

**Optimierung einer DC-fokussierten  
Expressionsstrategie zur Modulation von  
Immunantworten:**

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

**Am Fachbereich 08, Biologie und Chemie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

**Thomas Kirchner  
geb. am 12.09.1974  
In Heilbronn**

Gießen, 2007

**Gutachter:**

1. Herr Prof. Dr. Michael Martin
2. Frau Prof. Dr. Tina Trenczek

Tag der mündlichen Prüfung:

**Erklärung**

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig ohne unzulässige Hilfe angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder im Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe, dass die Dissertation noch an keiner anderen Fakultät zur Prüfung vorgelegt wurde, und dass sie nicht veröffentlicht worden ist. Die Bestimmungen der geltenden Promotionsordnung sind mir bekannt.

## **Danke:**

Herrn Prof. Dr. M. Martin danke ich für die Betreuung der Arbeit und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes. Gleichzeitig möchte ich mich für zahlreiche interessante Diskussionen und Ratschläge bedanken, die mir halfen, meine Ergebnisse teilweise aus einem völlig anderen Blickwinkel heraus zu interpretieren und dadurch neue Aspekte für meine Arbeit zu gewinnen. Außerdem bedanke ich mich für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und für die Vermittlung wichtiger Kontakte, durch die ich meine Arbeit nachhaltig voranbringen konnte.

Desweiteren möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. T. Trenczek für die Übernahme des Koreferats bzw. für die Erstellung des Zweitgutachtens bedanken.

Herrn Prof. Dr. F. Dreyer danke ich für die Bereitschaft an der Prüfung teilzunehmen.

Ich danke Herrn HD Dr. R. Ross für seine ständige Diskussionsbereitschaft, für zahlreiche Tipps und für viele interessante Gespräche.

Außerdem bedanke ich mich bei meinen Doktorandenkollegen, Christoph Linke, Thomas Körner, Shafaqat Ali und Dany Quan Nguyen für viele interessante Diskussionen und eine gute und konstruktive Arbeitsatmosphäre. Mein Dank gilt auch den Mitarbeitern am Institut für Immunologie, Herrn Dr. Christian Kollwe, Frau Heidi Müller, Betty Reitz, Miriam Findt und Ulrike Lenz, sowie den Diplomanden Juan Patrón, Heidrun Windisch, Thomas Schmidt, Björn Gerlach und Eva Rieser für gute Zusammenarbeit und interessante Gespräche, aus denen ich oftmals neue Impulse für meine Arbeit gewinnen konnte.

Ich bedanke mich beim Team der Blutbank Gießen für die Koordination und Bereitstellung der Buffy Coats, die eine essentielle Grundlage für meine Arbeit darstellten.

Nicht zu letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, vor allem meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglichten und mich in der vergangenen Zeit weiter in meinem Tun unterstützten. Besonders in der Endphase meiner Arbeit, konnte ich daraus eine zusätzliche Motivation schöpfen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem .....	1
1.1.1	Zellen des Immunsystems .....	1
1.1.2	Reaktion auf extra- bzw. intrazelluläre Krankheitserreger .....	4
1.1.3	Initiierung einer spezifischen Immunantwort vermittelt durch DC ..	6
1.2	Immunisierung, (DNA)-Vakzinierung:.....	10
1.3	Funktion von Fascin – Beschreibung seines Promotors .....	12
1.4	Einsatz zur Induktion von Toleranz.....	13
1.4.1	Transplantation.....	13
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>16</b>
2.1	Material .....	16
2.1.1	Material für Molekularbiologische Arbeiten .....	16
2.1.1.1	Geräte .....	16
2.1.1.2	Chemikalien.....	17
2.1.1.3	Reaktionskits .....	18
2.1.1.4	DNA-Vektoren .....	19
2.1.1.5	Enzyme und Reaktionspuffer .....	21
2.1.1.5.1	Restriktionsenzyme .....	21
2.1.1.5.2	weitere Enzyme und Mononukleotide .....	22
2.1.1.6	DNA-Marker .....	22
2.1.1.7	Oligonukleotide.....	22
2.1.1.8	Puffer und Lösungen .....	25
2.1.1.8.1	Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA.....	26
2.1.1.8.2	Bakterienmedium .....	28
2.1.1.9	Bakterienstämme .....	30
2.1.2	Material für die Kultivierung / Transfektion von Säugerzellen .....	31
2.1.2.1	Geräte .....	31
2.1.2.2	Lösungen, Puffer, Kulturmedien .....	32
2.1.2.3	Säugerzellkulturmedien.....	34
2.1.2.4	Zytokine, Prostaglandin E2.....	35
2.1.2.5	Antikörper .....	35
2.1.2.6	Transfektionsreagentien und Lösungen: .....	37

2.1.2.7	weitere Verbrauchsmaterialien .....	38
2.1.2.8	Säugerzell-Linien.....	39
2.1.3	Allgemeine Verbrauchsmaterialien .....	39
2.2	Methoden.....	40
2.2.1	Molekularbiologische Methoden .....	40
2.2.1.1	Bakterienanzucht.....	40
2.2.1.2	Herstellung Chemokompetenter Zellen .....	40
2.2.1.3	Transformation chemokompetenter Zellen .....	41
2.2.1.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	41
2.2.1.4.1	„Koch“-Methode .....	41
2.2.1.4.2	Alkalische Lyse .....	42
2.2.1.4.2.1	Plasmid-Isolierung im Kleinmaßstab – Minipräparation ..	42
2.2.1.4.2.2	Plasmidisolierung in präparativen Mengen – Midipräparation .....	43
2.2.1.5	Bestimmung der DNA-Konzentration .....	44
2.2.1.6	Agarosegelelektrophorese.....	44
2.2.1.7	Restriktionsverdau von DNA .....	45
2.2.1.8	Aufreinigung von DNA-Molekülen .....	45
2.2.1.9	DNA-Ligation & Klonierung.....	46
2.2.1.10	Klenow-Reaktion .....	47
2.2.1.11	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	47
2.2.1.12	DNA-Sequenzierung .....	48
2.2.2	Methoden der Zellkultur .....	49
2.2.2.1	Kulturbedingungen .....	49
2.2.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	49
2.2.2.3	Kryokonservierung - Auftauen von Zellen.....	50
2.2.2.4	Kultivierung humaner DC aus Monozyten .....	51
2.2.2.5	Dapi-Färbung zur Detektion von Mycoplasmen & Cytospins...	53
2.2.2.6	transiente Transfektion von Eukaryonten-Zellen .....	54
2.2.2.6.1	Transfektion der hDC .....	55
2.2.2.6.1.1	Amaza-Methode.....	56
2.2.2.6.1.2	Elektroporation der hDC .....	56
2.2.2.6.2	Transfektion der XS106 Zellen – DEAE-Dextran-Methode .	57
2.2.2.6.3	Transfektion der HaCaT-Zell-linie .....	58
2.2.2.6.3.1	Ca-Phosphat-Kopräzipitation .....	58
2.2.2.6.3.2	Lipofektion – GenePorter-Reagenz.....	59

2.2.2.7	Durchflusscytometrie & Immunfluoreszenz .....	60
2.2.2.8	Auswertung transient transfizierter Zellen .....	62
2.2.2.8.1	Dual-Luziferasetest .....	62
2.2.2.8.2	Nachweis der EGFP-Expression.....	63
2.2.2.9	MTT-Test.....	64
2.2.3	Statistik.....	65
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>66</b>
3.1	Charakterisierung des Modellsystems hDC .....	66
3.1.1	PBMC-Isolierung, Anreicherung der Monozyten.....	66
3.1.2	Zusammensetzung der Präparation am Kulturtag 9 (Transfektionszeitpunkt), Reifegrad der hDC.....	67
3.1.3	Serum als kritische Komponente der hDC Generierung .....	69
3.1.4	Dokumentation Differenzierung / Ausreifung der hDC:.....	70
3.2	Experimente im Rahmen der Etablierung des Reportergentests .....	72
3.2.1	Kotransfektion zweier Plasmide zur Nivellierung von Expressionsunterschieden.....	72
3.2.2	Nachweis der Kotransfektion zweier Plasmide .....	73
3.2.3	Einfluss der in der Präparation verbliebenen Lymphozyten auf den Reportergentest.....	73
3.3	Spezifität des Fascin-Promotors auf Dendritische Zellen.....	75
3.4	Aktivität des Fascin-Promotors korreliert mit Reifegrad der hDC .....	75
3.5	Verstärkung der Promotoraktivität durch Duplikation Fascinpromotoreigener Elemente .....	78
3.5.1	Herstellung eines 5'-deletierten Fascin-Promotors als Basis für weitere Klonierungen.....	78
3.5.2	Erzeugung von Teilfragmenten der Homologieregion A, B.....	79
3.5.2.1	Einfluss auf die Expressionsstärke eines nach- geschalteten Reportergens durch Duplikation von Teilfragmenten bzw. der ganzen Homologieregion AB-Klonierung in die Bal-I-Schnittstelle von pFascin2.7Bal ....	81
3.5.3	Einfluss der Homologieregion A bzw. des DNA-Abschnitts D7 – D6 .....	84
3.5.4	Einfluss auf die Expressionsstärke, wenn mehrere D2D7-Einheiten hintereinander gesetzt werden .....	86
3.5.5	Test der Fascin-Promotorderivate in der Keratinozyten-Zell-Linie HaCaT. Dokumentation der Spezifität auf DC .....	87
3.6	Aktivität des humanen Fascin-Promotors in der murinen Zelllinie XS106.....	90

3.7	Verstärkung der Expressionseffizienz transfizierter Reporter-genkonstrukte in DC durch Verbesserung des Kerntransports .....	91
3.7.1	Einfluss einer plasmidlokalisierten NFkB-Bindungssequenz auf die Expression der Reportergene EGFP / Luziferase in hDC.....	92
3.7.1.1	Herstellung der Konstrukte pFascin2.7NFkB-Luc bzw. pFascin2.7EGFP.....	92
3.7.1.2	Transfektion der Konstrukte Fascin2.7NFkB in hDC .....	94
3.7.1.3	Etablierung einer Methode zur Transfektion der hDC durch Elektroporation .....	96
3.7.1.4	Einfluss der plasmidlokalisierten NFkB-Bindungsstelle auf die Expressionseffizienz nach Transfektion der hDC durch Elektroporation .....	98
3.7.1.5	Transfektion der Konstrukte Fascin2.7 +/- NFkB in XS106.....	99
3.7.1.6	Nachweis der Spezifität auf DC – Transfektion in HaCaT .....	100
3.7.1.7	Untersuchungen der Fascinpromotor-eigenen NFkB-site.....	102
3.7.1.7.1	Herstellung des Konstrukts .....	102
3.7.1.7.2	Transfektion von pFascin2.7NFkB-fas in DC.....	103
3.8	Arbeiten zur Induktion von Immuntoleranz.....	105
3.8.1	Wirkung auf DC mittels pharmakologischer Inhibitoren .....	106
3.8.1.1	Auswahl des Zellsystems .....	107
3.8.1.1.1	XS106 - Expression Oberflächenmarker.....	108
3.8.1.1.1.1	XS106: Einschätzung der Toxizität mittels MTT-Test ...	108
3.8.1.1.1.2	XS106: Einfluss der Inhibitoren auf die Expression von Oberflächenmarkern .....	110
3.8.1.1.2	SP37A3: Expression der Oberflächenmarker.....	111
3.8.1.1.2.1	SP37A3: Dokumentation der Toxizität .....	113
3.8.1.1.2.1.1	MTT-Test.....	113
3.8.1.1.2.1.2	Bilanzierung der Zellzahl unter Verwendung von Trypanblau.....	115
3.8.1.1.2.2	SP37A3: Einfluss auf die Expression von CD40 – CD80 – CD86.....	116
3.8.1.1.2.2.1	SP37A3: Wirkung von GW5074 und NPC15437; U0126 und LY294002.....	117
3.8.1.1.2.2.2	SP37A3: Wirkung von Bay11-7082 5µM und PDTC 60µM.....	118
3.8.1.1.2.2.3	SP37A3: Wirkung von SB203580 .....	119
3.8.1.1.2.3	SP37A3: Einfluss auf die Expression weiterer Oberflächenmarker .....	119

<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>121</b>
4.1	CD14 <sup>+</sup> Monozyten aus Blutspenden sind als Basis zur Generierung von hDC geeignet .....	121
4.1.1	Bewertung des verfügbaren Zellsystems.....	121
4.1.2	Die Qualität des Serums bedingt den Reifegrad der hDC .....	122
4.1.3	Positivselektion mit einem CD83-Antikörper.....	124
4.1.4	Depletion kontaminierender Lymphozyten.....	125
4.2	Mögliche Strategien zur Verstärkung der Promotoraktivität.....	125
4.2.1	Potentielle Eignung viraler Enhancer-Elemente zur Verstärkung der Promotoraktivität .....	126
4.2.2	Nutzung eines Fascin-Promotoreigenen Enhancerelements.....	127
4.2.2.1	Einfluss der Position des neu eingefügten Enhancer-Elements.....	128
4.2.2.2	Potentieller Einfluss der Größe des Expressionsplasmids ...	129
4.2.3	Expressionsverstärkung durch Klonierung mehrerer Enhancer-Elemente direkt hintereinander.....	130
4.2.3.1	Potentieller Einfluss der Orientierung des einklonierten Enhancer-Elements.....	130
4.2.3.2	Limitation in der Menge vorhandener Transkriptionsfaktoren	131
4.2.3.3	Einfluss der räumlichen Anordnung bindender Transkriptionsfaktoren .....	132
4.2.4	Resümée der diskutierten Parameter .....	133
4.2.5	Weitere Arbeiten aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen ..	134
4.2.6	Unspezifische Maßnahmen zur Erhöhung der Expressionsstärke .....	135
4.2.6.1	Verbesserung des Kerntransports durch Einfügen der NFkB-Bindungsstelle .....	136
4.2.6.1.1	Einfluss des Basalpromotors.....	136
4.2.6.1.2	Beurteilung der Expression der EGFP +/- NFkB-Konstrukte .....	137
4.2.6.1.2.1	Methodische Einflüsse auf die EGFP-Expression.....	138
4.2.6.1.2.2	Vermittlung der Transportfunktion durch die NFkB-Moleküle in DC.....	138
4.2.6.1.2.3	Einfluss des Transfektionszeitpunktes auf die Transportfunktion der NFkB-Moleküle .....	139
4.2.6.1.2.4	Differenzielle Regulation der NFkB-Signalübertragung in DC.....	140
4.2.6.1.2.5	Einfluss der Sequenz der NFkB-Bindungsstelle.....	142
4.3	Arbeiten zur Immuntoleranz.....	145



4.3.1	Eignung der XS106-Zelllinie als in-vitro-Testsystem .....	146
4.3.2	Einfluss diverser Inhibitoren auf die Zelllinie SP37A3 .....	147
4.3.3	Inhibition des NFκB-Signalweges durch Bay11-7082 bzw. PDTC.....	150
4.3.4	Inhibition des p38-MAP-Kinase Signalweges durch SB203580.....	152
4.3.5	Einfluss von SB203580 auf die Expression weiterer Oberflächenmarker .....	153
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>158</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>159</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>180</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>184</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>186</b>
<b>10</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>187</b>
10.1	Experimente zur Etablierung einer Squarepulsmethode:.....	187
10.2	Übersicht DNA-Sequenz des Plasmids Fascin2.7 .....	188
10.3	PCR-Protokolle: .....	192
10.3.1	Amplifikation von DNA-Bereichen:.....	192
10.3.2	Sequenzierbedingungen:.....	193
10.4	Vektoren .....	194
10.4.1	pDsRed2-N1 .....	194
10.4.2	pZErO-2.1 .....	195
10.4.3	pCI-EGFPn1 .....	196
10.4.4	pEGFP-C1 .....	197
10.4.5	pGI3-Basic .....	198
10.4.6	pGI3-Control .....	199
10.4.7	pRL-CMV .....	200
10.4.8	pNF-κB-Luc, pGFPmax .....	201

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunsystem

Jeder Organismus ist ständig dem Angriff unterschiedlicher Erreger wie Bakterien, Viren u. a. parasitären Lebewesen ausgesetzt, die versuchen, den Organismus für sich als neuen Lebensraum zu erschließen. Im Lauf der Evolution wurden deshalb von den meisten Organismen Strategien entwickelt, sich gegen diese meist mikroskopisch kleinen Feinde zu erwehren. Die Summe aller Abwehrmechanismen oder auch Immunreaktionen genannt, wird als Immunsystem bezeichnet.

### 1.1.1 Zellen des Immunsystems

Bei den Säugetieren einschließlich des Menschen unterscheidet man zwischen angeborenen unspezifischen Immunreaktionen und spezifischen erworbenen Immunantworten. Bei den beteiligten immunkompetenten Zellen handelt es sich um Leukozyten, die ihrerseits alle aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks hervorgehen (Janeway und Travers, 2004; Vollmar und Dingermann, 2005).

Aus den myeloiden Vorläuferzellen entstehen neben den roten Blutzellen und Blutplättchen auch Granulozyten-/Makrophagenvorläuferzellen, aus denen neben Monozyten auch alle drei Arten Granulozyten gebildet werden: neutrophile, die vorwiegend phagozytotisch aktiv sind (Rosales und Brown, 1993), eosinophile, die in der Abwehr von Parasiten wie Helminthen von Bedeutung sind (Gouinni et. al 1994) und basophile Granulozyten, die Substanzen sezernieren, die z.B. die Gefäßpermeabilität beeinflussen (Wardlaw et al 1995). Alle Granulozyten sind nach heutigem Verständnis überwiegend an unspezifischen Immunreaktionen beteiligt. Monozyten, die in Körpergewebe einwandern, entwickeln sich entweder zu Makrophagen oder Dendritischen Zellen (DC) (Inaba et al.1993, Randolph et al 1998, 1999). Diese beiden Zelltypen fungieren als Bindeglieder zwischen dem angeborenen und dem spezifischen Immunsystem. Innerhalb der schnell einsetzenden unspezifischen Immunreaktion sind vor allem die Makrophagen aber auch Dendritische Zellen phagozytotisch aktiv. Die aufgenommenen Proteine pathogener Erreger werden zu kleinen Peptiden abgebaut, und T-Zellen in den sekundären lymphatischen Organen präsentiert, die daraufhin eine spezifische Immunantwort initiieren (vgl. unter 1.1.3). DC sind aufgrund Ihrer zellulären

## 1 - Einleitung

---

Ausstattung wesentlich potenter in der Antigengenerierung bzw. –präsentation und können weitaus stärker als Makrophagen T-Lymphozyten aktivieren (Steinman et al. 1993). Ursächlich hierfür können die für unreife Dendritische Zellen charakteristischen, MHC-Klasse-II-reichen Peptidbeladungs-Kompartimente (MIIC<sup>1</sup>) (Sallusto et al., 1995, Pierre et al., 1997) gesehen werden. DC bilden zusammen mit B-Zellen und Makrophagen die Gruppe der professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC<sup>2</sup>), die, wenn auch nur in geringer Anzahl, in allen Körpergeweben vorkommen.

Neben myeloiden repräsentieren lymphoide Vorläuferzellen die andere große Gruppe pluripotenter Vorläuferzellen des Knochenmarks, aus denen sich die Lymphozyten ableiten. Diese differenzieren entweder zu B-Zellen (Cumano et al. 1994), T-Zellen (Shortman et al. 1990), NK-Zellen<sup>3</sup> oder einem bestimmten Subtyp Dendritischer Zellen, den lymphoiden DC. B- und T-Zellen exprimieren ein Oberflächenprotein aus der Gruppe der Immunglobuline, die strukturell eng verwandt und aus variablen und konstanten Ketten aufgebaut sind. Diese Rezeptoren können hochaffin ein spezifisches Antigen erkennen. Im Fall des B-Zell-Rezeptors (BCR<sup>4</sup>) handelt es sich um das native antigene Protein anhand seiner räumlichen Struktur, der T-Zell-Rezeptor (TCR<sup>5</sup>) hingegen erkennt das entsprechende Antigen über sein charakteristisches, kurzes Peptidfragment, das den T-Zellen im MHC<sup>6</sup>-Kontext präsentiert wird.

Lymphozyten durchlaufen eine Reihe von Reifungsprozessen bis sie schließlich als reife Lymphozyten in die sekundären Immunorgane wandern. Die Heranreifung von Lymphozyten aus Stammzellen des Knochenmarks ist für B- und T-Zellen grundsätzlich gleich, lediglich der Ort, an dem die Ausreifung geschieht, ist unterschiedlich: T-Zellen reifen im Thymus, B-Zellen hingegen im Knochenmark. T-Zellen gelangen in den Thymus als doppelt negative Zellen. Zu diesem Zeitpunkt besitzen sie weder einen T-Zellrezeptor noch die charakteristischen Korezeptormoleküle CD4 bzw. CD8. Zunächst kommt es zur

---

<sup>1</sup> MIIC = MHC II rich compartments – MHCII-reiche Kompartimente

<sup>2</sup> APC = antigen presenting cell – antigenpräsentierende Zelle

<sup>3</sup> natural killer cells – natürliche Killerzellen

<sup>4</sup> BCR = B-Cell receptor – B-Zellrezeptor

<sup>5</sup> TCR = T-cell receptor – T-Zellrezeptor

<sup>6</sup> MHC – major histocompatibility complex – membranständiger Rezeptor mit dessen Hilfe die prozessierten Antigene präsentiert werden,

## 1 - Einleitung

---

Ausbildung von sog. Prä-T-Antigenrezeptoren, die nur aus einer Kette bestehen, im Verlauf der weiteren Reifung entsteht schließlich der komplette T-Zellrezeptor, der die Basis für weitere Selektionsprozesse bildet. Neben der Expression des T-Zellrezeptors werden sowohl CD4 als auch CD8 Moleküle auf der T-Zelle exprimiert. In den tiefen Schichten der Thymuscortex erfolgt durch Kontakt mit Epithelzellen eine Positivselektion:

Nur diejenigen T-Zellen, die mit Peptid beladene Eigen-MHC-I- (Hogquist et al., 1993) oder MHC-II-Moleküle (Barton und Rudensky, 1999) mit niedriger Affinität erkennen, werden ausgewählt, und am Ende dieser Selektionsphase exprimieren die T-Zellen nur noch einen der beiden Oberflächenrezeptoren, CD4 **oder** CD8. Dabei ist die Expression von CD4 auf T-Zellen beschränkt, deren T-Zellrezeptor im MHC-Klasse-II-Kontext präsentierte antigene Peptide erkennt. Nach Ihrer Aktivierung differenzieren diese T-Zellen zu sog. T-Helferzellen. CD8 wird von T-Zellen exprimiert, deren T-Zellrezeptor Antigenpeptide erkennt, die ihm über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden. Nach Antigenkontakt differenzieren diese zu sog. cytotoxischen T-Zellen (CTL<sup>7</sup>).

Im nächsten Schritt kommt es zur Negativselektion. Dabei werden im Thymus diejenigen unreifen T-Zellen eliminiert, die auf Peptide reagieren, welche durch Degradation körpereigener Proteine entstanden sind. An der Negativselektion, die in der Thymus-Medulla stattfindet, sind Dendritische Zellen beteiligt, die den T-Lymphozyten diese „Selbst“-Antigene entweder im MHC Klasse-I oder im MHC Klasse-II Kontext präsentieren (Laufer et al., 1996, Brocker et al., 1997). Die Entfernung autoreaktiver T-Lymphozyten im Thymus wird auch zentrale Tolerisierung genannt. Körpereigene Proteine, deren Expression auf wenige Gewebe bzw. Zelltypen beschränkt ist, werden reifen T-Lymphozyten im sekundären lymphatischen Gewebe von unreifen DC präsentiert. Den unreifen DC fehlt weitgehend die Expression kostimulatorischer Moleküle, die zur Aktivierung der T-Zellen notwendig ist. Auf diese Weise wird den reifen T-Lymphozyten ebenfalls Toleranz gegen körpereigene Proteine vermittelt (periphere Toleranz). Ähnliche Mechanismen existieren in der Peripherie (sekundäre lymphatische Organe) zur Deletion bzw. Anergisierung autoreaktiver T-Zellklone, die der zentralen Negativselektion im Thymus entgangen sind (Förster und Lieberam, 1996; Kurts et al. 1997).

In unreifen B-Zellen, die entweder keinen BCR (IgM) auf ihrer Oberfläche exprimieren bzw. die über ihren B-Zellrezeptor Antigene im Knochenmark mit hoher Affinität binden,

---

<sup>7</sup> CTL = cytotoxic T-lymphocyte – zytotoxischer T-Lymphozyt

## 1 - Einleitung

---

wird Apoptose induziert und auf diese Weise funktionsunfähige bzw. autoreaktive B-Zellen eliminiert. Die Reifung von B-Zellen ist verbunden mit der Koexpression von IgD an ihrer Oberfläche.

B- und T-Zellen, die noch keinen Kontakt mit Antigen hatten, werden naive B- und T-Zellen genannt. Diese zirkulieren im Blutstrom und den sekundären lymphatischen Organen wie Milz und Lymphknoten (Davenport et al.; 2000). Treffen diese Zellen dort auf ein Antigen, das hochspezifisch durch den entsprechenden Oberflächenrezeptor erkannt wird, kommt es zur Aktivierung der B- bzw. T-Zellen, die dann entweder zu Effektor- oder Gedächtniszellen differenzieren. Effektorzellen obliegt die zügige Vermittlung der spezifischen Immunantwort, wohingegen die Gedächtniszellen die Information über die Begegnung mit dem spezifischen Antigen und der ausgelösten Reaktion konservieren. Bei einem erneuten Kontakt mit dem gleichen Antigen, können die Gedächtniszellen dann sehr schnell aktiviert werden und eine gerichtete Immunantwort induzieren (Sprent, 1997).

### 1.1.2 Reaktion auf extra- bzw. intrazelluläre Krankheitserreger

Krankheitserreger besitzen an ihrer Oberfläche sich regelmäßig wiederholende Strukturmuster (PAMPs<sup>8</sup>) z. B. LPS (Lipopolysaccharid) von gram-negativen oder Lipoteichonsäure (LTA) gram-positiver Bakterien, die beim Eintritt der Erreger in den Organismus von Zellen der unspezifischen Immunabwehr (z.B. Phagozyten) über sogenannte Mustererkennungsmoleküle (PRR<sup>9</sup>) erkannt werden. Da diese Strukturen nur auf Mikroben, nicht aber auf körpereigenen Zellen vorkommen, kann auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen „fremd“ und „eigen“ erfolgen. Kann die Entfernung von Krankheitserregern nicht durch eine Sofortreaktion (im Wesentlichen Komplementaktivierung und Phagozytose) erfolgreich durchgeführt werden, so wird eine lokale Entzündungsreaktion ausgelöst. Dabei sezernieren vornehmlich Makrophagen nach Pathogenkontakt proinflammatorische Cytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 sowie Chemokine wie IL-8 (Maestrelli et al., 1988). Die Sekretion der Chemokine führt zur Anlockung von APC entlang eines chemotaktischen Gradienten an den Ort der Infektion bzw. Entzündung. Die APCs phagozytieren die extrazellulär vorliegenden Pathogene bzw. ihre verbliebenen Überreste und degradieren diese endosomal-lysosomal. Die dabei

---

<sup>8</sup> PAMP = pathogen-associated-molecular pattern = molekulare Musterstrukturen, die charakteristisch für Pathogene sind

<sup>9</sup> PRR = pattern recognition receptors = Mustererkennungsmoleküle

## 1 - Einleitung

---

entstehenden Antigenpeptide mit einer Länge von 12 bis 26 Aminosäuren werden in die Bindungsgrube von vornehmlich MHC-Klasse-II-Molekülen aufgenommen, deren Expression weitgehend auf APC beschränkt ist. Neben der Prozessierung von Antigen sezernieren die aktivierten APC ebenfalls proinflammatorische Cytokine bzw. leukozytenattrahierende Chemokine. Gleichzeitig regulieren sie ihre eigenen Chemokinrezeptoren herunter, um durch diese Maßnahme den Infektionsort verlassen zu können (Sozzani et al., 2000).

Eine Infektion mit intrazellulären Pathogenen wie z. B. Viren wird von den betroffenen Körperzellen durch Präsentation des degradierten „fremden“ Peptids im MHC I-Kontext angezeigt. Generell werden Proteine, die im Zellinneren, cytosolisch, vorliegen, über die proteasomale Degradation zu kurzen Peptiden mit einer Länge von 8 bis 10 Aminosäuren abgebaut und über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert (Lehner, 1996). Die Zelle unterscheidet bei der Degradation bzw. Präsentation von Antigen nicht zwischen eigenen Proteinen oder jenen von intrazellulären Pathogenen bzw. Virusproteinen, die unter Nutzung der zelleigenen Translation gebildet wurden, so dass, wie angesprochen, auch Peptide von diesen Proteinen gleichermaßen präsentiert werden. Über die Präsentation der Peptide via MHC-I-Moleküle können sowohl NK-Zellen<sup>10</sup> als auch CTLs erkennen, welche Zellen infiziert sind, und diesen Zellen das Signal zum Absterben durch Initiierung von Apoptose vermitteln.

In gewissem Umfang ist speziell in DC auch die Aufnahme extrazellulären Proteins in die proteasomale Degradation möglich. Die resultierenden Peptide werden dann wie intrazelluläre Proteine, über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert. Dieser Vorgang ist als „Kreuz-Präsentation“ beschrieben (Huang et al., 1996). Nach einem ähnlichen Funktionsprinzip lässt sich auch die Initiierung einer zellulären Immunreaktion gegen Tumore erklären, wenn DC Bestandteile von Tumorzellen aufnehmen (Paglia et al., 1996, Mayordomo et al., 1995).

---

<sup>10</sup> Erkennung erfolgt unspezifisch über sog. KIRs (Killer inhibitory receptors – Rezeptoren, die das Abtöten der Zelle verhindern)

### 1.1.3 Initiierung einer spezifischen Immunantwort vermittelt durch DC

Für die Auslösung einer spezifischen Immunantwort sind APC erforderlich. Besonders DC nehmen hierbei eine zentrale Stellung ein, da, nach heutigem Kenntnisstand, vermutlich alleine sie in der Lage sind, naive antigenspezifische T-Zellen zu aktivieren (Macatonia et al., 1987, Inaba et al., 1990). Dendritische Zellen, die Antigen aufgenommen haben, werden dadurch aktiviert und unter Stimulation von proinflammatorischen Cytokinen, die von Endothelzellen und Makrophagen sezerniert werden, wird in ihnen ein Reifungsprozess ausgelöst. Parallel zur Ausreifung wandern sie aus dem infizierten Gewebe aus. Dies geschieht über die am nächsten gelegenen afferenten Lymphbahnen in die sekundären lymphatischen Organe (Macatonia et al.; 1987). Unterstützt wird diese Migration wiederum durch spezifische Chemokine wie z.B. IL-8 oder SLC<sup>11</sup>, die von Stroma- oder Endothelzellen der Gefäße peripherer Lymphorgane produziert und sekretiert werden. Dendritische Zellen exprimieren Rezeptoren für IL-8 und SLC über die die Chemokine die Attraktion in die sekundären lymphatischen Organe vermitteln. Die DC gelangen schließlich in die parakortikalen T-Zellreichen Regionen im lymphatischen Gewebe und sezernieren dann ihrerseits Chemokine wie SLC oder ELC<sup>12</sup>. Die additive Sekretion beider Chemokine ist wichtig, damit T-Zellen, aber auch B-Zellen in den Lymphknoten einwandern. Im lymphatischen Gewebe suchen T-Zellen die Oberfläche der Dendritischen Zelle nach spezifischen MHC/Peptid-Komplexen ab. Dabei erfolgt zunächst eine Assoziation beider Zellen über Wechselwirkungen zwischen Adhäsionsmolekülen wie z. B. ICAM-3<sup>13</sup> (T-Zelle) und DC-SIGN<sup>14</sup> (DC) (Gejtenbeek et al., 2000) oder LFA-1<sup>15</sup> (T-Zelle) und ICAM-1 (DC). Findet die T-Zelle einen spezifischen Peptid/MHC-Komplex auf der Dendritischen Zelle wird LFA-1 aktiviert, und es erfolgt eine stabile Bindung mit dem Interaktionspartner auf der DC. Die Berührungszone zwischen den beiden Zellen wird Immunologische Synapse genannt. Die Immunologische Synapse ist so strukturiert,

---

<sup>11</sup> SLC = secondary lymphoid-tissue chemokine – Chemokin, das aus sekundärlymphatischen Geweben stammt

<sup>12</sup> ELC= EBI1-ligand chemokine – Ebl1-Liganden-Chemokin, auch MIP-3 $\beta$  bezeichnet

<sup>13</sup> ICAM-3 = intracellular adhesion molecule 3 – intrazelluläres Adhäsionsmolekül 3

<sup>14</sup> DC-SIGN = dendritic cell-specific ICAM3 grabbing nonintegrin – ICAM-3-bindendes Nichtintegrin, das spezifisch auf Dendritischen Zellen exprimiert wird

<sup>15</sup> LFA-1 = lymphocyte function-associated antigen 1 – mit der Funktion von Lymphozyten verbunden. Antigen

## 1 - Einleitung

---

dass zentral mehrere peptidbeladene MHC-Komplexe mit ihren spezifischen T-Zellrezeptoren wechselwirken. Ringartig um diese zentralen Komplexstrukturen lokalisiert, interagieren kostimulatorische Moleküle wie z.B. B7.1, B7.2<sup>16</sup> mit ihren entsprechenden Rezeptoren auf der T-Zelle (CD28) (Azuma et al., 1992). Etwas weiter peripher schließlich bilden die wechselwirkenden Adhäsionsmoleküle eine Art äußerer Ring um die MHC-T-Zellrezeptorkomplexe bzw. die miteinander interagierenden Kostimulatorischen Moleküle (Grakoui et al., 1999). Sie sorgen so ebenfalls für eine Intensivierung der Assoziation von T-Zelle und Dendritischer Zelle. Die Unterstützung der Ausbildung einer Immunologischen Synapse durch kostimulatorische Moleküle und Adhäsionsmoleküle ist wichtig, da die Bindungsaffinitäten zwischen Peptid-MHC-II-Komplex und spezifischen T-Zellrezeptor nur mäßig stark sind, für die erfolgreiche Aktivierung naiver T-Zellen und deren sukzessive Differenzierung zu CD4+-T-Effektorzellen aber ein starkes Signal und eine lang anhaltende Wechselwirkung benötigt wird. Für die Aktivierung von T-Zellen sind also zwei Signale nötig: das erste Signal wird durch die Assoziation von Peptid-MHC-II-Komplex und spezifischem T-Zellrezeptor ausgelöst, das zweite Signal durch die Interaktion der kostimulatorischen Moleküle mit den entsprechenden Zielstrukturen auf der T-Zelle. Nur wenn beide Signale vermittelt werden und das kostimulatorische Signal ausreichend stark ist, erfolgt die Differenzierung und Proliferation von aktivierten CD4+-T-Zellen. T-Zellen können durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus über die Interaktion des CD40-Liganden (auf T-Zelle) mit dem CD40-Molekül (auf APC) ihrerseits die APC zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle bzw. verschiedener Cytokine wie z. B. IL-12 anregen (Cella et al.; 1996). Final resultiert auf diese Weise eine Verstärkung der Kostimulation, die die erfolgreiche Aktivierung bzw. Proliferation der T-Zellen nachhaltig unterstützt. Die aktivierten T-Zellen sezernieren als autokrinen Wachstumsfaktor IL-2 (Minami et al.; 1993), gleichzeitig erfolgt genregulatorisch durch zusätzliche Expression der  $\alpha$ -Kette (CD25) und Zusammenlagerung mit der konstitutiv exprimierten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette eine Modulation des IL-2-Rezeptors. Diese Veränderung garantiert die optimale Reaktion auf IL-2 und führt zu einer ausgeprägten Proliferation der T-Zelle.

Bei den T-Zellen, die direkt über ihren T-Zellrezeptor mit dem via MHC-Klasse II-Moleküle präsentierten Peptid wechselwirken, handelt es sich um CD4+-T-Helferzellen. Durch ein zusätzliches, cytokinvermitteltes Signal der APC (DC) können diese nach ihrer Aktivierung

---

<sup>16</sup> B7.1 = CD80, B7.2 = CD86, kostimulatorische Moleküle



## 1 - Einleitung

---

zu zwei unterschiedlichen Subtypen differenziert werden: T-Zellen, die entweder zelluläre oder humorale Effektorzellen aktivieren. Welche der beiden Subtypen bevorzugt entstehen, ist vom Pathogen abhängig.

Unter dem Einfluss von  $\text{INF-}\gamma^{17}$  (sezerniert von Makrophagen) entstehen sog. Typ-1-DC, die daraufhin verstärkt IL-12 freisetzen. Dieses Cytokin ist maßgeblich an der Polarisierung der T-Helferzellen in sogenannte Typ 1-T-Helferzellen beteiligt (Hsieh et al. 1993). Th-1-Zellen produzieren ein ähnliches Spektrum an Cytokinen wie CTL. Dies begünstigt die Ausprägung einer zellulär vermittelten Immunantwort über Makrophagen, NK-Zellen, CTL etc. Bisher noch nicht vollständig geklärt ist der grundsätzliche Mechanismus der Aktivierung cytotoxischer CD8+-T-Zellen (CTL): Es wird vermutet, dass die CD8+-T-Zellen von den aktivierten CD4+-Th-1-Zellen dazu T-Zellhilfe empfangen. Eine zentrale Rolle spielt hierbei wieder IL-2. Erst durch dieses zusätzliche Signal können CTL, die über ihren spezifischen T-Zell-Rezeptor das im MHC-I-Kontext präsentierte Peptid erkannt haben, proliferieren. Nach erfolgter Differenzierung verlassen die antigenspezifischen CTL dann über den Blutstrom das lymphatische Gewebe und wandern an den Ort der Infektion bzw. Entzündung (Griffiths, 1995). Wird das entsprechende Antigenpeptid von Körperzellen via MHC-I-Moleküle präsentiert, können die CTL mit der Zelle wechselwirken und über verschiedene Mechanismen z.B. Interaktion des FasL (auf CTL) und Fas (CD95) (Suda und Nagata, 1994) oder über die Sekretion von Granzymen (Henkart et al., 1987; Liu et al., 1990) und Perforinen der infizierten Körperzelle das Signal zur Apoptose vermitteln. Über die direkte CTL-Effektorfunktion zur Eliminierung infizierter Zellen hinaus, schaffen CTLs durch Sekretion verschiedener Cytokine wie  $\text{INF-}\gamma$ ,  $\text{TNF-}\alpha^{18}$  oder  $\text{GM-CSF}^{19}$  (Goedegebuure et al., 1997) ein Milieu, dass die Aufrechterhaltung einer zellulären Immunantwort begünstigt.

Eine weitere Subpopulation stellen Typ-2 DC dar. Sie entwickeln sich unter Einfluss von Substanzen wie Prostaglandin E2 (PGE2) (Kalinski et al. 1998) oder Histamin (van der Pouw Kraan et al. 1998). Diese proinflammatorischen Cytokine werden von Fibroblasten und Epithelzellen sezerniert, die Kontakt mit extrazellulären Erregern, wie z. B. Bakterien

---

<sup>17</sup>  $\text{INF-}\gamma$  = Interferon  $\gamma$  (gamma), ein Cytokin

<sup>18</sup>  $\text{TNF-}\alpha$  = Tumor necrose factor  $\alpha$  – Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$

<sup>19</sup>GM-CSF = granulocyte macrophage colony stimulating factor – Granulozyten-Makrophagen-Koloniebildender Faktor

## 1 - Einleitung

---

hatten. Typ-2 DC setzen nach ihrer Ausreifung IL-6 frei, das die aktivierten T-Helferzellen in Typ-2-T-Helferzellen (Th2) umwandelt (Diehl und Rincón, 2002). Im Gegensatz zu Th-1-Zellen unterstützen Th2-Zellen durch Sekretion bestimmter Cytokine die Ausprägung einer humoralen Immunantwort. Die freigesetzten Cytokine dienen dabei als Wachstumsfaktoren vornehmlich von B-Zellen (IL-4), aber auch Mastzellen (IL-4, IL-10) oder Eosinophilen (IL-5) und beeinflussen maßgeblich deren Differenzierung (Janeway und Travers, 2004).

Die zentralen Zellen der humoralen Immunantwort stellen B-Zellen dar, die, wie unter 1.1.1 beschrieben, natives Antigen über ihren spezifischen BCR erkennen, dieses aufnehmen und die nach endosomaler Degradierung resultierenden Peptide im MHC II-Kontext präsentieren. Die Peptid-MHC-II-Komplexe werden von spezifischen Th-2-Helferzellen über deren TCR gebunden (Parker, 1993). Dazu wandern die Th-2-Zellen in die B-Zell-Bereiche von z. B. Lymphknoten ein. Durch eine zusätzliche Wechselwirkung von CD40 Ligand auf der T-Zelle mit CD40 auf den B-Zellen erfahren die B-Zellen eine additive Aktivierung und ein ausreichend starkes Signal, um zur antikörpersekretierenden Plasmazelle final auszudifferenzieren. Plasmazellen sezernieren Antikörper, die die gleiche Spezifität wie der oberflächengebundene BCR aufweisen. Ist das entsprechende Antigen an der Oberfläche des Pathogens lokalisiert, kann es von dem spezifischen Antikörper gebunden werden. Dadurch wird das entsprechende Pathogen neutralisiert und gleichzeitig für die Phagozytose durch unspezifische Effektorzellen markiert. Der konstante Teil des Antikörpers weist körpereigene, bekannte Strukturen auf, an die die Phagozyten über Fc-Rezeptoren<sup>20</sup> binden (Liu und Arpin, 1997). Die Eliminierung der Pathogene durch Phagozytose wird auf diese Weise verbessert und beschleunigt.

---

<sup>20</sup> Fc-Rezeptoren = Fc-Rezeptoren, binden den Fc-Teil von Immunglobulin Isotypen, Fc = fragment crystallizable – kristallisierbares Fragment

### 1.2 Immunisierung, (DNA)-Vakzinierung:

Unter 1.1.3 wurden die Reaktionsabläufe in der Ausbildung einer spezifischen Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen beschrieben. Die gerichtete und bewusst durchgeführte Auslösung einer Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen wird Immunisierung genannt. Verfolgt die Immunisierung das Ziel, eine Schutzwirkung gegen dieses Antigen (z. B. lokalisiert auf Pathogenen) zu erzeugen, spricht man von Vakzinierung in Anlehnung an das Schlüsselexperiment, in dem 1796 Edward Jenner zeigte, dass durch eine zuvor durchgeführte Inkubation mit Kuhpocken (*Vaccinia*) eine Schutzwirkung gegen die Pockenerkrankung des Menschen erzeugt werden konnte. Die Entwicklung wirksamer und sicherer Impfstoffe (Vakzinen) ist immer noch eines der wichtigsten Ziele der Immunologie, besonders im Hinblick auf Krankheiten wie AIDS, Malaria oder Tuberkulose, zu deren Bekämpfung neben einer humoralen Immunantwort auch eine starke zellulär vermittelte Immunreaktion nötig ist. Wie bereits erwähnt, setzt die Erzeugung einer cytotoxischen Immunantwort die proteasomale Degradierung von Antigenen z. B. von Virusproteinen voraus, deren Abbauprodukte (kurze Peptide) dann im MHC-I-Kontext präsentiert werden (Boczkowski et al., 1996). Um diesen Weg zu beschreiten, muss das Protein intrazellulär vorliegen. Zur Immunisierung wären deshalb bevorzugt lebende oder abgeschwächte intrazelluläre Erreger geeignet, die zwar (noch) gewährleisten, dass z.B. virales Protein in der Zelle gebildet wird, deren Einsatz aber aufgrund des großen Sicherheitsrisikos unterbleiben muss. Eine zentrale Bedeutung in der Überwindung dieser Problematik kommt der rekombinanten DNA-Technologie zu. Erzeugung rekombinanter (viraler) Proteine, deren *in vitro* Mutagenese zum Wegfall oder zur Minderung ihrer Pathogenität führt und Expression in vornehmlich immunkompetenten Zellen mit dem Ziel, eine (bevorzugt cytotoxische) Immunantwort (Ulmer et al.; 1993) auszulösen, wurde im Konzept der DNA-Vakzinierung (Gurunathan et al., 2000) verwirklicht. DNA-Vakzinen können eine gleichstarke Wirkung hinsichtlich der Induktion einer cytotoxischen Immunantwort auslösen wie Impfstoffe, die aus abgeschwächten Erregern bestehen, deren Effekte gewissermaßen nachahmen. Hierbei werden Expressionsplasmide, die das (veränderte) Antigen kodieren, entweder injiziert (Wolff et al., 1990) oder, angehängt an Goldpartikel, mit der Genpistole ins Gewebe geschossen (Williams et al.; 1991). Besonders wichtig für eine starke Expression des Transgens ist die Verwendung eines starken Promotors. Zunächst wurden aus diesem Grund virale

## 1 - Einleitung

---

Promotoren (CMV-<sup>21</sup>, SV40<sup>22</sup>-Promotoren) verwendet, jedoch exprimieren bei z. B. intradermaler bzw. subcutaner Applikation aufgrund der ubiquitären Aktivität dieser Promotoren dann mehrheitlich Keratinozyten das Transgen (Hengge et al., 1990) mit der Konsequenz, dass durch die sich anschließenden Mechanismen final eine eher humoral geprägte Immunantwort resultiert. Das Schlüsselereignis bei der DNA-Vakzinierung und Induktion einer Immunantwort stellt die Transfektion von DC dar (Casares et al 1997, Akbari et al. 1999, You et al. 2001). Um die Expression auf diese Zellen zu focussieren und die resultierende Immunantwort in Richtung einer vornehmlich zellulär geprägten zu lenken, muss ein DC-spezifischer Promotor verwendet werden.

Als DC-spezifisch wurde im Mausmodell der CD11c-Promotor beschrieben (Metlay et al. 1990). Ein 5,5 kpb-langes Promotorfragment des murinen CD11c-Promotors ist in transgenen Mäusen fast ausschließlich in DC aktiv (Riedinger et al. 1997, Brocker et al. 1997). Stärke und Erhalt der Spezifität dieses Promotors bei transienten Transfektionen, die ihn für den Einsatz als DNA-Vakzine auszeichnen würden, ist nicht bekannt. CIITA<sup>23</sup>, ein notwendiger Transaktivator für die MHC-II-Expression wird ausschließlich in DC exprimiert, und dessen Promotor ist somit exklusiv in DC aktiv (Muhlethaler-Mottet et al., 1997). Gleichzeitig wurde aber beschrieben, dass während der Reifung der DC, dessen Aktivität wieder herunterreguliert wird. Dadurch limitiert sich natürlich auch seine Verwendung als DNA-Vakzine. Die Charakterisierung des Promotors des murinen Dectin-2-Gens (Bonkobara et al.; 2001) bescheinigte diesem ebenfalls Spezifität auf Dendritische Zellen. Bereits 1999 konnten Ozawa und Mitarbeiter schon zeigen, dass ein 3,2 kpb-langes Fragment dieses Promotors zu einer 18fachen Verstärkung in murinen XS106-Zellen führt, wohingegen in Makrophagen, Fibroblasten, B- und T-Zellen sowie Keratinozyten das Promotorfragment weitgehend inaktiv war. Morita und Mitarbeiter hatten 2001 im Mausmodell nach biologistischer Transfektion unter Verwendung des Promotors des murinen Dectin-2-Gens (Bonkobara et al.; 2001) eine LC<sup>24</sup>-restringierte EGFP<sup>25</sup>-Expression beschrieben und eine zelluläre Immunreaktion gegen diese Maus-

---

<sup>21</sup> CMV = Cytomegalie-Virus

<sup>22</sup> SV40 = Simianvirus 40

<sup>23</sup> CIITA = class II transactivator – Klasse II Transaktivator

<sup>24</sup> LC – Langerhans Cell = Langerhans-Zelle ( DCs der Haut)

<sup>25</sup> EGFP = Enhanced green fluorescent protein – verstärkt grün fluoreszierendes Protein

Vakzine beobachtet. Sollte sich die LC-Spezifität in humanen Zellen bestätigen, wäre dieser Promotor eventuell auch im Humansystem für einen solchen Einsatz geeignet, allerdings bleibt aufgrund seiner LC-Spezifität der Einsatz auf eine kutane Applikation beschränkt.

### 1.3 Funktion von Fascin – Beschreibung seines Promotors

Fascin ist ein Aktinbündelungsprotein, ein Strukturprotein, das Kreuzvernetzungen im Aktin-Zytoskelett erzeugt und u. a. an der Ausbildung dendritischer Strukturen in Nervenzellen beteiligt ist. Neben der Expression in Nervenzellen wurde es auch in Dendritischen Zellen nachgewiesen (Mosialos et al., 1996). Soweit derzeit bekannt, ist die Expression von Fascin in Zellen des hämatopoetischen Systems exklusiv auf Dendritische Zellen beschränkt. Ross und Mitarbeiter konnten 1998 zeigen, dass Fascin in aktivierten murinen Langerhans'schen Zellen de novo exprimiert wird und auch in weiteren reifen DC-Populationen eine konstant hohe Expressionsrate nachgewiesen werden kann. Fascin akkumuliert in dendritischen Fortsätzen und ist für deren Ausbildung von essentieller Bedeutung. Die Dendriten sind am Kontakt zwischen Dendritischer Zelle und T-Zelle beteiligt, d. h. Fascin besitzt für DC auch funktionelle Relevanz. Für Dendritische Zellen, die in vitro z.B. aus dem Knochenmark der Maus oder aus CD14+-Blutmonozyten des Menschen generiert wurden, konnte ebenfalls eine reifeinduzierte Fascinexpression gezeigt werden (Sonderbye et al., 1997, Ross et al., 2000). Die beschriebene Funktion von Fascin und dessen Bedeutung für Dendritische Zellen unterstrichen die Wichtigkeit, die Regulation des Fascingens aufzuklären. Bros und Mitarbeiter charakterisierten 2003 den humanen Fascin-Promotor und konnten für einen 3kbp großen 5'-genflankierenden Bereich eine robuste Reporteraktivität zeigen. In etwa zeitgleich hatten Ross und Mitarbeiter (2003) den Promotorbereich des murinen Fascingens auf eine Größe von 2,6 kbp 5'-flankierend eingrenzen können. Der humane Fascin-Promotor (Bros et al., 2003) ist aus einem ca. 55 bp großen Basalpromotor und einem distal lokalisierten reifeabhängigen Enhancer-Element aufgebaut und deshalb speziell in ausgereiften Dendritischen Zellen aktiv. Zum Vergleich konnte in Fascin-negativen Monozyten keine Aktivität festgestellt werden. Die Promotoraktivität des humanen Fascinpromotors ist mit der Stärke des humanen EF1alpha1-Promotors zu vergleichen (Bros et al., 2003), der bereits in gentherapeutischen Anwendungen eingesetzt wurde. Unter Kontrolle des Fascin-Promotors lässt sich eine spezifische und gleichzeitig auch starke Expression von Genen in DC vermitteln: sogar auf Einzelzellebene konnte die Expression des Reportergens

## 1 - Einleitung

---

EGFP nachgewiesen werden. Aufgrund der geschilderten Fakten empfiehlt sich der humane Fascin-Promotor für den Einsatz als DNA-Vakzine und stellt im Humansystem den bislang stärksten verfügbaren Promotor dar.

### 1.4 Einsatz zur Induktion von Toleranz

Für einen starken Promotor, der darüber hinaus auch spezifisch in Dendritischen Zellen aktiv ist, finden sich zahlreiche Einsatzmöglichkeiten als DNA-Vakzine. Neben der angesprochenen Initiierung einer Immunantwort z. B. gegen Tumore oder Infektionskrankheiten ist auch der Einsatz in der Therapie von Allergien und Autoimmunerkrankungen denkbar. Auf den genannten Gebieten wurden bereits unspezifische DNA-Vakzinen erfolgreich im Tiermodell eingesetzt (Condon et al. 1996, Irvine et al. 1996, Ulmer et al. 1996, Hsu et al. 1996, Waisman et al. 1996). Bei den beiden zuletzt genannten Anwendungen muss dabei eine bereits bestehende übermäßige Immunantwort gegen ein spezifisches Antigen unterdrückt bzw. ausgeschaltet werden. Denkbar ist auch der Einsatz eines DC-spezifischen Promotors zur Verhinderung der Ausprägung einer neuen Immunantwort. Ein großes Einsatzgebiet fände sich z. B. bei der Verhinderung einer Transplantatabstoßung.

#### 1.4.1 Transplantation

Als eine große Errungenschaft der modernen Medizin gilt die Gewebetransplantation, die zunächst nur zwischen eineiigen Zwillingen oder eng verwandten Individuen möglich war. Die enge verwandtschaftliche Beziehung bedingt, dass die polymorphen MHC-Moleküle bzw. weitere für die Transplantation relevante Gene nur minimal unterschiedlich sind. Besteht keine Verwandtschaft zwischen Empfänger und Donor, wie es in der überwiegenden Anzahl der erforderlichen Transplantationen der Fall ist, werden mit an Sicherheit grenzender Wahrscheinlichkeit Transplantationsantigene vom Immunsystem des Empfängers als fremd erkannt und die Auslösung einer adaptiven Immunantwort gegen diese Antigene initiiert. Die unausweichliche, finale Folge ist dann die Abstoßung des Transplantats. Ein großer Meilenstein zur Überwindung dieses Problems wurde durch die Entwicklung von immunsuppressiven Medikamenten wie z. B. Cyclosporin A, Tacrolimus etc. erreicht, mit denen es erstmals möglich war, die Abstoßung allogener Transplantate zu verhindern. Der Nachteil an diesen Medikamenten ist, dass sie ständig eingenommen werden müssen und dabei häufig zahlreiche zum Teil schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten, die eventuell sogar das Absetzen des Immunsuppressivums

## 1 - Einleitung

---

erfordern. Dies ist einer der Hauptgründe, warum es auch noch nach Jahren einer zunächst erfolgreichen Transplantation zur Abstoßung des Transplantats kommen kann. Ein weiterer gravierender Nachteil, der mit der Einnahme von Immunsuppressiva verbunden ist, besteht in der reduzierten Immunabwehr von bakteriellen oder viralen Infektionen und dem verstärkten Auftreten von Tumoren, die sonst durch das Immunsystem hätten erfolgreich bekämpft werden können.

Die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden mit weniger gravierenden Nebenwirkungen ist somit ein dringendes Anliegen. Einen großen Fortschritt auf diesem Gebiet, könnte die Entwicklung neuer Strategien unter Nutzung von Mechanismen, die Toleranz gegen körpereigene Proteine vermitteln, sein. Wie unter 1.1.1 erwähnt, sind Dendritische Zellen sowohl in der Vermittlung zentraler als auch peripherer Toleranz gegen körpereigene Peptide, die T-Zellen im MHC-Kontext präsentiert werden, beteiligt. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass die Auslösung peripherer Toleranz ausschließlich durch unreife Dendritische Zellen vermittelt wird<sup>26</sup>, wohingegen die Aktivierung auf voll ausgereifte DC beschränkt ist. Die Erkenntnisse der jüngsten Zeit aber zeigen, dass diese strikte Trennung so nicht aufrecht zu erhalten ist. So sind z.B. reife (Moseman et al.; 2004) als auch nur partiell ausgereifte DCs (Lutz und Schuler, 2002) ebenfalls in der Lage CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen zu generieren, die mit der Vermittlung von Toleranz in Verbindung gebracht werden. Allein die fehlende oder verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle ist demnach noch kein Garant für die Vermittlung von Toleranz, jedoch stellt der Eingriff in die Ausreifung von DCs (Hackstein et al.; 2004, Tan et al.; 2005) eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Qualität einer resultierenden Immunantwort nach T-Zellkontakt in diese Richtung zu modulieren.

---

<sup>26</sup> die keine oder nur eine geringe Expression kostimulatorischer Moleküle aufweisen

### 1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die Transfektion von Dendritischen Zellen stellt das Schlüsselereignis der DNA-Vakzinierung dar. Die Entwicklung einer leistungsfähigen DNA-Vakzine, die eine starke Expression des kodierten Transgens ermöglicht und gleichzeitig spezifisch auf Dendritische Zellen beschränkt bleibt, ist für die weitere Einflussnahme auf bzw. Induktion von Immunantworten von zentraler Bedeutung. Wie unter 1.3 bereits erwähnt, stellt der Fascin-Promotor dazu eine hervorragende Basis dar. In der vorliegenden Arbeit sollten Strategien untersucht werden, den Fascin-Promotor weiter zu verstärken, gleichzeitig aber mussten diese so angelegt sein, dass die Spezifität des Promotors auf Dendritische Zellen nicht verloren geht.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten, zunächst in einer murinen DC-Zell-linie, unter Verwendung von pharmakologischen Inhibitoren erfolgsversprechende Angriffspunkte in der Signaltransduktionskaskade von DCs gefunden werden, deren Blockade eine Modulation von zentralen Oberflächenmolekülen bewirkt. Von besonderem Interesse hierbei ist die Wirkung auf die Expression von Adhäsions- bzw. Kostimulatorischen Molekülen, die, wie unter 1.1.3 beschrieben, maßgeblich die Wechselwirkungen mit der T-Zelle bedingen. Eine Veränderung im Expressionsmuster dieser Moleküle kann gleichzeitig auch die Qualität des Kontakts mit der T-Zelle modifizieren, so dass auf diese Weise eventuell ein toleranzinduzierender Phänotyp Dendritischer Zellen geschaffen werden kann.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Material für Molekularbiologische Arbeiten

##### 2.1.1.1 Geräte

Agarosegelkammern	PerfectBlue <sup>®</sup> Minigelsystem S bzw. M, Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Analysenwaage	PI-114, Denver Instruments, Colorado, USA
Autoklav	V-150, Systec GmbH, Wettenberg
Bakterienschüttler (Tisch-Rundschüttler)	Certomat SII / H, Braun Biotech, Melsungen
Bunsenbrenner	Gasprofi 1 SCS, Wartewig Labor-Dentaltechnik, Göttingen
Eismaschine	Scotsman <sup>®</sup> MF22 / B190 Frimont, Milano, Italy
Gefrierschränke	-20 °C: Privileg Nr. 7821, Quelle AG, Fürth -80 °C: MDF-U71V, Sanyo Ltd., Japan
Heizblock	Rotilabo Block-Heater H250, Roth GmbH, Karlsruhe
Heißluftsterilisatoren	ULE 800, Memmert GmbH & Co KG, Schwabach
Kühlschränke	Santo, Modell 3675-6KA, AEG mbH, Nürnberg
Kühlzelle(Kühlaggregat)	GM2, Zanotti, Pegognaga, Italy
Luminometer	Microlumat Plus LB96V, Berthold Technol., Bad Wildbad
Mikrowellengerät	Durabrand MW-17, Wal Mart, Wuppertal
Magnetrührer	MR 3001K, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Netzgeräte	Electrophoresis Power Supply EPS 301 bzw. EPS 1001, Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
pH-Meter	Inolab pH-level 1, WTW, Weinheim
Pipetten	Pipetman <sup>®</sup> P, Gilson International, Bad Camberg, (P2: 0,2-2µl, P20: 2-20µl, P200: 10-200µl, P1000: 100-1000µl) – Reference, Eppendorf AG, Hamburg, (0-2µl, 1-20µl, 10-100µl, 100-1000µl)
Probenmischer (Vortex-Maschine)	MS1, IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co KG, 79219 Staufen Vortex Genie2 6560, Scientific Industries, Bohemia, USA
Reinstwasseranlage	Nanopure, Diamond Bioresearch, Barnstead, Dubuque, Iowa, USA
Schüttelmixer	Thermomixer compact Eppendorf AG, Hamburg Duomax 1030, Polymax 1040, Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Spektrophotometer	Genesys 6, ThermoSpectronic, Rochester, USA
Spektrophotometer Mikrotiterplattenformat	SPECTRAMax <sup>®</sup> 340 PC <sup>384</sup> , Molecular Devices Corp. Sunnyvale, USA
Thermo-Zykler	Mastercycler gradient / personal, Eppendorf AG, Hamburg

## 2 - Material und Methoden

---

Transilluminator	GeneGenius Bio Imaging System, Syngene, Cambridge, UK & Digital Graphic Printer UP-D895, Sony Corp., Tokyo, Software: GeneSnap <sup>®</sup> , Synoptics Ltd, Cambridge, UK
Trockenschrank	BD115, Binder GmbH, 78532 Tuttlingen
Ultraschallbad	Sonorex RK510 H, Bandelin electronic, Berlin
Waagen	Laborwaage: PI602, Denver Instruments, Arvada, USA Grobwaage : Ohaus-Scout Pro, PineBrook, USA
Wasserdeionisierungs- anlage	RO 10 (Umkehrosrose), Werner GmbH, Leverkusen
Zentrifugen:	
- Tischzentrifuge	Z233 M-2, Hermle Labortechnik GmbH, Weihingen
- Kühlzentrifuge	Z233 MK-2, Hermle Labortechnik GmbH, Weihingen Avanti J-E Centrifuge, Beckman-Coulter, Palo Alto, USA

### 2.1.1.2 Chemikalien

(EDTA):Ethylendiamintetracetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Agar-Agar	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose NEEO Ultra	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose Ultrapure	Gibco BRL, Paisley, Scotland
Ameisensäure	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Bacto-Trypton	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Borsäure	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Bromphenolblau	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA, bovines Serumalbumin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Calciumchlorid Dihydrat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroquin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DAPI – 4',6'-Diamidino-2- Phenylindoldihydrochlorid	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
DEAE-Dextran	Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Schweden
Diethylpyrocarbonat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Dulbecco's PBS	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Einbettmedium	Glycergel, Dako Corp. Carpinteria, USA
Essigsäure	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol vergällt mit MEK	Schmidt Chemikalien GmbH & Co KG, Dillenburg
Ethanol, absolut, unvergällt	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Formamid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glycerol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Harnstoff	C. Roth GmbH, Karlsruhe

## 2 - Material und Methoden

---

Hefeextrakt	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Heparin-Natrium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
HEPES - 4(2-Hydroxyethyl)-1-	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Piperazinmethansulfonsäure Histopaque®1077 HybriMax®	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isoamylalkohol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Isopropanol (2-Propanol)	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycinsulfat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Lithiumchlorid	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Lysozym	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Magnesiumchlorid	C. Roth GmbH, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	C. Roth GmbH, Karlsruhe
MTT - Methyl-Thiazolyl- diphenyl-Tetrazoliumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumacetat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumcarbonat	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumhydroxid	C. Roth GmbH, Karlsruhe
NP-40 Ersatz (Igepal)	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Paraformaldehyd	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol (gepuffert)	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Propidiumbromid	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Saccharose	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Salzsäure	C. Roth GmbH, Karlsruhe
TRIS Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan	C. Roth GmbH, Karlsruhe
Triton® X-100	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasser	VE Wasseranlage Institut
Xylene Cyanol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 2.1.1.3 Reaktionskits

BigDye Terminator V3.1. Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dual-Luziferase Reporter Assay System	Promega GmbH, Mannheim
Human Dendritic Cell Nucleofection Kit	Amaxa GmbH, Köln
Plasmidpräparations-Kit Nucleobond PC100 (Midi)	Macherey Nagel GmbH & Co KG, Düren
Plasmidpräparations-Kit NucleoSpin (Mini)	Macherey Nagel GmbH & Co KG, Düren
Wizard SV Gel and PCR Cleanup System	Promega GmbH, Mannheim

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.1.4 DNA-Vektoren

Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Vektoren, die bei der Arbeit verwendet wurden. Im Anhang findet sich darüber hinaus die Darstellung der entsprechenden Vektorkarten (vgl. 10.4).

Tabelle 1 - Übersicht verwendeter Vektoren

Vektor:	Eigenschaft:
pZErO-2.13297 BP, Kan <sup>R27</sup> Invitrogen GmbH, Karlsruhe	Klonierungsvektor (Bernard et al. 1994), Genbank-Zugangsnummer: AY569777
pGI3-Basic 4818 BP, Amp <sup>R28</sup> , Promega GmbH, Mannheim	Promotorloser Photinus-Luciferase- Expressionsvektor (Groskreutz und Schenborn 1997) Genbank-Zugangsnummer: U47295
pGI3-Control 5256 BP, Amp <sup>R</sup> , Promega GmbH, Mannheim	Photinus-Luciferase-Expressionsvektor, durch den SV40-Promotor vermittelt (Genbank Zugangsnummer U47296)
pRLCMV 4097 BP, Amp <sup>R</sup> , Promega GmbH, Mannheim	Renilla-Luciferase-Expressionsvektor durch den CMV-Promotor vermittelt (Lorenz et al. 1991) Genbank Zugangsnummer: AF025843
pEGFP-C1 4733 BP, Kan <sup>R</sup> , Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, USA	EGFP-Expressionsvektor, CMV-Promotor vermittelt, (Cormack, B.P., Valdivia, R. and Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), Gene (1996), Genbank-Zugangsnummer: U55763

---

<sup>27</sup> Kan<sup>R</sup> = Kanamycin-Resistenz, Antibiotikumsresistenz, eingesetzt zur Selektion von Klonen

<sup>28</sup> Amp<sup>R</sup> = Ampicillin-Resistenz, vermittelt durch die Expression einer  $\beta$ -Lactamase, Antibiotikumsresistenz

## 2 - Material und Methoden

---

Vektor:	Eigenschaft:
pMaxGFP 3486 BP, Kan <sup>R</sup> , Everogen Joint Stock Comp. Moskau, Russland, Amaxa GmbH, Köln	GFP-Expressionsvektor, CMV-Promotor vermittelt, Amaxa news #3, Seite 8, 2004
pDsRed2-N1 4689 BP, Kan <sup>R</sup> , CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, USA	DsRed2 <sup>29</sup> -Expressionsvektor, CMV-Promotor vermittelt
pNFkB-Luc 5695 BP, Amp <sup>R</sup> , Stratagene, La Jolla, USA	Reportervektor mit 5xNFkB-Element (Zheng, C.-F., 1999) Genbank Zugangsnummer: AF053315

---

<sup>29</sup> DsRed2 = Reportergen, das ein rotfluoreszierendes Protein kodiert, verwandt mit EGFP

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.1.5 Enzyme und Reaktionspuffer

#### 2.1.1.5.1 Restriktionsenzyme

Sämtliche DNA-Restriktionen wurden mit den 10fach konzentrierten Reaktionspuffern der Firma Promega GmbH, 68199 Mannheim ausgeführt (Enzyme, für die in diesem Puffersystem keine Informationen verfügbar waren, wurden mit den Puffern verwendet, die zusammen mit dem jeweiligen Enzym geliefert worden waren). Die eingesetzten DNA-Restriktionsenzyme sind in der nachfolgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 2 - verwendete Restriktionsenzyme

Restriktions- enzym:	Erkennungs- sequenz:	Hersteller:
Age I	A↓CCGGT	Promega GmbH, Mannheim
Bal I	TGG↓CCA	Promega GmbH, Mannheim
BamH I	G↓GATCC	Promega GmbH, Mannheim
Bcu I (Spe I)	A↓CTAGT	Fermentas Lifesciences, Leon-Rot
Bgl II	A↓GATCT	Promega GmbH, Mannheim
Cla I	AT↓CGAT	Promega GmbH, Mannheim
EcoR I	G↓AATTC	Promega GmbH, Mannheim
EcoR V	GAT↓ATC	Promega GmbH, Mannheim
Hind III	A↓AGCTT	Promega GmbH, Mannheim
Hpa I	GTT↓AAC	New England Biolabs, Ipswich, USA
Kpn I	GGTAC↓C	New England Biolabs, Ipswich, USA
Mlu I	A↓CGCGT	New England Biolabs, Ipswich, USA
Mst I	TGC↓GCA	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
Nae I	G↓CCGGC	Promega GmbH, Mannheim
Nco I	C↓CATGG	New England Biolabs, Ipswich, USA
Nhe I	G↓CTAGC	New England Biolabs, Ipswich, USA
Not I	GC↓GGCCGC	New England Biolabs, Ipswich, USA
Nsi I	ATGCA↓T	New England Biolabs, Ipswich, USA
Pst I	CTGCA↓G	New England Biolabs, Ipswich, USA
Pvu II	CAG↓CTG	New England Biolabs, Ipswich, USA
Sac I	GAGCT↓C	New England Biolabs, Ipswich, USA
Sac II	CCGC↓GG	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
Sal I	G↓TCGAC	New England Biolabs, Ipswich, USA
Stu I	AGG↓CCT	Promega GmbH, Mannheim
Vsp I	AT↓TAAT	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
Xba I	T↓CTAGA	New England Biolabs, Ipswich, USA
Xho I	C↓TCGAG	New England Biolabs, Ipswich, USA

Das Symbol ↓ innerhalb der Restriktionsenzym-Erkennungssequenz kennzeichnet die Stelle, an welcher die DNA geschnitten wird.

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.1.5.2 weitere Enzyme und Mononukleotide

alkal. Phosphatase (aus Schrimps)	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
RNase A	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
Taq DNA Polymerase, rekomb.	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
Pfu DNA Polymerase, recomb.	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
T4-Ligase	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
T4 Polynucleotid Kinase	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Klenow Fragment (DNA Polymerase I large Fragment)	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) Mononucleotide für die PCR	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

### 2.1.1.6 DNA-Marker

pUC19 Msp I digest	Fermentas Lifesciences, St. Leon-Rot
Φ X174 DNA Hae III digest.	New England Biolabs, Ipswich, USA
Lambda DNA Hind III digest.	New England Biolabs, Ipswich, USA

### 2.1.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit benötigten Oligonukleotide wurden durch die Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert und in lyophilisierter Form geliefert. Die Rekonstitution erfolgte mit ddH<sub>2</sub>O<sup>30</sup> zu einer 100 pM Stammlösung. Dabei wurde zunächst 50 µl ddH<sub>2</sub>O auf das Lyophilisat gegeben und für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, damit sich die Oligonukleotide durch Aufquellen lösen konnten. Anschließend wurde in Portionen die erforderliche Wassermenge ergänzt und vorsichtig mit der Kolbenhubpipette gemischt (angeschnittene 1000 µl Pipettenspitze), um potentielle Scherkräfte, die die Oligonukleotide zerstören könnten, möglichst zu verhindern. Als Arbeitslösung wurde ein Aliquot der Stammlösung auf 10 pM verdünnt. Dieses Vorgehen bot gleichzeitig Schutz vor einer möglichen Kontamination der Stammlösung. Die folgende Tabelle enthält eine Übersicht aller verwendeten Primer. Im Anhang finden sich außerdem eine detaillierte

---

<sup>30</sup> ddH<sub>2</sub>O = Reinstwasser, das entweder doppelt destilliert bzw. zweifach demineralisiert ist

## 2 - Material und Methoden

Darstellung der Bindungssequenzen der „D“-Primer im Bereich der Homologieregion AB (10.2) sowie die Temperaturprotokolle, mit denen die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ausgeführt wurde (vgl. 10.3.1).

Tabelle 3 - verwendete Oligonucleotide

Bezeichnung:	Oligonukleotidsequenz:	Verwendungszweck:
Seq-pGl3-a-Luc fwd	5'-TTCAGGTTTCAGGGGGAGGT-3'	fwd Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die BamH I Schnittstelle von pGl3-Basic
Seq-pGl3-a-Luc rev.	5'-TAAGTGCGGCGACGATAGTC-3'	fwd Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die BamH I Schnittstelle von pGl3-Basic
5NFKB-Fas	5'-GAGAGTCTTAGGATCCACTGGG ATTGCCTGGGATTGCCTGGGATTG CCTGGGATTGCCTGGGATTGCCGT AGATCTGCTTCGTTG-3'	Matrize zur Generierung eines 5fachen NFKB <sup>31</sup> -Fragments aus dem Fascin-Promotor
5NFKB-Fas-fwd	5'-GACAGTCTTAGGATCCAC-3'	fwd Primer z. Generierung eines 5fachen NFKB-Fragments aus dem Fascin-Promotor
5NFKB-Fas-rev	5'-CAACGAAGCAGATCTAC -3'	rev Primer z. Generierung eines 5fachen NFKB-Fragments aus dem Fascin-Promotor
pZErO-5xNFKB fwd	BamH I 5'-CTAGGATCCGCGTTGGCCGATT	fwd. Primer zur Amplifikation des 5fach Fascin-

<sup>31</sup> NFKB = nuclear factor KB = Transkriptionsfaktor



## 2 - Material und Methoden

	CATTA-3'	NFKB-Fragments, kloniert in pZErO2.1
pZErO-5xNFKB rev	Bgl II 5'TGGAGATCTIGATGGATGCGGAA AGTCC-3'	rev. Primer zur Amplifikation des 5fach Fascin-NFKB-Fragments, kloniert in pZErO2.1
M13pZErO-fwd	5'-CAGGAAACAGCTATGACCA -3'	fwd. Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die MCS von pZErO2.1
M13pZErO-rev.	5'-TGTA AACGACGGCCAGT-3'	rev. Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die MCS von pZErO2.1
phF-D1	5'-ATCTTCCCCCGCGCACT-3'	fwd. Primer zur Amplifikation des Fragments D1D4
phF-D2	5'-CTGAGACCTTGTGGGCAGC -3'	fwd. Primer zur Amplifikation des Fragments D2D4 und D2D5
phF-D3	5'-AAGCCTCAGCCTTCGGTG-3'	fwd. Primer zur Amplifikation des Fragments D3D5
phF-D4	5'-GGACATGGTGCTGGCTAC-3'	rev. Primer zur Amplifikation des Fragments D1D4 und D2D4
phF-D5	5'-CCCACCTGGTGGTGAGTGG-3'	rev. Primer zur Amplifikation des Fragments D2D5 und D3D5
phF-D6	5'-GGACATTCCCTGCAGACACC-3'	rev. Primer zur Amplifikation der Fragmente D1D6 und D2D6
phF-D7	5'-CACCGAAGGCTGAGGCTT-3'	rev. Primer zur Amplifikation der Fragmente D1D7

## 2 - Material und Methoden

---

		und D2D7
phF-Pvu-fwd	5'-AGGACACATTTCTGGCAGC-3'	fwd. Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die Pvu II-Schnittstelle des Fascin-Promotors
phF-Pvu-rev	5'-GTGAGTGAGCCCTGGTCCAC-3'	rev. Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die Pvu II-Schnittstelle des Fascin-Promotors
phFas2.7Bal-I-fwd	5'-AGTGCAGGTGCCAGAACATT-3'	fwd. Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die Bal I-Schnittstelle des Fascin-Promotors
phFas2.7Bal-I-rev	5'-TGCTTCAAATGGGTTTACCG-3'	rev. Primer zur Amplifikation klonierter Fragmente in die Bal I-Schnittstelle des Fascin-Promotors

### 2.1.1.8 Puffer und Lösungen

#### EDTA 0,5 M-Lsg:

EDTA                      0,5 M

1 N NaOH-Lsg.        q. s.

dd H<sub>2</sub>O

die 1 N Natronlauge diene zur Einstellung des pH-Werts auf 8,0

#### DNA-Auftragspuffer (Gelladepuffer):

Glycerol 85 %        35,00 % (v/v)

0,5 M EDTA-Lsg     10,00 % (v/v)

SDS                     0,50 % (m/m)

Bromphenolblau    0,01 % (m/m)

Xylene Cyanol      0,01 % (m/m)

dd H<sub>2</sub>O

## 2 - Material und Methoden

---

### 3 M Na-Acetat-Lsg. pH 5,2:

NaAcetat            3 M  
Essigsäure konz.    q. s.<sup>32</sup>  
dd H<sub>2</sub>O

die konz. Essigsäure diente zur Einstellung des pH-Werts auf 5,2

### Tris-Borat-EDTA-Puffer 10fach konz. - 10 x TBE:

Tris                    890 mM  
Borsäure            890 mM  
EDTA                 25 mM  
dd H<sub>2</sub>O

Die Substanzen wurden in Wasser gelöst und die Lösung dann autoklaviert. Eingesetzt wurde die Lösung als 1fach konzentrierter Laufpuffer (1 zu 10 mit Aqua bidest. verdünnt), dabei wurde der pH Wert mit 1 N Salzsäure auf 8,3 eingestellt.

### TE-Puffer:

Tris                    10 mmol  
EDTA                 1 mmol  
1 N HCl              q. s.  
dd H<sub>2</sub>O

Die 1 N Salzsäure diente zur Einstellung des pH-Werts auf 7,5

### **2.1.1.8.1 Lösungen für die Isolierung von Plasmid-DNA**

#### Puffer 1 – Bakterien-Resuspensionspuffer:

EDTA                 10 mM  
TRIS                 50 mM  
1 N HCl              q.s.  
RNase A             100 µg / ml  
dd H<sub>2</sub>O

mit der 1 N Salzsäure wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt, die Lösung bei 4 °C gelagert

---

<sup>32</sup> q. s. = quantum satis = so viel, wie nötig

## 2 - Material und Methoden

---

### Puffer 2 – Lysepuffer:

NaOH                    200 mM  
SDS                     1 % (m/m)  
dd H<sub>2</sub>O

### Puffer 3 – Neutralisierungspuffer:

Kaliumacetat         2,8 M  
dd H<sub>2</sub>O  
pH-Wert mit Essigsäure auf 5,1 eingestellt

### Säulenäquilibrierungspuffer:

Tris                     100 mM  
Isopropanol         15 % (v/v)  
Kaliumchlorid       900 mM  
Triton X-100         0,15 % (v/v)  
dd H<sub>2</sub>O  
pH-Wert auf 6,3 mit konz. Phosphorsäure eingestellt

### Säulenwaschpuffer:

Tris                     100 mM  
Isopropanol         15 % (v/v)  
Kaliumchlorid       1,15 M  
dd H<sub>2</sub>O  
pH-Wert auf 6,3 mit konz. Phosphorsäure eingestellt

### Elutionspuffer:

Tris                     100 mM  
Isopropanol         15 % (v/v)  
Kaliumchlorid       1,5 M  
dd H<sub>2</sub>O  
pH-Wert auf 8,5 mit konz. Phosphorsäure eingestellt

## 2 - Material und Methoden

---

### STET-Puffer:

Saccharose	8 % (m/m)
Triton-x-100	5 % (v/v)
Tris	50 mM
EDTA	50 mM
1 N NaOH	q. s.

dd H<sub>2</sub>O

mit der 1 N Natronlauge wurde der pH-Wert auf 8,0 eingestellt

### Lysozym-Lsg. 1 %:

Lysozym, lyo. 1 % (m/m)

dd H<sub>2</sub>O

die Lösung wurde jeweils frisch vor Gebrauch hergestellt

### **2.1.1.8.2 Bakterienmedium**

#### LB-Medium:

NaCl	1,0 % (m/m)
Bacto-Trypton	1,0 % (m/m)
Hefeextrakt	0,5 % (m/m)
1 N NaOH	q. s.

dd H<sub>2</sub>O

Die Natronlauge diente zum Einstellen des pH-Werts auf 7,5. Das LB-Medium wurde vor Gebrauch bei 121 °C, 20 min, 1 bar Überdruck (gespannt, gesättigter Wasserdampf) autoklaviert und bis zum Verbrauch bei Raumtemperatur gelagert. Für Vor- bzw. Übernachtskulturen wurde, je nach verwendetem Vektor, dem Medium Ampicillin (100 µg/ml) bzw. Kanamycin (30 µg/ml) zugegeben. Dazu wurden 100fach konzentrierte Antibiotika-Stammlösungen verwendet.

#### LB-Agar-Platten:

Agar Agar 1,5 % (m/v)

LB-Medium

## 2 - Material und Methoden

---

Zum Ausplattieren von Bakteriensuspensionen<sup>33</sup> wurden LB-Agar-Platten hergestellt. Dazu wurde dem LB-Medium vor den Autoklavieren die entsprechende Menge Agar Agar zugegeben und das Medium wie oben beschrieben autoklaviert. Die resultierende sterile Lösung wurde auf ca. 50 °C abgekühlt und unter der Sterilbank die entsprechende Menge des jeweiligen Selektionsantibiotikums zugesetzt und gemischt. Danach wurde das so vorbereitete Medium auf Petrischalen mit 10 cm Durchmesser verteilt (ca. 10 – 15 ml/Platte) und die Lösung bei Raumtemperatur aushärten gelassen. Nach dem Aushärten wurden die LB-Platten noch mehrere Stunden bei Raumtemperatur über Kopf gelagert, um entstandenes Kondenswasser verdunsten zu lassen. Die Agar-Platten wurden, weiterhin über Kopf, bei 4 °C, dunkel aufbewahrt und längstens 2 Monate nach Herstellung verwendet.

### Bakterien-Einfriermedium:

LB-Medium            50 % (v/v)

Glycerol 85 %       50 % (v/v)

Vor Zugabe des Glycerols wurde das LB-Medium autoklaviert. Die Bakterien wurden mit 1,5 ml Einfriermedium in 2 ml Einfrierröhrchen aus Polypropylen bei -70 °C gelagert.

### CaCl<sub>2</sub>-Lsg. 0,1 M - (zur Herstellung chemokompetenter Zellen):

Calciumchlorid      100 mM

dd H<sub>2</sub>O

vor Verwendung autoklaviert

---

<sup>33</sup> z.B. nach der Transformation von Plasmid in Bakterien

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.1.9 Bakterienstämme

Tabelle 4 - verwendete Bakterienstämme

E.coli-Stamm :	Genotyp :
<b>TOP10</b>	F <sup>-</sup> mcrA, D(mmr-hsdRMS-mcrBC), $\Phi$ 80lacZDM15, DlacX74, deoR, recA1, araD139, D(ara-leu)7697, galU, galK, rspL(Str <sup>R</sup> ), endA1, nupGI <sup>-</sup> - (vgl. Grant S. G.N. et al. 1990: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 4645-49)
<b>XL1Blue</b>	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lac1 <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet <sup>R</sup> )] – Stratagene, La Jolla, 92037 CA, USA

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.2 Material für die Kultivierung / Transfektion von Säugerzellen

#### 2.1.2.1 Geräte

Brutschränke, CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	MCO-17AIC, Sanyo Electric Biomedical & Co Ltd, Moriguchi City, Osaka, Japan
Durchflusszytometer	FACS Calibur <sup>®</sup> , Becton Dickinson, San Jose, USA, Software: Cellquest <sup>®</sup> Pro
Einfrierdose	Nunc GmbH & Co KG, 65203 Wiesbaden
Elektroporator	GenePulser <sup>®</sup> X-Cell, Biorad Laboratories, Hercules, USA
Fluoreszenzmikroskop	DMIRB, Leica microsystems, Bensheim, Kamera DFC350FX (S/W), DFC280 (Farbe), Software: Leica IM50, Leica FW4000
Kühlzentrifuge	Z400K, Hermle Labortechnik GmbH, Weihingen
Lichtmikroskope - Zählmikroskop	CKX41, Olympus Europa GmbH, Hamburg Axiostar plus, Zeiss AG, Oberkochen
Nukleofektionsgerät	Nucleofector I, Amaxa GmbH, Köln
Pipettierhilfe, elektrisch	Pipetus akku, Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Sterilwerkbänke	Holten LaminAir Modell 1,8, Holten-Jouan Nordic A/S 3400, Allerød, Denmark
Stickstofftank	Locator <sup>®</sup> PlusThermolyne Type CY50900, Barnstead International, Dubuque, Iowa 52001, USA
Wasserbad	Typ 1004 GFL, Burgwedel
Zell-Zählkammer	Neubauer improved, Ref. 0640010, 0,1 mm – 0,0025 mm <sup>2</sup> , P. Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zählhilfe	Upgreen counters, Upgreen Corp., Taiping, Taiwan
„Zytospin“ Zentrifuge	Shandon Cytospin 4, ThermoElectron corporation, Astmoor, Runcom, Cheshire, UK



## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.2.2 Lösungen, Puffer, Kulturmedien

Sämtliche Medien und Stammlösungen zur Kultur der Säugerzellen wurden von der Firma: PAA Laboratories GmbH, A-4061 Pasching bezogen:

- Kulturmedien: DMEM (hoher Glucosegehalt), IMDM, RPMI 1640
- FCS Gold – fötales Kälberserum
- L(+)-Glutamin-Lsg. 200 mM in 1x PBS
- Na-Pyruvat-Lsg. 100 mM in 1x PBS
- Penicillin 10<sup>5</sup> IU/ml - Streptomycin 10 mg/ml in 1x PBS
- Trypsin 0,5% (m/v)-EDTA 0,2% (m/v) in 1x PBS

#### Fötales Kälberserum (FCS):

Die Qualität des verwendeten FCS wurde durch ein Analysenzertifikat bestätigt. Es wurde bereits durch den Hersteller steril filtriert und auf Mycoplasmen, Endotoxin, Viren und Bakterien getestet. Für den Einsatz zur Kultivierung der verwendeten Zelllinien wurde das FCS für 30 Minuten bei 56 °C im Wasserbad inkubiert. Dieser Prozess dient der Inaktivierung von Komplement-Faktoren. Für die längerfristige Verwendung wurde das FCS aliquotiert und bei -20°C eingefroren. FCS dient den Zellen als Nährstoffquelle und enthält u. a. verschiedene Wachstumsfaktoren.

Darüber hinaus benötigte Arbeitslösungen wurden mit doppelt deionisiertem Wasser aus der institutseigenen Reinstwasseranlage angesetzt:

#### 1x PBS:

Dulbeccos's PBS 1 % (m/m) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

dd H<sub>2</sub>O

Nach Auflösen des Pulvers wurde der pH-Wert geprüft, bei Abweichung mit 1 N NaOH bzw. 1N HCl auf 7,4 eingestellt, und die Lösung autoklaviert

## 2 - Material und Methoden

---

### Trypanblau:

Trypanblau-Lsg 0,4 %    20 % (v/v) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
1x PBS-Lsg                    80 % (v/v)

### Trysin-EDTA-Lsg:

Trypsin 0,5% (m/v)-EDTA  
0,2% (m/v)-Stammlsg.    10 % (v/v) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)  
1x PBS

### Fixierlösung für Dapi-Färbung:

Methanol    75 % (v/v)  
Essigsäure    25 % (v/v)

### DAPI-Färbelösung:

DAPI-Stammlsg. (50µg/ml)                    0,1 % (v/v)  
1x PBS-Lsg

### FACS-Medium:

FCS                    1 % (v/v) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)  
Natriumazid            0,1 % (m/v) (C.I Roth GmbH, Karlsruhe)  
In 1x PBS

### FACS-Fix II:

Paraformaldehyd    0,7 % (m/v) (C. Roth GmbH, Karlsruhe)  
In 1x PBS

Das Trägermedium für die Durchflusszytometrie, FACS-Flow<sup>®</sup> (Sheath Fluid), wurde von BD (Becton Dickinson), San Jose, CA, USA bezogen.

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.2.3 Säugerzellkulturmedien

#### DMEM (HaCaT-Zelllinie):

DMEM	0,821 % (m/m) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
NaHCO <sub>3</sub>	0,37 % (m/m)
Glucose	0,45 % (m/m)
FCS Δ+	10,00 % (v/v) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
Na-Pyruvat	1 mM

#### IMDM (XS106-Zelllinie):

IMDM	1,75 % (m/m) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
NaHCO <sub>3</sub>	0,3 % (m/m)
FCS Δ+	10,0 % (v/v) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
NS47 Überstand	5,0 % (v/v)
Na-Pyruvat	1 mM
GM-CSF (murin)	10 <sup>-6</sup> % (m/m)

#### IMDM (NS47-Zelllinie):

IMDM	1,75 % (m/m) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
NaHCO <sub>3</sub>	0,3 % (m/m)
FCS Δ+	10,0 % (v/v) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
Na-Pyruvat	1 mM

#### RPMI1640 (SP37A3<sup>-</sup>-Zelllinie):

RPMI1640	1,01 % (m/m) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
NaHCO <sub>3</sub>	0,2 % (m/m)
FCS Δ+	10,0 % (v/v) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
GM-CSF (murin)	10 <sup>-6</sup> % (m/m)
M-CSF (murin)	5 x 10 <sup>-6</sup> % (m/m)

## 2 - Material und Methoden

---

### RPMI1640 (für die DC-Kultur):

RPMI1640 1,01 % (m/m) (PAA Laboratories GmbH, Pasching)

NaHCO<sub>3</sub> 0,2 % (m/m)

Vollblutserum Δ+ 2% (v/v)

Alle aufgeführten Zellkulturmedien wurden mit L(+)-Glutamin (2mM<sup>\*</sup>) und Penicillin (10<sup>6</sup> IU/L<sup>\*</sup>) / Streptomycin (100 mg/L<sup>\*</sup>) supplementiert.  
(\* – Endkonzentration!)

### **2.1.2.4 Zytokine, Prostaglandin E<sub>2</sub>**

Die Generierung der DC erfolgte durch Differenzierung primärer Monozyten unter Verwendung verschiedener rekombinanter humaner Zytokine: Interleukin 4 (IL-4), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungsfaktor (GM-CSF), Interleukin 1β (IL-1β), Tumornekrosefaktor α (TNF-α) und Prostaglandin E<sub>2</sub> (Arachidonsäurederivat, synthetisch hergestellt). Diese wurden dem Kulturmedium als Stimulus zugesetzt. Die Zytokine wurden in lyophilisierter Form von AL Immunotools GmbH, Freisoythe bezogen und gemäß den Empfehlungen des Herstellers in 1x PBS rekonstituiert. Um Qualitätseinbußen zu vermeiden, wurden die Zytokine bedarfsgerecht portioniert und die Aliquote bei -70 °C eingefroren. Das Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) war von Axxora Dt. GmbH, Grünberg. Es wurde in absoluten Ethanol gelöst und ebenfalls aliquotiert eingefroren.

Für die Kultur der XS-106 bzw. SP37A3<sup>-</sup>-Zellen wurde Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierungsfaktor (GM-CSF) und Makrophagen-Kolonie-Stimulierungsfaktor (M-CSF, nur SP37A3<sup>-</sup>-Zellen) murinen Ursprungs benötigt. Diese Faktoren wurden in Form rekombinanter muriner Proteine von AL Immunotools GmbH, Freisoythe bzw. tebu-bio GmbH, Offenbach bezogen. Die Rekonstitution der lyophilisierten Zytokine erfolgte nach Empfehlungen der Hersteller. Auch diese Zytokine wurden in Aliquots bei -70°C eingefroren.

### **2.1.2.5 Antikörper**

Die Generierung der DC erfolgte aus primären Monozyten, die ihrerseits aus Buffy Coats isoliert wurden. Um Informationen über den Erfolg der Präparation und den Reinheitsgrad der Monozytenkultur zu gewinnen, wurden Antikörper gegen die Oberflächen-Marker CD14 (Monozyten – Klon TÜK4), CD19 (B-Lymphozyten – Klon HD37) und CD3 (T-Lymphozyten – Klon 4CHT1) eingesetzt.

## 2 - Material und Methoden

---

Zur Dokumentation des Reifegrades der generierten DC wurden Antikörper gegen die Zelloberflächen-Marker CD54 (Klon 6.5B5), CD83 (Klon HB15e), bzw. CD86 (Klon B4G3) verwendet. Alle genannten Antikörper sind in der Maus generiert, FITC-markiert und vom Subtyp IgG1 (Ausnahme: CD14 – IgG2a). Als Kontrolle wurde der entsprechende Isotyp IgG1-FITC bzw. IgG2a-FITC verwendet. Die Antikörper wurden alle von der Firma Dako Corp. Carpinteria, CA, USA bezogen.

**Tabelle 5 - eingesetzte Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotyp</b>	<b>Markierung</b>	<b>Hersteller</b>
Maus IgG1 Isotyp		IgG1	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Maus IgG2a Isotyp		IgG2a	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Maus-antihuman CD3	4CHT1	IgG1	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Maus-antihuman CD14	TüK4	IgG2a	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Maus-antihuman CD19	HD37	IgG1	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Maus-antihuman CD54	6.5B5	IgG1	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Maus-antihuman CD83	HB15e	IgG1	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Maus-antihuman CD86	B463	IgG1	FITC	Dako Corp. Carpinteria, CA
Ratte anti-Maus CD54	BE29G1	IgG2a	PE	Abcam plc. Cambridge, UK
Ratte anti-Maus CD273	TY25	IgG2a	PE	BD Biosciences
Ratte anti-Maus CD274	MIH5	IgG2a	PE	BD Biosciences
Ratte anti-Maus CD275	HK5.3	IgG2a	Biotin	BD Biosciences
Ratte anti-Maus CD86	GI-1	IgG2a	ohne	R & D Systems, Wiesbaden
Ratte anti-Maus CD40	1C10	IgG2a	ohne	NatuTec GmbH, Frankfurt
Armenian Hamster anti-Maus CD80	1610A1	IgG	ohne	NatuTec GmbH, Frankfurt
Ratte IgG2a Isotyp	R3595	IgG2a	ohne	BD Biosciences

## 2 - Material und Methoden

---

### Sekundärantikörper

Esel anti-Ratte IgG F(ab') <sub>2</sub>		IgG (H+L)	Cy-2	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege anti-Ratte IgG F(ab') <sub>2</sub>		IgG (H+L)	PE	Dianova GmbH, Hamburg
Ziege anti-Armenian Hamster IgG		IgG (H+L)	FITC	NatuTec GmbH, Offenbach

### Konjugat

Streptavidin-PE-Konjugat	---	---	PE	BD Biosciences, La Jolla
--------------------------	-----	-----	----	--------------------------

#### 2.1.2.6 Transfektionsreagentien und Lösungen:

##### Für die Lipofektion:

Transfektionsreagenz GenePorter, GeneTherapy Systems Inc., San Diego, USA

##### Für die DEAE-Dextran-Transfektion:

Chloroquin-Stammlsg:

Chloroquin 0,2 % (m/v)

dd H<sub>2</sub>O

DEAE-Dextran-Stammlsg:

DEAE-Dextran 1% (m/v)

dd H<sub>2</sub>O

Beide Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C

##### Für die Calciumphosphat-Kopräzipitation:

2x HBS-Stammlsg:

HEPES 50,0 mM

NaCl 280,0 mM

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O 1,5 mM

1 N NaOH q.s.

dd H<sub>2</sub>O

Calciumchlorid-Stammlsg:

CaCl<sub>2</sub> x 2H<sub>2</sub>O 2,5 M

dd H<sub>2</sub>O

Beide Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert, Lagerung bei 4°C. Die 2xHBS-Lösung wurde mit 1N NaOH auf pH 7,1 eingestellt

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.2.7 weitere Verbrauchsmaterialien

Deckgläschen	24 x 24 mm	Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
Einfrierröhrchen	Cryo.S steril, 2 ml	Greiner Bio-one, Fricken- hausen
Elektroporations- küvetten	Equibio 0,2 cm	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
FACS-Röhrchen	5 x 1 cm, unsteril	Greiner Bio-one, Fricken- hausen
Filteraufsatz	Porengröße: Ø 0,2 µm, Filtrationsvolumen: 500 ml	Biochrom AG, Berlin
Membranfilter	für wässrige Lösungen, Porengröße: Ø 0,2 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Objektträger	1 : 3 Zoll	Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda-Königshofen
Zellkulturflaschen	75 cm <sup>2</sup> , 200 ml	Greiner Bio-one, Fricken- hausen
	25 cm <sup>2</sup> , 40 ml	Biochrom AG, Berlin
Zellkulturplatten	6 und 12 Näpfe / Platte	Greiner Bio-one, Fricken- hausen
Zellkulturschaber	steril, 24 cm, 13 mm	Biochrom AG, Berlin

## 2 - Material und Methoden

---

### 2.1.2.8 Säugerzell-Linien

HaCaT: ist eine Keratinozytenzelllinie, die als spontan in vitro transformierte Zelllinie aus adulter Haut etabliert wurde (Boukamp et al.; 1988). Die Kultur der HaCaT-Zellen erfolgte in DMEM.

XS106: repräsentiert eine murine DC-Linie mit fortgeschrittenem Reifestatus (Xu et al.; 1995). XS106 Zellen wurden in IMDM kultiviert.

NS47: Bei den NS47 handelt es sich um eine murine Fibroblastenlinie (Schuhmachers et al.), die 1995 erzeugt wurde. Sie diente zur Gewinnung des M-CSF-haltigen Überstandes, der zur Kultur der XS106 Zellen benötigt wurde. NS47 wurden ebenfalls in IMDM kultiviert.

SP37A3: Diese murine DC-Linie wurde nach dem Protokoll von Winzler und Mitarbeitern (1996) generiert. Die SP37A3-Linie zeigt den Phänotyp unreifer dendritischer Zellen, kann aber durch Zugabe der Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu komplett ausgereiften DCs differenziert werden. Die Kultur der SP37A3 erfolgte in RPMI1640.

### 2.1.3 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	steril, 10 ml	Greiner Bio-one, Frickenhausen
Parafilm	Parafilm® M	Alcan Inc., Neenah, USA
Petrischalen	Ø 6 cm	Biochrom AG, Berlin
	Ø 10 cm	Hartenstein, Würzburg
Pipettenspitzen	für Eppendorf bzw. Gilson-Pipetten: weiß - 10 $\mu$ l, gelb - 200 $\mu$ l, blau - 1000 $\mu$ l	Sarstedt AG & Co, Nürnberg
Reaktionsgefäße	1,5 ml Volumen	Sarstedt AG & Co, Nürnberg
	2,0 ml Volumen	
	Thermotube (für PCR),	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Zentrifugenröhrchen	15 ml Volumen, Spitzboden	Greiner Bio-one, Frickenhausen
	50 ml Volumen, Spitzboden	



### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten wurden mit sterilisierten Arbeitsgeräten und soweit möglich sterilen Verbrauchsmaterialien durchgeführt.

##### 2.2.1.1 Bakterienanzucht

Von den eingesetzten Bakterienstämmen wurden für alle nachfolgenden Arbeiten zunächst Einzelkolonien benötigt. Dazu wurden Agarplatten, die bei 4°C gelagert waren, auf Raumtemperatur (RT) vorgewärmt und auf der Schalenunterseite beschriftet. 50 µl der Bakteriensuspension wurden auf dem LB-Agar ausplattiert. Die Agarplatte wurde bei 37 °C über Nacht in einem Brutschrank inkubiert. Ca. 12 h später wurde das Wachstum der Bakterien auf der Agarplatte anhand der Anzahl von Einzelkolonien beurteilt. Mittels einer Impföse aus Platindraht wurde eine Einzelkolonie entnommen und in 1 – 5 ml LB-Medium überführt. Der beimpfte Ansatz diente zur Herstellung einer Vorkultur.

##### 2.2.1.2 Herstellung Chemokompetenter Zellen

Für die Transformation von Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen wurden kompetente Bakterien benötigt. Die Herstellung von chemokompetenten Zellen erfolgte mit der Calcium-Chlorid-Methode: Dazu wurde eine Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstamms in 5 ml LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C, 180 rpm, auf dem Bakterenschüttler inkubiert. 1 ml der Vorkultur wurde nach ca. 15 h im Verhältnis 1:100 mit frischen LB-Medium expandiert und der Kulturansatz erneut bei 180 rpm, 37°C auf dem Bakterenschüttler geschüttelt. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,4 aufwies, wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt. Die weiteren Arbeiten erfolgten bei 4°C. Vom Kulturansatz wurden je 8ml in sterile Zentrifugenröhrchen abgefüllt und 5min bei 5000rpm, 4°C zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstands wurde das Zellpellet in 8 ml 0,1M filtriertem Calciumchlorid (pro Röhrchen) resuspendiert. Es folgte eine Inkubationsphase von 20 min auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation von 5 min, 5000 rpm, bei 4°C wurde der Überstand abgegossen und das Pellet in 0,8 ml 0,1M filtriertem Calciumchlorid aufgenommen. Für die Konservierung wurden 70 µl DMSO langsam hinzu gegeben, leicht gemischt und die resultierende Suspension in vorgekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße abgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei -70°C. Auf diese Weise behandelte Bakterien konnten ca. 6 Monate als chemokompetente Zellen verwendet werden.

## **2 - Material und Methoden**

---

### **2.2.1.3 Transformation chemokompetenter Zellen**

Für die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien wurden 0,5 µg auf 50 µl Bakteriensuspension verwendet, bei den Ligationsansätzen wurden 5 µl transformiert. Die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien geschieht auf antibiotikahaltigen LB-Agarplatten. Die Antibiotikaresistenz wird den Bakterien durch das transformierte Plasmid vermittelt. Zunächst wurde die entsprechende Menge DNA / Ligationsansatz in gekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt und 50 µl Bakteriensuspension auf Eis zupipettiert und gemischt. Nach einer Inkubationsphase von 30 min auf Eis wurde ein Hitzeschock von 2 min bei 42°C im Thermoblock ausgeführt und erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 300 µl vorgewärmtem LB-Medium. Nach einer Inkubationsphase von 1 h bei 37°C, 400 rpm (Eppendorf Thermomixer) zur Ausbildung der Antibiotikaresistenz wurden bei transformierter Plasmid-DNA 50 µl, bei Ligationsansätzen die kompletten 350 µl auf der Agarplatte verteilt und die Suspension antrocknen lassen. Die ausplattierten LB-Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert und ca. 12 h später der Erfolg der Transformation anhand der gewachsenen Einzelkolonien beurteilt.

### **2.2.1.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

#### **2.2.1.4.1 „Koch“-Methode**

Für das Durchmustern von Klonen zur Überprüfung auf das korrekte Insert nach der Klonierung wurde eine Methode benötigt, die schnell, kostengünstig und robust einzusetzen war. Das ideale Verfahren für diesen Zweck wurde in der „Koch“-Methode (modifiziert nach Holmes und Quigley, 1981) gefunden. Einzelkolonien wurden (vgl. 2.2.1.1.) über Nacht als Vorkultur angezogen. 1,2 ml der Bakteriensuspension wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und der Ansatz bei 4°C mit 4000 rpm, 5min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die Probe auf Eis in 300 µl STET-Puffer resuspendiert (vgl. 2.1.1.8.2.). 25 µl frisch zubereitete Lysozym-Lösung (10 mg/ml) wurde zugegeben und die Probe für 2 min gevortext. Anschließend wurde der Ansatz bei 98°C, 1 min auf dem Thermomixer inkubiert und danach für 15 min bei 12000 rpm, RT, zentrifugiert. Das Pellet wurde mit der Impföse entfernt, zu der Lösung das gleiche Volumen Isopropanol (325µl) gegeben und gemischt. Zum Ausfällen der DNA wurde die Probe 10 min bei -20°C gelagert, danach 10 min bei 4°C, 15000rpm zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde 2x mit je 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die

## **2 - Material und Methoden**

---

Zentrifugationsschritte beim Waschen waren 5 min bei 15000rpm, 4°C. Das DNA-Pellet wurde nach Trocknen bei RT in 80 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.2.1.4.2 Alkalische Lyse**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte durch alkalische Lyse nach Birnboim und Doly, 1979. Die Bakterien einer Ü/N-Kultur wurden zunächst mittels Zentrifugation sedimentiert und das Pellet in einem hypotonischen TRIS-Puffer resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde eine alkalische Lösung aus Natriumhydroxid mit 1% (m/m) SDS zugefügt. Dieser Puffer lysiert die Zellen, sämtliche Bakterienproteine werden denaturiert, die dann als SDS-Aggregate vorliegen. Im letzten Schritt wurde die alkalische Suspension durch Zugabe eines Natriumacetat-Puffers neutralisiert. Die nach der pH-Wert-Änderung entstandenen weißen Flocken aus SDS-assoziierten Zellwandbestandteilen wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Acetatpuffer liefert die erforderliche Salzkonzentration, so dass die Nukleinsäuren aus dem Überstand mit 70%igem Alkohol gefällt werden konnten.

#### **2.2.1.4.2.1 Plasmid-Isolierung im Kleinmaßstab – Minipräparation**

Die Isolierung der Plasmid-DNA im Kleinmaßstab für Restriktionen und Sequenzierung erfolgte nach dem unter 2.2.1.5. beschriebenen Verfahren. Verwendet wurde das Nucleospin-Kit der Firma Macherey-Nagel, Düren, das neben den beschriebenen Puffern zur Isolierung auch Trennsäulen und Puffer zur weiteren Aufreinigung enthielt. 1,5 ml einer Ü/N-Kultur wurden 1 min bei 10000 x g zentrifugiert und das Pellet in 250 µl Puffer A1 resuspendiert. Zur Lyse der Bakterien wurde das gleiche Volumen Puffer A2 zugegeben und gemischt. Die Neutralisierung erfolgte durch Zugabe von 300 µl Puffer A3. Die SDS-Aggregate wurden durch Zentrifugation bei 10000 x g, 10 min, RT sedimentiert. Die weitere Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte durch Affinitätschromatographie mittels Trennsäulchen auf Kieselgelbasis. Die überstehende Lösung wurde durch Zentrifugation bei 10000 x g, 1 min, RT durch die Säule gepresst und die DNA am Säulenmaterial adsorbiert. Mit 600 µl des ethanolhaltigen Puffer A4 wurde die Probe unter Zentrifugation bei 10000 x g, 1 min, RT gewaschen. Zur Entfernung von Flüssigkeitsresten wurde erneut 2min, bei 10000 x g, RT zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von zweimal 20 µl Puffer AE von der Säule eluiert. Zwischen den Elutionsschritten wurde für mindestens 1 min inkubiert; die Gewinnung des Eluats erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 x g, 1 min, RT. Die beiden erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und gemischt.

### 2.2.1.4.2.2 Plasmidisolierung in präparativen Mengen – Midipräparation

Für die transiente Transfektion von Säuger-Zelllinien wurden größere Mengen hochreiner Plasmid-DNA benötigt. Die Isolation dieser DNA im präparativen Maßstab erfolgte über das unter 2.2.1.4.2.2 beschriebene Verfahren unter Verwendung des Nucleobond® PC Midi-DNA-Kits, der Firma Macherey-Nagel: 1 ml einer frisch angesetzten Vorkultur (vgl. 2.2.1.1) wurde 1 : 50 mit neuem LB-Medium expandiert, und die Bakteriensuspension Ü/N (mindestens 12h) bei 37°C, 180rpm auf dem Bakterenschüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Bakteriensuspension in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 6000 x g, RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Zellpellet in 4 ml Puffer S1<sup>34</sup> gelöst, anschließend wurde 4 ml Puffer S2 (alkalische Lyse) zupipettiert und in kreisenden Bewegungen gemischt. Nach längstens 5 min Inkubationsdauer, in der sich die Lösung deutlich klären musste, wurden 4 ml des Puffers S3 (Neutralisierungspuffer) hinzugegeben und ebenfalls in kreisenden Bewegungen gemischt. Zur Pelletierung der entstandenen Protein-SDS-Aggregate wurde 30 min bei 12000 x g, RT, zentrifugiert und die überstehende Lösung auf eine Nucleobond® AX100 Säule gegeben. Diese Säule war zuvor mit 1,5 ml Äquilibriumspuffer N2 versetzt worden, um sie für die Adsorption der DNA vorzubereiten. Die abzentrifugierte Lösung floss mittels Schwerkraft durch die Säule, das Eluat wurde verworfen. Die Säule wurde zweimal mit je 10 ml Puffer N3 (ethanolhaltig) gewaschen und das Eluat ebenfalls verworfen. Um die DNA von der Säule zu waschen wurden 5 ml Puffer N5 (Hochsalzpuffer, vgl. 2.1.1.8.1) zugegeben und die durchgeflossene Lösung in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt. Es folgte eine Präzipitation der Plasmid-DNA durch Zugabe von 3,5 ml Isopropanol. Der Ansatz wurde gemischt und auf vier 2 ml Reaktionsgefäße verteilt, danach 30 min bei 15000 x g, 4°C zentrifugiert. Ein farbloses Pellet am Rundboden des Reaktionsgefäßes lies auf eine erfolgreiche Präzipitation schließen. Der Überstand wurde abpipettiert. Um den Salzgehalt der Probe weiter zu erniedrigen, wurde der Ansatz einmal mit 2 ml 70%igem Ethanol gewaschen, 5 min bei 15000 x g, 4°C zentrifugiert und der Überstand ebenfalls verworfen. Das DNA-Pellet wurde ca. 15 min bei RT trocknen lassen. Pro 2 ml Reaktionsgefäß wurden 60 µl ddH<sub>2</sub>O zugegeben und die DNA bei 60°C, 300rpm auf dem Eppendorf Thermomixer gelöst. Die Lösungen der 4 Reaktionsgefäße einer Probe wurden vereinigt und gemischt.

---

<sup>34</sup> hypotonischer Puffer, RNase A-haltig

### 2.2.1.5 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Plasmid-DNA aus der Mini-Präparation wurde aufgrund des geringeren DNA-Gehalts 1:30, die Plasmid-DNA aus der Midi-Präparation 1:100 mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt. Die Bestimmung erfolgte am Spektr-Photometer. Gemessen wurde die Absorption bei 260 nm (für DNA), bei 280 nm (für Protein) und bei 320 nm zur Bestimmung des Salzgehalts der Probe. Wichtig war die vollständige Abtrennung von RNA, denn auch diese liefert eine Absorption bei 260 nm und würde die Konzentrationsbestimmung verfälschen. 1 OD<sub>260</sub> entspricht 50 µg/ml DNA. Zur Berechnung der DNA-Konzentration musste dieser Faktor mit der tatsächlich erhaltenen Absorption bei 260 nm und dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden. Die Bestimmung der Absorption bei 280 nm gibt Aufschluss, wie viel Protein in der Probe verblieben ist. Der Quotient aus der Absorption bei 260 bzw. 280 nm kann zur Einschätzung der DNA-Qualität herangezogen werden.

### 2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Zur weiteren Qualifizierung von Plasmid-DNA bzw. zur Analyse von Restriktionen (vgl. 2.2.1.7) oder PCR-Produkten (2.2.1.11) wurde die Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt. Das Verfahren dient zur Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größe in einer Matrix aus Agarose. Unter Verwendung eines Standards (DNA-Marker) kann gleichzeitig eine Größenbestimmung vorgenommen werden. Die Maschenweite des Gels wird durch dessen Prozentigkeit bestimmt. Dabei wird die Dichte umso größer gewählt, je kleiner die zu erwartenden DNA-Fragmente sind. Gängige Gewichtsprozent liegen zwischen 0,8 und 1,5. Durch Anlegen einer Spannung an horizontale, pufferüberschichtete Gele wandern die negativ geladenen Nukleinsäuren im Elektrischen Feld zum Pluspol (Anode). Die Wanderungsgeschwindigkeit ist demzufolge abhängig von Porenweite des Gels und Ladung der DNA.

Die benötigte Agarosemenge wurde im Erlenmeyerkolben vorgelegt und das entsprechende Volumen an 1x TBE-Puffer zugegeben. Das Aufkochen der Agarose erfolgte in der Mikrowelle. Parallel dazu wurde ein Gelträger in die Gießkammer gestellt, in den 1 bis 2 Gelkämme zur Ausbildung der Taschen gesteckt worden waren. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wurde die Lösung auf dem Gelträger verteilt und aushärten lassen. Das Agarosegel wurde in die Elektrophoresekammer gegeben und mit Puffer überschichtet. Nach Entfernen der Gelkämme wurde die DNA-Lösung, die mit Ladepuffer gemischt war, in die Taschen des Gels einpipettiert und das Gel bei 100 V je nach Prozentigkeit und Laufstrecke für 1 – 2h aufgetrennt. Der Ladepuffer beschwert die DNA-

## **2 - Material und Methoden**

---

Lösung, damit sie gut in die Taschen pipettiert werden kann. Ein enthaltener Farbstoff (z.B. Bromphenolblau) dient zur optischen Orientierung der Lauffront. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Agarosegel für 15 min in einer Ethidiumbromid-Lösung (50µg/ml) gefärbt. Ethidiumbromid interkaliert in doppelsträngige DNA, die auf diese Weise im UV-Licht nachgewiesen werden kann. Die Detektion der ethidiumbromidgefärbten DNA-Banden erfolgte im UV-Transilluminator (305 nm), der zur Dokumentation der Gele mit einer Videoeinheit verbunden war.

### **2.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA**

Bakterielle Endonukleasen können doppelsträngige DNA sequenzspezifisch durch hydrolytische Spaltung der Phosphodiesterbindungen schneiden. Diese Eigenschaft wird in der DNA-Analytik ausgenutzt und stellt gleichzeitig die Basis für Klonierungen dar. Zum Einsatz kommen sog. Typ-II Restriktionsenzyme, die ihre Erkennungssequenz meist innerhalb eines Palindroms von 4 bis 8 Basenpaaren besitzen. Die resultierenden Spaltenden haben entweder einen 5'- oder 3'-Überhang, oder es entstehen bei der Restriktion glatte Enden.

Für qualitative DNA-Restriktionen wurden 0,3 µg Plasmid-DNA in einem Reaktionsvolumen von 15 µl eingesetzt. Verwendet wurde das Puffersystem der Firma Promega. Der Reaktionsansatz bestand aus der DNA-Lösung, 10 % (v/v) des enzymespezifischen Puffers, 1-10 IE Restriktionsenzym, aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O auf das genannte Reaktionsvolumen. Der Verdau wurde für die meisten Enzyme 1h bei 37°C, 400rpm auf dem Eppendorf Thermomixer ausgeführt und im Anschluss der komplette Ansatz durch Agarosegelelektrophorese (vgl. 2.2.1.6) analysiert. Für präparative Ansätze wurden bis zu 2 µg DNA eingesetzt und meist mehrere Stunden verdaut. Ein Aliquot von 0,3 µg wurde zur Analyse auf ein Gel aufgetragen.

### **2.2.1.8 Aufreinigung von DNA-Molekülen**

PCR-Produkte oder DNA-Moleküle, die einem Restriktionsverdau entstammten, wurden für ihre weitere Verwendung mit dem Promega Wizard SV Gel and PCR Cleanup System aufgereinigt. Dazu wurde der Ansatz mit dem gleichen Volumen Puffer „Membrane Binding Solution“ versetzt und gemischt. Die Aufreinigung erfolgte nach dem Prinzip der Affinitätschromatographie mit einer Trennsäule, auf die die vorbereitete Lösung pipettiert wurde. Nach einminütiger Inkubation wurde 1 min bei 16000 x g zentrifugiert und die durchgeflossene Lösung verworfen. Zu der gebundenen DNA auf der Säule wurden 700

## 2 - Material und Methoden

---

µl Waschpuffer „Membrane Wash Solution“ gegeben und 1 min bei 16000 x g zentrifugiert. Die Säule wurde erneut mit 500 µl Waschpuffer versetzt und 5 min bei 16000 x g zentrifugiert. Durch Zugabe von 40 µl nucleasefreiem Wasser wurde die DNA von der Säule eluiert. Vor der Zentrifugation bei 10000 x g, 1 min, RT zur Gewinnung des Eluats wurde die Säule mindestens 1 min mit dem Puffer inkubiert.

Die Aufreinigung eines Restriktionsansatzes, der aus mehreren Fragmenten bestanden und durch Gelelektrophorese aufgetrennt worden war, wurde ebenfalls mit dem Promega Wizard SV Gel and PCR Cleanup System durchgeführt. Dazu wurde die gewünschte Bande mit dem Skalpell unter UV-Licht (305 nm) aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Gelstück gewogen. Pro 100 mg Gelmasse wurden 100 µl Puffer „Membrane Binding Solution“ zupipettiert, und der Ansatz bei 60°C auf dem Thermomixer aufgeschmolzen. Die entstandene Lösung wurde auf eine Trennsäule gegeben und wie oben beschrieben aufgereinigt.

### 2.2.1.9 DNA-Ligation & Klonierung

Die DNA-Ligation (Lobban et al.; 1973) ist der wesentliche Reaktionsschritt einer Klonierung. Durch das Enzym T4-Ligase werden Phosphodiesterbindungen zwischen zwei DNA-Enden katalysiert. Dabei erfolgt die Verknüpfung immer von der 5'-Phosphat- zu der 3'-OH-Gruppe des anderen Strangs. Sowohl glatte als auch kompatible Enden werden kovalent verknüpft. Die Religation ist die einfachste Reaktion dieser Art. Sie dient zur Fusion eines linearisierten Vektors (intramolekulare Reaktion). Bei der Klonierung werden i. d. R. kleinere DNA-Fragmente in einen geschnittenen Vektor einkloniert (Intermolekulare Reaktion). Durch Restriktion von Vektor und Insert mit dem gleichen Paar an Restriktionsenzymen kann eine gerichtete Klonierung vorgenommen werden, d.h. das Insert wird mit einer definierten Orientierung eingefügt. Intramolekulare Reaktionsprodukte können auf diese Weise nicht entstehen. Durch Entfernen der 5'-Phosphatgruppe mit dem Enzym alkalische Phosphatase z.B. aus Shrimps (SAP – Shrimps alkaline Phosphatase) bzw. Kälbern (CIAP – calf intestinal alkaline Phosphatase) kann bei der Klonierung ebenfalls eine Religation des Vektors unterbunden werden. PCR-Produkte verfügen über keine 5'-Phosphatgruppe. Bei der Verwendung eines 5'-dephosphorylierten Vektors muss für eine erfolgreiche Klonierung an das PCR-Produkt mittels einer T4-Kinase-Reaktion eine 5'-Phosphat-Gruppe angefügt werden.

Die Dephosphorylierung wurde mit SAP in einem Volumen von 30 µl durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt neben 1 bis 5 I.U. des Enzyms, 10 % (v/v) des entsprechenden

## 2 - Material und Methoden

---

10x-Reaktionspuffers und die linearisierte DNA (bis zu 1 µg). Die Reaktion erfolgte für eine halbe Stunde bei 37 °C, 400rpm auf dem Eppendorf Thermomixer. SAP konnte, im Gegensatz zu CIAP, nach erfolgter Reaktion hitzeinaktiviert werden (15 min, 60°C).

Der Reaktionsansatz der T4-Kinase-Reaktion bestand neben der DNA aus 10% (v/v) des 10x Reaktionspuffers (enthält ATP als Kofaktor), 10 I.U. des Enzyms aufgefüllt auf 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O. Die Reaktion wurde für eine halbe Stunde bei 37°C im Thermocycler durchgeführt.

Für die DNA-Ligation wurden 200 ng des Vektors eingesetzt. Die Menge an Insert-DNA berechnete sich nach folgender Formel:  $m(\text{Insert}) = 5 \times m(\text{Vektor}) \times (\text{Größe Insert}/\text{Größe Vektor})$ . Das Gesamtvolumen der Reaktion betrug für intermolekulare Reaktionen 15 µl, für intramolekulare 20 µl. Neben Vektor und Insert-DNA enthielt der Reaktionsansatz 10% (v/v) 10xLigase-Puffer<sup>35</sup>, 1 -2,5 Weiss-Einheiten (Weiss et al.; 1968) T4-Ligase aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O auf das genannte Volumen. Die Reaktion wurde bei 16°C in Thermocycler über Nacht durchgeführt.

### 2.2.1.10 Klenow-Reaktion

Zum Glätten überhängender DNA-Enden, die durch Restriktion oder infolge PCR mit einer Taq-Polymerase (addiert 5' ein singuläres Adenosin-Nukleotid) entstanden sind, wurde das „Klenow“-Enzym verwendet. Die Klonierung in eine Schnittstelle mit glatten Enden bzw. wenn keine komplementären Enden vorhanden sind, wäre sonst nicht möglich. Der Reaktionsansatz bestand aus 10 % (v/v) des 10fach konzentrierten Puffers, 1 U Klenow-Enzym, der DNA und 0,5 mM dNTPs in einem Reaktionsansatz von 30 µl. Die Reaktion wurde für eine halbe Stunde bei 25°C im Thermocycler ausgeführt. Im Anschluss erfolgte die Hitzeinaktivierung des Enzyms 20 min bei 70°C. Die modifizierte DNA wurde vom denaturierten Enzym und den restlichen Komponenten des Ansatzes durch eine Aufreinigung, wie unter 2.2.1.8 beschrieben, gereinigt.

### 2.2.1.11 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine in-vitro-Methode zur Amplifikation doppelsträngiger DNA-Abschnitte unter Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase und zwei sequenzkomplementären Oligonukleotiden (Saiki et al.; 1988). Zunächst müssen die Doppelstränge der DNA zu Einzelsträngen denaturiert werden. Dies

---

<sup>35</sup> enthält 10 mM ATP als Kofaktor



## 2 - Material und Methoden

---

geschieht durch einen Inkubationsschritt bei 95°C, 3 min. Danach wird die Temperatur auf ca. 55 – 70°C abgesenkt, damit die Oligonukleotide an den jeweiligen Einzelstrang binden können. Die DNA-Polymerase lagert sich an das freie 3'-OH-Ende eines Oligonukleotids an und startet die Synthese des komplementären DNA-Strangs. Die optimale Reaktionstemperatur dieses Enzyms liegt bei 72 – 75°C und wird je nach Länge des zu amplifizierenden Produkts 1 – 2 min gehalten. Das Ergebnis dieses Zyklus bestehend aus den drei Reaktionsschritten Denaturierung – Anlagerung – Synthese ist die Amplifikation des DNA-Bereichs zwischen den Primer-Bindungsstellen. Es liegen nun mehr DNA-Moleküle als Matrizen vor, die im nächsten Zyklus in gleicher Weise verdoppelt werden; dabei kommt es zu einer exponentiellen Amplifikation des DNA-Abschnitts. Üblicherweise wurden bei der PCR-Reaktion 25 – 30 Zyklen ausgeführt. Bei der Amplifikation von DNA-Fragmenten, die später zur Klonierung eingesetzt werden sollen, empfahl sich die Verwendung der Pfu-Polymerase, die eine geringere Fehlerrate bei der Polymerisierung besitzt. Für kleine Fragmente und qualitative Reaktionen konnte die übliche Taq-Polymerase verwendet werden.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Ansatz von 20µl im Thermocycler ausgeführt. Der Reaktionsansatz bestand neben 10 – 50 ng DNA aus ½ U Taq-Polymerase, 10 % (v/v) des konzentrierten Reaktionspuffers, 10 % (v/v) einer 25 mmol-Magnesiumchlorid-Lsg, 5% (v/v) dNTP-Lösung (10 mmol), den beiden Oligonucleotiden (je 10 pM konz.) und ddH<sub>2</sub>O. Die Temperaturprogramme für die jeweiligen PCR-Reaktionen sind im Anhang unter 10.3 aufgeführt. Zur Analyse wurden 3 µl des PCR-Ansatzes auf ein Agarosegel aufgetragen (vgl. 2.2.1.6)

### 2.2.1.12 DNA-Sequenzierung

Zur Ermittlung der genauen Basenabfolge eines DNA-Abschnitts wurde die DNA-Sequenzierung nach Sanger und Mitarbeitern (Sanger et al.; 1977) eingesetzt. Dabei wird die DNA-Polymerisierungsreaktion repetitiv nur mit einem Primer durchgeführt, so dass nur der Gegenstrang der Matrize synthetisiert wird. Neben den üblichen dNTPs sind im Reaktionsansatz auch basenspezifische 2',3'-Didesoxynukleotide enthalten, die kovalent an einen von vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen gebunden sind. Wenn eines dieser modifizierten Nukleotide bei der Strangsynthese eingebaut wird, kommt es aufgrund der fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Abbruch der Synthese. Es resultiert ein Gemisch aus unterschiedlich langen Oligonukleotiden, die jeweils ein Fluorochrom am Ende tragen. Der Reaktionsansatz wird mit einem hochprozentigen, denaturierenden

## **2 - Material und Methoden**

---

Polyacrylamidgel aufgetrennt. Migriert die Bande im Gel durch den Detektionsbereich des Sequenzierautomaten, wird diese aufgrund des jeweiligen angehängten Fluoreszenzfarbstoffs mit einem Laser erfasst. Zwei aufeinander folgende Banden im Gel unterscheiden sich genau in der Länge einer Base.

Für die Durchführung der Einzelstrangsynthese mittels PCR wurde das Reaktionsset Big Dye Terminator V3.1 der Firma Applied Biosystems nach Angaben des Herstellers verwendet. Eingesetzt wurden durchschnittlich 400 ng DNA, 8 µl Sequenziermix und 1 µl Oligonucleotid (10 pM). Das Temperaturprotokoll für die Reaktion ist im Anhang 10.3.2 aufgeführt. Nach erfolgter PCR-Reaktion wurde die DNA mit 96%igem (v/v) Ethanol und 3M NaAcetat-Lösung präzipitiert. Nach Waschen der DNA mit 300 µl 70%igem (v/v) Ethanol wurde die DNA bei 45°C, 30 min getrocknet und in 25 µl Formamid gelöst. Zur Analyse der Sequenzierung wurde die Probe ins Rechtsmedizinische Institut der Universität Mainz eingeschickt. Der Sequenzvergleich erfolgte unter Verwendung des Computerprogramms Chromas<sup>®</sup>.

### **2.2.2 Methoden der Zellkultur**

#### **2.2.2.1 Kulturbedingungen**

Alle Arbeiten im Zusammenhang mit Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurde unter einer Sterilwerkbank gearbeitet, die aufgrund Ihrer laminaren Luftzirkulation eine keim- und partikelfreie Umgebung gewährleistete. Die eingesetzten Materialien wurden entweder bereits steril bezogen oder durch Autoklavieren bzw. Filtrieren (Porenweite 0,2 – 0,45 µm) in diesen Zustand überführt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in entsprechenden Inkubatoren bei 37°C in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre und je nach verwendetem Säugerzellmedium unter Zugabe von 5% oder 10% CO<sub>2</sub>. Das Kulturmedium wurde regelmäßig alle 3 – 4 Tage erneuert. Zell-Linien wurden bei 80%iger Konfluenz geerntet und neu ausgesät.

#### **2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde das Verfahren der Hämacytometrie eingesetzt unter Verwendung einer Neubauer Zählkammer. Die Zellen wurden geerntet und mit 1 x PBS gewaschen. Soweit es sich um adhärente Zellen handelte, wurden diese zuvor mit 0,01% Trypsin-0,1% EDTA in 1x PBS (vgl. 2.1.2.2) vom Plastikmaterial der Zellkulturschalen

## 2 - Material und Methoden

---

abgelöst und danach unter Zugabe eines serumhaltigen Mediums<sup>36</sup> homogen gemischt, so dass eine Einzelzellsuspension entstand. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde entnommen und im gleichen Verhältnis mit der unter 2.1.2.2 beschriebenen Trypanblau-Lösung gemischt. 10 µl dieser zubereiteten Zellsuspension wurden unter das Hämacytometerglaschen der Zählkammer pipettiert und mit 100facher Vergrößerung am Lichtmikroskop ausgezählt. Zellen, bei denen die äußere Membran geschädigt ist, sind durch den Farbstoff Trypanblau blau gefärbt. Der Anteil trypanblau positiver Zellen lieferte einen Hinweis auf die Viabilität der Zellen. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel: Anzahl der Zellen in 16 Kleinquadraten x Verdünnungsfaktor x 10<sup>4</sup> (Kammerkonstante). Ausgezählt wurden mindestens 3 x 16 Kleinquadrate und der Mittelwert dieser drei Ergebnisse für die Berechnung zugrunde gelegt.

### 2.2.2.3 Kryokonservierung - Auftauen von Zellen

Die Langzeitlagerung von Säugerzellen wurde im flüssigen Stickstoff in speziellen Einfrierröhrchen vorgenommen. Zunächst wurden die Zellen geerntet, eine homogene Suspension bereitet und die Zellen bei 300 x g, 5 min, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in einem kleinen Volumen Kulturmedium resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und auf 1 x 10<sup>6</sup> pro 800 µl Medium eingestellt. In jedes Einfrierröhrchen (auf Eis vorgekühlt) wurde 800 µl Zellsuspension abgefüllt. Zusätzlich wurden pro Röhrchen 100 µl FCS und 100 µl DMSO zupipettiert und gemischt. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen während des Einfrierens; die zusätzliche Serumgabe optimiert das Kulturmedium und reduziert dadurch die Toxizität des DMSO. Die Einfrierröhrchen wurden in eine doppelwandige, mit Isopropanol gefüllte Einfrierdose gestellt und für drei Tage bei -70°C gelagert. Dieses System gewährleistete ein langsames, möglichst schonendes Einfrieren der Zellen. Frühestens nach 72 h wurden die Einfrierröhrchen in den Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Zum Auftauen eingefrorener Zellen wurde ein Einfrierröhrchen in ein 37°C warmes Wasserbad gehalten, bis nur noch ein kleiner Anteil gefrorenen Materials zurückblieb. Durch vorsichtiges Mischen mit der Kolbenhubpipette wurde die Zellsuspension vollständig aufgetaut und sofort in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, in das bereits 20 ml warmes Kulturmedium vorgelegt waren. Zur vollständigen Entfernung des DMSO wurde der Ansatz bei 300xg, 5 min, 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

---

<sup>36</sup> inaktiviert das Trypsin

## 2 - Material und Methoden

---

Das Zellpellet wurde in 15 ml vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und die Suspension zur weiteren Kultivierung in eine Zellkulturflasche gegeben (vgl. Kulturbedingungen 2.2.2.1)

### 2.2.2.4 Kultivierung humaner DC aus Monozyten

Für die Untersuchung der Konstrukte des humanen Fascin-Promotors wurden reife Dendritische Zellen menschlichen Ursprungs benötigt. Es gibt bis dato noch keine käuflich erwerbbar humane DC-Zelllinie, die als Modell dafür eingesetzt werden könnte. Deshalb mussten die DCs aus Blut-Monozyten *in vitro* generiert werden, wie es erstmals von Romani und Mitarbeitern (1994, 1996) beschrieben worden war. Nach Isolation der Monozyten aus peripherem Blut erfolgt eine mehrtägige Kultivierung unter Zugabe der Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und GM-CSF<sup>37</sup>. Die Monozyten differenzieren in dieser Zeit zu unreifen Dendritischen Zellen. Zur Induktion ihrer Ausreifung werden die unreifen DCs mit einer Mischung proinflammatorischer Zytokine (oder LPS) versetzt. Die verwendete Methode zur Ausreifung der DC wurde dem Protokoll von Jonuleit und Mitarbeitern (1997) entnommen.

Für die Isolierung der Monozyten wurden Blutspenden aus der Gießener Blutbank verwendet, die am gleichen Tag gewonnen worden waren. Den Blutspenden war bereits der größte Anteil an Blutplasma entzogen worden, so dass die zellulären Bestandteile in einem Volumen von ca. 50 ml angereichert vorlagen. Zur Verhinderung der Gerinnung, war den Blutspenden ein niedermolekulares Heparin-Derivat zugemischt worden. Zunächst wurde in einer sterilen Glasflasche 80 ml 1xPBS-Puffer vorgelegt, der zur Unterstützung der Gerinnungshemmung mit 2 mM EDTA und 5U/ml Heparin-Natrium supplementiert worden war. In diesen Puffer wurden 40 ml der Blutspende langsam einpipettiert und mit einer Pipette homogen vermischt. Danach wurden vier 50 ml Zellkulturröhrchen mit je 15 ml Ficoll-Histopaque-Lösung befüllt, und 30 ml der verdünnten Blutsuspension vorsichtig aufgeschichtet<sup>38</sup>. Zur beschleunigten Sedimentation wurden die Ansätze 20 min bei 300xg, RT ohne Abbremsen zentrifugiert. Die PBMC<sup>39</sup> sammelten sich über der Ficoll-Schicht. Der Überstand aus verdünntem Blutplasma wurde bis ca. 1

---

<sup>37</sup> Granulocyte Macrophage colony stimulating factor - Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierungsfaktor

<sup>38</sup> aufgrund des Dichteunterschieds beider Flüssigkeiten resultiert eine scharfe Trennung

<sup>39</sup> PBMC – peripher blood mononuclear cells – Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut

## 2 - Material und Methoden

---

cm über dieser PBMC-Schicht abgenommen. Das verdünnte Blutplasma konnte nach Hitzeinaktivierung der Komplementfaktoren als autologes Serum zur weiteren Kultur der Monozyten verwendet werden. Aufgrund größerer Schwankungen in der Zusammensetzung dieses Serums verschiedener Spender wurde aber der Kultur mit humanem Serum eines Spenders, gewonnen aus einer Vollblutkonserve, der Vorzug gegeben. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 400xg, 20 min, RT ohne Abbremsung um die Auftrennung zu vervollständigen: Die PBMC bildeten eine abgegrenzte Interphase zwischen restlichem Blutplasma und Beginn der Ficoll-Schicht, Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten aufgrund geringerer Dichte durch den Gradienten und bildeten ein Pellet am Boden des Zentrifugenröhrchens. Mit einer 10 ml Stabpipette wurde die Interphase abgenommen und in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Interphasen aus zwei Röhrchen wurden vereinigt, mit einem Puffer aus 5 mM EDTA in 1xPBS aufgefüllt und gemischt. Zur Sedimentation der PBMC wurde 10 min bei 300xg, RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde erneut in 40 ml des EDTA-haltigen Puffers resuspendiert und bei gleicher Zentrifugalkraft zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Zellpellet schließlich in 10 ml 37°C warmen RPMI-Medium resuspendiert. Beide Präparationsansätze wurden vereinigt und die Leukozytenzahl bestimmt.

Zur Anreicherung der Monozyten bzw. zum Entfernen von T- und B-Zellen wurden in 6 Napf-Schalen pro Napf  $2 \times 10^7$  Leukozyten in 3 ml Kulturmedium ausgesät. Es folgte ein zweistündiger Inkubationsschritt im Brutschrank bei 37°C. Während dieser Zeit adhärten die Monozyten am Plastikmaterial der Zellkulturplatte. Der Überstand, der vornehmlich nur noch Lymphozyten enthielt, wurde abgenommen. Die Monozytenschicht am Boden der einzelnen Kulturnapfe wurden dreimal mit jeweils 1 ml 1xPBS vorsichtig gespült, um die Abtrennung verbliebener Lymphozyten zu verbessern. Mit diesem Verfahren konnte der Anteil unerwünschter Lymphozyten auf durchschnittlich 20 % begrenzt werden. Im Anschluss wurden pro Napf der Zellkulturplatte 3 ml Kulturmedium (vgl. 2.1.2.3), das mit 800 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 supplementiert war, zugegeben. Die Platten wurden zur weiteren Kultivierung über die nächsten 6 Tage in den Brutschrank gegeben. Da die Zytokine während der Differenzierung der Monozyten zu Dendritischen Zellen stark verbraucht werden, wurde im Intervall von 48 h (Kulturtag 2, 4 und 6) jeweils 1 ml Kulturmedium durch frisches ersetzt. Das Kulturmedium zur

## 2 - Material und Methoden

---

Ergänzung der Zytokinkonzentration enthielt 1600 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4. Am Tag 7 wurde das Kulturmedium komplett abgenommen und alle nicht adhärenen Zellen<sup>40</sup> vorsichtig abgespült. Es folgte die Sedimentation dieser Zellen durch Zentrifugation bei 300xg, 10 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 40 ml 1xPBS+1% (v/v) Serum gewaschen. Es wurde erneut bei gleicher Zentrifugalkraft und Dauer zentrifugiert und der Überstand bis auf 10 ml pro 50 ml Zentrifugenröhrchen abgenommen. Das Pellet wurde homogen gemischt und die Zellzahl bestimmt. Die Dendritischen Zellen wurden erneut durch Zentrifugation unter gleichen Bedingungen sedimentiert und in frischem Kulturmedium (enthält 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4), dem zur Ausreifung eine Mischung verschiedener proinflammatorischer Zytokine (10 ng/ml IL1 $\beta$  - 10ng/ml TNF- $\alpha$  - 1 $\mu$ g/ml Prostaglandin E<sub>2</sub>) zugegeben worden war, aufgenommen. Die Zellzahl wurde auf 1 x10<sup>6</sup>/ml eingestellt und die DC in eine neue 6-Napf-Platte ausgesät. Um eine nahezu vollständige Ausreifung zu gewährleisten, wurden die Dendritischen Zellen für die nächsten 48 h mit dem Reifemix weiterkultiviert. Zur Dokumentation des Reifegrades der DC wurde jeweils am Tag 9 (Transfektionszeitpunkt) mittels Immunfluoreszenz die Expression der Oberflächenmarker CD83 und CD86 bestimmt.

### 2.2.2.5 Dapi-Färbung zur Detektion von Mycoplasmen & Cytospins

In regelmäßigen Abständen und vor allem nach dem Auftauen eines neuen Aliquots Zellen aus der Lagerung unter flüssigem Stickstoff, wurden die Zellen mit dem Farbstoff DAPI (vgl. 2.1.1.2) auf eine potentielle Kontamination mit Mycoplasmen getestet. Mycoplasmen können die Eigenschaften der Zellen latent verändern, ohne dass die Zelle dadurch zwangsläufig abstirbt. Zur Gewährleistung ordentlichen Zellmaterials für die Experimente ist eine regelmäßige Überprüfung geboten. Nach Permeabilisierung der Zellen kann der Farbstoff in die Zellen eindringen und bindet dort an doppelsträngige DNA. In Mycoplasmenfreien Zellen ist ausschließlich der Zellkern blau gefärbt, bei kontaminierten Zellen finden sich auch blaugefärbte Partikel im Cytoplasma, die auf DNA-Material intrazellulärer Microorganismen schließen lassen.

Adhären wachsende Zellen wurden auf sterilen Deckgläschen ausgesät und über Nacht im 6-Napf-Format kultiviert. Das überstehende Zellkulturmedium wurde abgenommen und die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen. Bei Suspensionszellen wurde ein Aliquot mit

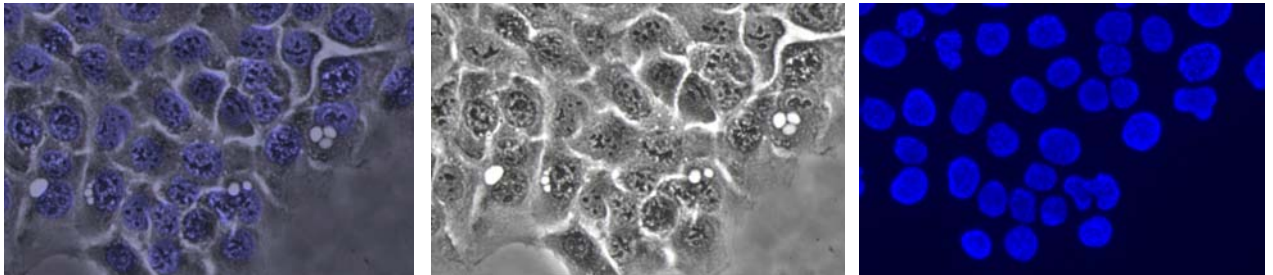
---

<sup>40</sup> = unreife Dendritische Zellen

## 2 - Material und Methoden

---

Hilfe einer „Cytospin“-Zentrifuge (500rpm, 4 min, RT) auf ein Deckgläschen zentrifugiert und dieses in einen Napf der 6-Napf-Platte überführt. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde eine Lösung aus 3 Teilen Methanol und 1 Teil Essigsäure auf das Deckgläschen pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Die Fixierlösung wurde abgenommen und pro Napf 2 ml der DAPI-Lösung (vgl. 2.1.2.2) zugegeben und diese 5min im Dunkeln einwirken lassen. Die DAPI-Lösung wurde abpipettiert und die Deckgläschen vorsichtig zweimal mit ddH<sub>2</sub>O gewaschen. Die Deckgläschen wurden der 6-Napfplatte entnommen, auf einem Objektträger getrocknet und mit Hilfe des Einbettmediums der Firma Dako Corp. Zellseite nach unten auf dem Objektträger fixiert. Die Beurteilung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit einem UV-Licht-Filter (360/40 nm Absorption – 470/40nm Emission) bei 200 – 400facher Vergrößerung.<sup>41</sup>.



**Abbildung 1 - Test auf Mycoplasmen bei HaCaT-Zellen**

Die linke Abbildung ist die Überlagerung des folgenden licht- (mitte) bzw. fluoreszenzmikroskopischen (rechts) Bildes und verdeutlicht die Lokalisation der blaugefärbten Zellkerne nach Dapifärbung in HaCaT Zellen. Im Fluoreszenzbild auf der rechten Seite sind ausschließlich die Zellkerne blau gefärbt, was auf eine Abwesenheit von kontaminierenden intrazellulären Microorganismen z.B. Mycoplasmen schließen lässt. Die Aufnahmen erfolgten mit 200facher Vergrößerung und einen UV-Lichtfilter von 360/40nm Absorption – 470/40nm Emission.

### 2.2.2.6 transiente Transfektion von Eukaryonten-Zellen

Die Transfektion stellt eine Methode dar, durch Einbringen von mRNA bzw. DNA-Konstrukten in Zellen ein durch diese Nukleinsäuren kodierte Gen zu exprimieren. Man unterscheidet zwischen virusvermittelten und nichtviralen Transfektionstechniken. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich nichtvirale Transfektionsmethoden eingesetzt. Das eingeschleuste Gen wird mit Hilfe zelleigener Translations- bzw.

---

<sup>41</sup> Durch Verwendung eines Antifade-Reagenz kann das Ausbleichen des Farbstoffs verzögert werden; Verwendung ist aber nicht zwingend notwendig

## 2 - Material und Methoden

---

Transkriptionsmechanismen exprimiert (Wigler et al.; 1977). In der Regel handelt es sich, besonders bei nichtviralen Transfektionstechniken<sup>42</sup>, um einen temporären Vorgang, da die entsprechenden Nukleinsäuren durch zelleigene Mechanismen abgebaut oder bei Stammzellen und Zelllinien<sup>43</sup> zusätzlich während der Mitose ausgedünnt werden. Eine Integration von DNA in das Zellgenom und damit stabile Expression des eingebrachten Gens ist vorwiegend bei viralen Transfektionsmethoden zu erwarten.

### 2.2.2.6.1 Transfektion der hDC

Bei Dendritischen Zellen, die keiner Zelllinie entstammen, handelt es sich bereits um differenzierte Zellen, die keine Mitose mehr betreiben. Nicht proliferierende Zellen, wie die in dieser Arbeit eingesetzten, aus Monozyten generierten humanen DC, sind mit nichtviralen Transfektionsmethoden nur schwer zu transfizieren. Am aussichtsreichsten ist die Transfektion auf Basis einer Elektroporation. Bei diesem Verfahren wird während des aktiven Transfektionsprozesses temporär die Organisation der Zell- und möglicherweise auch der Kernmembran gestört. Dies führt für kurze Zeit zur Ausbildung von kleinen Löchern in der Membran, durch die die Plasmide eindringen können. DNA-Konstrukte, die direkt in den Zellkern gelangen, können erfolgreich transkribiert werden, Plasmide die nur das Cytoplasma erreichen, müssen über zelleigene Prozesse in den Kern gelangen, damit das kodierte Gen exprimiert werden kann.

Bei den beiden nachfolgenden Methoden zur Transfektion der hDC handelt es sich jeweils um Elektroporationen, die nach weitgehend identischem Protokoll durchgeführt wurden. Die Vorgehensweise wird zunächst allgemein beschrieben. Die Unterschiede zwischen beiden Verfahren werden in den Unterkapiteln 2.2.2.6.1.1 und 2.2.2.6.1.2 angesprochen.

Die humanen Dendritischen Zellen wurden am Kulturtag 9 geerntet. Dabei wurden die Zellen in Suspension aus allen Zellkulturplatten vereinigt und die Zellzahl bestimmt. Diese wurde auf  $1 \times 10^6$  DC / 800  $\mu$ l Medium eingestellt. Für einen Transfektionsansatz wurden  $1 \times 10^6$  Zellen benötigt, d.h. es wurden 800  $\mu$ l Zellsuspension pro 1,5 ml Reaktionsgefäß abgefasst und bis zu ihrer Verwendung in den Brutschrank zurückgestellt. Jedes untersuchte Konstrukt wurde mindestens in Triplikatansätzen eingesetzt. Die Transfektion

---

<sup>42</sup> wenn keine Selektionsbedingungen mit Neomycin (G418) und entsprechenden Vektoren durchgeführt werden

<sup>43</sup> die ihre Fähigkeit zur Teilung noch bzw. weiterhin besitzen



## **2 - Material und Methoden**

---

erfolgte in Zyklen, wobei maximal 6 Ansätze gleichzeitig bearbeitet wurden. Die entsprechend vorbereiteten Reaktionsgefäße wurden bei 500xg, 6 min, RT zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden mit 500µl 1x PBS gewaschen und erneut 6 min bei 500xg zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Transfektionspuffer resuspendiert (dem zuvor die benötigte DNA-Menge zugesetzt worden war) und der Ansatz in die Elektroporationsküvette überführt. Nach Durchführung der Elektroporation wurde 500 µl warmes Kulturmedium zugegeben, gemischt und die Zellsuspension in den Napf einer 12-Napf-Platte überführt, wo bereits 500 µl warmes Kulturmedium vorgelegt worden waren. Die transfizierten Zellen wurden 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Aufarbeitung und Auswertung des Experiments erfolgte wie unter 2.2.2.8 beschrieben.

### **2.2.2.6.1.1 Amaxa-Methode**

Die Transfektionsmethode der Firma Amaxa GmbH (Lenz et al.; 2003), Köln stellt die bislang beste Möglichkeit dar, Dendritische Zellen effizient mit Plasmid-DNA zu transfizieren. Das Verfahren basiert, wie unter 2.2.2.6.1 beschrieben, auf einer Elektroporation. Zusätzlich beinhaltet der Transfektionspuffer eine unbekannte Komponente, die einen Kerntransport vermittelt. Mit diesem Verfahren konnten unter Verwendung des CMV-Promotors Expressionseffizienzen von über 50 % erreicht werden. Für die Transfektion wurden 5µg des jeweiligen Fascin-Promotor-Konstrukts und 1/20 der Menge Koreporter (Expression CMV-Promotor vermittelt) eingesetzt. Zur Berücksichtigung von Größenunterschieden zwischen den einzelnen Konstrukten erfolgte eine äquimolare Gewichtung der DNA-Mengen.

### **2.2.2.6.1.2 Elektroporation der hDC**

Wie unter 2.2.2.6.1.1 angemerkt befindet sich im Transfektionspuffer der Firma Amaxa GmbH eine Komponente, die einen Kerntransport vermittelt. Da in der vorliegenden Arbeit selbst eine Methode zur Verbesserung des Kerntransports untersucht wurde, musste eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch diesen Bestandteil ausgeschlossen werden. Die Etablierung einer weiteren Elektroporationsmethode war deshalb geboten. Sowohl die Geräteparameter als auch die Zusammensetzung des Transfektionspuffers der Amaxa-Methode sind nicht bekannt, aber aufeinander optimiert. Die Nutzung des Amaxa-Gerätes ohne Verwendung des mitgelieferten Puffers führte zu keinem befriedigenden Ergebnis.

## 2 - Material und Methoden

---

Bei dem hier eingesetzten Verfahren wurde zur Induktion des Elektrischen Feldes bei der Elektroporation ein sog. Quadratpuls („Squareplus“) eingesetzt. Die eingestellten Geräteparameter waren: 2825V/cm bei einer Pulszeit von 0.23s. Für die Transfektion der hDC wurde einmal ein Quadratpuls appliziert. Verwendet wurde eine 2 mm-Elektroporationsküvette und ein Transfektionspuffer, der aus 50% (v/v) RPMI-Medium und 50% (v/v) ddH<sub>2</sub>O bestand. Die eingesetzte DNA-Menge der Fascin-Promotorkonstrukte betrug 10 µg und 1/20 der Menge Koreporter. Es erfolgte ebenfalls eine äquimolare Gewichtung der DNA-Mengen. Durch die Zumischung von ddH<sub>2</sub>O zum RPMI-Medium resultieren hypoosmolale Bedingungen, die die Zellen nur kurze Zeit tolerieren. Eine zügige Arbeitsweise war deshalb geboten.

### 2.2.2.6.2 Transfektion der XS106 Zellen – DEAE-Dextran-Methode

Für die Transfektion der murinen DC-Zelllinie XS106 wurde die DEAE-Dextranmethode eingesetzt. Das genaue Funktionsprinzip dieser Methode ist im Einzelnen noch nicht bekannt, jedoch wird ein ähnlicher Mechanismus wie bei einer Lipofektion (vgl. 2.2.2.6.3.2) diskutiert.

Die XS106-Zellen wurden bei einer Zelldichte von ca.  $1,5 \times 10^6$  pro ml geerntet und die gesamte erhaltene Zellsuspension aus den Kulturgefäßen zusammengeführt und homogen gemischt. Nach einer Zentrifugation bei 1500 rpm 10 min wurde der Überstand abgenommen und die Zellen gesamt mit 25 ml 1x PBS gewaschen. Nach genauer Bestimmung der Zellzahl wurden in Eppendorfreaktionsgefäßen ein Volumen, das  $1 \times 10^6$  Zellen entsprach, aliquotiert und die Reaktionsgefäße in den Brutschrank zurückgestellt. Die Transfektion erfolgte in mehreren Zyklen nacheinander, wobei immer 5 Ansätze parallel bearbeitet wurden. Fünf Reaktionsansätze wurde dem Brutschrank entnommen und 6 min mit 500xg RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen in dem nachfolgend beschriebenen Transfektionsvolumen resuspendiert. Die Transfektionen wurden für jedes untersuchte Konstrukt in Vierfach- bzw. Fünffachwerten durchgeführt. Pro Einzeltransfektion wurde 1 µg DNA der Fascin-Promotorkonstrukte und 50 ng Koreporter eingesetzt. Es erfolgte ebenfalls eine äquimolare Gewichtung der Konstrukte. Das Transfektionsvolumen für eine Einzeltransfektion betrug 1 ml serumfreies Medium. In einem Eppendorfreaktionsgefäß wurde die Hälfte des Volumens, in das die benötigte Menge DNA zugemischt worden war, vorgelegt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 25 µl DEAE-Dextran- und 20 µl Chloroquin-Stammlösung zu einem Volumen von 455 µl serumfreien Medium gegeben und gemischt. Beide

## 2 - Material und Methoden

---

Teilansätze wurden vereinigt und wie oben beschrieben das nach Zentrifugation erhaltene Zellpellet darin resuspendiert. Es schloss sich eine Inkubationsphase von 30 min bei RT an. Zur homogenen Durchmischung der Proben während dieses Zeitintervalls wurden die Proben auf ein Rad gegeben, das die Proben über Kopf mit ca. 100 rpm mischte. Nach Ende der Transfektionsphase wurden die Proben bei 500xg 6 min zentrifugiert und der Überstand komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml 37 °C warmem Waschmedium<sup>44</sup> resuspendiert und die Ansätze erneut bei 500xg 6 min zentrifugiert. Der gerade beschriebene Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt und das Zellpellet nach dem letzten Zentrifugieren in 500 µl warmem Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Napf einer 12 Napfplatte überführt, in den bereits 500 µl warmes Kulturmedium vorgelegt worden waren. Es schloss sich eine Inkubation der Transfektionsansätze bei 37 °C für 18 h an. Die weitere Aufarbeitung der Transfektionen ist unter 2.2.2.8 beschrieben.

### 2.2.2.6.3 Transfektion der HaCaT-Zelllinie

Zunächst wurde die HaCaT-Keratinozyten-Zelllinie mittels Calcium-Phosphat-Kopräzipitation transfiziert. Im Verlauf der Experimente wurde diese Methode aufgrund stark variierender Expressionseffizienzen durch die Lipofektion ersetzt.

#### 2.2.2.6.3.1 Ca-Phosphat-Kopräzipitation

Die HaCaT-Zellen wurden am Vorabend der Transfektion mit  $0,6 \times 10^6$  Zellen / Napf einer 6-Napfplatte ausgesät. Am anderen Morgen wurde das Kulturmedium abgenommen und durch neues ersetzt. Die Transfektion wurde in Triplikatansätzen durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5µg der Fascin-Promotor-Konstrukte und 1/20 der Menge Koreporter in 300 µl Transfektionsvolumen eingesetzt. Die Herstellung des Calciumphosphat-DNA-Kopräzipitats erfolgte für die Triplikatansätze gemeinsam, wobei die Menge für 3,5 Reaktionen zubereitet wurde. Die Hälfte des benötigten Volumens zur Transfektion bestand aus der 2xHBS-Lösung (vgl. 2.1.2.6), die andere Hälfte aus der DNA-Lösung der 10% (v/v) Calciumchlorid-Stammlösung zugemischt worden waren. Die DNA-Lösung wurde in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Durch Einblasen von Luft mit Hilfe der elektrischen Pipettierhilfe wurde die Lösung aufgewirbelt und mit einer Pipette die

---

<sup>44</sup> enthält 5 % FCS, mildert die Wirkung der Zentrifugationskräfte auf die durch die Transfektion bereits stark beanspruchten Zellen - erhöht dadurch die Viabilität der transfizierten Zellen

## 2 - Material und Methoden

---

2xHBS-Lösung zugetropft. Sobald die 2xHBS-Lösung vollständig zugegeben war, wurde der Ansatz zur Ausbildung des Präzipitats für eine halbe Stunde bei RT stehen gelassen. Unmittelbar vor der Transfektion wurde die Lösung homogen gemischt und das benötigte Volumen einer Reaktion direkt in das Medium eines Napfes der Zellkulturplatte getropft, wobei darauf geachtet wurde, dass die Lösung gleichmäßig über die gesamte Fläche verteilt war. Die Transfektionsansätze wurden für 5 Stunden im Brutschrank inkubiert. Nach Ende dieser Inkubationsphase wurde das Kulturmedium komplett entnommen und zur Verbesserung der Expressionseffizienz ein DMSO<sup>45</sup>-Schock ausgeführt. Dazu wurde pro Napf 1 ml Kulturmedium, das 10% DMSO enthielt, auf dem Zellrasen verteilt, 3 min inkubiert und danach 2ml 1xPBS-Lösung zupipettiert. Der Überstand wurde komplett entnommen, die Zellen erneut mit 3 ml 1xPBS gewaschen und dann 3 ml Kulturmedium zugegeben. Es folgte eine weitere Inkubationszeit im Brutschrank über Nacht für ca. 12h. Die Aufarbeitung und Auswertung der Transfektion wurde wie unter 2.2.2.8 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.2.6.3.2 Lipofektion – GenePorter-Reagenz

Bei der Lipofektion werden die DNA, RNA oder Proteinmoleküle zunächst in Liposomen eingekapselt. Liposomen sind vesikelartige Gebilde, die ähnlich wie die Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht bestehen. Bei der Transfektion unter Zuhilfenahme von Liposomen erfolgt die Aufnahme der Nukleinsäuren, in dem bei Kontakt mit den zu transfizierenden Zellen die Membran der Liposomen mit deren Zellmembran fusioniert. Die Nukleinsäuren gelangen auf diese Weise direkt in das Cytoplasma. Eine andere Möglichkeit besteht in der Aufnahme der Vesikel durch Endozytose (Matsui et al. 1997). Der liposomale Inhalt liegt dann zunächst endosomal – lysosomal vor und muss dieses Kompartiment zunächst verlassen (Zabner et al. 1995). Die freigesetzte DNA muss dann, wie bei den meisten anderen Transfektionen auch, aus dem Cytoplasma durch die Kernporen in den Zellkern transportiert werden. Wie diese Aufnahme im Einzelnen erfolgt, ist noch weitgehend unbekannt.

Das verwendete Transfektionsreagenz war das GenePorter II Reagenz der Firma GeneTherapy Systems. Die HaCaT-Zellen wurden für die Transfektion am Vorabend in 24 Napfplatten mit einer Zelldichte von  $1,2 \times 10^5$  Zellen pro Napf ausgesät. Die Ansätze wurden in Triplikaten durchgeführt, wobei für jede Transfektion 1 µg DNA der Fascin-

---

<sup>45</sup> Dimethylsulfoxid

## 2 - Material und Methoden

---

Promotorkonstrukte und 50 ng Koreporter eingesetzt wurden. Der Transfektionsansatz wurde für die drei Reaktionen zusammen angesetzt, wobei die Menge für 3,2 Reaktionen vorbereitet wurde: Für eine Einzeltransfektion im 24 Napf-Maßstab wurden 250 µl Transfektionslösung benötigt. Dazu wurde in ein Eppendorfreaktionsgefäß die Hälfte des benötigten Volumens serumfreies Medium vorgelegt, in dem die entsprechende Menge DNA zugemischt worden war. Parallel dazu wurde ein zweites Reaktionsgefäß vorbereitet, das die andere Hälfte des erforderlichen Volumens serumfreies Medium nebst der in Vorversuchen herausgefundenen optimalen Menge an Transfektionsreagenz enthielt. Für HaCaT-Zellen wurden pro Einzelreaktion 8 µl des Transfektionsreagenzes eingesetzt. Beide Ansätze wurden gemischt und zur Ausbildung der Liposomen bzw. Einkapselung der DNA die entstandene Mischung 40 min bei RT inkubiert. Nach Ende der Inkubationsphase wurde die Transfektionslösung gemischt und direkt auf die adhären wachsende Zellschicht gegeben. Das Kulturmedium in den einzelnen Näpfen der Zellkulturplatte war zuvor komplett abgenommen worden. Die Transfektionsansätze wurden dann für 5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 5 h wurde pro Napf 2 ml Kulturmedium mit 10% FCS zugegeben, um die Viabilität der während der Transfektion serumfrei gehaltenen Zellen zu sichern. Es erfolgte eine weitere Inkubationsphase für ca. 18 h. Die Aufarbeitung und Auswertung der Transfektion wurde wie unter 2.2.2.8 beschrieben durchgeführt.

### 2.2.2.7 Durchflusscytometrie & Immunfluoreszenz

Alle durchflusscytometrischen Analysen wurden mit einem FACS<sup>®46</sup> Calibur der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Mit Hilfe der Durchflusscytometrie kann mit hoher Sensitivität und quantitativ die Expressionsstärke eines Proteins auf Einzelzellebene untersucht werden (Loken und Stall, 1982). Damit das Protein detektiert werden kann, muss es in den meisten Fällen zunächst durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden. Die Markierung erfolgt in der Regel antikörpervermittelt, d.h. das nachzuweisende Protein wird spezifisch durch einen Antikörper erkannt, an den entweder bereits der Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, oder der eine Funktion als Primärantikörper ausübt. Der Primärantikörper wird dann in einem weiteren Schritt von einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper gebunden und auf diese Weise das Fluorochrom dem Protein auf der Zelle zugeordnet. Eine Ausnahme stellt das als

---

<sup>46</sup> FACS<sup>®</sup> = fluorescence activated cell sorter – Fluoreszenz aktiviertes Zell-Sortiergerät, Cytofluorometer

## 2 - Material und Methoden

---

Reportergen eingesetzte EGFP oder dessen Derivate dar, die zellulär exprimiert werden und bereits selbst fluoreszierende Proteine sind. Sie können in der durchflusscytometrischen Analyse direkt aufgrund ihrer Fluoreszenzeigenschaften detektiert werden. Für die Messung müssen die markierten Zellen als Zellsuspension vorliegen, die dann einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt werden. Der Laserstrahl liefert die nötige Energie zur Anregung des Fluorochroms und die Intensität der resultierenden Fluoreszenzemission wird gemessen. Neben der Detektion der Intensität des eingeführten Fluorochroms können durch Streuungs- und Absorptionseigenschaften der Zellen im Laserlicht auch Parameter wie Zellgröße und –granularität bestimmt werden.

Für den Nachweis der EGFP-Expression wurden die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml FACS<sup>®</sup>-Medium gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 300 µl FACS<sup>®</sup> FIX II aufgenommen, das 0,7% (v/v) Paraformaldehyd enthielt. Die Zellen wurden dadurch fixiert, das exprimierte Fluoreszenzprotein fester mit der jeweiligen Zelle verbunden und konserviert. Die so behandelten Zellen konnten bis zu 14 Tage mit dem FACS<sup>®</sup> analysiert werden.

Für den Nachweis der auf der Zelloberfläche lokalisierten Proteine wurde nachfolgendes Protokoll eingesetzt: Die Zellen wurden geerntet und die einzelnen Ansätze in Eppendorfreaktionsgefäße überführt. Nach Zentrifugation bei 500xg 6 min wurde das überstehende Zellkulturmedium abgenommen und das Zellpellet in 50 µl FACS<sup>®</sup>-Medium resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe des entsprechenden spezifischen Antikörpers zu der Zellsuspension, wobei in der Regel die Stammlösung 1 : 100 verdünnt wurde (pro Nachweisreaktion wurden ca.  $4 \times 10^5$  Zellen und ca. 250 ng Antikörper-Protein eingesetzt). Nach einer Inkubationsphase von 30 min im Dunkeln bei RT wurden 300 µl FACS<sup>®</sup>-Medium zupipettiert und der Ansatz bei 500xg 6min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das resultierende Zellpellet mit 400 µl FACS<sup>®</sup>-Medium gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen zur Fixierung und Konservierung des Farbstoffs in 300 µl FACS<sup>®</sup>-FIX II-Lösung resuspendiert. Für den Fall dass die Markierung der Zellen mit dem Fluorochrom durch einen Sekundärantikörper erfolgte, wurden die Zellen nach dem Waschen erneut in 50 µl FACS<sup>®</sup>-Medium aufgenommen, der Sekundärantikörper im gleichen Verdünnungsverhältnis, wie oben beschrieben, zugesetzt und für weitere 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Entfernung ungebundenen Sekundärantikörpers zur Reduktion unspezifischer

## 2 - Material und Methoden

---

Hintergrundfluoreszenz wurde analog wie nach der Markierung mit einem bzw. dem Primärantikörper vorgenommen. Final wurde auch hier das Zellpellet in 300 µl FACS<sup>®</sup>-FIX II aufgenommen.

Alle FACS<sup>®</sup>-Proben wurden bis zur Messung bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

### 2.2.2.8 Auswertung transient transfizierter Zellen

#### 2.2.2.8.1 Dual-Luziferasetest

Die Detektion der Luziferaseexpression in Zellen, die mit den entsprechenden Reportergenkonstrukten transfiziert worden waren, erfolgte unter Verwendung des „Dual Luziferase Assay Kit“ (Sherf, B. et al.; 1996) der Firma Promega. Das System erlaubt nacheinander die Bestimmung zweier verschiedener Luziferasen<sup>47</sup> einer Probe im selben Reaktionsgefäß. Das zugrunde liegende Prinzip ist die Messung der Enzymaktivität der jeweiligen Luziferase (de Wet et al.; 1985; Lorenz et al.; 1991), die ihr Substrat unter Decarboxylierung und Freisetzen von Lichtenergie umsetzt. Dabei wird der zu analysierenden Probe Substratlösung in großen Überschuss zugesetzt, so dass die Reaktionsgeschwindigkeit nur noch von der Konzentration der Luziferase in der Probe abhängig ist. Die Messung erfolgt in einem Luminometer und erfasst integrativ die gebildete Lichtmenge über einen vorgegebenen Zeitraum. Die Bestimmung von zwei Luziferasen in einer Probe ermöglicht die Kotransfektion dieser beiden Reportergene, wobei die zweite Luziferase die Funktion eines internen Standards (Koreporter) besitzt. Der Vorteil hierbei besteht in der Normalisierung von Expressionsunterschieden, resultierend aus der Transfektion, durch Bildung des Quotienten aus den beiden Messergebnissen.

Die Aufnahme der Zellen erfolgte in einem entsprechenden Lysepuffer, der zuvor aus dem 5fach konzentrierten PLB-Puffer<sup>48</sup> durch Verdünnen mit ddH<sub>2</sub>O hergestellt worden war. Für Transfektionsansätze im 24 Napf-Format (HaCaT) bzw. 12 Napf-Format wurden jeweils 60 µl, für 6-Napfplatten 300 µl dieses Puffers eingesetzt. Bei adhärennten Zellen wurde das Medium abgenommen, zweimal der Zellrasen mit 1xPBS gewaschen und die entsprechende Menge Lysepuffer zugesetzt. Es folgte eine Inkubationsphase von 15 min auf einem horizontalen Plattenmischer bei 50rpm. Im Anschluss wurden die lysierten

---

<sup>47</sup> Photinus-Luziferase, Substrat: Luziferin; Renilla-Luziferase, Substrat:Coelenterazin

<sup>48</sup> PLB-Puffer – passive Lysis Puffer

## 2 - Material und Methoden

---

Zellen mit einem Zellspatel abgeschabt, mitsamt des Lysats in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert. Suspensionskulturen (hDC, XS106) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, bei 500xg 6min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Auch diese Zellen wurden zweimal mit 1xPBS gewaschen und das Zellpellet in 60 µl Lysepuffer aufgenommen. Es erfolgte eine Inkubationsphase von 15 min auf dem Eppendorf Thermomixer bei 300 rpm, RT. Die Ansätze wurden bei -20°C gelagert. Zur Detektion der Luziferaseaktivität wurden die Proben aufgetaut, homogen gemischt und zur Entfernung von Zellresten 2 min bei 500xg zentrifugiert. Von jedem einzelnen Probenansatz wurden 20 µl in eine Luminometerplatte vorgelegt und diese in den Luminometer gestellt. Die Messung wurde durch Injektion von 100 µl (5fache Menge der Probelösung) Photinus-Substrat-Lösung gestartet. Zur Durchmischung von Probe und Substratlösung wurde 2 s gewartet, danach wurde die Enzymaktivität als Lichtemission in RLU<sup>49</sup> über ein Intervall von 10 s gemessen. Die Bestimmung der Renilla-Luziferase erfolgte durch Injektion von 100µl Renilla-Luziferasesubstrat-Lösung, 1s Inkubationsdauer und anschließender Messzeit über 10s. In der Renilla-Luziferasesubstratlösung ist zusätzlich eine Komponente enthalten, die die Photinus-Luziferase inaktivierte, so dass ausschließlich Lichtemission der zweiten Luziferase gemessen wurde.

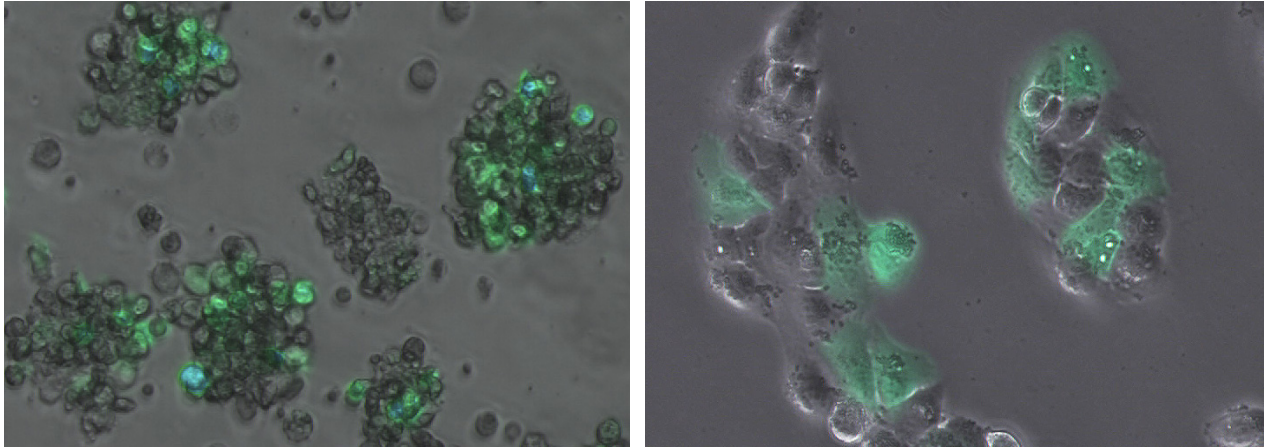
### 2.2.2.8.2 Nachweis der EGFP-Expression

Zellen, die mit entsprechenden EGFP-Reportergenkonstrukten transfiziert worden waren, wurden zum Nachweis der EGFP-Expression zunächst mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Zur besseren Quantifizierung der EGFP-pos. Zellen wurde 24 h nach erfolgter Transfektion die Analyse mit dem Cytofluorometer (vgl. 2.2.2.7) durchgeführt. Die Auswertung mittels Fluoreszenzmikroskop wurde direkt aus der Zellkulturplatte bei 100 – 200facher Vergrößerung vorgenommen. Von der Probe wurden jeweils zwei Aufnahmen gemacht: zunächst eine Durchlichtaufnahme zur Lokalisation der Zellen und dann eine Aufnahme unter Fluoreszenzanregung (480/40nm) und entsprechendem Filtersystem (527/30 nm) zur Detektion der EGFP-exprimierenden Zellen. Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch eine solche Aufnahme.

---

<sup>49</sup> RLU – relative light units – relative Lichteinheiten





**Abbildung 2 - Expressionseffizienz in Säugerzellen**

Die beiden Abbildungen zeigen die Expressionseffizienz in hDC (links) und HaCaT (rechts) nach Transfektion eines EGFP-Plasmids. Die Aufnahmen erfolgten bei 200facher Vergrößerung mit dem Lichtmikroskop und unter Verwendung eines Fluoreszenzbandfilters von 527/30 nm. Zur Lokalisation der EGFP-exprimierenden Zellen wurden die Fluoreszenzbilder jeweils mit der entsprechenden lichtmikroskopischen Aufnahme überlagert.

### 2.2.2.9 MTT-Test

Mit dem MTT-Test (Mosmann, 1983) lassen sich Aussagen über die Viabilität und Proliferationsrate von kultivierten Zellen treffen. Das zugrunde liegende Prinzip basiert auf der oxidativen Umsetzung eines zunächst schwachgelblichen Farbstoffs, dem MTT<sup>50</sup>, zu einem intensiv blauen, wasserunlöslichen Präzipitat. Die Umsetzung wird von mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen bewirkt, die bei sich in Teilung befindlichen Zellen besonders aktiv sind. Durch lichtmikroskopische Betrachtung der Zellen kann die Akkumulation des Farbstoffs verfolgt werden und auch, ob alle Zellen eines Ansatzes gleichmäßig den Farbstoff umsetzen. Nach Ende der Inkubationszeit, i. d. R. nach 2 – 4 h, wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die entstandenen MTT-Kristalle in 100 µl Isopropanol<sup>51</sup> gelöst. Die Quantifizierung des umgesetzten MTT erfolgte kolorimetrisch mit dem Spektrophotometer bei einer Wellenlänge von 570 nm. Der MTT-Test wurde in der vorliegenden Arbeit zur Abschätzung der Toxizität verschiedener pharmakologischer Inhibitoren eingesetzt. Als Referenz dienten unbehandelte Zellen, die ansonsten aber unter gleichen Bedingungen kultiviert worden waren.

Für die murine Zelllinie XS106 wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer Mikrotiterplatte in 100 µl Kulturmedium mit 5% FCS ausgesät. Am darauf folgenden Tag, ca. 12 h später,

---

<sup>50</sup> MTT – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

<sup>51</sup> enthält 5% Ameisensäure zur pH-Wertänderung (Phenolrot aus dem Medium färbt sich gelb)

## 2 - Material und Methoden

---

wurde die zu testende Konzentration des pharmakologischen Inhibitors in einem Volumen von 100 µl Zellkulturmedium dem jeweiligen Ansatz zugegeben und entweder für 7h, 24h oder 72h im Inkubator kokultiviert. Nach der Inkubationsphase wurde die Platte bei 1250rpm, 4min zentrifugiert und 100 µl des Überstandes abgenommen. Es erfolgte die Zugabe von 10 µl / Napf einer 0,5%igen MTT-Lösung. Nach zwei Stunden wurde durch Zugabe von 100 µl Isopropanol die Umsetzung des MTT gestoppt und das Auflösen der Kristalle bewirkt. Die Detektion erfolgte wie oben beschrieben.

Bei der SP37A3-Zelllinie wurden  $0,8 \times 10^5$  Zellen pro Napf einer Mikrotiterplatte in 180 µl Kulturmedium ausgesät. Das Kulturmedium enthielt neben 10 ng / ml murinem GM-CSF die Reifungszytokine TNF- $\alpha$  (10ng/ml) und IL-1 $\beta$  (10ng/ml). Direkt nach der Aussaat wurde in einem Volumen von 20 µl die zu testende Konzentration des Inhibitors zugegeben und für drei Tage kokultiviert. Wenn der Inhibitor nicht die gesamte Zeit im Ansatz verblieb, erfolgte die Inhibitorzugabe im Kulturmedium ohne Zytokinzusatz. Nach längstens 11/2 h wurde der Überstand dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 500xg, 6 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Reaktionsgefäß mit 100 µl Kulturmedium (+ Zytokinzusatz) gespült und diese Lösung in die entsprechende Vertiefung der Mikrotiterplatte überführt, die unmittelbar nach Abnehmen des Überstands ebenfalls mit 100 µl Kulturmedium befüllt worden war. Nach Ablauf der 72h Koinkubation wurden 10 µl der 0,5 %igen MTT-Lösung pro Ansatz zupipettiert und für 4 weitere Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach Zentrifugation der Platte bei 1250rpm, 5min wurde der Überstand abgenommen, 100 µl Isopropanol zugegeben und die MTT-Kristalle gelöst. Die Detektion erfolgte kolorimetrisch, wie oben beschrieben.

### 2.2.3 Statistik

Die Prüfung auf Signifikanz zwischen den Transfektionsansätzen einzelner Konstrukte wurde, da es sich um normalverteilte Populationen handelte, mit dem Student's t-Test durchgeführt. Die Analyse mit dem Student's t-Test erfolgte als gepaarter zweiseitiger Test. Die Rechenoperationen wurden mit dem Programm Windows EXCEL professionel Version 2004 ausgeführt. Es wurde ein Konfidenzintervall von 95% zugrunde gelegt, d.h. erhaltene p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung des Modellsystems hDC

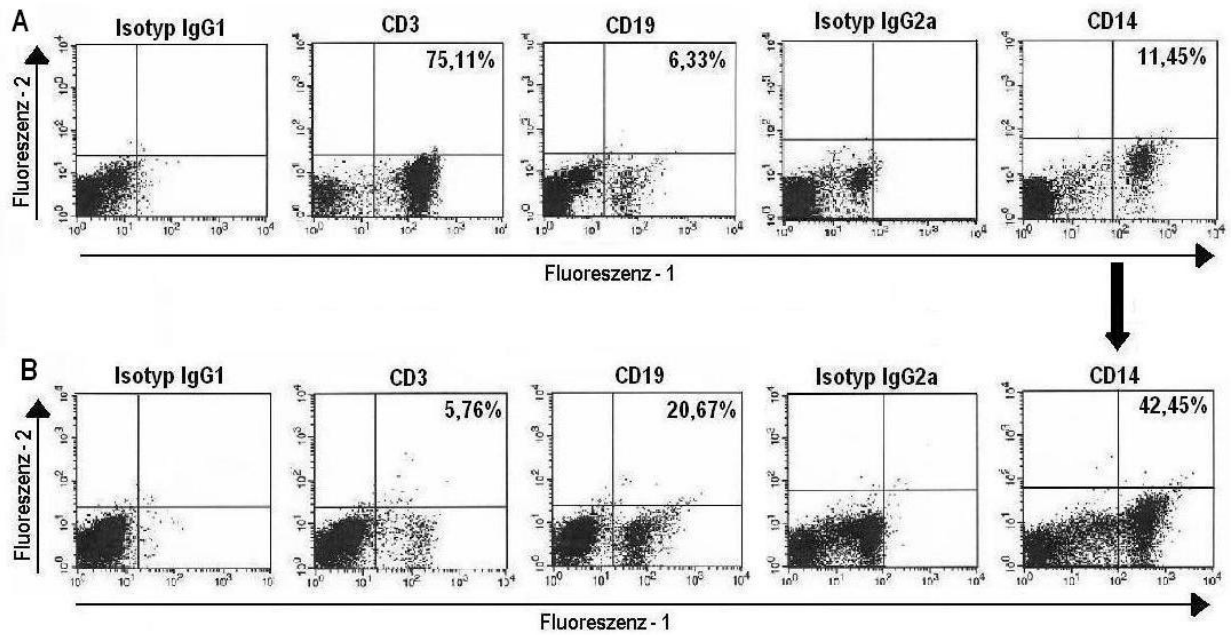
##### 3.1.1 PBMC-Isolierung, Anreicherung der Monozyten

CD14+ Blutmonozyten dienen als Ausgangsmaterial zur Generierung der hDC. Diese mussten durch Präparation aus BuffyCoats<sup>52</sup> gewonnen werden. Ziel war es, möglichst ausschließlich Monozyten zu isolieren und die anderen vorhandenen Blutzellen abzutrennen. Wie unter 2.2.2.4 beschrieben, wurde ein Verfahren auf Basis eines Ficoll-Gradienten eingesetzt. Diese Methode erlaubt die Abtrennung von PBMC aus Vollblut bzw. BuffyCoats. Die PBMC stellen ein Gemisch aus T- und B-Lymphozyten, Monozyten und wenigen im Blut vorhandenen dendritischen Zellen dar. Die Zusammensetzung der PBMC nach ihrer Isolierung wurde anhand von Antikörperfärbungen gegen CD3- (anti-T-Zellen), CD19 (anti-B-Zellen)- und CD14 (anti-Monozyten/Makrophagen)-Oberflächenproteine, gekoppelt an den Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) und anschließende Analyse mit dem Cytofluorometer dokumentiert. (vgl. Abbildung 3A). Die gewonnenen PBMCs wurden gewaschen und für einen sich anschließenden Adhärenzungsschritt in 6-Napf-Platten ausgesät. Dabei wurde die Eigenschaft der Monozyten, temporär an der Plastikoberfläche der 6-Napf-Platten zu haften, ausgenutzt. Nach Abspülen der im Überstand befindlichen Zellen (vornehmlich Lymphozyten), erreichte man auf diese Weise eine Aufkonzentrierung der Monozyten. Nach dem Adhärenzungsschritt wurde erneut mit den Antikörpern CD3-, CD19-, CD14-FITC die prozentuale Zusammensetzung der Probe bestimmt. Ein Vergleich der Diagramme für CD14 vor und nach dem Adhärenzungsschritt zeigte eine ca. vierfache Anreicherung der Monozyten (vgl. Abbildung 3B). Die Einzelgraphiken sind jeweils logarithmisch, Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2 dargestellt.

---

<sup>52</sup> Blutprodukt, gewonnen aus einer Blutspende von 500 ml, das Blutplasma ist weitgehend entfernt, die zellulären Bestandteile sind dadurch angereichert

### 3 - Ergebnisse



**Abbildung 3 - Quantitative Zusammensetzung PBMC - A) vor und B) nach Adhärenz**

Dokumentation der prozentualen Zusammensetzung der PBMC nach Aufreinigung mit Histopaque® (Sigma Aldrich, Taufkirchen) – **A** und nach 2-stündiger Adhärenz am Plastikmaterial der Zellkulturplatten – **B**. Cytofluorometrische Analyse mit CD3-, CD14-, CD19- und IgG1- bzw. IgG2a-FITC-Antikörpern, (Dako Corp., Carpinteria, CA) unter Verwendung eines FACSCalibur® (Becton Dickinson, San Jose, CA), logarithmische Darstellung Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2. Der Vergleich der beiden Diagramme für CD14 lässt eine Aufkonzentration der Monozyten um ca. das Vierfache erkennen.

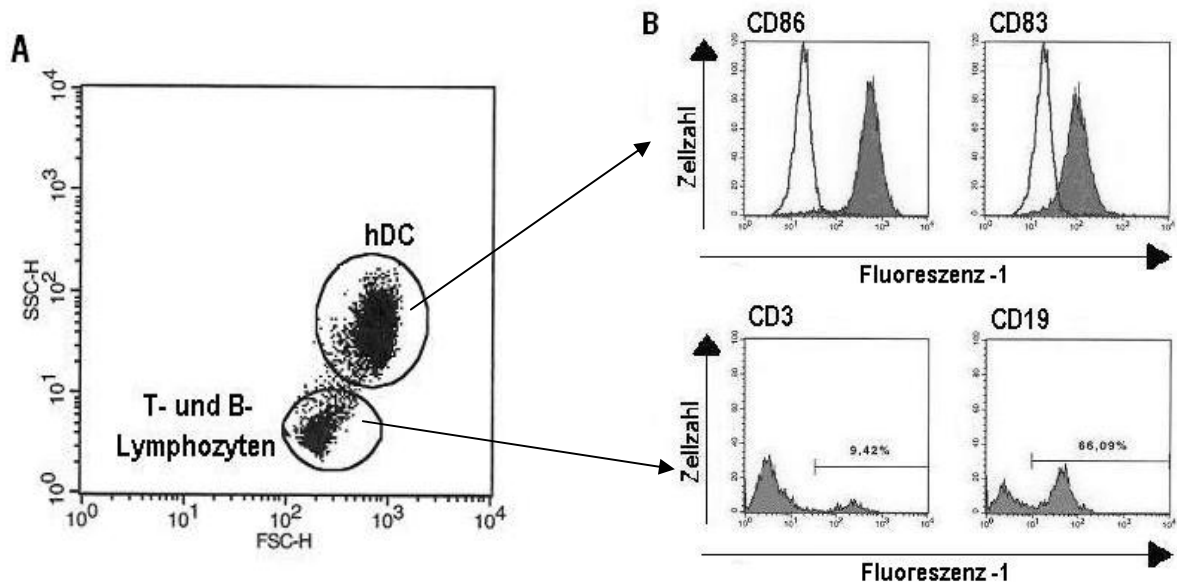
#### 3.1.2 Zusammensetzung der Präparation am Kulturtag 9 (Transfektionszeitpunkt), Reifegrad der hDC

Abbildung 4A zeigt die in der Präparation vorhandenen Zellpopulationen am Kulturtag 9 (Transfektionszeitpunkt) in der Darstellung SSC gegen FSC der Analyse mittels Cytofluorometer. Die Identität der verschiedenen Zelltypen wurde durch Immunfluoreszenz gegen Oberflächenproteine, die spezifisch (bzw. charakteristisch) auf den jeweiligen Zelltypen exprimiert werden, bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die stärker granuläre Population<sup>53</sup> den Dendritischen Zellen (CD86+ und CD83+) entspricht, die darunter lokalisierte, andere Population vorwiegend aus in der Präparation verbliebenen T (CD3+)- und B (CD19+)-Lymphozyten besteht. Das Verhältnis zwischen den beiden Populationen beträgt im Mittel 4:1, d.h. es verbleiben ca. 20 % Lymphozyten in der Präparation. Gleichzeitig lässt sich an der deutlichen Verschiebung zwischen Isotyp und spezifischer CD83- bzw. charakteristischer CD86-Färbung (FL1) in den Histogrammen

<sup>53</sup> jene, die weiter in Richtung des Parameters SSC verschoben ist

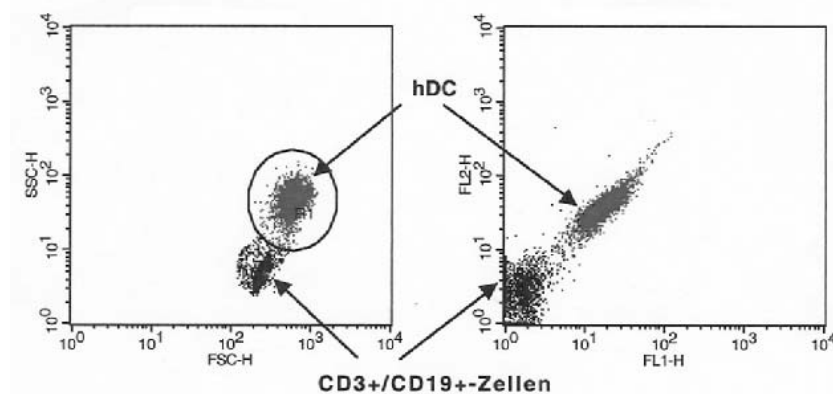
### 3 - Ergebnisse

der Abbildung 4B zeigen, dass die generierten Dendritischen Zellen am Kulturtag 9 die entsprechenden Oberflächenproteine stark exprimieren. Die Expression dieser Proteine kann mit dem Reifegrad der hDC (Zhou et al.; 1995) korreliert werden. Eine starke Expression lässt auf eine annähernd vollständige Ausreifung der hDC schließen.



**Abbildung 4 - Populationen in der hDC-Präparation am Tag 9 und Reifegrad der hDC**

**A:** Präparation am Kulturtag 9 (hDC und T- bzw. B-Lymphozyten) in der Darstellung SSC gegen FSC nach Analyse mit dem Cytofluorometer. **B oben:** Histogramm-Darstellung der Expression der Oberflächenmarker CD86 und CD83 gegen Isotyp IgG1 (korreliert mit Reifegrad der DC), **B unten:** Anteil der in der Präparation verbliebenen T- und B-Lymphozyten (nachgewiesen durch Cytofluorometrie gegen die Oberflächenproteine CD3 bzw. CD19)



**Abbildung 5 - Autofluoreszenz der hDC**

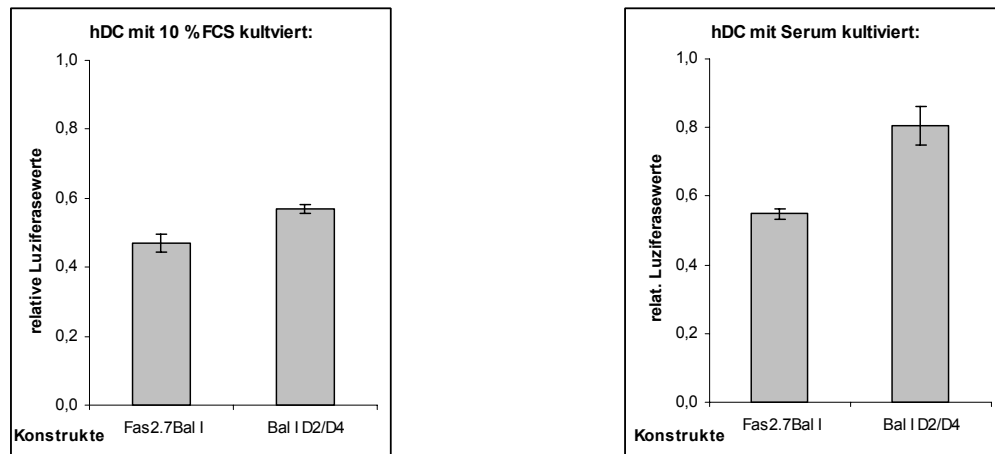
links: hDC-Präparation Kulturtag 9, in der Darstellung SSC gegen FSC, halblogarithmisch – rechts: Verschiebung der hDC Population in Richtung FL-1 (Fluoreszenz 1) bzw. FL-2 (Fluoreszenz 2) aufgrund ihrer Autofluoreszenz, logarithmische Darstellung

### 3.1.3 Serum als kritische Komponente der hDC Generierung

Die Generierung der hDC erfolgte über einen Zeitraum von neun Tagen. Zur Kultur der isolierten Monozyten musste Serum (u. a. als Quelle von Wachstumsfaktoren) zugesetzt werden. Die geplanten Promotoranalysen sind vom Reifestatus der DC stark abhängig. Das zugesetzte Serum sollte die Ausreifung der hDC möglichst gut unterstützen. Für die Kultur kommen humanes Serum und fötales Kälberserum (FCS) in Frage. Um potentielle Unterschiede zwischen den beiden Seren nachzuweisen, wurde die Expressionstärke von zwei transfizierten Fascinpromotor-Konstrukten bestimmt. Die Quantifizierung der Expression erfolgte über die Aktivität der nachgeschalteten Luziferase. Der theoretische Ansatz wäre die Überprüfung des Reifegrades der hDC mittels des Oberflächenmarkers CD83. Zur Quantifizierung von Expressionsunterschieden, bedingt durch den Einfluss des Serums, war der Reportergentest aber die geeignetere Methode. Der Unterschied in der Expression verschiedener Fascin-Konstrukte fiel bei den Zellen, die mit 2% Serum kultiviert wurden, deutlicher aus, verglichen mit den DC, die unter Verwendung von 10 % FCS generiert worden waren. Das humane Serum, gewonnen aus einer Vollblutkonserve, schien in seiner Zusammensetzung besser für die Generierung der hDC geeignet zu sein. Aus Gründen der Standardisierbarkeit wurde auf die Verwendung von autologem Serum aus demselben BuffyCoat eines Spenders verzichtet, da hierbei auch individuelle Qualitätsunterschiede zu erwarten waren.

### 3 - Ergebnisse

---



**Abbildung 6 - hDC-Kultur mit FCS bzw. Blutserum, Expression der Fascinpromotor-Konstrukte**

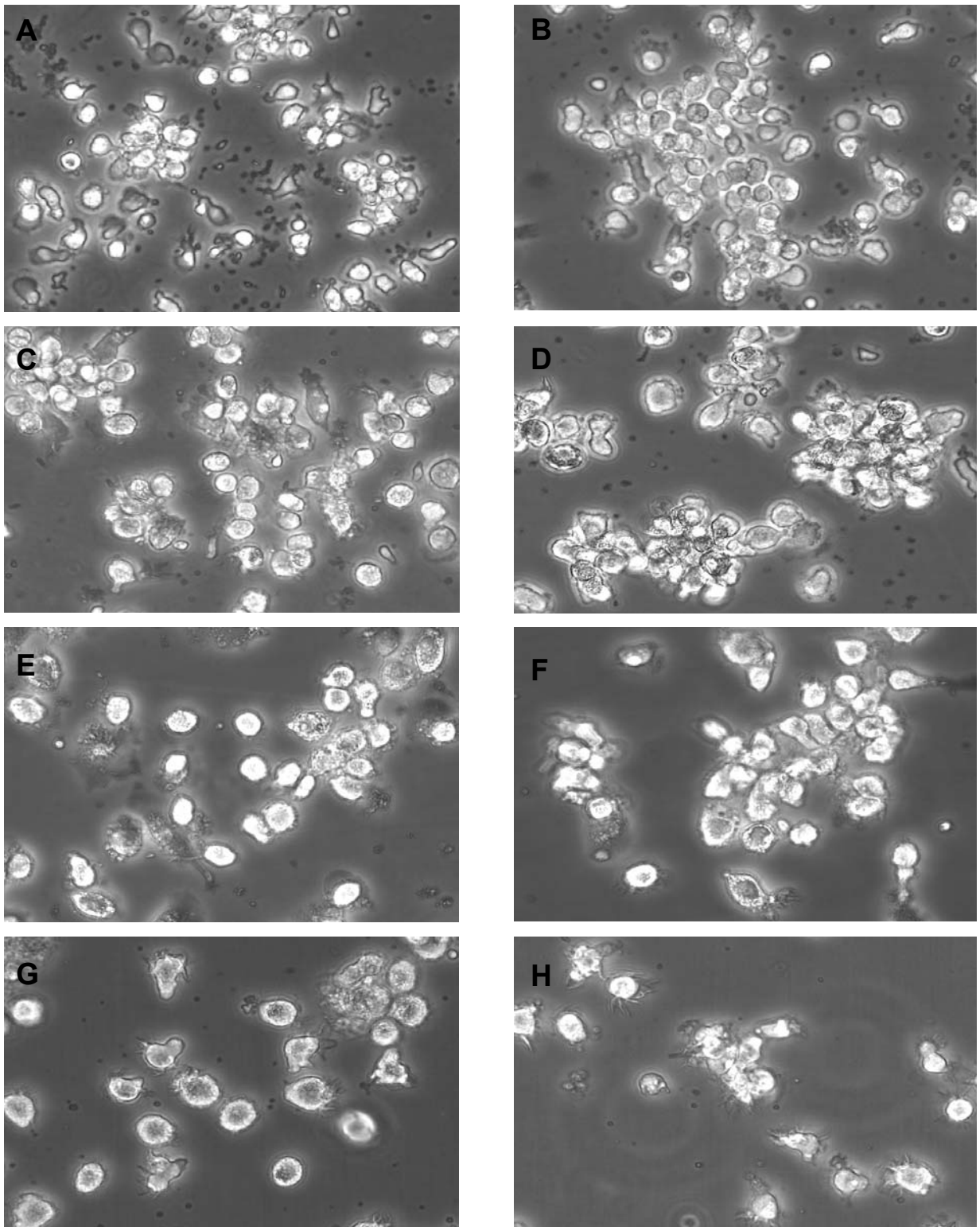
Die Abb. zeigt die Unterschiede in der Luciferaseexpression zwischen dem Fascin2.7Bal-Konstrukt<sup>54</sup> als Basis und BalID2D4, das zusätzlich eine Promotorduplikation trägt. Das Experiment wurde jeweils in Triplikatwerten ausgeführt. Die Unterschiede zwischen den Konstrukten fallen bei der Kultivierung mit Blutserum deutlicher aus.

#### 3.1.4 Dokumentation Differenzierung / Ausreifung der hDC:

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen die morphologischen Veränderungen der Generierung von DC ausgehend von CD14+-Monozyten aus Buffy Coats mit 2% humanem Serum über den Verlauf von 9 Tagen. Beginnend mit Tag 2 sieht man zunächst, dass die adhärenierten Monozyten unter Stimulation der Reifungscytokine IL-4 bzw. GM-CSF sich vom Plastikmaterial der Zellkulturplatte lösen und ihre makrophagenartige Struktur wieder verlieren. Die Zellen zeigen zunächst wieder die abgerundete Form von Suspensionszellen. Im weiteren Verlauf über die Tage 3 bis 5 nehmen die Zellen an Größe zu und zeigen die Ausbildung erster dendritischer Fortsätze (Tag 6). Mit der Zugabe des Ausreifungsmixes am Tag 7 kann man eine deutliche morphologische Veränderung der Zellen feststellen: es kommt zur Ausbildung vieler neuer Dendriten und die Zellen zeigen von Tag 7 bis 9 immer ausgeprägter den Phänotyp ausgereifter Dendritischer Zellen, der schließlich am Tag 9 für die meisten der kultivierten Zellen gegeben ist.

---

<sup>54</sup> Fascin2.7Bal ist ein 5'deletiertes Fascin-Promotorkonstrukt, das als Basis bei der Untersuchung verschiedener Promotorduplikationen z.B. Bal D2D4) eingesetzt wurde, detailliertere Informationen finden sich unter 3.5.1 bzw. 3.5.2



**Abbildung 7 - Dokumentation Differenzierung / Ausreifung der kultivierten hDC**

Lichtmikroskopische Aufnahmen (200fache Vergrößerung) im Verlauf der Kultivierung und Differenzierung humaner Dendritischer Zellen aus CD14+-Blutmonozyten, beginnend mit Tag 2 (vgl. Abb. 6A) dokumentiert bis zum Tag 9 (vgl. Abb. 6H) unter Zugabe von 2 % Blutserum. Es lässt sich eine Größenzunahme der heranreifenden Zellen und auch die Ausbildung vieler neuer Dendriten, vor allem nach Induktion der Ausreifung am Tag 7, feststellen.

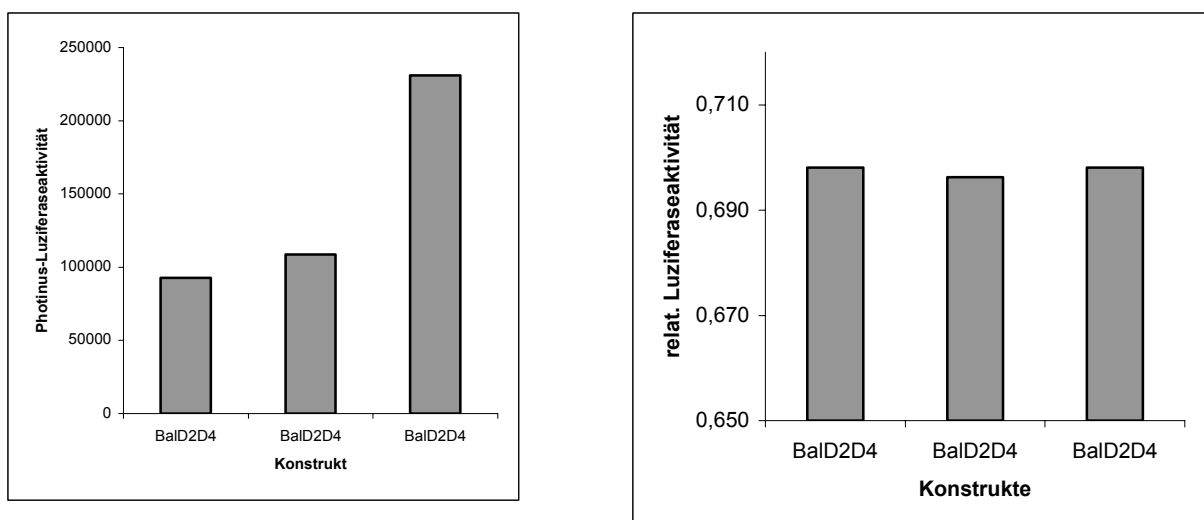


## 3.2 Experimente im Rahmen der Etablierung des Reportergentests

### 3.2.1 Kotransfektion zweier Plasmide zur Nivellierung von Expressionsunterschieden

Da bei einer Transfektion nicht alle Zellen in gleichem Maße in der Lage sind, das transfizierte Gen zu exprimieren, kommt es zwangsläufig zu größeren Expressionsunterschieden. Eine Methode, die zur Standardisierung der Expressionseffizienz bei den nachfolgenden Experimenten angewandt wurde, ist die Kotransfektion eines zweiten Plasmids. Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass, wenn ein Plasmid in die Zelle gelangt, i. d. R. auch beide Plasmide aufgenommen werden. Durch Bildung eines Quotienten aus den Expressionseffizienzen der beiden plasmidkodierten Gene können transfektionsbedingte Unterschiede normalisiert werden. Unabhängig davon muss durch eine ausreichende Anzahl von Mehrfachwerten überprüft (gewährleistet) werden, dass der resultierende Mittelwert sich in möglichst engen Fehlergrenzen bewegt und somit glaubwürdige Ergebnisse erhalten werden.

In der nachfolgenden Abbildung ist auf der linken Seite die Luziferaseaktivität von drei gleichen Ansätzen einer Probe dargestellt, die deutlich unterschiedlich zueinander sind. Die Graphik auf der rechten Seite zeigt die Nivellierung transfektionsbedingter Expressionsunterschiede durch Kotransfektion einer zweiten Luziferase und Bildung des Quotienten aus beiden Aktivitäten.



**Abbildung 8 - Normalisierung transfektionsbedingter Expressionsunterschiede**

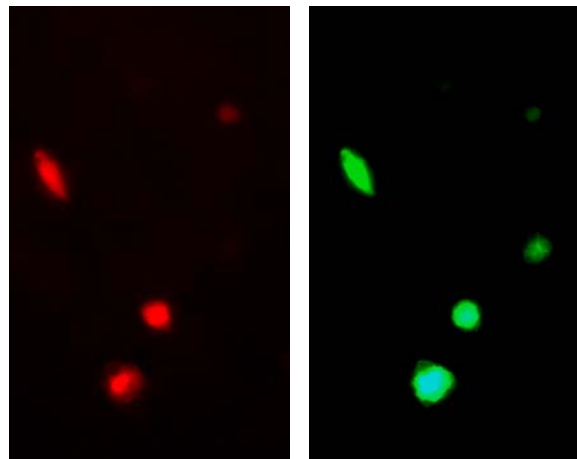
durch Kotransfektion einer zweiten Luziferase. Exemplarisch für die 3 Einzelwerte eines Expressionskonstrukts sind die Photinus-Luziferaseaktivität (links) und die Quotienten nach Division durch die kotransfizierte Renilla-Luziferase (rechts) gezeigt. Durch Kotransfektion einer zweiten Luziferase können transfektionsbedingte Expressionsunterschiede nivelliert werden.

### 3 - Ergebnisse

---

#### 3.2.2 Nachweis der Kotransfektion zweier Plasmide

Zur Normalisierung unterschiedlicher Expressionseffizienzen der Photinus-Luziferase wurde ein zweites Plasmid, das eine weitere Luziferase (Renilla-Luziferase) codiert, kotransfiziert. Zum Nachweis, dass beide Plasmide gleichermaßen in die Zelle gelangen und exprimiert werden können, wurden XS106 Zellen mit dem rotfluoreszierenden Plasmid DSRed2 und dem grünfluoreszierenden EGFP<sup>55</sup>, beide unter der Kontrolle des CMV-Promotors, kotransfiziert. Die nachfolgende Abbildung gibt diese Ergebnisse wieder und bestätigt, dass beide Plasmide durch die gleiche Zelle exprimiert werden.



**Abbildung 9 - Nachweis Expression zweier Reportergene durch die gleiche Zelle**

Die Abbildung zeigt, dass bei einer Kotransfektion zweier Plasmide beide von der gleichen Zelle aufgenommen und exprimiert werden. Dies bildet die Grundlage für die unter 3.2.1 beschriebenen Normalisierung. Die Fluoreszenzbilder wurden bei 200facher Vergrößerung aufgenommen.

#### 3.2.3 Einfluss der in der Präparation verbliebenen Lymphozyten auf den Reportergentest

Die eingesetzte Methode zur Charakterisierung der Expressionsunterschiede der verschiedenen Fascin-Konstrukte ist der Dual-Luziferasetest (vgl. 2.2.2.8.1). Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine integrative Methode, d.h., die exprimierte Luziferase des gesamten Ansatzes wird gemessen. Da aufgrund der Präparation ein Anteil von Fremdzellen in den Ansätzen verbleibt, musste sichergestellt werden, dass diese Zellen keinen Beitrag zur Photinus-Luziferaseexpression leisten: Bei zwei gleichen Transfektionsansätzen (Triplikate) wurden zu einer Probe zusätzlich 30% abgspülte

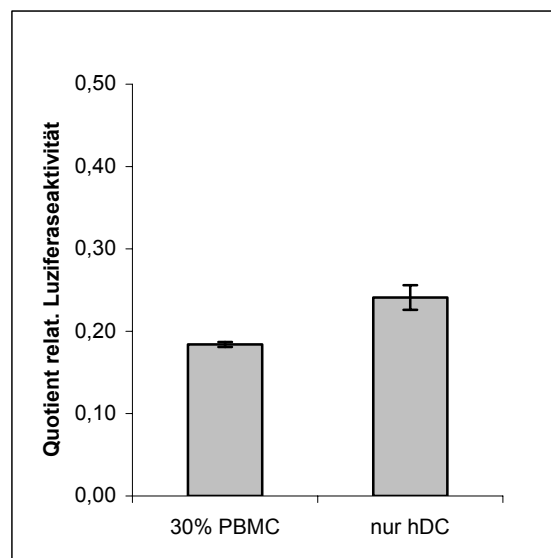
---

<sup>55</sup> enhanced green fluorescent protein – verstärktes grünfluoreszierendes Protein

### 3 - Ergebnisse

---

PBMCs zugesetzt und mitkultiviert. Nach Transfektion mit der Amaxa-Methode wurde die Luziferaseexpression gemessen. Als Coreporter zur Normalisierung der Transfektionsansätze wurde die Renilla-Luziferase unter dem CMV-Promotor mittransfiziert. Es zeigte sich, dass der Vergleichsansatz, der mehrheitlich hDC enthielt, eine höhere Luziferaseexpression lieferte, verglichen mit der Probe, die die zusätzlichen PBMCs enthielt. Es ist davon auszugehen, dass bei der Transfektion in der Vergleichsprobe, mehr hDC erreicht wurden und aufgrund der Spezifität des Fascin-Promotors auf DC eine höhere Fascin-Promotor getriebene Luziferaseexpression resultierte. Bei der anderen Probe wurde durch die Transfektion auch ein Teil der PBMC erreicht, die theoretisch nur das CMV-Konstrukt exprimieren konnten, was insgesamt in einer niedrigeren Photinus-Luziferaseexpression deutlich wurde. Die Daten ließen also den Schluss zu, dass die in der Präparation verbliebenden B- und T-Lymphozyten keinen Einfluss auf die Fascin-Promotor getriebene Proteinexpression hatten. Abbildung 10 zeigt das Ergebnis des Luziferasetests. Dargestellt sind die Mittelwerte der resultierenden Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität und die entsprechenden Standardabweichungen. Das Experiment wurde in Triplikatansätzen durchgeführt.



**Abbildung 10 - Vergleich relat. Luziferaseaktivität nach Zumischung von 30 % PMBC**

Die in der Präparation verbliebenden T- bzw. B-Lymphozyten liefern keinen Beitrag zur Fascin-Promotor vermittelten Proteinexpression. Dargestellt sind die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität, nebst den Standardabweichungen.

#### 3.3 Spezifität des Fascin-Promotors auf Dendritische Zellen

Die eingesetzte Methode zur Präparation der hDC kann die vollständige Entfernung der B- und T-Lymphozyten nicht leisten. Ein Anteil dieser Zellen bleibt in der Präparation zurück. Der Fascin-Promotor ist in Zellen des hämatopoetischen Systems exklusiv in Dendritischen Zellen aktiv. Das Reporterogen EGFP unter dem Fascin- bzw. CMV-Promotor ermöglicht den Nachweis der spezifischen / unspezifischen Expression auf Einzelzellebene. Die nachfolgenden Graphiken zeigen, dass unter dem CMV-Promotor auch verbliebene Lymphozyten EGFP exprimierten. Unter Verwendung des Fascin2.7-Promotor blieb die Expression des Reportergens auf hDC beschränkt.

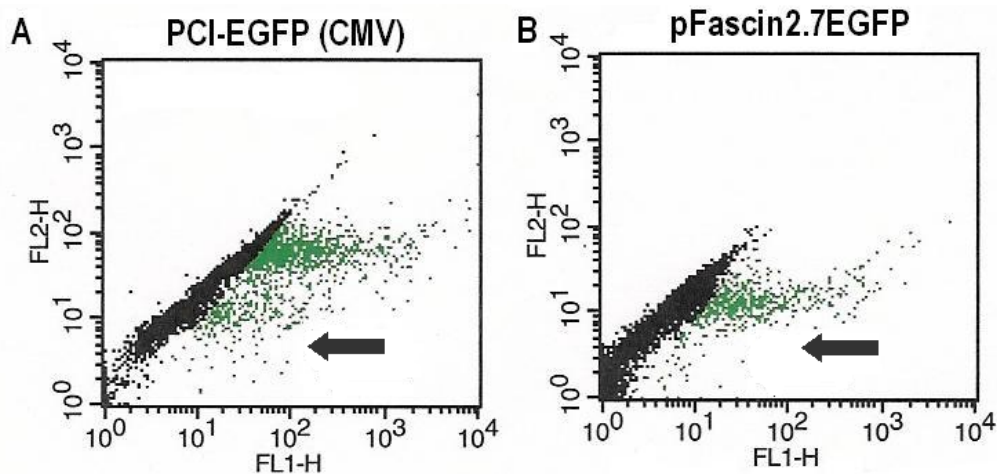


Abbildung 11 - EGFP-Expression A) unter CMV- bzw. B) unter dem Fascin-Promotor

Logarithmische Darstellung Fluoreszenz 1 gegen 2 der Analyse mittels Cytofluorometer: Die Expression des Reportergens blieb unter dem Fascin-Promotor auf DC beschränkt.

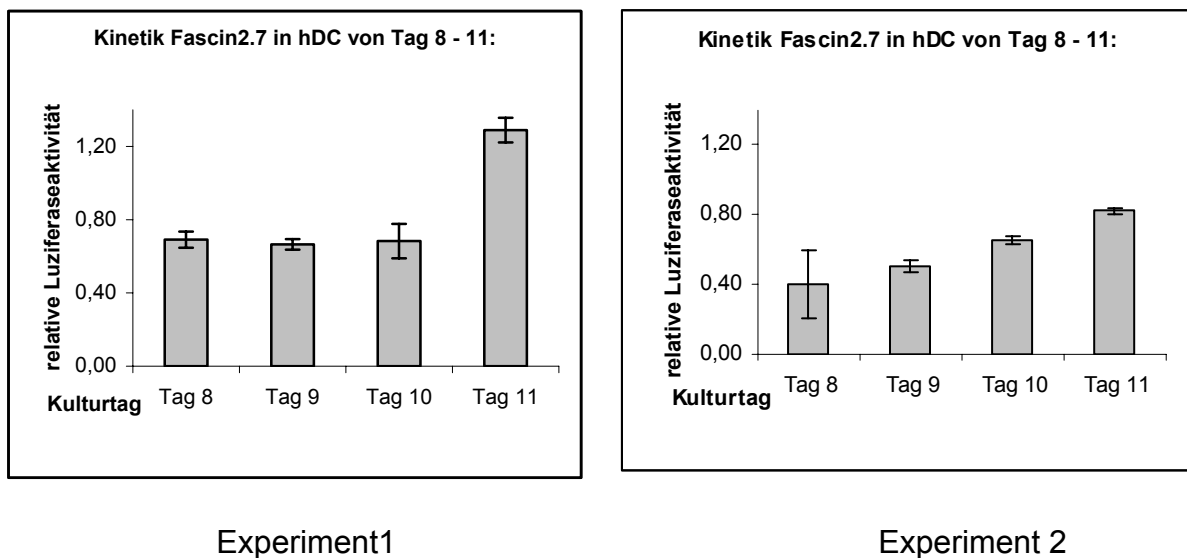
#### 3.4 Aktivität des Fascin-Promotors korreliert mit Reifegrad der hDC

Fascin wird in den Langerhansschen Zellen mit zunehmendem Reifegrad verstärkt genutzt (Ross et al.; 1998). Dies gilt auch für hDC, die aus CD14+-Monozyten aus menschlichem Blut generiert werden (Ross et al.; 2000). Der humane Fascin-Promotor wird ebenfalls von reifen CD83+ humanen DC stärker genutzt als von CD83- DC derselben Kultur (Bros et al.; 2003).

Der optimale Zeitpunkt für die Transfektion ist wahrscheinlich nicht identisch mit dem Zeitpunkt der maximalen Fascinexpression. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurde die Expression des Reportergens Photinus-Luziferase unter dem Fascin-Promotor2.7 an

### 3 - Ergebnisse

vier aufeinander folgenden Tagen bestimmt. Die Normalisierung unterschiedlicher Transfektionseffizienzen wurde durch Kotransfektion eines zweiten Reportergens, der Renilla-Luziferase unter dem CMV-Promotor erreicht. Die Expressionsstärke wurde 24 h später über den Dual-Luziferasetest von Promega bestimmt (vgl. 2.2.2.8.1). Beginnend mit dem Tag 8 (Transfektionszeitpunkt) konnte bereits eine deutliche Expression des Reportergens festgestellt werden, die am Tag 9 und 10 etwa auf gleichem Niveau lag. Am Tag 11 schließlich konnte noch einmal ein Anstieg der Expressionseffizienz beobachtet werden. Die Schwankungen in der Expressionsstärke über den Zeitraum Tag 8 - 10 fielen verhältnismäßig gering aus, so dass zur Erzielung eines glaubwürdigen Ergebnisses der Transfektionszeitpunkt bereits auf Tag 9 festgelegt werden konnte. Der Vorteil, der daraus resultierte, war, dass das Ergebnis des Experiments verhältnismäßig schnell vorlag. Ein Abwarten bis zum Kulturtag 11 wurde aufgrund der relativen Höhe des Expressionsniveaus als nicht zwingend notwendig erachtet. Somit konnte die Dauer eines Experiments auf ca. 11 Tage begrenzt werden. Die nachfolgende Abbildung 12 zeigt das Ergebnis der beiden jeweils in Dreifach-Triplikatsansätzen durchgeführten Experimente.

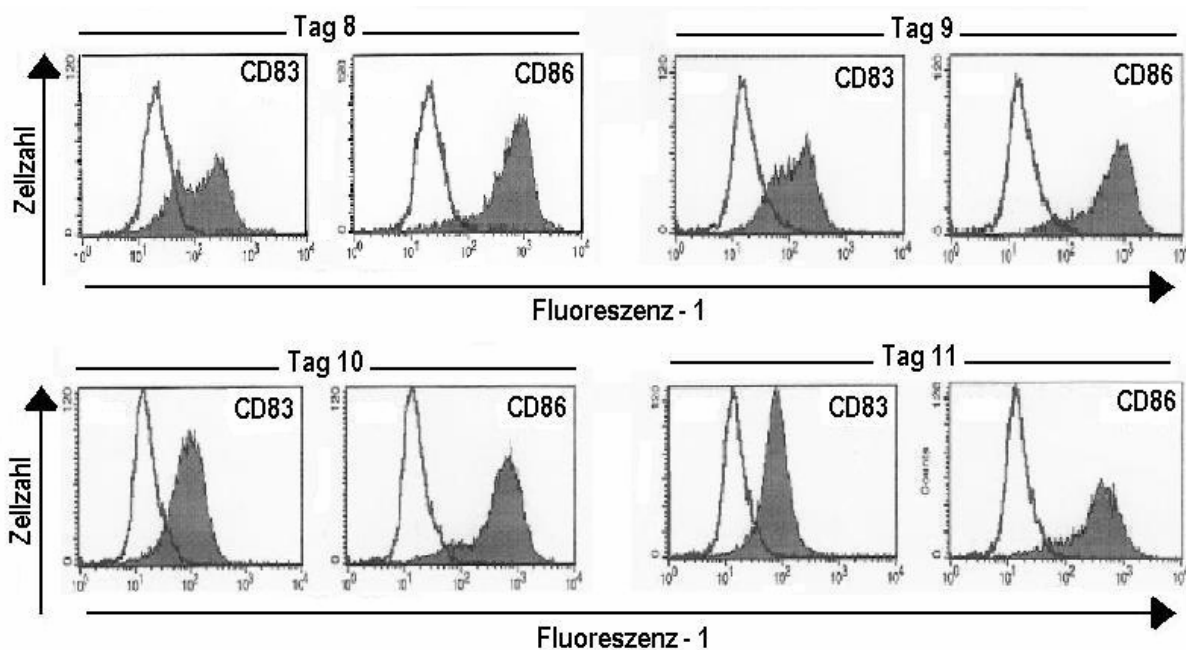


**Abbildung 12 - Luziferaseexpression in hDC zu unterschiedlichen Transfektionszeitpunkten**

Dargestellt sind die Mittelwerte der resultierenden Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferase-Aktivität und die entsprechenden Standardabweichungen. Die beiden Experimente wurden jeweils in Triplikatswerten durchgeführt. Die Expression des Fascin2.7 Konstrukts ist über den Tag 8 – 10 (Transfektionszeitpunkt) auf relativ konstantem, hohem Niveau.

### 3 - Ergebnisse

Parallel zur Bestimmung der Expressionsstärke des Reportergens unter dem Fascin-Promotor im Dual-Luziferasetest wurde für jedes der beiden Experimente dieser Versuchsreihe die Ausreifung der Dendritischen Zellen durch Immunfluoreszenz auf die Oberflächenproteine CD83 und CD86 (gegen den entsprechenden Isotyp IgG1) und anschließende Analyse mit dem Cytofluorometer dokumentiert. Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Experiments:



**Abbildung 13 - Dokumentation Reifestatus der hDC, an Tag 8-11**

Histogrammdarstellung der Expression der Oberflächenproteine CD83 und CD86 zur Dokumentation des Reifegrads an den einzelnen Kulturtagen mittels FITC-markierter Antikörper gegen den entsprechenden Isotyp IgG1 (Analyse im Cytofluorometer). Exemplarisch ist das Ergebnis eines der beiden Experimente gezeigt.

Die hDC wiesen gleichmäßig über die gesamte Population verteilt schon am Tag 8 eine starke Expression des Oberflächenproteins CD86 auf. Im untersuchten Zeitraum konnte die Höhe dieser Expression als konstant beobachtet werden. Dies zeigte sich im Histogramm als glockenförmige Kurve, die annähernd einer Gauß'schen Normalverteilung entsprach. Bei der Expression des Oberflächenproteins CD83 konnten am Tag 8 zunächst noch zwei beinahe gleichgroße Populationen nachgewiesen werden, wobei nur eine der beiden CD83 positiv war. Dies ließ auf hDC mit unterschiedlichem Reifegrad schließen. Im Verlauf des beobachteten Zeitraums wurden immer mehr Zellen CD83 positiv. Die Kurve im Histogramm näherte sich wie beim CD86 einer Normalverteilung an,

### 3 - Ergebnisse

die sie am Tag 10 auch erreichte. Die Kultur bestand jetzt aus annähernd einheitlich ausgereiften hDC.

Da aufgrund der spenderindividuellen BuffyCoats als Ausgangsmaterial für die Generierung von hDC eventuell auch Schwankungen in deren Reifestatus auftreten konnten, wurde in regelmäßigen Abständen die Expression der Oberflächenmarker CD83 und CD86 bestimmt. So konnte gewährleistet werden, dass die hDC am Tag 9 (Transfektionszeitpunkt) einen Reifestatus erreicht hatten, der die Nutzung vor allem der distal lokalisierten, reifeabhängigen, Fascin-Promotor-Elemente als wahrscheinlich erwarten lässt.

### 3.5 Verstärkung der Promotoraktivität durch Duplikation Fascinpromotoreigener Elemente

#### 3.5.1 Herstellung eines 5'-deletierten Fascin-Promotors als Basis für weitere Klonierungen

Zunächst wurde ein verkürztes Fascin-Konstrukt, das alle wichtigen konservierten Bereiche enthält und am 5' Ende über eine singuläre Bal I-Schnittstelle verfügt, hergestellt. Es diente als Basis für die nachfolgend aufgeführten Klonierungen.

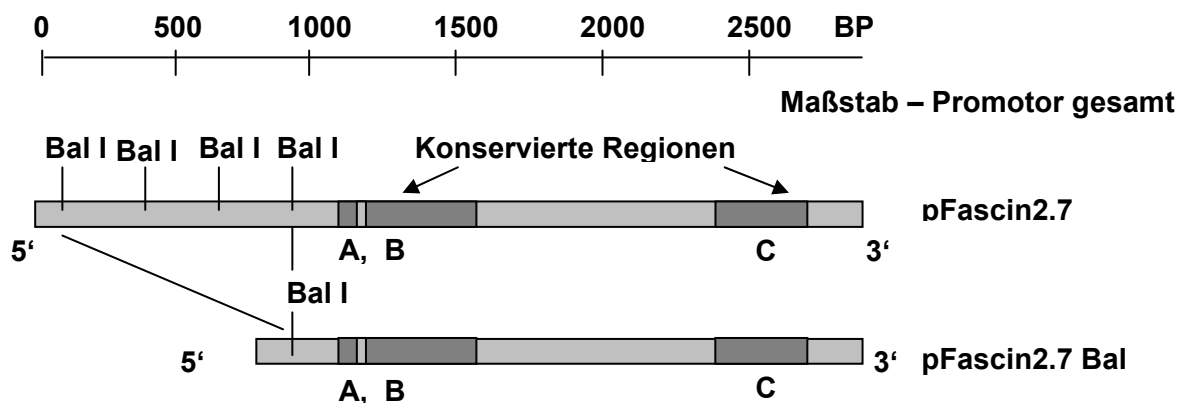


Abbildung 14 - Fascin2.7Bal - Fascin 2.7 – Größe und Lokalisation der Homologieregionen

Übersicht Deletion des Fascin-Promotors 2.7 zur Herstellung des Konstrukts Fascin2.7Bal, das am 5'-Ende über eine singuläre Bal I-Schnittstelle verfügt. Das Konstrukt diente als Basis für die nachfolgend beschriebenen Klonierungen

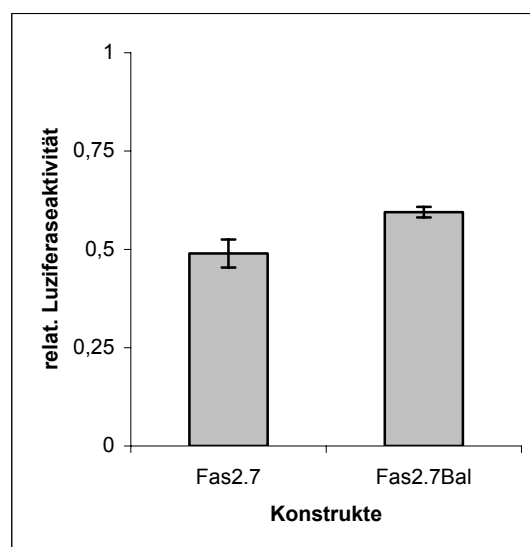
Ausgangspunkt war das Fascin2.7-Konstrukt, das in den pGI3Basic Vektor von Promega kloniert worden war. Das Plasmid wurde mit dem Restriktionsenzym Bal I geschnitten, so dass die resultierenden 5'-lokalisierten Elemente zwischen den Bal I-Schnittstellen ausgeschnitten wurden (vgl. Abbildung 14). Nach Gelelektrophorese und

### 3 - Ergebnisse

---

Excision der linearisierten, verkürzten DNA aus dem Gel wurde das Plasmid religiert und zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung der Bereich um die neu entstandene Bal-I-Schnittstelle sequenziert. Das Promotorkonstrukt hat eine Größe von 1543 BP.

Das erhaltene Fascin2.7Bal-Konstrukt wurde gegen das Fascin2.7-Konstrukt im Dual-Luziferasetest getestet. Als Coreporter zur Normalisierung der Transfektionseffizienzen diente die Renilla-Luziferase unter dem CMV-Promotor. Das Experiment wurde zweimal in Duplikatansätzen durchgeführt und lieferte für das Fascin2.7Bal-Konstrukt eine leichte Verstärkung der Expression hinsichtlich des Fascin2.7-Konstrukts.



**Abbildung 15 - Vergleich Luziferaseaktivität der Konstrukte pFascin2.7 - pFascin2.7Bal**

Das Fascin2.7Bal-Konstrukt zeigt gegenüber dem Fascin2.7-Konstrukt eine geringfügig gesteigerte Expression der nachgeschalteten Luziferase. Dargestellt sind die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität und die entsprechenden Standardabweichungen.

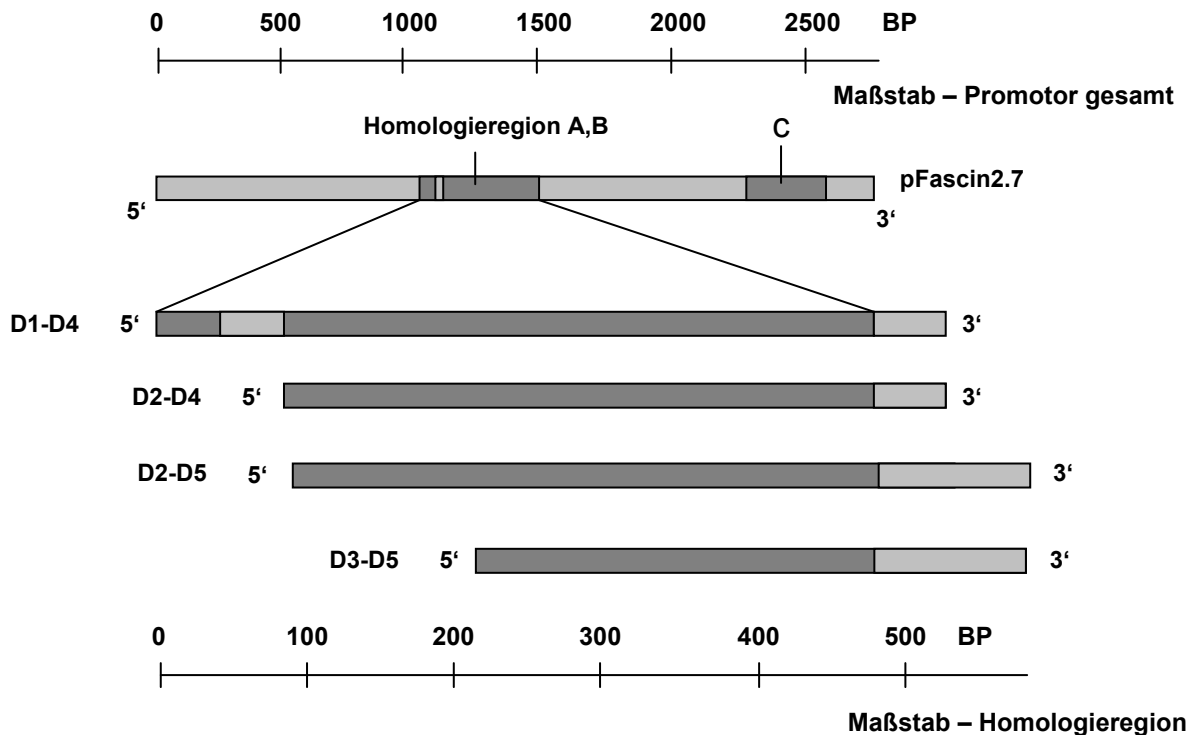
#### 3.5.2 Erzeugung von Teilfragmenten der Homologieregion A, B

Der humane Fascin-Promotor verfügt über drei Homologiebereiche A, B und C (vgl. Abbildung 14), die auf Basis eines Homologievergleichs zwischen den Promotorsequenzen von Maus und Mensch identifiziert wurden (Bros et al.; 2003). Bros und Mitarbeiter konnten zeigen, dass der Bereich C alle wichtigen Elemente eines Minimalpromotors, die für die Expression des nachfolgenden Gens notwendig sind, enthält. Die Spezifität des Fascin-Promotors auf Dendritische Zellen und die Verstärkung der Expression werden durch Elemente in der konservierten Region A, B bewirkt. Eine Duplikation der Homologieregion AB oder zumindest Teilelemente dieser Region sollten demnach zu einer Verstärkung der Expression führen. Welche DNA-Abschnitte innerhalb



### 3 - Ergebnisse

dieser Region tatsächlich für die Expressionssteigerung verantwortlich sind, war zu Beginn der Arbeiten nicht bekannt. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurden verschiedene Primer entworfen, mit denen unterschiedlich große Produkte der Homologieregion AB amplifiziert werden konnten. Die Oligonukleotide (vgl. 2.1.1.7) wurden mit den Buchstaben D und den Zahlen 1 bis 5 bezeichnet. Die nachfolgende Graphik gibt einen Überblick über Größe und Lokalisation der erhaltenen Elemente. Diese sind mit einer Kombination der jeweiligen Oligonukleotid-Bezeichnungen benannt.



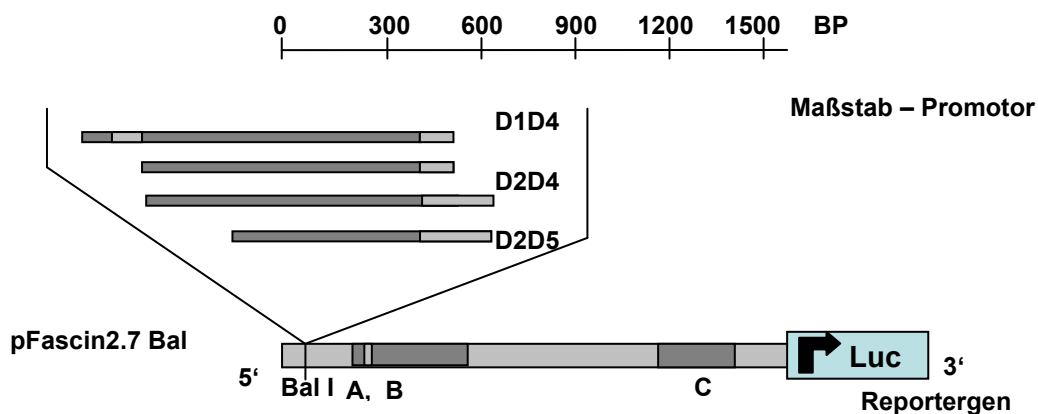
**Abbildung 16- Größe und Lokalisation der "D"-Konstrukte**

festgelegt durch die verschiedenen, entworfenen Primer. Die Bezeichnung des jeweiligen Konstrukts setzt sich zusammen aus dem für seine Erzeugung verwendeten Primerpaar. Mit aufsteigender Zahl werden Konstrukte erhalten, die immer geringere Anteile der konservierten Homologieregion A, B enthalten, gleichzeitig kommen Bereiche hinzu, die nichtkonserviert sind, um festzustellen, ob auch diese Bereiche einen Beitrag zur Expressionssteigerung liefern.

### 3 - Ergebnisse

#### 3.5.2.1 Einfluss auf die Expressionsstärke eines nachgeschalteten Reportergens durch Duplikation von Teilfragmenten bzw. der ganzen Homologieregion AB - Klonierung in die Bal-I-Schnittstelle von pFascin2.7Bal

Die mittels Polymerase-Ketten-Reaktion generierten Teilfragmente der Homologieregion A, B wurden nach Aufreinigung mit dem Promega SV Gel and PCR Cleanup System einer Klenow-Reaktion (2.2.1.10) unterzogen. Nach erneuter Aufreinigung wurden die erhaltenen Fragmente in die Bal-I-Schnittstelle des Fascin2.7Bal-Konstrukts kloniert<sup>56</sup>.



**Abbildung 17 - Klonierung der "D"-Konstrukte in die Bal I-Schnittstelle von Fascin2.7Bal**

Nachgeschaltet ist das Reportergen Photinus-Luziferase. Durch Bestimmung der Aktivität dieser Luziferase kann auf die Aktivität der Promotorelemente und den Beitrag der jeweiligen „D“-Konstrukte geschlossen werden.

Zum Nachweis der erfolgreichen Klonierung wurde mit den Oligonukleotiden phFas2.7Bal-I-fwd bzw.- rev. mittels PCR ein Fragment erzeugt, das die Bal-I-Schnittstelle und das potentiell klonierte D-Konstrukt im Zentrum hatte. Ein Aliquot der PCR-Reaktion wurde mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese gegen einen geeigneten DNA-Marker analysiert und die Fragmentgröße bestimmt. Entsprach das ermittelte Molekulargewicht der berechneten Größe, erfolgte eine zweite PCR mit einer Kombination aus geeignetem Oligonukleotid (D1 – D5) und dem komplementären, passenden phFas2.7-Bal-I-Primer. Erwies sich in der anschließenden Gelelektrophorese, dass das erhaltene Fragment ebenfalls die errechnete Größe hatte, konnte davon ausgegangen werden, dass das Fragment auch in korrekter Orientierung kloniert worden war. Der so charakterisierte Klon

<sup>56</sup> Das Restriktionsenzym Bal I erzeugt glatte DNA-Enden

### 3 - Ergebnisse

---

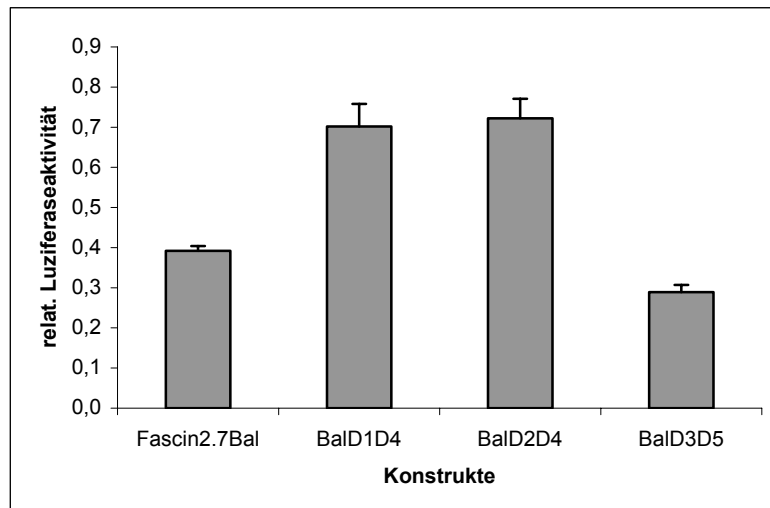
wurde zur Sequenzierung gegeben und deren Ergebnis auf Übereinstimmung der Einzelbasen mit der ursprünglichen Promotorsequenz verglichen.

Die erhaltenen Klone wurden zur Gewinnung von DNA herangezogen und diese transient in hDC transfiziert. Die Analyse der Luziferaseexpression mittels des Dualluziferasetests ergab die Expressionsstärke der erzeugten Konstrukte. Die DNA für die Transfektion wurde in äquimolaren Mengen eingesetzt, um Unterschiede, die sich aufgrund der verschiedenen Größe der Konstrukte ergeben, auszuschließen.

In der folgenden Abbildung ist das Ergebnis von einem der vier gleichwertigen Experimente gezeigt. Das BalD1D4- bzw. das BalD2D4-Konstrukt liefert ca. eine 1,7 fache Verstärkung der Expression, die signifikant unterschiedlich zum Referenzkonstrukt Fascin2.7Bal ist. Der Unterschied zwischen den beiden Konstrukten war nicht signifikant. Bei dem Konstrukt BalD2D5 kommt ein DNA-Abschnitt hinzu (Abbildung 16) der bereits außerhalb der konservierten Region B liegt. Es lässt sich zwar noch ein Anstieg der Expression dokumentieren, der aber deutlich geringer ausfällt, verglichen mit den Konstrukten BalD1D4 bzw. BalD2D4. Beim Konstrukt BalD3D5 fehlt zusätzlich ein Teil der Homologieregion B, der nichtkonservierte DNA-Abschnitt, wie bei BalD2D5 beschrieben, ist in diesem Konstrukt aber ebenfalls erhalten. Die resultierende Expression fällt geringer aus, als bei dem Referenzkonstrukt Fascin2.7Bal. Im weiteren Verlauf der Experimente wurde auf die Transfektion des BalD2D5-Konstrukts verzichtet, da einerseits die Steigerung der Expression nicht deutlich genug war und der Einfluss des nicht-konservierten DNA-Abschnitts durch das BalD3D5-Konstrukt untersucht werden konnte.

### 3 - Ergebnisse

---

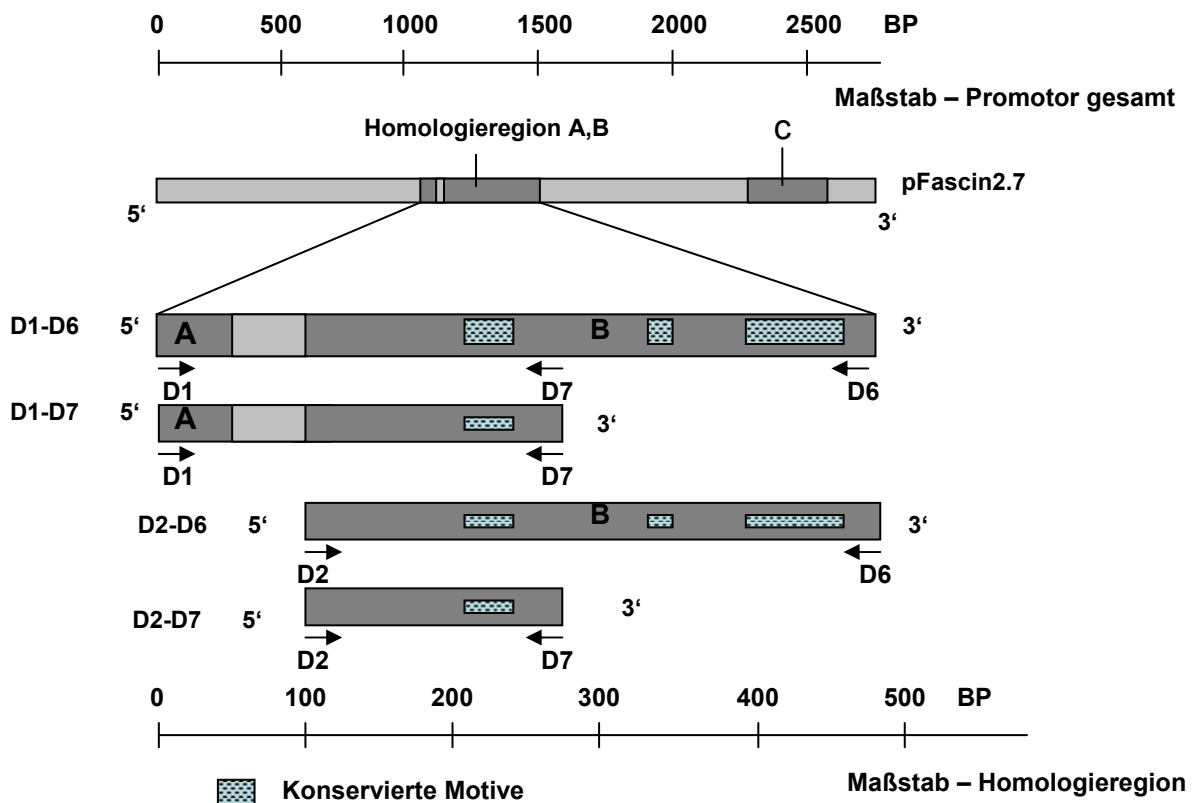


**Abbildung 18 - relat. Luziferaseaktivität der Bal-Konstrukte gegen pFascin2.7Bal als Referenz**

Sowohl die Duplikation des D1D4 als auch des D2D4-Konstrukts liefern annähernd eine Verdopplung der Expression des nachgeschalteten Reportergens. Das D3D5-Konstrukt zeigt keine zusätzliche Verstärkung der Expression. In diesem Abschnitt scheinen demnach keine weiteren aktivitätssteigernden Elemente lokalisiert zu sein. Dargestellt sind die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität nebst den entsprechenden Standardabweichungen. Abbildung 18 zeigt repräsentativ eines von vier gleichwertigen Experimenten jeweils in Triplikatansätzen.

Fazit: Durch Duplikation der Homologieregionen A und B bzw. nur der Homologieregion B lässt sich eine Expressionsteigerung des nachgeschalteten Reportergens erreichen, die signifikant unterschiedlich zum Referenzkonstrukt Fascin2.7Bal ist.

#### 3.5.3 Einfluss der Homologieregion A bzw. des DNA-Abschnitts D7 – D6



**Abbildung 19 - Größe und Lokalisation der Fragmente D1D6, D1D7, D2D6, D2D7**

festgelegt durch die verschiedenen, entworfenen Primer. Die Bezeichnung des jeweiligen Konstrukts setzt sich zusammen aus dem für seine Erzeugung verwendeten Primerpaar. Ebenfalls in der Abbildung dargestellt sind konservierte Motive, die potentielle Transkriptionsfaktorbindungsstellen enthalten, deren Existenz aus der Analyse mit einem entsprechenden Computerprogramm begründet wurden. Mit dieser Serie Konstrukte sollte untersucht werden, ob die expressionssteigernde Wirkung auf den Bereich D1D7 bzw. D2D7 eingegrenzt werden kann oder ob der Bereich D6D7 ebenfalls einen Anteil daran besitzt.

Basierend auf den Ergebnissen, die sich aus der Duplikation der Teilfragmente D1-D5 ergaben, wurden weitere Konstrukte geplant, um einerseits den Einfluss der Homologieregion A bzw. des Abschnitts D7 – D6 (2. Teil der Homologieregion B, der direkt nach D7 beginnt und basengenau bis zum Ende dieser konservierten Region reicht) auf die Verstärkung der Expression zu untersuchen.

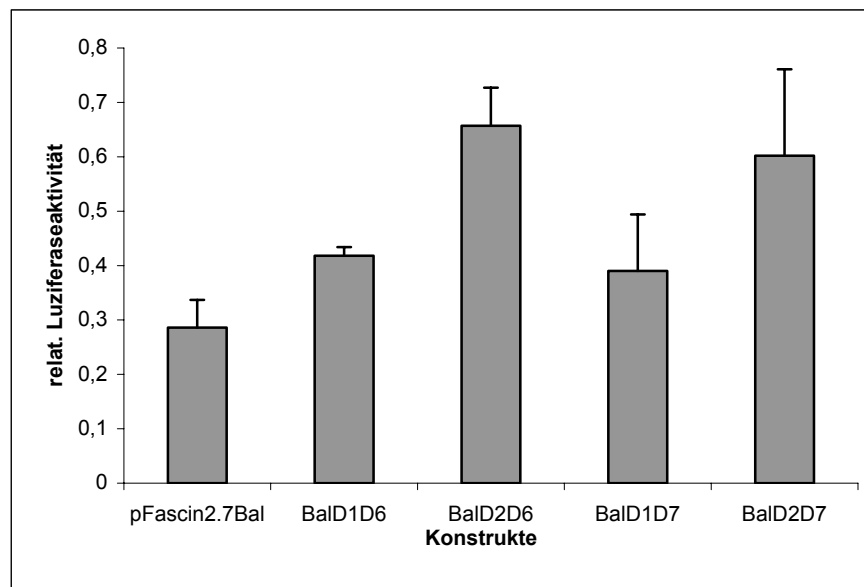
Es wurden vier neue Konstrukte entworfen, die paarweise konzipiert waren. Eine Übersicht gibt Abbildung 19: D1D6 beinhaltet den Sequenzbereich D1D2, der der Homologieregion A entspricht, während D2D6 um genau diese Region verkürzt ist. Beide Konstrukte aber besitzen den Sequenzabschnitt D7–D6. D1D7 bzw. D2D7 unterscheiden

### 3 - Ergebnisse

---

sich ebenfalls im Vorhandensein der Homologieregion A. Beide Konstrukte sind um den Bereich D7–D6 verkürzt.

Die Herstellung und Charakterisierung der Fragmente sowie das Klonieren in die Bal-I-Schnittstelle von Fascin2.7Bal erfolgten analog, wie unter Punkt 3.5.2.1 beschrieben. Das Experiment wurde zweimal in Triplikatwerten durchgeführt. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe zeigt, dass die Konstrukte BalD2D6 und BalD2D7 eine annähernd gleich hohe Verstärkung der Expression lieferten. Die Region D7-D6 scheint keinen weiteren Beitrag zur Steigerung der Expression zu leisten. Der Vergleich der Konstrukte, die sich im Vorhandensein der Homologieregion A unterschieden, zeigte, dass die Expression dann erniedrigt war, wenn dieser Sequenzabschnitt zusätzlich vorhanden war.



**Abbildung 20 - relat. Luziferaseaktivität der Bal-Konstrukte gegen pFascin2.7Bal als Referenz**

Sowohl die Duplikation des D2D7 als auch des D2D6-Konstrukts liefern annähernd eine Verdopplung der Expression des nachgeschalteten Reportergens. Die expressionssteigernden Elemente scheinen im Bereich D2D7 lokalisiert. Uneinheitlich ist der Beitrag der Homologieregion A zur Expressionsteigerung: In der vorliegenden Untersuchungsreihe leistet dieser Bereich keinen eigenen Beitrag zur Expressionssteigerung, sondern wirkt eher inhibitorisch. Dargestellt sind die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität nebst den entsprechenden Standardabweichungen. Abbildung 20 zeigt repräsentativ eines von zwei gleichwertigen Experimenten jeweils in Triplikatansätzen.

**Zusammenfassend konnten zwei Schlussfolgerungen gezogen werden:**

- 1) Die für die Steigerung der Expression wichtigen Elemente befinden sich im Sequenzabschnitt D2-D3 (ein ca. 90 BP langer DNA-Abschnitt).**
- 2) Die Homologieregion A leistet keinen eigenen Beitrag zur Expressionsverstärkung.**

### 3 - Ergebnisse

#### 3.5.4 Einfluss auf die Expressionsstärke, wenn mehrere D2D7-Einheiten hintereinander gesetzt werden

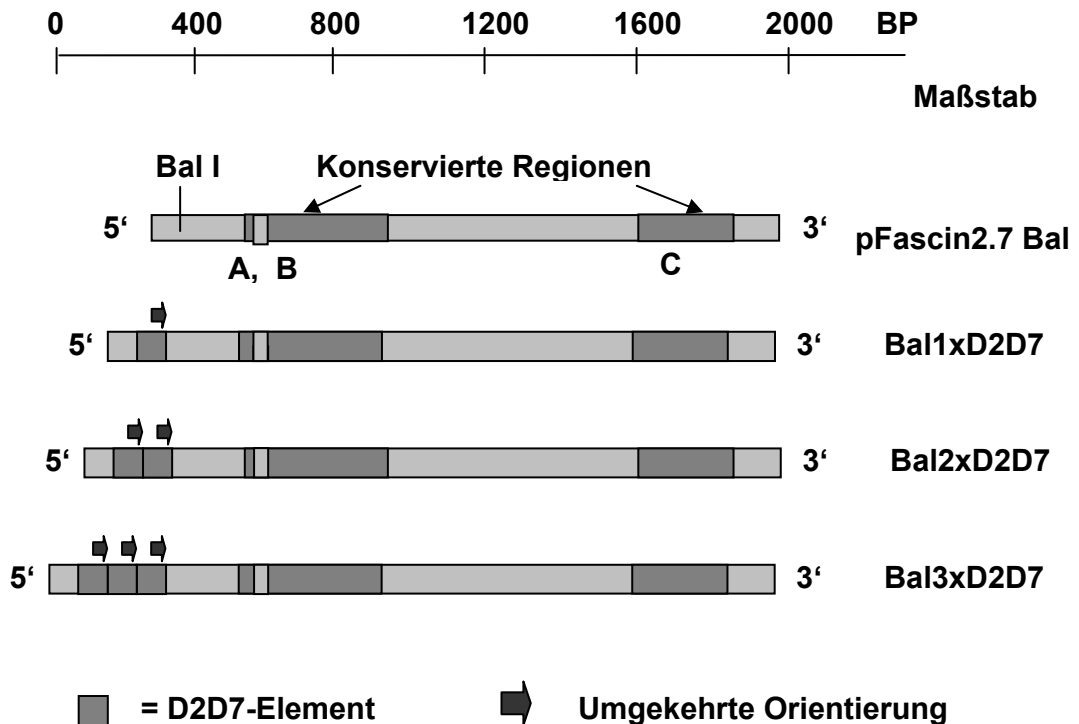


Abbildung 21 - Übersicht: Multiplikation mehrerer D2D7-Elemente und Klonierung in Fascin2.7Bal

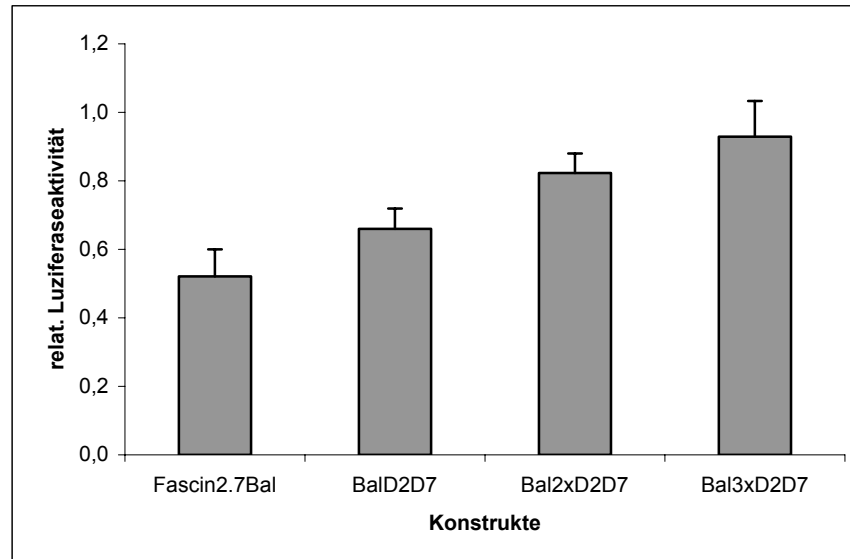
Die erzeugten Konstrukte erhalten eine unterschiedliche Anzahl D2D7-Konstrukte in der Bal-I-Schnittstelle. Die Konstrukte wurden als Reaktion auf die vorangegangenen Experimente entwickelt: demnach sollte jede zusätzliche D2D7-Einheit eine weitere Steigerung der Expression des nachgeschalteten Reportergens bewirken. Bedingt durch die Vorgehensweise resultierten Konstrukte, die in umgekehrter Orientierung inkloniert waren.

Unter Berücksichtigung der beiden vorangegangenen Versuchsreihen sollten mehrere Einheiten des DNA-Abschnitts D2D7 hintereinander addiert ebenfalls zu einer Expressionssteigerung führen, die vom Betrag her größer ausfallen sollte, als die bisher festgestellten Steigerungen. Mittels Polymerasekettenreaktion wurden zunächst die D2D7-Elemente hergestellt. Nach Klenow-Reaktion wurden die Fragmente einer T4-Polynukleotidkinasereaktion unterzogen zur Addition einer 5'-lokalisierten Phosphat-Gruppe. Zunächst wurden nur die Fragmente allein eineinhalb Stunden mit T4-Ligase inkubiert, anschließend wurde der mit dem Restriktionsenzym Bal-I geschnittene Vektor zugegeben und der Ansatz über Nacht ligiert. Die weitere Aufarbeitung und Charakterisierung der resultierenden Klone erfolgte wie unter 3.5.2.1 beschrieben. Es wurde ein Konstrukt mit einer, zwei und drei zusätzlichen D2D7-Einheiten erhalten, die alle die D2D7-Einheiten in umgekehrter Orientierung inseriert hatten! Die Ergebnisse zeigen, dass mit jeder weiteren hinzukommenden D2D7-Einheit die Expression zwar

### 3 - Ergebnisse

---

proportional verstärkt wird, die Differenzen in der Expressionsstärke aber hinter den Erwartungen zurückbleiben. Der Unterschied zwischen dem Referenzkonstrukt Fascin2.7Bal und dem Bal3xD2D7-Konstrukt (besitzt insgesamt 4x den D2D7-Bereich) ist in etwa gleich groß, wie beim Konstrukt BalD2D4.



**Abbildung 22 – relat. Luziferaseexpression der Konstrukte mit mehreren D2D7-Einheiten**

Mit jeder weiteren hinzukommenden D2D7-Einheit steigert sich die Expression des nachgeschalteten Reportergens um annähernd denselben Betrag. Die absolute Steigerung fällt aber wesentlich geringer aus, als erwartet. Insgesamt wird mit dem Bal3xD2D7-Konstrukt nur eine Expressionssteigerung erreicht, die in der Dimension des BalD2D4-Konstruktes liegt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität und die entsprechenden Standardabweichungen. Abbildung 22 zeigt repräsentativ eines von drei gleichwertigen Experimenten, jeweils in Triplikatansätzen.

#### **3.5.5 Test der Fascin-Promotorderivate in der Keratinozyten-Zell-Linie HaCaT. Dokumentation der Spezifität auf DC**

Die hergestellten Fascin-Konstrukte sollen in einer späteren Verwendung zur DNA-Vakzinierung eingesetzt werden. Bedingt durch den Applikationsweg trifft die DNA-Vakzine neben DCs vornehmlich auf Keratinozyten der Haut, die das nachgeschaltete Gen nicht exprimieren sollen. Zur Dokumentation der Spezifität auf hDC wurde die DNA in die HaCaT-Keratinozyten-Zelllinie transient transfiziert und auch hier die Expressionsstärke im Dual-Luziferase-Assay bestimmt. Die erhaltenen Ergebnisse der Versuchsreihe sind in den nachfolgenden Graphiken dargestellt. Zunächst wurde zur Transfektion der HaCaT-Zellen die Calcium-Phosphat-Methode gewählt. Im Verlauf der Versuchsreihe wurde aber festgestellt, dass die Expressionseffizienz bei dieser Methode größeren Schwankungen unterliegt, als erwartet. Aus diesem Grund wurde diese Transfektionsmethode zugunsten einer Lipofektion mit dem GenePorter-Reagenz ersetzt.



### 3 - Ergebnisse

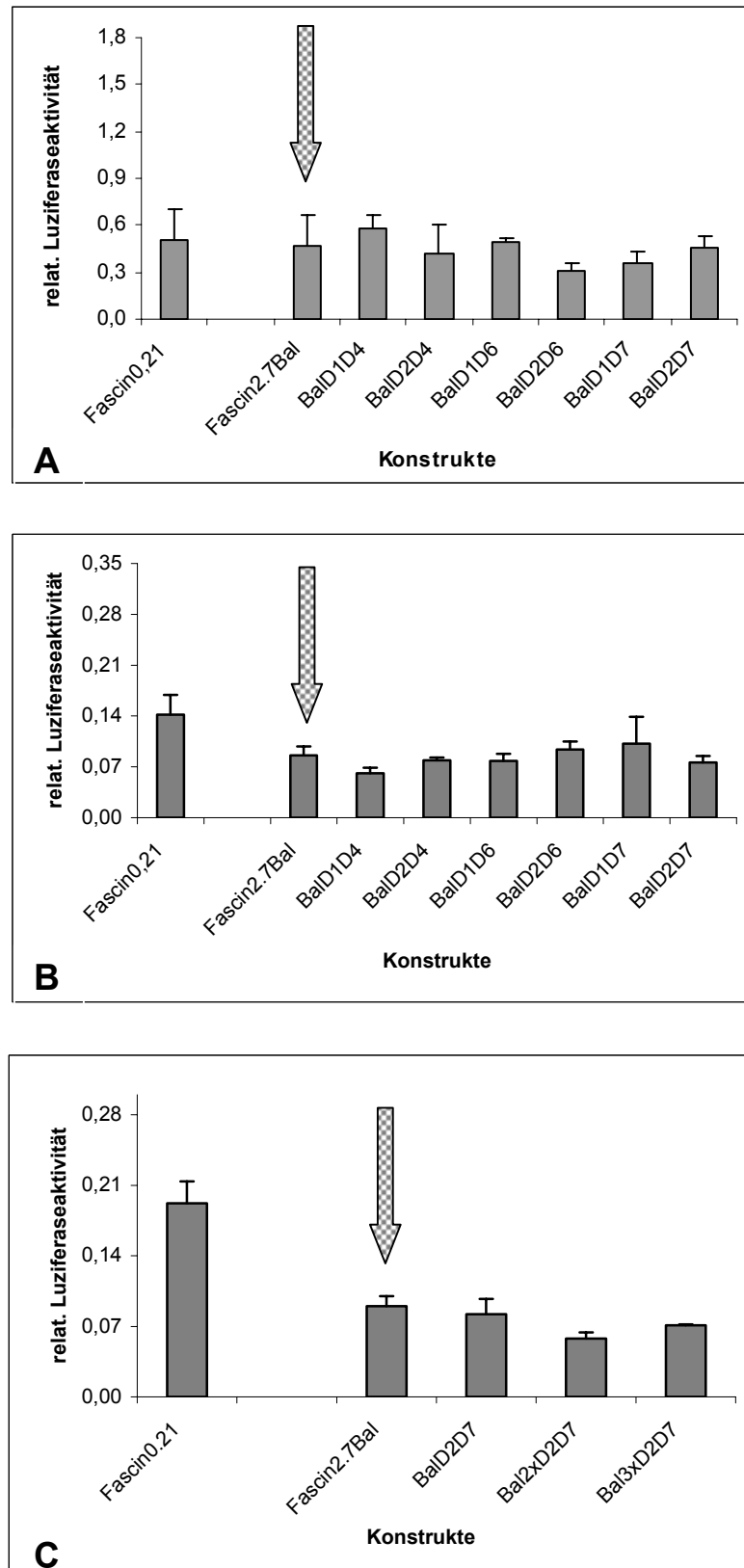
---

Eine Verifizierung mit der neuen Methode erbrachte vergleichbare Ergebnisse, wie mit der vormals gewählten Technik. Keines der untersuchten Konstrukte wies eine stärkere Luziferaseexpression in HaCaT-Zellen auf, als das Referenzkonstrukt. Auf die Testung der Konstrukte BalD2D5 bzw. BalD3D5 wurde verzichtet, da diese keine nennenswerte Expressionssteigerung in hDC bewirkten. In den Experimenten wurde zum Vergleich auch das Fascin0.21-Konstrukt<sup>57</sup> transfiziert. Die untersuchten Konstrukte lagen alle unterhalb der Luziferaseexpression von Fascin0.21.

---

<sup>57</sup> enthält nur den Minimalpromotor, der auch in HaCaT-Zellen aktiv ist

### 3 - Ergebnisse

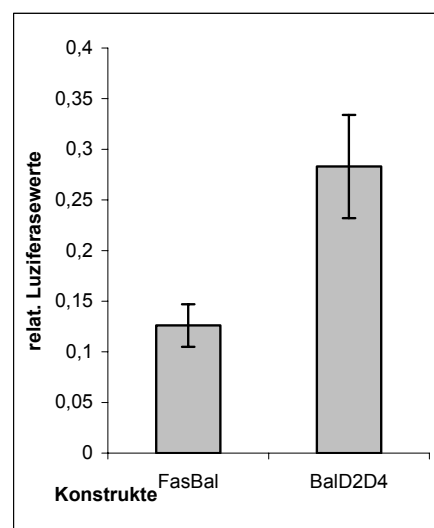


**Abbildung 23 - relat. Luziferaseaktivität der Bal-Konstrukte in HaCaT-Zellen**

Diagramm A zeigt die relat. Luziferaseaktivität nach Transfektion der Zellen mit der Calcium-Phosphat-Methode – bei Diagramm B und C wurden die Zellen mittels Lipofektion transfiziert. Alle untersuchten Bal-Konstrukte zeigen in HaCaT-Zellen keine stärkere Expression als das Referenzkonstrukt Fascin2.7Bal bzw. das Konstrukt Fascin0.21, das dem Basalpromotor entspricht

## 3.6 Aktivität des humanen Fascin-Promotors in der murinen Zelllinie XS106

Wie unter 3.5.1 erwähnt, verfügt der humane Fascin-Promotor über Homologieregionen, die sequenzgleich mit dem murinen Fascin-Promotor sind (Bros et al.; 2003). Die Spezifität auf Dendritische Zellen wird durch die Homologieregion AB vermittelt. Basierend auf diesen Erkenntnissen, sollte der humane Fascin-Promotor auch in Maus-Zellen eine Aktivität besitzen. Diese dürfte aufgrund des Wechsels in eine andere Spezies möglicherweise aber geringer ausfallen. Für das Experiment wurde die murine Zell-Linie XS106 gewählt, die ein Modell für reife dendritische Zellen darstellt (Xu et al.; 1995). Der Reifestatus der DC ist von besonderer Bedeutung, da die Elemente der Homologieregion AB vor allem in reifen DCs genutzt werden. Die Zelllinie XS106 bietet darüber hinaus eine Reihe weiterer Vorteile: Es handelt sich um Zellen, die eine hohe Verdopplungsrate besitzen, so dass recht schnell die erforderliche Zellzahl für Experimente erhalten werden kann, außerdem sind sie durch verschiedene Methoden gut zu transfizieren. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden die Konstrukte Fascin2.7Bal und BalD2D4 verwendet. Es zeigte sich, dass beide Konstrukte in den Maus-Zellen aktiv waren. Darüber hinaus konnte zwischen den beiden Konstrukten ein ähnlich großer Unterschied in der Luziferaseexpression festgestellt werden, wie in humanen DC. Die XS106-Zellen scheinen sich als Modell für die Untersuchung der Promotorduplikationen zu eignen.



**Abbildung 24 - Aktivität des humanen Fascin-Promotors in der murinen Zelllinie XS106**

Dargestellt sind die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität und die entsprechenden Standardabweichungen. Neben der Aktivität des Basis-Fascin-Konstrukts lässt sich auch die Expressionssteigerung nach Duplikation von Promotorbereichen in der murinen Zelllinie abbilden.

#### **3.7 Verstärkung der Expressionseffizienz transfizierter Reporter- genkonstrukte in DC durch Verbesserung des Kerntransports**

Dendritische Zellen sind schwierig mit Plasmid-DNA zu transfizieren (Strobel et al.; 2000), die Transfektion mit mRNA (Ponsaerts et al.; 2002; Boczkowski et al., 1996) hingegen ist relativ gut möglich. Die mRNA kann sofort, nachdem sie ins Zytoplasma gelangt ist, in Protein translatiert werden. Für die Expression eines plasmidcodierten Gens ist das Einwandern der DNA in den Zellkern erforderlich, damit mRNA gebildet werden kann. Bei Dendritischen Zellen handelt es sich um differenzierte Zellen, die nicht mehr der Zellteilung unterliegen. Ein Einschleusen der DNA während der Umorganisation des Zellkerns bei der Mitose ist somit nicht gegeben. Kleinere Moleküle gelangen passiv durch Diffusion in den Kern. Plasmid-DNA kann lediglich durch aktive Prozesse in den Zellkern aufgenommen werden. Somit ist die Expression des plasmidcodierten Gens stark durch den Kerntransport limitiert. Mesika und Mitarbeiter konnten 2001 zeigen, dass durch Einfügen einer repetitiven NF $\kappa$ B-Bindungssequenz in das Plasmid außerhalb des Promotorbereichs die Expression des Reportergens Luziferase in Zelllinien deutlich gesteigert werden kann. Im unstimulierten Zustand liegen die NF $\kappa$ B-Moleküle gekoppelt an I $\kappa$ B vor. Durch zellulären Stress oder Stimuli wie Lipopolysaccharid, Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin 1-  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) kann die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges erfolgen. I $\kappa$ B wird phosphoryliert und die NF $\kappa$ B-Moleküle translozieren in den Kern. Die aktivierten NF $\kappa$ B-Moleküle assoziieren bereits im Zytoplasma über ihre Bindungssequenz mit der Plasmid-DNA. Um Ihre Wirkung als Transkriptionsfaktoren zu entfalten, müssen die NF $\kappa$ B-Moleküle aus dem Zytoplasma über Trägerproteine in den Zellkern eingeschleust werden. Auf diese Weise kann deutlich mehr Plasmid-DNA in den Kern gelangen und transkribiert werden. Der NF $\kappa$ B-Weg spielt in Dendritischen Zellen ebenfalls eine zentrale Rolle (Ardeshtna et al.; 2000): Nach Aufnahme eines Antigens durch DC, erfahren diese eine Ausreifung, wobei es zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  kommt. Die Ausreifung wird u. a. durch den NF $\kappa$ B-Weg vermittelt und kann durch die genannten Stimuli induziert werden. Die angesprochene Methode sollte somit eine ideale Möglichkeit zur Verbesserung der Expressionseffizienz von Reportergenkonstrukten nach ihrer Transfektion in DC darstellen.

### 3 - Ergebnisse

#### 3.7.1 Einfluss einer plasmidlokalisierten NFkB-Bindungssequenz auf die Expression der Reportergene EGFP / Luziferase in hDC

##### 3.7.1.1 Herstellung der Konstrukte pFascin2.7NFkB-Luc bzw. pFascin2.7EGFP

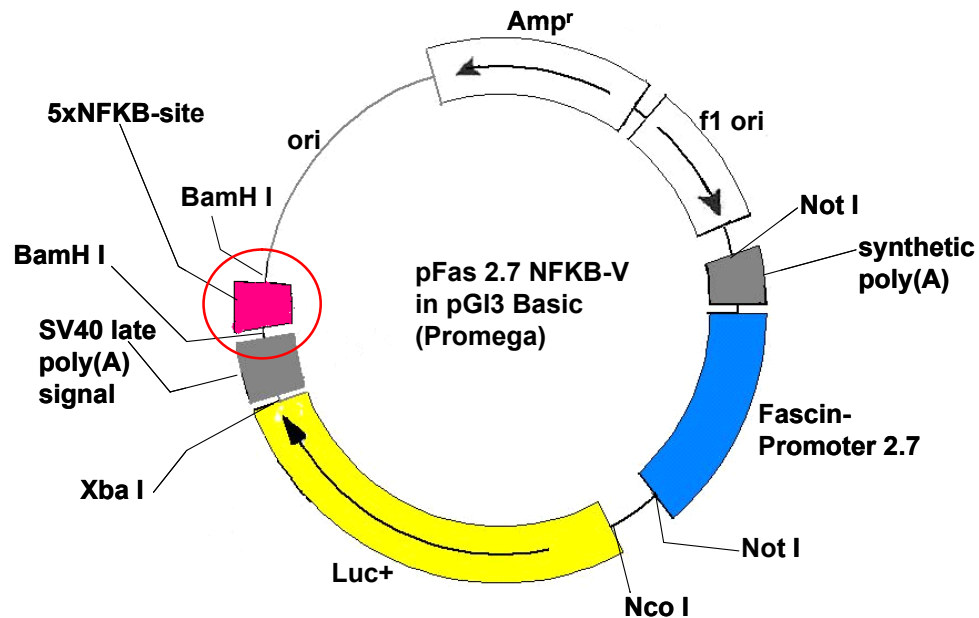


Abbildung 25 - Vektorkarte von pFascin2.7NFkB: Lokalisation der NFkB-Bindungsstelle

außerhalb des Promotorbereichs an einer inerten Stelle im Plasmid. Bindendes NFkB kann aufgrund der Position der Bindungsstelle nur eine Transportfunktion vermitteln, nicht aber eine direkte Verstärkung der Promotoraktivität, die üblicherweise durch Bindung von Transkriptionsfaktoren in Promotorbereichen vermittelt wird.

Der Vektor pNFkB-Luc<sup>®</sup> von Stratagene wurde mit dem Restriktionsenzym Sac II geschnitten, durch eine anschließende Klenow-Reaktion wurden die überhängenden Enden durch Auffüllen mit komplementären Basen geglättet. Parallel dazu wurde der Klonierungsvektor pZErO2.1<sup>®</sup> mit EcoRV verdaut<sup>58</sup> und beide linearisierten Vektoren ligiert. Das entstandene Fusionsplasmid wurde mit dem Restriktionsenzym BamH I geschnitten. Dadurch wurde der größte Teil des Vektors NFkB-Luc<sup>®</sup> wieder aus dem Plasmid ausgeschnitten. Im Klonierungsbereich des pZErO2.1<sup>®</sup> verblieb nur die 5fach repetitive NFkB-Bindungssequenz. Das Plasmid wurde erneut ligiert. So wurde der Klon pZErO5xNFkB erhalten. Für die weiteren Klonierungsarbeiten wurden die Vektoren pZErO5xNFkB und pFascin2.7 BamH I verdaut und fusioniert. Durch Restriktion des Fusionskonstrukts mit Nsi I konnte der Vektor pZErO2.1<sup>®</sup> zum größten Teil wieder entfernt

<sup>58</sup> EcoRV erzeugt ebenfalls glatte Enden

### 3 - Ergebnisse

---

werden. In die BamH I-Schnittstelle von pFascin2.7 wurden nur die 5xNFKB-Bindungssequenz und ein Anteil des Klonierungsbereichs von pZErO2.1<sup>®</sup> übertragen. Der linearisierte Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym Kpn I nachverdaut und die Enden mit Klenow-Enzym aufgefüllt. Dadurch konnte der verbliebene Anteil des Klonierungsbereichs von pZErO2.1<sup>®</sup> weitgehend entfernt werden. Durch die Generierung von glatten Enden und anschließende Ligation konnte eine neue BamH I-Schnittstelle geschaffen werden, so dass sich die NFKB-Bindungssequenz innerhalb von zwei BamH I-Schnittstellen befand. So wurde das Plasmid pFascin2.7NFKB erhalten, das für die nachfolgenden Untersuchungen verwendet wurde. Die 5fache NFKB-Bindungssequenz befindet sich an einer Stelle im Vektor (vgl. Abbildung 25), an der sie keine expressionsverstärkende Wirkung durch Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors vermitteln kann. Dieser soll lediglich eine Transportfunktion ausüben!

Zur Untersuchung der Expressionseffizienz auf Einzelzellebene wurde anstatt der Luziferase als Reporter gen EGFP<sup>59</sup> verwendet. Zur Herstellung des entsprechenden Konstrukts wurde mittels PCR und pFascin2.7NFKB als Matrize ein Bereich, der die zwei BamH I-Schnittstellen überspannt (enthält die NFKB-Bindungssequenz), amplifiziert. Nach Aufreinigung des resultierenden PCR-Produkts wurde mit dem Restriktionsenzym BamH I nachverdaut. Parallel dazu wurde das Konstrukt Fascin2.7EGFP<sup>60</sup>, das nach dem Reporter gen EGFP eine singuläre BamH I-Schnittstelle besitzt, ebenfalls mit diesem Enzym geschnitten. Das PCR-Produkt, das durch den Restriktionsverdau über kompatible Enden verfügte, wurde in die BamH I-Schnittstelle von pFascin2.7EGFP einkloniert. Da es sich bei der 5fachen NFKB-Bindungsstelle um ein Palindrom handelte, musste auf die Orientierung nicht geachtet werden.

---

<sup>59</sup> enhanced green fluorescent protein - verstärkt grünfluoreszierendes Protein

<sup>60</sup> hergestellt durch Bros et. al, 2003

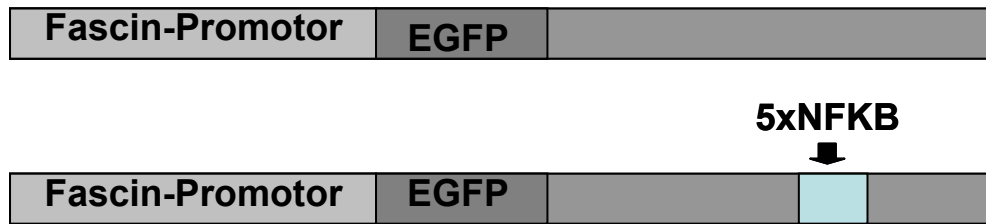


Abbildung 26 - Fascin2.7 EGFP+/-NFkB - Übersicht Konstrukte

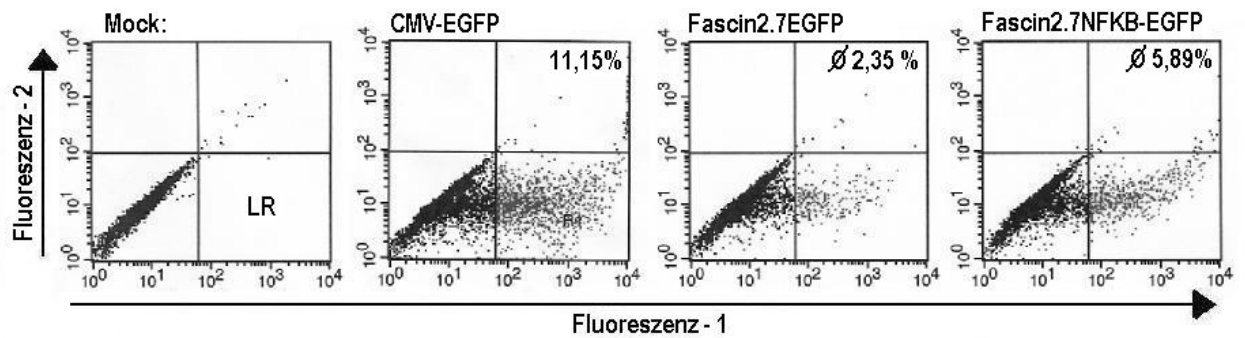
Schematische Darstellung der Konstrukte zur Verdeutlichung, dass die NFkB-Bindungsstelle ebenfalls außerhalb des Promotorbereiches an inerte Stelle im Plasmid lokalisiert ist (nicht maßstabsgetreu). Die EGFP-Konstrukte sind analog den Luciferase-Konstrukten angelegt, lediglich das Reportergen ist unterschiedlich.

#### 3.7.1.2 Transfektion der Konstrukte Fascin2.7NFkB in hDC

Zur Untersuchung des Einflusses einer plasmidlokalisierten NFkB-Bindungsstelle auf die Expression eines Reportergens in hDC auf Einzelzellebene wurden zunächst die unter 3.7.1.1 beschriebenen EGFP-Konstrukte in hDC transfiziert. Als Transfektionsverfahren diente die Methode der Firma Amaxa GmbH (Lenz et al., 2003). Wie unter 2.2.2.6.1.1 beschrieben, handelt es sich bei dieser Methode um eine Elektroporation, die im verwendeten Puffer zusätzlich eine Komponente enthält, die eine Nukleofektion vermittelt. Es stellt die derzeit beste Methode dar, Dendritische Zellen transient zu transfizieren, so dass eine hohe Expressionseffizienz resultiert. Die Hypothese war, dass, durch Einfügen der NFkB-Bindungsstelle in das Plasmid, mehr Zellen in der Lage sind, EGFP zu exprimieren und dass der Anteil stärker positiver Zellen zunehmen sollte. Die Auswertung des Experiments erfolgte mit dem Durchflusscytometer durch Bestimmung der Fluoreszenzintensität des EGFP.

Obwohl die Konstrukte mindestens in **Triplikat**ansätzen getestet wurden, war die **Varianz** des Mittelwerts teilweise recht groß, so dass die Unterschiede zwischen den Konstrukten weniger deutlich ausfielen. Eine statistische Auswertung mit dem Student t-Test unter Annahme eines Konfidenzintervalls von 0,05 war weder für die Betrachtung der mittleren Fluoreszenzintensität stark EGFP-positiver Zellen noch basierend auf den Unterschieden in der Anzahl dieser Zellen für keines der Experimente signifikant. Tendenziell bestätigte sich aber die Hypothese bezüglich einer Zunahme EGFP-positiver Zellen und einer Verstärkung der Fluoreszenzintensität. Abbildung 27 zeigt exemplarisch jeweils 1 Schaubild / Konstrukt aus einem von vier durchgeführten Experimenten in der logarithmischen Darstellung Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2.

### 3 - Ergebnisse

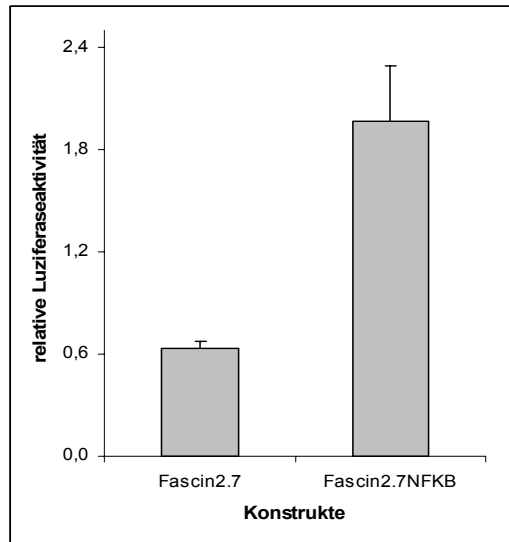


**Abbildung 27 – Expression Fascin2.7EGFP+/-NFkB in hDC (Amaxa)**

Analyse der EGFP-pos. Zellen mittels Cytofluorometer nach Transfektion der Konstrukte in hDC mit der Amaxa-Methode. hDC im unteren rechten Quadranten (LR) wurden als EGFP-pos. betrachtet. Abb. 24 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines von vier Experimenten. Bei den Fascin-Konstrukten wurden Triplikatansätze gemacht, gezeigt ist jeweils ein Schaubild (vgl. Ø Expressionseffizienz), logarithmische Darstellung, Fluoreszenz 1 gegen 2.

Um nachzuweisen, dass die Zunahme der EGFP-pos. Zellen nicht allein auf Schwankungen in der Expressionseffizienz beruhte, wurden parallel die Fascin2.7-Luziferase-Konstrukte in hDC getestet. Die Quantifizierung der Luziferaseexpression (vgl. 2.2.2.8.1) erfolgt integrativ über eine gesamte Probe. Dieses Verfahren bot zusätzlich den Vorteil, dass durch die Kotransfektion zweier Luziferasen unterschiedliche Expressionseffizienzen innerhalb der Mehrfachwerte berücksichtigt bzw. nivelliert werden konnten. Der resultierende Unterschied konnte somit dem Einfluss der 5fachen NFkB-Bindungsstelle zugeordnet werden. Das Experiment wurde dreimal in Triplikatwerten durchgeführt und lieferte durchschnittlich eine 3,5fache Verstärkung der Luziferaseexpression. Abbildung 28 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines der drei durchgeführten Experimente.





**Abbildung 28 - Expression der Luziferase-Konstrukte Fascin2.7+/-NFKB in hDC**

mit der Amaxa-Methode. Gezeigt ist ein Ergebnis von drei gleichwertigen Experimenten (durchgeführt in Triplikatanalysen). Durch Einführung der 5fachen NFKB-Bindungsstelle in das Plasmid konnte durchschnittlich eine Verstärkung der Luziferaseexpression um den Faktor 3,5 erreicht werden.

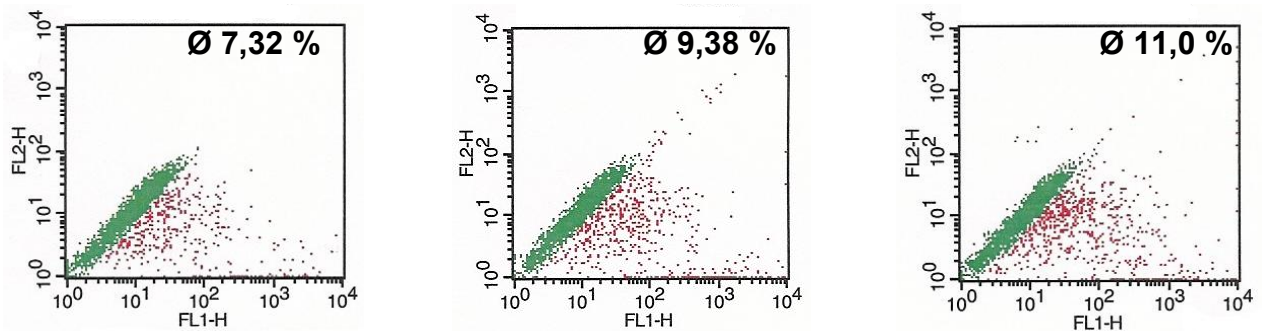
#### **3.7.1.3 Etablierung einer Methode zur Transfektion der hDC durch Elektroporation**

Die Transfektionsmethode der Firma Amaxa nutzt zur Erreichung hoher Expressionseffizienzen bereits eine Komponente im Transfektionspuffer, die einen Kerntransport vermittelt. Dieser Sachverhalt könnte den Effekt, der aus der plasmidlokalisierten NFKB-Bindungssequenz resultiert, modulieren. Um den potentiellen Einfluss dieser Nukleofektion abzuschätzen, musste zunächst ein Verfahren etabliert werden, mit dem Dendritische Zellen ohne Zuhilfenahme einer solchen Komponente transfiziert werden können. Dabei stellt die Elektroporation die aussichtsreichste Möglichkeit dar, um wenigstens eine geringe Expressionseffizienz zu erreichen (Lundqvist et al.; 2002). Unter Berücksichtigung der bereits publizierten Literatur (Van Tendeloo et al.; 2001; Mu et al.; 2003) wurden unterschiedliche Protokolle (Strobel et al.; 2000; Van Meirvenn et al., 2002) getestet und aufgrund des erfolgsversprechendsten Ansatzes die Etablierung eines Elektroporationsverfahrens mittels Squarepuls angestrebt (Saeboe-Larssen et al.; 2002). Basierend auf den in der Publikation dargestellten Erkenntnissen wurde eine Methode unter Berücksichtigung der in unserem Labor gegebenen Parameter etabliert. Änderungen bestanden im Wesentlichen in der Verwendung eines anderen Puffers mit geringerer Ionenstärke und einer verkürzten Pulszeit bei geringfügig erhöhter Spannung (vgl. 2.2.2.6.1.2). Abbildung 44 im Anhang dieser Arbeit gibt einen Überblick über die getesteten Parameter. Mit diesem Protokoll konnte eine Expressionseffizienz in hDC erreicht werden, die unter dem CMV-Promotor bei durchschnittlich 7,5% lag. Im

### 3 - Ergebnisse

besten Fall wurden 16% erreicht, dabei scheint die jeweilige Beschaffenheit der hDC-Präparation einen entscheidenden Einfluss auf die Höhe der Expressionseffizienz auszuüben.

Eine Weiterentwicklung dieser Methode mit einem Elektroporationspuffer der Firma GeneTrend führte zwar zu einer moderaten Steigerung der Expression im Vergleich zum etablierten Verfahren, jedoch blieb diese weit hinter den Erwartungen zurück. Weitere Optimierungen mit diesem Puffer wurden aus Kostengründen nicht unternommen. Im Zusammenhang mit der Etablierung der Transfektionsmethode wurde u. a. auch versucht, durch Hinzufügen von Cytosol- bzw. Kernextrakten in unterschiedlichen Mengen zum Elektroporationspuffer, eine Steigerung der Expressionseffizienz zu erreichen. Die Cytosol- bzw. Kernextrakte wurden durch Aufarbeiten frisch isolierter PBMC hergestellt. Eine Verbesserung der Expressionseffizienz konnte auf diese Weise leider nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch die Optimierungsversuche mit dem GeneTrend-Reagenz.



**A)** Standard-Puffer, 2825 V/cm

Pulszeit: 0.23, 10 µg DNA (CMV-Promotor), 2 mm Küvette

**B)** GeneTrendPuffer, 2825 V/cm, **C)** GeneTrendPuffer, 2900 V/cm

Pulszeit: 0.23, 10 µg DNA (CMV-Promotor), 2 mm Küvette

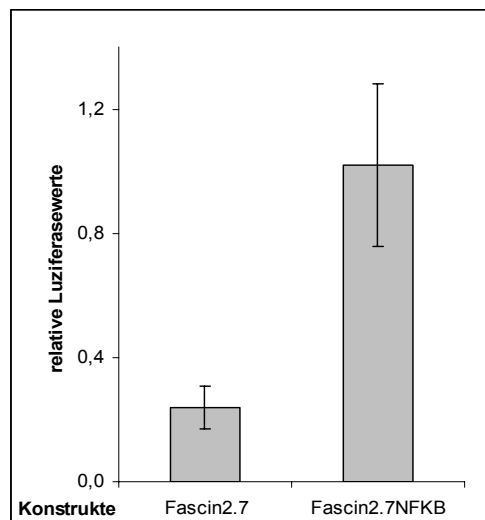
Pulszeit: 0.23, 10 µg DNA (CMV-Promotor), 2 mm Küvette

#### Abbildung 29 - Optimierungsversuch Elektroporation durch Verwendung des GeneTrend Puffers

Expressionseffizienz eines CMV-EGFP-Konstrukts A) unter den etablierten Bedingungen der Squarepuls-Methode – B) unter Verwendung der gleichen Geräteparameter, aber mit dem GeneTrend-Puffer – C) unter Verwendung des GeneTrend-Puffers und im Vergleich zu den Standardbedingungen erhöhter Voltzahl. Gezeigt ist jeweils ein Schaubild des in Triplikaten durchgeführten Experiments

#### 3.7.1.4 Einfluss der plasmidlokalisierten NFkB-Bindungsstelle auf die Expressionseffizienz nach Transfektion der hDC durch Elektroporation

Wie unter 3.7.1.2 angemerkt, nutzt die Transfektionsmethode der Firma Amaxa GmbH im Elektroporationspuffer eine unbekannte Komponente, die einen Kerntransport ausübt. Eine Interaktion bzw. ein Überlagerungseffekt mit der Wirkung der 5fachen NFkB-Bindungsstelle musste in Erwägung gezogen werden. Um diesen Sachverhalt zu untersuchen, wurde das unter 3.7.1.3 beschriebene Verfahren zur Transfektion der hDC mittels Squarepuls-Elektroporation genutzt. Zunächst wurden wieder die Konstrukte mit dem Reporter gen EGFP eingesetzt, um das Ausmaß einer potentiellen Expressionssteigerung durch die 5fache NFkB-Bindungsstelle auf Einzelzellebene zu testen. Das Experiment wurde zweimal in Triplikatsansätzen durchgeführt und lieferte ein vergleichbares Ergebnis, wie es unter Verwendung der Amaxa-Methode erhalten worden war. Die Expressionseffizienz der Konstrukte unter dem Fascin-Promotor war aber wesentlich geringer (Daten nicht gezeigt). Die Durchführung des Student t-Test konnte für eines der beiden Experimente (Konfidenzintervall 0,05) einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Konstrukten belegen, die Analyse des anderen Experiments ergab keine Signifikanz.



**Abbildung 30 - Expression Fascin2.7LUC +/- NFkB-Bindungsstelle (Squarepulsmethode)**

Gezeigt ist ein Ergebnis von drei gleichwertigen Experimenten (durchgeführt in Triplikatsansätzen). Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität und die zugehörigen Standardabweichungen: Auch mit der Squarepulsmethode konnte eine Expressionsteigerung des Fascin2.7NFkB-Konstrukts erhalten werden, vergleichbar mit der Transfektion durch die Amaxa-Methode, so dass die Expressionssteigerung auf die Einführung der zusätzlichen Kernlokalisierungssequenz (NFkB-Bindungsstelle) zurückgeführt werden kann.

### 3 - Ergebnisse

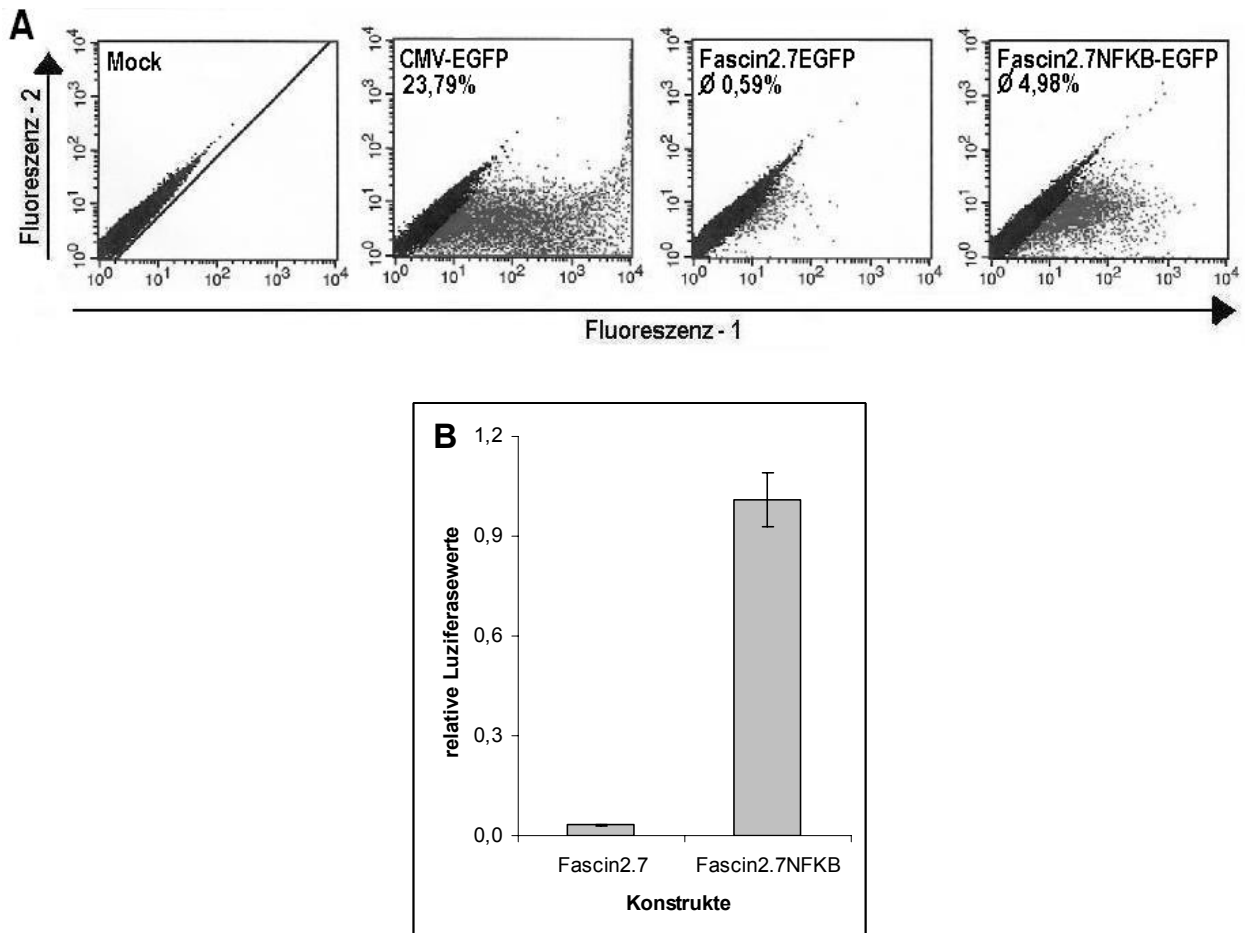
---

Im nächsten Schritt wurden die Luziferasekonstrukte unter Verwendung der Squarepuls-Methode in hDC getestet. Das Experiment wurde dreimal in Triplikatansets durchgeführt und lieferte durchschnittlich eine Vervierfachung der Luziferaseexpression. Damit zeigte sich sowohl in Qualität als auch Quantität ein vergleichbares Ergebnis mit den Experimenten, die mit der Amaxa-Methode durchgeführt worden waren. In der vorangestellten Abbildung 30 ist exemplarisch das Ergebnis eines der drei Experimente dargestellt.

#### **3.7.1.5 Transfektion der Konstrukte Fascin2.7 +/- NFkB in XS106**

Unter 3.6 wurde bereits gezeigt, dass der humane Fascin-Promotor auch in Mauszellen aktiv ist, so dass bei einer Transfektion dieser Konstrukte in die XS106 Zell-Linie eine hinreichend starke Expression resultieren sollte. Mit den nachfolgenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch Einführen einer NFkB-Bindungsstelle neben den beschriebenen Zell-Linien (vgl. Mesika et al.; 2001) auch in Dendritischen Zellen einer Mauslinie eine Verstärkung der Expression zu erhalten war. Sowohl mit dem Reporter genen Luziferase als auch mit EGFP konnte eine Verstärkung durch die NFkB-Bindungsstelle erreicht werden, die in beiden Fällen hochsignifikant war. Es wurden mit beiden Reporter genen jeweils zwei Experimente in Quadruplikaten durchgeführt. Die Luziferaseexpression verstärkte sich durchschnittlich um den Faktor 25, bei der EGFP-Expression konnte ca. eine Verzehnfachung detektiert werden. Abbildung 31 zeigt exemplarisch für ein Experiment die Verstärkung der Expression beider Reporter gene.

### 3 - Ergebnisse



**Abbildung 31 - Expression Fascin2.7 +/-NFKB in XS106**

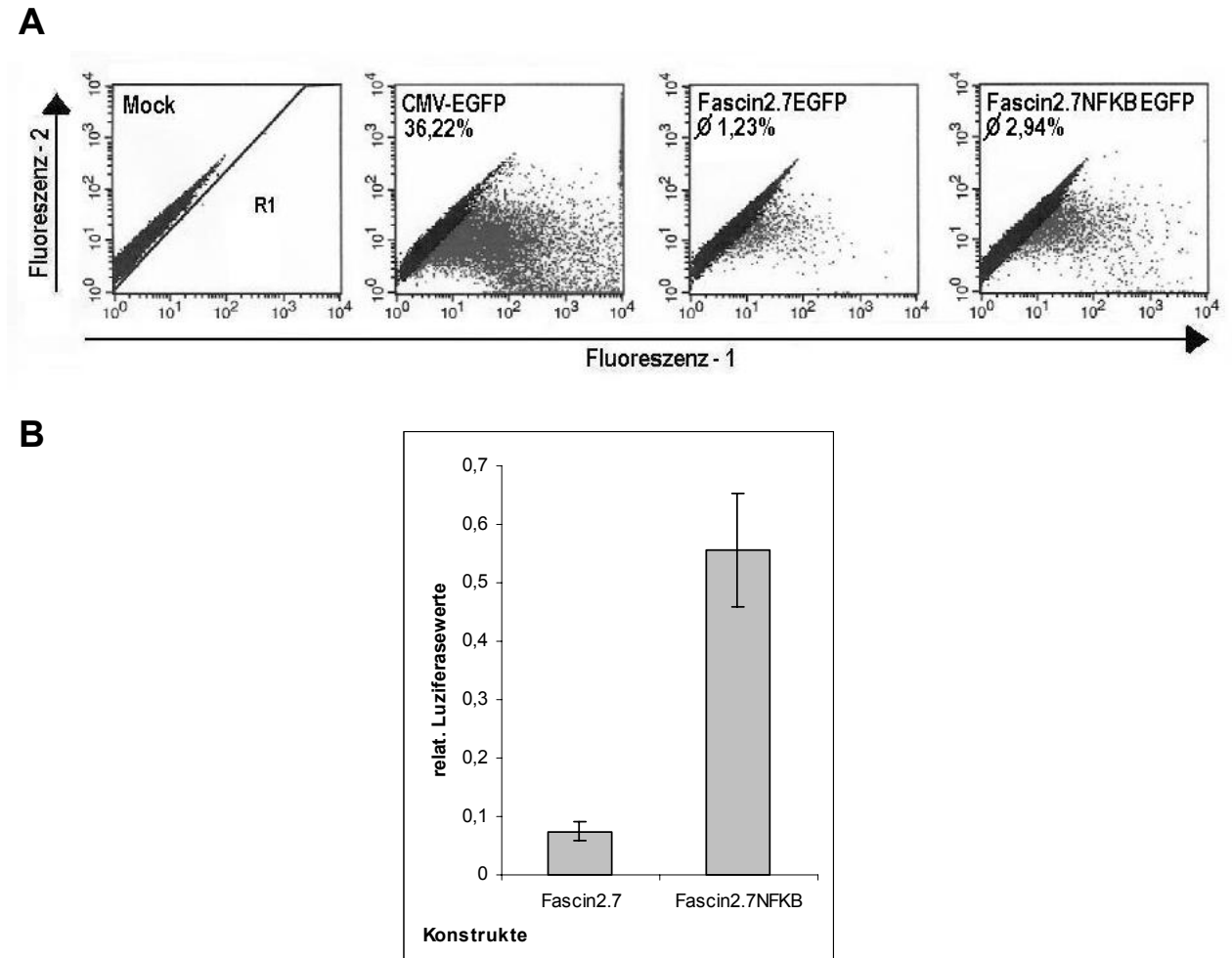
A – Analyse der EGFP-pos. Zellen mittels Cytofluorometer nach Transfektion der Konstrukte in XS106 mit der DEAE-Dextran-Methode. Die Experimente wurden jeweils in Quadruplikatansätzen durchgeführt. Abb. 32a zeigt exemplarisch das Ergebnis eines dieser Experimente, logarithmische Darstellung, Fluoreszenz 1 gegen 2. B – Expressionssteigerung des Fascin-Luziferase-Konstrukts in XS106 nach Einführen der NFKB-Bindungsstelle. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität und die zugehörigen Standardabweichungen: Sowohl auf Einzelzellebene (EGFP-pos. Zellen) als auch mit den Luziferasekonstrukten konnte eine hochsignifikante Steigerung nachgewiesen werden.

#### 3.7.1.6 Nachweis der Spezifität auf DC – Transfektion in HaCaT

Sowohl für das Reporter gen EGFP und noch deutlicher für die Luziferasekonstrukte konnte in hDC durch Einführen einer NFKB-Bindungsstelle in das Plasmid eine Verstärkung der Expression erreicht werden. Im weiteren Verlauf musste nun getestet werden, ob durch dieses Vorgehen die Spezifität des Fascin-Promotors auf hDC noch erhalten geblieben war. Zur Untersuchung dieses Sachverhalts wurden sowohl die Luziferase- als auch die EGFP-Konstrukte in die Keratinozyten-Zelllinie HaCaT transfiziert. Mit beiden Reporter genen konnte in den HaCaT-Zellen ebenfalls eine deutliche Verstärkung der Expression festgestellt werden!!! Die Experimente wurden jeweils in Triplikatansätzen und für das Reporter gen Luziferase fünfmal durchgeführt, für

### 3 - Ergebnisse

das EGFP-Konstrukt zweimal getestet. In allen Experimenten bestätigte sich das Ergebnis, dass durch die NFkB-Bindungsstelle im Plasmid die Spezifität des Fascin-Promotors auf Dendritische Zellen verloren gegangen war. Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Experiments sowohl für das Reporter-Gen Luziferase als auch für das EGFP.



**Abbildung 32 - Expression Fascin2.7 +/-NFkB in HaCaT**

A – Analyse der EGFP-pos. Zellen mittels Cytofluorometer nach Transfektion der Konstrukte in HaCaT durch Lipofektion (Gene-Porter-Reagenz). Die Experimente wurden jeweils in Triplikatsansätzen durchgeführt. Abb. 33a zeigt exemplarisch das Ergebnis eines dieser Experimente, logarithmische Darstellung, Fluoreszenz 1 gegen 2. B – Expressionssteigerung des Fascin-Luziferase-Konstrukts in HaCaT nach Einführen der NFkB-Bindungsstelle. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte der Quotienten aus Photinus- und Renilla-Luziferaseaktivität und die zugehörigen Standardabweichungen: Nach Transfektion der Konstrukte in HaCaT-Zellen lässt sich sowohl eine höhere Anzahl EGFP-positiver Zellen als auch eine Steigerung der Luziferaseexpression nachweisen. Durch Einführen der NFkB-Bindungsstelle scheint ein Verlust der Spezifität des Fascin-Promotors auf Dendritische Zellen zu resultieren.

#### 3.7.1.7 Untersuchungen der Fascinpromotor-eigenen NFkB-site

Grundsätzlich war durch Einführen einer NFkB-Bindungsstelle in das Plasmid eine Verstärkung der Expression eines Reportergens unter dem Fascin-Promotor in hDC möglich. Unglücklicherweise konnte unter diesen Bedingungen auch die Expression in nicht-dendritischen Zellen z.B. HaCaT verstärkt werden, was darauf schließen lässt, dass die Spezifität des Fascin-Promotors auf Dendritische Zellen verloren ging. Wie unter 3.5.2 bereits beschrieben, verfügt der humane Fascin-Promotor über drei mit dem murinen Fascin-Promotor strukturell konservierte Bereiche, die Homologieregionen A, B und C. Die Homologieregion A besitzt eine NFkB-Bindungsstelle, die sich nur in 2 Basen von der konsensus-NFkB-Bindungsstelle unterscheidet. In der Literatur sind mehrere geringfügig strukturell unterschiedliche Bindungsstellen bekannt (vgl. Huang et al., 2006). Moleküle der NFkB-Familie sollten also in diesem Bereich binden können. Welche Mitglieder aus der Familie der NFkB-Transkriptionsfaktoren tatsächlich mit dieser Bindungsstelle assoziieren war nicht bekannt. Es gibt derzeit 5 bekannte Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorenfamilie: RelA (p65), RelB, c-Rel, NFkB-1 (p50) und NFkB-2 (p52). Diese können in unterschiedlicher Zusammensetzung als Homo- oder Heterodimere mit der NFkB-Bindungsstelle assoziieren. Eventuell ist die Zusammensetzung dieser Heterodimere für DC spezifisch bzw. vielleicht gibt es tatsächlich noch weitere bislang unbekannte Mitglieder dieser Familie, die an diese Bindungsstelle anbinden. Unter Ausnutzung der Translokation dieser Moleküle in den Zellkern könnte auf diese Weise ein spezifischer Kerntransport stattfinden. Im nächsten Schritt wurde geprüft, ob eine 5fach repetitive fascinpromotoreigene NFkB-Bindungsstelle an gleicher Stelle in das Plasmid eingefügt, wie die zuvor untersuchte konsensus NFkB-Bindungsstelle, ebenfalls zu einem verstärkten Kerntransport des Plasmids führt, unter Erhalt der Spezifität auf Dendritische Zellen.

##### 3.7.1.7.1 Herstellung des Konstrukts

Für die Herstellung des Konstrukts wurde ein Oligonukleotid entworfen, das fünfmal die Fascinpromotor eigene NFkB-Bindungsstelle direkt nacheinander geschaltet trug (vgl. 2.1.1.7). Das Oligonukleotid diente als Matrize, um mit einem Primerpaar im ersten Zyklus der PCR zunächst doppelstängige DNA zu erzeugen und dann das entstandene Produkt zu amplifizieren. Die zur Amplifikation verwendeten Oligonukleotide besaßen für weitere Klonierungsarbeiten jeweils 5'-lokalisiert eine BamH I- bzw. eine Bgl II-Schnittstelle. Das erhaltene PCR-Produkt wurde zunächst komplett und mit glatten Enden in die EcoRV-

### 3 - Ergebnisse

---

Schnittstelle von pZErO2.1<sup>®</sup> kloniert. So wurde das Konstrukt pZErONFKB-fas erhalten. Mit den Oligonukleotiden M13pZErO rev. und fwd. (vgl. 2.1.1.7) wurde die Klonierungsstelle von pZErO2.1<sup>®</sup> einschließlich des einklonierten NFKB-fas-Fragments amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Enzymen BamH I und Bgl II<sup>61</sup> geschnitten und in den Vektor pFascin2.7LUC<sup>62</sup> der ebenfalls mit BamH I verdaut worden war, einkloniert. Es resultierte das Konstrukt pFascin2.7NFKB-fas. Dem Reporter gen Luziferase wurde aufgrund der deutlicheren und besser standardisierbaren Ergebnisse (vgl. 3.7.1.2) der Vorzug gegeben. Für die nächsten Experimente wurde deshalb nur das Konstrukt pFascin2.7NFKB-fas verwendet.

#### 3.7.1.7.2 Transfektion von pFascin2.7NFKB-fas in DC

Das unter 3.7.1.7.1 hergestellte Konstrukt mit dem Reporter gen Luziferase wurde in hDC zunächst mit der Amaxa-Methode getestet. Eine Verstärkung der Expression, wie es unter Verwendung der NFKB-konsensus Bindungsstelle erreicht worden war, konnte nicht festgestellt werden. Das Experiment wurde zweimal in Triplikatanalysen durchgeführt und lieferte in beiden Fällen das gleiche Ergebnis. In der folgenden Abbildung 34A ist das Ergebnis eines der beiden Experimente dargestellt.

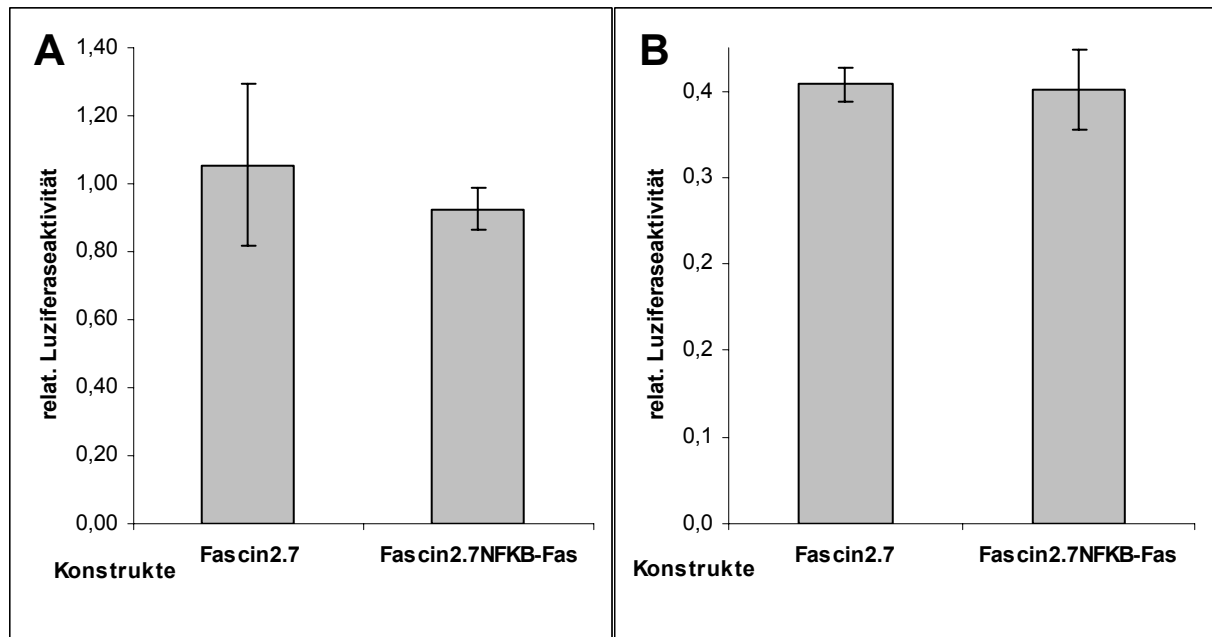
---

<sup>61</sup> das Restriktionsenzym Bgl II besitzt kompatible Enden zu einem BamH I geschnittenen Plasmid

<sup>62</sup> LUC = Luziferase



### 3 - Ergebnisse



**Abbildung 33 - Expression Fascin2.7NFKB-fas gegen Fascin2.7**

**A:** Transfektion in hDC mit der Amaxa-Methode – **B:** Transfektion in hDC mit der Squarepuls-Methode

Ein Expressionsunterschied zwischen beiden Konstrukten, basierend auf der Einführung der fascinpromotor-eigenen NFKB-Bindungsstelle in das Plasmid konnte mit beiden Verfahren nicht festgestellt werden

Zum weiteren Nachweis, dass die eingefügte Fascinpromotor-eigene NFKB-Bindungsstelle keinen Beitrag zur Expressionsverstärkung des Luciferasegens beitrug, wurden in zwei weiteren Experimenten (ebenfalls Triplikatansätze) die Konstrukte in hDC mit der Squarepuls-Methode getestet. Es zeigte sich dasselbe Ergebnis, wie es bereits nach Transfektion mit der Amaxa-Methode erhalten worden war (vgl. Abb. 34B). Auch nach Transfektion des Konstrukts in die murine DC-Zelllinie XS106 konnte kein Unterschied zwischen pFascin2.7 und pFascin2.7NFKB-fas festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Auf die Untersuchung in der Keratinozytenlinie HaCaT wurde verzichtet, da bereits in den DC keine Steigerung der Expression nachgewiesen werden konnte.

#### 3.8 Arbeiten zur Induktion von Immuntoleranz

DC sind die bislang einzigen bekannten Zellen des Immunsystems, die in der Lage sind, naive T-Lymphozyten zu stimulieren und so eine Immunantwort zu induzieren. Gleichzeitig können sie durch Präsentation des Antigen via MHC Klasse II auch bereits antigenkompetente T-Lymphozyten bei erneutem Kontakt mit dem Antigen aktivieren und diese zur Proliferation anregen. Final resultiert eine TH-Zell-Antwort, die das Immunsystem entscheidend moduliert. Die Wechselwirkung zwischen DC und T-Lymphozyt entsteht zunächst durch Kontakt mit dem via MHC II präsentierten Antigen und dem entsprechenden T-Zellrezeptor. Es kommt zur Ausbildung der Immunologischen Synapse, bei der zur Verstärkung der Wechselwirkung neben CD3 und CD4 Molekülen<sup>63</sup> auch kostimulatorische Moleküle und Adhäsionsmoleküle von Bedeutung sind. Die beiden letztgenannten Funktionsgruppen sind auf beiden Zellpopulationen - zelltypspezifisch - vorhanden. Jedes kostimulatorische Molekül besitzt einen entsprechenden Interaktionspartner auf der anderen Zelle. Wichtig für eine ausreichend starke T-Zell-Immunantwort ist eine ausreichend lange und starke Wechselwirkung zwischen DC und T-Lymphozyten. Sind einige der kostimulatorischen Moleküle nur schwach auf der Zelloberfläche exprimiert, kommt es entweder gar nicht oder nicht ausreichend stark zur Wechselwirkung mit seinem spezifischen Rezeptor bzw. Liganden auf der T-Zelle. Die Tatsache allein, dass die Expression zumindest eines kostimulatorischen Moleküls auf den DC verändert bzw. schwächer ist, gibt aber noch keine Auskunft, ob tatsächlich auch eine verminderte Dichte des Oberflächenmoleküls im Bereich der Immunologischen Synapse vorliegt. Einzig der Nachweis, dass keine Aktivierung von T-Zellen erfolgt, z. B. durch einen T-Zell-Stimulationstest oder T-Zell-Proliferationstest, bzw. dass der Kontakt mit den T-Zellen deren Expressionsmuster nicht in bekannter Weise moduliert, kann die Wirkung einer veränderten Oberflächenexpression von Kostimulatorischen Molekülen auf DC beweisen. Durch Einflussnahme auf die Expression der Oberflächenrezeptoren der Dendritischen Zellen könnte demnach die Qualität des Kontakts bzw. dessen Dauer mit der T-Zelle verändert werden. Zielsetzung ist hierbei nicht die völlige Unterdrückung einer Immunantwort bzw. der Ausbildung einer Immunologischen Synapse, sondern deren Modulation in eine tolerogene. Die resultierenden partiell oder verändert aktiven T-Zellen sollten auf das in diesem Kontext präsentierte Antigen zwar noch reagieren, aber keine

---

<sup>63</sup> flankieren den MHC II – T-Zellrezeptorkomplex

### 3 - Ergebnisse

---

typische Effektorfunktion mehr ausüben können. Sie sollten vielmehr den Status von sog. regulatorischen T-Zellen ( $T_{(reg)}$ ) annehmen. Auf diese Weise sollte es möglich sein, Toleranz gegen ein spezifisches Antigen zu erzeugen.

#### 3.8.1 Wirkung auf DC mittels pharmakologischer Inhibitoren

Wie unter 3.8 bereits angedeutet, stellt die Einflussnahme auf die Expression der Oberflächenmoleküle auf Dendritischen Zellen, besonders der Adhäsions- und Kostimulatorischen Moleküle, einen viel versprechenden Angriffspunkt dar, den Kontakt mit bzw. die Aktivierung der T-Zelle nach Antigenpräsentation zu beeinflussen und auf diese Weise die Ausbildung einer Immunantwort zu modulieren. Viele dieser Oberflächenproteine werden im Verlauf der Differenzierung bzw. Ausreifung der DC entweder ganz neu oder in verstärktem Ausmaß exprimiert. An den Differenzierungs- bzw. Ausreifungsprozessen von DC sind viele bekannte Signaltransduktionswege, wie z.B. der NFkB-Weg oder die MAP-Kinase<sup>64</sup> Signalwege beteiligt. Die regulatorischen Mechanismen der Expression von kostimulatorischen Molekülen sind häufig noch ungeklärt bzw. nur teilweise bekannt. Unreife weisen im Gegensatz zu reifen DC eine geringe Expression von kostimulatorischen Molekülen auf. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass die an der Ausreifung von DC beteiligten Signalwege auch einen Einfluss auf die Expression der Oberflächenproteine besitzen. Durch einen Eingriff in die Signaltransduktionskaskade der DC, die ganze Gruppen von Genen und Proteinen beeinflusst, kann mit großer Wahrscheinlichkeit auch die Expression der kostimulatorischen Moleküle verändert werden. Zur Untersuchung der einzelnen Signaltransduktionswege existiert mittlerweile eine große Anzahl vornehmlich chemischer Substanzen, mit denen gezielt bestimmte Moleküle in den Signalwegen inhibiert werden können. Unter Verwendung dieser pharmakologischen Inhibitoren kann in vitro eine Modulation der Signalwege in DC hervorgerufen werden, die final in der veränderten Expression zahlreicher Proteine u. a. auch der kostimulatorischen Moleküle resultiert. Nach einer intensiven Literaturrecherche, welche dieser Inhibitoren sich als besonders geeignet erweisen könnten, wurden zunächst zwölf Substanzen ausgewählt, die ganz zu Beginn (z.B. der PI3-Kinase-Hemmer LY294002) als auch ziemlich gegen Ende (z. B. der p38-MAP-Kinase-Hemmer SB203580) der Signalkaskade eingreifen. Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über die verwendeten Substanzen.

---

<sup>64</sup> MAP Kinase – mitogen activated protein Kinase – Mitogen aktivierte Proteinkinase

### 3 - Ergebnisse

---

Tabelle 6 - eingesetzte pharmakologische Inhibitoren

Nr.	Name des Inhibitors:	Beschreibung:
1	U0126	Spez. Inhibitor von MEK1 / MEK 2
2	PD98059	Spez. MAPKK Inhibitor
3	SB203580	inhibiert die MAPKAP Kinase 2 und die Aktivierung der RAF-1 Kinase
4	SP600125	selektiver Inhibitor der c-JUN-N-terminalen Kinase (JNK)
5	LY294002	Phosphoinositol-3-Kinase-Inhibitor
6	Manumycin A	Ras Inhibitor
7	GW5074	cRAF1 Kinase Inhibitor
8	KN-93	selektiver Ca <sup>2+</sup> / Calmodulin abhängige Proteinkinase-II-Inhibitor
9	NPC 15437	selektiver Proteinkinase C Inhibitor
10	Ro31-8220 Methylsulfonat	Inhibitor von GRK-5 (G-protein coupled receptor kinase), Proteinkinase C, MAPKAP Kinase 1 $\beta$
11	BAY 11-7082	Inhibitor Cytokin induzierter I $\kappa$ B $\alpha$ Phosphorylierung
12	Pyrrolidindithiocarbaminsäure (PDTC)	Inhibitor der NF $\kappa$ B Aktivierung

#### 3.8.1.1 Auswahl des Zellsystems

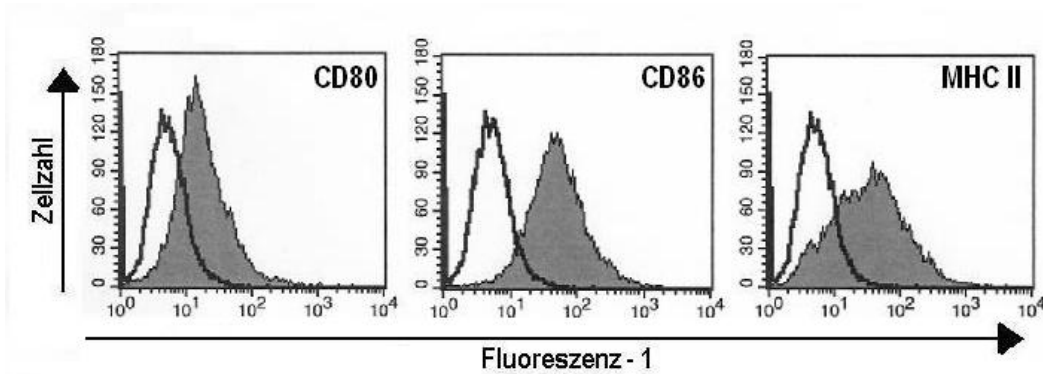
Für die Untersuchung der Auswirkung der pharmakologischen Inhibitoren wurde zunächst ein in vitro-Zellsystem benötigt. Der Vorteil eines solchen Systems besteht neben der Vermeidung von Tierversuchen auch darin, dass das Zellmaterial in großem Umfang zur Verfügung steht und alle Zellen einen einheitlichen Reifestatus besitzen. Die Verwendung einer solchen Zelllinie liefert die reproduzierbarsten Rahmenbedingungen für eine Inhibition. Aus den Ergebnissen können auch Hinweise hinsichtlich der Stabilität der Kostimulatorischen Moleküle erhalten werden. Zunächst wurde die murine XS106 Zelllinie eingesetzt, die dem Phänotyp reifer dendritischen Zellen entspricht. Der Fokus der untersuchten Oberflächenmarker fiel auf die zentralen kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 sowie auf die Expression von MHC Klasse II-Molekülen.

### 3 - Ergebnisse

---

#### 3.8.1.1.1 XS106 - Expression Oberflächenmarker

Die XS106-Zelllinie<sup>65</sup> weist die konstitutive Expression wichtiger kostimulatorischer Moleküle (CD80 – CD86) und von MHC Klasse II-Molekülen auf. Eine Expression des kostimulatorischen Moleküls CD40, das ebenfalls von zentraler Bedeutung ist, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.



**Abbildung 34 - XS106: Expression von Oberflächenproteinen**

nachgewiesen durch Inkubation mit dem jeweiligen Cy2 markierten Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein (ausgefüllte Kurve) im Vergleich zum Isotyp (schwarze Linie). Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse mittels Cytofluorometer (Fluoreszenz 1 gegen die Zellzahl, logarithmische Darstellung)

#### 3.8.1.1.1.1 XS106: Einschätzung der Toxizität mittels MTT-Test

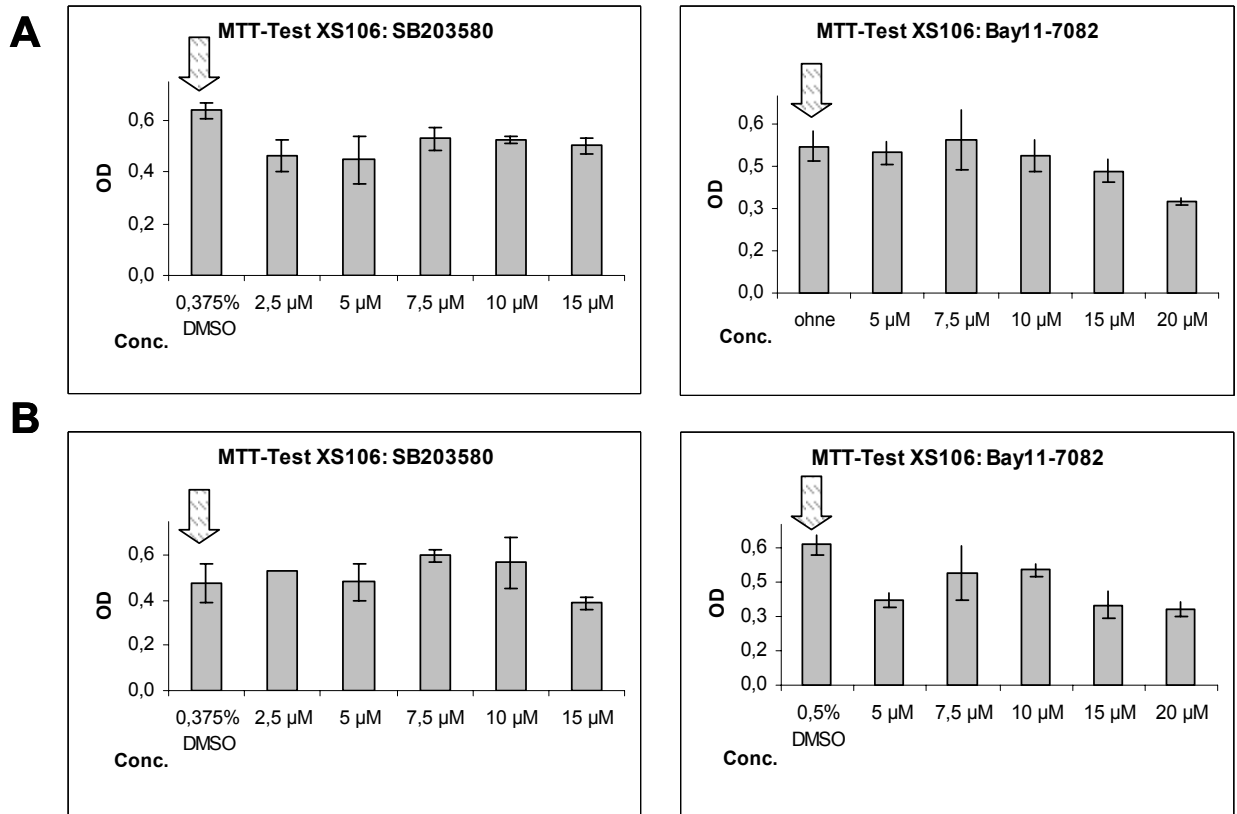
Für die XS106 Zell-linie existierten zu den verwendeten pharmakologischen Inhibitoren keine Informationen in welcher Konzentration diese eingesetzt werden könnten. Zur Abgrenzung von Toxizitätseffekten musste das eventuell vorhandene Toxizitätspotential nach Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen Inhibitor experimentell ermittelt werden. Für diesen Zweck wurde der MTT-Test eingesetzt. Der MTT-Test wurde für alle Inhibitoren insgesamt 3 Mal mit unterschiedlicher Inkubationsdauer (8h – 24h und 3 Tagen) durchgeführt. Zuvor war anhand der in der Literatur verfügbaren Informationen ein Konzentrationsbereich eingegrenzt worden, der als wenig toxisch erschien. Der Konzentrationsbereich wurde, wie in der Abbildung 36 ersichtlich, durch verschiedene Einzelkonzentrationen abgesteckt. Jede Konzentration wurde in Fünffachwerten getestet. Unter 2.2.2.9 im Material- und Methodenteil dieser Arbeit findet sich neben einer allgemeinen Beschreibung der Methode auch die definitiven Versuchsbedingungen für die Untersuchung an der XS106-Zell-linie. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen

---

<sup>65</sup> repräsentiert reife murine DC-Zellen, generiert aus Balb/c Mäusen

### 3 - Ergebnisse

exemplarisch das Toxizitätsprofil von SB203580 bzw. Bay11-7082 nach 3 tägiger bzw. 24-stündiger Inkubation.



**Abbildung 35 - XS106: Ermittlung des toxischen Potentials der pharm. Inhibitoren**

Inkubation der XS106-Zellen mit dem MAP-Kinase p38-Inhibitor SB203580 bzw. dem NFκB-Inhibitor Bay11-7082 A (obere Reihe): über 3 Tage und B (untere Reihe): über 24 h; Dokumentation der Zellviabilität mittels MTT-Test und Bestimmung der Absorption (OD<sup>66</sup>) des umgesetzten Farbstoffes bei 570 nm im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Inhibitor inkubiert wurden (vgl. Pfeil). Die Toxizität der Inhibitoren scheint sich nach 24 h stärker auszuwirken

Generell konnte für alle Inhibitoren beobachtet werden, dass die Toxizität bei einer Inkubation über 24 h stärker ausfiel im Gegensatz zu einer Inkubation über 3 Tage. Bei der 3-tägigen Inkubationszeit konnte mit Ausnahme der Zellen, die mit Manumycin A versetzt wurden, einem Inhibitor des Moleküls Ras, das in der Signalkaskade relativ am Anfang steht, durchschnittlich eine Überlebensrate von ca. 80% der Zellen registriert werden. Manumycin A wurde aufgrund der geringen toxischen Breite daraufhin für keine weiteren Experimente eingesetzt (Daten nicht gezeigt). Nach 24 h konnte bei allen untersuchten Inhibitoren eine stärkere Toxizität festgestellt werden: für den Inhibitor

<sup>66</sup> OD = optische Dichte, wird synonym zu dem Begriff Absorption verwendet

### 3 - Ergebnisse

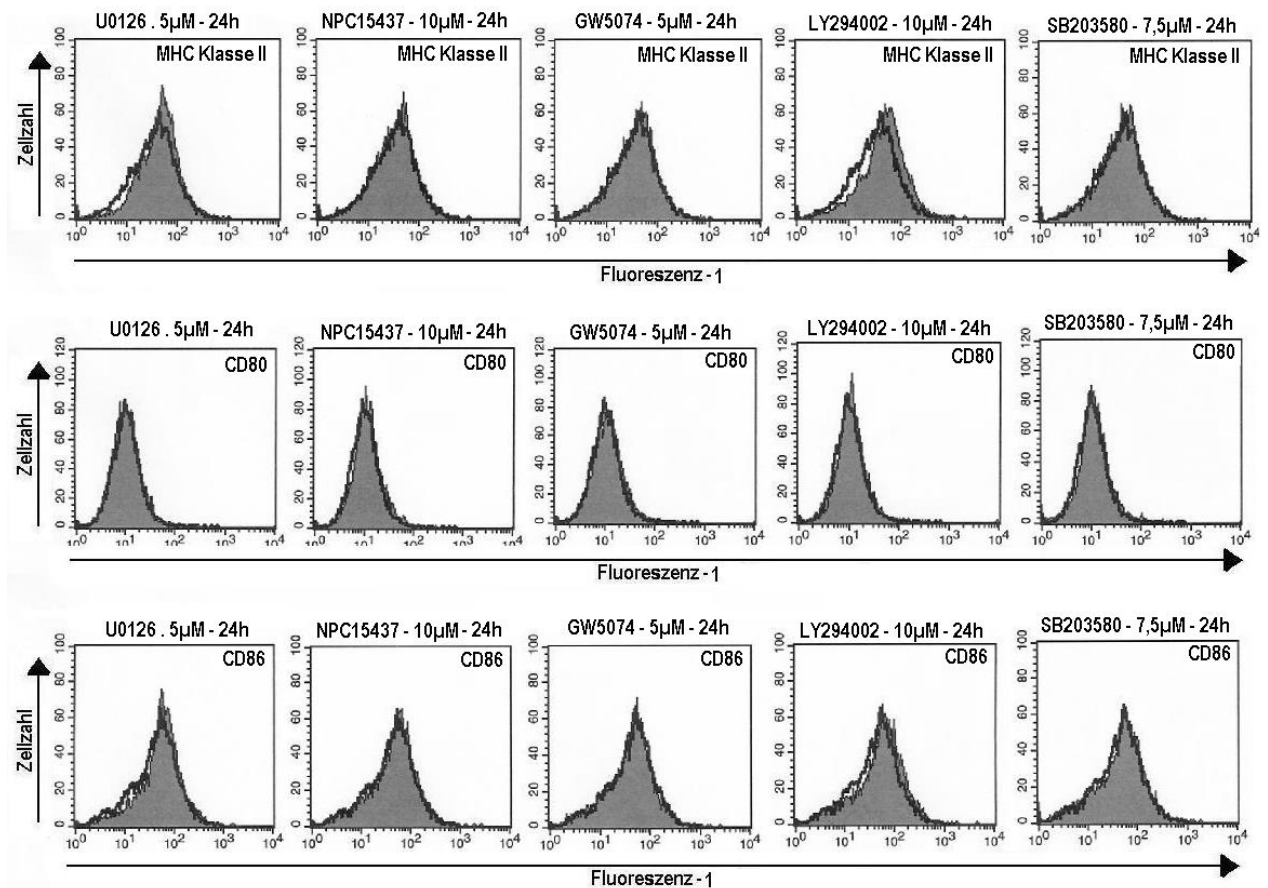
---

Bay11-7082 z. B. reduzierte sich die Überlebensrate der inkubierten Zellen auf knapp 50 Prozent in der höchsten untersuchten Konzentration.

#### **3.8.1.1.1.2 XS106: Einfluss der Inhibitoren auf die Expression von Oberflächenmarkern**

Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die über den MTT-Test erhalten wurden (vgl. 3.8.1.1.1.2), wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Expression der Oberflächenproteine CD80, CD86 und MHC II getestet. Zur Inkubation wurde ein Intervall von 24h bestimmt. Die eingesetzten Konzentrationen lieferten im MTT-Test mindestens eine Überlebensrate der behandelten Zellen von 75 Prozent, dennoch wurde angenommen, dass die Auswirkung auf die Expression der Oberflächenproteine am größten ausfallen könnte, da die Toxizitätswerte nach dieser Inkubationszeit im Gegensatz zu den anderen getesteten Zeiträumen auch am größten waren.  $1 \times 10^6$  Zellen wurden pro Napf einer 12-Napf-Platte in 1 ml Kompletmedium ausgesät und mit der entsprechenden Konzentration des Inhibitors versetzt. 24 h später wurden die Zellen abzentrifugiert, gewaschen und der Nachweis des jeweiligen Oberflächenproteins mittels Immunfluoreszenz, wie unter 2.2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Jede untersuchte Konzentration wurde mit Dreifachwerten getestet. Die Zellen der Einzelwerte wurden vor dem Antikörpernachweis gemischt, einerseits aufgrund der hohen Kosten, die der Einsatz der Antikörper verursachte, und andererseits, um die Anzahl der Proben in einem durchführbaren Umfang zu halten, damit möglichst viele Konzentrationen bzw. Inhibitoren parallel untersucht werden konnten. Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch für verschiedene Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen deren Einfluss auf die Oberflächenmarker CD80, CD86 und MHC II.

### 3 - Ergebnisse



**Abbildung 36 - XS106: Einfluss der Inhibitoren auf die Expression von CD80, CD86 und MHC II**

nachgewiesen durch Inkubation mit dem jeweiligen Cy2 markierten Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein. Die ausgefüllte Kurve repräsentiert die Expression des Proteins nach Inhibitoreinwirkung im Vergleich zur Kontrollpopulation (schwarze Linie). Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse mittels Cytofluorometer (Fluoreszenz 1 gegen die Zellzahl, logarithmische Darstellung). Keiner der getesteten Inhibitoren zeigte eine deutliche Wirkung auf die Expression der genannten Oberflächenproteine nach 24-stündiger Inkubation.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigten (vgl. Abbildung 36), dass bei keiner Konzentration der getesteten Inhibitoren in der XS106 Zelllinie eine Veränderung der Expression der untersuchten Oberflächenproteine festzustellen war. Die weitere Verwendung dieser Zelllinie erschien für das geplante Projekt wenig aussichtsreich, so dass die Suche nach einer geeigneteren Zelllinie unternommen werden musste.

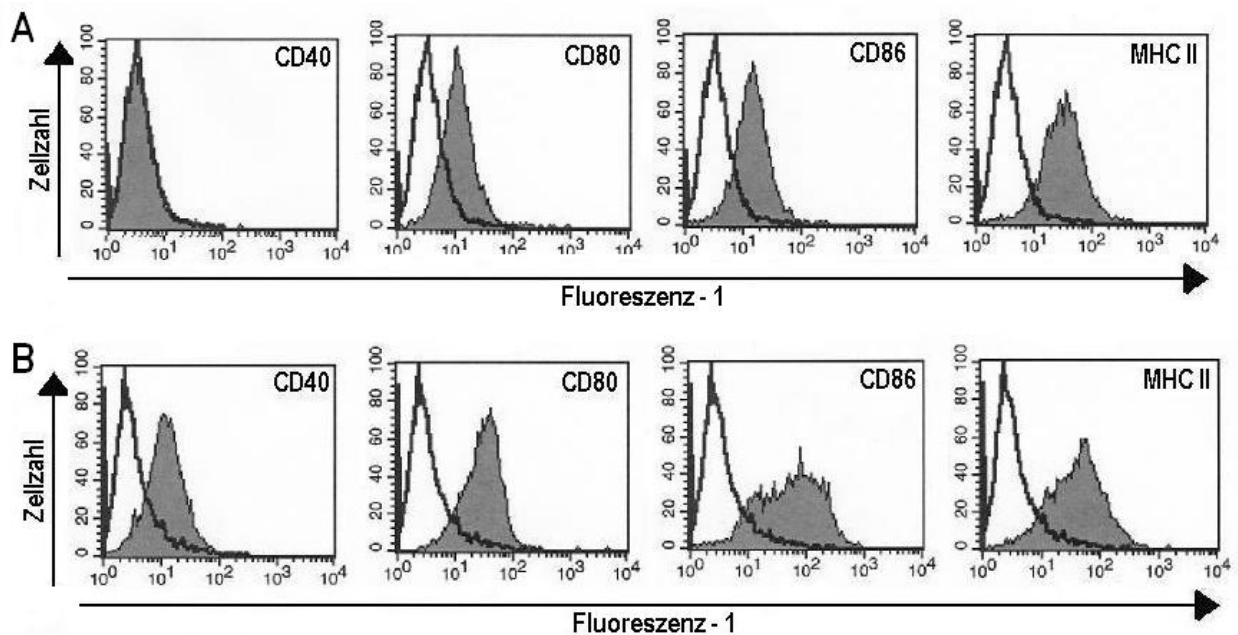
#### **3.8.1.1.2 SP37A3: Expression der Oberflächenmarker**

Die murine SP37A3<sup>-</sup>-Zelllinie (Sutter et al., unveröffentlicht, vgl. Winzler et al., 1997) kann durch Zugabe proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) zur Ausreifung gebracht werden und weist dann ebenfalls die Expression der wichtigsten Oberflächenmarker auf. Die Expression dieser Oberflächenproteine wird durch die Ausreifung teilweise erst induziert bzw. verstärkt (vgl. Abbildung 37). Dies bietet den Vorteil, dass der Anteil des



### 3 - Ergebnisse

neu exprimierten Proteins definitiv inhibiert werden kann. Mit Einsetzen der Ausreifung bzw. Differenzierung wird die Zellteilung eingestellt, die Anzahl der SP37A3<sup>-</sup>-Zellen ändert sich auch während der Koinkubation mit den pharmakologischen Inhibitoren nicht mehr. Der Gesamtanteil an exprimiertem Protein kann besser quantifiziert werden. Die Kultur dieser Zell-Linie ist sehr kostenintensiv, dadurch muss eine gewisse Limitation in der Bereitstellung von Zellmaterial berücksichtigt werden. Die nachfolgende Abbildung gibt einen Überblick über das Expressionsprofil der wichtigsten costimulatorischen Moleküle und MHC Klasse II-Moleküle in reifen und unreifen SP37A3<sup>-</sup>-Zellen: die Expression von CD40 scheint erst durch Stimulation mit den proinflammatorischen Cytokinen während der Ausreifung der Dendritischen Zellen induziert zu werden. Die Expression von MHC Klasse II-Molekülen bewegt sich sowohl in reifen, als auch unreifen DC auf konstant hohem Niveau, eine Zunahme in Verbindung mit der Ausreifung konnte nicht festgestellt werden. Bei den übrigen Molekülen kann eine Verstärkung der Expression im reifen Status nachgewiesen werden.



**Abbildung 37 - SP37A3: Expression der Oberflächenproteine**

nachgewiesen durch Inkubation mit dem jeweiligen Cy2 markierten Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein (ausgefüllte Kurve) im Vergleich zum Isotyp (schwarze Linie). Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse mittels Cytofluorometer (Fluoreszenz 1 gegen die Zellzahl, logarithmische Darstellung). Die obere Reihe unter A gibt die Ergebnisse in unreifen DC wieder, unter B ist die Expression der Oberflächenmoleküle in reifen DC dargestellt: mit zunehmender Ausreifung kommt es bei allen untersuchten Proteinen zu einer (wenn auch teilweise nur geringen) Steigerung der Expression dieser Proteine.

#### 3.8.1.1.2.1 SP37A3: Dokumentation der Toxizität

Die SP37A3-Zell-Linie reagiert wesentlich sensibler auf Stimulantien, verglichen mit den XS106 Zellen. Die ermittelten nichttoxischen Konzentrationen der Inhibitoren für die XS106 Zellen konnten daher nur als Richtwert betrachtet werden. Es musste erneut eine Bewertung der Toxizität in der von nun an verwendeten SP37A3-Zell-Linie vorgenommen werden. Zur Abschätzung der Toxizität wurden, wie schon bei der XS106-Zell-linie erwähnt, MTT-Tests eingesetzt. Darüber hinaus wurde zusätzlich durch Auszählen der Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau-lösung (vgl. 2.1.2.2) das Ausmaß der Toxizität auf Einzelzellebene bestimmt.

##### 3.8.1.1.2.1.1 MTT-Test

Die Bewertung der Toxizität eingesetzter Inhibitoren-Konzentrationen erfolgte, wie bereits bei den XS106-Zellen beschrieben, durch MTT-Tests. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse, die aus den Experimenten mit den XS106-Zellen erhalten worden waren (vgl. 3.8.1.1.1.1), wurden die Inhibitor-Konzentrationen für die SP37A3-Zellen gewählt. In der überwiegenden Anzahl der Experimente wurde eine Koinkubation der Zellen mit der jeweiligen Inhibitorkonzentration und der zur Ausreifung eingesetzten Menge proinflammatorischer Cytokine über ein Intervall von drei Kulturtagen durchgeführt. Zwei Substanzen, das Bay11-7082 und das Ro31-8220, wurden, aufgrund ihrer stark inhibitorischen Wirkung, zunächst nur für max. 90 min auf die Zellen gegeben, im Anschluss an die Inkubation mit der entsprechenden Cytokinmenge zur Reifeinduktion versetzt und dann über drei Tage weiterkultiviert. Unter 2.2.2.9 erfolgte für die SP37A3-Zellen bereits eine detaillierte Beschreibung der Versuchsdurchführung. Die Experimente wurden jeweils dreimal mit Vierfachwerten durchgeführt. Die nachfolgenden Graphiken der Abbildung 38 zeigen exemplarisch für verschiedene Inhibitoren bzw. Konzentrationen das Ergebnis der MTT-Tests: in der überwiegenden Zahl der Experimente konnte bei den Ansätzen mit Inhibitor eine Absorption gemessen werden, die ca. 80 % der Absorption von unbehandelten Zellen entsprach. Die Beurteilung unter dem Mikroskop vor der Aufarbeitung der Zellen zeigte, dass die Mehrzahl der Zellen den zugegebenen Farbstoff umsetzen konnte. Da es sich bei dem Verfahren um eine integrative Methode über den ganzen Ansatz handelte, wurde zur genaueren Bestimmung der Anzahl potentiell geschädigter Zellen, wie nachfolgend unter 3.8.1.1.2.1.2 beschrieben, auch Zähltests (Hämacytometrie-Kammer) durchgeführt.

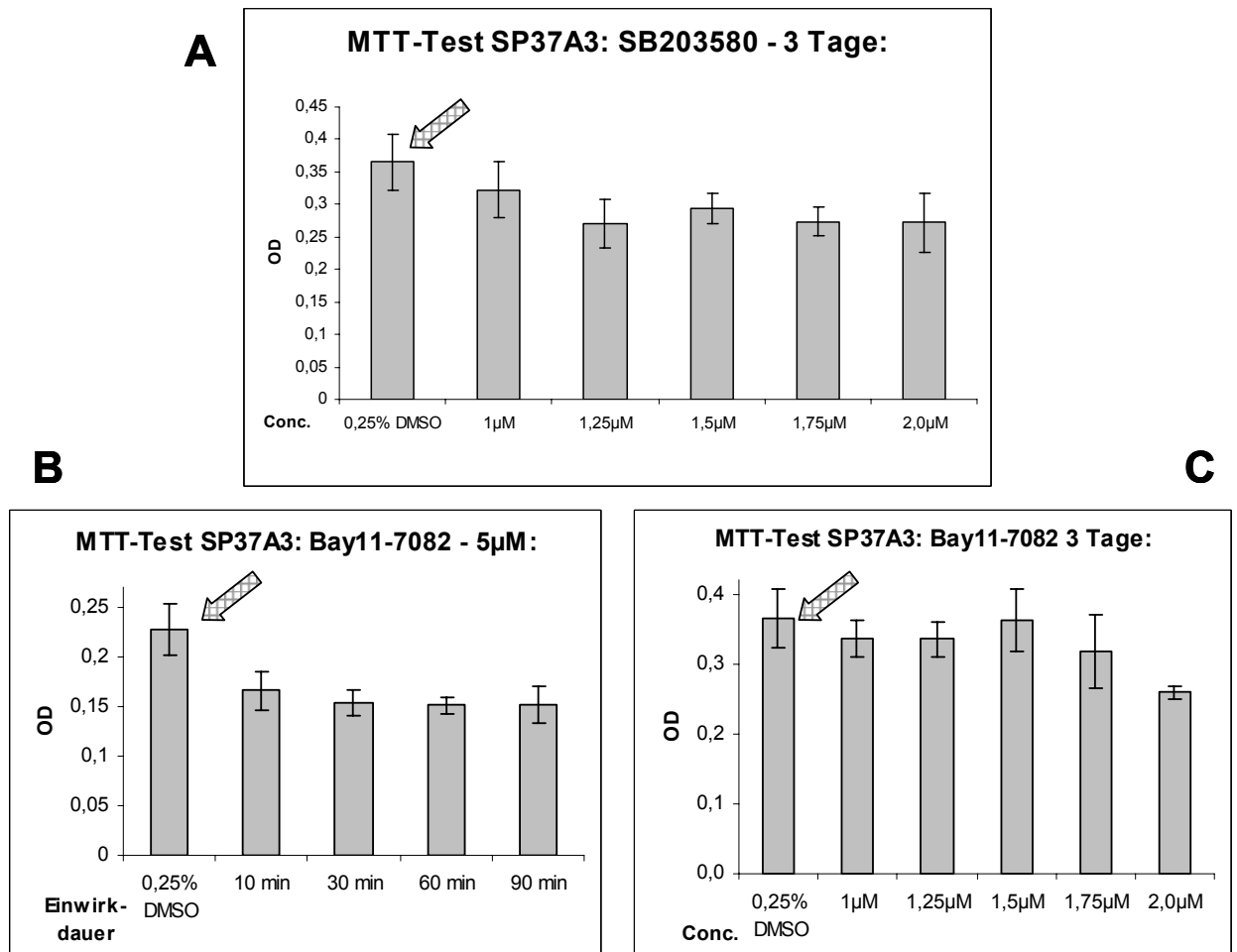


Abbildung 38 - SP37A3 - Nachweis der Toxizität durch MTT-Tests

Inkubation der SP37A3-Zellen mit dem MAP-Kinase p38-Inhibitor SB203580 (A) bzw. dem NFκB-Inhibitor Bay11-7082 (B + C). Dokumentation der Zellviabilität mittels MTT-Test und Bestimmung der Absorption des umgesetzten Farbstoffes bei 570 nm im Vergleich zu Zellen, die nicht mit Inhibitor inkubiert wurden (vgl. Pfeil). Bei A + C erfolgte eine Koinkubation von Inhibitor mit den Reifungscytokinen über 3 Tage, bei B wurde für die angegebene Zeit mit Inhibitor inkubiert, im Anschluss wurden die Reifungscytokine zugeben und weitere 3 Tage kultiviert. Die erhaltenen Ergebnisse lieferten bei allen untersuchten Inhibitor-Konzentrationen eine Absorption, die ca. 80% der Absorption unbehandelter Zellen entsprach.

#### 3.8.1.1.2.1.2 Bilanzierung der Zellzahl unter Verwendung von Trypanblau

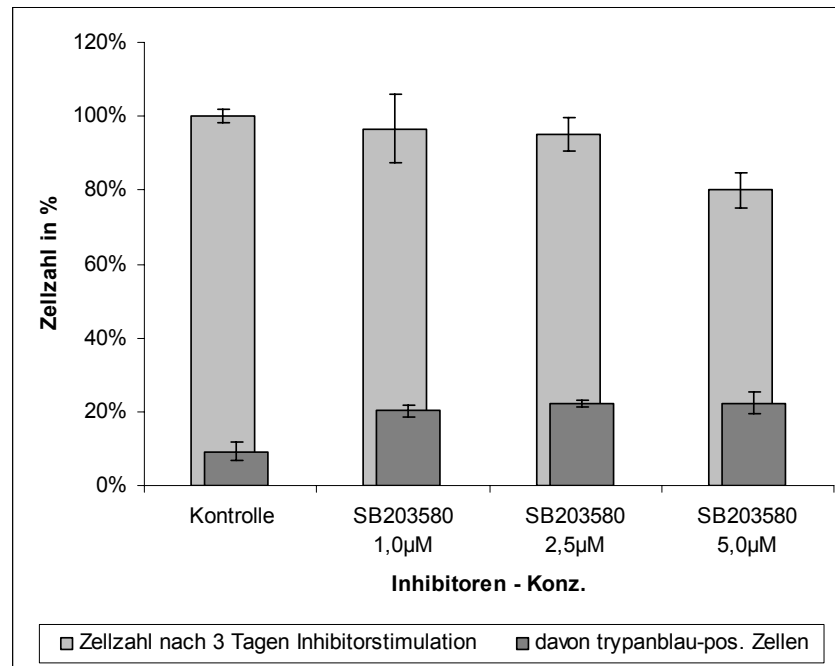
Das Experiment wurde für jede Inhibitorkonzentration in Dreifachwerten durchgeführt. Für jeden Ansatz einer Mehrfachbestimmung wurden  $4 \times 10^5$  Zellen in 1 ml Komplettmedium (inclus. der Reifungsstimuli TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) ausgesät und mit der jeweiligen Inhibitormenge, gelöst in DMSO, versetzt, so dass final eine DMSO-Konzentration von 0,25%<sup>67</sup> erhalten wurde. Nach 3tägiger Kultur erfolgte die Analyse der Zellen, ähnlich wie bei der Bestimmung der Zellzahl beschrieben (vgl. 2.2.2.2). Dabei wurden alle Zellen, die den Farbstoff aufgenommen hatten, als positiv und damit als durch den Inhibitor geschädigt bewertet. Jeder Ansatz wurde dreimal ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Aus den erhaltenen Werten der drei Parallelansätze wurden der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Gleichzeitig wurde eine Bilanzierung der Zellzahl vorgenommen. Die Zellzahl, die nach 3 Tagen Kultur unter denselben Bedingungen in der Referenzprobe ohne Inhibitor ermittelt wurde, wurde als 100 Prozent angenommen. Relativ zu dieser Basis wurde der Anteil geschädigter oder trypanblau-positiver Zellen berechnet. Die erhaltenen Zellzahlen der mit Inhibitor behandelten Proben (sowohl trypanblau-positive als auch –negative Population) wurden zur Kontrolle ins gleiche prozentuale Verhältnis gesetzt.

Die folgende Abbildung 39 zeigt exemplarisch die Ergebnisse eines Experiments nach 3tägiger Inkubation der Zellen mit dem p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB203580: In den Konzentrationen bis 2,5  $\mu$ M konnte annähernd die gleiche Zellzahl bestimmt werden, wie in der Referenzprobe. Ca. 20% dieser Zellen war trypanblau-positiv. Ein Vergleich dieser Ansätze mit den Ergebnissen des MTT-Tests zeigte eine gute Korrelation zwischen erhaltener Absorption und der Anzahl geschädigter Zellen. In beiden Fällen wurde ein Anteil von ca. 20% geschädigter Zellen ermittelt (vgl. Abbildung 38A). Nach Inkubation mit der Konzentration 5  $\mu$ M konnte nur noch ca. 80 % der ermittelten Zellzahl der Referenzprobe nachgewiesen werden, wovon wieder etwa 20 % trypanblau-positiv waren. Diese Konzentration wurde als zu toxisch erachtet, weitere Experimente wurden im Konzentrationsbereich bis 2  $\mu$ M ausgeführt.

---

<sup>67</sup> Diese Konzentration wurde auch in der Referenzprobe vorgegeben. Die DMSO-Konzentration war in Vorversuchen als nichttoxisch für die Zellen ermittelt worden

### 3 - Ergebnisse



**Abbildung 39 - SP37A3: Bilanzierung der Zellzahl**

nach 3tägiger Inkubation mit den angegebenen Inhibitor-Konzentrationen bzw. Kultur unter gleichen Bedingungen (Kontrolle) ohne Inhibitor. Der Inhibitor SB203580 hemmt spezifisch die MAP-Kinase p38. Die Zellzahl in der Kontrolle wurde als 100 Prozent angenommen. Prozentual zu diesem Wert wurden die trypanblau-positiven (= geschädigte Zellen) und die ermittelten Zellzahlen der Proben aus den Inhibitoransätzen berechnet. In den Konzentrationen bis 2,5 µM konnten 80 % ungeschädigte Zellen nachgewiesen werden, bei der Konzentration 5µM fiel die Toxizität höher aus. Das Experiment wurde in Dreifachwerten durchgeführt.

#### 3.8.1.1.2.2 SP37A3: Einfluss auf die Expression von CD40 – CD80 – CD86

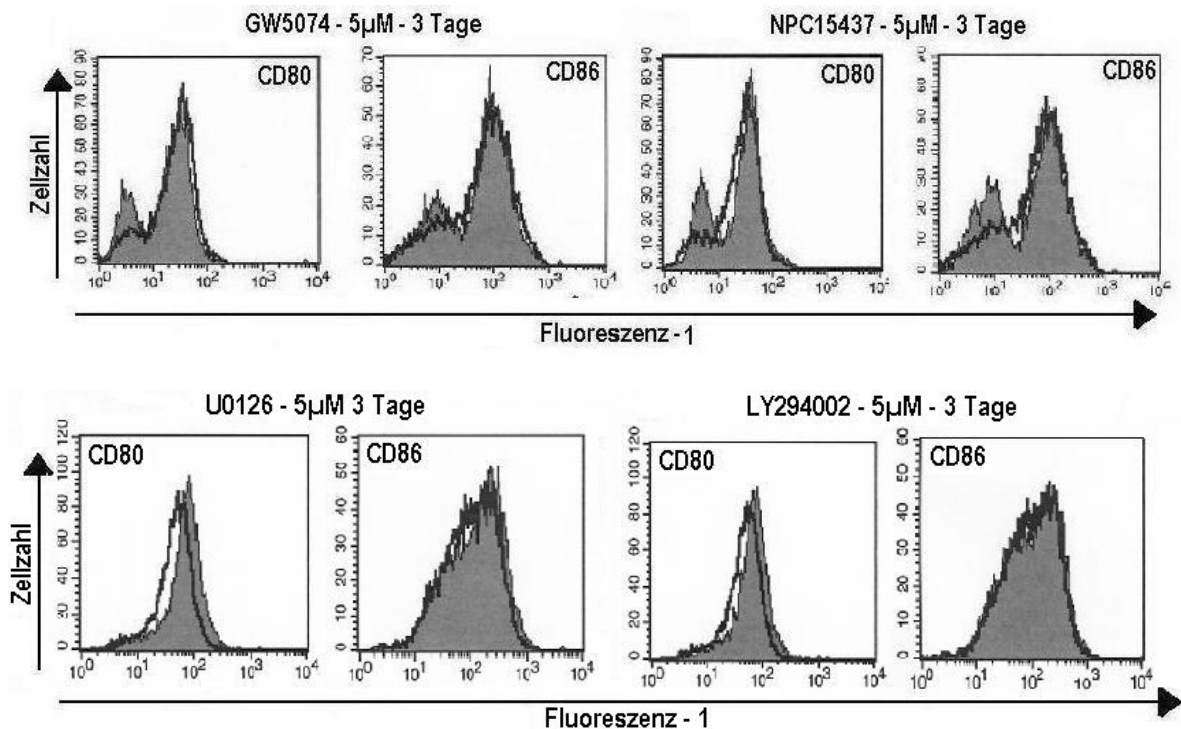
Zunächst wurde der Einfluss der Inhibitoren auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 in den SP37A3-Zellen untersucht. Diese Moleküle sind von genereller Wichtigkeit bei der Vermittlung eines starken Aktivierungssignals an die T-Zellen. Wenigstens eines dieser Moleküle sollte durch die Inkubation mit dem Inhibitor in seiner Expression verändert sein, damit bei Kontakt mit der T-Zelle und Ausbildung einer Immunologischen Synapse (vgl. mixed leukocyte reaction) eine Modulation derselben als wahrscheinlich erachtet wird. Basierend auf diesem Kriterium wurde nach Durchführung der ersten Tests auch eine Bewertung hinsichtlich der potentiellen Eignung des Inhibitors durchgeführt. Jede untersuchte Inhibitorkonzentration wurde mindestens in zwei unabhängigen Experimenten mit Vierfachwerten getestet. Das experimentelle Design erfolgte analog, wie unter 3.8.1.1.2.1.2 bei der Beurteilung der Toxizität durch Bilanzierung der Zellzahl bereits beschrieben. Nach der 3tägigen Inkubations- bzw. Kulturperiode wurden die Zellen geerntet, gewaschen und die vier Ansätze einer Inhibitorenkonzentration für die Antikörperfärbung gemischt. Die Antikörperfärbung und

### 3 - Ergebnisse

Analyse mit dem Durchflusscytometer wurde, wie unter 2.2.2.7 im Material- und Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Nachfolgend sind die Ergebnisse von verschiedenen, getesteten Konzentrationen unterschiedlicher Inhibitoren aufgeführt.

#### 3.8.1.1.2.2.1 SP37A3: Wirkung von GW5074 und NPC15437; U0126 und LY294002

Wie bereits unter 3.8.1.1.2.2 beschrieben, wurde als Kriterium für eine potentielle Modulation der Interaktion zwischen T-Zelle und Dendritischer Zelle vorausgesetzt, dass wenigstens eines der zentralen Kostimulatorischen Moleküle durch die Inhibitorwirkung in seiner Expression verändert wurde. Für die nachfolgend genannten Substanzen GW5074 bzw. NPC15437 konnte unter Verwendung einer Konzentration von  $5\mu\text{M}$  und 3tägiger Koinkubation keine Veränderung bei der Expression dieser Moleküle festgestellt werden. Speziell für den Inhibitor NPC15437 bewegte sich diese Konzentration bereits an der Schwelle zur Toxizität. Mit diesen Substanzen scheint sehr wahrscheinlich keine Einflussnahme auf die Expression der untersuchten Oberflächenproteine zu erzielen zu sein.



**Abbildung 40 - SP37A3: Wirkung von GW5074 und NPC15437, U0126 und LY294002**

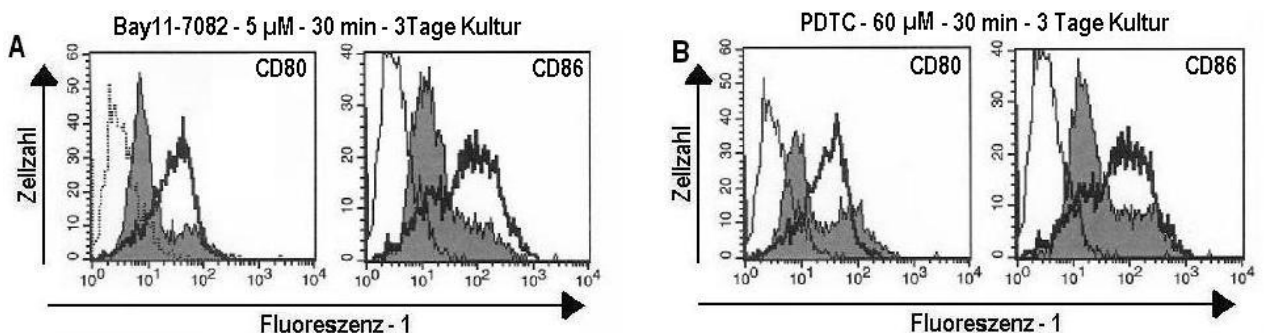
auf die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86, nachgewiesen durch Inkubation mit dem jeweiligen Cy2 markierten Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein. Die ausgefüllte Kurve repräsentiert die Expression des Proteins nach Inhibitoreinwirkung im Vergleich zur Kontrollpopulation (schwarze Linie). Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse mittels Cytofluorometer (Fluoreszenz 1 gegen die Zellzahl, halblogarithmische Darstellung). Mit keinem der getesteten Inhibitoren konnte in der gewählten Konzentration eine Wirkung auf die Expression der genannten Oberflächenproteine nach 3tägiger Inkubation festgestellt werden.

### 3 - Ergebnisse

#### 3.8.1.1.2.2 SP37A3: Wirkung von Bay11-7082 5µM und PDTC 60µM

Bay11-7082, ein spezifischer Inhibitor der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFκB (durch Unterbindung der Phosphorylierung von IκBα), hemmt bei Stimulation von SP37A3- Zellen über 10 – 30 – 60 – 90 min in der Konzentration von 5µM und anschließender Inkubation mit den Reifungszytokinen TNF-α, IL-1β über 3 Tage die Expression der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86. Bay11-7082 unterbindet irreversibel die Phosphorylierung von IκBα. Unter Berücksichtigung dieser Eigenschaft wurde die Inkubation nur über ein Intervall von max. 90 min ausgeführt. Die Besetzung seiner Zielstrukturen scheint sehr schnell zu erfolgen. Höhere Konzentrationen oder längere Inkubationszeiten führten nur zu einer geringen Verbesserung der Inhibitorwirkung, waren aber mit einer signifikant gesteigerten Toxizität verbunden. Eine Inkubation mit 10 µM z. B. unter sonst identischen Bedingungen steigerte die Anzahl toter Zellen auf über 80 % (Daten nicht gezeigt).

Parallel zu den Versuchen mit dem Inhibitor Bay11-7082 wurden auch Experimente mit Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC) durchgeführt. Dieser Inhibitor blockiert die Aktivierung der NFκB-Moleküle, indem er die Induktion reaktiver Sauerstoffradikale unterbindet, denen bei diesem Prozess eine wichtige Rolle zugeschrieben wird (Schreck et al., 1991). Auch mit dieser Substanz konnte eine Inhibition der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86 (vgl. Abb) erhalten werden. Die unabhängig nachgewiesene Reduktion durch beide Stoffe unterstreicht somit die Bedeutung der NFκB-Moleküle bei der Expression dieser Oberflächenmarker.



**Abbildung 41 - SP37A3: inhibitorische Wirkung von Bay11-7082 und PDTC**

auf die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86, nachgewiesen durch Inkubation mit dem jeweiligen Cy2 markierten Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein. Die ausgefüllte Kurve repräsentiert die Expression des Proteins nach Inhibitoreinwirkung im Vergleich zur Kontrollpopulation (schwarze Linie); die Kurve mit der dünnen Linie am linken Rand der Graphik ist der entsprechende Isotyp. Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse mittels Cytofluorometer (Fluoreszenz 1 gegen die Zellzahl, halblogarithmische Darstellung).

### 3 - Ergebnisse

#### 3.8.1.1.2.2.3 SP37A3: Wirkung von SB203580

Der spezifische Inhibitor der p38 MAP-Kinase, SB203580, hemmt in einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$  und 3tägiger Koinkubation mit der entsprechenden Menge Reifungscytokine die Expression der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86. Unter dieser Konzentration konnte keine Inhibition des Oberflächenmoleküls CD40 nachgewiesen werden; Tests, die mit einer höheren Konzentration ( $1,25\mu\text{M}$  und  $1,5\mu\text{M}$ ) durchgeführt wurden, verweisen auf eine Tendenz, dass bereits mit einer geringen Zunahme der Konzentration auch eine Inhibition von CD40 zu erreichen ist (Daten nicht gezeigt). Das Experiment wurde in der angegebenen Konzentration ( $1\mu\text{M}$ ) zweimal mit Vierfachwerten durchgeführt.

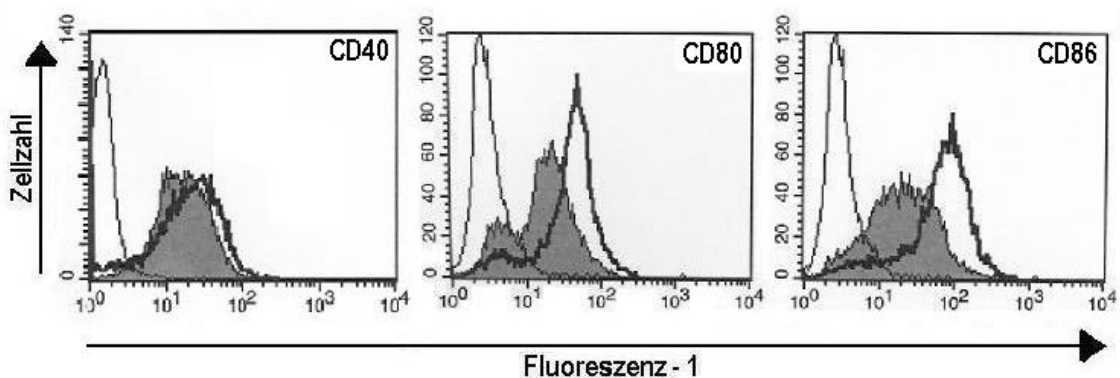


Abbildung 42 - SP37A3: inhibitorische Wirkung von SB203580

In der Konzentration von  $1\mu\text{M}$  und 3tägiger Koinkubation auf die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86, nachgewiesen durch Inkubation mit dem jeweiligen Cy2 markierten Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein. Die ausgefüllte Kurve repräsentiert die Expression des Proteins nach Inhibitoreinwirkung im Vergleich zur Kontrollpopulation (schwarze Linie); die Kurve mit der dünnen Linie am linken Rand der Graphik ist der entsprechende Isotyp. Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse mittels Cytofluorometer (Fluoreszenz 1 gegen die Zellzahl, halblogarithmische Darstellung). Die Expression des Oberflächenmoleküls CD40 hingegen konnte mit dieser Konzentration von SB203580 nicht verändert werden.

#### 3.8.1.1.2.3 SP37A3: Einfluss auf die Expression weiterer Oberflächenmarker

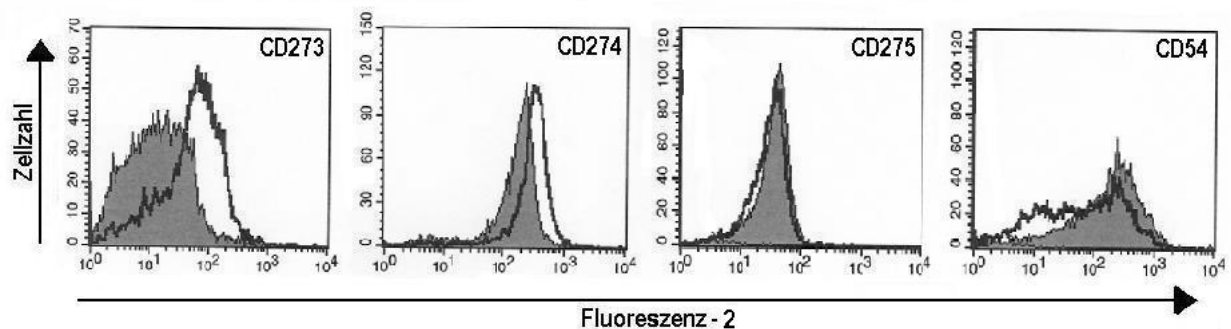
Die unter 3.8.1.1.2.2.3 beschriebene Konzentration von  $1\mu\text{M}$  des Inhibitors SB203580 lieferte eine solide, verminderte Expression der Oberflächenmoleküle CD80 und CD86. Unter Verwendung dieser Konzentration, sollte der Einfluss von SB203580 auf die Expression weiterer Kostimulatorischer Moleküle bzw. Adhäsionsmoleküle untersucht werden, um eine detailliertere Einsicht über die Verhältnisse bei der Wechselwirkung



### 3 - Ergebnisse

---

zwischen Dendritischer Zelle und T-Lymphozyt zu erhalten. Eingesetzt wurden PE<sup>68</sup>-markierte Antikörper gegen die Oberflächenproteine CD273, CD274, CD275 und CD54. Für die Moleküle CD273 und CD274 konnte mit dieser Konzentration ebenfalls eine verminderte Expression im Vergleich zu unbehandelten Zellen festgestellt werden. Für CD275 war keine Veränderung der Expression nachzuweisen und bei CD54 schien die Behandlung mit dem Inhibitor eher zu einer Steigerung der Expression zu führen. Das Experiment wurde zweimal mit Vierfachwerten durchgeführt und lieferte vergleichbare Ergebnisse.



**Abbildung 43 - Einfluss von SB203580 auf die Expression von CD273 - CD274 - CD275 und CD54**

In der Konzentration von 1µM und 3tägiger Koinkubation mit den entsprechenden Reifungscytokinen, nachgewiesen durch Inkubation mit dem jeweiligen PE-markierten Antikörper gegen das entsprechende Oberflächenprotein. Die ausgefüllte Kurve repräsentiert die Expression des Proteins nach Inhibitoreinwirkung im Vergleich zur Kontrollpopulation (schwarze Linie). Dargestellt sind die Ergebnisse der Analyse mittels Cytofluorometer (Fluoreszenz 2 gegen die Zellzahl, halblogarithmische Darstellung). Die Expression der Oberflächenmoleküle CD273 und CD274 war nach der Behandlung mit dem Inhibitor erniedrigt, bei CD275 zeigte sich kein Unterschied. Die Expression des Adhäsionsmoleküls CD54 schien dagegen leicht zuzunehmen.

---

<sup>68</sup> PE – Phycoerythrin, ein Fluoreszenzfarbstoff der bei einer Wellenlänge von 578nm (Maximum) nach Anregung Licht emittiert

# 4 Diskussion

## 4.1 CD14<sup>+</sup> Monozyten aus Blutspenden sind als Basis zur Generierung von hDC geeignet

### 4.1.1 Bewertung des verfügbaren Zellsystems

Für die Untersuchung der Promotorkonstrukte wurden reife Dendritische Zellen menschlichen Ursprungs benötigt. Wie bereits unter 2.2.2.4 angemerkt, gibt es noch keine geeignete bzw. käuflich verfügbare humane DC-Zell-Linie, die für die Experimente herangezogen werden könnte. Bei einer Zell-linie muss bedacht werden, dass diese entweder aus Tumorzellen gewonnen wurde, oder dass die Zellen durch bestimmte Prozesse verändert wurden, so dass ihre Teilungsfähigkeit erhalten bleibt. So entsteht zwar ein solides gut einsetzbares Zellsystem, das aber auch in gewisser Weise artifiziell ist und nur bedingt die natürlichen Verhältnisse widerspiegelt. Der Vorteil bei der Verwendung einer Zell-linie ist, dass das benötigte Zellmaterial beinahe keiner Limitation unterliegt, und dass sich die Zellen alle in einem etwa gleichen Reifestatus befinden. Für die vorliegende Fragestellung wäre die Verwendung einer Zell-linie aufgrund des einheitlichen Reifestatus zunächst gut geeignet gewesen. Die erwarteten Expressionsunterschiede zwischen den getesteten Konstrukten könnten, ohne Berücksichtigung potentiell reifebedingter Schwankungen, direkt mit den Promotorveränderungen korreliert werden können. In Ermangelung einer solchen humanen dendritischen Zell-linie, mussten Primärzellen zur Gewinnung der hDC verwendet werden.

Basis für die Kultur stellten CD14<sup>+</sup>-Blutmonozyten dar, die ihrerseits aus Blutspenden gesunder Spender isoliert werden mussten. Mit der Verwendung dieser Zellen als Ausgangsmaterial musste besonders bedacht werden, dass, obwohl es sich um gesunde Blutspender handelte, aufgrund der Individualität des jeweiligen Spenders, teilweise erhebliche Unterschiede hinsichtlich Anzahl und Zusammensetzung der verschiedenen Blutzellen, deren Verhalten auf unterschiedliche Stimuli bzw. in der Zusammensetzung des Serums zu erwarten waren. Durch den Prozess der Kultivierung bzw. Differenzierung der Monozyten zu Dendritischen Zellen musste gewährleistet werden, dass am Transfektionszeitpunkt auch reife DC vorlagen, die humanen DC möglichst genau entsprachen. Eine robuste Standardisierung der Methode war deshalb geboten.

Ein weiterer Aspekt, der für die Verwendung von Monozyten und damit Zellen myeloiden Ursprungs sprach, ist in dem potentiellen Einsatz des Fascinpromotorderivats als DNA-Vakzine und deren Applikationsort, der Oberhaut, zu sehen: Langerhans'sche Zellen, die bei der Vakzinierung bevorzugt erreicht werden sollen, sind die in der Haut residierenden Dendritischen Zellen. Diese haben sich aus ins Gewebe eingewanderten Monozyten und anschließender Differenzierung zu unreifen DC entwickelt. Langerhans'sche Zellen und die zur Untersuchung eingesetzten in vitro generierten DC entstammen also demselben Typus Vorläuferzellen. Die erhaltene Expressionstärke der Fascinpromotorkonstrukte in den generierten hDC ist demnach gut mit jener, die in Langerhans'schen Zellen zu erwarten ist, zu vergleichen.

### 4.1.2 Die Qualität des Serums bedingt den Reifegrad der hDC

In einer Vielzahl von Experimenten wurden Promotorkonstrukte eingesetzt, die Duplikationen bzw. Multiplikationen von zumindest Teilelementen eines reifeinduzierten ‚Enhancer‘-Bereiches enthielten. Allein in **reifen** Dendritischen Zellen sollten die sich potentiell ergebenden Expressionsunterschiede zwischen den einzelnen Konstrukten am besten zeigen lassen. Die Kulturbedingungen mussten also dergestalt angelegt sein, dass eine größtmögliche Standardisierung die individuellen Unterschiede der Spender weitestgehend nivellierte und mehrheitlich reife Dendritische Zellen erhalten werden konnten. Andererseits durften die Kulturbedingungen nicht zu artifiziell gestaltet werden, um eine starke Annäherung zur Realität zu gewährleisten und den Modellcharakter nicht überzubewerten. Sehr schnell wurde in diesem Zusammenhang das Serum als kritische Komponente der Kultivierung identifiziert: am weitverbreitetsten ist der Einsatz von FCS als Serumquelle in der Zellkultur. Tatsächlich wird dieses auch von einigen Arbeitsgruppen zur Kultur dendritischer Zellen (Sallusto et al.; 1994, Romani et al.; 1994) genutzt. Eigene Untersuchungen unter Verwendung von FCS zeigten zwar, dass mit diesem Serum eine Differenzierung bzw. Ausreifung von DC erhalten werden kann, jedoch waren die kultivierten Zellen in eigenen Experimenten etwas kleiner im Vergleich zur Kultur mit humanem Serum und die Anzahl der Zellen, die stark die Oberflächenproteine CD83 bzw. CD86 exprimieren, war ebenfalls geringer. Durch die Verwendung von Serum einer anderen Spezies erfährt das System neben der in vitro Generierung der Zellen eine zusätzliche artifizielle Komponente: das bovine Serum enthält eventuell andere Wachstumsfaktoren oder variiert zumindest in deren Konzentrationen. Außerdem sind es Proteine einer anderen Art, die von den Zellen als

## 4 - Diskussion

---

,fremd' erkannt werden können und eventuell dadurch zu Veränderungen der sezernierten Cytokine bzw. Aktivität bestimmter Signaltransduktionswege führen können. Es resultiert eine Abweichung von den angestammten Bedingungen, deren Ausmaß schlecht abgeschätzt werden und im Extremfall zu Artefakten führen kann.

Autologes Serum, wie es im Protokoll von Jonuleit und Mitarbeitern (1997) verwendet wird, passt am besten zu den individuellen Spenderzellen und sollte in Verbindung mit diesen Zellen gute Ergebnisse hinsichtlich der Ausreifung bzw. Differenzierung der DC ergeben. In den eingesetzten Buffy Coats (vgl. 3.1.1) war bereits die Hauptmenge an flüssigen Bestandteilen abgereichert worden. Je nachdem, wie quantitativ diese Aufkonzentration der zellulären Bestandteile vorgenommen wurde, erhielt man bei der Expansion der Blutspende mit Zellkultur-PBS und der Gewinnung von autologem Serum aus dem Überstand der Zentrifugation teilweise recht deutliche Konzentrationsunterschiede. Die Zugabe von 1x PBS wurde notwendig, um die Auftrennung mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten (Boyum A.; 1968) durchführen zu können. Je nachdem, wie groß die Schwankungen in der Konzentration des Serums ausfielen, waren auch Unterschiede im Ausreifungsgrad der Dendritischen Zellen festzustellen. Die Konsequenz, die sich aufgrund dieser Beobachtung aufdrängte, war die Mischung verschiedener Serumproben und deren Einsatz für die Kultivierung. Mit den zusammengeführten Serumproben musste dann zur Findung der optimalen einzusetzenden Menge eine Titration über mehrere Tage bzw. mehrere Spender unternommen werden. Als großen Nachteil hierbei ist zu sehen, dass die genaue Zusammensetzung der Mischung nach vollständigem Aufbrauchen und deren erneuter Produktion nie wieder komplett identisch hergestellt werden kann!

Die beste Lösung wurde in der Verwendung von Serum, gewonnen aus der originalen Vollblutkonserve **eines** Spenders, gefunden. Die Expansion mit 1xPBS entfiel und das erhaltene Serum wurde nach Hitzeinaktivierung bei 56°C aliquotiert und eingefroren. Die Titration mit diesem Serum ergab eine optimale Serumkonzentration nach Zugabe von 2% zu der Kultur. Das Serum wurde in allen Experimenten in gleicher Höhe eingesetzt und lieferte zum Transfektionszeitpunkt am Kulturtag 9 mehrheitlich reife Dendritische Zellen. Die hauptvariable Komponente in der Präparation waren somit nur noch die jeweiligen Monozyten der verschiedenen Spender.

Für künftige Versuchsreihen sollte zur Serumgewinnung eine Eigenblutspende erwogen werden. Neben der Verminderung eines potentiellen Infektionsrisikos bewegen sich bei

einer Neuproduktion die Schwankungen in engeren Grenzen im Vergleich zur Mischung verschiedener expandierter Seren mehrerer Spender. Auch der Umfang benötigter Zytokinmengen für die Kultur sollte für die geplanten Versuchsreihen großzügig abgeschätzt werden, so dass auch in dieser Hinsicht eine weitestgehende Standardisierung vorgenommen werden kann.

### 4.1.3 Positivselektion mit einem CD83-Antikörper

Romani und Mitarbeiter hatten bereits in Ihrer zweiten Veröffentlichung 1996 hinsichtlich der Generierung von humanen DC beobachtet, dass nicht alle DC über den Verlauf der Kulturzeit tatsächlich den vollen Reifestatus erreichen: Deshalb führten sie, basierend auf den Erkenntnissen von Zhou und Mitarbeitern (1992, 1995), dass reife Dendritische Zellen quantitativ CD83 exprimieren, eine Positivselektion über einen CD83-Antikörper durch. Diese Positivselektion wurde im vorliegenden Fall nicht unternommen, da sie aufgrund der methodeneigenen Gegebenheiten nicht annähernd vollständig erfolgen kann und aus diesem Grund eine zusätzliche Limitation in der Bereitstellung von DC zur Transfektion resultiert. Bros und Mitarbeiter konnten 2003 zwar zeigen, dass in ausschließlich CD83<sup>+</sup>-Zellen eine stärkere Expression der transfizierten Fascinpromotorkonstrukte zu erhalten ist, geringere Expressionswerte führten sie auf einen Verdünnungseffekt zurück, wenn in der Kultur gleichzeitig noch unreife DC vorhanden waren. Darüber hinaus muss bei einer Selektion von Zellen unter Verwendung eines Antikörpers mit deren zusätzlicher Aktivierung gerechnet werden. Ob und auf welche Weise diese Aktivierung manifest wird, ist für CD83 zwar noch nicht dokumentiert, dass es sich generell jedoch um kein seltenes Ereignis handelt, zeigt die Aktivierung von DC (Caux et al. 1994, Kikuchi et al. 2003) bzw. B-Zellen durch Stimulation mit einem anti-CD40 Immunglobulin (Hasbold et al., 1994, Parry et al., 1994). Dies könnte die generierten DC in Ihrer Reaktion auf das transfizierte Plasmid modulieren und zu veränderten Ergebnissen führen. Unabhängig davon muss bedacht werden, dass jeder zusätzlich durchzuführende Prozess einen Stressfaktor für die Zellen darstellt, dessen potentiellen Beitrag bei der Interpretation der Ergebnisse ebenfalls berücksichtigt werden muss. In der vorliegenden Arbeit wurde durch regelmäßige Überprüfung eines Aliquots der kultivierten Zellen mit einem CD83-Antikörper gewährleistet, dass eine ausreichende Anzahl CD83<sup>+</sup>- und somit reifer DC vorhanden war.

### 4.1.4 Depletion kontaminierender Lymphozyten

Romani und Mitarbeiter entfernten die bei der Isolierung der PBMC durch einen Ficoll-Gradienten ebenfalls vorhandenen Lymphozyten neben Abspülen nach Adärenz der Monozyten an das Plastikmaterial noch zusätzlich durch Depletion unter Verwendung von Antikörpern gegen CD19 bzw. CD3. Aus den Untersuchungen, hinsichtlich der Charakterisierung des Modellsystems (vgl. 3.1) wird deutlich, dass durch einen Adhärierungsschritt und anschließendem Abspülen nichtadhärenter Zellen der größte Anteil der Lymphozyten entfernt werden kann, und dass die verbliebenen B- und T-Lymphozyten keinen Beitrag zur Expression des Reportergens unter dem Fascinpromotor liefern (vgl. 3.2.3). Eine zusätzliche Depletion der Lymphozyten ist somit nicht zwingend erforderlich und deren Verzicht wirkt sich auch nicht negativ auf die erhaltenen Ergebnisse aus. Ein adoptiver Transfer der generierten DC zurück in den menschlichen Organismus, der eine möglichst reine DC-Population erfordern würde, war ebenfalls nicht vorgesehen. Ein positiver Nebeneffekt, der sich aus dieser Tatsache ergab, war neben einer Zeitersparnis bei der Präparation auch die Reduktion der Präparationskosten, da die Materialien zur Depletion sehr teuer sind.

## 4.2 Mögliche Strategien zur Verstärkung der Promotoraktivität

Wie schon bereits in der Einleitung (vgl. 1.2) erwähnt wurde, ist das Verfahren der DNA-Vakzinierung eine interessante und vielversprechende Möglichkeit, eine Immunantwort auszulösen. Das Schlüsselereignis der DNA-Vakzinierung stellt dabei die Transfektion von Dendritischen Zellen dar (Casares et al 1997, Akbari et al. 1999, You et al. 2001). Durch Verwendung eines Promotors, der spezifisch in Dendritischen Zellen aktiv ist, kann die Expression des nachgeschalteten Transgens auf diese Zellen begrenzt und somit eine zellulär vermittelte Immunantwort begünstigt werden. Da die Langerhansschen Zellen<sup>69</sup> nur mit geringer Häufigkeit im Gewebe verteilt sind, und von diesen Zellen nur ein sehr geringer Prozentsatz durch die DNA-Vakzinierung erreicht wird, ist eine möglichst starke Expression des Transgens wünschenswert. Beim Fascinpromotor handelt es sich bereits um einen sehr starken Promotor, dessen Aktivität weitgehend auf Dendritische Zellen beschränkt ist. Seine besondere Eignung zum Einsatz bei der DNA-Vakzinierung wurde ebenfalls in der Einleitung (vgl. 1.3) ausführlich dargestellt.

---

<sup>69</sup> Dendritische Zellen der Haut

## 4 - Diskussion

---

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Möglichkeiten untersucht, das Expressionssystem auf Basis des Fascin-Promotors über verschiedene Strategien zu modifizieren, so dass durch die gemachten Veränderungen eine weitere Expressionsverstärkung des nachgeschalteten Transgens resultiert. Gleichzeitig sollten die vorgenommenen Modifikationen aber noch gewährleisten, dass der Promotor weiterhin spezifisch in Dendritischen Zellen wirksam ist. Grundsätzlich kann man bei dieser Problemstellung zwischen zwei Hauptansatzpunkten unterscheiden:

1. direkte Einflussnahme auf den Promotor durch Hinzufügen bzw. Entfernen von Promotorelementen, die dessen Aktivität beeinflussen
2. generelle Strategien zur Verbesserung der Expressionseffizienz, da Dendritische Zellen als differenzierte, nicht mehr zur Teilung befähigte Zellen nur schwer einer transienten Transfektion mit nichtviralen Vektoren zugänglich sind

### **4.2.1 potentielle Eignung viraler Enhancer-Elemente zur Verstärkung der Promotoraktivität**

Eine weit verbreitete Möglichkeit, eine Verstärkung der Aktivität von Promotoren zu erreichen, stellt die Einführung weiterer regulatorischer Elemente dar. Die in diesem Zusammenhang häufig genutzten Elemente entstammen vorwiegend viralen Promotoren (Yew et al., 1997), jedoch finden auch regulatorische Sequenzen zellulärer Gene Verwendung (Vile et al., 1994; Kanai et al.; 1997). Eine Möglichkeit besteht z.B. durch Einfügen des SV40-Enhancers in das Expressionsplasmid. Der SV40-Enhancer besteht aus zwei Kopien einer 72 BP-Sequenz und ist ein regulatorisches Element aus dem Promotorbereich des Simian Virus, das zahlreiche Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren wie AP-1, AP-2, AP-3 (Lee et al., 1987, Mitchell et al. 1987), Oct-1 (Davidson et al. 1986) oder NFκB (Kanno et al. 1989) aufweist. Li und Mitarbeiter konnten 2001 zeigen, dass das Einklonieren eines SV40 Enhancers die Expression eines transient transfizierten CMV-Promotor-Reporterkonstrukts in murinen Skelettmuskelzellen zwanzigfach im Vergleich zu einem Expressionskonstrukt ohne dieses Verstärkungselement erhöht. Die in diesem Kontext angeführten Publikationen beschreiben auch, dass die Nutzung verschiedener Bindungsstellen des SV40-Enhancers zelltypspezifisch unterschiedlich ist. Allerdings muss man bei der Prüfung auf eine potentielle Eignung der Strategie für den vorliegenden Fall bedenken, dass die regulatorischen Sequenzen aus einem Virus stammen. Virale Verstärkerelemente sollten, bedenkt man den Vorteil, der für die Viren erreicht werden soll, möglichst in vielen Zellen

## 4 - Diskussion

---

genutzt werden können, so dass bei der Einführung dieses Enhancers in den Fascinpromotor sehr wahrscheinlich mit einem Verlust der Spezifität auf Dendritische Zellen zu rechnen ist. So konnten z.B. Latham und Mitarbeiter 2000 feststellen, dass das Einführen eines CMV-Enhancers die Aktivität sowohl des PSA-<sup>70</sup> als auch des Kallikrein-2-Promotors um ein Vielfaches (100 – 1000fach) verstärkte, jedoch ging mit dieser Verstärkung auch der Verlust der spezifischen Expression in den untersuchten Prostatazellen einher. Basierend auf diesen Erkenntnissen muss mit dem SV40 Enhancer ein ähnliches Ergebnis erwartet werden, so dass eine Verstärkung durch Einklonieren viraler regulatorischer Elemente wieder verworfen wurde.

### 4.2.2 Nutzung eines Fascin-Promotoreigenen Enhancerelements

Vielversprechender erscheint in diesem Zusammenhang die Erkenntnis, dass in den regulatorischen Elementen desselben Gens sowohl Enhancer- als auch Silencer-Bereiche zu finden sind, die zelltypspezifisch je nach dem vorliegenden, exprimierten Set an Transkriptionsfaktoren aktiviert werden können (Jeang und Khoury, 1988). Kennt man diese Elemente, sollte durch Ausschneiden bzw. Verdopplung der jeweiligen Sequenzen eine Verstärkung der Promotoraktivität zu erhalten sein (Schuur et al. 1996, Latham et al. 2000) Der Vorteil dieser Herangehensweise ist offensichtlich: Regulatorische Elemente eines Gens, dessen Expression sich bereits als spezifisch für einen bestimmten Zelltyp erwiesen hat, tragen sehr wahrscheinlich viel weniger das Potential bei einer Duplikation verschiedener Teilbereiche, dass die resultierende, veränderte Expressionstärke gleichzeitig auch nicht mehr spezifisch für den vorliegenden Zelltyp ist. Für den Fascin-Promotor war durch die Charakterisierung mittels Deletionskonstrukten bereits ein DNA-Bereich identifiziert worden, der ein Enhancerelement enthält. Dieses wird reifeinduziert von Dendritischen Zellen genutzt und ist maßgeblich an der Stärke des Promotors beteiligt. (Bros et al. 2003). Tatsächlich zeigte die Duplikation dieses Elements (vgl. 3.5.2.1), dass mit dieser Strategie eine Verstärkung der Expression eines nachgeschalteten Reportergens erhalten werden konnte, und auch der Test in HaCaT-Zellen bestätigte, dass die Expression weiterhin auf Dendritische Zellen beschränkt blieb.

---

<sup>70</sup> PSA – prostate-specific antigen – prostataspezifisches Antigen



### 4.2.2.1 Einfluss der Position des neu eingefügten Enhancer-Elements

Eine weitere Einflussmöglichkeit auf die Expressionsstärke bzw. die Spezifität eines Promotors, die bedacht werden muss, besteht in der Position des Einklonierens (Atchison, 1988). Je nachdem, wo genau die zusätzlichen Elemente eingefügt werden, könnten einerseits Enhancer bzw. Silencer-Elemente, die aufgrund der eventuell noch unvollständigen Charakterisierung als solche noch nicht detektiert sind, getrennt werden und auf diese Weise die Expressionsstärke nachteilig modulieren bzw. Unspezifität provozieren. Andererseits könnte die Distanz zum Basalpromotor Unterschiede in den eben genannten Parametern bewirken. Der überwiegende Anteil der Klonierungsarbeiten in der vorliegenden Arbeit wurde in der Bal-I-Schnittstelle des Fascin2.7Bal-Konstrukts gemacht, die durch Exzision eines DNA-Abschnitts künstlich erzeugt wurde. Die DNA-Enden wurden dadurch erst zusammengefügt, so dass mit einer Zerstörung unerkannter regulatorischer Elemente nicht zu rechnen ist. Da es vielfach recht schwierig ist, eine singuläre Schnittstelle in einem Promotorbereich zu finden, die zur Klonierung genutzt werden kann, ist man mit der Position, an der Veränderungen vorgenommen werden können, stark eingeschränkt. Parallel zu den Untersuchungen am Fascin2.7Bal-Konstrukt waren verschiedene Duplikationen auch in die singuläre Pvu II-Schnittstelle von Fascin2.7 kloniert worden, um einen möglichen positionsabhängigen Einfluss zu untersuchen. Das Fascin2.7Konstrukt ist ca. 1,2kbp größer als das Fascin2.7Bal-Konstrukt (vgl. 3.5.1), die Pvu II-Schnittstelle ist ca. 1kbp weiter distal zur genutzten Bal-I-Schnittstelle lokalisiert. Die Klonierungen lieferten qualitativ die gleichen Ergebnisse, wie sie beim Einfügen der Fragmente in der Bal-I-Schnittstelle erhalten wurden, jedoch fielen die Expressionsunterschiede zwischen den Konstrukten einer Schnittstelle geringer aus. Der Test in HaCaT-Zellen zeigte keine Zunahme der Expressionsstärke in diesen Zellen, was auf den Erhalt der Spezifität schließen lässt. (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall bleibt festzuhalten, dass, obwohl eine andere Schnittstelle zur Klonierung genutzt wurde, der Einfluss der Klonierungsposition keine Veränderung bewirkte. Das erhaltene Ergebnis beweist einmal mehr, dass es sich bei der fascinpromotoreigenen Sequenz um ein klassisches Enhancerelement handelt, das nach den Definitionen von Atchison, 1988 positionsunabhängig und, da aus dem gleichen Gen, auch spezifisch (Jeang und Houry, 1988) wirksam sein sollte. Die Beobachtung, warum die Expressionsunterschiede innerhalb einer Gruppe hergestellter Expressionsplasmide einer Schnittstelle weniger deutlich ausfielen, ist dabei weniger mit der Klonierungsposition in Verbindung zu bringen. Eine mögliche Erklärung wird durch den nachfolgend geschilderten Sachverhalt versucht.

### 4.2.2.2 Potentieller Einfluss der Größe des Expressionsplasmids

In der vorliegenden Arbeit vorgestellte Klonierungen wurden ausschließlich unter Verwendung des Fascin2.7Bal-Konstrukts (vgl. 3.5.1) hergestellt, die gleichzeitig auch das Ergebnis einer weiteren Überlegung darstellten: Je größer der Promotorbereich durch weitere Einklonierungen wird, desto mehr nimmt die gesamte Vektorgröße und resultierend daraus auch das Molekulargewicht zu. Nichtvirale Vektoren sind zwar bei der Größe einklonierbarer DNA im Gegensatz zu viralen Vektoren, bei denen die Obergrenze bei etwa 8 – 10 kpb (Mizuguchi und Hayakawa, 2002) zusätzlich einklonierter DNA besteht, nicht so stark limitiert, jedoch besitzen sie den Nachteil einer äußerst mäßigen nukleären Translokation. Unter 4.2.6ff wird diesem Sachverhalt noch intensiver Bedeutung beigemessen. Bei Plasmiden handelt es sich um Makromoleküle, die im Gegensatz zu Oligonucleotiden oder kleinen PCR-Produkten, nicht mehr durch Diffusion das Zellkompartiment wechseln können. Sie müssen z.B. bei der Transfektion für eine erfolgreiche Expression aktiv über die Kernporen (Stoffler et al., 1999, Kiseleva et al. 2000) in den Zellkern geschafft werden. Aufgrund komplexer räumlicher Strukturen und Anordnungen stark aufgefalteter („supercoiled“) DNA (Boles et al. 1990, Rybenkov, 1997, Marko und Siggia, 1994) kann die Abhängigkeit von Molekulargewicht und räumlicher Anordnung auf den Durchmesser des Moleküls nur schwer abgeschätzt werden. Dennoch möchte man, auch im Hinblick auf die erhaltenen Ergebnisse, postulieren, dass Plasmide mit geringerem Molekulargewicht effektiver in den Zellkern geschafft werden. Besondere Bedeutung erfährt dieser Sachverhalt, wenn man zugrunde legt, dass Zellen, die sich nicht mehr teilen, Plasmid-DNA wahrscheinlich ausschließlich über die angesprochenen nukleären Importmechanismen in den Zellkern transportieren können. Das Fascin2.7LUC-Plasmid weist bereits eine Größe von 7,5 kbp auf. Durch Generierung eines 5' verkürzten Konstrukts, dem Fascin2.7Bal, und dessen Verwendung als Basiskonstrukt, war es möglich, alle weiteren hergestellten Expressionsplasmide auf max. 6,7 kbp zu begrenzen. Geht man davon aus, dass aufgrund der geringeren Größe der Konstrukte, bei denen Fascin2.7Bal als Basiskonstrukt diente, mehr Kopien des Plasmids in den Zellkern gelangen und transkribiert werden können, sollte die resultierende Proteinmenge größer ausfallen. Die Größendifferenz zwischen den Bal- und Pvu-Konstrukten könnte somit eine Erklärung für die geringer ausfallenden Expressionunterschiede innerhalb einer Serie von Expressionsplasmiden in der gleichen Schnittstelle sein.

### 4.2.3 Expressionsverstärkung durch Klonierung mehrerer Enhancer-Elemente direkt hintereinander

Im Verlauf der weiteren Arbeiten mit dem Enhancerelement des Fascinpromotors konnte die Größe des für die Expressionssteigerung verantwortlichen Sequenzbereichs auf ca. 90 bp eingegrenzt werden. Xie und Mitarbeiter konnten 2001 zeigen, dass die Multiplikation von Enhancer-Elementen und deren Einklonierung distal zum Basalpromotor eine starke und zugleich spezifisch auf Prostatazellen begrenzte Expression lieferte. Eine Multiplikation des 90 bp großen Fragments des Fascinpromotors und Klonierung in die Bal-I-Schnittstelle von Fascin2.7Bal könnte demnach ebenfalls eine deutliche Verstärkung der Expression eines nachgeschalteten Reportergens in hDC bewirken. Gleichzeitig steigt die Vektorgröße aufgrund des relativ kleinen Fragments, von dem mehrere Kopien hintereinander gesetzt werden sollten, nur moderat an. Die erhaltenen Ergebnisse (vgl. 3.5.4) bestätigten, dass prinzipiell über diese Strategie eine weitere Verstärkung des Fascin-Promotors erhalten werden kann, und dass mit jeder neu hinzukommenden 90bp-Einheit die Expression annähernd proportional um denselben Betrag ansteigt. Die erhoffte deutliche Verstärkung, die z.B. Xie und Mitarbeiter bei den Prostatazellen festgestellt hatten, konnte nicht erreicht werden. Allerdings muss in diesem Zusammenhang angemerkt werden, dass die Arbeitsgruppe ausschließlich mit Zelllinien arbeitete, in denen die Verhältnisse anders im Vergleich zu ausdifferenzierten Zellen ausfallen können. Aber auch die basierend auf der **Duplikation** des 90 bp-Elements (entspricht dem D2D7-Konstrukt) geschätzte mögliche Steigerung der Expression, konnte für die Mehrfachkonstrukte nicht detektiert werden, sondern blieb bei dem Bal3xD2D7-Konstrukt (enthält insgesamt 4x das D2D7-Element) im Bereich der Duplikation von BalD2D4 (vgl. 3.5.2.1). Die erhaltenen Ergebnisse waren im Hinblick auf eine, durch diese Strategie nur mäßig zu steigernde Expression etwas unbefriedigend, so dass die Suche nach einer möglichen Erklärung für diesen Sachverhalt angestrengt wurde.

#### 4.2.3.1 Potentieller Einfluss der Orientierung des einklonierten Enhancer-Elements

Für einen möglichen Erklärungsversuch, warum die detektierte Expression so niedrig ausfiel, muss berücksichtigt werden, dass in allen erzeugten Mehrfachkonstrukten die 90bp Sequenz stets in umgekehrter Orientierung einkloniert worden war. Im Verlauf früher zurückliegender Klonierungsarbeiten wurden bereits schon Duplikationskonstrukte erhalten, die ebenfalls eine gegenläufige Orientierung aufwiesen. Die Transfektion in hDC und anschließende Bestimmung der Luziferaseexpression lieferte, wenn überhaupt, dann

## 4 - Diskussion

---

nur eine geringfügig reduzierte Expression eines solchen Konstrukts im Vergleich zur korrekten Orientierung (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis steht in Analogie zu den von Atchison 1988 resümierten Eigenschaften von Enhancerelementen, die auch in umgekehrter Orientierung annähernd gleich wirksam sind. In der Literatur finden sich kaum Hinweise, dass die Vermittlung der Verstärkungsfunktion durch Enhancer allein von der Orientierung der Sequenz abhängig ist. Lediglich für den SV40 Enhancer konnte Moreau, 1981 in einigen Fällen eine Abhängigkeit von der Distanz zwischen Enhancer und Promotor feststellen. Für Silencer<sup>71</sup>-Elemente wurde eine solche Abhängigkeit ebenfalls beobachtet. Jedoch ist hierbei nicht gesichert, ob tatsächlich die Inversion der Sequenz die alleinige Ursache für diese Beobachtung darstellt. Als wahrscheinlicher wird eine räumliche Wechselwirkung mit angrenzenden regulatorischen Elementen oder Faktoren in der neuen Orientierung vermutet (Ogbourne et al., 1998). Für die überwiegende Anzahl der Fälle kann demnach der zuvor beschriebene Sachverhalt, einer Unabhängigkeit von der Orientierung, angenommen werden. So konnten z.B. Germain und Mitarbeiter 1998 bei der Charakterisierung eines neuen Enhancerelements im Promotor des Reningens feststellen, dass dieses, unabhängig von der Orientierung, gleich wirksam war. Die für das größere Fragment D2D4 des Fascinpromotor-Enhancers gefundene Unabhängigkeit von der Orientierung wurde auch für die verkürzte Variante D2D7 angenommen. Der Fokus der Untersuchungen dieser Arbeit zielte auf die Entwicklung eines Fascinpromotorderivates mit hoher Aktivität, nicht auf der vollständigen Charakterisierung jedes einzelnen klonierten Teilfragments. Da der Einfluss eines umgekehrt orientierten D2D7-Fragments nicht getestet wurde, kann ein potentieller Einfluss nicht definitiv ausgeschlossen werden. Dennoch wird, auch unter Berücksichtigung der zitierten Literatur, die Bedeutung der gegenläufigen Orientierung als alleinige Erklärung für die unerwartet geringe Steigerung in der Expression des nachgeschalteten Transgens als eher unwahrscheinlich angesehen.

### 4.2.3.2 Limitation in der Menge vorhandener Transkriptionsfaktoren

Xie und Mitarbeiter (2000) hatten bei der Testung ihrer Konstrukte zusätzlich festgestellt, dass das Konstrukt, das vier Enhancerelemente enthielt, eine geringere Expressionssteigerung lieferte, im Vergleich zum Konstrukt mit drei Enhancersequenzen.

---

<sup>71</sup> regulatorisches Element, das ähnlich wie Enhancer, Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren trägt, aber repressiv auf die Genexpression wirkt

## 4 - Diskussion

---

Sie erklärten den Sachverhalt mit einer Limitation in der Menge vorhandener Transkriptionsfaktoren. Da im vorliegenden Fall mit jedem hinzukommenden Element noch eine, wenn auch nur geringe, Verstärkung der Expression festgestellt werden konnte, scheint auch dieser Sachverhalt keine Erklärung für die unerwartet niedrige Expressionsstärke unter den Mehrfachkonstrukten darzustellen. Prinzipiell müsste aber beim Hinzufügen von weiteren 90 bp-Sequenzen mit dieser Limitation ebenfalls gerechnet werden.

### 4.2.3.3 Einfluss der räumlichen Anordnung bindender Transkriptionsfaktoren

Einen sehr viel größeren Einfluss scheint in diesem Zusammenhang die räumliche Ausrichtung der anbindenden Proteine zu spielen, wie teilweise bereits unter 4.2.3.1 angedeutet. Die charakterisierten D2D7-Fragmente wurden direkt ohne Einführen zusätzlicher Basen zur Vergrößerung des Abstands zwischen den einzelnen Elementen hintereinander gefügt. Nach Atchison, 1988, sollten Enhancerelemente zwar positionsunabhängig wirksam sein, bei der direkten Aufeinanderfolge dieser Elemente muss wahrscheinlich aber vor allem an den angrenzenden Bereichen zwischen den einzelnen Elementen eine sterische Hinderung der anbindenden Proteine angenommen werden, so dass diese eine nicht für die Verstärkungswirkung optimale Konformation einnehmen bzw. in Wechselwirkung treten können. Besonders intensiv untersucht sind die Wechselwirkungen bzw. räumlichen Strukturen beim Initialisierungskomplex des TATA-Box-bindenden Proteins mit den Transkriptionsfaktoren Ila und Iib (Ptashne und Gann, 1997, Sauer und Tjian, 1997, Berk, 1999). Die Interaktion mit weiteren für den Transkriptionsstart wichtigen Faktoren setzt zusätzlich eine spezielle Windung der DNA im Basalpromotorbereich (Kim, J.L. et al., 1993, Kim, Y. et al. 1993, Coulombe, 1999) und Ausbildung einer räumlichen Struktur voraus, wie es z.B. unter Verwendung des GAL4-VP16-Fusionsproteins als Aktivierungsfaktor beschrieben ist (Dion und Coulombe, 2003). Die Autoren hatten bei Ihren Untersuchungen festgestellt, dass je nach Lage der Gal4-Bindungsstelle relativ zum TATA-Element Gal4-VP16 eine unterschiedlich starke Aktivierung der Transkription vermittelt. Durch die helikale Struktur der DNA stehen die Bindungsstellen bzw. die anbindenden Faktoren in unterschiedlicher räumlicher Ausrichtung zueinander. Die Aktivierung war dann maximal, wenn beide Elemente auf der gleichen Seite der DNA-Helix lokalisiert waren. Pro 2 bp wird die DNA um ca. 72 °C gedreht, so dass nach 10 bp eine komplette Drehung des DNA-Strangs um 360 °C erfolgt ist. Wenn beim Einfügen zusätzlicher DNA-Abschnitte durch Klonierung das Prinzip des

## 4 - Diskussion

---

„helical-phasing“ im Bezug auf die Bindungsstellen verletzt wird<sup>72</sup> resultiert aufgrund suboptimaler Lage der Transkriptionsfaktoren zueinander, wie in dem angeführten Beispiel, eine verminderte Aktivierung der Transkription. Diese Situation kann auf den vorliegenden Fall, dem Einklonieren der drei D2D7-Fragmente direkt hintereinander, übertragen werden. Sehr wahrscheinlich wurde hierbei die optimale Anordnung der Transkriptionsfaktoren zueinander unterbrochen, das zu einer verminderten Verstärkungswirkung der Enhancerelemente führte. Dieser Umstand erscheint die wahrscheinlichste Erklärung für die geringer als erwartete, aber nicht vollständig nivellierte Promotoraktivität darzustellen.

Ungleich komplizierter wird die Betrachtung des Sachverhalts unter Einbeziehung der mit der DNA assoziierten Nukleosome, vor allem wenn diese im Promotor- bzw. Enhancerbereich lokalisiert sind (Oftmals befinden sich diese Bereiche aber auch in sog. DNase-I-hypersensiblen Regionen, d. h. dass an dieser Stelle die Chromatinstruktur aufgelockert ist). Nukleosome können dann aufgrund ihrer Assoziation mit der DNA-Doppelhelix die Initiierung des Transkriptionsstarts mitregulieren. Ioshikhes konnte z.B. 1999 mit seiner Analyse zeigen, dass vor allem im Basalpromotorbereich die Verteilung von Transkriptionsfaktorbindungsstellen mit der nukleosomalen Periode von 10,1 – 10,5 bp korreliert. Nachdem Plasmid-DNA in den Zellkern aufgenommen wurde, wird diese von frei im Kern befindlichen Nukleosomen belegt und bildet ebenfalls chromatin-ähnliche Strukturen aus (Jeong und Stein, 1994a & b, Cereghini und Yaniv, 1984), so dass auch hier mit einem Einfluss dieser Proteine auf die Transkription zu rechnen ist. Jeong und Stein hatten anhand von DNA-Fragmentierungsexperimenten („DNA-laddering“) festgestellt, dass hierbei vielfach atypische Nukleosomenbanden auftraten, das auf ein anders geartetes Chromatinmuster schließen lässt. Mit diesem Umstand muss zwar generell bei transfizierter DNA gerechnet werden, kann aber natürlich bei unterschiedlichen Plasmiden auch eine unterschiedlich starke Auswirkung auf die resultierende Expressionsstärke bei der transienten Transfektion haben.

### 4.2.4 Resümée der diskutierten Parameter

Die vorliegenden Arbeiten zeigen, dass durch Duplikation bzw. Multiplikation des distalen Enhancer-Elements eine spezifische Verstärkung des Fascin-Promotors erreicht werden kann. Prinzipiell erfüllt dieser Enhancer alle Eigenschaften, wie sie von Atchison, 1988

---

<sup>72</sup> und die Transkriptionsfaktorbindungsstellen einen größeren bzw. kleineren Abstand zueinander besitzen

## 4 - Diskussion

---

formuliert wurden. Nachteilig bei der Multiplikation von Enhancerelementen scheint sich aufgrund suboptimaler räumlicher Verhältnisse, eine geringe Distanz der einzelnen Elemente zueinander auszuwirken (vgl. 4.2.3.3), so dass bei weiteren Klonierungsarbeiten dieser Umstand unbedingt berücksichtigt und vergrößert werden muss.

### 4.2.5 Weitere Arbeiten aufbauend auf den erhaltenen Ergebnissen

Durch die umfangreichen Klonierungsarbeiten mit dem distalen Enhancer-Element als Basis, konnte der für die Verstärkung der Promotoraktivität wichtige Sequenzabschnitt auf 90 BP eingegrenzt werden. Somit sind ideale Voraussetzungen geschaffen, um mittels EMSA<sup>73</sup> oder Supershift-Experimenten die anbindenden Transkriptionsfaktoren nachzuweisen und zu charakterisieren. Dazu sollte der DNA-Abschnitt überlappend in Oligomere von ca. 20 BP unterteilt werden, die dann für die angesprochenen Tests genutzt werden können. Auf diese Weise könnten gleich mehrere sehr wichtige Erkenntnisse erhalten werden: im naheliegendsten Fall können die Faktoren, die zur Verstärkung des Fascin-Gens in reifenden DC relevant sind, bestimmt werden. Gleichzeitig kann mit diesen Ergebnissen auf generell bei der Ausreifung von Dendritischen Zellen beteiligte Transkriptionsfaktoren geschlossen werden. Die Untersuchung der hergestellten Konstrukte zeigte in HaCaT-Zellen keine Verstärkung der Expression, so dass die erhaltenen Transkriptionsfaktoren sehr wahrscheinlich auch für die Spezifität auf Dendritische Zellen verantwortlich sind. Sollte tatsächlich beim Einfügen multipler Enhancerabschnitte in den Promotorbereich festgestellt werden, dass eine Limitation aufgrund der Menge vorhandener Transkriptionsfaktoren eintritt, bestünde die Möglichkeit, durch Kotransfektion Faktoren zu ergänzen, da diese dann bekannt wären.

Im Verlauf der Arbeiten hatte sich gezeigt, dass die XS106-Zellen (vgl. 3.6), obwohl es sich um eine murine Zell-linie handelt, ein gutes Modell darstellen, den Einfluss der „D“-Konstrukte, kloniert in die Bal-Schnittstelle von Fascin2.7Bal, zu untersuchen. Unter Verwendung dieser murinen Zell-linie könnte in Form eines schnellen Durchmusterens weiterer hergestellter Fascinpromotor-Konstrukte bereits eine Vorselektion auf aussichtsreiche Kandidaten unter diesen Konstrukten getroffen werden. Für eine definitive Bewertung der Konstrukte ist allerdings die Transfektion in hDC unerlässlich.

---

<sup>73</sup> EMSA – electro mobility shift assay

### 4.2.6 Unspezifische Maßnahmen zur Erhöhung der Expressionsstärke

Neben der Strategie, eine Verstärkung der Expression durch Hinzufügen von weiteren vornehmlich promotoreigenen regulatorischen Elementen zu erreichen, wurden auch unspezifische, nicht direkt mit der Promotoraktivität in Verbindung stehenden Maßnahmen untersucht. Das grundsätzliche Problem, dass mit dieser Strategie verbessert werden sollte, ist nicht allein auf Dendritische Zellen beschränkt: generell allen nichtviralen Transfektionsmethoden (Crystal, 1995, Luo et al., 2000, Song und Zheng, 2001) ist gemein, dass sie zwar im Gegensatz zu viralen Vektoren über ein ausgezeichnetes Sicherheitsprofil verfügen, aber gleichzeitig auch nur eine sehr geringe Expressionseffizienz des plasmidcodierten Transgens ermöglichen. Der Hauptgrund für diesen Umstand besteht in der Tatsache, dass die transfizierte DNA nachdem sie in die Zelle gelangt ist, dort entweder endosomal-lysosomal bzw. cytosolisch vorliegt. Zur erfolgreichen Transkription muss sie erst in den Zellkern gelangen. Der Austausch von Molekülen zwischen Zellkern und Cytoplasma wird durch spezielle Kanalproteine in der Kernmembran vermittelt (Stoffler et al., 1999, Kiseleva et al. 2000, Gorlich et al. 1995). Diese gestatten im wesentlichen zwei Mechanismen des Austauschs: kleinere Moleküle mit einem Radius von bis zu 9 nm können passiv durch Diffusion eingeschleust werden, größere werden an Transportproteine gebunden und auf diese Weise aktiv in den Kern aufgenommen (Ohno et al. 1998, Nigg, 1997). Wie bereits unter 4.2.2.2 angemerkt, muss Plasmid-DNA aufgrund ihrer Größe aktiv in den Zellkern aufgenommen werden. Dieser Schritt stellt die entscheidende Limitation für die Transfektion mit Plasmid-DNA dar (Zabner et al. 1995, Labat-Moleur et al.1996). Für Zellen oder Zelllinien, die (noch) zur Teilung befähigt sind, wurde bei einer Transfektion in der Mitose-Phase des Zellzyklus, wahrscheinlich aufgrund der Umorganisation der Zellkernmembran, eine Erhöhung der Expressionseffizienz beschrieben (Brunner et al. 2000, Ludtke et al. 2002). Bei Dendritischen Zellen handelt es sich um ausdifferenzierte Zellen, die sich nicht mehr teilen, so dass die Aufnahme von DNA wahrscheinlich ausschließlich auf den o. b. Vorgang, den aktiven Transport durch die Kernporen, beschränkt bleibt. Durch Einflussnahme auf den Kerntransport und, resultierend daraus, einer gesteigerten Aufnahme von Plasmid-DNA kann demnach eine Steigerung der Expression des plasmidcodierten Transgens erreicht werden.



### 4.2.6.1 Verbesserung des Kerntransports durch Einfügen der NFkB-Bindungsstelle

Wie unter 3.7 beschrieben, wurde zur Einflussnahme auf den Kerntransport und zur Steigerung der Expressionseffizienz eine repetitive NFkB-Bindungsstelle in das Plasmid außerhalb des Promotorbereichs eingeführt, wie es 2001 von Mesika und Mitarbeitern beschrieben worden war. Die Ergebnisse, vor allem mit dem Reportergen Luziferase, zeigten erfreulicherweise eine deutliche Zunahme der Expression in hDC. Allerdings konnte auch in HaCaT Keratinozytenzellen ein Anstieg in der Luziferaseexpression festgestellt werden. Obwohl der Fascin-Promotor spezifisch in Dendritischen Zellen wirksam sein sollte und die Veränderung am Plasmid außerhalb der Promotorregion gemacht wurde, so dass das bindende NFkB-Dimer keine transkriptionsverstärkende Wirkung vermitteln konnte, schien dadurch die Spezifität des Fascin-Promotor verloren gegangen zu sein.

#### 4.2.6.1.1 Einfluss des Basalpromotors

Bros und Mitarbeiter beschrieben 2003 bei der Charakterisierung des Fascin-Promotors, dass dieser aus einem Basalpromotor, der alle notwendigen Elemente zur Initialisierung der Transkription des Fascingens enthält, besteht und einem distal lokalisierten Enhancerelement, das reifeinduziert genutzt wird und maßgeblich für die Stärke des Promotors verantwortlich ist. Die Spezifität des Fascinpromotors wird ebenfalls durch den distal lokalisierten Enhancer vermittelt und kommt wahrscheinlich dadurch zustande, dass die bindenden Transkriptionsfaktoren in der erforderlichen Zusammensetzung ausschließlich in DC exprimiert werden (Jeang und Khoury, 1988). Der Basalpromotor hingegen, kann auch von anderen Zellen genutzt werden. So konnte z.B. für HaCaT-Zellen ebenfalls eine Aktivität des Basalpromotors nachgewiesen werden. Diese Beobachtung ist für transiente Transfektionsexperimente zunächst kein seltenes Ereignis. Selbst in Zellen, die den Promotor nicht endogen nutzen, wie im Fall der HaCaT-Zellen. Auch für den humanen CD11c-Promotor konnte z. B. eine Reporteraktivität in CD11c-defizienten T-Zell-linien gezeigt werden (Noti et al. 1996). Der als Basalpromotor im Fascinpromotor charakterisierte Bereich besitzt neben der TATA-Box zusätzlich ein Sequenzmotiv bestehend aus einer CRE-/AP-1 Bindungsstelle sowie ein weiteres, das aus einer AHR-ARNT Bindungsstelle bzw. einer GC-Box zusammengesetzt ist. Viele Promotoren verfügen im Bereich ihres Transkriptionsstarts über dieselben Elemente, da die Initialisierung der Transkription über recht ähnliche Mechanismen abläuft. Demnach verfügen diese Zellen über die erforderlichen Transkriptionsfaktoren, so dass bei einer

## 4 - Diskussion

---

transienten Transfektion der Basalpromotor auch genutzt werden kann. Ein parallel durchgeführtes Experiment mit dem Fascin0.21-Konstrukt, das nur den Basalpromotor enthält, zeigte ebenfalls nach Einführen einer NFkB-Bindungsstelle in HaCaT-Zellen eine deutliche Zunahme der Luziferaseexpression, die in ähnlicher Größenordnung, wie jene des Fascin2.7NFkB-Konstrukts lag. (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung unterstützt die Tatsache, dass die Zunahme der Expression in HaCaT-Zellen auf die Wirkung des Basalpromotors zurückzuführen ist und dass mit dem Einführen der NFkB-Bindungsstelle mit ziemlicher Sicherheit auch in DC eine Verbesserung des Kerntransports erreicht werden konnte. Die gesteigerte Wirkung des Basalpromotors kann mit der Erhöhung der Anzahl von Plasmiden im Zellkern erklärt werden, die zur Transkription genutzt werden können. Der definitive Nachweis eines gesteigerten Kerntransports kann aber nur über die Akkumulation der Plasmide im Zellkern z. B. durch Fluoreszenzmarkierung der Plasmide mit der GeneGrip-Methode (Zelphati et al. 1999) und Dokumentation mit dem Fluoreszenzmikroskop erbracht werden. Da durch Einführen der NFkB-Bindungsstelle in das Plasmid die basale Aktivität des Promotors in HaCaT zunahm und somit die Spezifität verloren ging, wurde auf den weiteren Nachweis verzichtet. Selbst wenn die detektierte Aktivität des Basalpromotors in HaCaT-Zellen als ein Produkt der transienten Transfektion gesehen werden kann, so ist jedoch mit dieser bei der Verwendung eines derart modifizierten Plasmids bei der DNA-Vakzinierung mittels Genpistole noch stärker zu rechnen. Der überwiegend vorherrschende Zelltyp an der Applikationsstelle Haut sind Keratinozyten. Selbst wenn die Expression des transfizierten Gens dadurch nur gering ansteigen sollte, so resultiert aufgrund der größeren Anzahl transfizierter Zellen ein Verlust der spezifischen Expression auf Dendritische Zellen. Der Einfluss des Basalpromotors limitiert somit den Einsatz von Methoden zur Verstärkung der Expression eines nachgeschalteten Transgens, die als Funktionsprinzip ausschließlich die verbesserte Aufnahme von Plasmid in den Zellkern bewirken.

### 4.2.6.1.2 Beurteilung der Expression der EGFP +/- NFkB-Konstrukte

Grundsätzlich konnte durch Einführen einer repetitiven NFkB-Bindungsstelle in das Plasmid eine Verstärkung der Expression des codierten Transgens erreicht werden. Speziell mit der Verwendung der EGFP-Konstrukte sollte der Einfluss der NFkB-Bindungsstelle im Plasmid auf Einzelzellebene bestimmt werden. Für das Konstrukt, das die NFkB-Bindungsstelle enthielt, wurde einerseits eine generelle Zunahme EGFP-positiver Zellen und andererseits ein höherer Anteil an DCs, die stark das Transgen

## 4 - Diskussion

---

exprimieren, erwartet. Die Analyse der transfizierten Zellen erfolgte mit dem Cytofluorometer. Grundsätzlich konnte die postulierte Hypothese durch die Experimente bestätigt werden (vgl. 3.7.1.2 und 3.7.1.4), jedoch wurde in deren Verlauf festgestellt, dass die Unterschiede zwischen den Konstrukten mit und ohne NFkB-Bindungsstelle teilweise recht gering ausfielen. Die zur Beurteilung der Unterschiede in DC durchgeführte statistische Analyse mit dem Student's t-Test konnte in den meisten Fällen keine Signifikanz nachweisen. Für eine mögliche Erklärung dieses Sachverhalts müssen zwei grundsätzlich verschiedene Ursachen bzw. Einflüsse betrachtet werden:

- A) methodischer Art
- B) NFkB-Expressionskinetik in DC

### 4.2.6.1.2.1 Methodische Einflüsse auf die EGFP-Expression

Die Schwankungsbreite bei dem Reporter gen Luziferase fiel innerhalb der Mehrfachwerte eines Konstrukts geringer aus, im Vergleich zu den EGFP-Konstrukten und konnte somit den Verstärkungseffekt der NFkB-Einheit deutlicher zeigen. Ausschlaggebend für diese Tatsache war die Kofransfektion einer zweiten Luziferase, die zur Nivellierung transfektionsbedingter Unterschiede in der Expression des Reporter gens eingesetzt wurde (vgl. 3.2.1 und 3.2.2). In Ermangelung eines ähnlichen Systems für das Reporter gen EGFP war ausschließlich das jeweilige Fascin-EGFP-Konstrukt transfiziert worden. Es zeigte sich, dass dem Einfluss dieser transfektionsbedingten Expressionsunterschiede sehr wahrscheinlich eine große Bedeutung zukommt. Der Stichprobenumfang von drei bzw. vier parallel transfizierten Ansätzen reichte meistens nicht aus, um den Einfluss potentiell erhaltener Extremwerte soweit zu reduzieren, dass sich der Mittelwert in engeren Grenzen bewegte. Die Entwicklung eines Systems, ähnlich dem des Dual-Luziferasereporter-Assays wäre wünschenswert. Am schwierigsten dürfte hierbei die Auswahl der beiden kofotransfizierenden Gene sein. Als Kompromisslösung könnte zur Orientierung die Renilla Luziferase mittransfiziert werden, so dass zumindest die Expressionen qualitativ beurteilt und eventuell auch gewichtet werden könnten.

### 4.2.6.1.2.2 Vermittlung der Transportfunktion durch die NFkB-Moleküle in DC

Wie bereits unter 3.7. ansatzweise beschrieben, spielt der NFkB-Weg eine zentrale Rolle bei der Generierung und Differenzierung der Dendritischen Zellen, aber auch bei der terminalen Ausreifung dieser Zellen, sowie der Antigenpräsentation. Deshalb wurde auch eine mögliche Expressionssteigerung eines plasmidcodierten Transgens unter Nutzung

dieses Signaltransduktionsweges angestrebt. Die vorliegenden Ergebnisse und vor allem die stark schwankenden Unterschiede in der Expression der EGFP-Konstrukte mit und ohne NFkB-Bindungsstelle lassen auf eine differentielle Einflussnahme der einzelnen Mitglieder der NFkB-Familie und deren unterschiedlichen Aktivität in der Steigerung der Expressionsstärke schließen, obwohl die NFkB-Bindungsstelle außerhalb des Promotorbereichs kloniert worden war und dadurch keine Transkriptionsfaktorwirkung zu erwarten war. Zu Beginn der Arbeiten mit dem Fascin-Promotorkonstrukt war der Transfektionszeitpunkt aufgrund von Kinetikversuchen mit dem Fascin2.7-Konstrukt (vgl. 3.4) auf den Tag 9 festgelegt worden, da zu diesem Zeitpunkt eine robuste Expression der nachgeschalteten Luziferase erhalten werden konnte, d.h. der Fascin-Promotor stark genutzt wurde. Zum gleichen Transfektionszeitpunkt wurden auch die Transfektionen mit den EGFP +/- NFkB-Konstrukten durchgeführt. Wie ebenfalls unter 3.7 beschrieben, sollte unter Ausnutzung der Eigenschaft der NFkB-Moleküle, nach Aktivierung in den Zellkern zu translozieren, ein mit einer entsprechenden NFkB-Bindungsstelle versehenes, transfiziertes Plasmid auf diese Weise verstärkt in den Kern geschafft werden. Für die Bindung an die DNA ist eine Dimerisierung der NFkB-Moleküle zu Homo- oder Heterodimeren notwendig (Thanos und Maniatis, 1995, Verma et al. 1995). Desweiteren ist es von großem Interesse, dass die NFkB-Moleküle mit starker Affinität an die entsprechende Bindungsstelle im Plasmid binden. Deshalb wurde zunächst in fünffacher Wiederholung die als konsensus-Bindungsstelle bekannte kB-Bindungsstelle des I $\kappa$ B-Motivs verwendet. An die Konsensus-Bindungsstelle binden bevorzugt die NFkB-Mitglieder p50 und p65, deren Beteiligung am Reifeprozess der Dendritischen Zellen mehrfach beschrieben ist (Rescigno et al. 1998, Hofer et al. 2001, Ouaz et al. 2002).

### **4.2.6.1.2.3 Einfluss des Transfektionszeitpunktes auf die Transportfunktion der NFkB-Moleküle**

Zum Zeitpunkt der Transfektion waren die Dendritischen Zellen bereits knapp 48 h mit den proinflammatorischen Cytokinen stimuliert worden, die für die Reifung der Dendritischen Zellen benötigt wurden. Wie lange kann man mit einer Translokation der NFkB-Moleküle in den Zellkern als Reaktion auf die Stimulation mit diesen Cytokinen rechnen? Die zur Signaltransduktion benötigten NFkB-Moleküle liegen bereits als inaktive Vorstufe im Cytoplasma vor (May und Ghosh, 1998). Nach Aktivierung des NFkB-Signalweges erfolgt relativ schnell auch die Translokation dieser Moleküle in den Zellkern. Dabei wird das inhibitorische Protein I $\kappa$ B $\alpha$  an den Serinen S32 und S36 phosphoryliert,

## 4 - Diskussion

---

degradiert und ubiquitinyliert. Die NFkB-Moleküle, deren Kernlokalisationssequenz durch die Bindung an Ikb $\alpha$  maskiert war, können nach deren Freilegung jetzt in den Kern wandern (Karin und Ben-Neriah, 2000). Bereits nach wenigen Minuten können die translozierten Moleküle im Zellkern nachgewiesen werden. Hofer und Mitarbeiter konnten 2001 nach Inkubation Dendritischer Zellen mit dem Bakterium *Salmonella typhimurium* bzw. LPS zeigen, dass bereits nach einer halben Stunde eine große Menge der NFkB-Moleküle im Zellkern vorlagen (nachgewiesen über EMSA), 2h nach der Aufnahme der Bakterien war die Menge der NFkB-Transkriptionsfaktoren im Kern maximal. Mindestens 24 h nach der Inkubation konnten, wenn auch in geringerer Menge, noch NFkB-Proteine im Zellkern nachgewiesen werden. Gleichzeitig mit dem Anstieg neuexprimierter Moleküle der NFkB-Transkriptionsfaktorenfamilie erfolgt auch ein Anstieg ihres endogenen Inhibitors, dem Ikb $\alpha$ , so dass final eine konstitutive nukleäre Translokation resultiert (Saccani et al., 2003). Die Reaktion wird durch die endogene Synthese von Cytokinen wie z.B. TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  zunächst aufrecht erhalten, es ist aber wahrscheinlich, dass, wie im vorliegenden Fall, nach 48h weit weniger Moleküle noch aktiv translozieren, so dass je nach individuellen Voraussetzungen in der Zelle der erwünschte Transporteffekt durch diese Moleküle eventuell nur noch gering ausfällt. Allerdings muss in diesem Zusammenhang der Einfluss der Transfektion selbst auf die Zellen berücksichtigt werden: der Vorgang der Transfektion ist für die Zellen mit einer Stress-Situation verbunden, die allein schon eine erneute Aktivierung des NFkB-Signalweges induzieren könnte und auf diese Weise einen eigenen Beitrag zur Translokation von NFkB-Molekülen, verbunden mit einem resultierenden gesteigerten Plasmidimport, liefern kann. In welcher Höhe sich dieser Beitrag auswirkt bzw. ob das Ausmaß der gesteigerten Expression des Plasmids mit der NFkB-Bindungsstelle eventuell allein auf die Transfektion zurückzuführen ist, kann nur schwer abgeschätzt werden. Insgesamt gesehen können diese beiden Punkte zwar als Erklärung für eine nicht maximal erreichte Expressionssteigerung dienen, da aber die Zellen für jedes Experiment immer nach dem gleichen Protokoll stimuliert und transfiziert worden waren, bietet dieser Sachverhalt allein eigentlich keine befriedigende Erklärung für die detektierten Schwankungen innerhalb der Mehrfachwerte eines Konstrukts.

### 4.2.6.1.2.4 Differenzielle Regulation der NFkB-Signalübertragung in DC

Die Aktivierung und Ausreifung von Dendritischen Zellen erfolgt über einen Zeitraum von einigen Tagen unter intensiver Beteiligung des NFkB-Signalweges. Gibt es in diesen Zellen regulatorische Mechanismen, die die Qualität der NFkB-Beteiligung modulieren?

## 4 - Diskussion

---

Hat diese Regulation eventuell auch Einfluss im vorliegenden Fall, in dem die NFkB-Moleküle gleichzeitig zum Transport von Plasmid-DNA in den Zellkern genutzt werden sollen? Seit einigen Jahren ist die Aufklärung der NFkB-Beteiligung an der Differenzierung, Reifung und Antigenpräsentation Dendritischer Zellen sowie deren Aktivierung von T-Lymphozyten Gegenstand des Forschungsinteresses einiger Arbeitsgruppen: Bereits Ammon und Mitarbeiter hatten 2000 festgestellt, dass die terminale Differenzierungsphase von DC mit einem Anstieg von NFkB-Dimeren, die aus einer p50 bzw. RelB-Untereinheit zusammengesetzt sind, begleitet wird. Clark und Mitarbeiter fanden 1999 eine Korrelation zwischen der Expression des Reifemarkers CD83 bzw. der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und CD40 mit der Expression des NFkB-Moleküls RelB, die auch auf eine Beteiligung von RelB bei der terminalen Differenzierung von DC schließen lässt. Pettit und Mitarbeiter hatten 1997 schon eine Beteiligung von relB an einer effektiven Antigenpräsentation postuliert. Rescigno und Mitarbeiter (1998) sowie auch die Arbeitsgruppe Hofer (2001) konnten zeigen, dass bei der Stimulation von Dendritischen Zellen mit LPS oder der Inkubation mit Bakterien, die eine Ausreifung der DC bewirken, das NFkB-Molekül p65 eine zentrale Bedeutung für den Reifungsprozess der DC besitzt und dass in frühen Stadien der Ausreifung vor allem NFkB-Dimere bestehend aus p50/p65, p50/p50 und p50/cRel im Zellkern zu finden sind. Zusammengenommen lässt sich für die Beteiligung der einzelnen Mitglieder der NFkB-Transkriptionsfaktorenfamilie folgende Beziehung ableiten: Das frühe Reifestadium der Dendritischen Zellen wird vornehmlich durch die NFkB-Moleküle p50, p65 und cRel dominiert. Im Verlauf der weiteren Ausreifung scheint die qualitative Zusammensetzung der NFkB-Moleküle zugunsten der Untereinheit RelB verschoben zu sein. Der Einfluss von p65 und p50 wird dann scheinbar immer geringer. Die Expression dieser beiden Mitglieder der NFkB-Familie geht wahrscheinlich zurück bzw. die Moleküle werden nicht mehr aktiviert. Wie bereits unter 4.2.6.1.2.2 beschrieben, wurde eine NFkB-Bindungsstelle gewählt, an die bevorzugt die Mitglieder p65 und p50 binden können. Diese Auswahl unterstützt die Beobachtung, dass in den frühen Ausreifungsstadien der DC diese Mitglieder der NFkB-Familie maßgeblich beteiligt sind. Gleichzeitig wurde aber auch der Reifestatus der Dendritischen Zellen durch Expression der Oberflächenmarker CD83 bzw. CD86 überprüft und resultierend daraus der Transfektionszeitpunkt auf den Kulturtag 9 festgelegt. Nach Clark und Mitarbeitern (1998) müsste zu diesem Zeitpunkt bereits ein Anstieg in der Expression von relB zu verzeichnen sein und der Einfluss von p65 bzw. p50 zurücktreten. Zusammen mit der Beobachtung von Romani und Mitarbeitern (1996),

## 4 - Diskussion

---

dass nicht alle DC in der Kultur die volle Ausreifung erreichen, scheint der individuelle Reifestatus der Präparation Dendritischer Zellen und damit die prozentuale Zusammensetzung der NFkB-Mitglieder das Ausmaß der Expressionssteigerung eines plasmidcodierten Transgens, vermittelt durch die Transportfunktion der NFkB-Mitglieder, maßgeblich zu bestimmen. Dieser Sachverhalt bietet eine gute Erklärung für stärkere Schwankungen innerhalb der Mehrfachwerte, als auch für die Beobachtung, wenn die Unterschiede zwischen den EGFP-Konstrukten +/-NFkB-Bindungsstelle nur gering ausfielen.

### 4.2.6.1.2.5 Einfluss der Sequenz der NFkB-Bindungsstelle

NFkB-Dimere wurden als hochflexible Moleküle beschrieben, die neben der angestammten Bindung auch alternative Kontakte mit der Basensequenz und dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der DNA eingehen können. Auf diese Weise können die NFkB-Moleküle mehrere unterschiedliche Bindungsstellen mit hoher Affinität binden (Chen et al. 1998, Chen-Park et al. 2002). Auf der anderen Seite bedeutet diese Flexibilität auch, dass unterschiedliche NFkB-Moleküle mit der gleichen Bindungsstelle in ähnlicher Stärke assoziieren können. In vitro Studien haben aber auch gezeigt, dass jede NFkB-Bindungsstelle bevorzugt bestimmte NFkB-Dimere bindet und dass die Dimere einige Bindungsstellen mit höherer Affinität binden als andere (Kunsch et al. 1992, Lin et al. 1995, Udalova et al. 2002). Im vorliegenden Fall wurde zur Nutzung der Transportfunktion der NFkB-Moleküle eine Bindungsstelle verwendet, die bevorzugt die Untereinheiten p50 und p65 bindet. Wie bereits unter 4.2.6.1.2.4 beschrieben, ist im Verlauf der Ausreifung Dendritischer Zellen eine unterschiedliche Zusammensetzung der NFkB-Moleküle über diesen Zeitraum aktiv. Zum Transfektionszeitpunkt am Tag 9 war die Mehrzahl der Zellen wahrscheinlich soweit herangereift, dass die Aktivität der Untereinheiten p50 und p65 weitgehend schon herunterreguliert war. Die mit zunehmendem Reifegrad immer stärker aktiven relB-Einheiten konnten die Bindungsstelle nicht effektiv besetzen, so dass die resultierende Expressionssteigerung (aufgrund der Kernlokation) nur mäßig ausfiel. Es scheint also doch deutliche Unterschiede hinsichtlich der Präferenz mancher NFkB-Moleküle für bestimmte Bindungssequenzen zu geben. Tatsächlich berichteten Bonizzi und Karin 2004 über eine Bindungsstelle in der Promotorregion von Genen, die eine bestimmte Art von Chemokinen codieren. Diese bindet mit hoher Affinität Dimere bestehend aus p52 und RelB, aber keine Dimere aus den NFkB-Untereinheiten p50 und p65. Eine Umwandlung dieser Bindungsstelle in eine

## 4 - Diskussion

---

Konsensus-Sequenz, die bevorzugt Dimere aus p50 und p65 erkennt (vgl. 4.2.6.1.2.2) führt zur verminderten Aktivität des Promotors. Diese unterschiedliche Nutzung von NFkB-Bindungsstellen lässt sich mittlerweile recht gut durch die in neuester Zeit entdeckte Erweiterung in der NFkB-Signalübertragung erklären: neben dem etablierten NFkB-Weg, aktiviert über die IκBα-Kinase (Karin und Ben-Neriah, 2000), existiert ein alternativer Signalweg, der durch NIK<sup>74</sup> und IKKα<sup>75</sup> aktiviert wird (Senftleben et al. 2001, Xiao et al., 2001). Die Mitglieder p50, p65 und cRel der NFkB-Transkriptionsfaktorenfamilie werden durch den klassischen Signalweg aktiviert, p52 und relB hingegen durch den alternativen Signalweg. In Dendritischen Zellen scheint im Verlauf der Ausreifung ein Wechsel zwischen den beiden Signalwegen stattzufinden, der die Dominanz von RelB im terminalen Ausreifungsstadium erklären kann. Somit scheint die Verwendung einer konsensus NFkB-Bindungsstelle zur Verstärkung der Expression eines plasmidcodierten Gens nur bedingt geeignet: Die Bindungsstelle wird bevorzugt im frühen Ausreifungsstadium der DC genutzt und kann dann sehr wahrscheinlich eine deutliche Steigerung des nukleären Imports des Plasmids vermitteln. Im Gegensatz dazu ist die Nutzung des Fascin-Promotors stark reifeabhängig und wird vor allem im fortgeschrittenen Reifestadium genutzt. Die maximal zu erreichende Expression des Transgens unter Verwendung eines derart modifizierten Plasmids wäre, abhängig von der Degradierung der Plasmid-DNA im Zellkern, dann zu erreichen, wenn die Transfektion am Tag 7 oder 8 stattfindet, die Detektion der Fascinexpression aber erst 48 h später erfolgt.

Parallel zu der eingesetzten konsensus NFkB-Bindungsstelle wurde auch die Fascinpromotoreigene NFkB-Bindungsstelle in fünffacher Wiederholung an die gleiche Stelle im Plasmid kloniert und zur Verbesserung des Kerntransports eingesetzt (vgl. 3.7.1.7). Mit der Fascin-Promotoreigenen NFkB-Bindungsstelle (NFkB-fas-Bindungsstelle) konnte im Luziferasetest weder bei den hDC noch in den XS106-Zellen eine Verstärkung der Luziferaseexpression nachgewiesen werden. Die Ergebnisse wurden dahingehend interpretiert, dass mit der Einführung dieser NFkB-Bindungsstelle keine Verstärkung des nukleären Imports von Plasmid-DNA erreicht werden konnte. Die NFkB-fas-Bindungsstelle stammt aus der Homologieregion A des Fascinpromotors (vgl. 3.5.1), welche Bestandteil des reifeabhängigen Enhancer-Elementes ist. Unter Berücksichtigung

---

<sup>74</sup> NFkB inducing Kinase – Kinase, die, die Aktivierung von NFkB einleitet via Phosphorylierung von IKKα

<sup>75</sup> IKKα - IκappaB kinase alpha



## 4 - Diskussion

---

der Erkenntnisse aus 4.2.6.1.2.4 müßte erwartet werden, dass diese Bindungsstelle dann bevorzugt von NFkB-Dimeren, bestehend aus den Untereinheiten p52 und RelB genutzt werden sollte. Zum Transfektionszeitpunkt am Tag 9 und Detektion der Expression am Tag 10 konnte keine Verstärkung der Expression nachgewiesen werden. Neben einer völligen Inaktivität dieser Bindungsstelle, könnte auch folgende Erklärung angeführt werden: die NFkB-fas-Bindungsstelle kann nicht durch NFkB-Dimere, bestehend aus p50 und p65, genutzt werden (vgl. Bonizzi und Karin, 2004), die Expression bzw. Aktivierung von RelB oder auch p52 ist zu diesem Zeitpunkt noch nicht soweit vorangeschritten, dass genügend Moleküle vorliegen, die den Transport von Plasmid-DNA nach dem vorgestellten Mechanismus unterstützen könnten.

Die Ergebnisse des Kinetikversuches (vgl. 3.4) zeigen, dass zum Transfektionszeitpunkt am Tag 11 und Detektion der Expression am Tag 12 noch einmal eine Steigerung in der Luziferaseexpression erhalten werden kann. Eventuell wird diese finale Expressionsteigerung durch die NFkB-fas-Bindungsstelle vermittelt. Sollte sich bestätigen, dass diese NFkB-Bindungsstelle tatsächlich vorwiegend von RelB bzw. p52-Molekülen genutzt wird, ist deren Einsatz zur Verbesserung des Kerntransports von Plasmid-DNA bei einer DNA-Vakzinierung wenig empfehlenswert, da in diesem Fall die DNA auf unreife Langerhanssche Zellen trifft, die zunächst nicht über die entsprechenden aktiven NFkB-Moleküle verfügen, um diese Bindungsstelle effektiv zu nutzen.

### 4.3 Arbeiten zur Immuntoleranz

Nachdem im ersten Teil der Arbeit Möglichkeiten und Strategien untersucht wurden, die Aktivität des Fascin-Promotors bzw. die Expression in Dendritischen Zellen allgemein zu verstärken, liegt der Fokus des zweiten Teils der Arbeit darauf, Grundlagen für einen Anwendungsbereich zu schaffen, in dem der Fascin-Promotor als Regulatorelement für eine DNA-Vakzine eingesetzt werden kann. Die Einflussnahme auf Dendritische Zellen als Zielstruktur kann dabei zwei Richtungen der Immunmodulation bewirken: 1) Erzeugung einer neuen gegen ein spezifisches Antigen gerichteten Immunantwort, die z. B. in der Bekämpfung von Tumoren und Infektionskrankheiten eingesetzt werden kann oder 2) Vermittlung von Toleranz gegen ein spezifisches Antigen, die bei der Therapie von Autoimmunerkrankungen oder zur Verhinderung einer Transplantatabstoßung Verwendung findet. Im vorliegenden Fall wurde die Präferenz der weiteren Untersuchungen zugunsten der Toleranzinduktion gewählt.

Wie bereits unter 3.8 beschrieben, kann eine veränderte Expression von Oberflächenstrukturen auf der Dendritischen Zelle den Kontakt mit der T-Zelle und damit auch die Qualität der resultierenden Immunantwort modulieren. Durch gezielte Einflussnahme auf die Oberflächenstrukturen kann demnach auch Einfluss auf die Art der Immunantwort ausgeübt werden. Viele dieser kostimulatorischen oder Adhäsionsmoleküle an der Zelloberfläche der DC werden erst im Verlauf der Ausreifung der DC exprimiert, so dass durch gerichtete Inhibition verschiedener Zielstrukturen in den dafür zuständigen Signalwegen die Expression sämtlicher Proteine moduliert werden kann. Da zwischen den einzelnen Signalwegen viele Quervernetzungen bestehen und die Regulation dieser Moleküle vielfach noch nicht bekannt ist, ist die Vorhersage, welche Moleküle genau verändert werden, schwierig. Mittelfristig soll mit Hilfe des Fascin-Promotors ein dominant negatives Protein exprimiert werden, das nach seiner Expression die Signaltransduktionskaskade an einer definierten Stelle hemmt. Zur Untersuchung welche Moleküle hierfür in Frage kommen, wurden wie unter 3.8.1 beschrieben, zunächst pharmakologische Inhibitoren eingesetzt. Neben der Auswahl, welche Inhibitoren für diesen Zweck geeignet erscheinen, war auch die Etablierung eines in-vitro-Modells zur Untersuchung der Inhibitorwirkung nötig.

### 4.3.1 Eignung der XS106-Zelllinie als in-vitro-Testsystem

Die XS106-Zelllinie weist die Expression der wichtigsten kostimulatorischen Moleküle und die von MHC Klasse-II-Molekülen auf. Die Ergebnisse der Behandlung mit den pharmakologischen Inhibitoren (vgl. 3.8.1.1.2) zeigten aber, dass nach 24stündiger Inkubation keine Veränderung hinsichtlich der Expression der untersuchten Oberflächenproteine festgestellt werden konnte. Ein zuvor unternommener Versuch die Expression dieser Oberflächenmoleküle durch Stimulation mit proinflammatorischen Cytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) zu steigern, war ebenfalls nicht erfolgreich. Dieser Versuch wurde, im Gegensatz zum Experiment mit den pharmakologischen Inhibitoren, auch über ein Intervall von drei Tagen ausgeführt und brachte keine nennenswerte Veränderung hinsichtlich der Expression dieser Proteine (Daten nicht gezeigt). Die gewählten Inhibitoren bzw. die eingesetzten Konzentrationen sowie die Stimulantien TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  scheinen alle keinen Einfluss auf die Proteinexpression der untersuchten Moleküle auszuüben. Dass keiner der durch die Inhibitoren gehemmten Signalwege in diesen Zellen aktiv sein sollte oder aktiviert werden könnte, ist als eher unwahrscheinlich zu betrachten. Viel eher ist zu vermuten, dass die untersuchten Moleküle nicht (mehr) über diese Signalwege reguliert werden. Damit bei den Zellen ohne vorherige Stimulierung eine Veränderung in der exprimierten Proteinmenge festgestellt werden kann, muss zum einen vorausgesetzt werden, dass die gewählten Signalwege zur Inhibition tatsächlich für die Expression dieser Oberflächenproteine verantwortlich sind und in der logischen Konsequenz, dass diese Signalwege dann auch konstitutiv aktiv sein müssten. Der letzt genannte Aspekt ist aber für vorwiegend stress-induzierte Signalwege<sup>76</sup> eher unwahrscheinlich. Bereits exprimiertes Protein, sofern es sich nicht wie z.B. beim I $\kappa$ B $\alpha$ , um Komponenten der Signaltransduktion handelt, deren Degradierung und Ubiquitynylierung für die Signalweiterleitung notwendig ist (vgl. Karin und Ben-Neriah, 2000; May und Ghosh, 1998) bleibt wahrscheinlich bis zum Absterben der Zelle erhalten. Es kann also nur die Expression potentiell neu synthetisierten Proteins durch Inhibition der Signalwege verhindert werden. Einen sensitiveren Nachweis, ob die codierenden Gene dieser Proteine einer Regulation über diese Signalwege zugänglich sind, kann z.B. durch Nachweis differentiell exprimierter mRNA versucht werden, allerdings ist im Hinblick auf die Fokussierung von stress-induzierten Signalwegen ohne vorherige Stimulierung der

---

<sup>76</sup> aus dieser Gruppe stammten die meisten der eingesetzten Inhibitoren

## 4 - Diskussion

---

Zellen auch auf dieser Ebene nicht mit einer differentiellen Regulation zu rechnen. Aufgrund dieser Überlegungen wurde auf weitere Experimente mit dieser Zelllinie verzichtet. Die XS106-Zelllinie scheint für die vorliegende Fragestellung ungeeignet. Die Wahl einer neuen Zelllinie, die durch Stimulation mit verschiedenen proinflammatorischen Cytokinen zur Differenzierung gebracht werden kann und dadurch ihren Status als Zelllinie verliert, schien für das geplante Projekt deutlich erfolgversprechender zu sein. Dieses murine Zell-System ist viel besser an die Gegebenheiten, der Existenz von unreifen und reifen Dendritischen Zellen, die nach Stimulation mit proinflammatorischen Cytokinen (oder bakteriellen Zellwandkomponenten wie LPS) ineinander übergehen, adaptiert.

### 4.3.2 Einfluss diverser Inhibitoren auf die Zelllinie SP37A3

Unter 3.8.1.1.2.2.1 wurde die Wirkung von Inhibitoren auf die SP37A3-Zellen zusammengefasst, die keine Auswirkung auf die Expression der untersuchten Moleküle CD40, CD80 und CD86 nach 3tägiger Inkubation und unter Stimulation mit den Reifungscytokinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hatten. Die Betrachtung unter dem Mikroskop zeigte morphologisch weitgehend keine Veränderungen hinsichtlich der Ausreifung dieser Zellen zu reifen murinen Dendritischen Zellen. Lediglich für den Proteinkinase C-Inhibitor NPC 15437 wurde für die gezeigte Konzentration schon ein größerer Anteil Trypanblau-positiver Zellen gefunden, der auf eine beginnende Toxizität schließen lässt. Aksoy und Mitarbeiter hatten 2002 den Einfluss der Proteinkinase C auf die Ausreifung von humanen Dendritischen Zellen nach Stimulation mit LPS untersucht und festgestellt, dass die Proteinkinase C selbst phosphoryliert und somit der Signalweg aktiviert wird. Nach Behandlung mit einem Inhibitor, der global alle Subtypen der Proteinkinase C hemmt, konnten sie zwar eine verminderte Produktion von IL-12 aber keine Veränderung im Anstieg der kostimulatorischen Moleküle CD80 bzw. CD86 und von MHC Klasse II-Molekülen feststellen. Im vorliegenden Fall konnte, wie unter 3.8.1.1.2.2.1 gezeigt, nach Stimulation mit TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und unter Verwendung des spezifischen Proteinkinase C-Inhibitors NPC 15437 in den murinen SP37A3-Zellen ebenfalls keine Veränderung in der Expression dieser Moleküle festgestellt werden. Interessant in diesem Zusammenhang könnte die Auswirkung auf die Sekretion verschiedener Cytokine, wie im genannten Beispiel IL-12, sein, denn auch eine differentielle Expression der sekretierten Cytokine vermag die Qualität der Immunantwort zu modulieren. Der Fokus der Arbeiten wurde aber zunächst auf Veränderungen der zentralen kostimulatorischen Moleküle gesetzt und

## 4 - Diskussion

---

deren potentielle Beeinflussung als Maßstab für breiter angelegte Untersuchungen mit den jeweiligen Inhibitor herangezogen.

Für den Inhibitor GW5074 (Lackey et al., 1999) einem cRAF-1 Inhibitor konnte auch kein Einfluss auf die Expression der untersuchten kostimulatorischen Moleküle nachgewiesen werden. In Bezug auf Dendritische Zellen ist für den genannten Inhibitor bisher noch keine Anwendung beschrieben worden. GW5074 wirkt in der Signaltransduktionskaskade unmittelbar nach dem Molekül Ras. Der Inhibitor gegen dieses Molekül, das Manumycin A (Hara et al., 1993), erwies sich in den untersuchten Konzentrationen als sehr toxisch für die XS106-Zellen, Aus diesem Grund wurde es gar nicht in den SP37A3-Zellen eingesetzt. Die Erfahrung hinsichtlich der bisherigen Arbeit mit der SP37A3-Zell-linie ließ darauf schließen, dass diese Zellen wesentlich sensibler auf Stimulantien reagieren im Vergleich zu XS106-Zellen. Eine derart deutlich toxische Wirkung konnte für GW5074 nicht festgestellt werden. cRaf, das inhibierte Molekül durch GW5074, steht am Beginn einer Signalkaskade von MAP Kinasen, bestehend aus cRAF, MEK<sup>77</sup> und ERK<sup>78</sup>. Die im folgenden angesprochenen Inhibitoren U0126 und PD98059, beides Hemmer des ERK-Signalweges, lieferten ebenfalls keine Veränderungen in der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86. Es scheint, dass diese Wirkung auch für den Inhibitor GW5074 zutrifft.

Ein ähnliches Ergebnis für U0126 (Favata et al., 1998) bzw. PD98059 (Dudley et al, 1995) konnten Puig-Kröger und Mitarbeiter 2001 feststellen, als sie den Einfluss des ERK-Signalweges auf die Ausreifung humaner Dendritischer Zellen, generiert aus CD14+ Blutmonozyten, untersuchten. Sie hatten die Ausreifung der Dendritischen Zellen sowohl mit LPS als auch TNF- $\alpha$  vorgenommen und konnten für beide Fälle zeigen, dass unter Verwendung der o. g. ERK-Signalweg-Inhibitoren sogar eine Verstärkung der funktionellen und phänotypischen Reifung der humanen Dendritischen Zellen inklusive der Expression wichtiger kostimulatorischer Moleküle resultierte. Sie schlossen daraus, dass die Aktivierung des ERK-Signalweges einen negativen Effekt auf die Ausreifung der Dendritischen Zellen ausübt. Etwa zeitgleich hatten Arrighi und Mitarbeiter 2001 annähernd die gleichen Ergebnisse in humanen dendritischen Zellen gefunden. Sie berichteten jedoch nicht von einer zusätzlichen Verstärkung der Ausreifung von DC und

---

<sup>77</sup> MEK - mitogenactivated protein kinase kinase – mitogen aktivierte Proteinkinase

<sup>78</sup> ERK - extracellular signal-regulated kinase – extrazellulär regulierte Kinase

## 4 - Diskussion

---

Expression der kostimulatorischen Moleküle nach Inhibition des ERK-Signalweges, das auf einen positiven Einfluss dieses Signalweges schließen ließe. Diese Aussage bestätigt zugleich die Ergebnisse von Ardeschna und Mitarbeiter, die bereits 2000 ebenfalls in humanen Dendritischen Zellen festgestellt hatten, dass eine Inhibition des MAP/ERK-Signalweges keinen Einfluss auf die Viabilität und Ausreifung dieser Zellen ausübt. Zusammengenommen bestätigen die Ergebnisse, die aus Experimenten in humanen Dendritischen Zellen gewonnen wurden, die vorliegenden Resultate der murinen Zell-(linie) SP37A3. Die SP37A3-Zelllinie (Sutter et al.; unveröffentlicht) wurde nach dem Protokoll von Winzler und Mitarbeitern (1997) hergestellt. Den Prototyp dieser Zelllinie stellen die 1997 generierten sog. D1-Zellen dar. Rescigno und Mitarbeiter hatten 1998 intensive Studien bezüglich der Abhängigkeit dieser Zellen (D1-Zellen) vom Wachstumsfaktor GM-CSF durchgeführt. Bei Entzug des Wachstumsfaktors kann eine Stimulation mit LPS unter Aktivierung des ERK-Signalweges die Überlebensfähigkeit der Zellen über 5 Tage sichern. Bei einer Inhibition dieses Signalweges mit PD98059 geht der positive Einfluss des LPS verloren. Im Zusammenhang mit diesen Studien hatten sie auch den Einfluss der ERK-Signalwegblockade auf die Expression von CD86 und MHC Klasse II-Moleküle untersucht und, wie in der vorliegenden Arbeit, keinen Unterschied hinsichtlich der Expression dieser Moleküle feststellen können.

Von zentraler Bedeutung für die Regulation der Differenzierung und Ausreifung Dendritischer Zellen scheint der Phosphoinositol-3-Kinase / Akt Signalweg (PI3-K/Akt) zu sein. So konnten Ardeschna und Mitarbeiter 2000 feststellen, dass nach Stimulation unreifer myeloider DCs mit LPS und Blockade des PI3-K/Akt-Signalweges durch den spezifischen PI3-Kinase Inhibitor LY294002 dieses zu einer erniedrigten Zellviabilität und gleichzeitig erhöhter Apoptoserate führte. Aufgrund der hohen Apoptoserate war es ihnen nicht möglich, die weiteren Auswirkungen der Blockade dieses Signalweges näher zu untersuchen. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Inhibition der Phosphoinositol-3-Kinase mit LY294002 in der Konzentration von 5 $\mu$ M und 10 $\mu$ M und anschließender Inkubation über 3 Tage mit den Reifungscytokinen TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  weder eine Reduktion in der Zellzahl noch eine Auswirkung der Inhibition auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle festgestellt werden. Die Auszählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer unter Verwendung von Trypanblau (vgl.2.2.2.2) lieferte keine erhöhte Anzahl trypanblau-positiver, toter Zellen. Morphologische Veränderungen, die charakteristisch für das Auftreten von Apoptose sind, können ebenfalls nicht festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die Expression antiapoptotischer Proteine

## 4 - Diskussion

---

(z.B. der BCL-2-Gruppe) durch Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges über TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sein. Dass über diesen Signalweg generell eine Beeinflussung der Expression kostimulatorischer Moleküle möglich ist, konnten 2002 Yang und Mitarbeiter zeigen: die Stimulation von aus Monozyten abgeleiteten unreifen DCs mit Hyaluronsäure oder Chondroitinsulfat führte zur Ausreifung dieser Zellen, verbunden mit einer Hochregulation kostimulatorischer Moleküle. Eine Blockade der PI3-Kinase mit Wortmannin verringerte die Effekte der Stimulantien. Unter der Annahme, dass Wortmannin ebenso spezifisch wie LY294002 die Phosphoinositol-3-Kinase hemmt, scheint der Einfluss des PI3/Akt-Signalweges auf die Expression kostimulatorischer Moleküle stark von der Art des Ausreifungsstimulus abzuhängen. Für den vorliegenden Fall muss aber trotzdem festgehalten werden, dass unter Verwendung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zur Ausreifung der murinen DC keine Veränderung hinsichtlich der Expression kostimulatorischer Moleküle zu erreichen war. Eine weitere Verwendung dieser Substanz wurde deshalb nicht angestrebt.

### 4.3.3 Inhibition des NF $\kappa$ B-Signalweges durch Bay11-7082 bzw. PDTC

Mit den beiden Inhibitoren Bay11-7082 und PDTC, die, wie unter 3.8.1.1.2.2.2 beschrieben, den NF $\kappa$ B-Signalweg mit unterschiedlichem Wirkprinzip hemmen, konnte eine verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in den murinen DC bei deren Ausreifung unter Verwendung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  nachgewiesen werden. Wenn zunächst die Inhibition der kostimulatorischen Moleküle nur in vitro in den SP37A3-Zellen erfolgen und diese veränderten Zellen dann z.B. in Balb/c-Mäuse (aus denen sie ursprünglich generiert wurden) zurücktransferiert werden sollen, ist für diesen Einsatz das Bay11-7082 die geeignetere Substanz. Bay11-7082 hemmt **irreversibel** die Phosphorylierung des Moleküls I $\kappa$ B $\alpha$ , so dass die Aktivierung und Degradierung und sukzessive die Freigabe der NF $\kappa$ B-Moleküle nicht mehr erfolgen kann. Die inhibitorische Wirkung hält, obwohl nur durchschnittlich eine halbe Stunde inkubiert wurde, mindestens über drei Tage an. Mit einer zusätzlichen Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges durch den Transfer der Zellen ist aufgrund der irreversiblen Blockade der Phosphorylierungsposition am I $\kappa$ B $\alpha$  ebenfalls nicht zu rechnen. Beim PDTC ist für höhere Konzentrationen (100  $\mu$ M) und bei einer längeren Inkubationsdauer (> 1 h) ein gegenläufiger Effekt beobachtet worden, nämlich, dass die Inhibition des NF $\kappa$ B-Signalweges wieder vollständig aufgehoben wird und im Gegenzug dann sogar noch eine Verstärkung der NF $\kappa$ B-vermittelten Signaltransduktion resultiert (vgl. Schreck et al., 1992). Dieser Effekt konnte

## 4 - Diskussion

---

auch bei der Untersuchung der Expression kostimulatorischer Moleküle in den murinen SP37A3-Zellen festgestellt werden: Einsatz von 60  $\mu$ M und Stimulation über 30 min lieferte eine verminderte Expression der Moleküle CD86 und CD80 (vgl. 3.8.1.1.2.2.2), bei einer Inkubation über eine Stunde bzw. Einsatz einer höheren Konzentration war die Reduktion in der Expression dieser Moleküle weniger deutlich ausgeprägt. Dieser Sachverhalt limitiert den Einsatz des PDTC in der o. b. Anwendung, des adoptiven Transfers veränderter SP37A3-Zellen zurück in Balb/c Mäuse. Zum Nachweis der Blockade des NF $\kappa$ B-Weges, verbunden mit der Auswirkung auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle ist er jedoch gut geeignet.

Ardeschna und Mitarbeiter hatten 2000 in humanen Dendritischen Zellen bereits eine verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86 bzw. von MHC Klasse-II-Molekülen unter Stimulation der Ausreifung mit LPS und Inhibition der Translokation der NF $\kappa$ B-Moleküle in den Zellkern feststellen können. Unter Verwendung der o. g. Inhibitoren und Induktion der Ausreifung mit TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde, wie unter 3.8.1.1.2.2.2 beschrieben, das gleiche Ergebnis für CD80 und CD86 in den SP37A3-Zellen erhalten. Yoshimura und Mitarbeiter (2001) konnten zeigen, dass nach adenoviralem Transfer und Überexpression von I $\kappa$ B $\alpha$  in humanen Dendritischen Zellen, generiert aus CD14+-Blutmonozyten, der NF $\kappa$ B-Signalweg in diesen Zellen blockiert werden konnte. Neben einer verminderten Expression der Oberflächenmoleküle HLA-Klasse II<sup>79</sup>, CD40, CD80 und CD86 wiesen sie auch eine Reduktion in der Produktion und Sekretion immunstimulatorischer Cytokine wie IL-12 oder TNF- $\alpha$  nach. Im gemischten Leukozytentest zeigten die so veränderten DC eine deutliche Reduktion in der Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren, welches in einer geringen Proliferationsrate der T-Zellen manifest wurde. Die erhaltenen Ergebnisse in den SP37A3-Zellen bzw. die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition des NF $\kappa$ B-Signalweges ein vielversprechendes Ziel darstellt, die Expression kostimulatorischer Moleküle zu reduzieren und auf diese Weise Einfluss auf die Initiierung einer Immunantwort zu nehmen bzw. diese zu modulieren. Sowohl das Oberflächenmolekül CD80 (Zhao et al., 1996, Hsing und Bishop, 1999) als auch CD86 (Li et al.; 1999, Baldwin, 1995) weisen in Ihren Promotorregionen Bindungsstellen für NF $\kappa$ B-Moleküle auf. Speziell für diese beiden

---

<sup>79</sup> HLA = human leukocyte antigen – humanes Leukozyten-Antigen



## 4 - Diskussion

---

Oberflächenproteine wird dadurch die Auswirkung einer NFκB-Blockade, verbunden mit einer verminderten Expression, besonders deutlich.

### 4.3.4 Inhibition des p38-MAP-Kinase Signalweges durch SB203580

Die Inkubation mit dem p38 MAP-Kinase-Inhibitor SB203580 zeigte bereits in relativ geringen Konzentrationen (1μM) eine deutliche Inhibition der Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 in den murinen SP37A3-Zellen (vgl. 3.8.1.1.2.2.3). Der Promotorbereich von CD86 weist mindestens eine ATF<sup>80</sup> bzw. eine CREB<sup>81</sup> Bindungsstelle auf (Ardeschna et al.; 2000), ebenso wurde für den Promotor des CD80-Gens die Existenz einer CREB-Bindungsstelle (Fong et al., 1996) beschrieben. Verschiedene Transkriptionsfaktoren wie z. B. ATF1 oder ATF2 bzw. CREB werden in Reaktion auf bestimmte Stimuli über den p38-MAP-Kinase Signalweg aktiviert (Raingeaud et al., 1996, Tan et al., 1996). Fukao und Mitarbeiter postulierten 2000, dass der p38-MAP-Kinase-Signalweg in reifen Dendritischen Zellen wahrscheinlich konstitutiv aktiv ist. Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse kann die Auswirkung der Blockade des p38-MAP-Kinase-Signalweges durch SB203580 auf die Expression dieser kostimulatorischen Moleküle sehr gut verstanden werden. Arrighi und Mitarbeiter konnten 2001 zeigen, dass durch Inhibition mit SB203580 die unter Verwendung von TNF-α bzw. LPS induzierte Hochregulation der Oberflächenmoleküle CD1a, CD40, CD80, CD86, HLA-DR und CD83 in humanen Dendritischen Zellen reduziert war. Ardeschna und Mitarbeiter hatten 2000 bereits ebenfalls für die meisten der genannten Oberflächenmoleküle in humanen DC eine verminderte Expression feststellen können, nicht aber für CD40 und HLA-DR. Die in ihrer Expression veränderten Moleküle nach Inhibition des p38-MAP-Kinase Signalweges sind weitgehend die gleichen, wie sie bereits bei einer Inhibition des NFκB-Signalweges gefunden wurden. Neben der Existenz von NFκB-Bindungsstellen in den Promotorbereichen dieser Gene, wurde für die p38-MAP-Kinase eine Wechselwirkung mit der Signaltransduktion über den NFκB-Weg beschrieben (Shakhov et al., 1990; Legrand-Poels et al., 1997; Van den Berghe et al., 1996; Carter et al., 1999). Aufgrund der multiplen Vernetzungen und Wechselwirkungen beider Signalwege wird die in weiten Teilen gleiche Auswirkung auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle in DC deutlich.

---

<sup>80</sup> ATF = activating transcription factor – aktivierender Transkriptionsfaktor

<sup>81</sup> CREB = cAMP responsive element binding protein – cAMP-responsibles Element bindendes Protein

### 4.3.5 Einfluss von SB203580 auf die Expression weiterer Oberflächenmarker

Die Untersuchung der verschiedenen Signalwege, um durch deren Blockade Einfluss auf die Expression der zentralen kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 in den SP37A3-Zellen nehmen zu können, lieferte nur für den p38-MAP-Kinase- bzw. den NFκB-Signalweg eine erfolgversprechende Basis. Im nächsten Schritt sollte nun die Auswirkung der Blockade eines dieser Signalwege auf die Expression weiterer Oberflächenmoleküle, die an der Ausbildung einer Immunologischen Synapse beteiligt sind, untersucht werden. DC zählen unter den APC, zu den Zellen, die am effektivsten antigenes Peptid präsentieren können. Wie unter 1.1.1 bereits beschrieben, können als Ursache hierfür die DC spezifischen MIIC-Bereiche gesehen werden, die eine gesteigerte Beladung von MHC-II-Molekülen mit antigenem Peptid ermöglichen (Sallusto et al., 1995, Pierre et al., 1997). Eine Reduktion der Expression dieser Moleküle, wie sie unter der Inhibition des NFκB-Signalweges beschrieben worden ist (vgl. Ardeschna et al., 2000), könnte zwangsläufig dazu führen, dass weniger MHC-II-Moleküle in den MIIC-Bereichen vorliegen und aus diesem Grund weniger Antigen präsentiert werden kann. Die Wechselwirkung zwischen dem via MHC Klasse II- präsentierten antigenen Peptid und dem peptidspezifischen T-Zellrezeptor ist per se eher schwach ausgeprägt. Eine zusätzliche Reduktion in der Dichte antigenpräsentierender MHC-II-Moleküle könnte möglicherweise zum völligen Verlust der Wechselwirkung bzw. zur Verhinderung der Ausbildung einer Immunologischen Synapse führen. Bei der Modulation von Immunantworten zur Induktion von Toleranz soll aber lediglich die Qualität der Wechselwirkung zwischen DC und T-Zelle verändert werden, die Ausbildung der Immunologischen Synapse muss aber zur Erzeugung tolerogener regulatorischer T-Zellen ( $T_{reg}$ ) erhalten bleiben. Aus diesem Grund ist der Blockade des p38-MAP-Kinase-Signalweges, die nicht mit einer verminderten Expression von MHC-II-Molekülen verbunden ist, der Vorzug gegeben worden. Die weiteren Untersuchungen wurden deshalb mit dem Inhibitor SB203580 durchgeführt.

Bei den weiteren untersuchten Oberflächenmolekülen handelte es sich um die kürzlich als neue Mitglieder der B-7-Gruppe identifizierten kostimulatorischen Moleküle B7-DC (CD273, PD-L2)<sup>82</sup>, B7-H1 (CD274, PD-L1)<sup>83</sup> und B7H (CD275, LICOS, B7RP-1)<sup>84</sup> sowie

---

<sup>82</sup> PD-L2 = Programmed Death-Receptor Ligand 2 – 2. Ligand des Rezeptors für Programmierten Zelltod

<sup>83</sup> PD-L1 = Programmed Death-Receptor Ligand 1 – 1. Ligand des Rezeptors für Programmierten Zelltod

## 4 - Diskussion

---

dem Adhäsionsmolekül ICAM-1<sup>85</sup> (CD54). Unter Verwendung der Konzentration 1µM für SB203580 konnte für die beiden Liganden B7-DC bzw. B7-H1 ebenfalls eine reduzierte Expression festgestellt werden (vgl. 3.8.1.1.2.3). Die Expression von B7H (LICOS) blieb unter der Blockade des p38 MAP-Kinase-Signalweges unverändert, wohingegen eine leicht verstärkte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 nachgewiesen werden konnte. Die Expression von B7-DC (Tseng et al. 2001) ist neben verschiedenen Tumoren fast ausschließlich auf DC beschränkt; B7-H1 (Tamura et al., 2001) ist auf mehreren verschiedenen Zelltypen z.B. aktivierten T-Zellen und APCs<sup>86</sup> exprimiert (Yamazaki et al., 2002). Für die Liganden B7-DC und B7-H1 wurde zunächst eine kostimulatorische Wirkung beschrieben (Shin et al., 2003; Nguyen et al., 2002; Tseng et al., 2001, Tamura et al. 2001) die unabhängig von den bekannten Interaktionspartnern auf der T-Zelle (CD28, CTLA-4<sup>87</sup>, ICOS<sup>88</sup>) ist. Als Zielstruktur für beide Liganden wurde der PD-1<sup>89</sup> Rezeptor auf T-Zellen erkannt. Als aber die Wechselwirkung nachgewiesen wurde, konnte gleichermaßen festgestellt werden, dass die Interaktion mit diesem Rezeptor ein inhibitorisches Signal (Tsushima et al., 2003; Freeman et al., 2000) bewirkt, das sich z. B. in verminderter Cytokinsekretion oder T-Zell-Proliferation auswirkt. Mittlerweile wird davon ausgegangen, dass es neben dem PD-1 Rezeptor noch einen weiteren, bisher unbekanntem Rezeptor für die Liganden B7-DC bzw. B7-H1 gibt (Shin et al., 2003). Der Umfang bzw. die Verteilung der Signalweiterleitung dieser Ligand-Rezeptor-Familie der B7-Gruppe scheint ziemlich ähnlich, wie die bereits bekannte Untergruppe B7-1 bzw. B7-2 (APC) und CD28 bzw. CTLA-4 (T-Zelle) aufgebaut zu sein.

Durch die Blockade des p38-MAPK-Signalweges konnte also eine Reduktion der Expression dieser beiden Liganden festgestellt werden. Wenn der PD-1 Rezeptor der einzige Interaktionspartner auf der T-Zelle wäre, dessen Signalfunktion eher mit der Aufrechterhaltung von Toleranz verbunden wird (vgl. Carreno und Collins, 2002; Freeman

---

<sup>84</sup> LICOS = ligand of inducible costimulator – Ligand des induzierbaren Kostimulators

B7-RP-1 = B7 related Protein 1 - mit der B7-Gruppe kostimulatorischer Moleküle verbundenes Protein 1

<sup>85</sup> ICAM-1 = intercellular adhesion molecule 1 – interzelluläres Adhäsionsmolekül 1

<sup>86</sup> APC = antigen presenting cells = antigenpräsentierende Zellen. Wie z.B. DC, B-Zellen, Macrophagen

<sup>87</sup> CTLA-4 = Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 – Cytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4

<sup>88</sup> ICOS = inducible costimulator – induzierbarer Kostimulator

<sup>89</sup> PD-1 = programmed Death-1 = Rezeptor 1 für programmierten Zelltod

## 4 - Diskussion

---

et al. 2000), wäre die verminderte Expression dieser Liganden schwer zu erklären und würde sich als eher kontraproduktiv für die Vermittlung von Toleranz darstellen. Wie aber bereits erwähnt, besitzen beide Liganden über einen derzeit noch unbekanntem Rezeptor auch eine costimulatorische aktivierende Wirkung auf T-Zellen, so dass unter Berücksichtigung dieses Sachverhalts ihre verminderte Expression durchaus im Sinne einer Toleranzinduktion interpretiert werden kann. Neben den Parallelen in der Funktionsverteilung mit den B7-1 bzw. B7-2-Molekülen scheint deren Regulation über den p38-MAPK-Signalweg weitgehend identisch, sonst könnte durch die Blockade dieses Signalweges keine verminderte Expression dieser Liganden festgestellt werden. Interessant in diesem Zusammenhang wäre aufgrund der engen Verzahnung mit dem NFkB-Signalweg die Untersuchung der Wirkung auf die Expression von B7-DC bzw. B7-H1 unter einer Blockade dieses Signalweges.

Das dritte untersuchte Oberflächenprotein der B7-Gruppe kostimulatorischer Moleküle ist das B7-H. B7-H ist der Ligand, der mit dem Rezeptor ICOS auf der T-Zelle wechselwirkt (Carreno und Collins, 2002). Wie bereits erwähnt, konnte durch die Blockade des p38-MAPKinase-Signalweges keine Reduktion der Expression von B7-H erreicht werden, so dass eine Beteiligung dieses Signalweges an dessen Expression eher unwahrscheinlich erscheint. Denkbar wäre eine konzentrationsabhängige Reduktion der Expression, die für den Einsatz von SB203580 zur Signalwegblockade durchaus häufiger beobachtet wurde (vgl. Arrighi et al., 2001). B7-H zeigt eine robuste Expression in reifen SP37A3-Zellen, die sehr wahrscheinlich erst durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  induziert wurde (Swallow et al., 1999). Swallow und Mitarbeiter konnten zeigen, dass B7-H neben B-Zellen und DC auch auf weiteren Geweben vor allem nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  exprimiert wurde. Sie postulierten eine Beteiligung von B7-H bei der Verstärkung einer Immunantwort vor allem bei bereits aktivierten T-Zellen. Eine direkte Beteiligung bei der Stimulation von naiven T-Zellen hielten sie für eher unwahrscheinlich. Wenn B7-H ausschließlich eine Bedeutung bei der Aufrechterhaltung bzw. Verstärkung einer Immunantwort durch voraktivierte T-Zellen zukommt, aber keinen Einfluss auf die Qualität der Immunantwort ausüben kann, sollte dessen Expression weder nachteilig auf die Induktion von Toleranz einwirken bzw. würde deren Manifestation noch weiter unterstützen. In sofern passt auch die unveränderte Expression von B7-H nach Inhibition des p38-MAP-Kinase Signalweges zunächst gut in das Bild einer tolerogenen immunologischen Synapse. Özkaynak und Mitarbeiter konnten 2001 allerdings eine Beteiligung der B7-H – ICOS-Kostimulation sowohl bei akuten als auch chronischen Abstoßungsreaktionen von Transplantaten

## 4 - Diskussion

---

nachweisen, die unter Gabe eines Antikörpers gegen ICOS verhindert werden konnten. Basierend auf dieser Beobachtung kommt der Expression von B7-H eventuell doch eine kritische Rolle zu, besonders dann, wenn sich herausstellen sollte, dass der p38MAK-Kinase-Signalweg tatsächlich keinen Einfluss auf dessen Expression hat. B7-H wurde ursprünglich bei der Untersuchung von Genen entdeckt, die unter Beteiligung von NFκB-Transkriptionsfaktoren aktiviert werden (Swallow et al., 1999). Zusammen mit der vielfach beobachteten Induktion dessen Expression durch TNF-α scheint der Einfluss, der aus einer Blockade des NFκB-Signalweges hervorgeht, offensichtlich. Die Inhibition des NFκB-Signalweges wäre somit eine vielversprechende Option, um die Expression von B7-H zu reduzieren, sollte sich die Induktion dieses Oberflächenproteins tatsächlich als kritisch erweisen.

Neben den zentralen Wechselwirkungen zwischen peptidbeladenen MHC-II-Molekülen und spezifischen TCR bzw. der Interaktion von kostimulatorischen Molekülen mit ihrem entsprechenden Partner auf der jeweils anderen Zelle sind auch sog. Adhäsionsmoleküle an der Ausbildung und Aufrechterhaltung einer immunologischen Synapse beteiligt. Für diese Adhäsionsmoleküle ist generell beschrieben, dass sie eine Wechselwirkung zwischen APC und T-Zelle vermitteln können, auch unabhängig davon, ob die Interaktion zwischen MHC und TCR bzw. kostimulatorischen Molekülen stattgefunden hat (Griffiths et al., 1995, Staquet et al., 1995). Bei der Ausreifung der Dendritischen Zellen unter Stimulation mit proinflammatorischen Cytokinen kommt es bereits zur Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie CD54. Im vorliegenden Fall konnte unter Inhibition von p38-MAPK mit SB203580 eine weitere, wenn auch geringe, Steigerung der Expression von CD54 festgestellt werden. Die gleiche Beobachtung konnte auch nach einer Blockade des NFκB-Signalweges festgestellt werden (vgl. Yoshimura et al., 2001). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass eine starke Wechselwirkung von Adhäsionsmolekülen für eine erfolgreiche Aktivierung von T-Zellen notwendig ist und synergistisch wirkt (Kuhlmann et al., 1991), gleichzeitig muss aber bei einer Aktivierung und Initiierung einer Immunantwort die Interaktion zwischen beiden Zellen wieder aufgelöst werden können, damit weitere T-Zellen aktiviert werden können (Viola et al., 1996). Yoshimura und Mitarbeiter (2001) schlossen aus der gesteigerten Expression der Oberflächenmoleküle nach Inhibition des NFκB-Signalweges auch auf eine stärkere Wechselwirkung zwischen APC und T-Zelle und somit auf eine erschwerte Dissoziation beider Zellen. Diese Hypothese könnte ebenfalls ein Indiz für eine Toleranzinduktion darstellen. Sollte diese Vermutung zutreffend sein, so wäre auch unter der Blockade mit SB203580 mit einer

## 4 - Diskussion

---

solchen Verstärkung der Wechselwirkung zu rechnen, die in Richtung Toleranzinduktion deuten würde.

### 5 Zusammenfassung

Modifikationen der genregulatorischen Elemente des Fascinpromotors zur Entwicklung einer DNA-Vakzine stellen die aussichtsreichste Perspektive dar, eine starke, auf DC begrenzte Expression des codierten Proteins zu erreichen. Eine Duplikation unterschiedlich großer Bereiche der distal lokalisierten Homologiebereiche A und B liefert vornehmlich für jene der Homologieregion B eine robuste Verstärkung der Expression in Dendritischen Zellen, deren Spezifität auf diese Zellen erhalten bleibt. Keratinozyten, die bei einem Einsatz als DNA-Vakzine unter Verwendung einer Genpistole überwiegend am Applikationsort vorliegen, zeigen für die Duplikationskonstrukte nur eine geringe, basale Promotoraktivität. Die Untersuchung einiger dieser Konstrukte in der murinen DC-Zelllinie XS106 liefert eine ähnlich große Verstärkung der Expression wie in humanen DC und ermöglicht somit auch einen potentiellen Einsatz dieser DNA-Vakzine im Mausmodell. Durch Einführen einer repetitiven konsensus NFkB-Bindungsstelle an inerte Stelle im Expressionsplasmid, mit dem Ziel, den Kerntransport dieses Plasmids zu forcieren, kann zwar auch eine deutliche Verstärkung der Expression eines nachgeschalteten Reportergens erhalten werden, gleichzeitig geht dabei aber die Spezifität auf Dendritische Zellen verloren. Eine Fascin-Promotor eigene, repetitive NFkB-Bindungsstelle, an gleicher Stelle ins Plasmid kloniert, liefert keinen verstärkenden Effekt und ist somit zur Optimierung der Expressionseffizienz ebenfalls ungeeignet.

In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass im Modellsystem der SP37A3-Zellen, einer zur Ausreifung induzierbaren, murinen DC-Zelllinie, durch spezifische Inhibition des NFkB-Signalweges bzw- der MAP-Kinase p38 mit pharmakologischen Inhibitoren Dendritische Zellen resultieren, die eine verminderte Expression der zentralen kostimulatorischen Moleküle der B7-Gruppe, CD80 und CD86, aufweisen. Für SB203580, dem Inhibitor der MAP-K p38, konnte zusätzlich auch eine verminderte Expression weiterer Oberflächenrezeptoren dieser Gruppe, von CD273 bzw. CD274, nachgewiesen werden. Die reduzierte Expression dieser kostimulatorischen Moleküle lässt eine andere Qualität der Wechselwirkung mit T-Zellen vermuten, so dass durch Intervention in diese Signalwege eventuell ein Typus dendritischer Zellen erzeugt werden kann, der die Vermittlung von Toleranz gegen ein bestimmtes Antigen bewerkstelligen kann. Die in der vorliegenden Arbeit geschaffenen Grundlagen stellen somit eine aussichtsreiche Basis für weitere Forschungsaktivitäten auf diesem Gebiet dar.

## 6 Literatur

**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 - 78

**Aksoy E**, Amraoui Z, Goriely S, Goldman M, Willems F. **2002**: Critical role of protein kinase C epsilon for lipopolysaccharide-induced IL-12 synthesis in monocyte-derived dendritic cells – **Eur. J. Immunol.** **32**: 3040 - 9

**Ammon, C.**; Mondal, K.; Andreesen, R.; Krause, S.W. **2000**: Differential expression of the transcription factor NF-kappaB during human mononuclear phagocyte differentiation to macrophages and dendritic cells - **Biochem. Biophys. Res. Commun.** **268**: 99–105

**Ardeshna, K. M.**; Pizzey, A. R.; Devereux, S.; Khwaja, A. **2000**: The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells - **Blood** **96**: 1039 - 46

**Arrighi J-F**, Rebsamen M, Rousset F, Kindler V, Hauser C. **2001**: A critical role for p38 mitogen-activated protein kinase in the maturation of human blood-derived dendritic cells induced by lipopolysaccharide, TNF- $\alpha$ , and contact sensitizers - **J. Immunol.** **166**: 3837 - 45.

**Atchison, M. L.** **1988**: Enhancers: mechanisms of action and cell specificity - **Ann. Rev. Cell Biol.** **4**: 127 - 53

**Azuma, M.**; Cayabyab, M.; Buck, D.; Phillips, J. H.; Lanier, L. L. **1992**: CD28 interactions with B7 costimulates primary allogeneic proliferative responses and cytotoxicity mediated by small, resting T lymphocytes - **J. Exp. Med.** **175**: 353 - 60

**Baldwin A.S.** **1995**: The NF-kB and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights - **Annu. Rev. Immunol.** **14**: 649 - 81

**Barton, G. M., Rudensky, A. Y.** **1999**: Requirement for diverse, low-abundance peptides in positive selection of T cells - **Science** **283**: 67 - 70

**Berk, A.J.** **1999**: Activation of RNA polymerase II transcription.- **Curr. Opin. Cell. Biol.** **11(3)**: 330 - 5



**Bernard, P.**; Gabant, P.; Bahassi, E. M.; Couturier, M. **1994**: Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene - **Gene 148: 71 - 4**

**Birnboim, H. C. and Doly, J.** **1979**: A Rapid Alkaline Extraction Procedure for Screening Recombinant Plasmid-DNA - **Nucl. Acids. Res. 7: 1513 - 23**

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

**Boles, T. C.**, White, J. H. and Cozzarelli, N. R. **1990**: Structure of plectonemically supercoiled DNA - **J. Mol. Biol. 213: 931 - 51**

**Bonizzi, G.** und **Karin, M.** **2004**: The two NF- $\kappa$ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity - **Trends Immunol. 25: 280 - 8**

**Boukamp, Petra**; Petrussevska, Rule T.; Breitkreutz, Dirk; Hornung, Jürgen; Markham, Alex and Fusenig, Norbert E. **1988**: Normal Keratinization in a Spontaneously Immortalized Aneuploid Human Keratinocyte Cell Line – **J. Cell Biol. 106: 761 - 71**

**Boyum A** **1968**: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood – **Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (S97): 77 - 89**

**Brocker, T.**, Riedinger, M.; Karjalainen, K. **1997**: Driving gene expression specifically in dendritic cells - **Adv. Exp. Med. Biol. 417: 55 - 7**

**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 - 50**

**Bros, M.**; Ross, X-L.; Pautz, A.; Reske-Kunz, AB. and Ross, R. **2003**: The Human Fascin Gene Promoter Is Highly Active in Mature Dendritic Cells Due to a Stage-Specific Enhancer – **J. Immunol. 2003 171: 1825 - 34**

**Brunner, S.**; Sauer, T.; Carotta, S.; Cotton, M.; Saltik, M. und Wagner, E. **2000**: Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus - **Gene Ther. 7: 401 – 7**

**Carreno, B. M. and Collins, M.** **2002**: The B7 family of ligands and its receptors: New pathways for costimulation and inhibition of immune responses - **Annu. Rev. Immunol. 20: 29 - 53**

**Carter, A. B.**; Knudtson, K.L.; Monick, M. M. and Hunninghake, G. W. **1999**: The p38 mitogen-activated protein kinase is required for NF- $\kappa$ B-dependent gene expression: the role of TATA-binding protein (TBP) - **J. Biol. Chem. 274: 30858**

**Casares S**, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA **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 - 6**

**Caux, C.**, C. Massacrier, B. Vanbervliet, B. Dubois, C. Van Cooten, I. Durand and J. Banchereau **1994**: Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking - **J. Exp. Med. 180: 1263**

**Cella, M.**; Scheidegger, D.; Palmer-Lehmann, K.; Lane, P.; Lanzavecchia, A.; Alber, G. **1996**: Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation - **J. Exp. Med. 184: 747 - 52**

**Cereghini, S.** und Yaniv, M. **1984**: Assembly of transfected DNA into chromatin: structural changes in the origin-promoter-enhancer region upon replication - **EMBO J. 6: 1243 - 53**

**Chen, F.E.**, Huang, D.B., Chen, Y.Q. and Ghosh, G. **1998**: Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF- $\kappa$ B bound to DNA - **Nature 391: 410 - 13**

**Chen-Park, F.E.**, Huang, D.B., Noro, B., Thanos, D. and Ghosh, G. **2002**: The  $\kappa$ B DNA sequence from the HIV-LTR functions as an allosteric regulator of HIV transcription - **J. Biol. Chem. 277: 24701 - 8**

**Clark, G. J.**; Gunningham, S.; Troy, A.; Vuckovic, S.; Hart, D.N. **1999**: Expression of the RelB transcription factor correlates with the activation of human dendritic cells - **Immunology 98: 189 - 96**

**Condon, C.**; Watkins, S. C.; Celluzzi, C. M.; Thompson, K.; Falo, L. D. **1996**: DNA-based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells - **Nat. Med. 2: 1122 - 8**

**Cormack, B. P.**, Valdivia, R. H.; Falkow, S. **1996**: FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP) - **Gene 173: 33 - 8**

**Coulombe, B.**; Burton, ZF **1999**: DNA bending and wrapping around RNA polymerase: a "revolutionary" model describing transcriptional mechanisms – **Microbiol. Mol. Biol.**

**Rev. 63(2): 457 - 78**

**Crystal, R. G. 1995:** Transfer of genes to humans: Early lessons and obstacles to success - **Science 270: 404 - 410**

**Cumano, A.;** Kee, B. L.; Ramsden, D. A.; Marshall, A.; Paige, C. J.; Wu, G. E. **1994:** Development of B lymphocytes from lymphoid committed and uncommitted progenitors - **Immunol. Rev. 137: 5 - 33**

**Davenport, M. P.;** Grimm, M. C.; Lloyd, A. R. **2000:** A homing selection hypothesis for T cell trafficking - **Immunol. Today 21: 315 - 7**

**Davidson, I.;** Fromental, C.; Augereau, P.; Wildeman, A.; Zenke, M.; Chambon, P. **1986:** Cell-type specific protein binding to the enhancer of simian virus 40 in nuclear extracts - **Nature 323: 544 - 8**

**Diehl, S.;** Rincon, M. **2002:** The two faces of IL-6 on Th1 / Th2 differentiation - **Mol. Immunol. 39: 531 - 6**

**Dion, V. and Coulombe, B. 2003:** Interactions of a DNA-bound Transcriptional Activator with the TBP-TFIIA-TFIIB-Promoter Quaternary Complex – **J. Biol. Chem. 278: 11495 – 501**

**Dudley DT,** Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR **1995:** A synthetic inhibitor of the mitogenactivated protein kinase cascade - **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 7686 - 89**

**Dulbecco, R.** and Freeman, G. **1959:** Plaque-Production by the Polyoma Virus – **Virology 8: 396 - 7**

**Dulbecco, R.** and Vogt, M. **1954:** Plaque Formation and Isolation of Pure Lines with Poliomyelitis Viruses – **J. Exp. Med. 99: 167 - 82**

**Favata, MF;** Horiuchi, KY; Manos, EJ et al. **1998:** Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase - **J. Biol. Chem. 273: 18623 - 32**

**Fong TC,** Wu Y, Kipps TJ. **1996:** Identification of a promoter element that regulates tissue-specific expression of the human CD80 (B7.1) gene - **J. Immunol. 157: 4442 - 50**

**Förster, I.,** Lieberam, T. **1996:** Peripheral tolerance of CD4 T cells following local activation in adolescent mice - **Eur. J. Immunol. 26: 3194 - 202**

**Freeman, G. J. ;** Long, A. J.; Iwai, Y.; Bourque, K.; Chernova, T.; Nishimura, H.; Fitz, L.

J. ; Malenkovich, N. ; Okazaki, T. ; Byrne, M. C.; Horton, H. F.; Fouser, L.; Carter, L.; Ling, V.; Bowman, M. R.; Carreno, B. M.; Collins, M.; Wood, C. R. and Honjo, T. **2000**: Engagement of the PD-1 Immunoinhibitory Receptor by a Novel B7 Family Member Leads to Negative Regulation of Lymphocyte Activation - **J. Exp. Med.** **192**: 1027 - 34

**Fukao, T.**; Matsuda, S.; Koyasu, S. **2000**: Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN- $\gamma$  production by dendritic cells - **J. Immunol.** **164**: 64 - 71

**Geijtenbeek, T. B.**; Torensma, R.; van Vliet, S. J.; van Duijnhoven, G. C.; Adema, G. J.; van Kooyk, Y.; Figdor, C. G. **2000**: Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses - **Cell** **100**: 575 - 85

**Germain, St.**; Bonnet, Fabrice; Philippe, Josette; Fuchs, Sébastien; Corvol, Pierre and Pinet, Florence **1998**: A Novel Distal Enhancer Confers Chorionic Expression on the Human Renin Gene – **J. Biol. Chem.** **273 (39)**: 25292 - 300

**Goedegebuure, P. S.**; Douville, C. C.; Doherty, J. M.; Linehan, D. C.; Lee, K. Y.; Ganguly, E. K.; Eberlein, T. J. **1997**: Simultaneous production of T helper-I-like cytokines and cytolytic activity by tumor-specific T cells in ovarian and breast Cancer - **Cell. Immunol.** **175**: 150 - 6

**Gorlich D,** Vogel F, Mills AD, Hartmann E, Laskey RA 1995: Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import - **Nature.** **1995 377**: 246 - 8

**Gouinni, A. S.**; Lamkhioed, B.; Ochiachi, K.; Tanaka, Y.; Dalaporte, E.; Capron, A., Kinet, J. P., Capron, M. **1994**: High affinity IgE receptor on Eosinophils is involved in defense against parasites - **Nature** **367**: 183 - 6

**Grakoui, A.**; Bromely, 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 – 7

**Griffiths, C. E.** Railen, D., Gallatin, W. M. and Cooper, K. D. **1995**: The ICAM-3/LFA-1 interaction is critical for epidermal Langerhans cell alloantigen presentation to CD4+ T cells - **Br. J. Dermatol.** **133**: 823

**Griffiths, G. M.** **1995** - The cell biology of CTL killing - **Curr. Opin Immunol** **7**: 343 - 8

**Groskreutz, D., Schenborn, E. T.** **1997**: Reporter systems - **Methods Mol. Biol.** **63**: 11 - 30

**Gurunathan, S.**; Klinman, D.M. and Seder, R. A. **2000**: DNA VACCINES: Immunology, Application, and Optimization - **Annu. Rev. Immunol. 18: 927 – 74**

**Hackstein, H.**; Thomson, AW **2004**: Dendritic cells: emerging pharmacological targets of immunosuppressive drugs – **Nat. Rev. Immunol. 4: 24 - 35**

**Hara, M.**; Akasaka, K.; Akinaga, S.; Okabe, M; Nakano, H.; Gomez, R.; Wood, D.; Uh, M. and Tamanoi, F. **1993**: Identification of Ras farnesyltransferase inhibitors by microbial screening - **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2281 - 85**

**Hasbold J.** Johnson-Leger C, Atkins CJ, Clark EA, Klaus GG **1994**: Properties of mouse CD40: cellular distribution of CD40 and B cell activation by monoclonal anti-mouse CD40 antibodies – **Eur. J. Immunol.; 24 (8): 1835 - 42**

**Hengge, U. R.**; Walker, P. S.; Vogel, J. C. **1996**: Expression of naked DNA in human, pig, and mouse skin - **J. Clin. Invest. 97: 291: 1 - 6**

**Henkart, P. A.**; Berrebi, G. A.; Takayama, H.; Munger, W. E.; Sitkovsky, M. V. **1987**: Biochemical and functional properties of serine esterases in acidic cytoplasmic granules of cytotoxic T lymphocytes - **J. Immunol. 139: 2398 - 405**

**Hofer, S.**; Rescigno, M.; Granucci, F.; Citterio, S.; Francolini, M. und Ricciardi-Castagnoli, P. **2001**: Differential activation of NF- $\kappa$ B subunits in dendritic cells in response to Gram-negative bacteria and to lipopolysaccharide - **Microbes and Infection 3: 259 - 65**

**Hogquist, K. A.**; Gavin, M. A.; Bevan, M. J. **1993**: Positive selection of CD8+ T cells induced by major histocompatibility complex binding peptides in fetal thymic organ culture - **J. Exp. Med. 177: 1469 - 73**

**Holmes, David** S. And Quigley, Michael **1981**: A Rapid Boiling Method for the Preparation of Bacterial Plasmids – **Anal. Biochem. 114: 193 - 7**

**Hsieh, C. S.**; Macatonia, S. E.; Tripp, C. S.; Wolf, S. F.; O'Garra, A.; Murphy, K. M. **1993**: Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages - **Science 260: 547 - 9**

**Hsing, Y.** and **Bishop, G. A.** **1999**: Requirement for nuclear factor- $\kappa$ B activation by a distinct subset of CD40-mediated effector functions in B lymphocytes - **J. Immunol. 162:**

2804

**Hsu, F. J.**; Benike, C.; Fagnoni, F.; Liles, T. M.; Czerwinski, D.; Taidi, B.; Engleman, E. G.; Levy R. **1996**: Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells - **Nat. Med. 2: 52 - 8**

**Huang, A. Y.**; Bruce, A. T.; Pardoll, D. M.; Levitsky, H. **1996**: In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter - **Immunity 4: 349 - 55**

**Huang, Ch.**, Bi, Enguang; Hu, Yu; Deng, Weiwen; Tian, Zhigang; Dong, Chen; Hu, Yuanjie and Sun, Bing **2006**: A Novel NF-kB Binding Site Controls Human Granzyme B Gene Transcription – **J. Immunol. 176: 4173 - 81**

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

**Inaba, K.**; Metlay, J. P.; Crowley, M. T.; Witmer-Pack, M.; Steinman, R. **1990**: Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo - **Int. Rev. Immunol. 6: 197 - 206**

**Ioshikhes I,** Trifonov EN, Zhang MQ. **1999**: Periodical distribution of transcription factor sites in promoter regions and connection with chromatin structure. - **Proc Natl Acad Sci U S A. 96(6): 2891 - 5**

**Irvine, K. R.**; Rao, J. B.; Rosenberg, S. A.; Restifo N. P. **1996**: Cytokine enhancement of DNA immunization leads to effective treatment of established pulmonary metastases - **J. Immunol. 156: 238 - 45**

**Iscove, N.N** and Melchers, F. **1978**: Complete Replacement of Serum by Albumin, Transferrin and Soyabean Lipid in Cultures of Lipopolysaccharide-Reactive B Lymphocytes - **J. Exp. Med. 147: 923 - 33**

**Jeang, K-T. und Khoury, G.** **1988**: The Mechanistic Role of Enhancer Elements in Eukaryotic Transcription – **Bioessays 8: 104 - 7**

**Jeong, S.** und Stein, A. **1994**: Micrococcal nuclease digestion of nuclei reveals extended nucleosome ladders having anomalous DNA lengths for chromatin assembled on non-replicating plasmids in transfected cells - **Nucleic Acids Res. 22(3): 370 - 5**

**Jeong, SW.** und **Stein, A.** **1994**: DNA sequence affects nucleosome ordering on

replicating plasmids in transfected COS-1 cells and in vitro – **J. Biol. Chem. 269: 2197 - 205**

**Jonuleit, H.**, Kuhn, U., Müller, 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 - 42**

**Kalinski, P.**; Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M.; Kapsenberg, M. L. **1998**: Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient Cdla+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 - 9**

**Kanai, F.**; Lan, K. H.; Shiratori, Y.; Tanaka, T.; Ohashi, M.; Okudaira, T.; Yoshida, Y.; Wakimoto, H.; Hamada, H.; Nakabayashi, H.; Tamaoki, T. Und Omata, M. **1997**: In vivo gene therapy for alpha-fetoprotein-producing hepatocellular carcinoma by adenovirus-mediated transfer of cytosine deaminase gene - **Cancer Res. 57: 461 – 5**

**Kanno, M.**; Fromental, C.; Staub, A.; Ruffenach, F.; Davidson, I.; Chambon, P. **1989**: The SV40 T-Cell (kappa B) and the related H-2KB enhansons exhibit different cell type specific and inducible proto-enhancer activities, but the SV40 core sequence and the AP-2 binding site have no enhanson properties - **EMBO J. 8: 4205 - 14**

**Karin, M.**, and **Ben-Neriah, Y.** **2000**: Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- $\kappa$ B activity - **Annu. Rev. Immunol. 18, 621 - 63**

**Kikuchi, Kazuhiro**; Yanagawa, Yoshiki; Iwabuchi, Kazuya; Onoe, Kazunori **2003**: Differential role of mitogen-activated protein kinases in CD40-mediated IL-12 production by immature and mature dendritic cells - **Immunology Letters 89: 149 - 154**

**Kim, J.L.**; Nikolov, DB; Burley, SK **1993**: Co-crystal structure of TBP recognizing the minor groove of a TATA element - **Nature 365: 520 - 7**

**Kim, Y.**; Geiger, JH; Hahn, S; Sigler, PB **1993**: Crystal structure of a yeast TBP/TATA-box complex - **Nature 365: 512 - 20**

**Kiseleva, E.**, Goldberg, M. W., Cronshaw, J., and Allen, T. D. **2000**: The nuclear pore complex: Structure, function, and dynamics - **Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression 10: 101 – 112**

**Kuhlman P.**; Moy, V. T.; Lollo, B. A. and Brian, A. A. **1991**: The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-I in T lymphocyte activation. Contributions of adhesion and co-activation - **J. Immunol. 146: 1773 - 82**

**Kunsch, C.**; Ruben, S.M. and Rosen, C.A. **1992**: Selection of optimal  $\kappa$ B/Rel DNA-binding motifs: interaction of both subunits of NF- $\kappa$ B with DNA is required for transcriptional activation - **Mol. Cell. Biol. 12: 4412 - 21**

**Kurts, C.**; Carbone, F. R.; Barnden, M.; Blanas, E.; Allison, J.; Heath, W. R.; Miller, J. F. **1997**: CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity - **J. Exp. Med. 186: 2057 - 62**

**Labat-Moleur, F.**, Steffan, A.M.; Brisson, C.; Perron, H.; Feugeas, O.; Furstenberger, P.; Oberling, F.; Brambilla, E. Und Behr, J. P. **1996**: An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines - **Gene Ther. 3: 1010 - 17**

**Lackey, Karen**; Cory, Michael; Davis, Ronda; Frye, Stephen V.; Harris, Philip A.; Hunter, Robert N.; Jung, David K. O.; McDonald, Bradley; McNutt, Robert W.; Peel, Michael R.; Rutkowske, Randy D.; Veal, James M. and Wood, Edgar R. **2000**: The Discovery of Potent cRaf1 Kinase Inhibitors - **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 10: 223 - 6**

**Latham JP**, Searle PF, Mautner V, James ND **2000**: Prostate-specific antigen promoter/enhancer driven gene therapy for prostate cancer: construction and testing of a tissue-specific adenovirus vector - **Cancer Res. 60(2): 334 - 41**

**Laufer, T. M.**; DeKoning, J.; Markowitz, J. S.; Lo, D.; Glimcher, L. H. **1996**: Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex - **Nature 383: 81 - 5**

**Lee, W.**; Haslinger, A.; Karin, M.; Tjian, R. **1987**: Activation of transcription by two factors that bind promoter and enhancer sequences of the human metallothionein gene and SV40 - **Nature 325: 368 - 72**

**Legrand-Poels, S.**; Maniglia, S.; Boelaert, JR; Piette, J. **1997**: Activation of the transcription factor NF-kappaB in lipopolysaccharide-stimulated U937 cells - **Biochem. Pharmacol. 53: 339 - 46**

**Lehner, P. J.**; Cresswell, P. **1996**: Processing and delivery of peptides presented by MHC class I molecules - **Curr. Opin. Immunol. 8: 59 - 67**



**Lenz, Petra**; Bacot, Silvia M.; Frazier-Jessen, Michelle R.; Feldman, Gerald M. **2003**: Nucleoporation of Dendritic Cells: Efficient gene transfer by electroporation into human monocyte-derived dendritic cells – **FEBS 538: 149 - 154**

**Li, S.**; MacLaughlin, F. C.; Fewell, J. G.; Gondo, M.; Wang, J.; Nicol, F.; Dean, D. A.; Smith, L. C. **2001**: Muscle-specific enhancement of gene expression by incorporation of SV40 enhancer in the expression plasmid - **Gene Ther. 8: 494 - 7**

**Li, J.**; Liu, Z.; Jiang, S.; Cortesini, R.; Lederman, S. and Suci-Foca, N. **1999**: T-suppressor lymphocytes inhibit NF- $\kappa$ B-mediated transcription of CD86 gene in APC - **J. Immunol. 163: 6386**

**Lin, R.**, Gewert, D. and Hiscott, J. **1995**: Differential transcriptional activation in vitro by NF- $\kappa$ B/Rel proteins - **J. Biol. Chem. 270: 3123 - 31**

**Liu, C. C.**; Joag, S. V.; Kwon, B. S.; Young, J. D. **1990**: Induction of perforin and serine esterases in a murine cytotoxic T lymphocyte clone - **J. Immunol. 144: 1196 - 201**

**Liu, Y. J., Arpin, C.** **1997**: Germinal center development - **Immunol. Rev. 156: 111 - 26**

**Lobban, P. E.**, Kaiser, A. D. **1973**. Enzymatic end-to end joining of DNA molecules - **J. Mol. Biol. 78: 453 - 71**

**Loken, M. R., Stall, A. M.** **1982**: Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology - **J. Immunol. Methods 50: R85 - 112**

**Lorenz, W. W.**; McCann, R. O.; Longiaru, M.; Cormier, M. J. **1991**: Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase - **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4438 - 42**

**Ludtke, J.J.**; Sebestyen, M.G.; Wolff, J.A. **2002**: The effect of cell division on the cellular dynamics of microinjected DNA and dextran - **Mol. Ther. 5: 579 - 88**

**Lundqvist, Andreas**; Noffz, Gabriele; Pavlenko, Maxim; Sæbøe-Larsen, Stein; Fong, Timothy; Maitland, Norman and Pisa, Pavel **2002**: Nonviral and Viral Gene Transfer Into Different Subsets of Human Dendritic Cells Yield Comparable Efficiency of Transfection - **Journal of Immunotherapy 25(6): 445 - 54**

**Luo, D.**, and Saltzman, W. M. **2000**: Synthetic DNA delivery systems - **Nat. Biotechnol.**

18: 33 - 37

**Macatonia, S. E.**; Hocken, N. A.; Litton, M.; Vieira, P.; Hsieh, C. S.; Culpepper, J. A.; Wysocka, M.; Trinchieri, G.; Murphy, K. M.; O'Garra, A. **1995**: Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells - **J. Immunol.** **154**: 507 1 - 9

**Maestrelli, P.**; Tsai, J. J.; Cromwell, O.; Kay, A. B. **1988**: The identification and partial characterization of a human mononuclear cell-derived neutrophil chemotactic factor apparently distinct from IL-1, IL-2, GM-CSF, TNF and IFN-gamma - **Immunology.** **64**: 9 - 25

**Marko JF**, Siggia ED **1994**: Fluctuations and supercoiling of DNA – **Science** **265**: 506 - 8

**Matsui, H.**; Johnson, L. G.; Randell, S. H.; Boucher, R. C. **1997**: Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells - **J. Biol. Chem.** **272**: 11 17 - 26

**May M. J.und Gosh, S.** **1998**: Signal transduction through NF-kB – **Immunol. today** **2**: 80 - 8

**Mayordomo, J. I.**; Mayordomo, J. I.; Zorina, T.; Storkus, W. J.; Zitvogel, L.; Celluzzi, C.; Falo, L. D.; Melief, C. J.; Ildstad, S. T.; Kast, W. M.; Deleo, A. B.; et al. **1995**: Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity – **Nat. Med.** **1**: 1297 - 1302

**Mesika, Adi**; Grigoreva, Irina; Zohar, Muriel and Reich; Ziv **2001**: A regulated NFkB-Assisted Import of Plasmid-DNA into Mammalian Cell Nuclei – **Mol. Ther.** **3(5)**: 653 - 7

**Metlay, J. P.**; Witmer-Pack, M. D.; Agger, R.; Crowley, M. T.; Lawless, D.; Steinman, R. M. **1990**: The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies - **J. Exp. Med.** **171**: 1753 - 71

**Minami, Y.**; Kono, T.; Miyazaki, T.; Taniguchi, T. **1993**: The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes - **Annu. Rev. Immunol.** **11**: 245 - 68

**Mitchell, P. J.**; Wang, C.; Tjian, R. **1987**: Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen - **Cell** **50**: 847 - 61

**Mizuguchi H**, Hayakawa T **2002**: Adenovirus vectors containing chimeric type 5 and type 35 fiber proteins exhibit altered and expanded tropism and increase the size limit of

foreign genes – **Gene 285 (1-2): 69 - 77**

**Moore, G.E** Gerner, R. E. and Franklin, H. A. **1967**: Culture of Normal Human Leucocytes – **JAMA 199: 519 - 25**

**Moreau, P.**; Hen, R.; Wasyluk, B.; Everrett, R.; Gaub, M. et al. **1981**: The SV40 72-bp repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants – **Nucleic Acids Res. 9: 6047 - 9**

**Moseman, EA**; Liang, X; Dawson, AJ; et al. **2004**: Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells – **J. Immunol. 173: 4433 - 42**

**Mosialos, G.**; Birkenbach, M.; Ayehunie, S.; Matsumura, F.; Pinkus, G. S.; Kieff, E.; Langhoff, E. **1996**: Circulating human dendritic cells differentially express high levels of a 55-kd actin-bundling protein - **Am. J. Pathol. 148: 593 - 600**

**Mossmann, Tim** **1983**: Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays – **J. Immunol. Meth. 65: 55 - 63**

**Mu, L.J.**; Gaudernack, G.; Sæbøe-Larsen, S.; Hammerstad, H.; Tierensz, A. und Kvalheim, G. **2003**: A Protocol for Generation of Clinical Grade mRNA Transfected Monocyte-Derived Dendritic Cells for Cancer Vaccines - **Scand. J. Immunol. 58: 578 - 86**

**Muhlethaler-Mottet, A.**; Otten, L. A.; Steimle, V.; Mach, B. **1997**: Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA - **EMBO J. 16: 2851 - 60**

**Nguyen, L. T.**; Radhakrishnan, S. ; Ciric, B. ; Tamada, K.; Shin, T.; Pardoll, D. M.; Chen, L.; Rodriguez, M. and Pease, L. R. **2002**: Cross-linking the B7 Family Molecule B7-DC Directly Activates Immune Functions of Dendritic Cells - **J. Exp. Med. 196: 1393 - 8**

**Nigg, E. A.** **1997**: Nucleocytoplasmic transport: Signals, mechanisms and regulation - **Nature 386: 779 - 87**

**Noti, J. D.**; Reinemann, B. C.; Petrus, M. N. **1996**: Spl binds two sites in the CD11c promoter in vivo specifically in myeloid cells and cooperates with AP1 to activate transcription - **Mol. Cell. Biol. 16: 2940 - 50**

**Ogbourne, S. und Antalis, T. M. 1998 : Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes - **Biochem. J. 331: 1 - 14****

**Ohno, M., Fornerod, M., and Mattaj, I. W. 1998: Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers - **Cell 92: 327 - 36****

**Özkaynak, E.; Gao, W.; Shemmeri, N.; Wang, Ch.; Gutierrez-Ramos, J-C.; Amaral, J.; Qin, S.; Rottman, J. B.; Anthony J. Coyle, A. J. and Wayne W. Hancock, W. W. 2001: Importance of ICOS–B7RP-1 costimulation in acute and chronic allograft rejection – **Nat. Immunol. 2 (7): 591 - 6****

**Ouaaz, F.; Arron, J.; Zheng, Y.; Choi, Y.; Beg, AA. 2002: Dendritic Cell development and survival require Distinct NF-kB Subunits - **Immunity 16: 257 - 70****

**Paglia, P., Chiodoni, C., Rodolfo, M. and Colombo, M. P. 1996: Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime CTL against tumor antigen in vivo - **J. Exp. Med. 183: 317 - 22****

**Parker, D. C. 1993: T cell-dependent B cell activation - **Annu. Rev. Immunol. 11: 331 - 60****

**Parry SL, Hasbold J, Holman M, Klaus GG 1994: Hypercross-linking surface IgM or IgD receptors on mature B cells induces apoptosis that is reversed by costimulation with IL-4 and anti-CD40 – **J. Immunol. 152 (6): 2821 - 29****

**Pettit, A.R.; Quinn, C.; MacDonald, K.P.; Cavanagh, L.L.; Thomas, G.; Townsend; W.; Handel, M.; Thomas, R. 1997: Nuclear localization of RelB is associated with effective antigenpresenting cell function - **J. Immunol. 159: 3681–91****

**Pierre, P.; Turley, S. J., Gatti, E., Hull, M., Meltzer, J., Mirza, A., Inaba, K., Steinman, R. M., Mellman, I. 1997: Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells - **Nature 388: 787-92****

**Ponsaerts, Peter; Van den Bosch, Glenn; Cools, Natalie; Van Driessche, Ann; Nijs, Griet; Lenjou, Marc; Lardon, Filip; Van Broeckhoven, Christine; Van Bockstaele, Dirk R.; berneman, Zwi N. And Vantendeloo, Viggo F.I. 2002: Messenger RNA Elektroporation of Human Monocytes followed by Rapid in Vitro Differentiation, Leads to Highly Stimulatory Antigen-Loaded Mature Dendritic Cells – **J. Immunol 169: 1669 - 75****

**Ptashne, M.; und Gann, A. 1997: Transcriptional activation by recruitment - **Nature 386:****

569 - 77

**Puig-Kroeger A**, Relloso M, Fernandez-Capetillo O, Zubiaga A, Silva A, Bernabeu C, Corbi AL **2001**: Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells – **Blood 98 (7): 2175 - 82**

**Raingeaud, J.**; Whitmarsh, A. J.; Barrett, T.; Derijard, B. and Davis, R. J. **1996**: MKK3- and MKK6-regulated gene expression is mediated by the p38 mitogenactivated protein kinase signal transduction pathway - **Mol. Cell. Biol. 16: 1247 - 55**

**Randolph, G. J.**; Beaulieu, S.; Lebecque, S. ; Steinman, R. M.; Muller, W. A. **1998**: Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking - **Science 282: 480 - 3**

**Randolph, G. J.**; Inaba, K. ; Robbiani, D. F. ; Steinman, R. M. ; Muller, W. A. **1999**: Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells *in vivo* - **Immunity 11: 753 - 61**

**Rescigno M**, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. **1998**: Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways – **J. Exp. Med. 188: 2175 - 80**

**Riedinger, M.**; Karjalainen, K.; Brocker, T. **1997**: Targeted expression of MHC class II genes to dendritic cells *in vivo*. **Immunol. Lett. 57: 155-8**

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

**Romani, N.**; Reider, D.; Heuer, M.; Ebner, S.; Kampgen, E.; Eibl, B.; Niederwieser, D. and Schuler, G. **1996**: Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability - **J. Immunol. Meth. 196: 137 - 51**

**Rosales, C., Brown, E. J.** **1993**: Neutrophil receptors and modulation of the immune response. In: Abramson, J. S.; Wheeler, J. G. (Herausgeber) The natural immune system - **IRL Press. New York. S. 24 - 62**

**Ross, R.**; Jonuleit, H.; Ross, X.-L.; Yamashiro, S.; Matsumura, F.; Enk, A.; Knop, J. and

Reske-Kunz, A. B. **2000**: Expression of the actin-bundling protein fascin in cultured human dendritic cells correlates with dendritic morphology and mature state of the cells – **J. Invest. Dermatol. 115: 658 - 63**

**Ross, R.**; Ross, X.-L.; Schwing, J.; Längin, T. Und Reske-Kunz, A. B. **1998**: The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells – **J. Immunol. 160: 3776 - 82**

**Rybenkov, V. V.**, Vologodskii, A. V., and Cozzarelli, N. R. **1997**: The effect of ionic conditions on the conformations of supercoiled DNA. I. Sedimentation analysis - **J. Mol. Biol. 267: 299 - 311**

**Saccani, Simona**; Pantano, Serafino and Natoli, Giocchino – **2003**: Modulation of NF- $\kappa$ B Activity by Exchange of Dimers – **Mol. Cell 11: 1563 - 74**

**Saeboe-Larssen S**, Fossberg E, Gaudernack G. **2002**: mRNA-based electrotransfection of human dendritic cells and induction of cytotoxic T lymphocyte responses against the telomerase catalytic subunit (hTERT). – **J. Immunol. Meth. 259 (1-2): 191 -203**

**Saiki, RK**; Gelfand, DH; Stoffel, S; Scharf, SJ; Higuchi, R.; Horn, GT; Mullis, KB and Erlich, HA **1988**: Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA-Polymerase – **Science 239: 487 – 91**

**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.; 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 - 18**

**Sanger, F.**; Nicklen, S.and Coulson, A. R. **1977**: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors - **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463 - 7**

**Sauer; F. und Tjian, R. 1997**: Mechanisms of transcriptional activation: differences and similarities between yeast, Drosophila, and man – **Curr. Opin. Genet. Dev. 7(2):176-81**

**Schreck, K.**; Rieber, P. and Baeuerle, P.A. **1991**: Reactive oxygen intermediates as

apparently widely used second messengers in the activation of the NF $\kappa$ B transcription factor and HIV-1 - **EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) 10: 2247**

**Schuhmachers, Georg**; Xu, Shan; Bergstresser, Paul R. and Takashima, Akira **1995**: Identity and Functional Properties of Novel Skin-Derived Fibroblast Lines (NS-Series) that Support the Growth of Epidermal-Derived Dendritic Cell-Lines – **J. Invest. Dermatol. 105: 225 - 30**

**Schuur, E.R.**; Henderson, G.A.; Kmetec, L.A.; Miller, J.D.; Lamparski, H.G. and Henderson, D.R. **1996**: Prostate-specific antigen expression is regulated by an upstream enhancer - **J. Biol. Chem. 271, 7043 - 51**

**Senfleben, U.**; Cao Y.; Xiao G.; Greten FR.; Krahn G.; Bonizzi G.; Chen Y, Hu Y; Fong A; Sun SC; Karin M. **2001**: Activation by IKK $\alpha$  of a second, evolutionary conserved, NF- $\kappa$ B signaling pathway – **Science 293: 1495 - 9**

**Shakhov, AN**; Collart, MA; Vassalli, P; Nedospasov, SA, Jongeneel, CV. **1990**: Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor  $\alpha$  gene in primary macrophages - **J. Exp. Med. 171: 35 - 47**

**Sherf, Bruce A.**; Navarro, Shauna L.; Hannah, Rita R. and Wood, Keith V. **1996**: Dual-Luciferase<sup>TM</sup> Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays - **Promega Notes Magazine 57: 2**

**Shin, T.**; Kennedy, G.; Gorski, K.; Tsuchiya, H.; Koseki, H.; Azuma, M.; Yagita, H.; Chen, L.; Powell, J.; Pardoll, D. M.; and Housseau, F. **2003**: Cooperative B7-1/2 (CD80/CD86) and B7-DC Costimulation of CD4-T Cells Independent of the PD-1 Receptor - **J. Exp. Med. 198: 31 - 8**

**Shortman, K.**; Egerton, M.; Spangrude, G. J.; Scollay, R. **1990**: The generation and fate of thymocytes - **Semin. Immunol. 2: 3 - 12**

**Sonderbye, L.**; Magerstadt, R.; Blatman, R. N.; Preffer, F. I.; Langhoff, E. **1997**: Selective expression of human fascin (p55) by dendritic leukocytes - **Adv. Exp. Med. Biol. 417: 41 - 6**

**Song, Li** and Zheng, Ma **2001**: Nonviral Gene Therapy – **Curr. Gene Ther. 1: 201 - 26**

**Sozzani, S.**; Allavena, P.; Vecchi, A.; Mantovani, A. **2000**: Chemokines and dendritic cell traffic - **J. Clin. Immunol. 20: 151 - 60**

**Sprent, J. 1997:** Immunological memory - **Curr. Opin. Immunol. 9: 371 - 9**

**Staquet, M. J.**; Peguet, J., Jacquet, C., Dezutter-Dambuyant, C and Schmitt, D. **1995** :  
Expression of ICAM-3 on human epidermal dendritic cells - **Immunobiology 192: 1249**

**Steinman, R. M.**; Witmer-Pack, M; Inaba, K. **1998:** Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance - **Adv Exp Med Biol. 329: 1-9**

**Stoffler, D.**; Fahrenkrog, B.; Aebi, U. **1999:** The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics - **Curr. Opin. Cell Biol. 11: 391 - 401**

**Strobel, I.**; Berchtold, S.; Götze, A.; Schulze, U; Schuler, G. and Steinkasserer A. **2000:**  
Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes - **Gene Therapy 7: 2028 - 35**

**Suda, T., Nagata, S. 1994:** Purification and characterization of the Fas-ligand that induces apoptosis - **J. Exp. Med. 179: 873 - 9**

**Swallow, M. M.**; Wallin, J. J. and Sha, W. C. **1999:** B7h, a Novel Costimulatory Homolog of B7.1 and B7.2, Is Induced by TNF  $\alpha$  - **Immunity 11: 423 - 32**

**Tamura, H.**; Dong, H.; Zhu, G.; Sica, G.L.; Flies, DB., Tamada, K. and Chen, L. **2001:** B7-H1 costimulation preferentially enhances CD28-independent T-helper cell function – **Blood 97: 1809 - 16**

**Tan, Y.**; Rouse, J.; Zhang, A.; Cariati, S.; Cohen, P. and Comb; M. J. **1996:** FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2 - **EMBO J. 4629 - 42**

**Tan, PH;** Sagoo, P.; Chan, C. ; et al. **2005:** Inhibition of NF-kappaB and oxidative pathways in human dendritic cells by antioxidative vitamins generates regulatory T cells - **J. Immunol. 174: 7633 - 44**

**Thanos, D. and Maniatis, T. 1995:** NF- $\kappa$ B: a lesson in family values - **Cell 80: 529 - 32**

**Tseng, S-Y.**; Otsuji, M. ; Gorski, K.; Huang, X. ; Slansky, J. E. ; Pai, S. I. ; Shalabi, A.; Shin, T. ; Pardoll, D. M.; and Tsuchiya, H. **2001:** B7-DC, a New Dendritic Cell Molecule with Potent Costimulatory Properties for T Cells - **J. Exp. Med. 193: 839 - 45**

**Tsushima, F.**; Iwai, H.; Otsuki, N.; Abe, M.; Hirose, S.; Yamazaki, T.; Akiba, H.; Yagita, H.; Takahashi, Y.; Omura, K.; Okumura, K. and Azuma, M. **2003:** Preferential



contribution of B7-H1 to programmed death-1-mediated regulation of hapten-specific allergic inflammatory responses - **Eur. J. Immunol. 33: 2773 - 82**

**Udalova, I.A.**, Mott, R., Field, D., and Kwiatkowski, D. 2002: Quantitative prediction of NF- $\kappa$ B DNA-protein interactions - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 8167 - 72

**Ulmer J. B.**; Donnelly J. J.; Parker S. E.; Rhodes G. H.; Felgner P.L.; Dwarki V.J.; Gromkowski S.H.; Deck R.R.; De Witt, D.M.; Friedman, A.; Howe, L.A.; Leander, K.R.; Martinez, D.; Perry, H.C.; Shiver, J.W.; Montgomery, D.C.; Liu, M.A. **1993**: Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein - **Science 259:1745 – 9**

**Ulmer, J. B.**; Deck, R. R.; Dewitt, C. M.; Donnelly, J. I.; Liu, M. A. **1996**: Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells - **Immunology 89: 59 - 67**

**Van den Berghe, W. V.**, Plaisance, S.; Boone, E.; De Bosscher, K.; Schmitz, M. L.; Fiers, W. and Haegeman, G. **1998**: p38 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase pathways are required for nuclear factor- $\kappa$ B p65 transactivation mediated by tumor necrosis factor - **J. Biol. Chem. 273: 3285**

**Van der Pouw Kraan, T. C.**; Snijders, A.; Boeijs, L. C.; de Groot, E. R.; Alewijnse, A. E.; Leurs, R.; Aarden L. A. **1998**: Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors - **J. Clin. Invest. 102: 1866 - 73**

**Van Meirvenne, Sonja**; Straetman, Lieven; Heirman, Carlo; Dullaers, Melissa

De Greef, Catherine; Van Tendeloo, Viggo and Thielemans, Kris **2002**: Efficient genetic modification of murine dendritic cells by electroporation with mRNA - **Cancer Gene Therapy 9: 787 – 97**

**Van Tendeloo**, Viggo F.; Ponsaerts, Peter; Lardon, Filip; Nijs, Griet; Lenjou, Marc; Van Broeckhoven, Christine; Van Bockstaele, Dirk R. and Berneman, Zwi N. **2001**: Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells – **Blood 98: 49 - 56**

**Verma, I.M.**, Stevenson, J.K., Schwarz, E.M., Van Antwerp, D., and Miyamoto, S. **1995**: Rel/NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B family: intimate tales of association and dissociation - **Genes Dev. 9, 2723 - 35**

**Vile, R. G.**; Nelson, J. A. ; Castleden, S.; Chong, H. And Hart, I. R. **1994**: Systemic gene therapy of murine melanoma using tissue specific expression of the HSVtk gene involves an immune component - **Cancer Res. 54: 6228 - 34**

**Viola, A. and Lanzavecchia, A.** **1996**: T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds - **Science 273: 104**

**Waisman, A.**; Ruiz, P. J.; Hirschberg, D. L.; Gelman, A.; Oksenberg, J. R.; Brocke, S.; Mor, F.; Cohen, I. R.; Steinman, L **1996**: Suppressive vaccination with DNA encoding a variable region gene of the T-cell receptor prevents autoimmune encephalomyelitis and activates Th2 immunity - **Nat. Med. 2: 899 - 905**

**Wardlaw, A. J.**; Moqbel, R.; Kay, A. B. **1995**: Eosinophils: Biology and role in disease - **Adv. Immunol. 60: 195 - 266**

**Weiss, B.**, Jacquemin-Sablon, A., Live, T. R., Fareed, G. C., Richardson, C. C. **1968**: Enzymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VI. Further purification and properties of polynucleotide ligase from Escherichia coli infected with bacteriophage T4 - **J. Biol. Chem. 243: 4543 - 55**

**Wigler, M.**, Silverstein, S., Lee, L. S., Pellicer, A., Cheng, Y., Axel, R. **1977**: Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. - **Cell 11: 223 - 32**

**Williams, R.S.**; Johnston, S.A.; Riedy, M.; De Vit, M. J.; McElligott, S. G.; Sanford, J. C. **1991**: Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles - **Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 2726 – 30**

**Winzler, Claudia**; Rovere, Patrizia; Rescigno, Maria; Granucci, Francesca; Penna, Guiseppe; Adorini, Luciano and Ricciardli-Castagnoli, Paola **1997**: Maturation Stages of Mouse Dendritic Cells in Growth Factor-dependent Long-Term Cultures – **J. Exp. Med. 185: 317 - 28**

**Wolff, JA**; Malone, RW; Williams, P; Chong, W; Acsadi, G; Jani, A; Felgner, PL; **1990**: Direct gene transfer into mouse muscle in vivo - **Science 247: 1465 - 8**

**Xiao, G.**, Harhaj, E.W. and Sun, S.C. **2001**: NF- $\kappa$ B-inducing kinase regulates the processing of NF- $\kappa$ B2 p100 - **Mol. Cell 7: 401 - 9**

**Xie, X.**, Zhao, X., Liu, Y., Young, C. Y., Tindall, D. J., Slawin, K. M., Spencer, D.M. **2001**: Robust prostate-specific expression for targeted gene therapy based on the human

kallikrein 2 promoter - **Hum. Gene Ther. 12: 549 - 61**

**Xu, S.**; Ariizumi, K.; Cacerces-Dittmar, G.; Edelbaum, D.; Hashimoto, K.; Bergstresser, P. R.; Takashima, A. **1995**: Successive Generation of Antigen-presenting, dendritic Zell-Lines from Murine Epidermis – **J. Immunol. 155: 2697 – 2705**

**Yamazaki, T.**; Akiba, H.; Iwai, H.; Matsuda, H.; Aoki, M.; Tanno, Y.; Shin, T.; Tsuchiya, H.; Pardoll, D. M.; Okumura, K.; Azuma, M.; and Yagita, H. **2002**: Expression of Programmed Death 1 Ligands by Murine T Cells and APC1 – **J. Immunol. 169: 5538 - 45**

**Yang R.**; Yan, Z.; Chen, F.; Hansson, G. K.; Kiessling, R. **2002**: Hyaluronic acid and chondroitin sulphate A rapidly promote differentiation of immature DC with upregulation of costimulatory and antigen-presenting molecules, and enhancement of NF-kappaB and protein kinase activity – **Scand. J. Immunol. 55(1): 2 - 13**

**Yoshimura S.**, Bondeson J, Brennan FM, Foxwell BM, Feldmann M. **2003**: Antigen presentation by murine dendritic cells is nuclear factor-kappa B dependent both in vitro and in vivo – **Scand. J. Immunol. 58(2): 165 - 72**

**Yoshimura, S.**; Bondeson, J.; Foxwell, B. M.; Brennan, J.; Fionula M. and Feldmann, M. **2001**: Effective antigen presentation by dendritic cells is NF-KB dependent: coordinate regulation of MHC, Costimulatory molecules and cytokines – **Internat. Immunol. 13: 675 - 83**

**You, Z.**; Huang, X.; Hester, J.; Toh, HC; Chen, SY.; **2001**: Targeting dendritic cells to enhance DNA vaccine potency - **Cancer Res. 61: 3704 - 11**

**Zabner, J.**, Fasbender, A. J., Moninger, T., Poellinger, K. A., and Welsh, M. J. **1995**: Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid. - **J. Biol. Chem. 270: 18997 – 19007**

**Zelphati, O.**, Liang, X., Hobart, P., and Felgner, P. L. **1999**: Gene chemistry: Functionally and conformationally intact fluorescent plasmid DNA - **Hum. Gene Ther. 10: 15 – 24**

**Zhao, J.**; Freeman, G.J.; Gray, G.S.; Nadler, L.M.; Glimcher, L.H. **1996**: A cell type-specific enhancer in the human B7.1 gene regulated by NF-kappaB - **J. Exp. Med. 183: 777–89**

**Zhou, L. J.**; Schwarting, R.; Smith, H. M.; Tedder, T. F. **1992**: A novel cell-surface

## 6 - Literatur

---

molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily - **J. Immunol. 149: 735 - 42**

**Zhou L. J.**, Tedder, T. F. **1995**: Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily - **J. Immunol. 154: 3821 - 35**

### 7 Abkürzungsverzeichnis

Amp <sup>R</sup>	<u>a</u> mpicillin <u>r</u> esistent
APC	<u>a</u> ntigen <u>p</u> resenting <u>c</u> ell – antigenpräsentierende Zelle
ATF	<u>a</u> ctivating <u>t</u> ranscription <u>f</u> actor – aktivierender Transkriptionsfaktor
ATP	<u>a</u> denosine <u>t</u> ri <u>p</u> hosphate – Adenosintriphosphat
B7.1, B7.2	B7.1 = CD80, B7.2 = CD86, kostimulatorische Moleküle
B7-RP-1	<u>B7</u> <u>r</u> elated <u>p</u> rotein 1 - mit der B7-Gruppe kostimulatorischer Moleküle verbundenes Protein 1
BCR	<u>B</u> - <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor – B-Zellrezeptor
BSA	<u>B</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin, Rinderserumalbumin
BP	<u>b</u> ase <u>p</u> air - Basenpaar
CIAP	<u>c</u> alf <u>i</u> ntestinal <u>a</u> lkaline <u>p</u> hosphatase – alkalische Phosphatase aus dem Verdauungstrakt von Kälbern
CIITA	<u>c</u> lass <u>II</u> <u>t</u> rans <u>a</u> ctivator – Klasse II Transaktivator
CMV	<u>C</u> ytomegalie- <u>V</u> irus
CREB	<u>c</u> AMP <u>r</u> esponsive <u>e</u> lement <u>b</u> inding protein – cAMP-responsibles Element bindendes Protein
CTL	<u>c</u> ytotoxic <u>T</u> - <u>l</u> ymphocyte – zytotoxischer T-Lymphozyt
CTLA-4	<u>c</u> ytotoxic <u>T</u> - <u>l</u> ymphocyte <u>a</u> ntigen 4 – zytotoxisches T-Lymphozyten Antigen 4
DAPI	4',6'- <u>D</u> iamidino-2- <u>P</u> henyl <u>i</u> ndoldihydrochlorid, Fluoreszenzfarbstoff
DC	<u>d</u> endritic <u>c</u> ell – Dendritische Zelle
DC-SIGN	<u>d</u> endritic <u>c</u> ell- <u>s</u> pecific <u>I</u> CAM3 <u>g</u> rabbing <u>n</u> onintegrin – ICAM-3-bindendes Nichtintegrin, das spezifisch auf Dendritischen Zellen exprimiert wird
ddH <sub>2</sub> O	<u>d</u> oppelt <u>d</u> estilliertes Wasser, Reinstwasser
DMEM	<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium, nach Dulbecco modifiziertes Eagle-Medium
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfo <u>x</u> id
DNA	<u>D</u> esoxy- <u>R</u> ibonucleic- <u>A</u> cid, Desoxy-Ribonukleinsäure, Erbsubstanz
DsRed2	Reportergen, das ein rotfluoreszierendes Protein kodiert
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>c</u> etat, Komplexbildner (6-zähliger Ligand)
EGFP	<u>e</u> nhanced <u>g</u> reen <u>f</u> luorescence <u>p</u> rotein, verstärkt grün fluoreszierendes Protein
ELC	<u>E</u> B11- <u>l</u> igand <u>c</u> hemokine – Ebl1-Liganden-Chemokin, auch MIP-3 $\beta$ bezeichnet

## 7 - Abkürzungsverzeichnis

---

EMSA	<u>e</u> lectro <u>m</u> obility <u>s</u> hift <u>a</u> ssay
ERK	<u>e</u> xtracellular <u>r</u> egulated <u>k</u> inase – extrazellulär regulierte Kinase
FACS®	<u>f</u> luorescence <u>a</u> ctivated <u>c</u> ell <u>s</u> orter – fluoreszenzaktivierter Zellsortierer
FCS	<u>F</u> etal <u>C</u> alf <u>S</u> erum, fötales Kälberserum
FITC	<u>F</u> luoresceine- <u>I</u> sothiocy <u>a</u> nat, Fluoreszenzfarbstoff
GM-CSF	<u>G</u> ranulozyten- <u>M</u> akrophagen- <u>K</u> olonie- <u>S</u> timulierungsfaktor
HEPES	4(2- <u>H</u> ydroxy <u>e</u> thyl)-1- <u>P</u> iperazin <u>e</u> thansulfonsäure, Puffersubstanz
HLA	<u>h</u> uman <u>l</u> eukocyte <u>a</u> ntigen – humanes Leukozyten-Antigen
ICAM-1	<u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule <u>1</u> – interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICAM-3	<u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule <u>3</u> – intrazelluläres Adhäsionsmolekül 3
ICOS	<u>i</u> nducible <u>c</u> ostimulator – induzierbarer Kostimulator
IκBα	<u>i</u> nhibitor of (NF) <u>κ</u> <u>B</u> <u>α</u> - NF-κB-Inhibitor α
IKKα	<u>I</u> kappaB <u>k</u> inase <u>a</u> lpha
IL-1β	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin 1β, Zytokin
IL-4	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin 4, Zytokin
IMDM	<u>I</u> scove's <u>M</u> odified <u>D</u> MEM, nach Iscove modifiziertes DMEM
Kan <sup>R</sup>	<u>k</u> anamycin <u>r</u> esistent
konz.	<u>k</u> onzentriert
LB-Medium	<u>L</u> uria- <u>B</u> ertani-Medium, Bakterienkulturmedium
LC	<u>L</u> angerhans <u>C</u> ell = Langerhans-Zelle
LFA-1	<u>l</u> ymphocyte <u>f</u> unction- <u>a</u> ssociated antigen <u>1</u> – mit der Funktion von Lymphozyten verbundenes Antigen
LICOS	<u>l</u> igand of <u>i</u> nducible <u>c</u> ostimulator – Ligand des induzierbaren Kostimulators
LPS	<u>l</u> ipopolysaccharide - Lipopolysaccharid
LTA	<u>l</u> ipoteichonic <u>a</u> cid - Lipoteichonsäure
LUC	<u>L</u> uciferase - Luziferase
lyo.	<u>l</u> yophilisiert, gefriergetrocknet
MAP-K	<u>m</u> itogen <u>a</u> ctivated <u>p</u> rotein <u>k</u> inase – mitogen aktivierte Proteinkinase
M-CSF	<u>M</u> akrophagen- <u>K</u> olonie- <u>S</u> timulierungsfaktor
MEK	mitogenactivated protein kinase kinase – mitogen aktivierte Proteink.
MHC	<u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex – Haupt-Histokompatibilitätskomplex
MIIC	<u>M</u> HC <u>I</u> I rich <u>c</u> ompartments – MHCII-reiche Kompartimente
MTT	3-(4,5- <u>D</u> imethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl- <u>t</u> etrazoliumbromid
NFKB	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>K</u> <u>B</u> = Transkriptionsfaktor

## 7 - Abkürzungsverzeichnis

---

NIK	<b>N</b> FKB <b>i</b> nducing <b>k</b> inase - Kinase, die, die Aktivierung von NFkB einleitet
NK-Zellen	<b>n</b> atural <b>k</b> iller cells – natürliche Killerzellen
nm	<b>N</b> anometer, Längenmaß
Ø	Durchmesser
OD <sub>600</sub>	<b>O</b> ptische <b>D</b> ichte, gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm
PAMPs	<b>p</b> athogen- <b>a</b> ssociated- <b>m</b> olecular <b>p</b> attern = molekulare Musterstrukturen, die charakteristisch für Pathogene sind
PBMC	<b>p</b> eripher <b>b</b> lood <b>m</b> ononuclear <b>c</b> ells – mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PBS	<b>p</b> hosphate <b>b</b> uffered <b>s</b> aline, Natrium-Phosphat-Puffer
PCR	<b>p</b> olymerase <b>c</b> hain <b>r</b> eaction, Polymerase-Ketten-Reaktion
PD-1	<b>p</b> rogrammed <b>d</b> eath-receptor <b>1</b> - Rezeptor 1 für programmierten Zelltod
PD-L1	<b>p</b> rogrammed <b>d</b> eath-receptor <b>l</b> igand <b>1</b> – Ligand 1 des Rezeptors für programmierten Zelltod
PD-L2	<b>p</b> rogrammed <b>d</b> eath-receptor <b>l</b> igand <b>2</b> – Ligand 2 des Rezeptors für programmierten Zelltod
PDTC	<b>P</b> yrrolidin- <b>D</b> ithio <b>c</b> arbaminsäure
PE	R(+)- <b>P</b> hyco <b>e</b> rythrin, Fluoreszenzfarbstoff
PI3	<b>P</b> hospho <b>i</b> nositol- <b>3</b> -OH
PGE <sub>2</sub>	<b>P</b> rostaglandin <b>E</b> <sub>2</sub> , Arachidonsäuremetabolit
PLB	<b>p</b> assive <b>l</b> ysis <b>p</b> uffer – passiv wirksamer Lysepuffer
PRR	<b>p</b> attern <b>r</b> ecognition <b>r</b> eceptor = Mustererkennungsrezeptor
PSA	<b>p</b> rostate- <b>s</b> pecific <b>a</b> ntigen – prostataspezifisches Antigen
q.s.	<b>q</b> uantum <b>s</b> atis – soviel, wie nötig
RLU	<b>r</b> elative <b>l</b> ight <b>u</b> nits – relative Lichteinheiten
rpm	<b>r</b> evolutions <b>p</b> er <b>m</b> inute – Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	<b>R</b> oosevelt <b>P</b> ark <b>M</b> emorial <b>I</b> nstitute, Zellkulturmedium, das an diesem Institut konzipiert wurde
RT	<b>R</b> aum <b>t</b> emperatur
SAP	<b>s</b> hrimps <b>a</b> lkaline <b>p</b> hosphatase – alkalische Phosphatase aus Shrimps
SDS	<b>S</b> odium <b>d</b> odecyl <b>s</b> ulfate, Natriumdodecylsulfat, Tensid
SLC	<b>s</b> econdary <b>l</b> ymphoid- <b>t</b> issue <b>c</b> hemokine – Chemokin, das aus sekundärlymphatischen Geweben stammt
SV40	<b>S</b> imian <b>v</b> irus <b>40</b>
TBE	<b>T</b> ris- <b>B</b> orat- <b>E</b> DTA-Laufpuffer
TCR	<b>T</b> - <b>c</b> ell <b>r</b> eceptor – T-Zellrezeptor
TE	<b>T</b> ris-(hydroxymethyl)-aminomethan - <b>E</b> DTA-Puffer

## 7 - Abkürzungsverzeichnis

---

Tet <sup>R</sup>	<b>tetracyclin</b> resistent
TNF- $\alpha$	<b>Tumornekrosefaktor</b> $\alpha$ , Zytokin
TRIS	<b>Tris</b> -(hydroxymethyl)-aminomethan, Puffersubstanz
Ü/N	<b>Über Nacht</b>
$\Delta^+$	hitzeinaktiviert



### 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Test auf Mycoplasmen bei HaCaT-Zellen.....	54
Abbildung 2 - Expressionseffizienz in Säugerzellen.....	64
Abbildung 3 - Quantitative Zusammensetzung PBMC - A) vor und B) nach Adhärenz	67
Abbildung 4 - Populationen in der hDC-Präparation am Tag 9 und Reifegrad der hDC	68
Abbildung 5 - Autofluoreszenz der hDC.....	68
Abbildung 6 - hDC-Kultur mit FCS bzw. Blutserum, Expression der Fascinpromotor-Konstrukte.....	70
Abbildung 7 - Dokumentation Differenzierung / Ausreifung der kultivierten hDC.....	71
Abbildung 8 - Normalisierung transfektionsbedingter Expressionsunterschiede.....	72
Abbildung 9 - Nachweis Expression zweier Reportergene durch die gleiche Zelle.....	73
Abbildung 10 - Vergleich relat. Luziferaseaktivität nach Zumischung von 30 % PMBC ..	74
Abbildung 11 - EGFP-Expression A) unter CMV- bzw. B) unter dem Fascin-Promotor ..	75
Abbildung 12 - Luziferaseexpression in hDC zu unterschiedlichen Transfektionszeitpunkten .....	76
Abbildung 13 - Dokumentation Reifestatus der hDC, an Tag 8-11.....	77
Abbildung 14 - Fascin2.7Bal - Fascin 2.7 – Größe und Lokalisation der Homologieregionen.....	78
Abbildung 15 - Vergleich Luziferaseaktivität der Konstrukte pFascin2.7 - pFascin2.7Bal .....	79
Abbildung 16- Größe und Lokalisation der "D"-Konstrukte.....	80
Abbildung 17 - Klonierung der "D"-Konstrukte in die Bal I-Schnittstelle von Fascin2.7Bal ..	81
Abbildung 18 - relat. Luziferaseaktivität der Bal-Konstrukte gegen pFascin2.7Bal als Referenz .....	83
Abbildung 19 - Größe und Lokalisation der Fragmente D1D6, D1D7, D2D6, D2D7 .....	84
Abbildung 20 - relat. Luziferaseaktivität der Bal-Konstrukte gegen pFascin2.7Bal als Referenz .....	85
Abbildung 21 - Übersicht: Multiplikation mehrerer D2D7-Elemente und Klonierung in Fascin2.7Bal .....	86
Abbildung 22 - relat. Luziferaseexpression der Konstrukte mit mehreren D2D7-Einheiten ..	87
Abbildung 23 - relat. Luziferaseaktivität der Bal-Konstrukte in HaCaT-Zellen .....	89
Abbildung 24 - Aktivität des humanen Fascin-Promotors in der murinen Zelllinie XS106 ...	90
Abbildung 25 - Vektorkarte von pFascin2.7NFKB: Lokalisation der NFKB-Bindungsstelle ..	92
Abbildung 26 - Fascin2.7 EGFP+/-NFKB - Übersicht Konstrukte.....	94

## 8 - Abbildungsverzeichnis

---

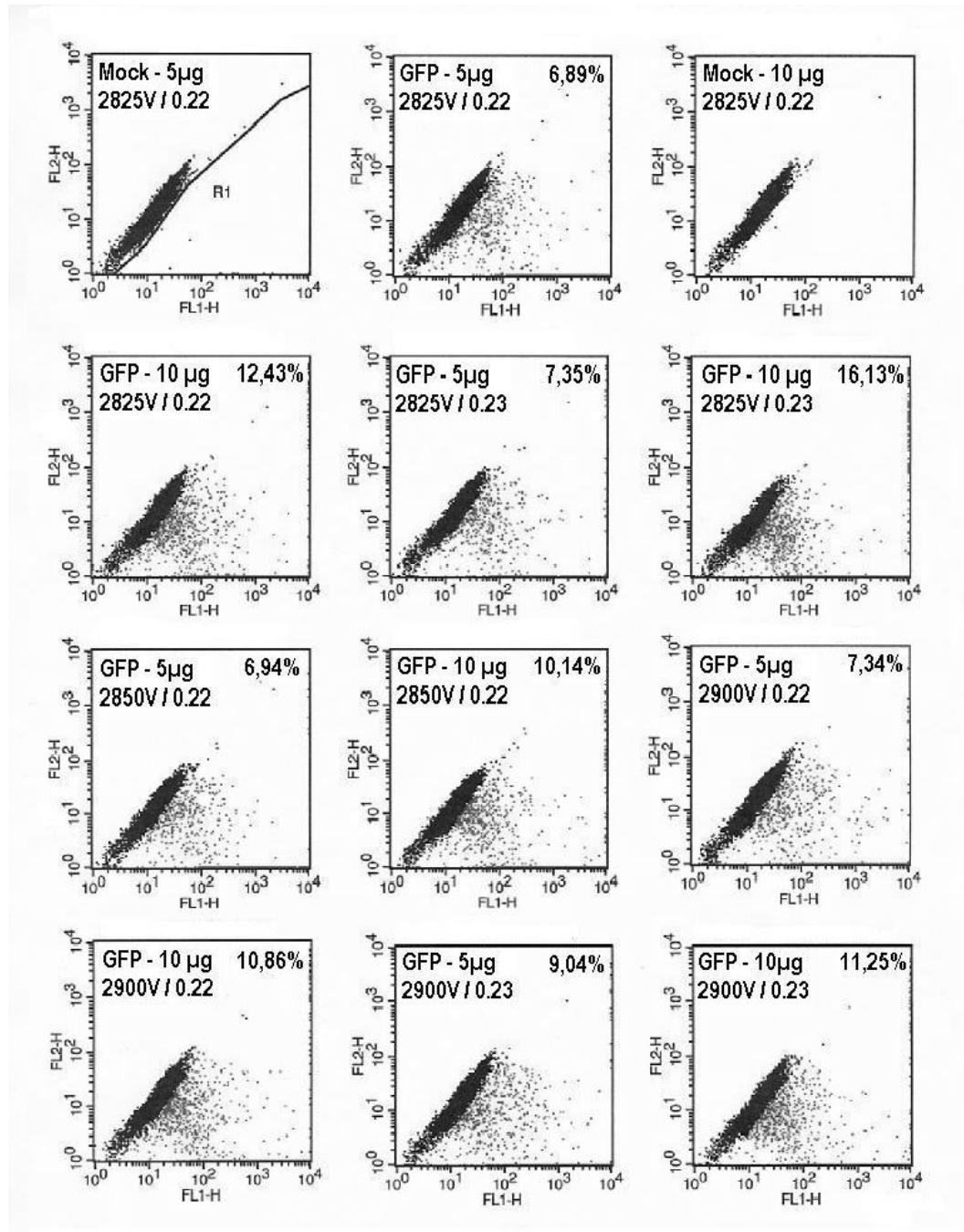
Abbildung 27 - Expression Fascin2.7EGFP+/-NFkB in hDC (Amaya) .....	95
Abbildung 28 - Expression der Luziferase-Konstrukte Fascin2.7+/-NFkB in hDC .....	96
Abbildung 29 - Optimierungsversuch Elektroporation durch Verwendung des GeneTrend Puffers .....	97
Abbildung 30 - Expression Fascin2.7LUC +/- NFkB-Bindungsstelle (Squarepulsmethode) .....	98
Abbildung 31 - Expression Fascin2.7 +/-NFkB in XS106 .....	100
Abbildung 32 - Expression Fascin2.7 +/-NFkB in HaCaT .....	101
Abbildung 33 - Expression Fascin2.7NFkB-fas gegen Fascin2.7 .....	104
Abbildung 34 - XS106: Expression von Oberflächenproteinen .....	108
Abbildung 35 - XS106: Ermittlung des toxischen Potentials der pharm. Inhibitoren .....	109
Abbildung 36 - XS106: Einfluss der Inhibitoren auf die Expression von CD80, CD86 und MHC II .....	111
Abbildung 37 - SP37A3: Expression der Oberflächenproteine .....	112
Abbildung 38 - SP37A3 - Nachweis der Toxizität durch MTT-Tests .....	114
Abbildung 39 - SP37A3: Bilanzierung der Zellzahl .....	116
Abbildung 40 - SP37A3: Wirkung von GW5074 und NPC15437, U0126 und LY294002 .....	117
Abbildung 41 - SP37A3: inhibitorische Wirkung von Bay11-7082 und PDTC .....	118
Abbildung 42 - SP37A3: inhibitorische Wirkung von SB203580 .....	119
Abbildung 43 - Einfluss von SB203580 auf die Expression von CD273 - CD274 - CD275 und CD54 .....	120
Abbildung 44 - Optimierungsversuche Transfektion von hDC mittels Squarepuls .....	187
Abbildung 45 – Aufbau von pDsRed2-N1 .....	194
Abbildung 46 - Aufbau pZErO-2.1 .....	195
Abbildung 47 - Aufbau von pCI-EGFPn1 .....	196
Abbildung 48 - Aufbau pEGFP-C1 .....	197
Abbildung 49 - Aufbau von pGI3Basic .....	198
Abbildung 50 - Aufbau von pGI3-Control .....	199
Abbildung 51 - Aufbau pRL-CMV .....	200
Abbildung 52 - Aufbau von pNF-κB-Luc (A) und pGFPmax (B) .....	201

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Übersicht verwendeter Vektoren .....	19
Tabelle 2 - verwendete Restriktionsenzyme.....	21
Tabelle 3 - verwendete Oligonucleotide .....	23
Tabelle 4 - verwendete Bakterienstämme .....	30
Tabelle 5 - eingesetzte Antikörper .....	36
Tabelle 6 - eingesetzte pharmakologische Inhibitoren .....	107
Tabelle 7 - in der Arbeit verwendete PCR-Programme .....	192
Tabelle 8 – Programm zur Sequenzierung .....	193

## 10 Anhang

## 10.1 Experimente zur Etablierung einer Squarepulsmethode:



**Abbildung 44 - Optimierungsversuche Transfektion von hDC mittels Squarepuls**

Die Abbildung gibt eine Übersicht über die Expressionseffizienzen, die bei der Optimierung und Etablierung einer Squarepulsmethode in hDC erhalten wurden. Gezeigt sind die Diagramme der Analyse mittels Cytofluorometer, log. Darstellung Fluoreszenz 1 (FL1-H) gegen Fluoreszenz 2 (FL2-H). Neben den untersuchten Parametern ist die resultierende Expressionseffizienz eines EGFP-Konstrukts unter dem CMV-Promotor in Prozent angegeben.

## 10.2 Übersicht DNA-Sequenz des Plasmids Fascin2.7

1 – 57 5'TCACTTTCCCCTGCAGAGCCTGCTGCATGGTGTCCAGTGGCCAGCCTGGGAGGAGCTC  
 58 – 115 AGGACTGGCCTCACCTCGTGCCACGCCCTCGTACCAAGGTGGCTCAGATGGCACCTGGG  
 116 – 173 TTCCCGAAGGGCCAGGAACACAGCGTCCATGTCCCCATCCTTCCCGGAGGGACTTGG  
 174 – 231 GGTGGGGCCTGCAGGAAGGATCATGTGACTTGTTC AAGGGCAGCTTGTCTGCCCCGGA  
 232 – 288 CACAGAGGTGCCATCGTAAGCGAGATGCAGGCAAGGTGAGGACAGGGCATGGTGCCG  
 289 – 347 AGCAGGAATGATTTTCGAAAATGCTACTCTGTGGTCCGGCACGGTGGCTCACTCCTGTAA  
 348 – 405 TCCCAGTACTTTGGGAGGCCAGGCGGGCAGATCATGAGGTCAGGAGTTCAAGACCAGC  
 406 – 464 CTGGCCAACATGGTGAAACCCCTTCTCTACTGAAAATACAAAAACTACCCGGGCGTGGT  
 465 – 522 GGTGGATGCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCC  
 523 – 581 TGGAGGTGAAGGTTGCAATGAGCCGAGATTGCACCACTGCACTCCGACCTGGGCGACAG  
 582 – 640 AGAAAGACTCCGTCTGAAAAACAACAACAAAACCCCGAGATTCTCTTT  
 -- Bal I -- ----- phFPvu  
 641 – 699 TCCCCGTCCGGAGCTCTA**TGGCCA**TCTGGAGCTCGTTCTGTCCACA**AGGACACATTTG**  
 **fwd** -----  **phFPvu rev** -----  
 700 – 758 **CTGGCAGC**AGCT**GTGGACCAGGGCTCACTCAC**TCACATCTGTACCCAATCTAGAGCAGG  
 759 - 816 ACAAACACCTATCACCTGCACTGGCAATGGACAGAGGACAGTGGCAGCCCCATCACCAG  
 817 – 877 AGGCATTCAAGCCAAGGCATTTTCTATCGTCTATTTATCTATCTATCTATCTATCTAT  
 878 – 938 CTATCTATCTATCTATCTAGATGAGATCTTGCTATGTTGCCAGGTTGAACTCCTGGCCTC  
 939 – 997 AAGCGATCCTCCTGCTTCAGCCTCCCAAAGTGTTGGGATTTAGGTGTGAACCACTGTAC  
 998 - 1055 CTGGCTGGAGTGCAGTGGCACTGTCATAGCTCACTGCAGCCTCCACCTCCTGGGCTCAA  
 1056 – 1114 GGAATCCTCTTTCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGACCACAGGCATGCACCATCACACCC  
 1115 – 1174 AGCTAAACCTTGATTTTTTCCATAGTATATGGCTCAGGGCAGAGCAAAGAAGCA  
 ----- Bal I -----  
 1175 – 1232 CAAAACATGTTGGCTTGCGGTTGAGGGCTGATGGGAGGGGGTTC**TGGCCA**AAGCCCAA  
 1233 – 1290 AATTAACAGCCACAACGTCAAGTGTCTGTGGGAGGGGTTGCCAGGGGCGTGCGGGTTC  
 ----- phFas2.7Bal-I-rev -----  
 1291 – 1348 TGGGGCTCAAGGCCCTGCC**CGGTAAACCCATTTGAAGCA**AGGATGGCAAGAAGGTGACAC  
 ----- phF-D1 -----  
 1349 – 1406 C**ATCTTCCCCCGCGCACT**GAAAGCCCTGGCTGGGATTGCCTGGGGCAGACACAGGCTC  
 1407 – 1464 GGACCAGCCCCAGCAATCCCAGTTTATCAGCGAGCCGGCTGAGGGCCCGGAGTTATC  
 ----- phF-D2 -----  
 1465 – 1522 TCAGTGCCCGGC**CTGAGACCTTGTGGGCAGC**CTGTGGTCATGCTGGCATTCCAGGGGC  
 ----- phF-D3 / phF-D7 -----  
 1523 – 1580 CTTTTGGCATGTGGGAATGTCCAGGAA**AAGCCTCAGCCTTCGGTG**AGGCGCAGAAAA  
 ----- phF-D4 -----  
 1581 – 1637 GGGAAGTGTCCCTAGAGGGGGTGGGTGAGGGCGTGGGAGGT**GGTGTCTGCAGGGAAT**  
 -----  
 1638 – 1694 **GTCC**CCTTTGGGGGAGGAGGATGGAGGGTGGGATTCTGAGGATGGGGGGGGGGCT  
 ----- phF-D5 -----

1695 – 1753 **GTAGCCAGCACCATGTCC**CTCCTGTGTGACCAGCTCAGAGTCCCATGAAATTGGGGCTT  
1754 – 1810 GGGAGGGGAAGGGACACTGGCCTGGGAACCAGAGACCTGGGCTGGTCTGGCTCACAG  
-----  
1811 – 1869 TTGCTGGACCTCTGTGATCCGTGTCAAAAAACGAGAACACCAATTCCTGTCTCTGC**CCAC**  
----- **phF-D6** -----  
1870 – 1927 **TCACCACCAGGTGGG**ACCTGAACCCTGGCATCGCCAGCATTGGGAATGTCGGCCACTGA  
1928 – 1985 CTCAACCACTCTCCCGGAGACCTATTTGGGCCACCCGAGGCGGGTGCCTGGGCCACACG  
1986 – 2042 GAGGGGTCTTGGTGGTCTTCAGGGCAGCGGCTGTGGGGCTGAAGCCTCAAGGAACCAC  
2043 – 2100 ATCTCTGCATAGGAGGGCCAGGCTGCAGGGCCTCGGAGACAACCTAGTTGGGCGTGTTG  
2101 – 2158 GGGTCTGTGGGTCCCAGGTCTGGCCTCACCGGGTCCCCACCGCGCTGTCAGCTCCCA  
2159 – 2217 GCCTCTTTCCCTCGTCTGCCTCTGGGCTTCTGTAAGGCTATGTGCTCCAAGGCCACCTCC  
2218 – 2275 TCCAGGCAGCCCTCAGACCCCCACCTTCGCCCAGTACCGATCTGCACCGTGGTCTCTGA  
2276 – 2334 AGTCTCCATCGTGACCTCAAACCTCGCTCGTCTTGCTCCTAGCGAGGCTTGGGGTCGG  
2335 – 2390 GGTGTCCGAGGTGGGGGACATCCGGGGGGGTTAGGTGGCTGGCGCGGGGAGCCGGGG  
2391 – 2446 TTGTGAGGGGTGATGTCCTCAGGCGGCGGCGCTGCGGGGTGCGGCGAGGACACCGGT  
2447 – 2502 GGGGTGAGAGCACCGGCGGGGCAGCAGCGGGGGCCGCAGCGCCGGGTCCCTCGGCC  
2503 – 2558 CGGGGCCCTCCCGCGCGGAGCCAGGGGCGGGACAGGGGGGCGTGGCCTGGTGGCG  
2559 – 2616 CTGACGTCACCTCGCCTATAAAATGTCCGGGGCGCCGCTAGCTGGGCTTTGTGGAGCGC  
2617 – 2672 TGCGGAGGGTGCCTGCGGGCCGCGGCAGCCGAACAAAGGAGCAGGGGCGCCGCCGCA  
2673 – 2728 GGGACCCGCCACCCACCTCCCGGGGCGCGCAGCGGCCTCTCGTCTATCCATCACACT  
2729 – 2787 GGCGGCCGCTCGAGATCTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAG  
2788 – 2846 CCACC**ATG**GAAGACGCCAAAAACATAAAGAAAGGCCCGGCCATTCTATCCGCTGGAA  
2847 – 2904 GATGGAACCGCTGGAGAGCAACTGCATAAGGCTATGAAGAGATACGCCCTGGTTCCTGG  
2905 – 2964 AACAATTGCTTTTACAGATGCACATATCGAGGTGGACATCACTTACGCTGAGTACTTCGAA  
2965 – 3023 ATGTCCGTTTCGGTTGGCAGAAGCTATGAAACGATATGGGCTGAATACAAATCACAGAATC  
3024 – 3083 GTCGTATGCAGTGAAACTCTCTTCAATTCTTTATGCCGGTGTGGGGCGGTTATTTATCG  
3084 – 3142 GAGTTGCAGTTGCGCCC GCGAACGACATTTATAATGAACGTGAATTGCTCAACAGTATGG  
3143 – 3201 GCATTTGCGAGCCTACCGTGGTGTTCGTTTCCAAAAGGGGTTGCAAAAATTTTGAACGT  
3202 – 3262 GCAAAAAAAGCTCCCAATCATCAAAAAATTATTATCATGGATTCTAAAACGGATTACCAG  
3263 – 3322 GGATTTGAGTCGATGTACACGTTTCGTACATCTCATCTACCTCCCGTTTTAATGAATACG  
3323 – 3382 ATTTTGTGCCAGAGTCCTTCGATAGGGACAAGACAATTGCACTGATCATGAACTCCTCTG  
3383 – 3442 GATCTACTGGTCTGCCTAAAGGTGTCGCTCTGCCTCATAGAACTGCCTGCGTGAGATTCT  
3443 – 3502 CGCATGCCAGAGATCCTATTTTTGGCAATCAAATCATTCCGGATACTGCGATTTAAGTGT  
3503 – 3563 TGTTCCATTCCATCACGTTTTTGAATGTTTACTACACTCGGATATTTGATATGTGGATTTG  
3564 – 3624 GAGTCGTCTTAATGTATAGATTTGAAGAAGAGCTGTTTCTGAGGAGCCTTCAGGATTACAA  
3625 – 3683 GATTCAAAGTGCGCTGCTGGTGCCAACCCTATTCTCCTTCTTCGCCAAAAGCACTCTGATT  
3684 – 3744 GACAAATACGATTTATCTAATTTACACGAAATTGCTTCTGGTGGCGCTCCCCTCTCTAAGG  
3745 – 3802 AAGTCGGGAAGCGGTTGCCAAGAGGTTCCATCTGCCAGGTATCAGGCAAGGATATGGG  
3803 – 3861 CTCCTGAGACTACATCAGCTATTCTGATTACACCCGAGGGGGATGATAAACCGGGCGCG  
3862 – 3919 GTCGGTAAAGTTGTTCCATTTTTTGAAGCGAAG3GTTGTGGATCTGGATACCGGGAAC  
3920 - 3978 GCTGGGCGTTAATCAAAGAGGCGAACTGTGTGTGAGAGGTCCTATGATTATGTCCGGTTA

## 10 - Anhang

---

3979 – 4037 TGTAACAATCCGGAAGCGACCAACGCCTTGATTGACAAGGATGGATGGCTACATTCTGG  
4038 – 4096 AGACATAGCTTACTGGGACGAAGACGAACACTTCTTCATCGTTGACCGCCTGAAGTCTCT  
4097 – 4156 GATTAAGTACAAAGGCTATCAGGTGGCTCCCGCTGAATTGGAATCCATCTTGCTCCAACA  
4157 – 4215 CCCAACATCTTCGACGCAGGTGTCGCAGGTCTTCCCGACGATGACGCCGGTGAACCTC  
4216 – 4274 CCGCCGCCGTTGTTGTTTTGGAGCACGGAAAGACGATGACGGAAAAAGAGATCGTGGAT  
4275 – 4333 TACGTCGCCAGTCAAGTAACAACCGCGAAAAAGTTGCGCGGAGGAGTTGTGTTTGTGGA  
4334 – 4392 CGAAGTACCGAAAGGTCTTACCGAAAACCTCGACGCAAGAAAAATCAGAGAGATCCTCAT  
4393 – 4450 AAAGGCCAAGAAGGGCGGAAAGATCGCCGTGTAATTCTAGAGTCGGGGCGGCCGGCCG  
4451 – 4509 CTTCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACCTAGAATGCAGT  
4510 – 4570 GAAAAAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCT  
4571 – 4631 GCAATAACAAGTTAACAACAACAATT

----- Seq-pGI3-a-Luc fwd ----

4632 – 4691 GCATTCATTTTATGT**TTCAGGTTCAGGGGAGGT**GTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAA

BamH I -- Sal I ---

4692 - 4750 ACCTCTACAAATGTGGTAAATCGATAA**GGATCCGTCGAC**CGATGCCCTTGAGAGCCTT

----- Seq-pGI3-a-Luc rev -----

4751 – 4808 CAACCCAGTCAGCTCCTTCCGGTGGGCGCGGGGCAT**GACTATCGTCGCCGCACTTA**TGA  
4809 – 4867 CTGTCTTCTTTATCATGCAACTCGTAGGACAGGTGCCGGCAGCGCTCTTCCGCTTCCTCG  
4868 - 4925 CTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCCGGCTGCGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAA  
4926 – 4984 GGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAA  
4985 – 5043 AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGG  
5044 – 5101 CTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCC  
5102 – 5160 GACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGT  
5161 – 5219 TCCGACCCTGCCGTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGC  
5220 – 5278 TTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTGCTCCAAGCTGG  
5279 – 5336 GCTGTGTGCACGAACCCCCGTTCCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGT  
5337 – 5395 CTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAG  
5396 – 5453 GATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTA  
5454 – 5512 CGGCTACACTAGAAGAACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG  
5513 - 5571 AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTT  
5572 – 5631 TGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTT  
5632 – 5691 TCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGA  
5692 - 5752 TTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAA  
5753 – 5813 AGTATATATGAGTAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCT  
5814 – 5873 CAGCGATCTGTCTATTTTCGTTCCATCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTAC  
5874 – 5932 GATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCT  
5933 – 5990 CACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGT  
5991 – 6049 GGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCGGGAAGCTAGAGTAA  
6050 – 6108 GTAGTTCCGCGAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGT  
6109 – 6167 CACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTA  
6168 – 6226 CATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCA

## 10 - Anhang

---

6227 – 6285 GAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTCATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTAC  
6286 – 6345 TGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGA  
6346 – 6404 GAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGC  
6405 – 6463 GCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAAC  
6464 – 6523 CTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC  
6524 – 6583 ATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAT  
6584 – 6641 GCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTTC  
6642 – 6703 AATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATT  
6704 – 6763 TAGAAAAATAACAAATAGGGTTCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCG  
6764 – 6821 CCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTA  
6822 – 6879 CACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTTCTTCCTTCTTCGCCACGT  
6880 – 6939 TCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCGATTTAGTG  
6940 – 6998 CTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGGCCAT  
6999 – 7057 CGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACT  
7058 – 7117 CTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGTCTATTCTTTTATTATAAGGGA  
7118 – 7178 TTTTGCCGATTTTCGGCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAAT  
7179 – 7240 TTTAACAAAATATTAACGCTTACAATTTGCCATTCGCCATTCAGGCTGCGCAACTGTTGGG  
7241 – 7298 AAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCT  
----- **pGI3-Not-fwd** -----  
7299 – 7357 TCGCT**TATTACGCCAGCCCAAGCTA**CCATGATAAGTAAGTAATATTAAGGTACGGGAGGT  
----- **Not-l** -----  
7358 – 7419 ACTTGGA**GCGGCCGC**AATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTG  
7420 – 7479 TGAATCGATAGTACTAACATACGCTCTCCATCAAAACAAAACGAAACAAAACAAACTAG  
**pGI3-Not-rev / phFas2.7Bal-l-fwd**  
7480 – 7534 CAAAATAGGCTGTCCCCAGTGC**AAGTGCAGGTGCCAGAACAT**TTCTCTATCGATA – 3'



### 10.3 PCR-Protokolle:

#### 10.3.1 Amplifikation von DNA-Bereichen:

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die der Arbeit verwendeten PCR Protokolle zur Amplifikation von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Größe. Die optimalen PCR-Bedingungen mussten für jede Primerkombination zunächst empirisch ermittelt werden:

Tabelle 7 - in der Arbeit verwendete PCR-Programme

Oligonukleotid:	PCR-Programm:		
	Zykluszahl	Temperatur(°C)	Dauer (min:sec)
Seq-pGI3-a-Luc fwd + Seq-pGI3-a-Luc rev.	2	95	02:00
		95	00:30
		59	00:30
		72	00:45
	2	95	00:30
		59,5	00:30
		72	00:45
	30	95	00:30
		60	00:30
		72	00:45
1	72	05:00	
5NFKB-Fas-fwd + 5NFKB-Fas-rev	2	95	02:00
		95	00:30
		51,5	00:30
		72	00:30
	2	95	00:30
		52	00:30
		72	00:30
	20	95	00:30
		53	00:30
		72	00:30
1	72	05:00	
pZErO-5xNFKB fwd + pZErO-5xNFKB rev	2	95	02:00
		95	00:30
		54	00:30
		72	00:45
M13pZErO-fwd M13pZErO-rev	2	95	00:30
		54,5	00:30
		72	00:45
	30	95	00:30
		55	00:30
		72	00:45
	1	72	05:00

phF-Pvu-fwd + phF-Pvu-rev	3	95	02:00
		95	00:30
		68	00:30
	2	72	00:45
		95	00:30
		67	00:30
	30	72	00:45
		95	00:30
		66	00:30
	1	72	00:45
72		07:00	
phFas2.7Bal-I-fwd + phFas2.7Bal-I-rev	2	95	02:00
		95	00:30
		56	00:30
	2	72	00:45
		95	00:30
		56,5	00:30
	30	72	00:45
		95	00:30
		57	00:30
	1	72	00:45
72		05:00	
phF-D1 + phF-D4	30	95	02:00
phF-D2 + phF-D4		95	00:30
phF-D2 + phF-D5		59,6	00:30
phF-D3 + phF-D5		G = 1,8°	3,0°/s
phF-D1 + phF-D6		72	00:30
phF-D1 + phF-D7		72	05:00
phF-D2 + phF-D6			
phF-D2 + phF-D7			
	1		

10.3.2 Sequenzierbedingungen:

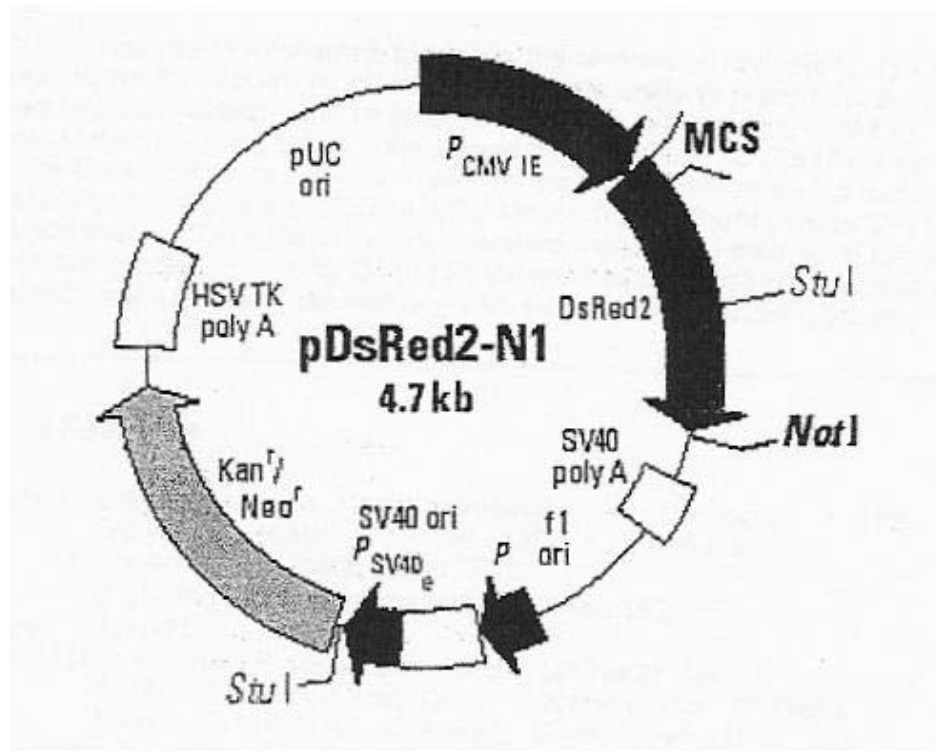
Tabelle 8 – Programm zur Sequenzierung

Oligonukleotid:	Sequenzier-Programm:		
	Zyklen- zahl	Tempe- ratur(°C)	Dauer (min:sec)
verschiedene Sequen- zierprimer	25	96	10:00
		Pause	Mix dazu
		96	00:10
		55	00:15
		60	04:00

## 10.4 Vektoren

Auf den nachfolgenden Seiten sind die Vektorkarten und der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Vektoren aufgeführt.

### 10.4.1 pDsRed2-N1



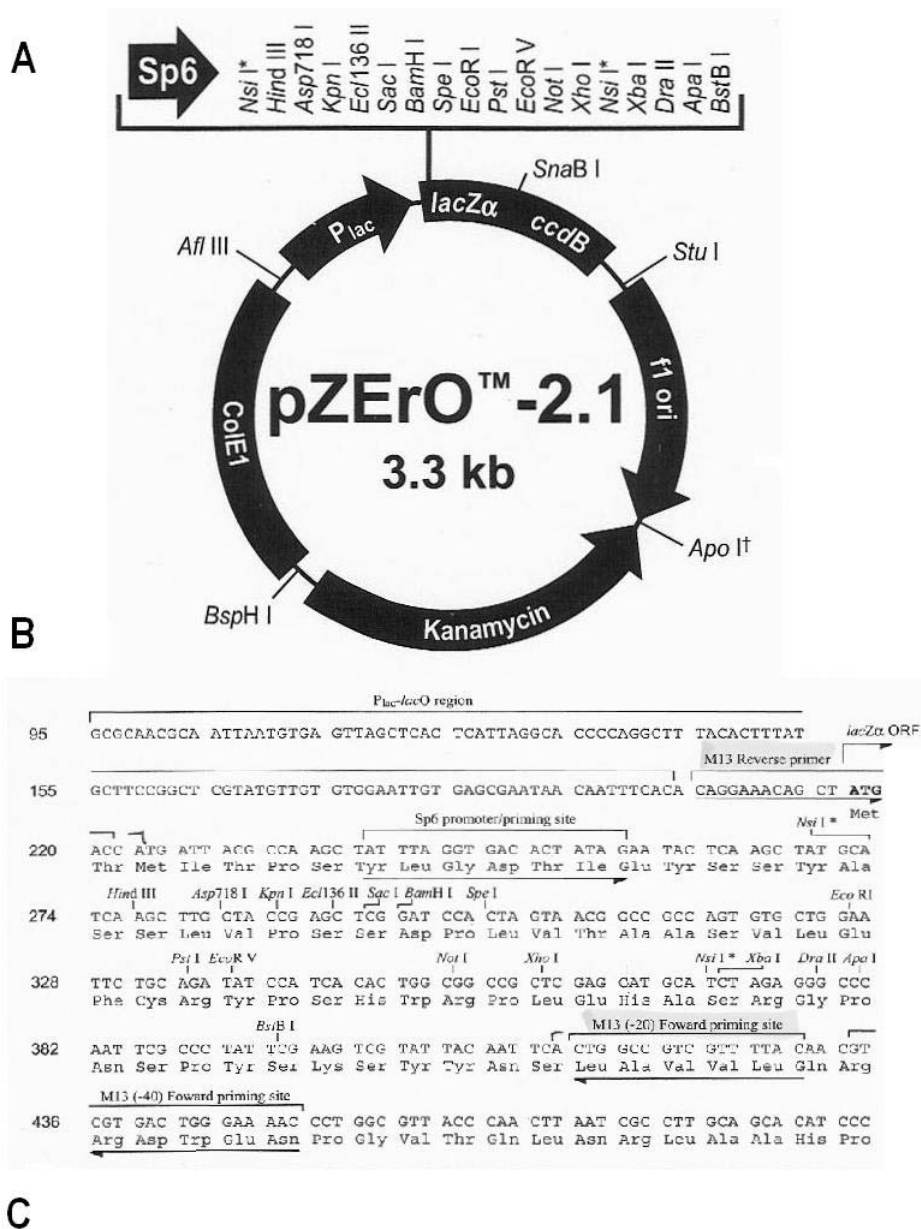
**Vektorelemente:**

CMV-Promotor	1 - 589
Polylinker	591 - 671
Rot fluoreszierendes Protein-Reporter gen (DsRed2)	672 - 1356
SV40 ,late' Poly(A)-Signal	1508 - 1558
Bakterienpromotor zur Expression des Kanamycin-Resistenzgens	2122 - 2150
SV40 Replikationsursprung	2401 - 2536
Kanamycin / Neomycin Resistenzgen	2585 - 3379
Herpes simplex Virus Thymidinkinase Polyadenylierungssignal	3615 - 3633
pMB1 abgeleiteter Replikationsursprung (pUC ori)	3964 - 4607

**Abbildung 45 – Aufbau von pDsRed2-N1**

Oben: Vektorkarte – unten: Vektorelemente, Angabe der Position im Vektor

10.4.2 pZErO-2.1



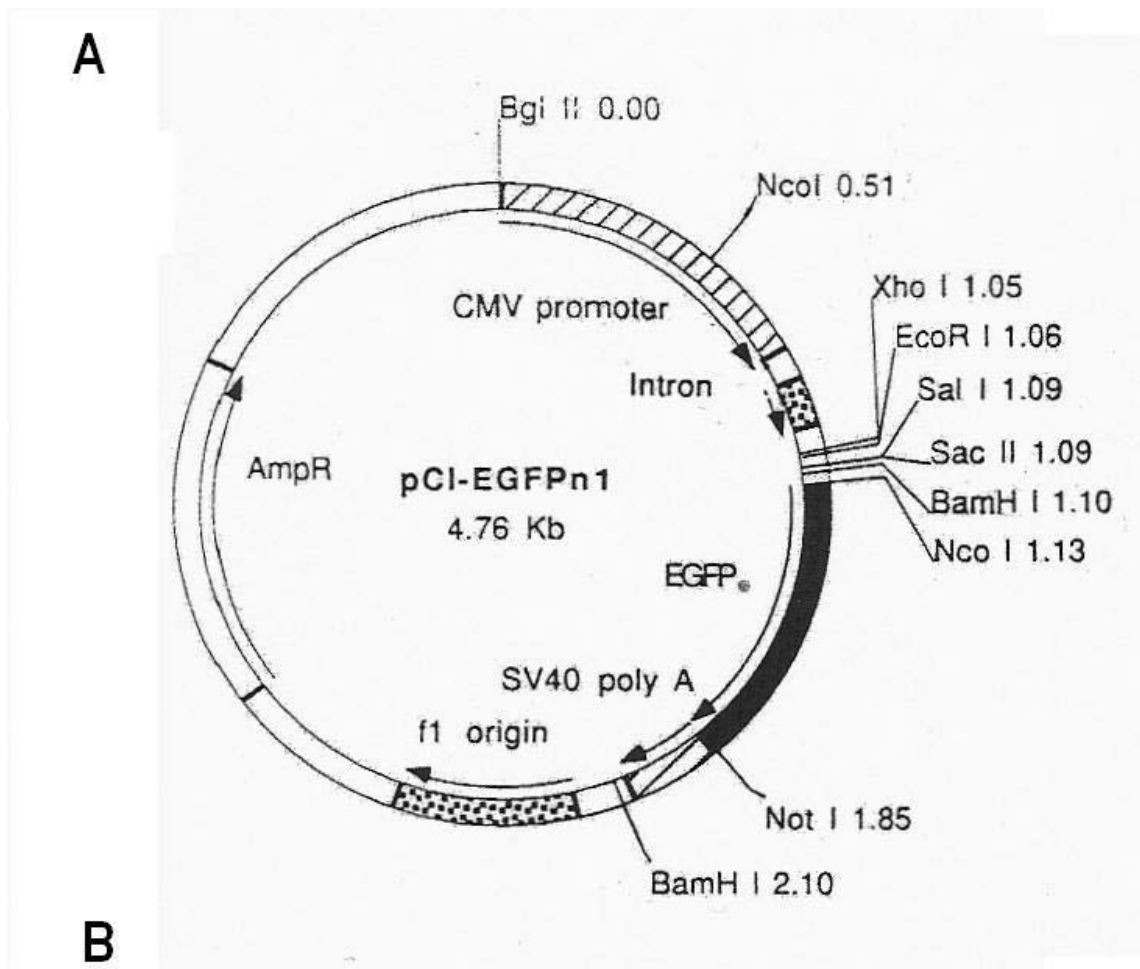
**Vektorelemente:**

lacZ-Promotor (P <sub>lac</sub> )	95 - 216
lacZ-Genanteil (lacZ $\alpha$ )	217 - 558
Polylinker	269 - 381
ccdB-Lethal-Gen	568 - 870
f1-Replikationsursprung (f1 ori)	895 - 1307
Kanamycin-Resistenzgen	1322 - 2116
ColE1-abgeleiteter Plasmid-Replikationsursprung (ColE1)	2502 - 3175

**Abbildung 46 - Aufbau pZErO-2.1**

A) Vektorkarte B) Polylinker: Angabe der Restriktionsschnittstellen und der Primerbindungsstellen (unterstrichen), die Pfeilrichtung markiert die Richtung der DNA-Polymerisierung C) Vektorelemente, Angabe der Position im Vektor

10.4.3 pCI-EGFPn1



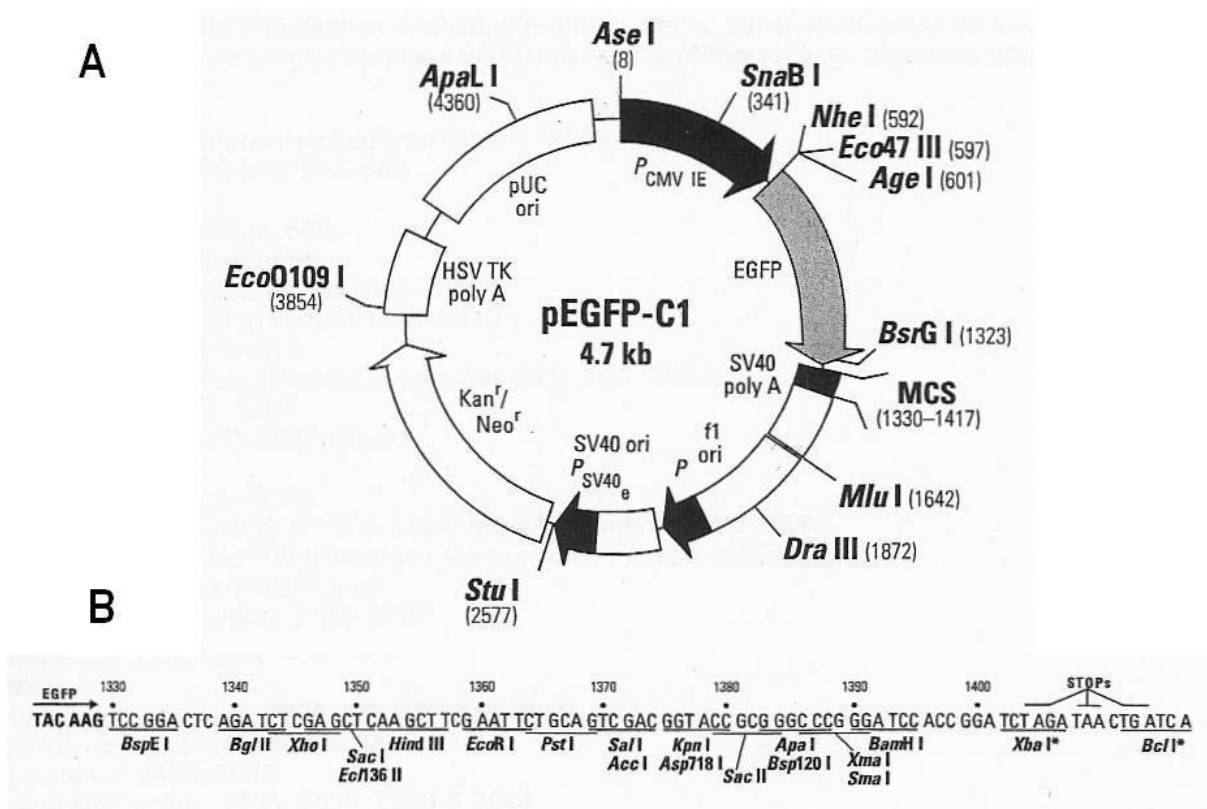
**Vektorelemente:**

CMV-Promotor	1 - 795
Chimäres Intron	857 - 989
Polylinker	1052 - 1118
EGFP - Gen	1126 - 1845
SV40 late Poly(A)-Signal	1862 - 2083
f1-Replikationsursprung (f1 ori)	2173 - 2628
β-lactamase Gen (Amp <sup>r</sup> )	3067 - 3927
ColE1-abgeleiteter Plasmid-Replikationsursprung (ori)	nicht eingezeichnet

**Abbildung 47 - Aufbau von pCI-EGFPn1**

A) Vektorkarte, Angabe wichtiger Restriktionsschnittstellen B) Vektorelemente mit Angabe der Position im Vektor

10.4.4 pEGFP-C1



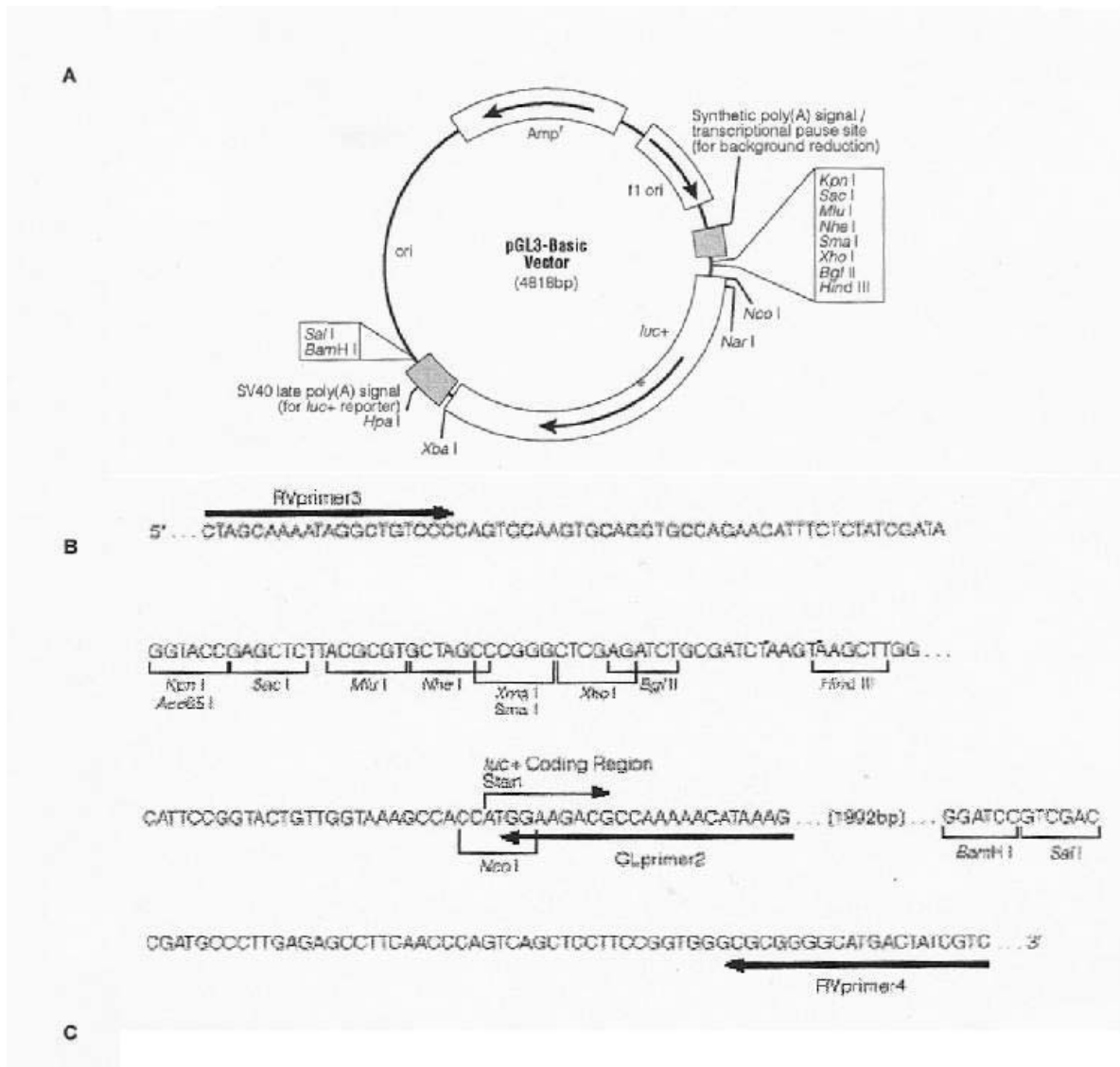
**Vektorelemente:**

CMV-Promotor (PCMV IE)	1 - 589
EGFP-Gen	606 - 1410
Polylinker (MCS)	1330 - 1417
SV40 ,early' Poly(A)-Signal	1550 - 1600
f1-Replikationsursprung (f1 ori)	1647 - 2102
Bakterienpromotor zur Expression des Kanamycin-Resistenzgens	2164 - 2199
SV40 Replikationsursprung	2443 - 2578
Kanamycin / Neomycin Resistenzgen	2627 - 3421
Herpes simplex Virus Thymidinkinase Polyadenylierungssignal	3657 - 3675
pMB1 abgeleiteter Replikationsursprung (pUC ori)	4006 - 4649

**Abbildung 48 - Aufbau pEGFP-C1**

A) Vektorkarte, Angabe wichtiger Restriktionsschnittstellen B) Aufbau des Polylinkers, die Erkennungssequenzen der angegebenen Restriktionsenzyme sind unterstrichen C) Vektorelemente mit Angabe der Position im Vektor

10.4.5 pGL3-Basic



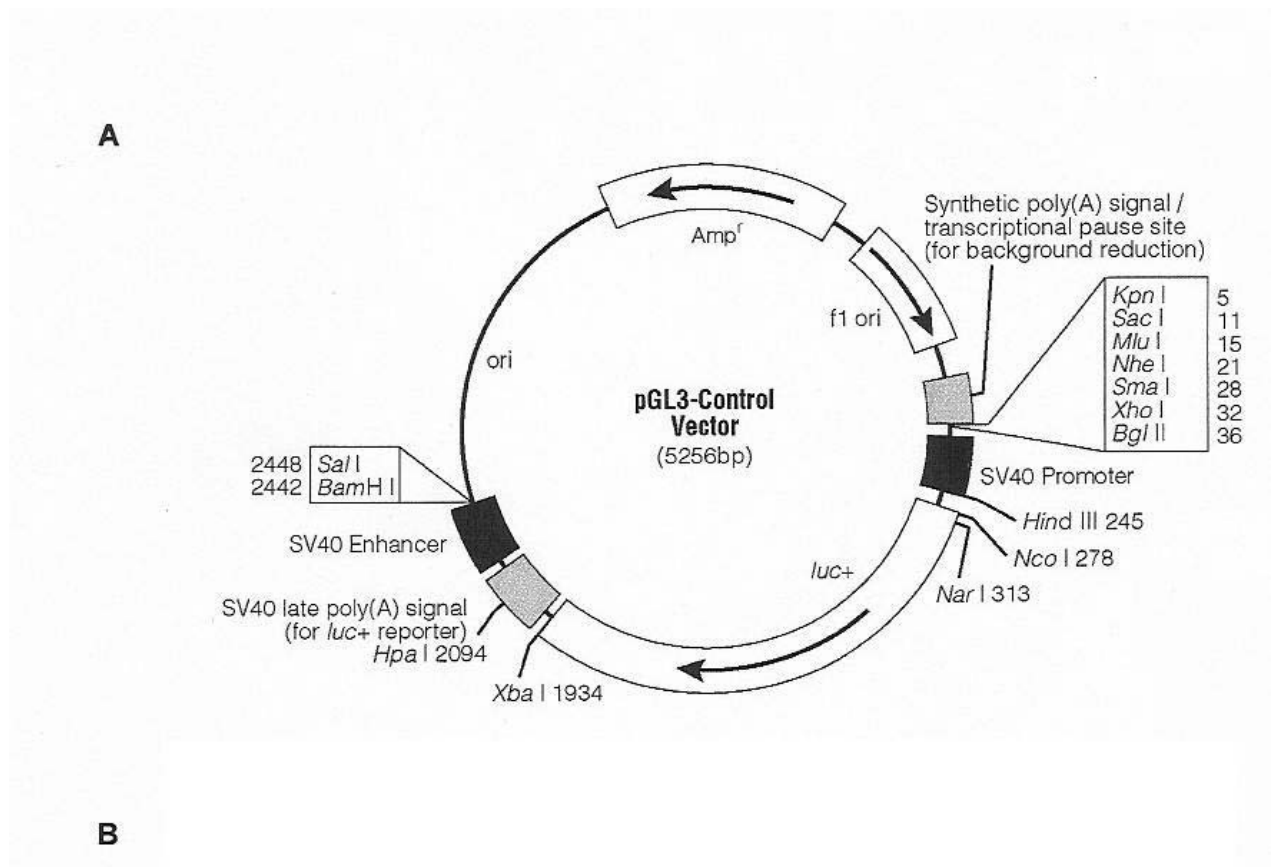
**Vektorelemente:**

Polylinker	1 - 58
Photinus-Luziferase-Gen (luc+)	88 - 1737
SV40 'late' Poly(A)-Signal	1772 - 1993
ColE1-abgeleiteter Plasmid-Replikationsursprung (ori)	2318
β-lactamase Gen (Amp <sup>r</sup> )	1126 - 1845
SV40 'late' Poly(A)-Signal	3940 - 3083
f1-Replikationsursprung (f1 ori)	4073 - 4527
stromaufwärts gelegenes Poly(A)-Signal	4658 - 4811

**Abbildung 49 - Aufbau von pGL3Basic**

A) Vektorkarte B) Polylinker: Angabe der Restriktionsschnittstellen und der Primerbindungsstellen (unterstrichen), die Pfeilrichtung markiert die Richtung der DNA-Polymerisierung C) Vektorelemente, Angabe der Position im Vektor

10.4.6 pGL3-Control



**Vektorelemente:**

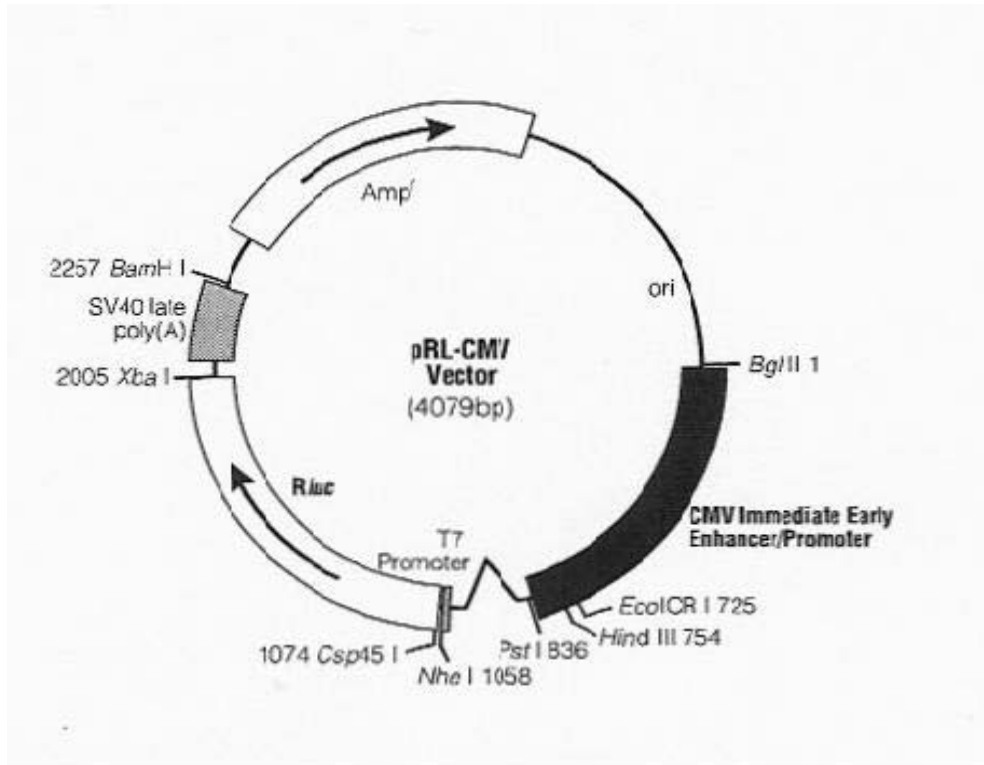
Polylinker	1 - 41
SV40-Promotor	48 - 250
Photinus-Luziferase-Gen (luc+)	280 - 1929
SV40 'late' Poly(A)-Signal	1964 - 2185
SV40 Enhancer	2250 - 2441
ColE1-abgeleiteter Plasmid-Replikationsursprung (ori)	2756
β-lactamase Gen (Amp <sup>r</sup> )	4378 - 3521
f1-Replikationsursprung (f1 ori)	4511 - 4965
stromaufwärts gelegenes Poly(A)-Signal	5096 - 5249

**Abbildung 50 - Aufbau von pGL3-Control**

A) Vektorkarte, Angabe wichtiger Restriktionsschnittstellen B) Vektorelemente mit Angabe der Position im Vektor



10.4.7 pRL-CMV



**Vektorelement**

CMV-Promotor	7 - 803
Chimäres Intron	860 - 996
Renilla-Luciferase-Reportergen (RLuc)	1068 - 2003
SV40 late Poly(A)-Signal	2045 - 2246
β-lactamase Gen (Amp <sup>r</sup> )	2393 - 3253
ColE1-abgeleiteter Plasmid-Replikationsursprung (ori)	nicht gezeigt

**Abbildung 51 - Aufbau pRL-CMV**

A) Vektorkarte, Angabe wichtiger Restriktionsschnittstellen B) Vektorelemente mit Angabe der Position im Vektor

10.4.8 pNF- $\kappa$ B-Luc, pGFPmax

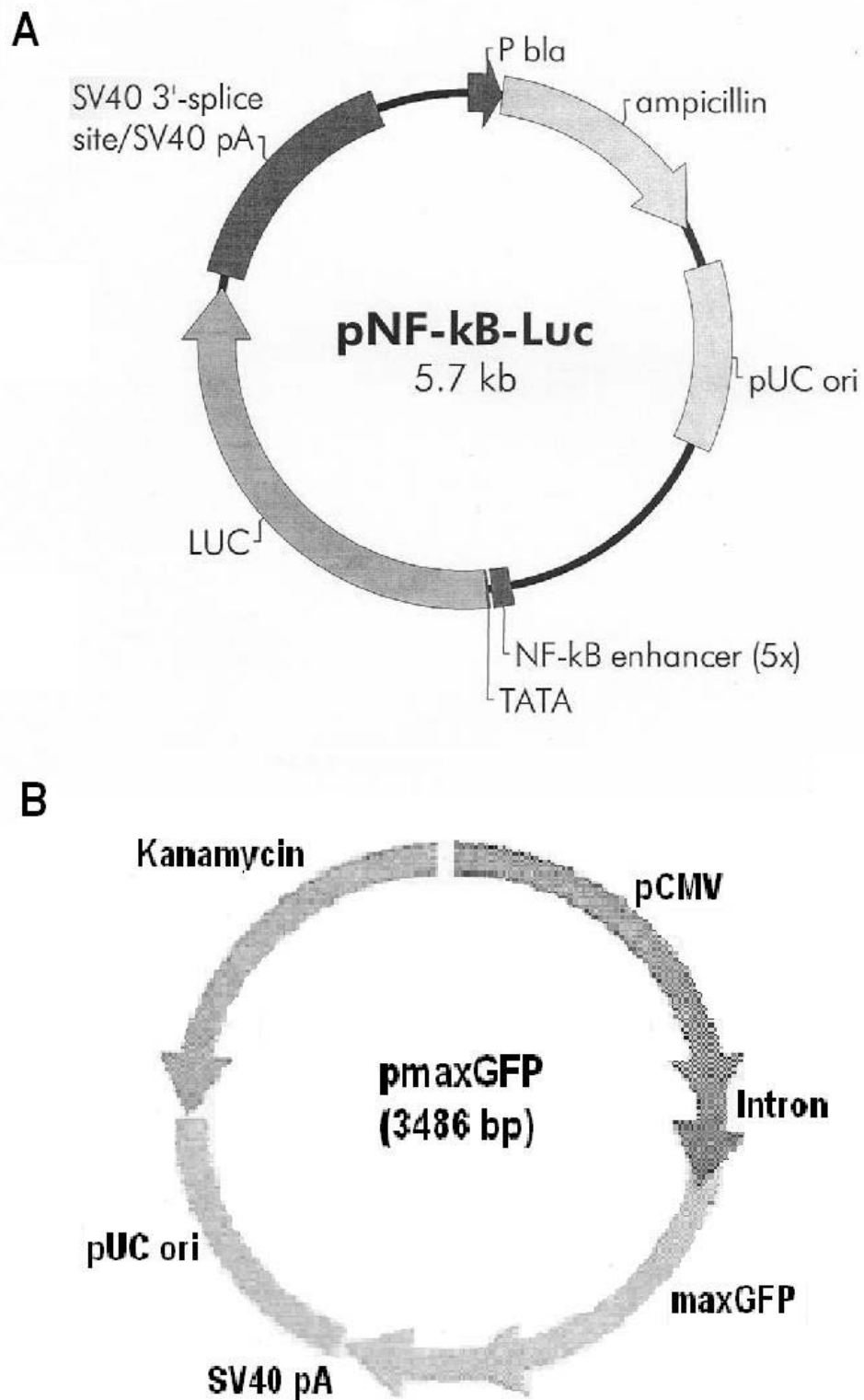


Abbildung 52 - Aufbau von pNF- $\kappa$ B-Luc (A) und pGFPmax (B)