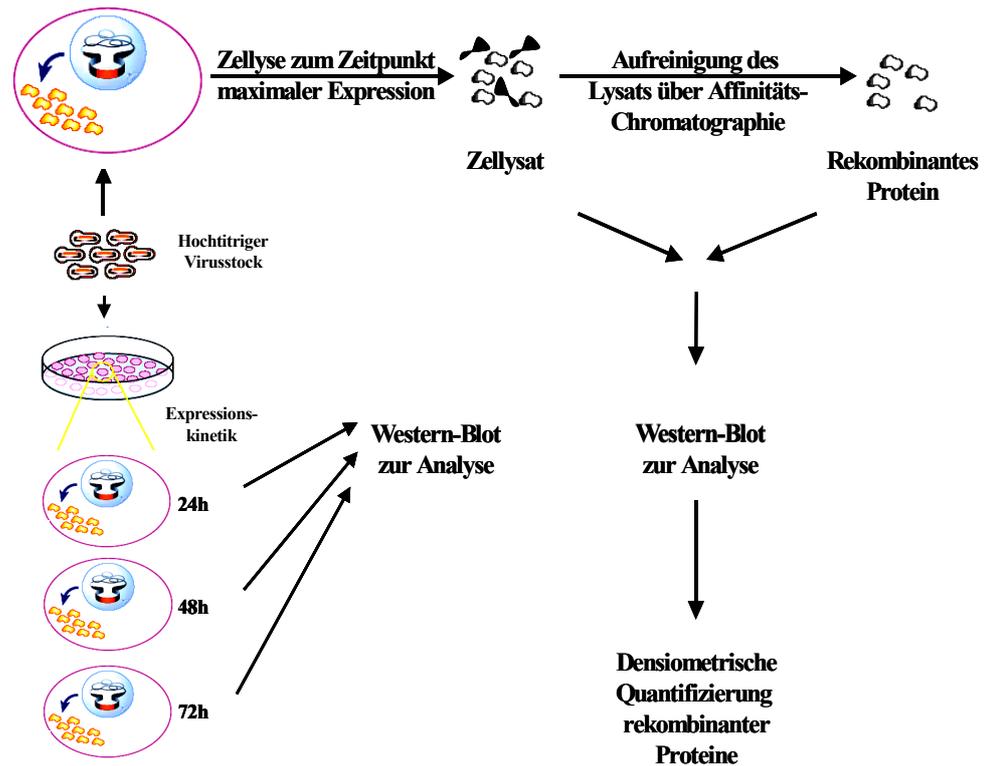


Abb. 3.2.1. Übersicht über die Darstellung rekombinanter Proteine mithilfe rAcMNPV-infizierter Insektenzellen

Mit hochtitrigen rekombinanten AcMNPVs wurde zunächst der Zeitpunkt maximaler Expression bei Infektion von SF158-Insektenzellen in einer Expressionskinetik ermittelt. Der hochtitrige Virusstock diente danach zur Infektion von ca. 4×10^8 SF158-Insektenzellen. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt optimaler Expression lysiert und entweder aliquotiert und bei -80°C in PBS gelagert oder über eine Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt und dann bei -80°C gelagert. Eine Quantifizierung der rekombinanten Proteine erfolgte über eine densitometrische Analyse.

Im Laufe der vorliegenden Arbeit wurden eine Reihe von rekombinanten Proteinen in AcMNPV-infizierten Insektenzellen exprimiert. Für die Bindungsstudien von pp65 an Zellen wurden EGFP-Fusionsproteine hergestellt, die unterschiedliche PTDs und eine um 30 Aminosäuren N-terminal verkürzte Variante des pp65 enthielten. Die Proteine waren dabei

jeweils N-terminal an EGFP fusioniert. Die PTD des HIV Tat-Proteins fusioniert an EGFP (TatPTD-EGFP), die PTD des *Drosophila* Antennapedia-Proteins fusioniert an EGFP (Penetratin-EGFP), sowie pp65 fusioniert an EGFP (pp65-EGFP) und EGFP ohne weitere Modifikationen wurden dabei durch Lyse der infizierten Zellen gewonnen. Das zur autologen Stimulation von T Zellen eingesetzte pp65 wurde ebenfalls auf diese Weise erhalten. Um die Aufnahme von pp65 und den Einfluß auf die Aktivierung von Dendritischen Zellen zu zeigen, wurden zwei Fusionsproteine mit N-terminalem GST- und 6fach Histidin- Anteil hergestellt. Im Falle von GST-6fach Histidin fusioniert an pp65-EGFP (GST-His-pp65-EGFP) und GST-6fach Histidin fusioniert an EGFP (GST-His-EGFP) wurden die Proteine nach der Lyse der Insektenzellen über eine Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt (siehe 2.16.). Eine Übersicht der exprimierten Proteine ist in Abbildung 3.2.2. dargestellt.

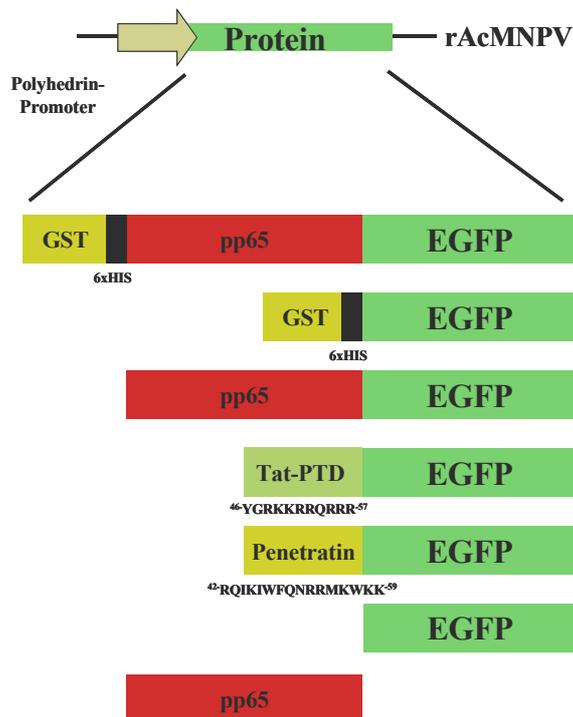


Abb.3.2.2. Übersicht über die im Laufe dieser Arbeit verwendeten Proteine
Die Proteine wurden durch rAcMNPV-infizierte Insektenzellen exprimiert. Die Proteine sind von N-Terminus links nach C-Terminus rechts dargestellt.

Die Proteine wurden nach der Expression und gegebenenfalls der Aufreinigung quantifiziert, um die Effizienzen bei der Bindung, Aufnahme, Stimulation und Reifung von humanen DCs vergleichen zu können. Zunächst wurde eine Protein-Konzentrationsbestimmung durchgeführt (siehe 2.15.). Die Reinheit von GST-His-EGFP wurde mit Hilfe eines mit Coomassie Brilliant Blue angefärbten SDS-Polyacrylamidgeles auf 90 % bestimmt. Um die Stoffmengen-konzentrationen der rekombinanten Proteine in den Insektenzell-Lysaten quantifizieren zu können, wurden zusätzlich SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen mit unterschiedlichen Verdünnungen der Proteine und Lysate durchgeführt (siehe 2.17.1.). Nach Transfer der Proteine auf eine Membran, Inkubation mit Antikörpern, die spezifisch für EGFP oder pp65 waren, sowie einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper wurden mittels einer Fluoreszenz-Reaktion Fluoreszenz-empfindliche Filme belichtet (siehe 2.18.1. und 2.18.2.). Diese dienten nach der Entwicklung zur Bestimmung der relativen Proteinkonzentrationen mit Hilfe des Vilber Lourmat BIOID V6.31-Protein-Quantifizierungs-Programmes (Abb. 3.2.3.). Durch den Vergleich mit aufgereinigtem GST-His-EGFP Protein ließen sich somit die Stoffmengenkonzentrationen sämtlicher Proteine bestimmen. Dabei wurde über das DNA-Star Programm (Version 04/95) das Molekulargewicht von GST-His-EGFP über die Aminosäure-Abfolge auf 61,36 kDa ermittelt. Mithilfe der Proteinkonzentration von 82 mg/l und der Reinheitsbestimmung (90%) konnte so die Stoffmengenkonzentration des Proteins errechnet werden. Dabei ergab sich eine Stoffmengenkonzentration von 121 nM. Eine Übersicht der erhaltenen Stoffmengenkonzentrationen sämtlicher Proteine ist in Tabelle 3.1. dargestellt. Bei den folgenden Experimenten wurden von den einzelnen Antigenen Verdünnungen gleicher Stoffmengenkonzentration in Medium hergestellt.

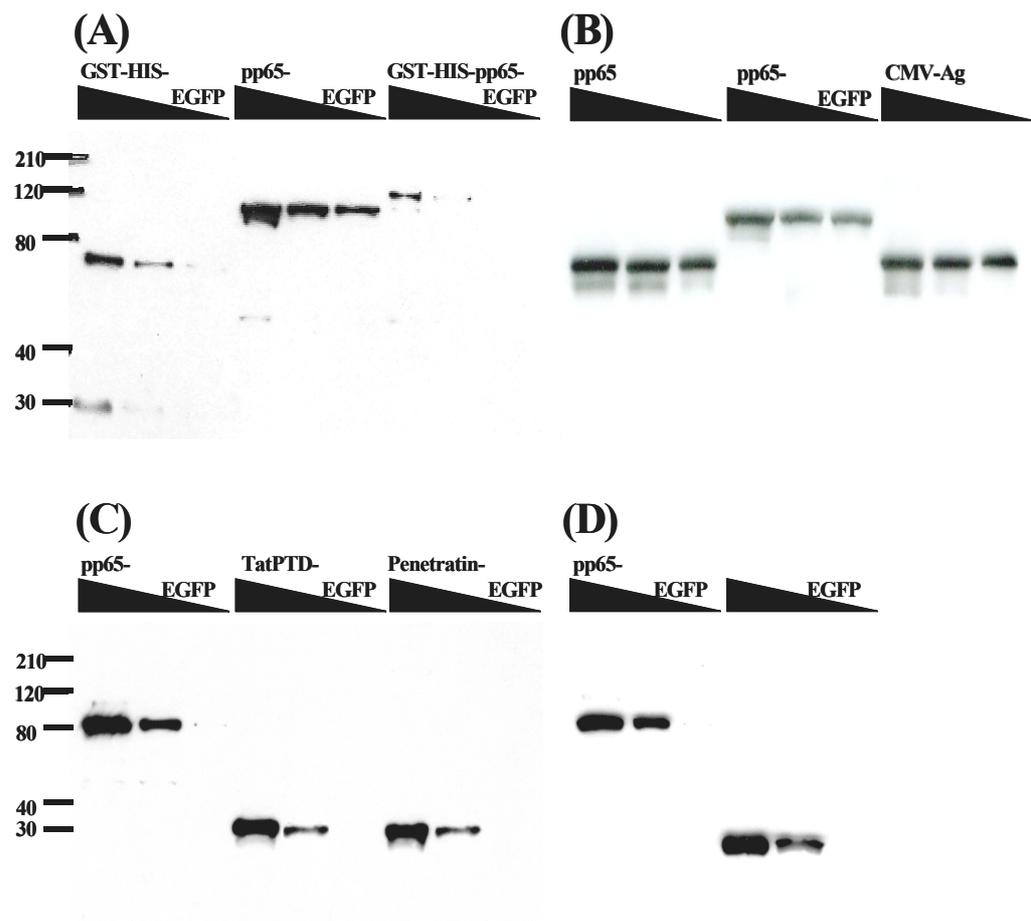


Abb.3.2.3. Quantifizierung rekombinanter Proteine

Mit den Proteinen GST-HIS-pp65-EGFP, GST-HIS-EGFP, pp65-EGFP, TatPTD-EGFP, Penetratin-EGFP, EGFP, sowie pp65 und kommerziellem CMV-Antigen (CMV-Ag) wurden in unterschiedlicher Verdünnung Western Blots mit Antikörpern gegen EGFP (A,C,D) oder pp65 (B) und einem Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper durchgeführt. Die Stoffmengenkonzentrationen wurden dann durch densitometrischen Abgleich mit pp65-EGFP ermittelt. Als Grundlage dafür diente die Stoffmengenkonzentration von aufgereinigtem GST-His-EGFP.

Tab. 3.1. Protein- und Stoffmengenkonzentrationen der verwendeten Proteine

| Fusionsprotein | Proteinkonzentration (mg/l) | Stoffmengenkonzentration (nM) |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| GST-His-pp65-EGFP | 110 | 1,4 |
| GST-His-EGFP | 82 | 121 |
| pp65-EGFP | 2280 | 33 |
| TatPTD-EGFP | 2740 | 8235 |
| Penetratin-EGFP | 3630 | 2642 |
| EGFP | 2680 | 5833 |
| pp65 | 1920 | 8,2 |

3.2.2. Das pp65-EGFP-Fusionsprotein bindet effizient an Monozyten

Protein-Antigene werden *in vivo* von DCs cross-präsentiert (den Haan *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2002; Pooley *et al.*, 2001). Ein Protein-Antigen sollte also möglichst gezielt von diese Zellen gebunden und aufgenommen werden. Im Blut befindet sich nur eine geringe Anzahl an DCs, da sie hauptsächlich in der Peripherie und in den lymphatischen Organen lokalisiert sind (Janeway *et al.*, 2001). Dies macht Untersuchungen zur Bindung an humane DCs in PBMC-Präparationen des Blutes äußerst schwierig. Monozyten dagegen sind in großer Zahl im Blut vorhanden und Vorläuferzellen der DC1. Durch ihre hohe phagozytotische Aktivität sind sie in der Lage, Pathogene aufzunehmen und zu zerstören. Sie exprimieren große Mengen an Mannose-Rezeptoren, die bei der Präsentation von Lipid-Antigenen eine Rolle spielen. Außerdem exprimieren

sie TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 und TLR8 sowie M-CSF-Rezeptor, welche auch von den aus Monozyten differenzierten DC1 exprimiert werden (Kadowaki *et al.*, 2001; Menetrier-Caux *et al.*, 1998; Palucka *et al.*, 1998).

Zunächst sollte daher getestet werden, ob die Bindung von pp65 besonders effizient an Monozyten stattfindet. Dazu wurden 2×10^6 PBMC von drei Blutspendern mit pp65-EGFP der Stoffmengenkonzentration von 33 nM oder mit dem Lysat AcMNPV-infizierter Zellen gleicher Proteinkonzentration für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle angefärbt und durchflußzytometrisch charakterisiert. Dabei wurden CD19⁺ als B Zellen, CD3⁺ Zellen als T Zellen, CD14⁺CD4⁺ Zellen als Monozyten und CD3⁻CD16⁺CD56⁺ Zellen als NK Zellen definiert (Cooper *et al.*, 2001; Hernandez-Campo *et al.*, 2006; Moretta *et al.*, 1989; Tedder *et al.*, 1994). In Abbildung 3.2.4. ist der Anteil der Populationen an der Gesamtzahl der betrachteten pp65-EGFP positiven Zellen dargestellt. Bei den betrachteten Populationen der drei Donoren ist die Population der Monozyten diejenige, welche pp65-EGFP am stärksten bindet. Abhängig vom betrachteten Spender sind 76 % bis 89 % der pp65-EGFP-positiven Zellen Monozyten, 6 % bis 13 % T Zellen, 3 % bis 8 % B Zellen und nur 1 % bis 2 % NK Zellen. Daher scheint pp65-EGFP besonders effektiv an die Vorläuferzellen der DC1 zu binden.

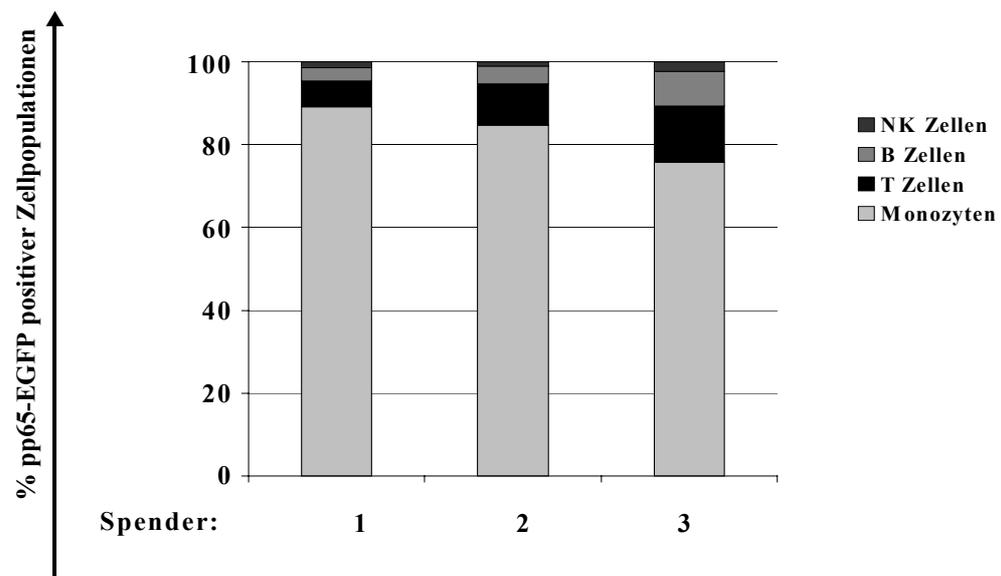


Abb.3.2.4. pp65-EGFP bindet bei Inkubation mit humanen PBMC effizient an Monozyten

2×10^6 PBMC von drei Spendern wurden mit jeweils pp65-EGFP (33 nM) und Lysat AcMNPV-infizierter Zellen gleicher Proteinkonzentration für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Oberflächenmoleküle angefärbt und durchflußzytometrisch bestimmt. Dabei wurden $CD19^+$ Zellen als B Zellen, $CD3^+$ Zellen als T Zellen, $CD14^+CD4^+$ Zellen als Monozyten und $CD3^-CD16^+CD56^+$ Zellen als NK Zellen definiert. Dargestellt ist der Anteil der Populationen an der Gesamtzahl der betrachteten pp65-EGFP positiven Zellen.

3.2.3. Vergleich von pp65 mit den Transduktionsdomänen TatPTD und Penetratin bei der Bindung an unreife humane Dendritische Zellen

Der erste Schritt bei der Cross-Präsentation eines Protein-Antigens besteht aus der Aufnahme des Proteins durch die Zelle. Dies kann Rezeptor-vermittelt oder auch mit geringerer Effizienz Rezeptor-unabhängig durch beispielsweise Makropinozytose geschehen. PTDs binden vermutlich nicht spezifisch an Rezeptoren, sondern durch elektrostatische Wechselwirkungen mit

Polyanionen an die Zelloberfläche (Leifert & Whitton, 2003). Bei In-Vivo-Immunisierungen ist die Stimulation der CD8⁺ T Zellen durch PTD-gekoppelte Immunogene im Vergleich zu einer Peptidstimulation ineffizient. Als Kandidat für ein effizientes Translokatorisches Protein sollte pp65 daher effektiver, als bereits beschriebene PTDs, an DCs binden.

Nach Darstellung von pp65, Penetratin und TatPTD mit C-terminalem EGFP-Fusionsanteil sollte zunächst die in der Literatur beschriebene durch Penetratin und TatPTD verbesserte Bindung von EGFP an DCs reproduziert werden (Batchu *et al.*, 2005). Dazu wurden 2×10^5 iDCs für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit der EGFP-Fusionsproteine TatPTD-EGFP und Penetratin-EGFP, sowie EGFP in der Stoffmengenkonzentration von 4 µM inkubiert. Als Kontrolle dienten allein mit Medium inkubierte DCs. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD1a gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.5. dargestellt.

Bei der eingesetzten Stoffmengenkonzentration von 4 µM wurde EGFP nur im geringen Maße von iDCs gebunden. Unter 1% der iDCs waren EGFP-positiv. Im Gegensatz dazu führte die N-terminale Fusion der TatPTD zu einer Verbesserung der Bindung an iDCs. Die Anzahl EGFP-positiver Zellen war auf 18% gestiegen. Durch die Fusion mit Penetratin konnte allerdings die Bindung nochmals auf 51% EGFP-positiver iDCs gesteigert werden. Die N-terminale Fusion von Penetratin und TatPTD führte also tatsächlich zu einer verbesserten Bindung von EGFP an iDCs.

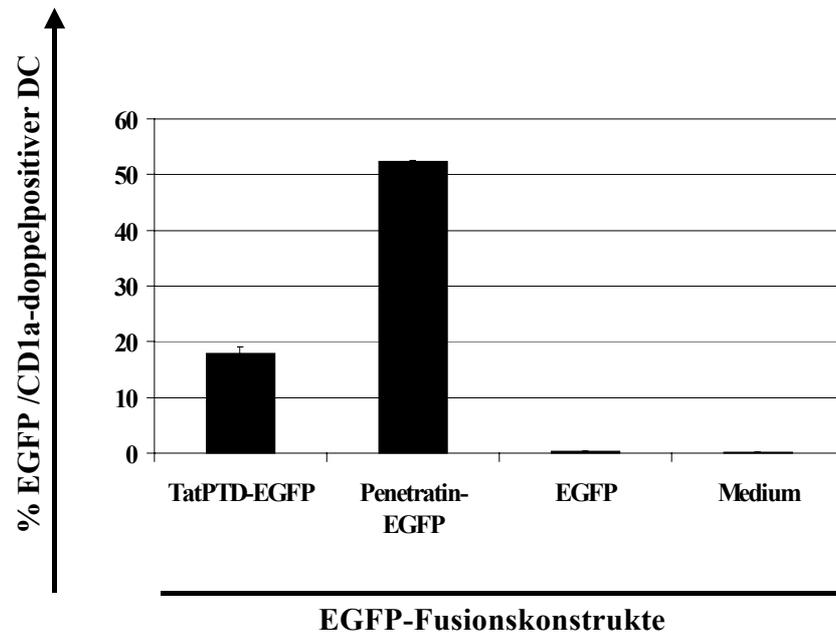


Abb. 3.2.5. Die PTD-EGFP-Fusionsproteine TatPTD-EGFP und Penetratin-EGFP binden effizient an unreife humane Dendritische Zellen

2×10^5 iDCs wurden für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit von TatPTD-EGFP, Penetratin-EGFP und EGFP (jeweils $4 \mu\text{M}$) inkubiert. Als Kontrollen dienten allein mit Medium inkubierte iDCs. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD1a gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind die Prozentzahlen CD1a-positiver Zellen, die gleichzeitig EGFP-positiv waren. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

Um die Bindung von pp65 mit Penetratin und TatPTD vergleichen zu können, wurden die Fusionsproteine mit dem C-terminalen EGFP-Fusionsanteil in gleicher Stoffmengenkonzentrationen von jeweils 33 nM und 17 nM eingesetzt. 2×10^5 iDCs zweier Blutspender wurden für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit von pp65-EGFP, TatPTD-EGFP, Penetratin-EGFP und EGFP inkubiert. Als Kontrollen dienten allein mit Medium inkubierte iDCs. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und mit

fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD1a gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.6. dargestellt.

Es zeigte sich, dass bei einer Stoffmengenkonzentration von 33 nM und 17 nM die Bindung von Penetratin-EGFP, TatPTD-EGFP und EGFP an iDCs kaum noch nachweisbar ist. Die Anzahl EGFP-positiver Zellen lag hier durchgängig bei beiden Blutspendern unter 1 %. Dagegen war die Bindung von pp65-EGFP an iDCs effektiver, bei 17 nM waren 17 %, bzw. 32 % der iDCs EGFP-positiv. Durch den Einsatz von der doppelten Menge an Protein ließ sich die Anzahl EGFP-positiver iDCs auf 26 %, bzw. 56 % ebenfalls nahezu verdoppeln.

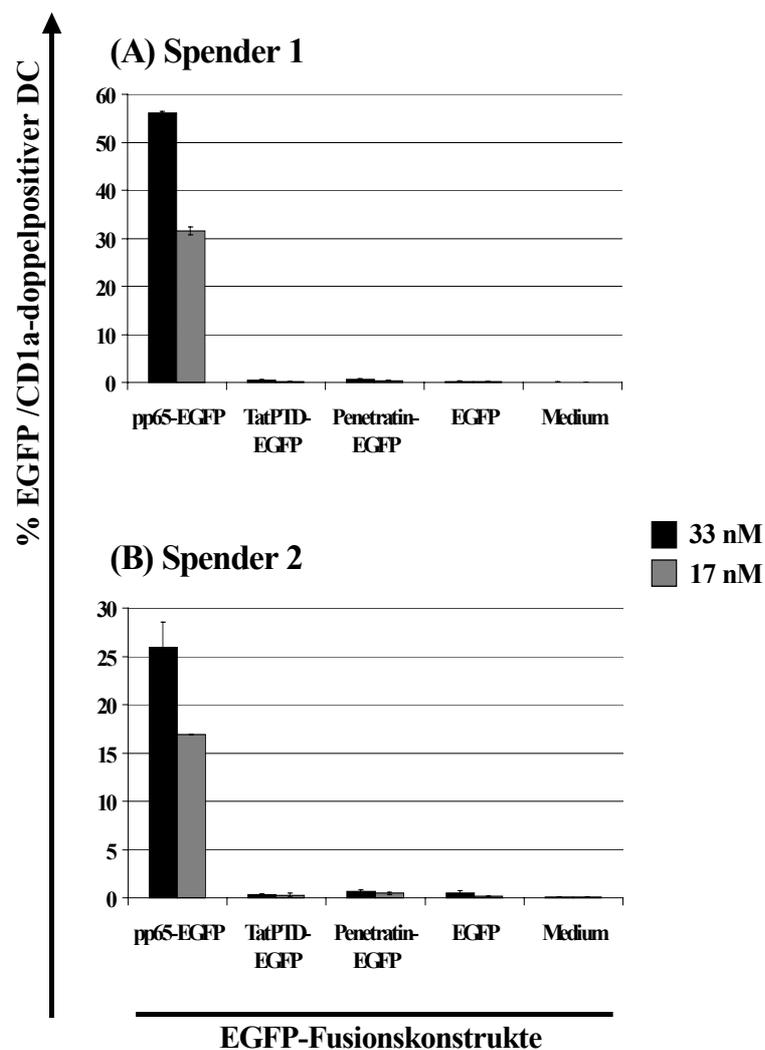


Abb. 3.2.6. pp65-EGFP bindet mit höherer Effizienz an humane Dendritische Zellen als TatPTD-EGFP und Penetratin-EGFP

2×10^5 iDCs wurden für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit der EGFP-Fusionsproteine pp65-EGFP, TatPTD-EGFP und Penetratin-EGFP, sowie EGFP (33 nM (schwarze Balken) und 17 nM (graue Balken)) inkubiert. Als Kontrolle dienten allein mit Medium inkubierte iDCs. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD1a gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind die Prozentzahlen CD1a-positiver Zellen, die gleichzeitig EGFP-positiv waren. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

3.2.4. Effiziente Aufnahme von pp65 mit N- und C-terminalem Fusionsanteil in unreife humane Dendritische Zellen

Nachdem unter 3.2.3. gezeigt werden konnte, dass pp65-Fusionsprotein im Gegensatz zu Penetratin- und TatPTD-Fusionsproteinen mit höherer Effizienz an iDCs binden, sollte im Folgenden gezeigt werden, dass pp65-Fusionsproteine von den iDCs nicht nur verbessert gebunden, sondern auch verbessert aufgenommen werden. Um gleichzeitig zu zeigen, dass die Aufnahme dabei unabhängig von der Position des Fusions-Anteils ist, wurde ein pp65-Fusionsprotein hergestellt, das neben dem C-terminalen EGFP-Fusionsanteil auch einen N-terminalen GST-6fach Histidin-Anteil besitzt (GST-His-pp65-EGFP)(siehe 3.2.1.).

Bei einer durchflußzytometrischen Analyse der Fluoreszenz-positiven Zellen nach Inkubation mit EGFP-Fusionproteinen kann man nicht unterscheiden, ob das Protein aufgenommen, oder nur an die Zelle gebunden wurde. Um dieses Problem zu lösen, ist für durchflußzytometrische Aufnahmestudien von PTD-Fusionsproteinen eine Methode beschrieben worden, bei der durch eine Trypsin-Behandlung gebundenes Protein vor der Analyse von der Zelloberfläche abgedaut wird (Loison *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2003). Diese

Methode sollte nun für den Nachweis der Aufnahme von N- und C-terminal fusioniertem pp65 herangezogen werden. 2×10^5 iDCs wurden dazu für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit der EGFP-Fusionsproteine GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP bei einer Stoffmengenkonzentration von 1,4 nM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und für 30 Minuten mit 0,25-prozentiger Trypsinlösung oder PBS bei 37°C behandelt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD1a gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.7. dargestellt.

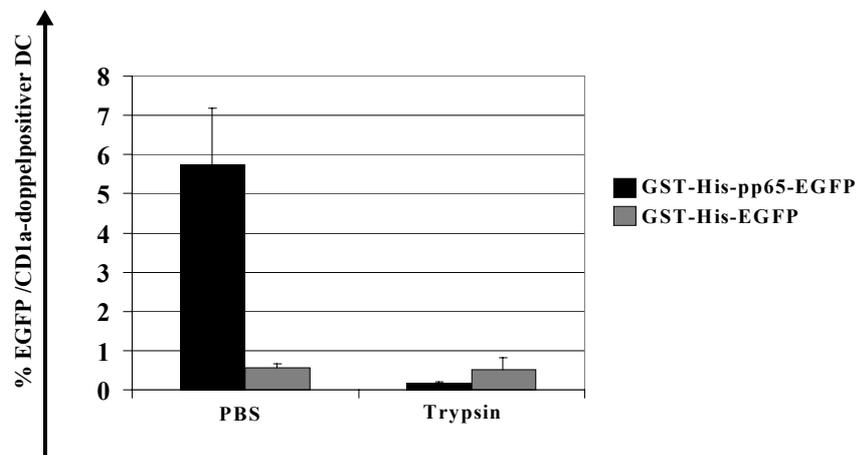


Abb. 3.2.7. Die durchflußzytometrische Analyse eignet sich nicht zum Nachweis der Aufnahme von pp65 durch humane Dendritische Zellen

2×10^5 iDCs wurden für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit der EGFP-Fusionsproteine GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP (jeweils 1,4 nM) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 30 Minuten mit 0,25-prozentiger Trypsinlösung oder PBS bei 37°C behandelt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen CD1a gefärbt. Die Auswertung erfolgte durchflußzytometrisch. Dargestellt sind die Prozentzahlen CD1a-positiver Zellen, die gleichzeitig EGFP-positiv waren. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

Das GST-His-pp65-EGFP Fusionsprotein wurde bei der eingesetzten Konzentration von 1,4 nM im Gegensatz zum GST-His-EGFP Fusionsprotein verbessert von den iDCs gebunden. 6 % der iDCs sind EGFP-positiv, im Gegensatz dazu sind nur 0,6 % der GST-His-EGFP-inkubierten iDCs EGFP-positiv. Nach der Trypsinbehandlung sinkt allerdings die Anzahl EGFP-positiver iDCs bei beiden EGFP-Fusionsproteinen auf unter 0,5 %. Möglicherweise war die eingesetzte Konzentration von 1,4 nM zu gering, um die EGFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle nachzuweisen. Die publizierten durchflußzytometrischen PTD-Aufnahmestudien wurden jedenfalls mit weit höherer Proteinkonzentration durchgeführt (Loison *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2003).

Die durchflußzytometrische Analyse nach Trypsinverdau konnte nicht zum Nachweis der verbesserten Aufnahme von pp65 herangezogen werden (siehe oben). Daher sollte die gegenüber GST-His-EGFP vermutlich verbesserte Aufnahme von GST-His-pp65-EGFP durch eine Immunfluoreszenz gezeigt werden, die das EGFP-Fluoreszenzsignal spezifisch verstärkt. Dazu wurden 2×10^5 iDCs für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit der EGFP-Fusionsproteine GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP einer Stoffmengenkonzentration von 1,4 nM inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden die Zellen gewaschen und für 30 Minuten mit 0,25-prozentiger Trypsinlösung oder PBS bei 37°C behandelt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen EGFP und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Der Zellkern wurde außerdem mit DAPI angefärbt. Danach wurden die Zellen fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.8. dargestellt. Bei der eingesetzten Menge von 1,4 nM ließ sich bei GST-His-EGFP und GST-His-pp65-EGFP-inkubierten Zellen in den iDCs ein Fluoreszenz-Signal nachweisen. Im Gegensatz zu GST-His-EGFP-inkubierten iDCs war das Fluoreszenz-Signal der GST-His-pp65-EGFP-inkubierten iDCs allerdings verstärkt. Außerdem schien hier ein höherer Anteil der iDCs Fluoreszenz-positiv zu sein. Im Gegensatz zur durchflußzytometrischen Analyse zeigte sich bei der Immunfluoreszenz nach Trypsinverdau kein Verlust des Fluoreszenzsignals. Daher nahmen iDCs pp65-Fusionsproteine tatsächlich verbessert auf.

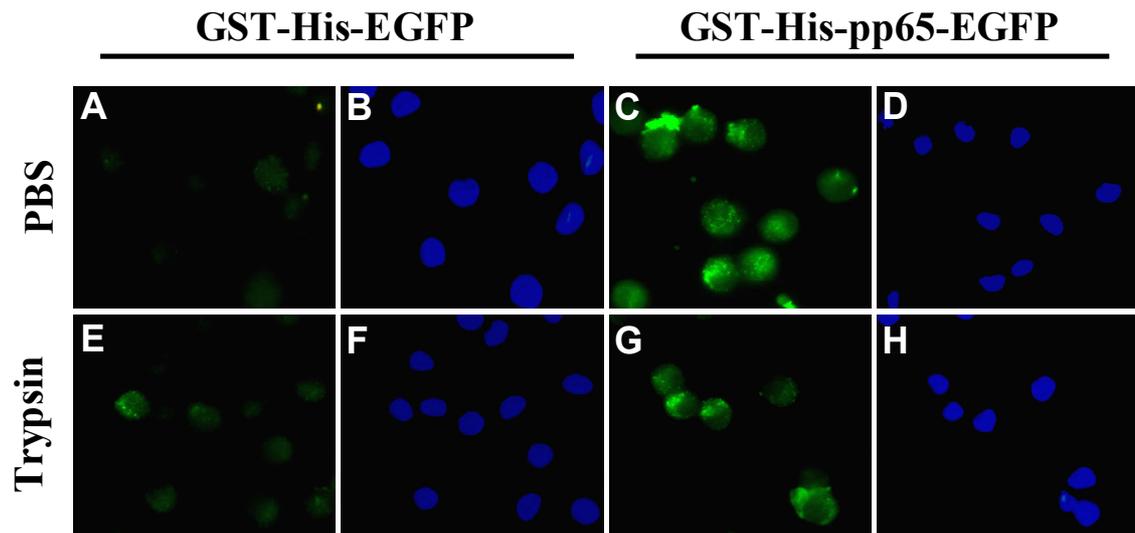


Abb. 3.2.8. Nachweis der effizienten Aufnahme von pp65 mit N- und C-terminalem Fusionsanteil in humane Dendritische Zellen durch Immunfluoreszenz

2×10^5 iDCs wurden für zwei Stunden bei 37°C in Anwesenheit der EGFP-Fusionsproteine GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP (jeweils $1,4 \text{ nM}$) inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und für 30 Minuten mit 0,25-prozentiger Trypsinlösung oder PBS bei 37°C behandelt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit Antikörpern gegen EGFP und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Der Zellkern wurde außerdem mit DAPI angefärbt. Ausgewertet wurden die Fluoreszenzen durch Fluoreszenz-Mikroskopie. Dargestellt sind die EGFP/FITC-Fluoreszenzen in grün (A,C,E,G) und die DAPI-Fluoreszenz in blau (B,D,F,H) eines repräsentativen Blutspenders von insgesamt zwei untersuchten Blutspendern.

3.2.5. Durch unreife humane Dendritische Zellen präsentiertes pp65 induziert eine antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T Zell-Stimulation

Unreife DCs sind besonders gut in der Lage, Antigene aufzunehmen und zu präsentieren. Die Antigene werden allerdings in vielen Fällen nur in Zusammenhang mit MHC-II-Molekülen präsentiert und induzieren daher meist nur humorale Immunantworten (Shedlock & Weiner, 2000). Effektiven Schutz vor Infektionen bietet jedoch meist nur die Kombination von zellulärer und humoraler Immunität. Die Präsentation von exogenen Antigenen im MHC-I-Präsentationsweg wird *in vivo* nur von DCs geleistet (den Haan *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2002; Pooley *et al.*, 2001). Bisher ist allerdings unklar, welche Eigenschaften ein Protein-Antigen aufweisen muss, um effektiv cross-präsentiert zu werden. Bei PTD-Fusionsproteinen nimmt man an, dass die PTD den Transfer der Proteine in das Zytoplasma erleichtern, wo sie dann für die MHC-I-Präsentationsweg prozessiert werden (Leifert & Whitton, 2003). Das pp65 wird im Zusammenhang mit HCMV-Virionen oder HCMV-„Dense bodies“ effektiv cross-präsentiert (Gilbert *et al.*, 1996; Grefte *et al.*, 1992; Riddell *et al.*, 1991). Die vorangegangenen Experimente hatten gezeigt, dass pp65 die Aufnahme von fusionierten Proteinen in DCs verbessert. Die Voraussetzung dafür, dass pp65 auch die Cross-Präsentation der fusionierten Proteine verbessert, wäre zunächst die effektive Cross-Präsentation von pp65 ohne Beteiligung von HCMV-Partikeln durch DCs. Dies sollte im folgenden unter Benutzung eines autologen Stimulationsmodells getestet werden.

Die Stimulation von antigenspezifischen Gedächtnis- T Zellen durch autologe DCs wurde bereits als geeignete Methode beschrieben, um die Cross-Präsentation von pp65 im Zusammenhang mit HCMV-Partikeln zu testen (Tabi *et al.*, 2001). Die DCs sollen dabei das Antigen aufnehmen und cross-präsentieren. Eine Übersicht dieser Methode ist in Abbildung 3.2.9. dargestellt. Aus humanen Leukozyten-Konzentraten (siehe 2.20.1.) wurden zunächst Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMC) isoliert (siehe 2.20.2.) und diese durch Adhärenz in Monozyten und PBL getrennt (siehe 2.20.3.). Die PBL wurden dann in flüssigem Stickstoff

eingefroren (siehe 2.5.4.), während die Monozyten über sechs Tage zu iDCs ausdifferenziert wurden (siehe 2.22.). Dann erfolgte über zwei Stunden die Inkubation der iDCs mit den Antigenen. In dieser Zeit sollten die iDCs das Antigen aufgenommen, prozessiert und präsentiert haben (Ackerman *et al.*, 2005). Um an iDCs gebundenes Antigen zu entfernen, wurden die iDCs anschließend über 30 Minuten mit 0,25 prozentigem Trypsin inkubiert und dann gewaschen. Die PBL wurden aufgetaut und zu den antigenbeladenen iDCs gegeben und nach der unter 2.23.2. angegebenen Methode stimuliert. Nach der Fixierung der Zellen wurde das Effektormolekül IFN- γ in Kombination mit CD69, was früh nach Aktivierung auf den T Zellen exprimiert wird, mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper angefärbt (Reddy *et al.*, 2004). Zusätzlich wurden noch CD4 oder CD8 mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper angefärbt, um die stimulierten T Zell-Populationen unterscheiden zu können. Die Analyse erfolgte durchflußzytometrisch.

Die Methode der Stimulation von T Zellen durch autologe iDCs setzt voraus, dass das Antigen tatsächlich von den iDCs selbst prozessiert und präsentiert wird. Um auszuschließen, dass an iDCs gebundenes Antigen durch andere Zellen aufgenommen und prozessiert wird, sollte ein Trypsinverdau der Antigen-inkubierten iDCs durchgeführt werden. Zunächst sollte daher untersucht werden, ob und inwieweit der Verdau mit Trypsin die Expression von HLA- und kostimulatorischen Molekülen beeinflusst. Dazu wurden 1×10^6 iDCs für 30min in 0,25-prozentiger Trypsinlösung oder PBS bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen gefärbt und die Expression der HLA- und der kostimulatorischen Moleküle, sowie CD83 im Durchflußzytometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.10. dargestellt und in Tabelle 3.2.2. zusammengefasst. Offensichtlich hatte der Trypsinverdau keinen Einfluß auf die Expression der Oberflächenmoleküle. Die Expression von HLA- und kostimulatorischen Molekülen war bei Trypsin-behandelten Zellen vergleichbar mit unbehandelten Zellen. Lediglich CD80 scheint im geringeren Maße auf der Oberfläche Trypsin-behandelter Zellen exprimiert zu sein. Da bei Stimulation von T Zellen durch autologe Trypsin-behandelte iDCs die Kostimulation über Antikörper geleistet wurde, war die

Bedeutung für die Stimulation der T Zellen mit dieser Methode allerdings gering. HLA-I war auf Trypsin-behandelten Zellen sogar vermehrt nachweisbar. Möglicherweise läßt sich dies durch eine schnelle Erneuerung abgedauter HLA-I-Moleküle aus der Zelle erklären (Iezzi *et al.*, 1998; Langenkamp *et al.*, 2000). Trypsin-behandelte iDCs schienen immer noch in der Lage zu sein, HLA- und kostimulatorische Moleküle an der Oberfläche zu präsentieren, was eine Voraussetzung für eine antigenspezifische Stimulation von T Zellen darstellte.

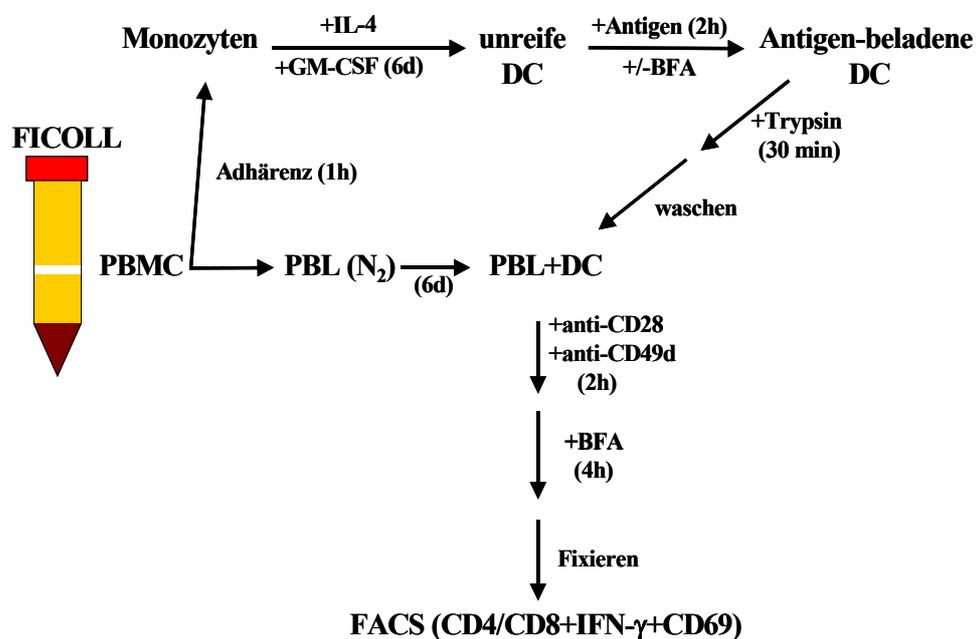


Abb. 3.2.9. Übersicht über die In-Vitro-Stimulation autologer antigenspezifischer T Zellen durch humane Dendritische Zellen

Dargestellt sind der zeitliche Verlauf und die Parameter der Stimulation autologer T Zellen durch humane DCs. Die Abbildung beschreibt die Isolierung beider Zellpopulationen, sowie den zeitlichen Verlauf der In-Vitro-Differenzierung von DCs aus humanen CD14-positiven Monozyten. Ferner stellt die Abbildung die Parameter der Antigen-Aufnahme und Behandlung der Antigen-beladenen DCs vor der Stimulation dar. Die Parameter der Stimulation und der anschließenden Analyse sind ebenfalls graphisch erfasst.

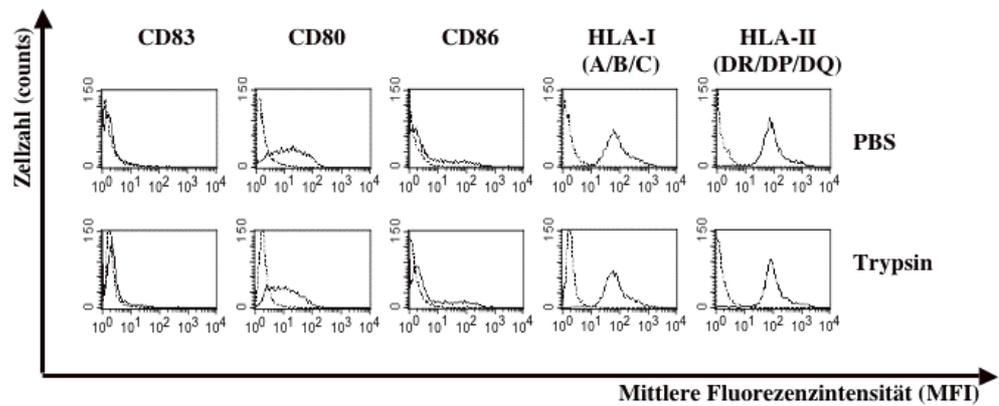


Abb. 3.2.10. Die Expression kostimulatorischer Oberflächenproteine und HLA-Moleküle auf humanen Dendritischen Zellen wird durch Trypsinverdau nur schwach beeinflusst

1×10^6 iDCs wurden für 30 min in 0,25-prozentiger Trypsinlösung oder PBS bei 37°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen gefärbt und die Expression der charakteristischen Reifungsmarker im Durchflusszytometer bestimmt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der vermessenen Zellen aufgetragen. Die durchgezogenen Linien stellen die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenantigene und die gestrichelten Linien die Hintergrundfluoreszenz dar. Die zugehörigen Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität und den prozentualen Anteil positiver Zellen sind in Tabelle 3.2.2. aufgeführt. Dargestellt sind die Werte eines repräsentativen Blutspenders von insgesamt zwei untersuchten Blutspendern.

Tab. 3.2.2.: Expression der charakteristischen Reifungsmarker auf humanen DCs nach Trypsinbehandlung

Dargestellt sind die im Durchflusszytometer bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Oberflächenantigene CD86, CD80, HLA-II und HLA-I und der prozentuale Anteil an CD83-positiven DCs nach Trypsinbehandlung

| Reagenz | Mittlere Fluoreszenzintensität | | | | Prozent |
|---------|--------------------------------|------|------------------|--------------------------|---------|
| | CD80 | CD86 | HLA-I (A/B/C) | HLA-II (DR/ DP/DQ) | CD83 |
| PBS | 27 | 36 | 275 | 258 | 1 |
| Trypsin | 13 | 38 | 354 | 280 | 1 |

Alle in diesem Experiment eingesetzten Dendritischen Zellen exprimierten zu mehr als 90 % CD1a und weniger als 2 % CD14.

Der Trypsinverdau hat nur schwachen Einfluß auf die Fähigkeit von iDCs, HLA- und kostimulatorische Moleküle zu exprimieren (siehe oben). Im Folgenden wurde daher getestet, ob pp65 durch iDCs cross-präsentiert werden kann. pp65-inkubierte iDCs sollten nach Trypsin-Behandlung neben CD4⁺ T Zellen auch CD8⁺ T Zellen antigenspezifisch stimulieren können. Dazu wurden 2x10⁶ humane iDCs für zwei Stunden mit pp65 der Stoffmengenkonzentration 0,1 nM oder mit Lysat AcMNPV-infizierter Insektenzellen gleicher Proteinkonzentration bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DCs mit Trypsin oder PBS behandelt, gewaschen und zusammen mit anti-CD28 und anti-CD49d im Verhältnis DCs zu T Zellen 1:10 oder 1:1 zu autologen PBL gegeben. Zum Vergleich der Effizienz der Cross-Präsentation durch DCs wurden parallel 2x10⁶ PBMC desselben Spenders mit pp65 oder Lysat AcMNPV infizierter Insektenzellen bei 37°C stimuliert (siehe 2.23.1.). Nach zwei Stunden wurde die Zytokinsekretion durch BFA-Zugabe inhibiert, nach weiteren vier Stunden

die Zellen fixiert und eine Färbung mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 in Kombination mit Antikörpern gegen CD69 und IFN- γ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.11. dargestellt.

Bei Durchführung des Experimentes mit Zellen eines HCMV-positiven Spenders zeigte sich, dass durch Zugabe von pp65-inkubierten, mit Trypsin-behandelten iDCs zu autologen PBL sowohl CD4⁺ (Abbildung 3.2.11 (A)), als auch CD8⁺ Gedächtnis- T Zellen (Abbildung 3.2.11. (B)) stimuliert wurden. Die Stimulation war in beiden Fällen Antigen-spezifisch, da das Lysat AcMNPV infizierter Insektenzellen bei vergleichbarer Proteinkonzentration nur eine schwache Hintergrundstimulation der Gedächtnis- T Zellen ausgelöst hat. Dafür sprach auch, dass bei einem HCMV-negativen Spender durch die pp65-inkubierten iDCs nur schwache Gedächtnis- T Zell-Antworten ausgelöst werden, die vergleichbar zu mit Lysat AcMNPV-infizierter Insektenzellen-behandelter iDCs sind. Die Stimulation durch autologe iDCs beim HCMV-positiven Spender ist in der Stärke abhängig von Verhältnis der iDCs zu den T Zellen in der PBL-Fraktion. Je mehr iDCs vorhanden sind, desto stärker die Stimulation. Sie war im Falle der CD4⁺ Gedächtnis- T Zellen bei einem gleichen Verhältnis von iDCs zu T Zellen sogar höher, als bei der Stimulation von PBMC, die ja nur sehr geringe Mengen DCs enthalten. Die Stimulation der CD8⁺ Gedächtnis- T Zellen ist bei diesem iDCs zu T Zell-Verhältnis dagegen nur genauso hoch, wie bei der Stimulation der PBMC, hier wird die Cross-Präsentation im In-Vitro-Stimulationsmodell vermutlich auch von Monozyten geleistet (Neijssen *et al.*, 2005). Die Trypsin-Behandlung der iDCs hat keinen Einfluß auf die Stimulation der T Zellen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die beobachtete Gedächtnis-T Zell-Stimulation durch über iDCs prozessiertes und präsentierte pp65 ausgelöst wurde.

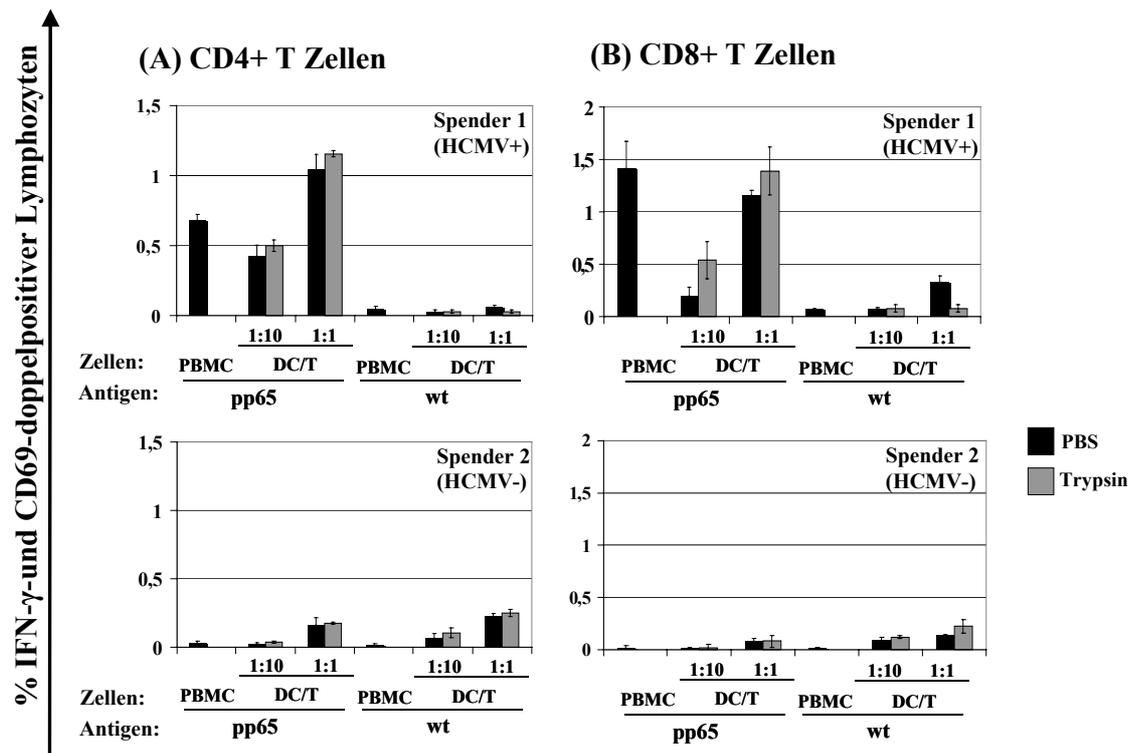


Abb. 3.2.11. Präsentation von pp65 durch autologe Dendritische Zellen stimuliert antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis- T Zell-Antworten

2×10^6 von aus Monozyten differenzierten humanen DCs wurden für zwei Stunden mit pp65 (0,1 nM) und als Kontrolle mit Lysat AcMNPV-infizierter Insektenzellen gleicher Proteinkonzentration (wt) bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DCs mit Trypsin oder PBS behandelt, gewaschen und zusammen mit anti-CD28 und anti-CD49d im Verhältnis DCs zu T Zellen 1:10 oder 1:1 zu autologen PBL gegeben. Zur Kontrolle der Stimulation wurden parallel 2×10^6 PBMC desselben Blutspenders mit pp65 (0,1 nM) oder wt bei 37°C inkubiert. Nach zwei Stunden wurde die Zytokinsekretion durch BFA-Zugabe inhibiert, nach weiteren vier Stunden die Zellen fixiert und eine Färbung mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 in Kombination mit Antikörpern gegen CD69 und IFN- γ durchgeführt. Dargestellt sind die Prozentzahlen CD69⁺IFN- γ ⁺CD4⁺ T Zellen (A) und CD69⁺IFN- γ ⁺CD8⁺ T Zellen (B) eines HCMV-positiven Blutspenders, sowie eines HCMV-negativen Blutspenders. Die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von zwei parallelen Versuchsansätzen.

3.2.6. Rekombinantes exogenes pp65 hat keinen Einfluß auf die phänotypische Reifung unreifer humaner Dendritischer Zellen

Die Induktion einer CD8⁺ T Zell-Antwort ist nicht nur abhängig von einer effizienten Cross-Präsentation des Antigens, sondern auch von einer adäquaten Aktivierung der DCs. Lösliche Faktoren, wie IFN- α (Cho *et al.*, 2002) oder TLR-Liganden, wie beispielsweise LPS (van Mierlo *et al.*, 2004) lösen bei iDCs die Expression von MHC und CD80, sowie CD86 aus und erhöhen so deren T Zell- stimulatorische Kapazität um das 100-fache (Lanzavecchia & Sallusto, 2001). Darüber hinaus können diese Faktoren die Cross-Präsentation von exogenen Antigenen steigern (Beignon *et al.*, 2003; Brimnes *et al.*, 2003; Cho *et al.*, 2002; Le Bon *et al.*, 2003; van Mierlo *et al.*, 2004; West *et al.*, 2004). Daher sollte ein ideales Protein zur Immunisierung neben einer effektiven Cross-Präsentation außerdem eine Aktivierung der DCs auslösen oder eine Aktivierung durch andere Faktoren zulassen. Daher sollte zunächst untersucht werden, ob pp65 die Expression von HLA- und kostimulatorischen Molekülen, sowie CD83 verstärkt und somit eine Aktivierung der iDCs auslöst.

1x10⁶ iDCs wurden für zwei Tage mit GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP einer Stoffmengenkonzentration von jeweils 0,1 nM kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte iDCs. Als Positivkontrolle wurden iDCs mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Expression der charakteristischen Reifungsmarker wurde nach Färbung der Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 3.2.12. dargestellt und in der Tabelle 3.2.3. zusammengefasst. Es ließ sich keine Erhöhung der Expression von HLA- und kostimulatorischen Molekülen oder CD83 durch pp65 bei den iDCs nach 48 Stunden feststellen. Im Gegensatz dazu führte LPS sehr wohl zu einer Erhöhung der Expression von HLA- und kostimulatorischen Molekülen. Nach der Inkubation mit LPS waren außerdem 8 % der iDCs CD83-positiv. Pp65 löste daher keine Aktivierung der iDCs aus.

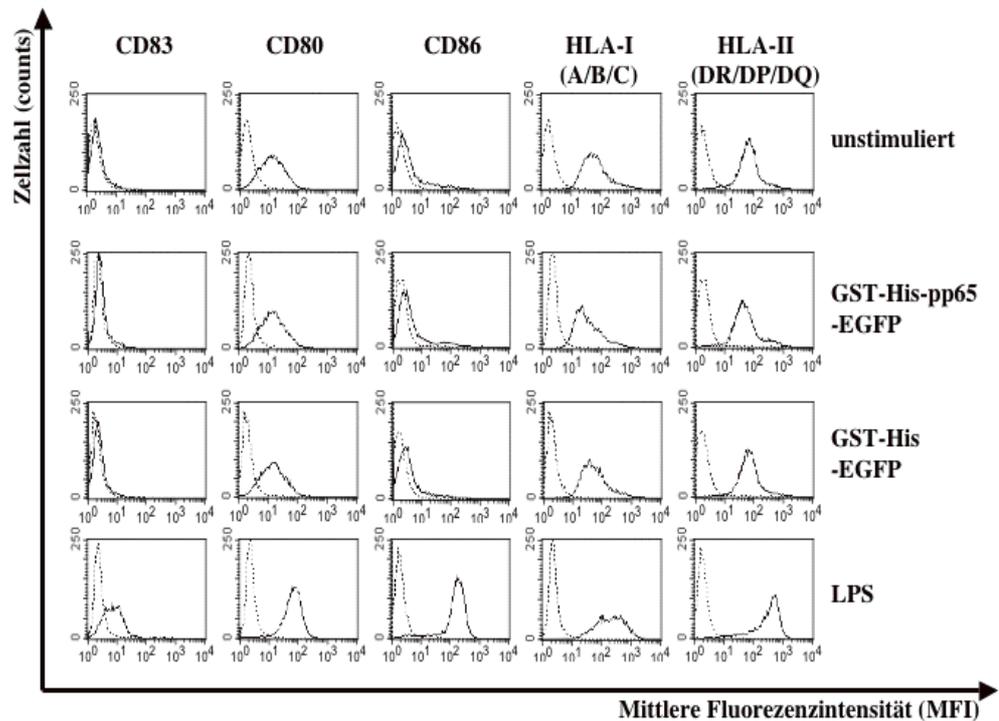


Abb. 3.2.12. Expression charakteristischer Reifungsmarker auf humanen Dendritischen Zellen in Abhängigkeit von pp65

1×10^6 iDCs wurden zwei Tage mit GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP (jeweils 0,1 nM) kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte iDCs. Als Positivkontrolle wurden iDCs mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Expression der charakteristischen Reifungsmarker wurde nach Färbung der Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer bestimmt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der vermessenen Zellen aufgetragen. Die durchgezogenen Linien stellen die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenantigene und die gestrichelten Linien die Hintergrundfluoreszenz dar. Die zugehörigen Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität und den prozentualen Anteil positiver Zellen sind in Tabelle 3.2.3. aufgeführt. Dargestellt sind die Werte eines repräsentativen Blutspenders von insgesamt zwei untersuchten Blutspendern.

Tab. 3.2.3.: Expression charakteristischer Reifungsmarker auf humanen Dendritischen Zellen in Abhängigkeit von pp65

Dargestellt sind die im Durchflusszytometer bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Oberflächenantigene CD86, CD80, HLA-II und HLA-I und der prozentuale Anteil an CD83-positiven DCs.

| Stimulus | Mittlere Fluoreszenzintensität | | | | Prozent |
|-------------------|--------------------------------|------|------------------|--------------------------|---------|
| | CD80 | CD86 | HLA-I (A/B/C) | HLA-II (DR/ DP/DQ) | CD83 |
| unstimuliert | 28 | 48 | 92 | 84 | 0 |
| GST-His-pp65-EGFP | 33 | 64 | 77 | 71 | 0 |
| GST-His-EGFP | 28 | 47 | 85 | 84 | 0 |
| LPS | 72 | 180 | 278 | 372 | 8 |

Alle in diesem Experiment eingesetzten Dendritischen Zellen exprimierten zu mehr als 90 % CD1a und weniger als 2 % CD14.

Da pp65 keine Aktivierung von iDCs induzierte, musste sie durch andere Faktoren geleistet werden, um eine effektive Stimulation von T Zellen zu induzieren. Im Folgenden sollte daher getestet werden, ob pp65 die Aktivierung von iDCs durch LPS beeinflusst. Dazu wurden 1×10^6 iDCs für zwei Tage mit 100 ng/ml LPS in Kombination mit GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP einer Stoffmengenkonzentration von jeweils 0,1 nM oder ohne Fusionsprotein-Zugabe kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte iDCs. Die Expression der charakteristischen Reifungsmarker wurde nach Färbung der Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.14. dargestellt und in der Tabelle 3.2.4.

zusammengefasst. LPS induzierte eine Expressionssteigerung von HLA- und kostimulatorischen Molekülen, sowie CD83. Durch Zugabe von GST-His-pp65-EGFP wurde die Expressionshöhe der charakteristischen Reifungsmarker der LPS- behandelten DCs nicht vermindert.

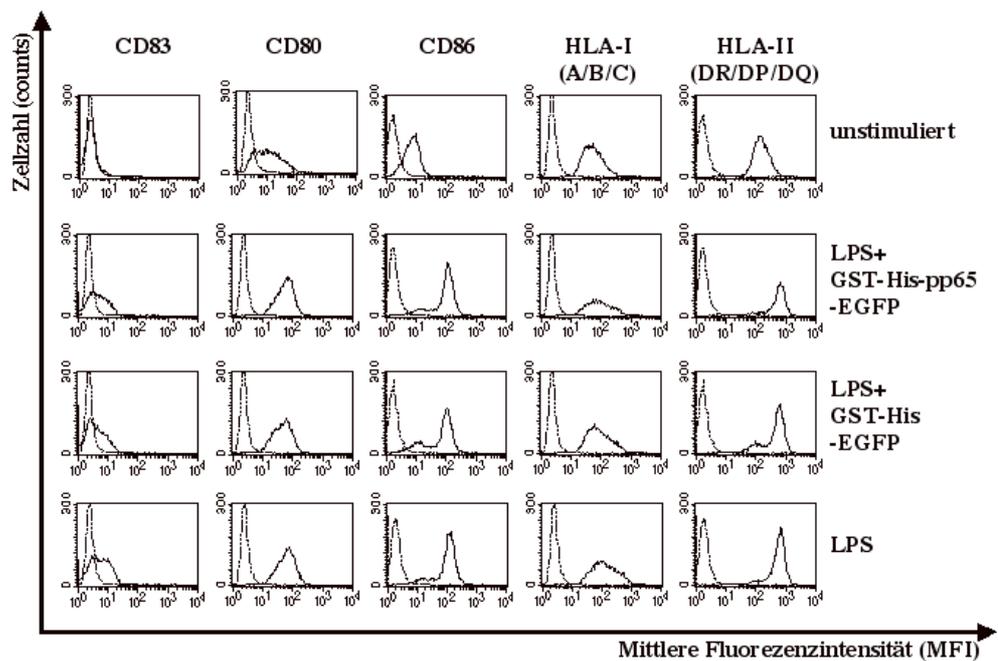


Abb. 3.2.13 Expression charakteristischer Reifungsmarker humaner LPS-stimulierter Dendritischer Zellen in Abhängigkeit von pp65

1×10^6 iDCs wurden zwei Tage mit LPS (100 ng/ml) in Kombination mit GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP (jeweils 0,1 nM) kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte iDCs. Als Positivkontrolle wurden iDCs mit LPS (100 ng/ml) inkubiert. Die Expression der charakteristischen Reifungsmarker wurde nach Färben der Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer bestimmt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der vermessenen Zellen aufgetragen. Die durchgezogenen Linien stellen die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenantigene und die gestrichelten Linien die Hintergrundfluoreszenz dar. Die

zugehörigen Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität und der prozentuale Anteil positiver Zellen sind in Tabelle 3.2.4. aufgeführt. Dargestellt sind die Werte eines repräsentativen Blutspenders von insgesamt zwei untersuchten Blutspendern.

Tab. 3.2.4. Expression charakteristischer Reifungsmarker humaner LPS-stimulierter Dendritischer Zellen in Abhängigkeit von pp65

Dargestellt sind die im Durchflusszytometer bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Oberflächenantigene CD86, CD80, HLA-II und HLA-I und der prozentuale Anteil an CD83-positiven DCs in Abhängigkeit von LPS und pp65.

| Stimulus | Mittlere Fluoreszenzintensität | | | | Prozent |
|---------------------------|--------------------------------|------|------------------|--------------------------|---------|
| | CD80 | CD86 | HLA-I (A/B/C) | HLA-II (DR/ DP/DQ) | CD83 |
| unstimuliert | 39 | 44 | 81 | 180 | 0 |
| LPS+ GST-His-pp65-EGFP | 67 | 113 | 184 | 578 | 10 |
| LPS+ GST-His-EGFP | 57 | 99 | 126 | 492 | 6 |
| LPS | 71 | 119 | 174 | 587 | 8 |

Alle in diesem Experiment eingesetzten Dendritischen Zellen exprimierten zu mehr als 90 % CD1a und weniger als 2 % CD14.

Im Gegensatz zu LPS ist IFN- α als Immunmodulator zur Humantherapie zugelassen (Lai, 2006). Endogen exprimiertes pp65 inhibiert allerdings die Induktion einer Reihe von IFN α -responsibler Proteine (Abate *et al.*, 2004; Browne & Shenk, 2003). Daher sollte im Folgenden getestet werden, ob

aufgrund der pp65-Bindung die Expression von HLA- und kostimulatorischen Molekülen, sowie CD83 inhibiert werden und damit die IFN α -induzierte phänotypische Reifung von DCs gehemmt wird. Dazu werden 1×10^6 iDCs für zwei Tage mit 1000 U/ml IFN- α in Kombination mit GST-His-pp65-EGFP und GST-His-EGFP einer Stoffmengenkonzentration von 0,1 nM kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte iDCs. Als Positivkontrolle wurden iDCs mit LPS (100 ng/ml) und IFN- α (1000 U/ml) inkubiert. Die Expression der charakteristischen Reifungsmarker wurde nach Färbung der Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.2.13. dargestellt und in der Tabelle 3.2.5. zusammengefasst. IFN- α konnte iDCs nur unvollständig aktivieren, im Gegensatz zu einer LPS-induzierten Reifung wurde die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nur geringfügig induziert. Ebenso war HLA-I auch schwächer induziert als bei LPS-stimulierten Zellen. Die Expression von CD83 wurde durch IFN- α nicht induziert, wohingegen bei LPS-stimulierten DCs 33% positiv für CD83 wurden. Die Expression von HLA-II ist dagegen vergleichbar mit der LPS-stimulierten DCs. Die Zugabe von pp65 hatte keinen Einfluß auf die unvollständige Reifung durch IFN- α . Durch Zugabe von GST-His-pp65-EGFP wurde die Expressionshöhe der charakteristischen Reifungsmarker der IFN- α - behandelten DCs nicht vermindert.

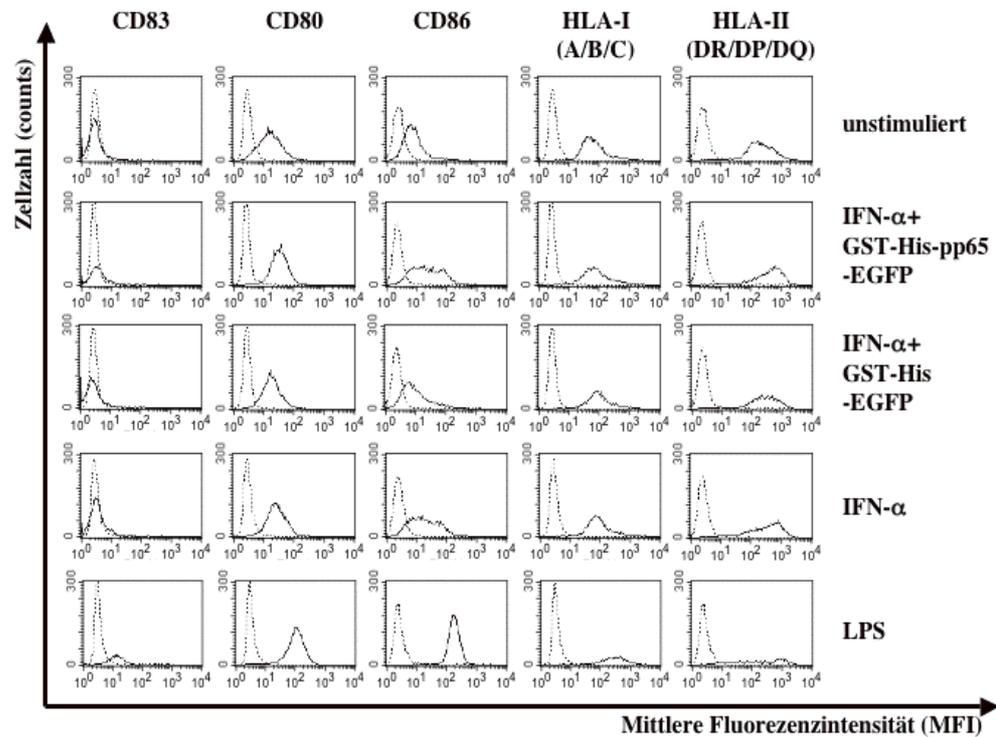


Abb. 3.2.14. Expression charakteristischer Reifungsmarker humaner IFN- α -stimulierter Dendritischer Zellen in Abhängigkeit von pp65

1×10^6 iDCs wurden zwei Tage mit 1000 U/ml IFN- α in Kombination mit GST-His-PP65-EGFP und GST-His-EGFP (0,1 nM) kultiviert. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte iDCs. Als Positivkontrolle wurden iDCs mit LPS (100 ng/ml) und IFN- α (1000 U/ml) inkubiert. Die Expression der charakteristischen Reifungsmarker wurde nach Färbung der Oberflächenmoleküle im Durchflusszytometer bestimmt. In den Histogrammen ist die mittlere Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der vermessenen Zellen aufgetragen. Die durchgezogenen Linien stellen die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenantigene und die gestrichelten Linien die Hintergrundfluoreszenz dar. Die zugehörigen Werte für die mittlere Fluoreszenzintensität und den prozentualen Anteil positiver Zellen sind in Tabelle 3.2.5. aufgeführt. Dargestellt sind die Werte eines repräsentativen Spenders von insgesamt zwei untersuchten Spendern.

Tab. 3.2.5. Expression charakteristischer Reifungsmarker IFN- α -stimulierter humaner Dendritischer Zellen in Abhängigkeit von pp65

Dargestellt sind die im Durchflusszytometer bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Oberflächenantigene CD86, CD80, HLA-II und HLA-I und der prozentuale Anteil an CD83-positiven DCs in Abhängigkeit von IFN- α und pp65.

| Stimulus | Mittlere Fluoreszenzintensität | | | | Prozent |
|--------------------------------------|--------------------------------|------|------------------|--------------------------|---------|
| | CD80 | CD86 | HLA-I (A/B/C) | HLA-II (DR/ DP/DQ) | CD83 |
| unstimuliert | 24 | 28 | 86 | 270 | 1 |
| IFN- α + GST-His-pp65-EGFP | 37 | 45 | 119 | 491 | 1 |
| IFN- α + GST-His-EGFP | 35 | 26 | 127 | 362 | 1 |
| IFN- α | 35 | 43 | 125 | 435 | 1 |
| LPS | 115 | 180 | 345 | 482 | 33 |

Alle in diesem Experiment eingesetzten Dendritischen Zellen exprimierten zu mehr als 90 % CD1a und weniger als 2 % CD14.

Nach den vorliegenden Ergebnissen wurde pp65 von iDCs effizienter, als die Tat-PTD- oder Penetratin-Fusionsproteine gebunden. Es erhöhte die Aufnahme von N- und C-terminalen Fusionsanteilen in iDCs und wurde effizient von DCs cross-präsentiert, wobei es bei geringer Stoffmengenkonzentration effiziente CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis- T Zell-Antworten induzierte. Obwohl pp65 selbst keine Aktivierung von iDCs auslöste, ließen sich pp65-inkubierte DCs durch LPS und IFN- α aktivieren. Pp65 stellt demnach ein effizientes Trägersystem für Protein-Immungene dar, um neben effektiven CD4⁺ T Zell-Antworten auch effektive CD8⁺ T Zell-Antworten zu generieren.

4. Diskussion

Nach wie vor stellen Infektionskrankheiten ein weltweites Problem dar, das sich im Zuge kurzer Reisezeiten und globaler Handelswege in jüngster Vergangenheit eher verschärft hat. Gegenwärtig sterben jährlich etwa 15 Millionen Menschen an Infektionskrankheiten. Die meisten Todesfälle ereignen sich in Entwicklungsländern, in denen Therapiemöglichkeiten nur unzureichend zugänglich sind. Daher ist gerade für diese Länder die Entwicklung von Impfstoffen essentiell.

Gegen viele Infektionskrankheiten wurden bereits Impfstoffe entwickelt, die erfolgreich gegen deren Ausbreitung eingesetzt werden und teilweise lebenslangen Schutz verleihen. So führte das konsequent durchgeführte Immunisierungsprogramm gegen Pocken schließlich 1977 zu dessen weltweiter Ausrottung (Fenner, 1982). Es gibt allerdings auch heute noch Infektionen, gegen die kein wirksamer Impfschutz existiert. Als Beispiel sei hier das humane Immundefizienzvirus (HIV) genannt. Im Jahre 2005 waren weltweit insgesamt circa 40,3 Millionen Menschen mit HIV, dem Verursacher von dem „acquired immunodeficiency syndrome“ (AIDS), infiziert. Davon starben in demselben Jahr etwa 3,1 Millionen Menschen. Die Zahl der Neuinfektionen war 2005 mit nahezu 5 Millionen sogar noch höher (UNAIDS: „Global Summary of the AIDS epidemic“ Dezember 2005). Es gibt heutzutage zwar wirksame Therapiemöglichkeiten, die den Krankheitsverlauf hinauszögern, allerdings finden sie aufgrund der hohen Kosten in Entwicklungsländern nahezu keine Anwendung. Darüber hinaus beeinträchtigen die Nebenwirkungen, die mit einer sogenannten „highly active antiretroviral therapy“ (HAART) einhergehen, die Lebensqualität der Infizierten erheblich (Bowers & Bert-Moreno, 2004; Isnard Bagnis *et al.*, 2006; Vigano *et al.*, 2005; Wyatt & Klotman, 2006).

Neben HIV stellen auch Infektionen mit dem Hepatitis C Virus (HCV) ein weltweites Problem dar. Nach Angaben der „world health organization“ (WHO) sind etwa 3 % der Weltbevölkerung mit HCV infiziert, was etwa 200

Millionen entspricht. Jährlich kommen etwa drei bis vier Millionen Neuinfektionen dazu. 85 % der Infizierten entwickeln eine chronische Infektion, die in 60 % der Fälle zur Entstehung einer chronischen Hepatitis führt (Mast *et al.*, 1999). Gegen HCV kann ebenfalls therapiert werden, was im Gegensatz zu HIV auch zu einer Eliminierung des Virus führen kann, allerdings sprechen bis zu 40 % der Infizierten nicht oder nur schlecht auf die Therapie mit Interferon und Ribavirin an (Braun & Vierling, 2003; Lai, 2000; Zeuzem, 2004). Eine Übersicht wichtiger Infektionskrankheiten, für die bisher kein Impfschutz existiert, ist in Tabelle 4.1. dargestellt.

Tab.4.1.: Infektionskrankheiten, für die kein effektiver Impfschutz existiert (basierend auf Daten der WHO 2005)

| Infektionskrankheit | Neuinfektionen pro Jahr | Todesfälle pro Jahr |
|---|-------------------------|---------------------|
| Tuberkulose | > 8 Millionen | > 1,5 Millionen |
| Masern | > 45 Millionen | 800000 |
| Wurminfektionen | -k.A.* | 17000 |
| Durchfallerkrankungen (Cholera/Rotaviren) | > 4 Millionen | > 2 Millionen |
| Atemwegserkrankungen (Grippe, SARS, RSV) | > 350 Millionen | > 4 Millionen |
| AIDS | > 5 Millionen | > 3 Millionen |
| Malaria | > 400 Millionen | > 1 Millionen |

*k.A.: keine Angabe

Klassische Immunisierungsstrategien beruhen auf einer Immunisierung durch attenuierte, vermehrungsfähige Pathogene. Attenuierte Lebendimpfstoffe besitzen eine hohe Immunogenität und induzieren starke zelluläre T Zell-Antworten (Leclerc, 2003). Im Gegensatz dazu sind inaktivierte Pathogene in der Regel nur nach wiederholter Immunisierung in der Lage, Immunität zu erzeugen. Dabei werden meist nur schwache MHC-I-restringierte CTL-Antworten induziert (Chanock *et al.*, 1988). Die Induktion einer CTL-Antwort ist jedoch von besonderer Bedeutung zum Schutz gegen intrazelluläre Erreger, wie beispielsweise Viren. Gegen HIV existiert bisher kein attenuierter Lebendimpfstoff. Die Gefahr einer Reversion zum pathogenen Wildtyp ist bei diesem Virus aufgrund seiner hohen Mutationsrate enorm (Jetzt *et al.*, 2000; Levy *et al.*, 2004; Mansky & Temin, 1995; Vartanian *et al.*, 2002). Darüber hinaus mangelt es zur Zeit noch an einem praktikablen Tiermodellsystem, da zur Zeit SIV-Infektionen von Makaken als Modell dienen, die nur bedingt die Umstände einer HIV-Infektion widerspiegeln (Koff *et al.*, 2006). Auch gegen HCV existiert noch kein attenuierter Lebendimpfstoff. Bis vor kurzen gab es kein Zellkultursystem, um HCV *in vitro* anzuzüchten und durch Passagieren oder gezielte Gendelektion zu attenuieren. Das hat sich zwar in jüngster Zeit verändert, dennoch wird die Entwicklung eines attenuierten Impfstoffs wahrscheinlich noch auf sich warten lassen (Lindenbach *et al.*, 2005; Wakita *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005). Außerdem besteht auch bei HCV aufgrund seiner hohen Mutationsrate ebenfalls die Gefahr, dass attenuierte Viren zum pathogenen Wildtyp revertieren (Bartenschlager *et al.*, 2004). Daher ist gerade bei diesen Pathogenen die Entwicklung alternativer Immunisierungs-Strategien sinnvoll.

Alternative Immunisierungs-Strategien sollten sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunität induzieren, um effektiven Schutz gegen Infektionen zu bieten. Dieser wird unter anderem durch CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen vermittelt. Die Präsentation von Antigen durch reife DCs führt zur effizienten Stimulation und Differenzierung naiver CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen in Effektor- und Gedächtnis-Zellen (Dhodapkar *et al.*, 2000; Dhodapkar *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000; Steinman *et al.*, 2000). Alternative Immunisierungs-Strategien zielen daher auf die Optimierung der antigenspezifischen

Stimulation durch reife DCs (Apostolopoulos & Plebanski, 2000; Jeannin *et al.*, 2000). Dazu werden grundsätzlich zwei unterschiedliche Wege beschrieben, die Immunisierung mittels Protein-Antigen-codierender DNA oder mittels Protein-Antigen selbst. Beide Immunisierungsmethoden zielen auf die Präsentation des Antigens durch reife DCs. Für die DNA-Immunisierung konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme nackter DNA durch DCs *in vivo* eher gering ist (Casares *et al.*, 1997). Beim Menschen bleibt wahrscheinlich hauptsächlich aus diesem Grund die Immunisierung mit nackter DNA ineffizient (Haynes *et al.*, 1996). Im Gegensatz dazu erreicht man durch die Immunisierung mit Protein-Antigenen vornehmlich nur eine Th2-Immunantwort (Shedlock & Weiner, 2000). Dabei scheint das Antigen von DCs nicht effektiv im MHC-I-Präsentationsweg prozessiert zu werden (Cross-Präsentation).

Für DNA- und Protein-Immunisierungen sind effektive Trägersysteme beschrieben, die unabhängig vom Antigen oder der kodierenden DNA das Antigen oder die DNA stabilisieren und möglichst effektiv in DCs transportieren (vgl. 1.4.3.1-3 + 1.4.4.2.). Der effektive Transport kann sowohl die direkte Präsentation von DNA-codiertem Antigen durch DCs erhöhen, als auch die Cross-Präsentation der Antigene steigern.

Im Zusammenhang mit dem Trägersystem kann außerdem ein „danger“-Signal übertragen werden, um die DCs zu aktivieren und auszureifen. In einigen Fällen liefert das Signal das Trägersystem selbst, wie bei Protein-Fusionskonstrukten mit dem „heat-shock“-Protein gp96, das eine Reifung der transduzierten DCs auslöst (Basu *et al.*, 2000). In den meisten Versuchen wurde allerdings das „danger“-Signal an das Trägersystem gekoppelt, so zum Beispiel bei der DNA-Immunisierung. Hier werden Cystidin-Guanidin-Wiederholungen, so genannte CpG-Sequenzen verwendet, da sie über TLR-9 die Reifung von DCs auslösen (Krieg, 2002). Außerdem kann systemisch ein Signal über Adjuvantien auf die DCs übertragen werden. Da allerdings zur Zeit als einziges Adjuvant Aluminiumhydroxid von der „food and drug agency“ (FDA) für die Anwendung beim Menschen zugelassen ist, finden viele der „danger“-Signale derzeit nur in experimentellen Studien Anwendung.

Schließlich kann auch im Zusammenhang mit den Trägersystemen eine Polarisation der Immunantwort erreicht werden. Beispielsweise werden Zytokine direkt an das Trägersystem gekoppelt oder Zytokin-Gene an die Antigen-kodierende DNA (Calarota & Weiner, 2004).

4.1 Rekombinantes „Autographa californica multiple nuclear polyhedrosis virus“ (AcMNPV) als Genvektor zur Expression von Antigenen in Dendritischen Zellen

Rekombinante AcMNPV werden im Tiermodell erfolgreich zur Induktion antiviraler In-Vivo-Immunantworten eingesetzt und stimulieren dabei Antigen-spezifisch und -unspezifisch das Immunsystem. Bei der Nutzung von rAcMNPV als Genvektor für eine DNA-Immunisierung ist bislang ungeklärt, ob rAcMNPV DC direkt infiziert oder ob Proteine rAcMNPV-infizierter Körperzellen cross-präsentiert werden (Aoki *et al.*, 1999; Facciabene *et al.*, 2004; Huser *et al.*, 2001). Dies wäre vor allem hinsichtlich der Nutzung von rAcMNPV bei Immunisierungen von Bedeutung, die auf direkter Infektion von DCs beruhen. Daher sollte in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob und unter welchen Umständen humane DCs durch rAcMNPVs infiziert werden. Folgende Ergebnisse wurden erhalten: (1) humane iDCs können in geringem Umfang gp64-abhängig durch rAcMNPV infiziert werden, (2) die Zugänglichkeit des rAcMNPV-Genoms für Polymerasen scheint nur einen geringen Einfluß auf die Expressionsstärke in iDCs zu haben, (3) die Infektion von iDCs erlaubt nur eine transiente Expression von Reportergenen und sinkt schnell ab, so dass bei dem Zeitpunkt optimaler Aktivierung von DCs die Expressionsstärke gering ist und (4) im Gegensatz zu iDCs können optimal aktivierte mDCs nicht von rAcMNPV infiziert werden.

Zur Induktion einer Immunantwort durch DCs ist neben anderen Parametern die Expressionsstärke des Immunogens in den DCs entscheidend. Möglichst viele MHC-Moleküle sollten mit Peptiden des prozessierten Immunogens an der Oberfläche präsentiert werden, da dies die Stimulation naiver T Zellen beschleunigt (Iezzi *et al.*, 1998). Im Laufe dieser Arbeit wurde gezeigt, dass rAcMNPVs iDCs abhängig von dem viralen gp64-Oberflächenprotein nur mit geringer Effizienz infizieren (siehe Abb. 3.1.5. und 3.1.11.). Gleichzeitig konnten aber 293 Zellen effizient infiziert werden (siehe Abb. 3.1.4.). Die verwendeten rAcMNPVs enthielten dabei Reportergene, deren Expression vom HCMV-IE-Promotor gesteuert wurde. Dieser Promotor hat einen sehr weit gefassten Wirtstropismus und ist neben unterschiedlichsten Arten von

Säugerzellen auch in Insektenzellen funktionell (Condreay *et al.*, 1999; Duisit *et al.*, 1999). Der Promotor steuert ebenfalls bei aus Monozyten differenzierten humanen DCs die effiziente Expression von Reportergenen. Daher ist davon auszugehen, dass der Promotor auch im Zusammenhang mit rAcMNPV funktionell in DCs ist (Linette *et al.*, 2000; Mangeot *et al.*, 2000).

Neben der Promotoraktivität ist der Transport viraler DNA in den Zellkern ein kritischer Faktor bei der Infektion von iDCs. Da DCs nicht teilungsaktiv sind, muss bei ihnen die virale DNA durch die Kernporen geschleust werden, um sie mit der Transkriptionsmaschinerie der Zelle zusammen zu bringen (Kis *et al.*, 2004). Es konnte allerdings bereits gezeigt werden, dass sowohl wenig teilungsaktive primäre Zellen als auch im Zellzyklus arretierte Zellen mit hoher Effizienz von rAcMNPV infiziert werden. Dabei können die Nukleokapside der Viren komplett durch die Kernporen in den Zellkern gelangen (Ho *et al.*, 2004b; Ma *et al.*, 2000; Sarkis *et al.*, 2000; van Loo *et al.*, 2001). Daher ist der Zugang von rAcMNPV-DNA zum Zellkern in den iDCs vermutlich nicht limitierend. Es konnte dagegen gezeigt werden, dass bei 293 Zellen die Bindung der Nukleokapsidproteine an das virale Genom die RNA-Polymerase an einer effizienten Reportergenexpression hindert. Die Auflockerung der Bindung durch den Histon-Deacetylase-Hemmer n-Butyrat führte zu einer starken Expressionserhöhung (siehe Abb. 3.1.9.). Dagegen war die aufgrund der n-Butyrat-Zugabe erreichte Expressionserhöhung in iDC nur schwach (siehe Abb. 3.1.10.). Daher scheinen die Nukleokapsidproteine im Gegensatz zu 293 Zellen in iDCs die Zugänglichkeit der viralen DNA für die RNA-Polymerase nur geringfügig zu hemmen.

Ein möglicher Grund für die geringe Effizienz der gp64-abhängigen Infektion von iDCs durch rAcMNPVs könnte der Mangel an Oberflächenmolekülen sein, mit denen gp64 interagieren kann. Das gp64-Protein ist bei der Infektion von Säugerzellen essentiell, um an die Zellen zu binden und einen Transport der Viruskapside aus den Endosomen zu vermitteln (Oomens & Wertz, 2004; Tani *et al.*, 2001). Bisher wurden die gp64-Rezeptoren noch nicht eindeutig identifiziert, allerdings scheinen Asialo-Glykoproteine, Heparansulfate und Phospholipide beteiligt zu sein (Boyce & Bucher, 1996; Hofmann *et al.*, 1995;

Tani *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2001). Da jedoch Zelltypen hämatopoetischen Ursprungs insgesamt nur schlecht durch rAcMNPV infizierbar sind, liegt nahe, dass möglicherweise gemeinsame Oberflächeneigenschaften für die geringe Infektionseffizienz verantwortlich sind (Cheng *et al.*, 2004; Condreay *et al.*, 1999). Dafür spricht auch, dass die effiziente Infektion von CD4⁺ T Zellen durch rAcMNPV nur durch Pseudotypisieren mit dem Env-Protein des HIV-1 erreicht wurde (Boublik *et al.*, 1995). Die Fusion von „vesicular stomatitis virus“ (VSV)-G-Protein mit gp64 erhöhte ebenfalls die Infektionseffizienz in Hepatomzellen und Neuronalzellen der Ratte (Barsoum *et al.*, 1997). Mit VSV-G Protein pseudotypisierte Lentiviren konnten bereits erfolgreich für eine bis über 90-prozentige Infektion von aus Monozyten differenzierten DC eingesetzt werden (Chinnasamy *et al.*, 2000; Granelli-Piperno *et al.*, 2000; Mangeot *et al.*, 2002). Daher könnte das Pseudotypisieren von rAcMNPV mit VSV G-Protein die Infektionseffizienz von iDC möglicherweise deutlich erhöhen.

Ein wichtiger Parameter bei der Induktion einer Immunantwort durch DCs ist die adäquate Aktivierung (=Reifung) der DCs, die die Expression kostimulatorischer Moleküle und die Expressionssteigerung von HLA-Molekülen einleitet (Banchereau & Steinman, 1998). Nicht aktivierte Zellen induzieren bei der Präsentation eines Antigenes an naive T Zellen Toleranz (Dhodapkar *et al.*, 2000; Dhodapkar *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000; Steinman *et al.*, 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass rAcMNPVs in der Lage sind, eine starke funktionelle Reifung von iDCs zu mDCs in 48 Stunden auszulösen. Dabei scheint eine Bindung des Virus an die Zelle nötig zu sein, da die rAcMNPV-induzierte Reifung von gp64 abhängig ist (Schütz *et al.*, zur Publikation eingereicht). Rekombinantes AcMNPV wäre demnach ein idealer Vektor zum Transfer von DNA in DCs. Die Expression des Reportergens in rAcMNPV-infizierten iDCs nimmt von 24 nach 48 Stunden allerdings sehr schnell ab (siehe Abb. 3.1.5.). Dabei scheint in den nicht-teilungsaktiven DCs der Abbau der viralen DNA ein Hauptgrund für den Verlust der Expression zu sein (Hu, 2005). Die MHC-I-Peptid-Moleküle an der Oberfläche der DCs werden ständig erneuert und neu beladen, so dass optimal durch rAcMNPV aktivierte DCs nach 48 Stunden möglicherweise nur noch geringe Mengen Antigen über MHC-I präsentieren (Iezzi *et al.*, 1998;

Langenkamp *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu iDCs konnten mit LPS voll ausgereifte mDCs nicht mit rAcMNPVs infiziert werden (siehe Abb. 3.1.6.). Dabei könnte möglicherweise eine Rolle spielen, dass mDCs im Gegensatz zu iDCs nur noch wenig extrazelluläres Material über Endozytose aufnehmen (Mellman & Steinman, 2001). Da rAcMNPV Säugerzellen Endozytosevermittelt infizieren, ist die Aufnahme des Virus in mDCs vermutlich ineffizient (Boyce & Bucher, 1996; Hofmann *et al.*, 1995). Außerdem ist nicht auszuschließen, dass aufgrund der Reifung von DCs die Expression von Oberflächenmolekülen inhibiert wird, die die gp64-abhängige Infektion ermöglichen (Oomens & Wertz, 2004; Tani *et al.*, 2001). Desweiteren hat der proteasomale Abbau beispielsweise bei der Infektion durch HIV-1 einen wesentlichen Einfluß auf die Infektionseffizienzen (Wei *et al.*, 2005). Daher könnte der veränderte Abbau von Proteinen in Immunproteasomen innerhalb von mDCs ebenfalls zu einer beschleunigten Degradierung der viralen Komponenten führen.

Insgesamt kann aus den vorliegenden Ergebnissen geschlossen werden, dass rAcMNPV als Genvektor für die Infektion von DCs ineffizient ist. Die Infektion von rAcMNPV *in vivo* betrifft wahrscheinlich nicht hauptsächlich DCs, da die beobachtete Infektion anderer Zellen im Gegensatz zu DCs *in vitro* viel effizienter ist. Daher ist die *in vivo* beobachtete antigenspezifische Stimulierung nur im geringen Umfang auf direkt infizierte DCs zurückzuführen. Vielmehr trägt die durch rAcMNPV induzierte Aktivierung der DC zu einer effizienten Cross-Präsentation von Immunogenen aus infizierten Nicht-DC-Körperzellen bei (siehe Abb. 4.1.). Es ist allerdings denkbar, dass das Pseudotypisieren von rAcMNPV mit beispielsweise VSV G-Protein die Effizienz der Infektion von DCs steigert (Chinnasamy *et al.*, 2000; Granelli-Piperno *et al.*, 2000; Mangeot *et al.*, 2002). Dies böte einen Ansatzpunkt zur Optimierung von rAcMNPV als virales Trägersystem zur DNA-Immunisierung.

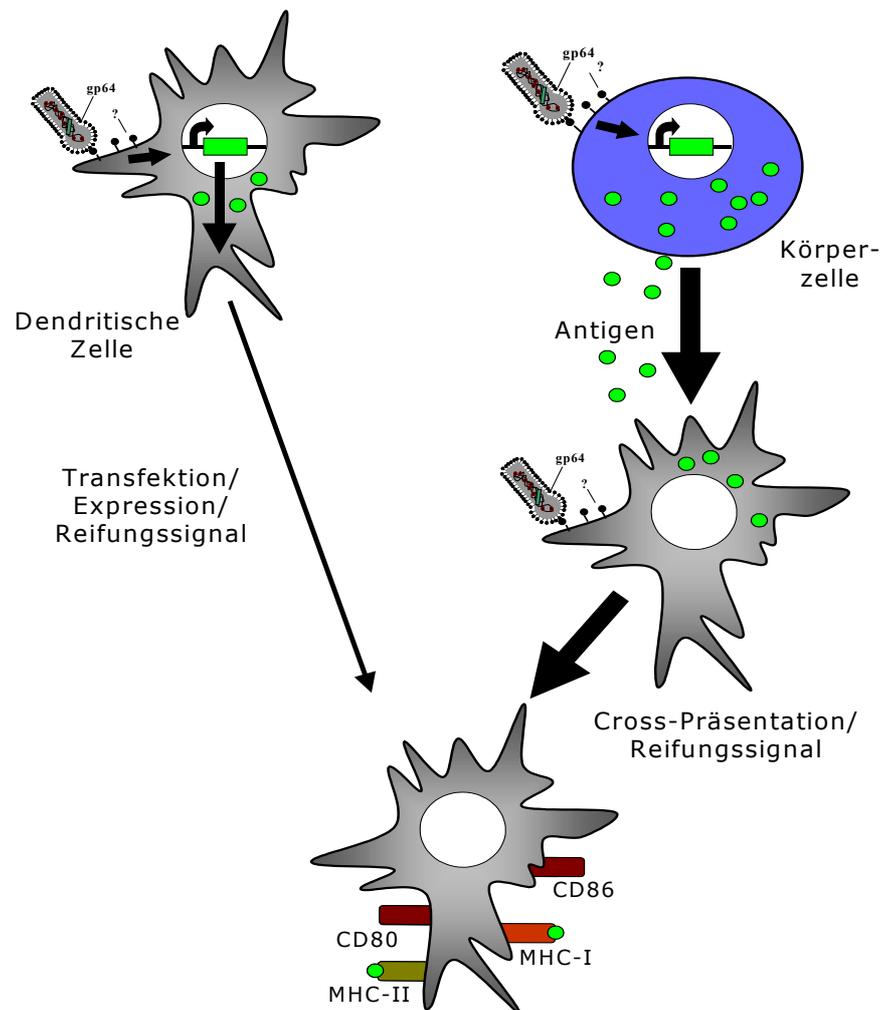


Abb. 4.1. Modell zur In-Vivo-Immunsierung durch rekombinante AcMNPV

Rekombinante AcMNPV sind nur in geringem Umfang in der Lage, DCs zu infizieren, allerdings infizieren sie sehr effizient andere Körperzellen. Sie sind außerdem in der Lage, DCs effektiv zu aktivieren. Daher wird der überwiegende Teil der Stimulation *in vivo* wahrscheinlich über cross-präsentierende DCs geleistet, die das Antigen von anderen rAcMNPV-infizierten Körperzellen aufgenommen haben. Die immunstimulatorischen Eigenschaften von rAcMNPVs können die Effizienz der Cross-Präsentation dabei positiv beeinflussen.

4.2 HCMV-pp65, ein virales Protein als Transportmittel für Antigene

Zur Induktion zellulärer Immunantworten durch Protein-Immunisierung muss das Antigen *in vivo* von aktivierten DCs cross-präsentiert werden (den Haan *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2002; Pooley *et al.*, 2001). Dabei kann das Koppeln von Antigenen an PTD oder Translokatorische Proteine den Transport der Antigene in den Cross-Präsentationsweg erhöhen (Kim *et al.*, 1997; Leifert *et al.*, 2001; Pietersz *et al.*, 2001; Shibagaki & Udey, 2002; Wang *et al.*, 2002). Das virale HCMV-Protein pp65 stellt einen Kandidaten als Transportmittel für Antigene in den Cross-Präsentationsweg dar, da es im Zusammenhang mit HCMV-Virionen effizient cross-präsentiert werden kann und eine PTD-ähnliche Domäne besitzt. Es sollte daher in diesem Teil der Arbeit untersucht werden, ob pp65-gekoppelte Proteine effizient an iDCs binden und aufgenommen werden. Außerdem sollte die von HCMV-Virionen unabhängige Cross-Präsentation von pp65 durch DCs gezeigt und der Einfluß von pp65 auf die DC-Aktivierung untersucht werden. Folgende Ergebnisse wurden erhalten: (1) pp65 wird von iDC effizienter als die Tat-PTD oder Penetratin gebunden, (2) pp65 erhöht die Aufnahme von N- und C- terminalen Fusionsproteinen in iDCs, (3) pp65 wird effizient von DC cross-präsentiert, wobei es bei geringer Stoffmengenkonzentration effizient CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T Zell-Antworten induziert und (4) pp65 löst keine Aktivierung von iDC aus, es läßt dagegen aber die Aktivierung der DCs durch LPS und IFN- α zu.

Protein-Antigene werden *in vivo* nur von DCs cross-präsentiert (den Haan *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2002; Pooley *et al.*, 2001). Ein Protein-Antigen sollte also von diesen Zellen möglichst effizient gebunden werden. Bei Vergleich der Bindung von TatPTD- und Penetratin- fusioniertem EGFP mit pp65- fusioniertem EGFP zeigte sich, dass pp65-EGFP mit weit höherer Effizienz an iDCs bindet, als die anderen Fusionsproteine oder EGFP ohne Fusionsanteil (siehe Abb. 3.2.5. und 3.2.6.). Während die Bindung von pp65-EGFP schon ab einer Konzentration von 17 nM gut nachweisbar war, ließ sich eine ähnlich effektive Bindung von TatPTD-EGFP und Penetratin-EGFP an iDCs nur mit über einer 100fach erhöhten Konzentration erreichen. Dennoch waren die TatPTD- und Penetratin-EGFP-Fusionsproteine gegenüber EGFP erheblich

effizienter (siehe Abb. 3.2.5). Je nach Zelltyp, der auf eine Bindung von PTD-Fusionskonstrukten in der Vergangenheit getestet wurde, ließ sich diese bei einer Konzentration von 0,06 bis 40 μM nachweisen. (Batchu *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2000; Loison *et al.*, 2005; Lundberg *et al.*, 2003; Richard *et al.*, 2003; Shen *et al.*, 2004; Zoog *et al.*, 2004). Dabei wurde bei aus Monozyten differenzierten humanen DCs eine effiziente Transduktion mit PTD-Fusionskonstrukten bei einer Konzentration von 3 μM beobachtet (Batchu *et al.*, 2005). Die PTD-Fusionskonstrukte binden vermutlich über Ionen-Wechselwirkungen an Heparansulfate, die auch auf iDCs zahlreich vorhanden sind (Bousarghin *et al.*, 2005; Falnes *et al.*, 2001; Mai *et al.*, 2002). pp65 bindet effizienter an iDCs, daher liegt nahe, dass die Bindung von pp65 über andere Mechanismen als die Interaktion mit Polyanionen vermittelt wird. Der Interaktionspartner von pp65 auf den iDCs ist nicht bekannt. Die Bindung eines spezifischen Rezeptors auf den iDCs würde allerdings wahrscheinlich auch die nach der Bindung erfolgende Aufnahme verbessern, da eine rezeptorvermittelte Aufnahme generell deutlich effizienter abläuft (Arora & Leppla, 1994; Arora *et al.*, 1994; Falnes *et al.*, 2001; Wiedlocha *et al.*, 1994). Für das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors für pp65 spricht, dass pp65-EGFP nicht von allen Zellen des Blutes gleich gut gebunden wird. Bei Inkubation von pp65-EGFP mit humanen PBMC wurde der weitaus größte Anteil der Fusionsproteine (76 % bis 89 %) von Monozyten gebunden (siehe Abb. 3.2.4.). Da Monozyten und aus Monozyten differenzierte iDCs viele Oberflächenmoleküle gemeinsam haben, ist denkbar, dass pp65 über denselben Rezeptor an Monozyten und an iDCs bindet (Kadowaki *et al.*, 2001; Menetrier-Caux *et al.*, 1998; Palucka *et al.*, 1998).

Die Voraussetzung für eine effektive CD4^+ und CD8^+ T Zellstimulation durch exogene Antigene ist die effektive Aufnahme durch DCs. Es konnte gezeigt werden, dass pp65 in der Lage ist, die Aufnahme von N- und C-terminalen Fusionsanteilen in iDCs zu erhöhen. Die in der Literatur beschriebenen Nachweismethoden zur Aufnahme von PTD-Fusionsproteinen umfassen sowohl durchflusszytometrische Analysen, als auch die Fluoreszenz- oder Immunfluoreszenzmikroskopie (Leifert & Whitton, 2003). Durchflusszytometrisch läßt sich allerdings nicht unterscheiden, ob die

Proteine nur gebunden oder tatsächlich aufgenommen wurden. Ein interessanter Ansatz zum durchflusszytometrischen Nachweis der Aufnahme ist die von Richard *et al.* beschriebene Methode, bei der die bei einer Konzentration von 0,2 μM bis zu 10 μM eingesetzten PTD-Fusionsproteine vor der Analyse von der Zelloberfläche durch Trypsin abgedaut werden (Loison *et al.*, 2005; Richard *et al.*, 2003). So kann die Aufnahme der PTD-Fusionsproteine leicht quantifiziert werden. Es zeigte sich allerdings, dass die verwendete Konzentration des GST-His-pp65-EGFP-Fusionsproteins von 1,4 nM nicht ausreicht, um die Aufnahme nach Trypsinverdau im Durchflußzytometer direkt zu quantifizieren (siehe Abb. 3.2.7.). Erst nach Verstärken des Signals durch Färben des EGFP-Fusionsanteils mit EGFP-spezifischen Antikörpern war eine deutlich effizientere Aufnahme der Fusionsanteile vermittelt durch pp65 fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar (siehe Abb. 3.2.8.).

Da pp65 augenscheinlich die Bindung und die Aufnahme von Fusionsproteinen an iDCs vermittelt, ist anzunehmen, dass es die Präsentation der Fusionsproteine im MHC-II-Präsentationsweg erhöht. Pp65 sollte als effektives Trägersystem für Antigene aber auch in der Lage sein, die fusionierten Antigene in den Cross-Präsentationsweg zu schleusen, um eine effektive Präsentation über MHC-I zu vermitteln. Eine Voraussetzung dafür ist, dass das exogene pp65 selbst effektiv cross-präsentiert wird. Bei einer geringen Proteinkonzentration von 0,1 nM konnte exogenes pp65 von Trypsin-behandelten iDCs sowohl im MHC-II-Präsentationsweg, als auch im MHC-I-Präsentationsweg prozessiert werden. Die Induktion von Gedächtnis- T Zell-Antworten war durch die pp65-Peptide präsentierenden iDCs genauso hoch oder höher als bei mit exogenem pp65 stimulierten PBMC (siehe Abb. 3.2.11). Die beobachtete Cross-Präsentation von pp65 in PBMC wird in diesem Ex-Vivo-Stimulationssystem vermutlich von Monozyten geleistet (Neijssen *et al.*, 2005). Dennoch scheint pp65 mit derselben Effizienz auch von iDCs cross-präsentiert zu werden. Dies ist eine Voraussetzung für den Einsatz bei einer In-Vivo-Immunisierung, da die Induktion von T Zellantworten *in vivo* von der Cross-Präsentation von DCs abhängig ist. Die Induktion von T Zell-Antworten

ist außerdem vergleichsweise effizient, da mit bekannten PTD erst bei hohen Proteinkonzentrationen von 0,1 μM eine Stimulation durch fusionierte Antigene nachweisbar ist (Bennett *et al.*, 2002; Shibagaki & Udey, 2002). Mit pp65 wurde eine effiziente Stimulation der T Zellen in einem Konzentrationsbereich erreicht, bei dem sonst nur mit Peptiden effektiv stimuliert wird (Leifert & Whitton, 2003). Die Fusion von TatPTD und Penetratin an pp65 führte zu keiner Erhöhung der pp65-spezifischen Gedächtnis-T Zell-Antworten im humanem Vollblut oder PBMC-Präparationen HCMV-positiver Blutspender (Persönliche Mitteilung R. Furtwängler, Institut für Virologie, Universitätskliniken Homburg/Saar und Daten nicht gezeigt). Dies spricht ebenfalls für die hohe Effizienz von pp65 bei der Aufnahme im Vergleich zu TatPTD und Penetratin.

Für die Verwendung von pp65 als Trägersystem für Antigene *in vivo* ist außerdem von Interesse, ob das Protein einen Einfluß auf die Aktivierung von iDCs hat. Denn nur wenn Peptid-MHC-Moleküle im Zusammenhang mit kostimulatorischen Molekülen auf aktivierten mDCs präsentiert werden, wird eine effektive antigenspezifische Stimulation von T Zellen induziert (Dhodapkar *et al.*, 2000; Dhodapkar *et al.*, 2001; Jonuleit *et al.*, 2000; Steinman *et al.*, 2000). Da pp65 selbst keine Aktivierung von iDCs induziert (siehe Abb. 3.2.12.), muss die Aktivierung über alternative Stimuli erreicht werden. Bei der Immunisierung sind diese Substanzen als Adjuvanzien bekannt. Immunstimulatorische Moleküle wie Lipopolysaccharid (LPS), Cholera Toxin (CT), CpG-Sequenzen von bakterieller DNA und Zytokine wie IL-2 und IL-12 gehören zu den nicht-partikulären Adjuvanzien (Heath, 1995a; Heath, 1995b; Krieg *et al.*, 1995; Lycke, 1997; Ulrich & Myers, 1995). LPS aktiviert dabei DCs durch eine Interaktion mit TLR4, wohingegen bakterielle CpG-Sequenzen eine Aktivierung über TLR9 induzieren und dabei die autologe Reifung über exprimiertes IFN- α einleiten (Kaisho & Akira, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass IFN- α *in vitro* zu einer partiellen Reifung von DCs führt, die in der Stärke allerdings der LPS-induzierten Reifung unterliegt (siehe 3.2.14.). Die pp65-Fusionsproteine hatten keinen Einfluß auf die IFN- α -induzierte DC-Reifung (siehe 3.2.14.). Sie scheinen im Gegensatz zu endogen exprimiertem pp65 IFN- α -responsive Gene nicht zu beeinflussen (Abate *et al.*,

2004; Browne & Shenk, 2003). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass systemisch appliziertes IFN- α auch zu einer Reifung von DCs *in vivo* führt (Luft *et al.*, 1998; Montoya *et al.*, 2002). Zudem ist IFN- α ein Faktor, der bei viraler Infektion cross-präsentierende DCs zum Cross-Priming aktiviert (Beignon *et al.*, 2003; Brimnes *et al.*, 2003; Le Bon *et al.*, 2003). Systemisch wird IFN- α bei der Therapie von beispielsweise chronischen HCV-Infektionen bereits eingesetzt (Lai, 2006). Da IFN- α bei systemischer Applikation allerdings auch Nebenwirkungen wie Fieber und Gliederschmerzen verursacht, ist vermutlich eine direkte Kopplung von über reifungsinduzierende TLR-bindenden Proteinen oder Motiven an pp65 sinnvoller. Dadurch wäre gewährleistet, dass nur solche DCs aktiviert werden, die pp65-Fusionsproteine auch gebunden und aufgenommen haben. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass pp65-Fusionsproteine die über TLR-4 induzierte Reifung durch LPS nicht inhibierten (siehe Abb. 3.2.13.). Somit ist die Aktivierung von iDCs *in vivo* im Zusammenhang mit pp65-fusionierten TLR-Liganden oder durch systemische Applikation von IFN- α möglich.

Das im Laufe dieser Arbeit verwendete Expressionssystem rAcMNPV-infizierter Insektenzellen erlaubt die simultane Expression multipler Proteine (Ho *et al.*, 2004a; Hu *et al.*, 2003; Lenz *et al.*, 2001; Schiller & Lowy, 2001; Tegerstedt *et al.*, 2003; Xiang *et al.*, 2002). Da pp65 simultan sowohl N-terminale, als auch C-terminale Fusionsproteine in iDCs transportiert, könnte pp65 also einerseits an das Antigen und andererseits an ein reifungsinduzierendes Protein gekoppelt werden (siehe 3.2.8.). Dazu würde sich beispielsweise gp96, ein zelluläres Heat-Shock-Protein, anbieten. Es bindet an CD91 auf DCs und induziert dabei die Reifung der Zelle (Basu *et al.*, 2000; Binder *et al.*, 2000; Singh-Jasuja *et al.*, 2000).

Der Einsatz von pp65 als Transportsystem für fusionierte Antigene böte auch die Möglichkeit einer simultanen Immunisierung gegen HCMV. Für pp65 sind ein Großteil der HCMV-spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T Zellen spezifisch, allerdings werden nur wenige Antikörper gegen pp65 gebildet (Beninga *et al.*, 1995; Khattab *et al.*, 1997; Ohlin *et al.*, 1991; Ohlin *et al.*, 1995; Wills *et al.*, 1996). Für die Kontrolle der HCMV-Infektion sind allerdings hauptsächlich die

T Zell-Antworten entscheidend, so dass eine Immunisierung mit pp65-Fusionsproteinen möglicherweise vor HCMV-Infektionen schützt (Glowacki & Smaill, 1994; Riddell *et al.*, 1992). Ob allerdings pp65-fusionierte Proteine auch effizient cross-präsentiert werden und Immunität erzeugen, ist zur Zeit noch ungeklärt. Diese Frage soll in Zukunft im LCMV-Mausmodellssystem unter Verwendung pp65-fusionierter LCMV-Epitope geklärt werden. Für die Applikation pp65-fusionierter Antigene im Menschen sollte außerdem geklärt werden, ob die existierende Immunität gegen pp65 in HCMV⁺ Personen zu einem Abtöten der antigenpräsentierenden Zellen führt. Ob dies der Fall ist, kann in einem MCMV-Mausmodell untersucht werden, da eine Reihe von pp65-Epitopen auch bei der Maus erkannt werden (Diamond *et al.*, 1997; Schmolke *et al.*, 1995). Sollte pp65 in MCMV-positiven Mäusen keine Cross-Präsentation fusionierter Antigene induzieren, müssen weitere Anstrengungen unternommen werden, um die relevanten Domänen in pp65 einzugrenzen, die die effektive Cross-Präsentation vermitteln.

pp65 stellt sich in der Zusammenfassung der erhaltenen Ergebnisse als vielversprechendes System dar, um N- oder C-terminal fusionierte Proteine effektiv in den Cross-Präsentationsweg von DCs zu schleusen. Es bindet effektiver, als herkömmliche PTDs oder translokatorische Proteine an DCs, vermittelt eine effiziente Aufnahme fusionierter Proteine und wird selbst sehr effizient von DCs cross-präsentiert. Obwohl pp65 selbst keine Aktivierung von DCs induziert, erlaubt das Expressionssystem neben der Fusion von Antigenen die Fusion reifungsinduzierender Proteine. Weiterführende Experimente werden hierbei Aufschluß darüber geben, ob pp65-fusionierte Antigene tatsächlich effektive CTL-Antworten induzieren und ob eine vorhandene Immunität gegen pp65 die Präsentation der fusionierten Antigene negativ beeinflusst.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden unterschiedliche Verfahren zur Induktion von zellulären Immunantworten untersucht, die vor allem einen Schutz gegen intrazelluläre Erreger, wie virale Infektionen bieten sollen. *In vivo* sind hauptsächlich DCs in der Lage, effizient naive T-Zellen zu stimulieren und so primäre Immunantworten zu induzieren. Außerdem sind DCs die einzigen Zellen, die Protein-Antigene *in vivo* im MHC-I-Präsentationsweg prozessieren und so ein Cross-Priming von T Zellen induzieren können. Strategien, die die Expression oder die Präsentation eines Antigens in DCs *in vivo* und *in vitro* ermöglichen, würden demnach eine erfolgsversprechende Immunisierungs-Strategie darstellen. Darauf basierend wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht: (1) ob und in welchen Rahmen DCs bei Immunisierungs-Strategien mit "*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus" (AcMNPV) transfiziert werden und (2) ob das HCMV-Tegumentprotein pp65 Eigenschaften aufweist, die es als potentiell Trägersystem für Proteinantigene in den Cross-Präsentationsweg von iDCs geeignet macht.

- (1) Es konnte in Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass humane iDCs in geringem Umfang gp64-abhängig durch rAcMNPV infiziert werden. Dies erlaubt eine transiente Expression von Reportergenen in den iDCs. Allerdings sinkt die Expression schnell ab, so dass zu dem Zeitpunkt optimaler Aktivierung der DCs durch AcMNPV die Expressionsstärke gering ist. Im Gegensatz zu iDCs können hingegen optimal aktivierte mDCs nicht von rAcMNPV infiziert werden. Da AcMNPV im hohen Grade in der Lage ist, DCs zu aktivieren, aber nur mit geringer Effizienz die iDCs infiziert, ist die Immunisierung mit rAcMNPV *in vivo* demnach wahrscheinlich von der Cross-Präsentation von Antigenen aus infizierten Körperzellen abhängig.

- (2) Das HCMV-Tegumentprotein pp65 vermittelt eine effizientere Bindung gekoppelter Proteine an iDCs, als die beschriebenen Protein-Transduktionsdomänen TatPTD und Penetratin. Außerdem vermittelt pp65 die Aufnahme fusionierter Proteine in iDCs. Darüber hinaus wird pp65 in iDCs effizient in den Cross-Präsentationsweg geschleust und induziert bei geringer Stoffmengenkonzentration $CD4^+$ und $CD8^+$ Gedächtnis- T Zell-Antworten. Obwohl pp65 keinen Einfluß auf die Aktivierung von DCs hat, stellt es ein vielversprechendes System dar, um fusionierte Proteine in den Cross-Präsentationsweg von DCs zu schleusen. In Kombination mit einem Adjuvans könnten so effektive zelluläre Immunantworten induziert werden.

Die getesteten Systeme zur DNA- als auch Protein-Immunisierung sind beide Kandidaten zur Induktion von zellulären Immunantworten. Sie besitzen spezifische Eigenschaften, beispielsweise führt AcMNPV zu einer sehr effizienten Aktivierung von DCs, pp65 dagegen nicht. Andererseits ist die Effizienz der Infektion von iDCs durch AcMNPV gering, während pp65 sehr effizient von iDCs cross-präsentiert wird. Die vorliegenden Untersuchungen bieten in ihrer Gesamtheit einen Ansatzpunkt, um die Systeme für eine spezifische Anwendung *in vivo* zu optimieren.

6. Summary

Intracellular pathogens, like viruses, are eliminated by cellular immune responses. During this work I investigated several systems to induce these immune responses. *In vivo*, primary T cells are mainly induced by dendritic cells (DCs). These are also the only cells to cross-present and finally cross-prime naive T cells with protein antigens *in vivo*. Immunization-strategies address therefore the expression and the presentation of antigens in DCs. Based on these findings, it was investigated: (1) whether and how efficient "*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus" (AcMNPV) is able to infect DCs and (2) whether the HCMV-tegment-protein pp65 shows properties of an efficient carrier system for antigens into DCs.

- (1) Human iDCs got infected by rAcMNPV with low efficiency. This infection was dependent on gp64. The infection of iDCs resulted in a transient expression of the reporter genes encoded by rAcMNPV. The levels of expression were decreasing rapidly. This results in low expression levels at the timepoint of optimal AcMNPV-mediated activation of DCs. In contrast activated mDCs were not infectable by rAcMNPV. Taken together, AcMNPV strongly activates DCs, but does not infect DCs only with low efficiency. Therefore it is likely, that In-Vivo-immunization with rAcMNPV leads mainly to the infection of body cells other than DCs. The antigen from these cells might then be cross-presented by rAcMNPV-activated DCs.
- (2) Proteins, fused to HCMV-tegment-protein pp65 were bound with higher efficiency to DCs than those fused to the described protein-transduction-domains (PTD) TatPTD and Penetratin. Furthermore, the fusion of pp65 to proteins also led to an enhanced uptake by iDCs. Pp65 alone is inducing strong CD4⁺ and CD8⁺ memory-T cell-responses when taken up by DCs. Therefore it is also efficiently cross-presented by these cells. Taken together, pp65 is a promising candidate to direct fused antigens into the cross-presentation pathway of DCs. The

pp65 does not activate DCs, but could be used to induce effective T cell responses in combination with adjuvants.

The tested systems both contribute to the induction of cellular immunity. They both harbour specific advantages and disadvantages. Whereas AcMNPV leads to a very efficient activation of DCs, pp65 is not able to activate these cells. On the other hand, rAcMNPV does infect iDCs with low frequency. In contrast to this, pp65 is taken up and cross-presented very efficiently. These findings allow further optimization of the systems for specific In-Vivo-application.

7. Literatur

Abate, D. A., Watanabe, S. & Mocarski, E. S. (2004). Major human cytomegalovirus structural protein pp65 (ppUL83) prevents interferon response factor 3 activation in the interferon response. *J Virol* **78**, 10995-11006.

Abe, T., Takahashi, H., Hamazaki, H., Miyano-Kurosaki, N., Matsuura, Y. & Takaku, H. (2003). Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *J Immunol* **171**, 1133-1139.

Ackerman, A. L. & Cresswell, P. (2003). Regulation of MHC class I transport in human dendritic cells and the dendritic-like cell line KG-1. *J Immunol* **170**, 4178-4188.

Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampe, R. & Cresswell, P. (2005). Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat Immunol* **6**, 107-113.

Ada, G. L. & Blanden, R. V. (1994). CTL immunity and cytokine regulation in viral infection. *Res Immunol* **145**, 625-628; discussion 628-629.

Akbari, O., Panjwani, N., Garcia, S., Tascon, R., Lowrie, D. & Stockinger, B. (1999). DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med* **189**, 169-178.

Albert, M. L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L. & Bhardwaj, N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* **188**, 1359-1368.

Andres, P. G., Howland, K. C., Dresnek, D., Edmondson, S., Abbas, A. K. & Krummel, M. F. (2004). CD28 signals in the immature immunological synapse. *J Immunol* **172**, 5880-5886.

Andrews, D. M., Andoniou, C. E., Granucci, F., Ricciardi-Castagnoli, P. & Degli-Esposti, M. A. (2001). Infection of dendritic cells by murine cytomegalovirus induces functional paralysis. *Nat Immunol* **2**, 1077-1084.

Andrieu, M., Desoutter, J. F., Loing, E., Gaston, J., Hanau, D., Guillet, J. G. & Hosmalin, A. (2003). Two human immunodeficiency virus vaccinal lipopeptides follow different cross-presentation pathways in human dendritic cells. *J Virol* **77**, 1564-1570.

Aoki, H., Sakoda, Y., Jukuroki, K., Takada, A., Kida, H. & Fukusho, A. (1999). Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Vet Microbiol* **68**, 197-207.

Apostolopoulos, V. & Plebanski, M. (2000). The evolution of DNA vaccines. *Curr Opin Mol Ther* **2**, 441-447.

Armant, M. A. & Fenton, M. J. (2002). Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* **3**, REVIEWS3011.

Arora, N. & Leppla, S. H. (1994). Fusions of anthrax toxin lethal factor with shiga toxin and diphtheria toxin enzymatic domains are toxic to mammalian cells. *Infect Immun* **62**, 4955-4961.

- Arora, N., Williamson, L. C., Leppla, S. H. & Halpern, J. L. (1994).** Cytotoxic effects of a chimeric protein consisting of tetanus toxin light chain and anthrax toxin lethal factor in non-neuronal cells. *J Biol Chem* **269**, 26165-26171.
- Arrode, G., Boccaccio, C., Abastado, J. P. & Davrinche, C. (2002).** Cross-presentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8+ T cells is regulated by virus-induced, soluble-mediator-dependent maturation of dendritic cells. *J Virol* **76**, 142-150.
- Austyn, J. M. (1996).** New insights into the mobilization and phagocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **183**, 1287-1292.
- Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A. & Kopf, M. (1999).** Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* **29**, 291-299.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998).** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-252.
- Banchereau, J., Schuler-Thurner, B., Palucka, A. K. & Schuler, G. (2001).** Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* **106**, 271-274.
- Barry, M. & Bleackley, R. C. (2002).** Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* **2**, 401-409.
- Barsoum, J., Brown, R., McKee, M. & Boyce, F. M. (1997).** Efficient transduction of mammalian cells by a recombinant baculovirus having the vesicular stomatitis virus G glycoprotein. *Hum Gene Ther* **8**, 2011-2018.
- Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. (2004).** Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* **63**, 71-180.
- Basu, S., Binder, R. J., Suto, R., Anderson, K. M. & Srivastava, P. K. (2000).** Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int Immunol* **12**, 1539-1546.
- Batchu, R. B., Moreno, A. M., Szmania, S. M., Bennett, G., Spagnoli, G. C., Ponnazhagan, S., Barlogie, B., Tricot, G. & van Rhee, F. (2005).** Protein transduction of dendritic cells for NY-ESO-1-based immunotherapy of myeloma. *Cancer Res* **65**, 10041-10049.
- Beck, K., Meyer-Konig, U., Weidmann, M., Nern, C. & Hufert, F. T. (2003).** Human cytomegalovirus impairs dendritic cell function: a novel mechanism of human cytomegalovirus immune escape. *Eur J Immunol* **33**, 1528-1538.
- Beck, N. B., Sidhu, J. S. & Omiecinski, C. J. (2000).** Baculovirus vectors repress phenobarbital-mediated gene induction and stimulate cytokine expression in primary cultures of rat hepatocytes. *Gene Ther* **7**, 1274-1283.
- Bedrosian, I., Roros, J. G., Xu, S., Nguyen, H. Q., Engels, F., Faries, M. B., Koski, G. K., Cohen, P. A. & Czerniecki, B. J. (2000).** Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-2, and interleukin-12 synergize with calcium ionophore to enhance dendritic cell function. *J Immunother* **23**, 311-320.
- Bedrosian, I., Mick, R., Xu, S., Nisenbaum, H., Faries, M., Zhang, P., Cohen, P. A., Koski, G. & Czerniecki, B. J. (2003).** Intranodal administration of peptide-pulsed mature dendritic cell vaccines results in superior CD8+ T-cell function in melanoma patients. *J Clin Oncol* **21**, 3826-3835.
- Behrens, G., Li, M., Smith, C. M., Belz, G. T., Mintern, J., Carbone, F. R. & Heath, W. R. (2004).** Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol* **82**, 84-90.

- Beignon, A. S., Skoberne, M. & Bhardwaj, N. (2003).** Type I interferons promote cross-priming: more functions for old cytokines. *Nat Immunol* **4**, 939-941.
- Beninga, J., Kropff, B. & Mach, M. (1995).** Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J Gen Virol* **76 (Pt 1)**, 153-160.
- Bennett, R. P., Dalby, B. & Guy, P. M. (2002).** Protein delivery using VP22. *Nat Biotechnol* **20**, 20.
- Benvenuti, F., Lagaudriere-Gesbert, C., Grandjean, I., Jancic, C., Hivroz, C., Trautmann, A., Lantz, O. & Amigorena, S. (2004).** Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol* **172**, 292-301.
- Berwin, B., Hart, J. P., Rice, S., Gass, C., Pizzo, S. V., Post, S. R. & Nicchitta, C. V. (2003).** Scavenger receptor-A mediates gp96/GRP94 and calreticulin internalization by antigen-presenting cells. *Embo J* **22**, 6127-6136.
- Bhakta, N. R., Oh, D. Y. & Lewis, R. S. (2005).** Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat Immunol* **6**, 143-151.
- Binder, R. J., Anderson, K. M., Basu, S. & Srivastava, P. K. (2000).** Cutting edge: heat shock protein gp96 induces maturation and migration of CD11c⁺ cells in vivo. *J Immunol* **165**, 6029-6035.
- Blumberg, R. S., Gerdes, D., Chott, A., Porcelli, S. A. & Balk, S. P. (1995).** Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol Rev* **147**, 5-29.
- Boppana, S. B. & Britt, W. J. (1996).** Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology* **222**, 293-296.
- Borchard, G. (2001).** Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev* **52**, 145-150.
- Boublik, Y., Di Bonito, P. & Jones, I. M. (1995).** Eukaryotic virus display: engineering the major surface glycoprotein of the Autographa californica nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Biotechnology (N Y)* **13**, 1079-1084.
- Bousarghin, L., Hubert, P., Franzen, E., Jacobs, N., Boniver, J. & Delvenne, P. (2005).** Human papillomavirus 16 virus-like particles use heparan sulfates to bind dendritic cells and colocalize with langerin in Langerhans cells. *J Gen Virol* **86**, 1297-1305.
- Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. & Behr, J. P. (1995).** A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7297-7301.
- Bowers, J. M. & Bert-Moreno, A. (2004).** Treatment of HAART-induced lactic acidosis with B vitamin supplements. *Nutr Clin Pract* **19**, 375-378.
- Boyce, F. M. & Bucher, N. L. (1996).** Baculovirus-mediated gene transfer into mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2348-2352.
- Boyle, J. S., Silva, A., Brady, J. L. & Lew, A. M. (1997).** DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14626-14631.
- Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J. L. & Maliszewski, C. R. (2000).** Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**, 3029-3039.

- Braun, M. & Vierling, J. M. (2003).** The clinical and immunologic impact of using interferon and ribavirin in the immunosuppressed host. *Liver Transpl* **9**, S79-89.
- Brigl, M. & Brenner, M. B. (2004).** CD1: Antigen Presentation and T Cell Function. *Annu Rev Immunol* **22**, 817-890.
- Brimnes, M. K., Bonifaz, L., Steinman, R. M. & Moran, T. M. (2003).** Influenza virus-induced dendritic cell maturation is associated with the induction of strong T cell immunity to a coadministered, normally nonimmunogenic protein. *J Exp Med* **198**, 133-144.
- Britt, W., Fay, J., Seals, J. & Kensil, C. (1995).** Formulation of an immunogenic human cytomegalovirus vaccine: responses in mice. *J Infect Dis* **171**, 18-25.
- Brocker, T., Riedinger, M. & Karjalainen, K. (1997).** Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med* **185**, 541-550.
- Brode, S. & Macary, P. A. (2004).** Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *Immunology* **112**, 345-351.
- Brown, G. D. & Gordon, S. (2001).** Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**, 36-37.
- Brown, M., Davies, D. H., Skinner, M. A., Bowen, G., Hollingsworth, S. J., Mufti, G. J., Arrand, J. R. & Stacey, S. N. (1999).** Antigen gene transfer to cultured human dendritic cells using recombinant avipoxvirus vectors. *Cancer Gene Ther* **6**, 238-245.
- Browne, E. P. & Shenk, T. (2003).** Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11439-11444.
- Brunner, C., Seiderer, J., Schlamp, A. & other authors (2000a).** Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol* **165**, 6278-6286.
- Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M. & Wagner, E. (2000b).** Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther* **7**, 401-407.
- Calarota, S. A. & Weiner, D. B. (2004).** Enhancement of human immunodeficiency virus type 1-DNA vaccine potency through incorporation of T-helper 1 molecular adjuvants. *Immunol Rev* **199**, 84-99.
- Casares, S., Inaba, K., Brumeanu, T. D., Steinman, R. M. & Bona, C. A. (1997).** Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* **186**, 1481-1486.
- Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. & Banchereau, J. (1992).** GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* **360**, 258-261.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C. & other authors (1996a).** CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *J Exp Med* **184**, 695-706.
- Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Durand, I. & Banchereau, J. (1996b).** Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* **87**, 2376-2385.

- Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., de Saint-Vis, B., Dezutter-Dambuyant, C., Jacquet, C., Schmitt, D. & Banchereau, J. (1997).** CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *Adv Exp Med Biol* **417**, 21-25.
- Chanock, R. M., Murphy, B. R., Collins, P. L. & other authors (1988).** Live viral vaccines for respiratory and enteric tract diseases. *Vaccine* **6**, 129-133.
- Chattergoon, M. A., Robinson, T. M., Boyer, J. D. & Weiner, D. B. (1998).** Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J Immunol* **160**, 5707-5718.
- Cheng, T., Xu, C. Y., Wang, Y. B., Chen, M., Wu, T., Zhang, J. & Xia, N. S. (2004).** A rapid and efficient method to express target genes in mammalian cells by baculovirus. *World J Gastroenterol* **10**, 1612-1618.
- Chinnasamy, N., Chinnasamy, D., Toso, J. F., Lapointe, R., Candotti, F., Morgan, R. A. & Hwu, P. (2000).** Efficient gene transfer to human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells using human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* **11**, 1901-1909.
- Cho, H. J., Hayashi, T., Datta, S. K., Takabayashi, K., Van Uden, J. H., Horner, A., Corr, M. & Raz, E. (2002).** IFN-alpha beta promote priming of antigen-specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by immunostimulatory DNA-based vaccines. *J Immunol* **168**, 4907-4913.
- Condon, C., Watkins, S. C., Celluzzi, C. M., Thompson, K. & Falo, L. D., Jr. (1996).** DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nat Med* **2**, 1122-1128.
- Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Clay, W. C. & Kost, T. A. (1999).** Transient and stable gene expression in mammalian cells transduced with a recombinant baculovirus vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 127-132.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. (2001).** The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* **22**, 633-640.
- Corr, M., Lee, D. J., Carson, D. A. & Tighe, H. (1996).** Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* **184**, 1555-1560.
- Crawford, K., Gabuzda, D., Pantazopoulos, V., Xu, J., Clement, C., Reinherz, E. & Alper, C. A. (1999).** Circulating CD2+ monocytes are dendritic cells. *J Immunol* **163**, 5920-5928.
- Cresswell, P. (1994).** Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 259-293.
- Cusi, M. G., Terrosi, C., Savellini, G. G., Di Genova, G., Zurbriggen, R. & Correale, P. (2004).** Efficient delivery of DNA to dendritic cells mediated by influenza virosomes. *Vaccine* **22**, 735-739.
- Das, V., Nal, B., Dujancourt, A., Thoulouze, M. I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A. & Alcover, A. (2004).** Activation-induced polarized recycling targets T cell antigen receptors to the immunological synapse; involvement of SNARE complexes. *Immunity* **20**, 577-588.
- de Jong, E. C., Smits, H. H. & Kapsenberg, M. L. (2005).** Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin Immunopathol* **26**, 289-307.
- Dee, K. U. & Shuler, M. L. (1997).** Optimization of an assay for baculovirus titer and design of regimens for the synchronous infection of insect cells. *Biotechnol Prog* **13**, 14-24.
- Delneste, Y., Magistrelli, G., Gauchat, J. & other authors (2002).** Involvement of LOX-1 in dendritic cell-mediated antigen cross-presentation. *Immunity* **17**, 353-362.

- den Haan, J. M., Lehar, S. M. & Bevan, M. J. (2000).** CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J Exp Med* **192**, 1685-1696.
- Depoix, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utzny, C., Muller, S. & Valitutti, S. (2005).** Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* **22**, 185-194.
- Dhodapkar, M. V. & Bhardwaj, N. (2000).** Active immunization of humans with dendritic cells. *J Clin Immunol* **20**, 167-174.
- Dhodapkar, M. V., Krasovsky, J., Steinman, R. M. & Bhardwaj, N. (2000).** Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest* **105**, R9-R14.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. (2001).** Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* **193**, 233-238.
- Di Nicola, M., Siena, S., Bregni, M. & other authors (1998).** Gene transfer into human dendritic antigen-presenting cells by vaccinia virus and adenovirus vectors. *Cancer Gene Ther* **5**, 350-356.
- Diamond, D. J., York, J., Sun, J. Y., Wright, C. L. & Forman, S. J. (1997).** Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* **90**, 1751-1767.
- Dietz, A. B. & Vuk-Pavlovic, S. (1998).** High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells. *Blood* **91**, 392-398.
- Dinter, A. & Berger, E. G. (1998).** Golgi-disturbing agents. *Histochem Cell Biol* **109**, 571-590.
- Donaghy, H., Gazzard, B., Gotch, F. & Patterson, S. (2003).** Dysfunction and infection of freshly isolated blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells in patients infected with HIV-1. *Blood* **101**, 4505-4511.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. & Liu, M. A. (1997).** DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* **15**, 617-648.
- Donnelly, J. J., Wahren, B. & Liu, M. A. (2005).** DNA vaccines: progress and challenges. *J Immunol* **175**, 633-639.
- Drillien, R., Spehner, D., Bohbot, A. & Hanau, D. (2000).** Vaccinia virus-related events and phenotypic changes after infection of dendritic cells derived from human monocytes. *Virology* **268**, 471-481.
- D'Souza, S., Rosseels, V., Denis, O. & other authors (2002).** Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. *Infect Immun* **70**, 3681-3688.
- Duisit, G., Saleun, S., Douthe, S., Barsoum, J., Chadeuf, G. & Moullier, P. (1999).** Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *J Gene Med* **1**, 93-102.
- Dustin, M. L. & Chan, A. C. (2000).** Signaling takes shape in the immune system. *Cell* **103**, 283-294.
- El-Aneed, A. (2004).** Current strategies in cancer gene therapy. *Eur J Pharmacol* **498**, 1-8.
- Elliott, G. & O'Hare, P. (1997).** Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* **88**, 223-233.

- Elliott, G. D. & Meredith, D. M. (1992).** The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J Gen Virol* **73** (Pt 3), 723-726.
- Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W. I., Steinman, R. M. & Bhardwaj, N. (1999).** Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *J Immunol* **163**, 6762-6768.
- Ezekowitz, R. A., Sastry, K., Bailly, P. & Warner, A. (1990).** Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* **172**, 1785-1794.
- Facciabene, A., Aurisicchio, L. & La Monica, N. (2004).** Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice. *J Virol* **78**, 8663-8672.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Rose, D. M., Pearson, A., Ezekowitz, R. A. & Henson, P. M. (2000).** A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature* **405**, 85-90.
- Falnes, P. O., Ariansen, S., Sandvig, K. & Olsnes, S. (2000).** Requirement for prolonged action in the cytosol for optimal protein synthesis inhibition by diphtheria toxin. *J Biol Chem* **275**, 4363-4368.
- Falnes, P. O., Wesche, J. & Olsnes, S. (2001).** Ability of the Tat basic domain and VP22 to mediate cell binding, but not membrane translocation of the diphtheria toxin A-fragment. *Biochemistry* **40**, 4349-4358.
- Fan, H., Lin, Q., Morrissey, G. R. & Khavari, P. A. (1999).** Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat Biotechnol* **17**, 870-872.
- Fenner, F. (1982).** A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev Infect Dis* **4**, 916-930.
- Fiebich, B. L., Jager, B., Schollmann, C., Weindel, K., Wilting, J., Kochs, G., Marme, D., Hug, H. & Weich, H. A. (1993).** Synthesis and assembly of functionally active human vascular endothelial growth factor homodimers in insect cells. *Eur J Biochem* **211**, 19-26.
- Fonteneau, J. F., Kavanagh, D. G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T. L., Bhardwaj, N. & Larsson, M. (2003).** Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *Blood* **102**, 4448-4455.
- Ford, K. G., Souberbielle, B. E., Darling, D. & Farzaneh, F. (2001).** Protein transduction: an alternative to genetic intervention? *Gene Ther* **8**, 1-4.
- Fossum, S. (1989).** Dendritic leukocytes: features of their in vivo physiology. *Res Immunol* **140**, 883-891; discussion 918-826.
- Freiberg, B. A., Kupfer, H., Maslanik, W., Delli, J., Kappler, J., Zaller, D. M. & Kupfer, A. (2002).** Staging and resetting T cell activation in SMACs. *Nat Immunol* **3**, 911-917.
- Friedl, P., den Boer, A. T. & Gunzer, M. (2005).** Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **5**, 532-545.
- Fu, T. M., Ulmer, J. B., Caulfield, M. J., Deck, R. R., Friedman, A., Wang, S., Liu, X., Donnelly, J. J. & Liu, M. A. (1997).** Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* **3**, 362-371.
- Fuller, D. H. & Haynes, J. R. (1994).** A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res Hum Retroviruses* **10**, 1433-1441.

- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. & Desjardins, M. (2002).** Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**, 119-131.
- Gallina, A., Percivalle, E., Simoncini, L., Revello, M. G., Gerna, G. & Milanesi, G. (1996).** Human cytomegalovirus pp65 lower matrix phosphoprotein harbours two transplantable nuclear localization signals. *J Gen Virol* **77 (Pt 6)**, 1151-1157.
- Gallucci, S., Lolkema, M. & Matzinger, P. (1999).** Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* **5**, 1249-1255.
- Gamvrellis, A., Leong, D., Hanley, J. C., Xiang, S. D., Mottram, P. & Plebanski, M. (2004).** Vaccines that facilitate antigen entry into dendritic cells. *Immunol Cell Biol* **82**, 506-516.
- Georgantas, R. W., 3rd, Leong, K. W. & August, J. T. (2000).** Antigen-specific induction of peripheral T cell tolerance in vivo by codelivery of DNA vectors encoding antigen and Fas ligand. *Hum Gene Ther* **11**, 851-858.
- Ghosh, S., Parvez, M. K., Banerjee, K., Sarin, S. K. & Hasnain, S. E. (2002).** Baculovirus as mammalian cell expression vector for gene therapy: an emerging strategy. *Mol Ther* **6**, 5-11.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B. & Greenberg, P. D. (1996).** Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* **383**, 720-722.
- Glowacki, L. S. & Smaill, F. M. (1994).** Use of immune globulin to prevent symptomatic cytomegalovirus disease in transplant recipients--a meta-analysis. *Clin Transplant* **8**, 10-18.
- Godelaine, D., Carrasco, J., Lucas, S., Karanikas, V., Schuler-Thurner, B., Coulie, P. G., Schuler, G., Boon, T. & Van Pel, A. (2003).** Polyclonal CTL responses observed in melanoma patients vaccinated with dendritic cells pulsed with a MAGE-3.A1 peptide. *J Immunol* **171**, 4893-4897.
- Gorecki, D. C. & Simons, J. P. (1999).** The dangers of DNA vaccination. *Nat Med* **5**, 126.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. & Dustin, M. L. (1999).** The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227.
- Granelli-Piperno, A., Zhong, L., Haslett, P., Jacobson, J. & Steinman, R. M. (2000).** Dendritic cells, infected with vesicular stomatitis virus-pseudotyped HIV-1, present viral antigens to CD4⁺ and CD8⁺ T cells from HIV-1-infected individuals. *J Immunol* **165**, 6620-6626.
- Graubert, T. A., DiPersio, J. F., Russell, J. H. & Ley, T. J. (1997).** Perforin/granzyme-dependent and independent mechanisms are both important for the development of graft-versus-host disease after murine bone marrow transplantation. *J Clin Invest* **100**, 904-911.
- Greenough, T. C., Brettler, D. B., Somasundaran, M., Panicali, D. L. & Sullivan, J. L. (1997).** Human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocytes (CTL), virus load, and CD4 T cell loss: evidence supporting a protective role for CTL in vivo. *J Infect Dis* **176**, 118-125.
- Grefte, J. M., van der Gun, B. T., Schmolke, S., van der Giessen, M., van Son, W. J., Plachter, B., Jahn, G. & The, T. H. (1992).** The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol* **73 (Pt 11)**, 2923-2932.

- Gronowski, A. M., Hilbert, D. M., Sheehan, K. C., Garotta, G. & Schreiber, R. D. (1999).** Baculovirus stimulates antiviral effects in mammalian cells. *J Virol* **73**, 9944-9951.
- Grosshans, H. (2000).** Gene therapy--when a simple concept meets a complex reality. Review on gene therapy. *Funct Integr Genomics* **1**, 142-145.
- Gunzer, M., Weishaupt, C., Hillmer, A., Basoglu, Y., Friedl, P., Dittmar, K. E., Kolanus, W., Varga, G. & Grabbe, S. (2004).** A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo. *Blood* **104**, 2801-2809.
- Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K. & other authors (2000).** Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* **181**, 1537-1546.
- Haensler, J. & Szoka, F. C., Jr. (1993a).** Synthesis and characterization of a trigalactosylated bisacridine compound to target DNA to hepatocytes. *Bioconjug Chem* **4**, 85-93.
- Haensler, J. & Szoka, F. C., Jr. (1993b).** Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug Chem* **4**, 372-379.
- Hahn, G., Jores, R. & Mocarski, E. S. (1998).** Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3937-3942.
- Halary, F., Amara, A., Lortat-Jacob, H. & other authors (2002).** Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity* **17**, 653-664.
- Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M. & Raetz, C. R. (1991).** Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. *Nature* **352**, 342-344.
- Harrer, T., Harrer, E., Kalams, S. A. & other authors (1996).** Strong cytotoxic T cell and weak neutralizing antibody responses in a subset of persons with stable nonprogressing HIV type 1 infection. *AIDS Res Hum Retroviruses* **12**, 585-592.
- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. & Barratt-Boyes, S. M. (2001).** Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J Immunol* **166**, 3717-3723.
- Haynes, J. R., McCabe, D. E., Swain, W. F., Widera, G. & Fuller, J. T. (1996).** Particle-mediated nucleic acid immunization. *J Biotechnol* **44**, 37-42.
- Heath, A. W. (1995a).** Cytokines as adjuvants in immunocompromised hosts. *Int J Clin Lab Res* **25**, 25-28.
- Heath, A. W. (1995b).** Cytokines as immunological adjuvants. *Pharm Biotechnol* **6**, 645-658.
- Heath, W. R., Belz, G. T., Behrens, G. M. & other authors (2004).** Cross-presentation, dendritic cell subsets, and the generation of immunity to cellular antigens. *Immunol Rev* **199**, 9-26.
- Hernandez-Campo, P. M., Almeida, J., Sanchez, M. L., Malvezzi, M. & Orfao, A. (2006).** Normal patterns of expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins on different subsets of peripheral blood cells: a frame of reference for the diagnosis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cytometry B Clin Cytom* **70**, 71-81.
- Ho, Y., Lin, P. H., Liu, C. Y., Lee, S. P. & Chao, Y. C. (2004a).** Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles. *Biochem Biophys Res Commun* **318**, 833-838.

- Ho, Y. C., Chen, H. C., Wang, K. C. & Hu, Y. C. (2004b).** Highly efficient baculovirus-mediated gene transfer into rat chondrocytes. *Biotechnol Bioeng* **88**, 643-651.
- Ho, Y. C., Chung, Y. C., Hwang, S. M., Wang, K. C. & Hu, Y. C. (2005).** Transgene expression and differentiation of baculovirus-transduced human mesenchymal stem cells. *J Gene Med* **7**, 860-868.
- Hofmann, C., Sandig, V., Jennings, G., Rudolph, M., Schlag, P. & Strauss, M. (1995).** Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10099-10103.
- Hofmann, C. & Strauss, M. (1998).** Baculovirus-mediated gene transfer in the presence of human serum or blood facilitated by inhibition of the complement system. *Gene Ther* **5**, 531-536.
- Holdorf, A. D., Lee, K. H., Burack, W. R., Allen, P. M. & Shaw, A. S. (2002).** Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol* **3**, 259-264.
- Holtappels, R., Podlech, J., Pahl-Seibert, M. F., Julch, M., Thomas, D., Simon, C. O., Wagner, M. & Reddehase, M. J. (2004).** Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues. *J Exp Med* **199**, 131-136.
- Homann, D., Teyton, L. & Oldstone, M. B. (2001).** Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med* **7**, 913-919.
- Hu, Y. C., Hsu, J. T., Huang, J. H., Ho, M. S. & Ho, Y. C. (2003a).** Formation of enterovirus-like particle aggregates by recombinant baculoviruses co-expressing P1 and 3CD in insect cells. *Biotechnol Lett* **25**, 919-925.
- Hu, Y. C., Tsai, C. T., Chang, Y. J. & Huang, J. H. (2003b).** Enhancement and prolongation of baculovirus-mediated expression in mammalian cells: focuses on strategic infection and feeding. *Biotechnol Prog* **19**, 373-379.
- Hu, Y. C. (2005).** Baculovirus as a highly efficient expression vector in insect and mammalian cells. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 405-416.
- Huang, J. H., Getty, R. R., Chisari, F. V., Fowler, P., Greenspan, N. S. & Tykocinski, M. L. (1994).** Protein transfer of preformed MHC-peptide complexes sensitizes target cells to T cell cytolysis. *Immunity* **1**, 607-613.
- Hugues, S., Fetler, L., Bonifaz, L., Helft, J., Amblard, F. & Amigorena, S. (2004).** Distinct T cell dynamics in lymph nodes during the induction of tolerance and immunity. *Nat Immunol* **5**, 1235-1242.
- Hung, C. F., He, L., Juang, J., Lin, T. J., Ling, M. & Wu, T. C. (2002).** Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen. *J Virol* **76**, 2676-2682.
- Huppa, J. B. & Davis, M. M. (2003).** T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat Rev Immunol* **3**, 973-983.
- Hurez, V., Saparov, A., Tousson, A., Fuller, M. J., Kubo, T., Oliver, J., Weaver, B. T. & Weaver, C. T. (2003).** Restricted clonal expression of IL-2 by naive T cells reflects differential dynamic interactions with dendritic cells. *J Exp Med* **198**, 123-132.
- Huser, A., Rudolph, M. & Hofmann, C. (2001).** Incorporation of decay-accelerating factor into the baculovirus envelope generates complement-resistant gene transfer vectors. *Nat Biotechnol* **19**, 451-455.

Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. (1998). The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* **8**, 89-95.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. & Steinman, R. M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-1702.

Isnard Bagnis, C., Tezenas Du Montcel, S., Fonfrede, M. & other authors (2006). Changing Electrolyte and Acido-Basic Profile in HIV-Infected Patients in the HAART Era. *Nephron Physiol* **103**, p131-p138.

Jacob, M. C., Favre, M. & Bensa, J. C. (1991). Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* **12**, 550-558.

Jahn, G., Scholl, B. C., Traupe, B. & Fleckenstein, B. (1987). The two major structural phosphoproteins (pp65 and pp150) of human cytomegalovirus and their antigenic properties. *J Gen Virol* **68 (Pt 5)**, 1327-1337.

Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C. & Vogel, J. C. (1998). Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* **161**, 3042-3049.

Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., von Stebut, E., Udey, M. C. & Vogel, J. C. (1999). Bacterial DNA and CpG-containing oligodeoxynucleotides activate cutaneous dendritic cells and induce IL-12 production: implications for the augmentation of Th1 responses. *Int Arch Allergy Immunol* **118**, 457-461.

Janeway, C., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. (2001). *Immunobiology; The immune system in health and disease*, 5 edn. New York: Garland Publishing.

Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G. & Schoenberger, S. P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* **421**, 852-856.

Jeannin, P., Renno, T., Goetsch, L. & other authors (2000). OmpA targets dendritic cells, induces their maturation and delivers antigen into the MHC class I presentation pathway. *Nat Immunol* **1**, 502-509.

Jenne, L., Hauser, C., Arrighi, J. F., Saurat, J. H. & Hugin, A. W. (2000). Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function. *Gene Ther* **7**, 1575-1583.

Jenne, L., Thumann, P. & Steinkasserer, A. (2001). Interaction of large DNA viruses with dendritic cells. *Immunobiology* **204**, 639-648.

Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D. & Dougherty, J. P. (2000). High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J Virol* **74**, 1234-1240.

Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. & Enk, A. H. (1997). Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* **27**, 3135-3142.

Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. (2000a). Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* **192**, 1213-1222.

- Jonuleit, H., Tuting, T., Steitz, J., Bruck, J., Giesecke, A., Steinbrink, K., Knop, J. & Enk, A. H. (2000b).** Efficient transduction of mature CD83+ dendritic cells using recombinant adenovirus suppressed T cell stimulatory capacity. *Gene Ther* **7**, 249-254.
- Jonuleit, H., Giesecke-Tuettenberg, A., Tuting, T. & other authors (2001).** A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* **93**, 243-251.
- Jonuleit, H. & Schmitt, E. (2003).** The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* **171**, 6323-6327.
- Jung, S., Unutmaz, D., Wong, P. & other authors (2002).** In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* **17**, 211-220.
- Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J. Y. & Liu, Y. J. (2000).** Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* **192**, 219-226.
- Kadowaki, N., Ho, S., Antonenko, S., Malefyt, R. W., Kastelein, R. A., Bazan, F. & Liu, Y. J. (2001).** Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* **194**, 863-869.
- Kaech, S. M. & Ahmed, R. (2001).** Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol* **2**, 415-422.
- Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. (2002).** Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* **111**, 837-851.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. (1994).** CD8+ T cell-mediated protection against an intracellular bacterium by perforin-dependent cytotoxicity. *Eur J Immunol* **24**, 3068-3072.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. (1995a).** Lymphocyte-mediated cytotoxicity in vitro and in vivo: mechanisms and significance. *Immunol Rev* **146**, 95-115.
- Kagi, D., Seiler, P., Pavlovic, J., Ledermann, B., Burki, K., Zinkernagel, R. M. & Hengartner, H. (1995b).** The roles of perforin- and Fas-dependent cytotoxicity in protection against cytopathic and noncytopathic viruses. *Eur J Immunol* **25**, 3256-3262.
- Kaisho, T. & Akira, S. (2002).** Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* **1589**, 1-13.
- Kalinski, P., Schuitmaker, J. H., Hilkens, C. M. & Kapsenberg, M. L. (1998).** Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol* **161**, 2804-2809.
- Katsumi, A., Emi, N., Abe, A., Hasegawa, Y., Ito, M. & Saito, H. (1994).** Humoral and cellular immunity to an encoded protein induced by direct DNA injection. *Hum Gene Ther* **5**, 1335-1339.
- Ke, Y. & Kapp, J. A. (1996).** Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J Exp Med* **184**, 1179-1184.
- Khattab, B. A., Lindenmaier, W., Frank, R. & Link, H. (1997).** Three T-cell epitopes within the C-terminal 265 amino acids of the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus recognized by human lymphocytes. *J Med Virol* **52**, 68-76.

- Kim, D. T., Mitchell, D. J., Brockstedt, D. G., Fong, L., Nolan, G. P., Fathman, C. G., Engleman, E. G. & Rothbard, J. B. (1997).** Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J Immunol* **159**, 1666-1668.
- Kis, Z., Pallinger, E., Endresz, V., Burian, K., Jelinek, I., Gonczol, E. & Valyi-Nagy, I. (2004).** The interactions between human dendritic cells and microbes; possible clinical applications of dendritic cells. *Inflamm Res* **53**, 413-423.
- Knebel, D. & Doerfler, W. (1987).** Activation of an insect baculovirus promoter in mammalian cells by adenovirus functions. *Virus Res* **8**, 317-326.
- Koff, W. C., Johnson, P. R., Watkins, D. I. & other authors (2006).** HIV vaccine design: insights from live attenuated SIV vaccines. *Nat Immunol* **7**, 19-23.
- Kost, T. A. & Condreay, J. P. (2002).** Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends Biotechnol* **20**, 173-180.
- Kost, T. A., Condreay, J. P. & Jarvis, D. L. (2005).** Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat Biotechnol* **23**, 567-575.
- Krieg, A. M., Yi, A. K., Matson, S., Waldschmidt, T. J., Bishop, G. A., Teasdale, R., Koretzky, G. A. & Klinman, D. M. (1995).** CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**, 546-549.
- Krieg, A. M. (2002).** CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* **20**, 709-760.
- Kruh, J. (1982).** Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol Cell Biochem* **42**, 65-82.
- Krummel, M. F., Sjaastad, M. D., Wulfing, C. & Davis, M. M. (2000).** Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* **289**, 1349-1352.
- Kuchtey, J., Chefalo, P. J., Gray, R. C., Ramachandra, L. & Harding, C. V. (2005).** Enhancement of dendritic cell antigen cross-presentation by CpG DNA involves type I IFN and stabilization of class I MHC mRNA. *J Immunol* **175**, 2244-2251.
- Kumar, M., Behera, A. K., Lockey, R. F. & other authors (2002).** Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection. *Hum Gene Ther* **13**, 1415-1425.
- Kupfer, A., Mosmann, T. R. & Kupfer, H. (1991).** Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 775-779.
- Lai, M. Y. (2000).** Firstline treatment for hepatitis C: combination interferon/ribavirin versus interferon monotherapy. *J Gastroenterol Hepatol* **15 Suppl**, E130-133.
- Lai, M. Y. (2006).** Combined interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C in Taiwan. *Intervirology* **49**, 91-95.
- Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2000).** Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol* **1**, 311-316.
- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2001a).** Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**, 263-266.
- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2001b).** The instructive role of dendritic cells on T cell responses: lineages, plasticity and kinetics. *Curr Opin Immunol* **13**, 291-298.

- Lanzavecchia, A. & Sallusto, F. (2001c).** Antigen decoding by T lymphocytes: from synapses to fate determination. *Nat Immunol* **2**, 487-492.
- Larsson, M., Fonteneau, J. F., Lirvall, M., Haslett, P., Lifson, J. D. & Bhardwaj, N. (2002).** Activation of HIV-1 specific CD4 and CD8 T cells by human dendritic cells: roles for cross-presentation and non-infectious HIV-1 virus. *Aids* **16**, 1319-1329.
- Larsson, M., Beignon, A. S. & Bhardwaj, N. (2004).** DC-virus interplay: a double edged sword. *Semin Immunol* **16**, 147-161.
- Laus, R., Graddis, T. J., Hakim, I. & Vidovic, D. (2000).** Enhanced major histocompatibility complex class I-dependent presentation of antigens modified with cationic and fusogenic peptides. *Nat Biotechnol* **18**, 1269-1272.
- Le Bon, A., Etchart, N., Rossmann, C., Ashton, M., Hou, S., Gewert, D., Borrow, P. & Tough, D. F. (2003).** Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol* **4**, 1009-1015.
- Leclerc, C. (2003).** New approaches in vaccine development. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**, 329-341.
- Lee, K. H., Dinner, A. R., Tu, C. & other authors (2003).** The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* **302**, 1218-1222.
- Leifert, J. A., Lindencrona, J. A., Charo, J. & Whitton, J. L. (2001).** Enhancing T cell activation and antiviral protection by introducing the HIV-1 protein transduction domain into a DNA vaccine. *Hum Gene Ther* **12**, 1881-1892.
- Leifert, J. A. & Whitton, J. L. (2003).** "Translocatory proteins" and "protein transduction domains": a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. *Mol Ther* **8**, 13-20.
- Leisy, D. J., Lewis, T. D., Leong, J. A. & Rohrmann, G. F. (2003).** Transduction of cultured fish cells with recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* **84**, 1173-1178.
- Lenz, P., Day, P. M., Pang, Y. Y., Frye, S. A., Jensen, P. N., Lowy, D. R. & Schiller, J. T. (2001).** Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* **166**, 5346-5355.
- Levy, D. N., Aldrovandi, G. M., Kutsch, O. & Shaw, G. M. (2004).** Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4204-4209.
- Li, C. R., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Goodrich, J. M. & Riddell, S. R. (1994).** 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* **83**, 1971-1979.
- Li, L., Liu, D., Hutt-Fletcher, L., Morgan, A., Masucci, M. G. & Levitsky, V. (2002).** Epstein-Barr virus inhibits the development of dendritic cells by promoting apoptosis of their monocyte precursors in the presence of granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-4. *Blood* **99**, 3725-3734.
- Li, M., Davey, G. M., Sutherland, R. M., Kurts, C., Lew, A. M., Hirst, C., Carbone, F. R. & Heath, W. R. (2001).** Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J Immunol* **166**, 6099-6103.
- Lieberman, J. (2003).** The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* **3**, 361-370.

- Limmer, A., Ohl, J., Kurts, C., Ljunggren, H. G., Reiss, Y., Groettrup, M., Momburg, F., Arnold, B. & Knolle, P. A. (2000).** Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8⁺ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *Nat Med* **6**, 1348-1354.
- Lindenbach, B. D., Evans, M. J., Syder, A. J. & other authors (2005).** Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* **309**, 623-626.
- Lindgren, M., Gallet, X., Soomets, U., Hallbrink, M., Brakenhielm, E., Pooga, M., Brasseur, R. & Langel, U. (2000).** Translocation properties of novel cell penetrating transportan and penetratin analogues. *Bioconjug Chem* **11**, 619-626.
- Linette, G. P., Shankara, S., Longerich, S., Yang, S., Doll, R., Nicolette, C., Preffer, F. I., Roberts, B. L. & Haluska, F. G. (2000).** In vitro priming with adenovirus/gp100 antigen-transduced dendritic cells reveals the epitope specificity of HLA-A*0201-restricted CD8⁺ T cells in patients with melanoma. *J Immunol* **164**, 3402-3412.
- Liu, Y., Jones, M., Hingtgen, C. M., Bu, G., Laribee, N., Tanzi, R. E., Moir, R. D., Nath, A. & He, J. J. (2000a).** Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* **6**, 1380-1387.
- Liu, Y., Santin, A. D., Mane, M., Chiriva-Internati, M., Parham, G. P., Ravaggi, A. & Hermonat, P. L. (2000b).** Transduction and utility of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene into monocytes and dendritic cells by adeno-associated virus. *J Interferon Cytokine Res* **20**, 21-30.
- Liu, Y. J. (2001).** Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* **106**, 259-262.
- Lizee, G., Basha, G., Tiong, J., Julien, J. P., Tian, M., Biron, K. E. & Jefferies, W. A. (2003).** Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *Nat Immunol* **4**, 1065-1073.
- Loison, F., Nizard, P., Sourisseau, T., Le Goff, P., Debure, L., Le Drean, Y. & Michel, D. (2005).** A ubiquitin-based assay for the cytosolic uptake of protein transduction domains. *Mol Ther* **11**, 205-214.
- Lore, K., Betts, M. R., Brenchley, J. M., Kuruppu, J., Khojasteh, S., Perfetto, S., Roederer, M., Seder, R. A. & Koup, R. A. (2003).** Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol* **171**, 4320-4328.
- Louz, D., Bergmans, H. E., Loos, B. P. & Hoeben, R. C. (2005).** Cross-species transfer of viruses: implications for the use of viral vectors in biomedical research, gene therapy and as live-virus vaccines. *J Gene Med* **7**, 1263-1274.
- Luft, T., Pang, K. C., Thomas, E., Hertzog, P., Hart, D. N., Trapani, J. & Cebon, J. (1998).** Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells. *J Immunol* **161**, 1947-1953.
- Lundberg, M., Wikstrom, S. & Johansson, M. (2003).** Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther* **8**, 143-150.
- Lycke, N. (1997).** The mechanism of cholera toxin adjuvanticity. *Res Immunol* **148**, 504-520.
- Ma, L., Tamarina, N., Wang, Y., Kuznetsov, A., Patel, N., Kending, C., Hering, B. J. & Philipson, L. H. (2000).** Baculovirus-mediated gene transfer into pancreatic islet cells. *Diabetes* **49**, 1986-1991.

- Mai, J. C., Shen, H., Watkins, S. C., Cheng, T. & Robbins, P. D. (2002).** Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J Biol Chem* **277**, 30208-30218.
- Maldonado, M., Baybis, M., Newman, D., Kolson, D. L., Chen, W., McKhann, G., 2nd, Gutmann, D. H. & Crino, P. B. (2003).** Expression of ICAM-1, TNF-alpha, NF kappa B, and MAP kinase in tubers of the tuberous sclerosis complex. *Neurobiol Dis* **14**, 279-290.
- Mangeot, P. E., Negre, D., Dubois, B., Winter, A. J., Leissner, P., Mehtali, M., Kaiserlian, D., Cosset, F. L. & Darlix, J. L. (2000).** Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J Virol* **74**, 8307-8315.
- Mangeot, P. E., Duperrier, K., Negre, D., Boson, B., Rigal, D., Cosset, F. L. & Darlix, J. L. (2002).** High levels of transduction of human dendritic cells with optimized SIV vectors. *Mol Ther* **5**, 283-290.
- Mansky, L. M. & Temin, H. M. (1995).** Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol* **69**, 5087-5094.
- Mast, E. E., Alter, M. J. & Margolis, H. S. (1999).** Strategies to prevent and control hepatitis B and C virus infections: a global perspective. *Vaccine* **17**, 1730-1733.
- Mellman, I. & Steinman, R. M. (2001).** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255-258.
- Mempel, T. R., Scimone, M. L., Mora, J. R. & von Andrian, U. H. (2004).** In vivo imaging of leukocyte trafficking in blood vessels and tissues. *Curr Opin Immunol* **16**, 406-417.
- Menetrier-Caux, C., Montmain, G., Dieu, M. C., Bain, C., Favrot, M. C., Caux, C. & Blay, J. Y. (1998).** Inhibition of the differentiation of dendritic cells from CD34(+) progenitors by tumor cells: role of interleukin-6 and macrophage colony-stimulating factor. *Blood* **92**, 4778-4791.
- Merrihew, R. V., Clay, W. C., Condreay, J. P., Witherspoon, S. M., Dallas, W. S. & Kost, T. A. (2001).** Chromosomal integration of transduced recombinant baculovirus DNA in mammalian cells. *J Virol* **75**, 903-909.
- Merten, O. W., Geny-Fiamma, C. & Douar, A. M. (2005).** Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther* **12 Suppl 1**, S51-61.
- Mi, Z., Mai, J., Lu, X. & Robbins, P. D. (2000).** Characterization of a class of cationic peptides able to facilitate efficient protein transduction in vitro and in vivo. *Mol Ther* **2**, 339-347.
- Miller, M. J., Safrina, O., Parker, I. & Cahalan, M. D. (2004).** Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes. *J Exp Med* **200**, 847-856.
- Mittenbuhler, K., v d Esche, U., Heinevetter, L., Bessler, W. G. & Huber, M. (2003).** Lipopeptides: adjuvanticity in conventional and genetic immunization. *FEMS Immunol Med Microbiol* **37**, 193-200.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. & Kupfer, A. (1998).** Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* **395**, 82-86.
- Montoya, M., Schiavoni, G., Mattei, F., Gresser, I., Belardelli, F., Borrow, P. & Tough, D. F. (2002).** Type I interferons produced by dendritic cells promote their phenotypic and functional activation. *Blood* **99**, 3263-3271.

- Moretta, A., Ciccone, E., Pantaleo, G., Tambussi, G., Bottino, C., Melioli, G., Mingari, M. C. & Moretta, L. (1989).** Surface molecules involved in the activation and regulation of T or natural killer lymphocytes in humans. *Immunol Rev* **111**, 145-175.
- Mori, K., Sugimoto, C., Ohgimoto, S. & other authors (2005).** Influence of glycosylation on the efficacy of an Env-based vaccine against simian immunodeficiency virus SIVmac239 in a macaque AIDS model. *J Virol* **79**, 10386-10396.
- Moss, W. C., Irvine, D. J., Davis, M. M. & Krummel, M. F. (2002).** Quantifying signaling-induced reorientation of T cell receptors during immunological synapse formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15024-15029.
- Moutaftsi, M., Mehl, A. M., Borysiewicz, L. K. & Tabi, Z. (2002).** Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* **99**, 2913-2921.
- Mullins, D. W., Sheasley, S. L., Ream, R. M., Bullock, T. N., Fu, Y. X. & Engelhard, V. H. (2003).** Route of immunization with peptide-pulsed dendritic cells controls the distribution of memory and effector T cells in lymphoid tissues and determines the pattern of regional tumor control. *J Exp Med* **198**, 1023-1034.
- Musey, L., Hughes, J., Schacker, T., Shea, T., Corey, L. & McElrath, M. J. (1997).** Cytotoxic-T-cell responses, viral load, and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **337**, 1267-1274.
- Mwau, M., Cebere, I., Sutton, J. & other authors (2004).** A human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) clade A vaccine in clinical trials: stimulation of HIV-specific T-cell responses by DNA and recombinant modified vaccinia virus Ankara (MVA) vaccines in humans. *J Gen Virol* **85**, 911-919.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A. & Dowdy, S. F. (1998).** Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* **4**, 1449-1452.
- Negre, D., Mangeot, P. E., Duisit, G. & other authors (2000).** Characterization of novel safe lentiviral vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) that efficiently transduce mature human dendritic cells. *Gene Ther* **7**, 1613-1623.
- Negulescu, P. A., Krasieva, T. B., Khan, A., Kerschbaum, H. H. & Cahalan, M. D. (1996).** Polarity of T cell shape, motility, and sensitivity to antigen. *Immunity* **4**, 421-430.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J. W., Reits, E., Janssen, L. & Neefjes, J. (2005).** Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* **434**, 83-88.
- Nersting, J., Svenson, M., Andersen, V. & Bendtzen, K. (2003).** Maturation of human dendritic cells by monocyte-conditioned medium is dependent upon trace amounts of lipopolysaccharide inducing tumour necrosis factor alpha. *Immunol Lett* **89**, 59-65.
- Nichols, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V. & Troilo, P. J. (1995).** Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann N Y Acad Sci* **772**, 30-39.
- Nishimura, N., Nishioka, Y., Shinohara, T., Ogawa, H., Yamamoto, S., Tani, K. & Sone, S. (2001).** Novel centrifugal method for simple and highly efficient adenovirus-mediated green fluorescence protein gene transduction into human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Methods* **253**, 113-124.
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S. & other authors (1998).** Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science* **279**, 2103-2106.

Ohlin, M., Sundqvist, V. A., Gilljam, G., Ruden, U., Gombert, F. O., Wahren, B. & Borrebaeck, C. A. (1991). Characterization of human monoclonal antibodies directed against the pp65-kD matrix antigen of human cytomegalovirus. *Clin Exp Immunol* **84**, 508-514.

Ohlin, M., Plachter, B., Sundqvist, V. A., Steenbakkers, P. G., Middeldorp, J. M. & Borrebaeck, C. A. (1995). Human antibody reactivity against the lower matrix protein (pp65) produced by cytomegalovirus. *Clin Diagn Lab Immunol* **2**, 325-329.

Oliveira, S. C., Harms, J. S., Afonso, R. R. & Splitter, G. A. (2001). A genetic immunization adjuvant system based on BVP22-antigen fusion. *Hum Gene Ther* **12**, 1353-1359.

Oomens, A. G. & Wertz, G. W. (2004). The baculovirus GP64 protein mediates highly stable infectivity of a human respiratory syncytial virus lacking its homologous transmembrane glycoproteins. *J Virol* **78**, 124-135.

Palucka, K. A., Taquet, N., Sanchez-Chapuis, F. & Gluckman, J. C. (1998). Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation. *J Immunol* **160**, 4587-4595.

Pandey, R. & Khuller, G. K. (2004). Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. *J Antimicrob Chemother* **53**, 635-640.

Pante, N. & Kann, M. (2002). Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell* **13**, 425-434.

Peitz, M., Pfannkuche, K., Rajewsky, K. & Edenhofer, F. (2002). Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4489-4494.

Pena-Cruz, V., Ito, S., Dascher, C. C., Brenner, M. B. & Sugita, M. (2003). Epidermal Langerhans cells efficiently mediate CD1a-dependent presentation of microbial lipid antigens to T cells. *J Invest Dermatol* **121**, 517-521.

Peters, J. H., Ruppert, J., Gieseler, R. K., Najjar, H. M. & Xu, H. (1991). Differentiation of human monocytes into CD14 negative accessory cells: do dendritic cells derive from the monocytic lineage? *Pathobiology* **59**, 122-126.

Pieroni, L., Maione, D. & La Monica, N. (2001). In vivo gene transfer in mouse skeletal muscle mediated by baculovirus vectors. *Hum Gene Ther* **12**, 871-881.

Pietersz, G. A., Li, W. & Apostolopoulos, V. (2001). A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway. *Vaccine* **19**, 1397-1405.

Pontesilli, O., Klein, M. R., Kerkhof-Garde, S. R., Pakker, N. G., de Wolf, F., Schuitemaker, H. & Miedema, F. (1998). Longitudinal analysis of human immunodeficiency virus type 1-specific cytotoxic T lymphocyte responses: a predominant gag-specific response is associated with nonprogressive infection. *J Infect Dis* **178**, 1008-1018.

Pooley, J. L., Heath, W. R. & Shortman, K. (2001). Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells. *J Immunol* **166**, 5327-5330.

Prasad, S. A., Norbury, C. C., Chen, W., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2001). Cutting edge: recombinant adenoviruses induce CD8 T cell responses to an inserted protein whose expression is limited to nonimmune cells. *J Immunol* **166**, 4809-4812.

Price, A. A., Cumberbatch, M., Kimber, I. & Ager, A. (1997). Alpha 6 integrins are required for Langerhans cell migration from the epidermis. *J Exp Med* **186**, 1725-1735.

- Prochiantz, A. (2000).** Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 400-406.
- Purtic, B., Pitcher, L. A., van Oers, N. S. & Wulfing, C. (2005).** T cell receptor (TCR) clustering in the immunological synapse integrates TCR and costimulatory signaling in selected T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2904-2909.
- Raftery, M. J., Schwab, M., Eibert, S. M., Samstag, Y., Walczak, H. & Schonrich, G. (2001).** Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity* **15**, 997-1009.
- Rahemtulla, A., Fung-Leung, W. P., Schilham, M. W. & other authors (1991).** Normal development and function of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *Nature* **353**, 180-184.
- Ramirez, M. C. & Sigal, L. J. (2002).** Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J Immunol* **169**, 6733-6742.
- Razzell, P. E. (1965).** Edward Jenner: The History of a Medical Myth. *Med Hist* **9**, 216-229.
- Rea, D., Schagen, F. H., Hoeben, R. C., Mehtali, M., Havenga, M. J., Toes, R. E., Melief, C. J. & Offringa, R. (1999).** Adenoviruses activate human dendritic cells without polarization toward a T-helper type 1-inducing subset. *J Virol* **73**, 10245-10253.
- Reddy, A., Sapp, M., Feldman, M., Subklewe, M. & Bhardwaj, N. (1997).** A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* **90**, 3640-3646.
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H. M. & Prabhakar, U. (2004).** Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J Immunol Methods* **293**, 127-142.
- Rescigno, M., Piguet, V., Valzasina, B., Lens, S., Zubler, R., French, L., Kindler, V., Tschopp, J. & Ricciardi-Castagnoli, P. (2000).** Fas engagement induces the maturation of dendritic cells (DCs), the release of interleukin (IL)-1beta, 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* **192**, 1661-1668.
- Reusser, P., Riddell, S. R., Meyers, J. D. & Greenberg, P. D. (1991).** Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* **78**, 1373-1380.
- Richard, J. P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M. J., Chernomordik, L. V. & Lebleu, B. (2003).** Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* **278**, 585-590.
- Riddell, S. R., Rabin, M., Geballe, A. P., Britt, W. J. & Greenberg, P. D. (1991).** Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* **146**, 2795-2804.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E. & Greenberg, P. D. (1992).** Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**, 238-241.

- Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G. & Sinzger, C. (2000).** Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* **81**, 393-399.
- Robinson, D. S. & O'Garra, A. (2002).** Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* **16**, 755-758.
- Rodriguez, A., Regnault, A., Kleijmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. & Amigorena, S. (1999).** Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* **1**, 362-368.
- Romani, N., Gruner, S., Brang, D. & other authors (1994).** Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* **180**, 83-93.
- Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P. L., Wender, P. A. & Khavari, P. A. (2000).** Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nat Med* **6**, 1253-1257.
- Rouard, H., Leon, A., Klonjowski, B. & other authors (2000).** Adenoviral transduction of human 'clinical grade' immature dendritic cells enhances costimulatory molecule expression and T-cell stimulatory capacity. *J Immunol Methods* **241**, 69-81.
- Roy, K., Mao, H. Q., Huang, S. K. & Leong, K. W. (1999).** Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* **5**, 387-391.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1994).** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. (1995).** Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**, 389-400.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S. & Lanzavecchia, A. (1998).** Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* **28**, 2760-2769.
- Sarkis, C., Serguera, C., Petres, S., Buchet, D., Ridet, J. L., Edelman, L. & Mallet, J. (2000).** Efficient transduction of neural cells in vitro and in vivo by a baculovirus-derived vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14638-14643.
- Sato, M., Takayama, T., Tanaka, H., Konishi, J., Suzuki, T., Kaiga, T. & Tahara, H. (2003).** Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2). *Cancer Sci* **94**, 1091-1098.
- Schiller, J. T. & Lowy, D. R. (2001).** Papillomavirus-like particle based vaccines: cervical cancer and beyond. *Expert Opin Biol Ther* **1**, 571-581.
- Schmolke, S., Kern, H. F., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995).** The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J Virol* **69**, 5959-5968.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. (1998).** T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* **393**, 480-483.

- Schroers, R., Sinha, I., Segall, H., Schmidt-Wolf, I. G., Rooney, C. M., Brenner, M. K., Sutton, R. E. & Chen, S. Y. (2000).** Transduction of human PBMC-derived dendritic cells and macrophages by an HIV-1-based lentiviral vector system. *Mol Ther* **1**, 171-179.
- Seki, J., Sonoke, S., Saheki, A., Fukui, H., Sasaki, H. & Mayumi, T. (2004).** A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting. *Int J Pharm* **273**, 75-83.
- Sester, M., Sester, U., Kohler, H., Schneider, T., Deml, L., Wagner, R., Mueller-Lantzsch, N., Pees, H. W. & Meyerhans, A. (2000).** Rapid whole blood analysis of virus-specific CD4 and CD8 T cell responses in persistent HIV infection. *Aids* **14**, 2653-2660.
- Sester, M., Sester, U., Gartner, B., Heine, G., Girndt, M., Mueller-Lantzsch, N., Meyerhans, A. & Kohler, H. (2001).** Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation* **71**, 1287-1294.
- Shedlock, D. J. & Weiner, D. B. (2000).** DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J Leukoc Biol* **68**, 793-806.
- Shedlock, D. J. & Shen, H. (2003).** Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**, 337-339.
- Shen, H., Mai, J. C., Qiu, L., Cao, S., Robbins, P. D. & Cheng, T. (2004).** Evaluation of peptide-mediated transduction in human CD34+ cells. *Hum Gene Ther* **15**, 415-419.
- Shibagaki, N. & Udey, M. C. (2002).** Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immunol* **168**, 2393-2401.
- Shortman, K. (2000).** Burnet oration: dendritic cells: multiple subtypes, multiple origins, multiple functions. *Immunol Cell Biol* **78**, 161-165.
- Shortman, K. & Liu, Y. J. (2002).** Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-161.
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A. & Ley, T. J. (1998).** How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr Opin Immunol* **10**, 581-587.
- Sin, J. I., Bagarazzi, M., Pachuk, C. & Weiner, D. B. (1999).** DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD vaccine model. *DNA Cell Biol* **18**, 771-779.
- Singh-Jasuja, H., Scherer, H. U., Hilf, N., Arnold-Schild, D., Rammensee, H. G., Toes, R. E. & Schild, H. (2000).** The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur J Immunol* **30**, 2211-2215.
- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G. & other authors (1998).** Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* **161**, 1083-1086.
- Sprent, J. & Surh, C. D. (2001).** Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* **13**, 248-254.
- Sprent, J. & Surh, C. D. (2002).** T cell memory. *Annu Rev Immunol* **20**, 551-579.
- Srivastava, P. (2002).** Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **2**, 185-194.

- St Angelo, C., Smith, G. E., Summers, M. D. & Krug, R. M. (1987).** Two of the three influenza viral polymerase proteins expressed by using baculovirus vectors form a complex in insect cells. *J Virol* **61**, 361-365.
- Steinman, R. M. (1991).** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* **9**, 271-296.
- Steinman, R. M. & Swanson, J. (1995).** The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* **182**, 283-288.
- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. (2000).** The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* **191**, 411-416.
- Steinman, R. M. & Nussenzweig, M. C. (2002).** Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 351-358.
- Stenger, S., Rosat, J. P., Bloom, B. R., Krensky, A. M. & Modlin, R. L. (1999).** Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today* **20**, 390-394.
- Strobel, I., Krumbholz, M., Menke, A. & other authors (2000).** Efficient expression of the tumor-associated antigen MAGE-3 in human dendritic cells, using an avian influenza virus vector. *Hum Gene Ther* **11**, 2207-2218.
- Subklewe, M., Paludan, C., Tsang, M. L., Mahnke, K., Steinman, R. M. & Munz, C. (2001).** Dendritic cells cross-present latency gene products from Epstein-Barr virus-transformed B cells and expand tumor-reactive CD8(+) killer T cells. *J Exp Med* **193**, 405-411.
- Tabi, Z., Moutaftsi, M. & Borysiewicz, L. K. (2001).** Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J Immunol* **166**, 5695-5703.
- Takashima, A. & Morita, A. (1999).** Dendritic cells in genetic immunization. *J Leukoc Biol* **66**, 350-356.
- Tani, H., Nishijima, M., Ushijima, H., Miyamura, T. & Matsuura, Y. (2001).** Characterization of cell-surface determinants important for baculovirus infection. *Virology* **279**, 343-353.
- Tedder, T. F., Zhou, L. J. & Engel, P. (1994).** The CD19/CD21 signal transduction complex of B lymphocytes. *Immunol Today* **15**, 437-442.
- Tegerstedt, K., Andreasson, K., Vlastos, A., Hedlund, K. O., Dalianis, T. & Ramqvist, T. (2003).** Murine pneumotropic virus VP1 virus-like particles (VLPs) bind to several cell types independent of sialic acid residues and do not serologically cross react with murine polyomavirus VP1 VLPs. *J Gen Virol* **84**, 3443-3452.
- Thumann, P., Luftl, M., Moc, I., Bagot, M., Bensussan, A., Schuler, G. & Jenne, L. (2003a).** Interaction of cutaneous lymphoma cells with reactive T cells and dendritic cells: implications for dendritic cell-based immunotherapy. *Br J Dermatol* **149**, 1128-1142.
- Thumann, P., Moc, I., Humrich, J., Berger, T. G., Schultz, E. S., Schuler, G. & Jenne, L. (2003b).** Antigen loading of dendritic cells with whole tumor cell preparations. *J Immunol Methods* **277**, 1-16.
- Thurner, B., Haendle, I., Roder, C. & other authors (1999).** Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**, 1669-1678.

- Traver, D., Akashi, K., Manz, M., Merad, M., Miyamoto, T., Engleman, E. G. & Weissman, I. L. (2000).** Development of CD8 α -positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* **290**, 2152-2154.
- Ulmer, J. B., DeWitt, C. M., Chastain, M. & other authors (1999).** Enhancement of DNA vaccine potency using conventional aluminum adjuvants. *Vaccine* **18**, 18-28.
- Ulrich, J. T. & Myers, K. R. (1995).** Monophosphoryl lipid A as an adjuvant. Past experiences and new directions. *Pharm Biotechnol* **6**, 495-524.
- van Loo, N. D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F. & Scholte, B. J. (2001).** Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J Virol* **75**, 961-970.
- van Mierlo, G. J., Boonman, Z. F., Dumortier, H. M. & other authors (2004).** Activation of dendritic cells that cross-present tumor-derived antigen licenses CD8⁺ CTL to cause tumor eradication. *J Immunol* **173**, 6753-6759.
- van Zanten, J., Harmsen, M. C., van der Meer, P., van der Bij, W., van Son, W. J., van der Giessen, M., Prop, J., de Leij, L. & The, T. H. (1995).** Proliferative T cell responses to four human cytomegalovirus-specific proteins in healthy subjects and solid organ transplant recipients. *J Infect Dis* **172**, 879-882.
- Vartanian, J. P., Henry, M. & Wain-Hobson, S. (2002).** Sustained G \rightarrow A hypermutation during reverse transcription of an entire human immunodeficiency virus type 1 strain Vau group O genome. *J Gen Virol* **83**, 801-805.
- Verdijk, R. M., Mutis, T., Esendam, B., Kamp, J., Melief, C. J., Brand, A. & Goulmy, E. (1999).** Polyriboinosinic polyribocytidylic acid (poly(I:C)) induces stable maturation of functionally active human dendritic cells. *J Immunol* **163**, 57-61.
- Verma, I. M. & Somia, N. (1997).** Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature* **389**, 239-242.
- Vigano, A., Schneider, L., Giacomet, V., Bianchi, R., Cicero, M. L., Soster, F., Bulgheroni, E. & Rusconi, S. (2005).** Efficacy and tolerability of multiple drug therapy in HIV-infected children. *J Infect* **50**, 404-411.
- Volkman, L. E. & Goldsmith, P. A. (1983).** In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl Environ Microbiol* **45**, 1085-1093.
- Wagle, M. & Jesuthasan, S. (2003).** Baculovirus-mediated gene expression in zebrafish. *Mar Biotechnol (NY)* **5**, 58-63.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T. & other authors (2005).** Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**, 791-796.
- Walsh, C. M., Matloubian, M., Liu, C. C. & other authors (1994).** Immune function in mice lacking the perforin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 10854-10858.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D. & Riddell, S. R. (1995).** Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* **333**, 1038-1044.

- Wang, H. Y., Fu, T., Wang, G., Zeng, G., Perry-Lalley, D. M., Yang, J. C., Restifo, N. P., Hwu, P. & Wang, R. F. (2002). Induction of CD4(+) T cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J Clin Invest* **109**, 1463-1470.
- Wang, M. J., Nissen, M. H., Buus, S., Ropke, C. & Claesson, M. H. (2003). Comparison of CTL reactivity in the spleen and draining lymph nodes after immunization with peptides pulsed on dendritic cells or mixed with Freund's incomplete adjuvant. *Immunol Lett* **90**, 13-18.
- Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P. & other authors (1998). Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* **282**, 476-480.
- Ward, N., Milstien, J., Hull, H. & Hull, B. (1993). A global overview and hope for the eradication of poliomyelitis by the year 2000. *Trop Geogr Med* **45**, 198-202.
- Wei, B. L., Denton, P. W., O'Neill, E., Luo, T., Foster, J. L. & Garcia, J. V. (2005). Inhibition of lysosome and proteasome function enhances human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* **79**, 5705-5712.
- Weiss, J. M., Sleeman, J., Renkl, A. C. & other authors (1997). An essential role for CD44 variant isoforms in epidermal Langerhans cell and blood dendritic cell function. *J Cell Biol* **137**, 1137-1147.
- Weller, T. H. & Coons, A. H. (1954). Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med* **86**, 789-794.
- West, M. A., Wallin, R. P., Matthews, S. P., Svensson, H. G., Zaru, R., Ljunggren, H. G., Prescott, A. R. & Watts, C. (2004). Enhanced dendritic cell antigen capture via toll-like receptor-induced actin remodeling. *Science* **305**, 1153-1157.
- Wiedlocha, A., Falnes, P. O., Madshus, I. H., Sandvig, K. & Olsnes, S. (1994). Dual mode of signal transduction by externally added acidic fibroblast growth factor. *Cell* **76**, 1039-1051.
- Wilke, M., Fortunati, E., van den Broek, M., Hoogeveen, A. T. & Scholte, B. J. (1996). Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther* **3**, 1133-1142.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. & Sissons, J. G. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* **70**, 7569-7579.
- Wulfing, C., Bauch, A., Crabtree, G. R. & Davis, M. M. (2000). The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10150-10155.
- Wyatt, C. M. & Klotman, P. E. (2006). Antiretroviral therapy and the kidney: balancing benefit and risk in patients with HIV infection. *Expert Opin Drug Saf* **5**, 275-287.
- Xiang, J., Wunschmann, S., George, S. L., Klinzman, D., Schmidt, W. N., LaBrecque, D. R. & Stapleton, J. T. (2002). Recombinant hepatitis C virus-like particles expressed by baculovirus: utility in cell-binding and antibody detection assays. *J Med Virol* **68**, 537-543.
- Xu, Y., Tao, X., Shen, B., Horng, T., Medzhitov, R., Manley, J. L. & Tong, L. (2000). Structural basis for signal transduction by the Toll/interleukin-1 receptor domains. *Nature* **408**, 111-115.
- Yu, W. H., Kashani-Sabet, M., Liggitt, D., Moore, D., Heath, T. D. & Debs, R. J. (1999). Topical gene delivery to murine skin. *J Invest Dermatol* **112**, 370-375.

Zeuzem, S. (2004). Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann Intern Med* **140**, 370-381.

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G. & other authors (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9294-9299.

Zhu, S. G., Xiang, J. J., Li, X. L. & other authors (2004). Poly(l-lysine)-modified silica nanoparticles for the delivery of antisense oligonucleotides. *Biotechnol Appl Biochem* **39**, 179-187.

Zitvogel, L., Regnault, A., Lozier, A., Wolfers, J., Flament, C., Tenza, D., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G. & Amigorena, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* **4**, 594-600.

Zoog, S. J., Papov, V. V., Pullen, S. S., Jakes, S. & Kehry, M. R. (2004). Signaling and protein associations of a cell permeable CD40 complex in B cells. *Mol Immunol* **40**, 681-694.

Danksagung:

Mein Dank gilt allen voran Prof. Andreas Meyerhans für die unzähligen fachlichen Diskussionen und vor allem die Schaffung wissenschaftlicher Freiräume, die mir dabei geholfen haben, über mich hinauszuwachsen.

Ebenso möchte ich Prof. Eckart Meese für die Übernahme des Zweitgutachtens danken.

Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern der Blutbank der Winterbergkliniken für die Bereitstellung des Patientenmaterials und der zugehörigen Informationen.

Bei allen Mitarbeitern der Virologie/Homburg möchte ich mich herzlich für die nette Arbeitsatmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft bedanken, vor allem aber auch bei dem Leiter des Instituts für Virologie, Prof. Nikolaus Müller-Lantzsch, der so eine Arbeitsatmosphäre überhaupt erst möglich gemacht hat.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. Alexandra Schütz für ihre experimentelle Expertise und ihre Freundschaft.

Außerdem habe ich anregende Diskussionen mit Dr. Tanja Breinig und Dr. Reinhard Maier, sowie Dr. Maria Mathilde Bartolome Rodriguez und Prof. Juana Diez geführt, für deren Anregungen ich sehr dankbar bin.

Tanja Tänzer, Birgit Weber und Daniela Holzer danke ich für exzellente technische Assistenz und wie auch Carsten Krieg, Rhoikos Furtwängler, Dr. Marco Schäfer, Andreas Jung, Felix Bock, Anke Schulz, Christina Hohn, Rui Galao, Patricia Resa, Leonardo Mina, Javier Martinez und Dr. Jochen Reiter für den vielen Spaß, den ich in unserer Arbeitsgruppe gehabt habe.

Außerdem danke ich Dr. Milena Kitova, Dr. Vivienne Armbrüster und Dr. Orsolya Kreneisz, die quasi promotionsbegleitend freundschaftlich mit mir verbunden blieben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich im Studium und danach fortwährend unterstützt haben.

Lebenslauf und wissenschaftlicher Werdegang:

Persönliche Angaben

| | |
|---------------|--------------------|
| Name: | Nicoletta Scheller |
| Geburtsdatum: | 09.12.1973 |
| Geburtsort: | Husum |

Schulausbildung

| | |
|-------------|----------------------------------|
| 1980 – 1984 | Grundschule Emmelsbüll-Horsbüll |
| 1984 – 1993 | Friedrich-Paulsen-Schule Niebüll |
| | Allgemeine Hochschulreife |

Berufsausbildung

| | |
|-------------|--|
| 1994 – 2001 | Biologie-Studium an der Universität des Saarlandes Hauptfach: Genetik Nebenfächer: Virologie und Mikrobiologie Thema der Diplomarbeit: Modulation der Gedächtnis-T-Zell-Stimulation im In-Vitro-Stimulationsassay: Entwicklung eines Expressionssystems zur Herstellung von Transduktionsdomänengekoppeltem Antigen Abschluß mit Auszeichnung |
| 2001– 2006 | Anfertigung der Dissertation an den Universitätskliniken Homburg/Saar, Institut für Virologie Betreuer: Prof. Andreas Meyerhans |

Eidesstattliche Versicherung:

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quellen gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Saarbrücken, April 2006

(Nicoletta Scheller)