

Aus der Medizinischen Klinik m. S. Hämatologie, Onkologie und
Tumorimmunologie, Campus Berlin-Buch
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mannose-Rezeptor vermittelter Gentransfer in humane
Dendritische Zellen

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Olaf Joachim Hopfer

aus Potsdam

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. Pezzutto
2. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
3. M.Y. Mapara MD, Ph D

Datum der Promotion: 19.08.2007

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	3
VERWENDETE ABKÜRZUNGEN UND EINHEITEN	5
1.0 ZUSAMMENFASSUNG	10
2.0 EINLEITUNG	11
2.1 PROBLEMATIK	11
2.2 TUMORANTIGENE	11
2.3 VERSAGEN DER TUMORIMMUNANTWORT	12
2.4 ANTIGENPROZESSIERUNG UND PRÄSENTATION	14
2.5 TUMORVAKZINIERUNG	15
2.5.1 zelluläre Vakzine	15
2.6 DENDRITISCHE ZELLEN	17
2.7 DER MANNOSE-REZEPTOR	24
2.8. REZEPTOR-VERMITTELTER GENTRANSFER	26
2.8.1 Überblick	26
2.8.2 Trägermoleküle.....	28
2.8.3 Kondensation.....	29
2.8.4 Liganden.....	30
2.8.5 Lysosomaler Escape	31
2.8.6 Kernlokalisierung und Transgen-Expression	32
3.0 FRAGESTELLUNG UND VERSUCHSAUFBAU	34
4.0 MATERIALIEN UND METHODEN	35
4.1 PUFFER	35
4.2 ZELLKULTURMEDIEN.....	36
4.3 BIOLOGISCHES MATERIAL	37
4.4 ANTIKÖRPER	38
4.5 SONSTIGE MATERIALIEN	38
4.6 ZELLKULTUR	39
4.7 FACS-ANALYSEN	41
4.8 PLASMIDVEKTOREN.....	41
4.9 DNA KONZENTRATIONSBESTIMMUNG	42
4.10 MANNOSYLIERUNG VON POLY-L-LYSIN UND POLYETHYLENIMIN SOWIE ANALYSE DER KONSTRUKTE.....	42
4.11 TRANSFEKTIONSKOMPLEXE.....	45
4.12 TRANSFEKTION.....	45
4.13 LUCIFERASE-ASSAY	46
4.14 PROTEINBESTIMMUNG NACH BREDFORD.....	46
4.15 BESTIMMUNG DER TOXIZITÄT DER TRANSFEKTIONSKOMPLEXE.....	46
5.0 ERGEBNISSE	47
5.1 EXPRESSION DES HUMANEN MANNOSE-REZEPTORS AUF RATTEN MMR61-FIBROBLASTEN UND RAT6-FIBROBLASTEN.....	47
5.2 GENERIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN	47
5.3 MANNOSYLIERUNG DER POLYMERE	49
5.4 ELEKTROPHORESE DER TRANSFEKTIONSKOMPLEXE.....	50
5.5 TRANSFEKTIONSEXPERIMENTE	52
5.5.1 Vergleich von Rat6-Zellen und MMR61-Zellen.....	52
5.5.2 Transfektionsexperimente an MMR61-Fibroblasten	53
5.5.3. Transfektionsexperimente an humanen Dendritischen Zellen	59
6.0 DISKUSSION	65
7.0 ANHANG	74
8.0 LITERATURVERZEICHNIS	79
9.0 PUBLIKATIONEN	92
10.0 DANKSAGUNG	92

11.0 LEBENSLAUF.....	93
12.0 ERKLÄRUNG AN EIDES STATT.....	95
13.0 ABSTRACT.....	96

Verwendete Abkürzungen und Einheiten

α	anti
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ABL	Abelson-Leukämie-Protoonkogen
ACT	Ammoniumchlorid Tris
AFP	Alpha-Fetoprotein
AG	Aktiengesellschaft
AIDS	acquired immunodeficiency syndrom, erworbenes Immunschwäche Syndrom
AK	Antikörper
ALL	Akute Lymphatische Leukämie
APC	Antigen-präsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP spaltendes Enzym
BAGE	Bronchial Assoziierte Gene
BCR	breakpoint cluster region
BCR-ABL	Onkogen, t(9;22)(q34;q11)
BCL-2	B-cell leukemia/lymphoma-2
bidest.	bidestilata, zweifach destilliert
BSA	bovines Serumalbumin
B-Zelle	B-Lymphozyt
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation, Differenzierungsantigene
CRD	carbohydrate recognition domain, Erkennungsdomäne für Kohlenhydrate
CEA	karzinoembryonales Antigen
c-kit	tyrosine-protein kinase, Protoonkogen
CLA	cutaneous lymphocyte-associated antigen, Lymphozyten assoziiertes Antigen der Haut
CL-22	artifizielles kationisches Peptid, Vektor für nicht-viralen Gentransfer
CML	Chronisch Myeloische Leukämie
CMP	myeloische Vorläuferzelle
cMR	cellular mannose receptor, zellulärer Mannose-Rezeptor
CMV	Zytomegalievirus

c-myc	zelluläres Homolog zum viralen Onkogen v-myc (avian myelocytomatosis retrovirus)
CO	Company
CpG	Zytosin-Guanin-Dinukleotid
CSF	Colony Stimulating Factor; Kolonie stimulierender Faktor
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
dest.	destilata, destilliert
d.h.	das heißt
DC	Dendritic Cell, Dendritische Zelle
DC1	reife myeloische Dendritische Zelle
DC2	reife plasmazytoide Dendritische Zelle
DTT	Dithiothreitol (Threo-1,4-Dimercapto-2,3-Butanediol)
DEC-205	CD-205, Lektinrezeptor
DH5 α	Escherichia coli Stamm
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Deoxyribonukleinsäure
DNase	DNA spaltendes Enzym
Dogs	Diocadeacetylaminoglylspermin
Dotma	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)Propyl]-N,N,N-Trimethylammoniumchlorid
Dope	L-Dioleoyl-Phosphatidylethanolamin
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein, verstärktes Grün-fluoreszierendes Protein
et al.	und Mitarbeiter
engl.	englisch
ER	Endoplasmatischen Retikulum
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorter
Fc	Fragment crystallizable, kristallisierbares Fragment von Antikörpern nach enzymatischer Spaltung
FCS	Fetal Calf Serum, fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
G418	Genitacin
GAGE	Gastrointestinal Assoziierte Gene
GALA	synthetisches amphoterer Peptid
GFP	green fluorescent protein, Grün-fluoreszierendes Protein
ggfs.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung

GP	Glykoprotein
G ₁ -Phase	Gap 1-Phase im Zellzyklus
h	Stunde
HA	Hämagglutinin
H ₂ O ₂	Sauerstoffperoxyd
HIV	human immunodeficiency virus, Menschliches Immundefizienz-Virus
HLA	Human Leucocyte Antigen, humanes Leukozyten-Antigen
HMG	high motility group, Gruppe mit hoher Mobilität
hnRNP	Ribonukleoprotein
HPC	hämatopoetische Vorläuferzellen
HPV	Humanes Papilloma Virus
HSV	Herpes simplex Virus
HSV-TK	Herpes simplex Virus Thymidinkinase
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1, CD54
iDC	unreife Dendritische Zellen
IDO	Indolamin-2,3-dioxygenase
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iMC	unreife myeloische Zellen
INF	Interferon
kD	kilo-Dalton
KRSPA-GFP	Plasmidvektor für Grün-fluoreszierendes Protein
l	Liter
LAG	Langerhans assoziierte Antigene
LB	Luria Bertani
LFA-3	Lymphocyte Function-Associated antigen-3, CD58
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar
mAb	monoklonale Antikörper
MAGE	Melanom Assoziierte Gene
Mann-BSA	mannosyliertes BSA
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MMR	Mannose-Rezeptor
MoDC	aus Monozyten generierte Dendritische Zellen
M-PEI	mannosyliertes Polyethylenimin
M-PL	mannosyliertes Polylysin
mRNA	messenger RNA, Boten-RNA
MW	Molekulargewicht

n	Stichprobengröße
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NF-κB	nuclear factor κB, Kernfaktor κB
NLS	nuclear localization signal, Kern-Lokalisationssignal
NPC	nuclear pore complex, Kernporenkomplex
PBMC	peripheral blood mononuclear cells, Mononuclear Zellen aus Peripheralblut
PBS	Phosphat gepufferte Saline
pBS-kRSPA-GFP	GFP-Vektorplasmid
pCluc4	Luciferasevektorplasmid
pDC1	Blut-Monozyten
pDC2	intermediäre plasmazytoide Dendritische Zellen
PE	Phykoerythrin
PEI	Polyethylenimin
PGE-2	Prostaglandin E-2
PL	Polylysin
RAGE	Renal Assoziierte Gene
RIGS	repeat induced gene silencing, auf Sequenzwiederholungen basierende „Abschaltung“ von Genen
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RSV-LTR	Rous Sarcoma Virus-“long terminal repeat”
RT	Raumtemperatur
SCID	severe combined immunodeficiency, schwere Immunschwäche durch T- und B-Zelldefekt
SD	Standardabweichung
sMR	soluble mannose receptor, löslicher Mannose-Rezeptor
S-Phase	DNA-Synthese-Phase im Zellzyklus
S-S	Disulfidbrücke
SV40	Simian Virus 40
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
$t_{1/4}$	halbe Halbwertszeit
TAA	Tumor-Assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TAL-1	T-cell acute lymphocytic leukemia 1, T-ALL-Gen
TAP	Transporter associated with Antigen Processing, intrazellulärer Transporter der prozessierten Antigene
TBE	Tris-Borate-EDTA
TCR	T Cell Receptor, T-Zell-Rezeptor
TFR	Transferrin-Rezeptor
TGF	tumor growth factor, Tumor-Wachstumsfaktor

Th-Zellen	T-Helfer-Lymphozyten
TiL	Tumor-infiltrierende Lymphozyten
TLR	Toll-like receptor, Antigenmuster (engl., pattern) erkennender Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
T-Zelle	T-Lymphozyt
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor, Gefäß-endothelialer-Wachstumsfaktor
vs.	versus
\bar{x}	arithmetischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel

1.0 Zusammenfassung

Rezeptor-vermittelter Gentransfer bietet die Möglichkeit eines zellspezifischen „Targetting“ in vitro und in vivo. Durch Kultivierung von CD34+Stammzellen oder CD14+ monozytären Vorläuferzellen in Gegenwart von Zytokinen ist es heutzutage möglich, eine große Anzahl an Dendritischen Zellen (DC) für die zelluläre Immuntherapie ex vivo zu generieren. Eine effektive Möglichkeit der Antigenbeladung von Antigen-präsentierenden Zellen stellt die Transfektion von Tumorantigen-kodierender DNA dar (Kombination multipler Epitope von Tumor-assoziierten Antigenen (TAA), vornehmliche Präsentation über MHC-Klasse-I und Priming von CD4+ sowie CD8+ T-Zellen). Verschiedene Nachteile des viralen Gentransfers (Rekombinationsereignisse, insertionale Mutagenese bei Retroviren, fehlende Zelltypspezifität, Antikörper-vermittelte Inaktivierung in vivo) machen nicht-virale Methoden für klinische Anwendungen attraktiv (Transfektion ausdifferenzierter und teilungsunfähiger Zellen, episomale Plasmid-DNA mit großen Inserts).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein nicht-virales Rezeptor-vermitteltes In-vitro-Gentransfersystem für humane DC aus CD14+ monozytären Vorläuferzellen etabliert. Als Ziel-Rezeptor diente der Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR), welcher auf unreifen DC stark exprimiert wird und eine starke endozytotische Aktivität aufweist. Neben Poly-L-Lysin (50kD) kam hierbei Polyethylenimin (50kD und 800kD) zum Einsatz. In Analogie zur Synthese von Neoglykoproteinen wurden die Polymere PL und PEI mit Mannose, dem als Ligand am besten geeigneten Monosaccharid, kovalent verbunden. Zur Etablierung und Optimierung der Transfektionsbedingungen wurde ein Modell-System mit Ratten-Fibroblasten-Zellen (MMR61), die den humanen MMR als Transgen exprimieren, etabliert. Über ein Luciferase-Expressionssystem erfolgte die Quantifizierung der Transfektions-Effizienz. Es konnte gezeigt werden, dass mannosyliertes PEI (800kD) hervorragend zur MMR-spezifischen Transfektion von MMR61-Zellen geeignet ist, wobei sich eine um einen Faktor 3 bessere Transfektions-Effizienz des mannosylierten gegenüber dem nativen Polymer zeigte. Die Zahl transfizierter MMR61-Zellen betrug dabei mindestens 13%. Eine Expressionsdauer von bis zu 1 Woche war mit M-PEI (800kD) nachweisbar, gegenüber nur 2-3 Tagen bei M-PL (50kD). Humane DC ließen sich prinzipiell mit M-PEI MMR-spezifisch transfizieren (4,5fach höhere Transgen-Expression mit M-PEI (800 kD) und 11fach höhere Transgen-Expression mit M-PEI (50kD) gegenüber dem nativen Polymer), wobei eine erhebliche interindividuelle Variabilität der Transfizierbarkeit von MoDC verschiedener Blutspender zu beobachten war. Hierbei zeigte sich eine Transfizierbarkeit von bis zu 26% der individuellen DC-Präparationen, dies jedoch bei erheblicher Toxizität der Transfektionskomplexe. Mögliche Ursache hierfür könnte das hohe degradative Potential des dem MMR nachgeordneten endozytotischen Pathways sein. Zusammenfassend zeigt die vorliegende Arbeit, dass der MMR eine Rezeptor-vermittelte Transfektion ermöglicht, speziell für DC ist diese Methode jedoch anderen etablierten Gentansfer-Systemen deutlich unterlegen. Die Eignung des vorgestellten Transfektionssystems zur In-Vivo-Transfektion von DC bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

2.0 Einleitung

2.1 Problematik

Burnet stellte 1970 das Konzept der T-Zell-vermittelten Immunüberwachung von Tumoren auf, ausgehend von der Vorstellung, dass der malignen Entartung genetische Veränderungen in der Mutterzelle eines entarteten Zell-Klons zugrunde liegen, die ihren Ausdruck in veränderten Proteinen oder einem abnormen Protein-Expressionsmuster finden. Fehler der Immunüberwachung, die diese Zellveränderungen nicht erkennen und Malignomzellen nicht eliminieren, wären so mitverantwortlich für die Tumorentstehung [1].

Zwar muss aus heutiger Sicht dieses Modell relativiert werden, für das Konzept der Induktion einer Tumor-gerichteten Immunantwort sprechen jedoch Tierexperimente, die eine Tumorabstoßung bzw. -progression nach Immunstimulation bzw. -suppression zeigen [2]. Der Nachweis autologer tumorspezifischer T-Lymphozyten sowie von Antikörpern beweist die Existenz Tumor-assoziiierter Antigene (TAA) [3]. Nach der „danger-theory“ (engl., Gefahrentheorie) von P. Matzinger ist das Versagen des Immunsystems eine Tumor-gerichtete, zelluläre Antwort zu induzieren auf das Fehlen von so genannten Gefahrensignalen auf Malignomzellen zurückzuführen [4], [5].

Die Induktion einer Immunantwort zur Überwindung tumorspezifischer Toleranz bzw. Anergie ist das Ziel neuer Therapieansätze. Dieses soll u.a. durch den Einsatz professioneller Antigen präsentierender Zellen (APC), insbesondere durch Dendritische Zellen (DC) mit ihrem besonderen kostimulatorischen Potential, erreicht werden. Nach Antigenbeladung sind diese in der Lage, eine Tumorantigen-spezifische T-Zell-Antwort durch „Priming“ naiver CD8+ und CD4+ T-Zellen zu induzieren. Einmal aktiviert können diese CTL dann ohne weitere Kostimulation Tumorzellen abtöten.

2.2 Tumorantigene

Die Voraussetzung für T-Zell-vermittelte Therapieansätze ist das Vorhandensein tumorassoziierter Antigene als immunologisches Target. Durch Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TiL) bzw. durch T-Lymphozyten aus peripherem Blut von Malignompatienten konnten zahlreiche Tumorantigene identifiziert werden [6]. Nach ex vivo Separation von TiL lassen sich durch wiederholte Stimulation mit autologen Tumorzellen spezifische T-Zellklone generieren, mit denen sich Tumorantigene charakterisieren lassen. Diese können z.B. in folgende Gruppen eingeteilt werden [7].

1. **„Shared“-Antigene:** häufig von verschiedenen Malignomen exprimiert, z.T. pathogenetisch an der malignen Zell-Transformation beteiligt, z.T. geringe Restriktion antigener Peptide für verschiedene HLA-Allele (z.B. MAGE-1 Peptide), Eignung von Peptid/HLA-Kombinationen als Vakzine für größere Patientengruppen, z.B. Unterteilung in [8]:
 - a. **Tumor-assoziierte Antigene:** von bestimmten Tumoren überexprimiert, jedoch häufig auch in gesundem Gewebe vorkommend, z.B. onkofetale Antigene wie karzinoembryonales Antigen (CEA) und das Alpha-Fetoprotein (AFP).

- b. **Differenzierungsantigene:** von Normalzellen und Malignomzellen exprimiert, z.B. Tyrosinase [9], Melan-A/Mart-1 [10] sowie die Glykoproteine gp100 [11] und gp75 [12] in Melanomzellen und Melanozyten.
 - c. **Tumor-/Testisantigene:** keine Expression in normalen Geweben Erwachsener mit Ausnahme der Gonaden (auf testikulären Keimzellen jedoch keine MHC-Klasse-I Expression), z.B. Gene der Familien MAGE (melanoma associated gene), BAGE (bronchial associated gene), GAGE (gastrointestinal associated gene) und RAGE (renal associated gene), Expression in verschiedenen Malignomen (Melanom, Mammakarzinom, Sarkom, Blasenkarzinom, Prostatakarzinom, Nichtkleinzelliges Lungenkarzinom) [13], [14], [15].
2. **Tumor-spezifische Antigene:** individualspezifisch, wie a): **Punktmutationen** des Tumorsuppressor-Gens p53 [16], des p21ras Proteins [17] und der Zyklin-abhängigen Kinase 4 [18], oft mit Funktionsverlust von Zellzyklus und Apoptose regulierenden Mediatorproteinen; des Weiteren b): **Fusionsproteine**, Entstehung durch Translokationen mit Bildung von Onkogen-Produkten (Neoproteine mit Aktivität als Enzyme oder Regulationsproteine und ursächlicher Beteiligung an der Mutagenese), z.B. Translokation des BCL-2 Gens bei B-Zell-Lymphomen [t(14,18)] , des c-MYC-Gens bei Burkitt-Lymphomen [t(8;14), t(2;8), t(8;22)], die BCR-ABL-Translokation bei B-ALL und CML (Integration des Abelson-Leukämie-Protoonkogen von Chromosom 9 in die Major Breakpoint Region von Chromosom 22).
 3. **Virale Antigene:** Abstammung von z.B. Epstein-Barr-Virus (EBV) beim Burkitt-Lymphom und Papilloma Virus (HPV) beim Zervixkarzinom.
 4. **Idiotyp-Antigene:** individualspezifische Determinanten des T-Zell-Rezeptors und der Immunglobuline.

2.3 Versagen der Tumorummunantwort

Das Fehlen kostimulatorischer Moleküle bzw. von „Gefahrensignalen“ auf Tumorzellen (entsprechend der Theorie von P. Matzinger) ist hauptverantwortlich für das Ausbleiben einer effektiven Tumorgerichteten Immunantwort. Die Interaktion des T-Zell Rezeptors (TCR) mit dem Antigen-beladenen Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-Klasse-I bzw. Klasse-II stellt dabei das erste Signal dar. Bleibt die Vermittlung eines zweiten kostimulatorischen Signals durch akzessorische Moleküle (u.a. CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) auf APC sowie CD28 auf T-Zellen) aus, so kommt es zur Ausbildung von Toleranz bzw. Anergie [19]. Optimal werden kostimulatorische und Adhäsionsmoleküle durch professionelle APC exprimiert.

Eine weitere Ursache ineffektiver Tumorabstoßung sind „Immunescape“-Phänomene (engl., immunologische Flucht) durch Malignomzellen mit ineffektiver Tumorzell-Immunzell-Interaktion [20]. Solche Mechanismen sind die Ausbildung von Antigenverlust-Varianten, der Verlust von Zelladhäsionsmolekülen [21] und ein Verlust der Antigenpräsentation durch MHC-Moleküle (Defekte der Antigen-Prozessierung oder HLA-Expression) [22], [23]. Peptide tumorspezifischer Antigene werden außerdem nicht immer von HLA-Molekülen gebunden [7, 24]. Tumorzellen können darüber

hinaus eine protektive Immunantwort durch die Sekretion suppressorischer Zytokine, wie Interleukin-10 (IL-10) [25] oder des Transforming Growth Factor-beta (TGF-beta [26], aktiv unterdrücken.

Zahlreiche Indizien sprechen dafür, dass eine Malignom-induzierte Dysfunktion Dendritischer Zellen einen wichtigen Tumor-Escape-Mechanismus darstellt. Tumore rekrutieren z.T. Zytokin-vermittelt unreife DC (Tumor-infiltrierende DC) und blockieren deren weitere Ausreifung [27], [28], [29], [30]. Unreife myeloische DC werden sogar in der Tumorumgebung zu TGF-beta sezernierenden Zellen konvertiert, die CD4+ CD25+ **regulatorische T-Zellen** induzieren [31].

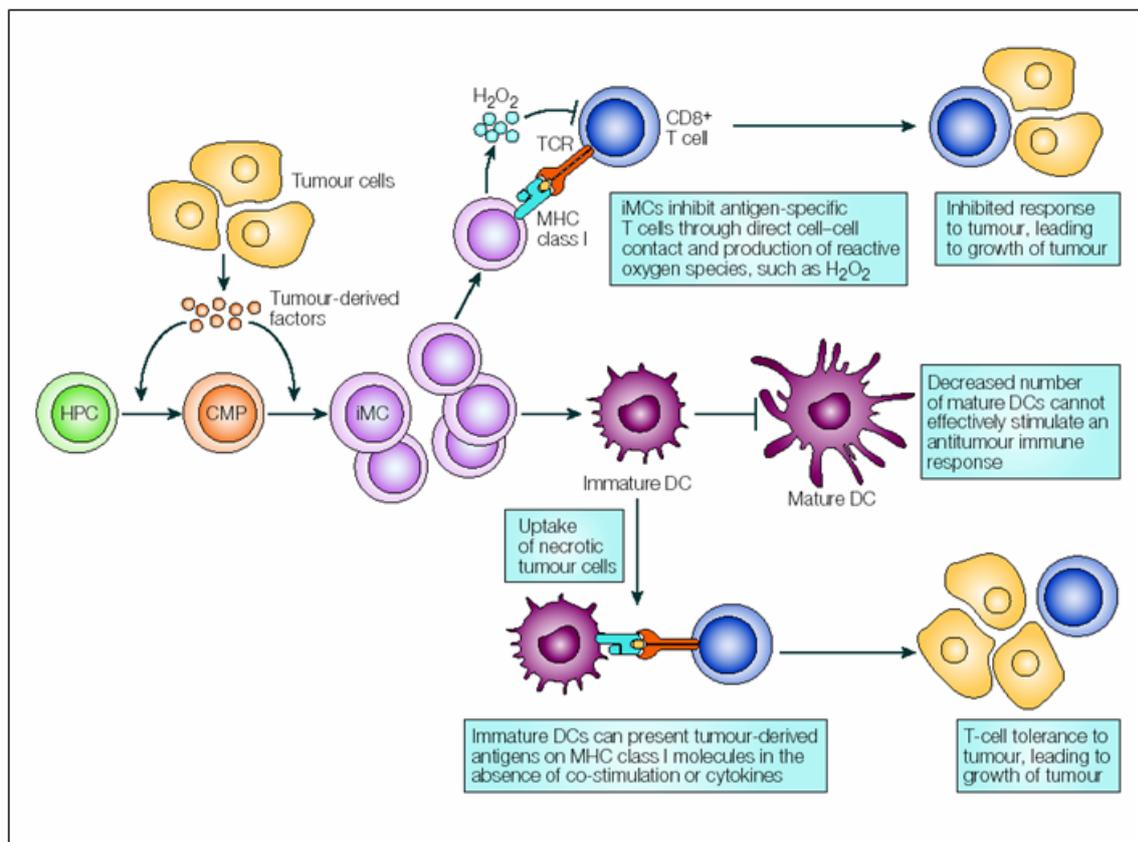


Abb.1:

Gestörte DC Differenzierung bei Malignomen. Tumor bedingt kommt es zur Störung der DC-Differenzierung im Knochenmark. In Folge ist die Zahl reifer und kompetenter DC reduziert, hingegen die Zahl unreifer DC (iDC) und unreifer myeloischer Zellen (iMC) erhöht. HPC, hämatopoetische Vorläuferzelle; CMP, Myeloische Vorläuferzelle; TCR, T-Zell Rezeptor (aus [32]).

2.4 Antigen-Prozessierung und Präsentation

Antigene werden CD8⁺-zytotoxischen-T-Lymphozyten (CTL) und CD4⁺-Helfer-T-Lymphozyten (Th-Zellen) in prozessierter Form als Peptide über MHC-Komplexe präsentiert. Die T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor eine Affinität über einem bestimmten Schwellenwert zum präsentierten Antigen hat, proliferieren oder werden aktiviert, wenn ein „zweites Signal“ als Kostimulation, z.B. der CD28-Ligand B7.2 bereitgestellt wird [33]. Fehlt das kostimulatorische Signal, dann werden die spezifischen T-Zellen inaktiviert (anerg) oder deletiert. MHC-Komplexe, auch „humane Leukozyten Antigene“ (HLA), werden in MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterteilt (MHC-Klasse I: HLA-A, HLA-B und HLA-C sowie HLA-E, HLA-F und HLA-G, Expression auf Thrombozyten und fast allen kernhaltigen Körperzellen; MHC-Klasse-II: HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP, Expression auf Antigenpräsentierenden Zellen). Ein erheblicher Polymorphismus der HLA-Gene, insbesondere im Bereich der Peptidbindungsdomäne, ist für die Vielfalt der Peptidbindungen und der HLA-Haplotypen verantwortlich.

Über den **MHC-Klasse-I** restringierten Weg werden in der Regel endogene Antigene gegenüber CD8⁺-T-Lymphozyten präsentiert. Durch Proteinase-Komplexe (Proteasomen) werden im Zytoplasma synthetisierte Proteine zu Peptiden mit einer Aminosäurenlänge von 9-11 abgebaut und durch Transportmoleküle (TAP = Transportproteine assoziiert mit Antigen-Prozessierung) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert. Dort treffen sie auf neu synthetisierte MHC-Klasse-I-Moleküle mit freien Bindungsstellen. Passen die Peptide in die Bindungsdomäne (Überschreitung einer Affinitätsgrenze), wird der gesamte MHC-Peptid-Komplex über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Dort können CD8⁺-T-Lymphozyten mit passendem T-Zell-Rezeptor binden (1.Signal) und werden aktiviert wenn kostimulatorische Moleküle exprimiert werden (2. Signal). Die Effektorwirkung erfolgt über die Sekretion lytischer Enzyme (z.B. Perforin) oder die Expression von Fas-Ligand (auch CD95L oder APO-1L, Apoptose-Induktion Fas-positiver Targetzellen).

Exogene Antigene werden in der Regel über den **MHC-Klasse-II** Weg prozessiert und CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert. Abweichend hiervon können DC exogene Antigene auch über den MHC-Klasse-I-Weg präsentieren [34]. Die Antigenaufnahme erfolgt dabei durch APC (DC, Monozyten/Makrophagen und B-Lymphozyten) über Pinozytose oder Oberflächen-Rezeptoren in endosomale Vesikel, die mit lysosomalen Vesikeln verschmelzen und späte endosomale Kompartimente bilden. Hier erfolgt bei saurem pH der lysosomale Abbau durch Proteasen (z.B. Cathepsin B und D) zu Peptiden mit einer Aminosäurenlänge von 10-25. Die späten Endosomen fusionieren mit Vesikeln welche die im Endoplasmatischen Retikulum (ER) zunächst als Dimere synthetisierten MHC-Klasse-II-Komplexe enthalten. Deren Antigenbindungsstelle ist durch eine so genannte invariante γ -Kette vor der Bindung endogener Peptide geschützt. Durch Abspaltung der γ -Kette im so genannten MHC-II-Beladungskompartiment wird die Affinitäts-vermittelte Bindung von Peptiden, in der MHC-Bindungsdomäne ermöglicht. Die Peptid-MHC-Klasse-II-Komplexe werden ebenfalls an die Zellmembran transportiert, wobei die Peptid-Bindung diese stabilisiert. Leere MHC-Komplexe ohne gebundenes Peptid werden dagegen rasch degradiert.

Die Interaktion mit einem spezifischen T-Zell-Rezeptor (1.Signal) führt nach Kostimulation (2. Signal) zur Aktivierung und Proliferation entsprechender CD4⁺-T-Zellen. Diese zusätzlichen

kostimulatorischen Signale werden über CD28-CD80/86- und CD40-CD40L-Interaktionen sowie über Adhäsionsmoleküle vermittelt [35]. Unter IL-12-Einfluß differenzieren sich CD4+ T-Helferzellen zu Th1-Zellen („T-Zell-Hilfe“ gegenüber CTL), wohingegen es unter IL-4-Einfluß zur Differenzierung zu Th2-Zellen kommt (Förderung der B-Zell Differenzierung und Aktivierung Eosinophiler Granulozyten).

2.5 Tumor-Vakzinierung

Ziel dieses Therapieansatzes ist die Induktion einer spezifischen Antwort durch zytotoxische T-Lymphozyten und Antikörper gegen geeignete Tumorzell-Epitope [36], [37], [38].

2.5.1 zelluläre Vakzine

2.5.1.1 Dendritische Zellen

DC als potenteste Antigenpräsentierende Zellen (APC) sind als zelluläre Vakzine besonders geeignet. [39], [40], [41]. Peptide von Proteinen endogenen und exogenen Ursprungs werden von DC über MHC-Klasse-I-Moleküle CD8+-zytotoxischen-T-Zellen und über MHC-Klasse-II-Moleküle CD4+-T-Zellen präsentiert [42], [43]. Um die Präsentation von Tumorantigenen durch Dendritische Zellen zu erreichen wurden verschiedene Strategien entwickelt:

1. Bestückung mit synthetischen oder natürlichen Tumorproteinen bzw. –peptiden. Nur bei kompletten Proteinen entfällt hierbei die Notwendigkeit, passende Tumorantigene eines Patienten und ihre Eignung für den jeweiligen HLA-Haplotyp zu bestimmen. Die Kombination verschiedener Proteine bzw. Peptide minimiert die Wahrscheinlichkeit eines "Immunescape" über Antigenverlust-Varianten [44], [45].
2. Transfektion Tumorantigen-kodierender DNA oder „nackter“ Tumor-RNA [46] mit bevorzugter Antigen-Präsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle. Vorteilhaft ist dabei die Kombinierbarkeit verschiedener Epitope, die Präsenz interner Adjuvantien (z.B. bakterielle CpG-Motive) in Transfektions-Vektoren [47], die Dauer und Stärke der Antigenpräsentation sowie die Möglichkeit sog. „universeller“ Vakzine für alle Patienten, ohne die Notwendigkeit einer vorherigen HLA-Typisierung. Hierfür bieten sich a) virale Vektoren [48], [49], [50], [51] sowie b) nicht-virale Vektoren [52], [53], [54], [55] an.

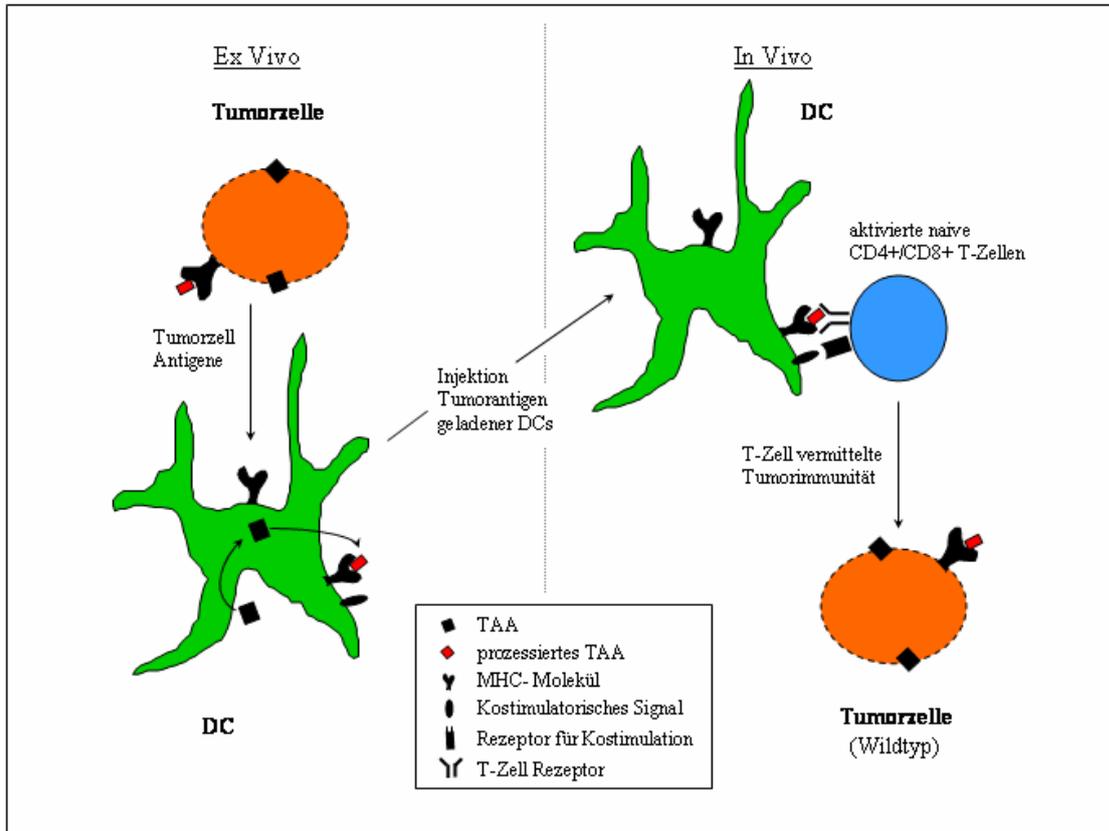


Abb. 2:

Prinzip einer DC-Vakzine (nach [56]). Tumorantigene (Protein/Peptid oder DNA/RNA) werden auf autologe DC übertragen, prozessiert und über MHC-Klasse-I bzw. Klasse-II Moleküle präsentiert. Antigen-beladene DC werden dem Patienten re-transfundiert und aktivieren naive CD4+/CD8+ T-Zellen. Eine T-Zell-vermittelte Immunantwort, insbesondere durch CD8+ CTL, führt in der Effektorphase zur Tumorzelllyse.

2.5.1.2 Tumorzell-Vakzine

Zur Induktion einer spezifischen T-Zell-Antwort werden Tumorzellen, die das MHC-Molekül meistens exprimieren, denen aber kostimulatorische Moleküle fehlen, genetisch verändert. Dazu werden 1) **kostimulatorische Moleküle**, vor allem der CD28-Ligand B7.1, in autologe Tumorzellen transfiziert [57], [58], [59], [60]. Zur lokalen Erhöhung der Konzentration 2) **Leukozyten-aktivierender Zytokine** wurden außerdem für diese kodierende Gene in autologe Tumorzellen transfiziert und als Vakzine verabreicht. Favorisierte Zytokine sind dabei z.B.: das proinflammatorische TNF-alpha [61], APC aktivierendes GM-CSF [25], der T-Zell Wachstumsfaktor IL-2 [62], der B-Zellen stimulierende Faktor IL-4 [59] und der Prä-B-Zell Wachstumsfaktor IL-7 [63], [60].

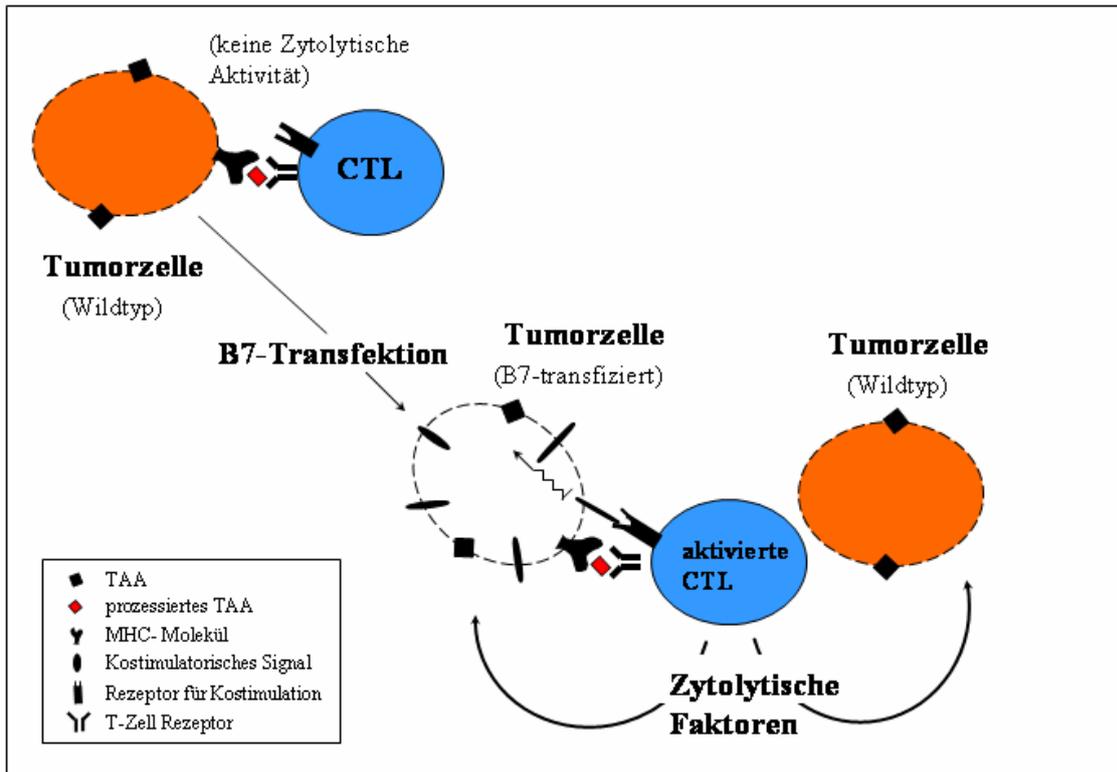


Abb. 3:

CD8+ T-Zellen-vermittelte Tumormunität, Tumorzellen als Antigen-präsentierende-Zellen, Transfektion kostimulatorischer Moleküle (nach [56]).

2.6 Dendritische Zellen

Vor ca. 130 Jahren wurden Dendritische Zellen zum ersten Mal als Langerhans-Zellen der Haut und 1973 von Steinman et al. als Subklasse von Milz-Zellen beschrieben [64], [65]. Die typische Morphologie dieser Zellen ist charakterisiert durch viele feine Zytoplasmafortsätze von über 10 nm Länge, welche außerdem die Fähigkeit zur aktiven Bewegung besitzen. Durch diese Zellmorphologie ist die Aufnahme von Antigenen und Präsentation gegenüber T-Zellen optimal möglich. Wegen der geringen Zelldichte von DC im peripheren Blut bzw. im Gewebe war es erschwert, ausreichende Zellzahlen zu generieren. Durch die Entwicklung von Methoden zur Gewinnung von Dendritischen Zellen aus CD34+ Knochenmarks-Vorläuferzellen [66] bzw. aus Monozyten [67], [68] wurde dieses Problem überwunden. Innerhalb der Antigen-präsentierenden-Zellen nehmen die DC eine Sonderrolle ein, da nur sie in der Lage sind, naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Bei der Induktion der T-Zell-vermittelten Immunreaktion kommt ihnen damit eine Schlüsselrolle zu [40], [69]. Funktionell unterscheidet man reife und unreife Dendritische Zellen [70].

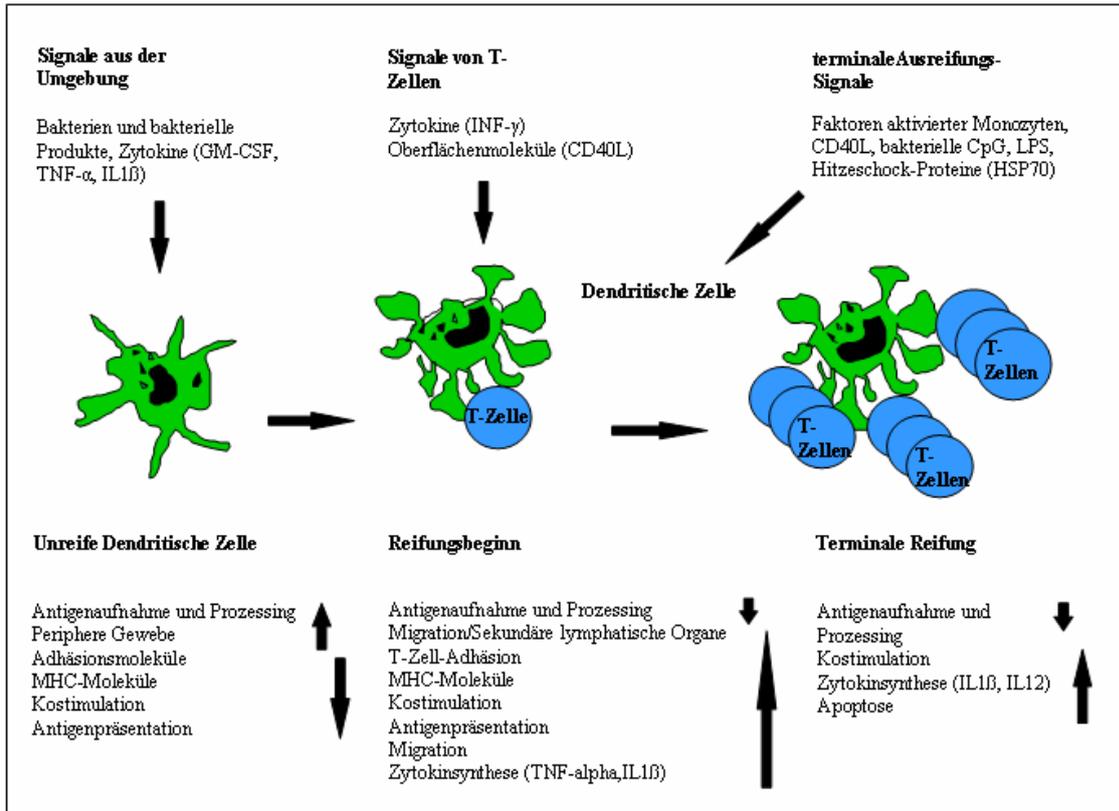


Abb. 4:

In vivo Reifung Dendritischer Zellen (nach [71]).

Unreife Dendritische Zellen werden insbesondere an inneren und äußeren Körperoberflächen sowie in parenchymatösen Organen gefunden, wo sie Antigene aufnehmen [72]. Dies erfolgt bei Partikeln und Mikroben über Phagozytose [73] und bei Flüssigkeiten sowie gelösten Partikeln über Makropinozytose [74]. Über Fc-Rezeptoren erfolgt die Aufnahme opsonisierter Antigene, über Lectin-Rezeptoren wie den Mannose-Rezeptor [75], [76] und den DEC-205 Rezeptor [77] die Aufnahme glykosylierter Antigene.

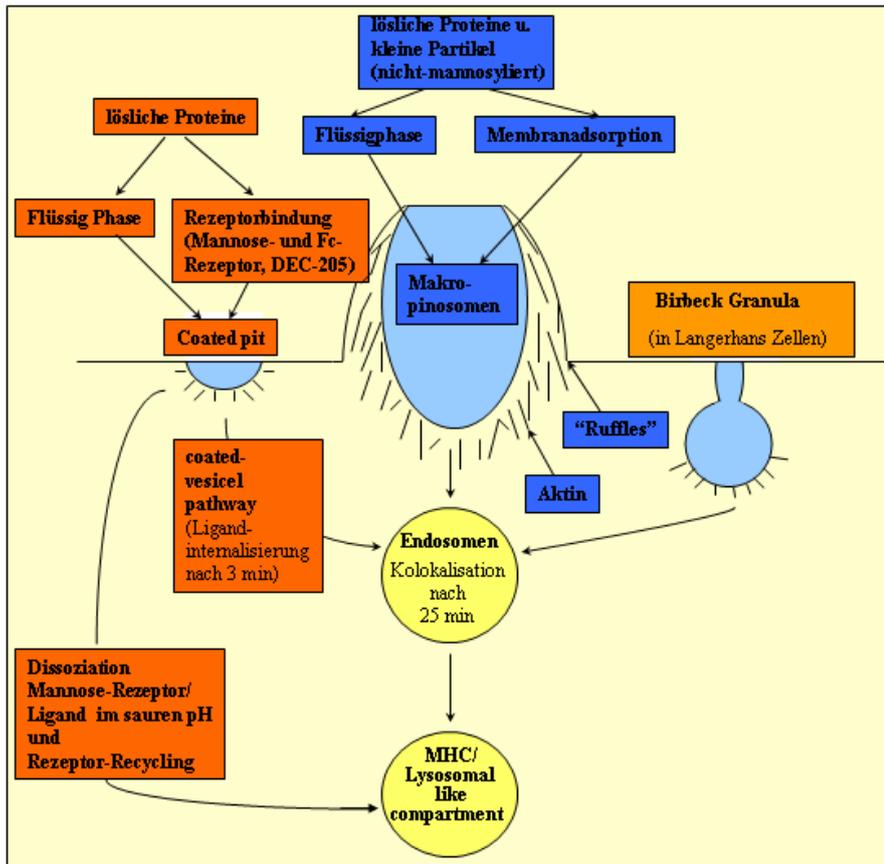


Abb. 5:
Antigenaufnahme unreifer Dendritischer Zellen (nach [74])

Unreife CD1a+ Dendritische Zellen zeigen eine geringe Expression von kostimulatorischen und Adhäsions-Molekülen (CD40, CD54, CD58, CD86 u.a.) sowie von MHC-Klasse-I und -II-Molekülen. Die Konzentration intrazellulärer MHC-Klasse-II-Moleküle ist dagegen hoch. Inflammatorische Signale in der Peripherie, z.B. Zytokine oder Erreger, stellen nach der Antigenaufnahme das Signal für die Ausreifung der Dendritischen Zellen dar. Über Liganden für die TNF-Rezeptorfamilie wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, der eine Vielzahl von Genen reguliert, die an der Modulation der Immunantwort beteiligt sind [78]. Solche Reifungs-Induktoren können bakterielle Lipopolysaccharide, komplette Erreger, Kontaktallergene und inflammatorische Zytokine (z.B. TNF-alpha und GM-CSF) sein, [79], [80], [25], [81]. Die aufgezählten Stimulatoren mobilisieren unreife Dendritische Zellen zur Migration in die T-Zell Zone lymphatischer Organe, wo sie den Reifungsprozeß beenden [79].

Die Fähigkeit zur Aufnahme und zum Prozessieren von Antigenen ist bei **reifen DC** reduziert, die Funktion der Antigenpräsentation und der Kostimulation hingegen optimiert [82]. Entsprechend werden Adhäsions- und kostimulatorische Moleküle (CD40, B7.1/CD80 und B7.2/CD86, ICAM-1/CD54, LFA-3/CD58) verstärkt exprimiert. Die DC-Marker CD83 [83] und p55/Fascin [84] sind positiv. Makrophagen-spezifische Marker (CD14, CD68, CD115) sind hingegen negativ oder werden nur schwach exprimiert.

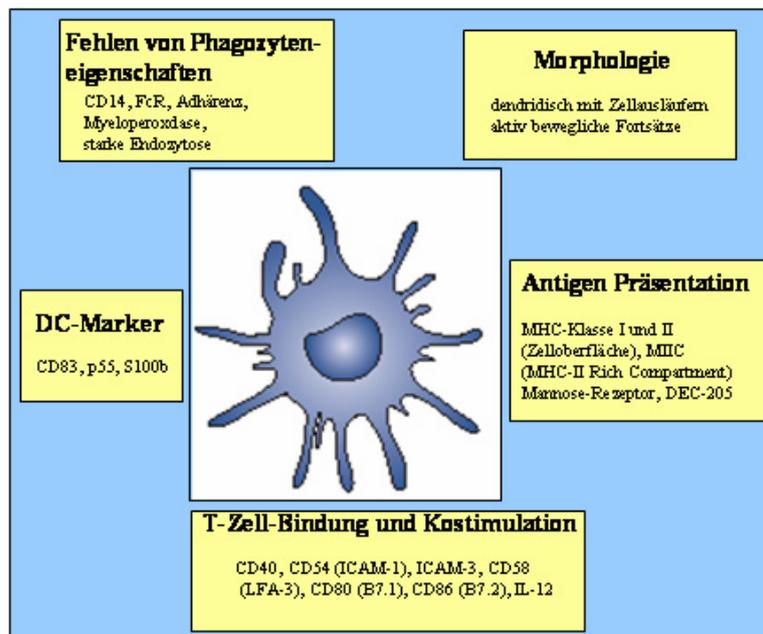


Abb. 6:

Eigenschaften reifer Dendritischer Zellen (nach [84])

Aufgenommene und endogene Antigene gelangen nach dem Prozessieren als Peptid-MHC-Klasse-II oder Peptid-MHC-Klasse-I-Molekül-Komplexe an die Zelloberfläche [85], deren Zahl bei Dendritischen Zellen 10-100fach größer ist als bei anderen Antigen-präsentierenden Zellen. Eine hohe Zahl von Oberflächen MHC-Klasse-II Molekülen ist charakteristisch für reife DC. Naive T-Lymphozyten können so trotz geringer Antigenmengen aktiviert werden [86]. Beim "priming" naiver T-Lymphozyten in den T-Zell-Zonen von lymphatischen Geweben kommt es zur typischen Clusterbildung zwischen Dendritischen und T-Zellen [87]. Eine Dendritische Zelle kann dabei zwischen 100 und 3000 naive T-Lymphozyten aktivieren. T-Helfer-Zellen sind dabei für eine effektive DC-initiierte T-Zell-Antwort essentiell, wie Experimente mit blockierenden Antikörpern gegen TH1-Zytokine zeigen konnten, [88], [87].

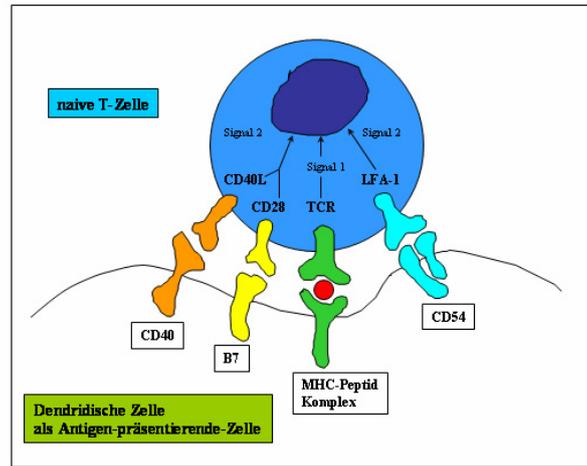


Abb. 7:

"Priming" einer naiven T-Zelle durch eine reife Dendritische Zelle (nach [43])

Darüber hinaus wurden verschiedene Subtypen von reifen DC in vitro beschrieben, wobei hauptsächlich zwischen DC1 und DC2 differenziert wird [89]. Die Übertragbarkeit auf in vivo vorkommende DC ist dabei jedoch noch nicht abschließend geklärt. Menschliche DC wurden in vitro aus verschiedenen Progenitorzellen generiert. Die frühesten Vorläuferzellen sind CD34+ hämatopoetische Stammzellen aus Knochenmarks- bzw. Nabelschnurblut. Diese Zellfraktion enthält so genannte „committed“ (engl., festgelegt) DC-Vorläuferzellen, die in der Lage sind, in speziellem Medium (halbfestes Medium, GM-CSF und TNF-alpha, Vorstimulierung mit c-Kit-Ligand) reine DC-Kolonien zu bilden [90]. Nach einer Kultivierung myeloischer CD34+ Vorläuferzellen in GM-CSF und TNF-alpha haltigem Medium lassen sich 2 unterschiedliche intermediäre Vorläuferzellen differenzieren die das „cutaneous lymphocyte-associated antigen“ (CLA, engl., Lymphozyten-assoziiertes Antigen der Haut) unterschiedlich exprimieren (CLA+, CD1a+, CD14-, TGF-beta abhängig und CLA-, CD1a, CD14+ Monozyten-ähnlich) [91], [92]. Unter TGF-beta Einfluß differenzieren sich aus CLA+ Vorläuferzellen Langerhans-Zell-ähnliche Zellen (CD1a+, CD14-), die entsprechend Birbeck Granula, Langerhans assoziierte Antigene (LAG), Langerin und E-Cadherin aufweisen [93]. Der zweite Differenzierungs-"pathway" (CLA- Vorläufer) führt zu interstitiellen DC ähnlichen Zellen (CD9+, CD68+, Gerinnungsfaktor XIIIa+). Diese interstitiellen DC ähnlichen Zellen weisen starke Homologien zu den aus Blut-Monozyten (pDC1) unter GM-CSF und IL-4 generierten und unter TNF-alpha ausgereiften DC1 auf [94], [95], [68]. Ein separater Weg differenziert DC aus lymphoiden CD34+ Vorläuferzellen. Die resultierenden intermediären plasmazytoiden DC (pDC2, CD4+, IL-3R+, CD11c-, linienspezifische Marker zumeist negativ) exprimieren keine myeloischen, jedoch teilweise lymphoide Marker [96], [97]. Nach Stimulation durch Erreger (Viren, Bakterien) produzieren sie Klasse-I INF (INF-alpha und -beta). Bei Nachweisbarkeit im Blut und im lymphatischen Gewebe ist der Eintritt in Lymphknoten L-Selectin abhängig. Durch in vitro Stimulierung (IL-3, CD154, bakterielle CpG, HSV) lassen sich die Vorläuferzellen (pDC2) in reife DC (DC2) mit niedrig exprimiertem CD11c und fehlenden myeloischen Markern differenzieren [98], [99].

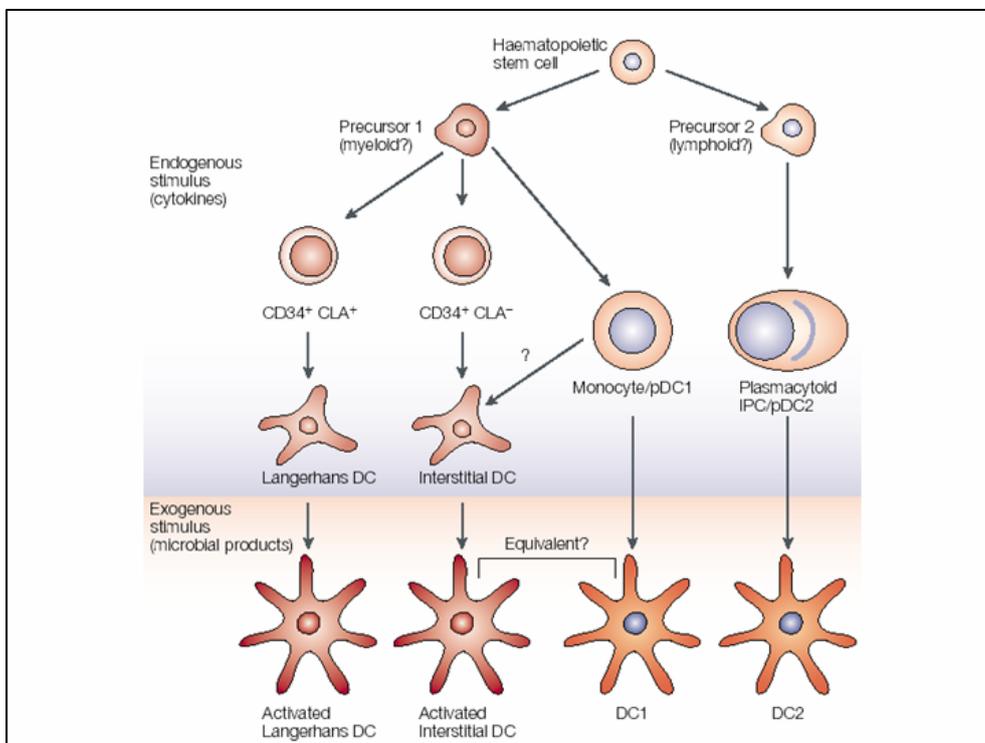


Abb. 8:

Differenzierung verschiedener DC-Subtypen aus hämatopoetischen CD34+ Vorläuferzellen zu DC1 bzw. Interstitiellen DC und Langerhans DC sowie zu DC2. CLA, „cutaneous lymphocyte-associated antigen“, (aus [89]).

Die funktionelle Spezialisierung reifer DC ist, durch eine ausgeprägte Plastizität, sehr komplex. Bedingungen der (vorausgegangenen) Differenzierung und die Art der Stimulation (Erreger, Zytokine) beeinflussen hierbei die Adaptationsfähigkeit [100], [101]. Unterschiedliche „Pattern Recognition“ Rezeptoren zwischen pDC1 und pDC2 sind z.B. Zeichen differenter biologischer Reaktionsmuster [102]. Plasmazytoide pDC2 reagieren z.B. bevorzugt auf CpG Oligonukleotide (TLR7, TLR9), wohingegen monozytäre pDC1 vor allem LPS und Peptidoglykane erkennen (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR8). Nach Ausreifung induzieren DC1 vorzugsweise eine Th1 (T Helfer 1 Zellen) Immunantwort, wohingegen DC2 eine Th2 (T Helfer 2 Zellen)-Immunantwort hervorrufen [103]. Inwieweit die funktionellen Unterschiede von DC wirklich durch Abstammung von unterschiedlichen Progenitorzellen bedingt sind oder ob es eher Unterschiede im „Micro-environment“ sind, welche zu funktioneller Differenzierung führen muss derzeit offen bleiben.

Bei der Anpassung des Gleichgewichtes zwischen „Abstoßung“ und Toleranz bzw. Anergie im Rahmen der adaptiven Immunabwehr ist die Anpassungsfähigkeit des DC-Systems essentiell [104]. Im nichtinfizierten Organismus präsentieren unreife DC bzw. pDC Autoantigene ohne Kostimulation, wenige reife DC befinden sich im Ruhestadium [105]. Beim Fehlen von „Gefahrensignalen“ wird somit gegenüber Autoantigenen durch T-Zell Inaktivierung (Deletion, Induktion regulatorischer T-Zellen) Toleranz bzw. Anergie induziert. Bei Infektion oder Entzündung (Gefahrensignale) wird die finale DC-Ausreifung (aus Vorläuferzellen) befördert sowie ein „Umschalten“ von DC vom Ruhe- in den aktivierten Zustand. Aktivierte DC werden zur Migration in die T-Zell Zonen lymphatischer Organe angeregt, wo es schließlich zur T-Zell-Aktivierung kommt.

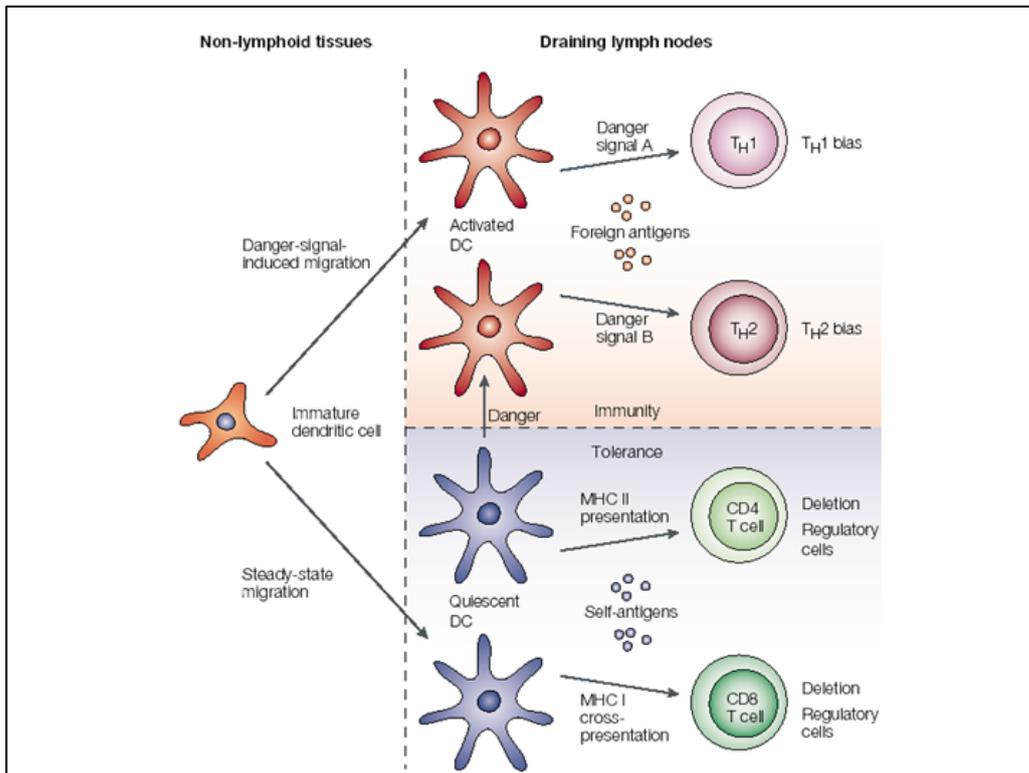


Abb. 9:

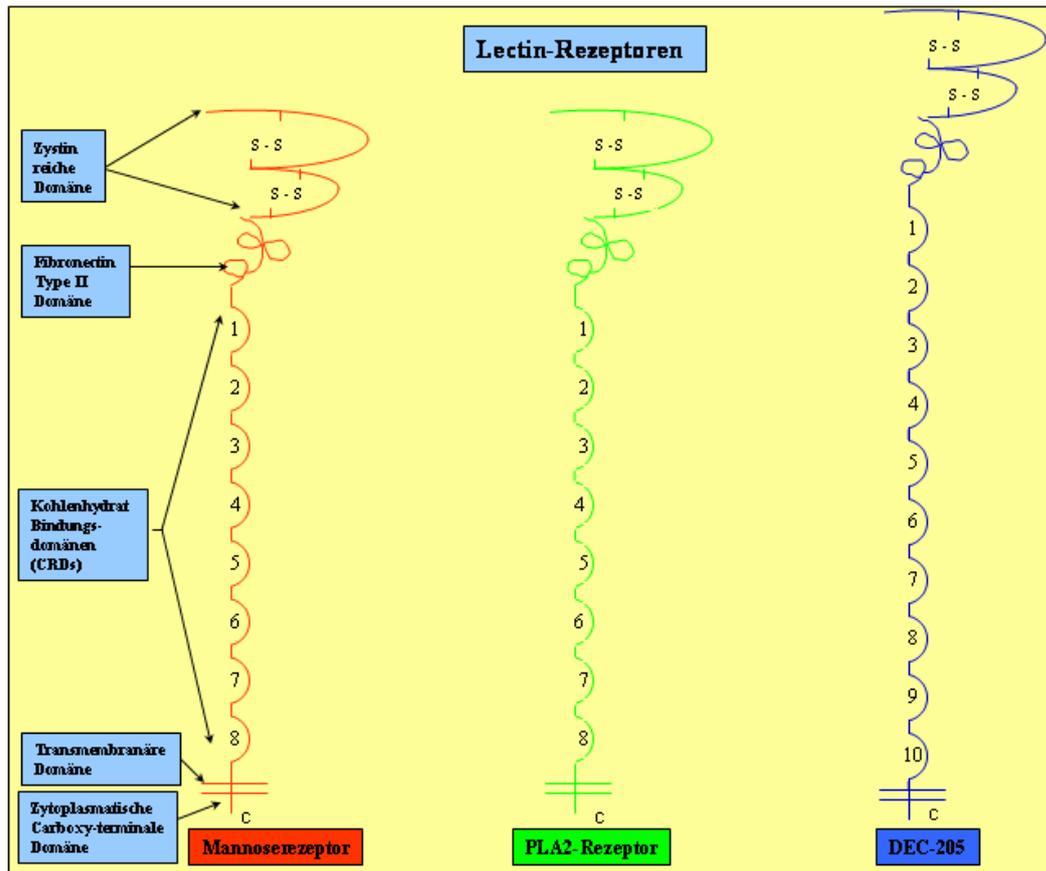
DC vermittelte Immunregulation. Beim Fehlen von Gefahrensignalen (Infektion, Entzündung) kommt es zum Eintritt ruhender (engl. quiescent) DC in lymphatische Gewebe. Durch sie wird eine periphere T-Zell Toleranz gegenüber Autoantigenen aufrechterhalten. Gefahrensignale (Infektion, Entzündung) führen zur Aktivierung von DC, welche verstärkt in lymphatische Gewebe einwandern und durch gemeinsame Präsentation von Antigenen mit Kostimulatoren, Fremdantigen-spezifische T-Zellen aktivieren und eine spezifische Immunantwort induzieren. TH1, T Helfer 1 Zellen; TH2, T Helfer 2 Zellen. (aus [89]).

Durch zwei Methoden ist es prinzipiell möglich DC in ausreichender Menge für Immuntherapie-Protokolle zu gewinnen:

1. Mittels Leukapherese und immunmagnetischer Anreicherung von **CD34+ Knochenmarks-Vorläuferzellen**, die unter GM-CSF und TNF-alpha zu reifen DC differenziert werden [106], [66].
2. Alternativ werden **CD14+ Monozyten** durch Leukapherese, Plastikadhärenz oder immunmagnetische Methoden aus dem peripheren Blut gewonnen und für 4-6 Tage unter IL-4 und GM-CSF zu unreifen myeloischen Dendritischen Zellen differenziert [67], [94]. Die finale Ausreifung erfolgt durch proinflammatorische Zytokine wie TNF-alpha [107], LPS oder „monocyte conditioned medium“ [68], [108] bzw. einem „Zytokincocktail“ aus TNF- alpha+IL-1 beta+IL-6+PGE-2(2) [109] für weitere 2-3 Tage. Bei Zytokinenzug sind voll ausgereifte DC stabil, d.h. es erfolgt keine Entdifferenzierung zu Monozyten oder Makrophagen [107].

2.7 Der Mannose-Rezeptor

Der Mannose-Rezeptor (MMR) wird auf Dendritischen Zellen exprimiert und gehört in eine Klasse von Kohlenhydrat-erkennenden Proteinstrukturen, sog. Lektinen [110], [111]. Zu dieser Gruppe gehören das Mannose-bindende-Protein, der hepatische Asialoglykoprotein-Rezeptor, der Phospholipase-A2-



Rezeptor, die Typ-C-Lektinfamilie und der DEC-205 Rezeptor auf Dendritischen Zellen [77], [112].

Abb. 10:

Familie von Multi-Lektin Rezeptoren, die strukturelle Gemeinsamkeiten aufweisen. Von links nach rechts: Mannose-Rezeptor, Phospholipase A2-Rezeptor; DEC-205-Rezeptor, die Zahlen 1-10 beziehen sich auf die CRDs (Carbohydrate Recognition Domain), S-S steht für Disulfidbindung in der Zystinreichen Domäne; nach [76].

Zuerst wurde der MMR auf Makrophagen beschrieben [113], konnte aber auch auf anderen Zelltypen, insbesondere unreifen Dendritischen Zellen [82], [110], nachgewiesen werden. Hier wurden $1,7 \times 10^6$ Bindungsstellen/Zelle für mannosyliertes BSA (Mann-BSA) ermittelt [110]. Das transmembranöse Rezeptorprotein hat ein Molekulargewicht von 175 kD [114] und besteht aus 5 Domänen. Diese sind eine zyttoplasmatische carboxyterminale Region, eine transmembranöse Region, eine Region aus 8 tandemartig angeordneten Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen (CRDs=Carbohydrate Recognition Domains) [115], [116], [117], der Fibronektin-Type-II-Repeat-Region und der zystinreichen

aminoterminalen Region [118]. Die letzten drei Regionen sind ontogenetisch hochkonservierte Proteinabschnitte (Homologien von 76-92% zwischen Maus und Mensch). Auf die funktionell entscheidenden Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen soll im Weiteren detaillierter eingegangen werden. Untereinander weisen die CRDs eine Homologie von 30% auf, wobei ihre Fähigkeit zur Antigen-Erkennung durch die Aminosäuren Glutaminsäure, Prolin und Asparagin definiert wird [119]. Die CRDs 4 und 5 wurden als die einzigen CRDs mit Bindungsstellen für Kohlenhydrat-Liganden und den essentiellen Kofaktor Kalzium beschrieben [120], [121]. Ein einzelnes CRD kann nur ein Monosaccharid-Molekül binden, was die CRD-Clusterbildung zur Bindung verzweigter und multivalenter Kohlenhydrat-Liganden erklärt. Gebunden werden Hexosen, die jeweils äquatoriale OH-Gruppen an C3 und C4 aufweisen. Solche hochaffinen Liganden sind alpha-D-Mannose, L-Fucose und N-Acetylglucosamin [122]. Stellt man eine Reihenfolge der Bindungsstärke zum Mannose-Rezeptor auf, so ergibt sich: verzweigt-kettige Oligosaccharide > lineare Oligosaccharide > Monosaccharide [123]. Außerdem werden sulfatierte und nicht-sulfatierte Glykoproteine [124], [125] gebunden. Auf der Zellmembran pathogener Erreger finden sich Oligosaccharide mit typischem Aufbau als „molekulares Erkennungsmuster“. Dass mannosylierte Antigene 100- bis 1000fach [126] besser durch APC aufgenommen und T-Zellen präsentiert werden, legt eine wichtige Funktion des Mannose-Rezeptors bei der Antigenaufnahme nahe [82], [72], [127].

Die Liganden des Mannose-Rezeptors können u.a. durch Mannan, Horseradish-Peroxidase, D-Mannan- bzw. L-Fucose-Albumin vom Rezeptor verdrängt werden [110]. Interferon-gamma (INF-gamma) bewirkt eine verminderte Expression des Mannose-Rezeptors und seiner endozytotischen Aktivität, verstärkt jedoch die Mannose-Rezeptor-vermittelte Phagozytose sowie die Fähigkeit der Zellen über diesen Rezeptor aufgenommene Erreger abzutöten [128], [129]. LPS (Lipopolysaccharide) und TNF-alpha reduzieren die Mannose-Rezeptor-Expression, deren endozytotischen Aktivität bei DC während des Reifungsprozesses abnimmt [82]. Auf der anderen Seite bewirken Dexamethason [130], IL-10 [131] und IL-13 [132] eine vermehrte Mannose-Rezeptor-Expression in DC. Proportional zur Syntheserate des MMR in DC ist der Anteil an löslichem Mannose-Rezeptor (sMR), der durch Proteolyse vom membrangebundenen Rezeptor (cMR) getrennt wird [133].

Für die Endozytose und die Signaltransduktion ist der intrazytoplasmatische und transmembranöse Rezeptormangel entscheidend [134]. Bei neutralem pH wird der Ligand gebunden und gelangt zusammen mit dem Rezeptor in frühe, in der Zellperipherie gelegene, endosomale Kompartments. Im sauren pH der Endosomen löst sich der Ligand vom Rezeptor. Dieser kehrt an die Zelloberfläche zurück, um erneut Liganden zu binden. Die Passage durch frühe Endosomen und das „Rezeptor-Recycling“ sind dabei typisch für eine adsorptive Endozytose. Durch Monensin läßt sich der Transfer des Liganden von den Endosomen zu den Lysosomen als auch das Rezyklieren des Rezeptors spezifisch blockieren. Die Eignung des Rezeptors als spezifisches Target für den Transfer bioaktiver Moleküle ins Zellinnere wurde von C.D. Muller erstmals untersucht [135]. Ein Gentransfer, [55], [54] bzw. ein Oligonucleotidtransfer [136] in Makrophagen, vermittelt über den Mannose-Rezeptor, wurden ebenfalls beschrieben.

Der mit dem Mannose-Rezeptor strukturverwandte **DEC-205-Rezeptor** wird ebenfalls auf DC exprimiert, insbesondere in T-Zell Zonen von lymphatischem Gewebe [137]. Auch er ist ein Rezeptor, der eine adsorptive Endozytose ermöglicht. Die bisher ungenügend charakterisierten natürlichen Liganden werden jedoch, anders als beim Mannose-Rezeptor, in „tiefe“ spätendosomale Vesikel befördert, die reich an MHC-Klasse-II Komplexen sind, den bereits erwähnten MHC-II reichen Kompartments.

2.8. Rezeptor-vermittelter Gentransfer

DC sind in der Lage, naiven T-Zellen äußerst effektiv Antigene in Form von Peptid-MHC-Komplexen zu präsentieren. Ein Gentransfer ist eine Möglichkeit, um DC effizient mit Tumorantigenen zu beladen. Ein Rezeptor-vermittelter Gentransfer, der Vektoren über die Endozytose des Rezeptor-Ligand-Komplexes ins Zytoplasma befördert, ermöglicht dabei ein spezifisches Targetting von Zielzellen. Diese Eigenschaft ist insbesondere für mögliche In-Vivo-Applikationen von Bedeutung. Da sich die vorliegende Arbeit mit dem In-vitro-Rezeptor-vermittelten-Gentransfer befaßt, sollen sich die weiteren Ausführungen in erster Linie darauf beschränken.

2.8.1 Überblick

Die für den **viralen Gentransfer** verwendeten Vektoren gehören im Wesentlichen zur Gruppe der Adeno-, Retro- und Herpesviren, die über entsprechende Rezeptoren ins Zytoplasma gelangen [138]. Vorteile dieser Methoden sind eine hohe Effizienz bezogen auf den Prozentsatz transfizierter Zellen, die Expressionsstärke der Transgene in den Einzelzellen sowie eine lange Expressionsdauer. Als mögliche Nachteile erweisen sich die Größenlimitierung der Transgene auf 6-8 Kilobasen [139] und die mögliche Induktion einer Immunreaktionen gegen Viruskomponenten in vivo. Risiken, welche insbesondere bei adenoviralen Vektoren der 1. Generation von Bedeutung sind, ergeben sich außerdem aus der Möglichkeit einer Wildtypkonversion ("recombination events"). In deren Folge könnten replikationskompetente pathogene Viren aus replikationsinkompetenten Viren entstehen [140]. Beim retroviralen Transfer ergeben sich zudem Risiken aus der Zufallsintegration viraler DNA ins Wirtsgenom im Sinne einer „Insertionsmutagenese“. Die Transfektion mittels retroviraler Vektoren ist schließlich auf mitotische Zellen beschränkt [141]. Beim viralen Gentransfer stellt sich das Problem, dass der Target-Rezeptor auf vielen Zelltypen exprimiert wird, aber damit gerade nicht spezifisch ist.

Die Methode des **nicht-viralen Rezeptor-vermittelten-Gentransfers** bietet durch Wahl eines geeigneten Rezeptor-Liganden-Paares die Möglichkeit, Zielzellen spezifisch zu transfizieren. Eine Integration ins Wirtsgenom ist extrem unwahrscheinlich, da die DNA episomal bleibt [142]. Die oben beschriebenen Transformationsereignisse sind größtenteils ausgeschlossen [143], [144]. Mit dieser Methode können auch ausdifferenzierte, teilungsunfähige Zellen, wie z.B. Neuronen, transfiziert werden [145]. Es lassen sich außerdem größere DNA-Moleküle oder auch verschiedene Plasmide mit mehreren Genen einschleusen. Die Transfektionssysteme sind meist nicht immunogen, zeigen jedoch

als Nachteil oft eine geringere Transfektionseffizienz. Das zeigt sich in einer geringeren Zahl transfizierter Zellen und in einem geringeren Level sowie einer kürzeren Dauer der Transgen-Expression. Durch Koexpression von Selektionsgenen, z.B. einem Resistenz-Gen gegenüber Geneticin (G418) lassen sich insbesondere aus Zell-Linien stabil transfizierte Zellklone generieren.

G.Y. Wu und C.H. Wu gelang zuerst ein Rezeptor-vermittelter nicht-viraler Gentransfer mittels eines Asialoorosomucoïd-Poly-L-Lysin-Konjugates in Asialoglykoprotein-Rezeptor positiven Hepatozyten [146]. Ferkol et al. sowie Erbacher et al. gelang ein Mannose-Rezeptor-vermittelter Gentransfer in Makrophagen, wobei mannosyliertes Polylysin als DNA-Träger benutzt wurde [55], [54]. Bei der Synthese nicht-viraler Vektoren müssen für In-vitro-Applikationen folgende Anforderungen berücksichtigt werden:

1. Die Transfektionskomplexe müssen die DNA in kleine Partikel kondensieren können. Durch die Größe der endosomalen Vesikel (100 nm) bzw. der Kernporen sind Größenlimitierungen gegeben [147], [148]. Die Zielzellen müssen spezifisch und in ausreichender Menge vom Komplex erreichbar sein. Dies wird durch die Verknüpfung mit Liganden ausgewählter Rezeptoren erreicht. Die Komplexe müssen außerdem über die Zellmembran ins Zytoplasma aufgenommen werden können (Endozytose, Pinozytose), wozu sie an diese binden oder an ihr aggregieren und akkumulieren. Hierbei sind spezifische Bindungen an einen Rezeptor oder auch unspezifische Aggregationen an der negativ geladenen Zelloberfläche möglich.
2. Während des Transits ins Zytoplasma bzw. den Zellkern muss der Komplex stabil bleiben. Vor Degradierung, insbesondere durch lysosomale Nukleasen, muss die DNA geschützt sein [149].
3. Die Transfektionskomplexe müssen die Fähigkeit zum Austritt aus den lysosomalen Vesikeln („lysosomaler Escape“) besitzen, damit die DNA ins Zytoplasma freigesetzt wird [150]. Geschieht das nicht, wird die Plasmid-DNA durch lysosomale Nukleasen degradiert und erhält nicht die Möglichkeit, ins Kernkompartiment zu gelangen, in welchem schließlich die Translation erfolgt.
4. Der Komplex benötigt darüber hinaus ein „nuclear localisation signal“ (NLS), um den Übertritt einer ausreichenden Zahl von DNA-Molekülen durch die Kernmembran in das Kernkompartiment zu gewährleisten [147]. Der Komplex soll zudem nicht-immunogen, nicht-toxisch bzw. nicht-Apoptose-induzierend sowie möglichst verstoffwechselbar sein.
5. Das Plasmide sollte episomal verbleiben und die Fähigkeit zur Replikation enthalten, z.B. durch entsprechende Mutanten des Simian Virus (SV40) „large T-antigen“. Des Weiteren ist ein starker Promotor, möglichst mit Gewebespezifität, anzustreben [142].

Im Hinblick auf eine mögliche In-Vivo-Applikation muss berücksichtigt werden, dass oberhalb einer kritischen Größe des Vektor-Konstruktes der Kapillarquerschnitt und die endothelialen Poren ein Hindernis darstellen können. Hierbei kommt es nach Überschreitung eines Größenlimits zur unspezifischen Aufnahme des Vektors durch Makrophagen. Außerdem sind eine mögliche Aggregation und Inaktivierung durch Serumbestandteile (Komplement, Antikörper bzw. lösliche Rezeptoren) zu bedenken.

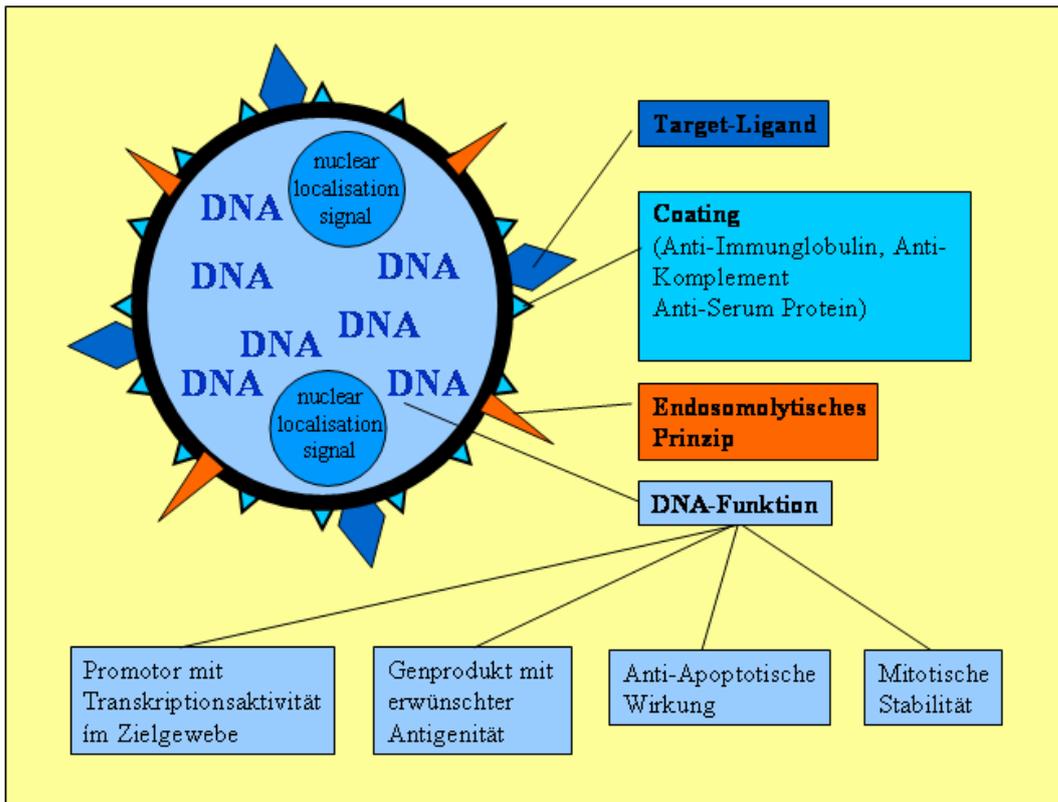


Abb. 11:

Wichtige Eigenschaften eines optimalen synthetischen Komplexes für einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer

2.8.2 Trägermoleküle

Als „Carrier“-Moleküle werden vor allem kationische Lipide und Polymere verwendet. Kationische **Lipid-Carrier** sind amphotere makromolekulare Verbindungen, die in der Lage sind, anionische Plasmid-DNA elektrostatisch zu binden und Mizellen zu bilden. In diesen ist die DNA kondensiert und vor Nukleasen geschützt. Beispiele sind Transfectam[®] (DOGS=Diocetadeacetyl-amino-glycylspermine) und Lipofectin[®] (DOTMA+DOPE=N-(1-2,3-Dioleoyloxy)propyl)-n,n,n-Trimethylammonium-Chloride assoziiert mit Dioleoyl-Phosphatidylethanolamine) [151], [152]. Von den kationischen Lipiden werden mit DNA-Molekülen so genannte Liposomen gebildet, die eine unspezifische Überquerung der Zellmembran und einen lysosomalen Escape ermöglichen. Mögliche Probleme der In-Vivo-Applikation des liposomalen Gentransfers sind unter anderem die mögliche Komplementaktivierung, die Toxizität und der Leber- bzw. Lungentropismus [143], [153], [154].

Die für den Gentransfer benutzten **Polymere** sind eine heterogene Gruppe von natürlichen oder künstlichen Verbindungen, die ebenfalls in der Lage sind, DNA-Moleküle zu aggregieren bzw. zu

kondensieren. Sie sind meist kationisch, z.T. aber auch elektrisch neutral. Polyvinylpyrrolidon und Polyvinylalkohol sind Beispiele für neutrale Polymere, die über Wasserstoffbrücken Bindungen mit DNA-Molekülen eingehen [155]. Zu den wichtigen kationischen Polymeren gehören Poly-L-Lysin [146], Polyamidoamin-Dendrimer [156], Bisacridine [157], Polyethylenimin (PEI) [158], das Polyvinylderivat Polybrene [159] und das Chinin-Derivat Chitosan [160]. PEI gilt wegen seiner endosomolytischen Potenz, wahrscheinlich aufgrund seiner außerordentlichen Pufferkapazität („Protonenschwamm“), und wegen seines Kerntropismus (gewisse NLS-Aktivität) als besonders geeignet für den nichtviralen Gentransfer [161], [162]. **Natürliche Polykationen**, die zum Gentransfer benutzt wurden sind Histone [163], Spermine und Spermidine [164] sowie das chromosomale HMG1-Protein (HMG=high motility group) [165].

2.8.3 Kondensation

Die Bildung des DNA/Polymer-Komplexes ist von Eigenschaften beider Reaktionspartner und von Rahmenbedingungen, vor allem der Salzkonzentration abhängig [166]. Die Länge des Polymers und seine Sekundärstruktur bestimmen dabei das Kondensationsverhalten [167] genauso wie die DNA-Länge [168] und ihre Basenzusammensetzung [169]. Die DNA/Polymerbindung ist allgemein durch Protein-Liganden destabilisierbar, da diese insbesondere durch Änderungen von Ladungseigenschaften sterische Veränderungen bewirken. Die Verhältnisse sind hierbei vergleichbar mit der DNA/Histon-Bindung im Chromatin, die dynamische Strukturveränderungen der genomischen DNA regulieren [170], [170]. Elektrostatische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken sind für die DNA-Bindung in diesem Zusammenhang hauptverantwortlich.

Die kationischen Trägermoleküle führen zu teilweiser oder vollständiger Neutralisierung der negativen Phosphat-Reste der DNA sowie zur Präzipitation und Kondensation der Makromoleküle auf eine Größe von 10-100 nm. Bei Neutralisierung aller negativen Phosphat-Reste der DNA entstehen Strukturen mit optimaler Stabilität [144]. Ziel ist die Bildung kleiner Komplexe, um die genannten Größenlimits einzuhalten. Dazu werden die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass die einzelnen DNA-Moleküle Kondensationskerne für die Trägermoleküle bilden. Damit können Komplexe von bis zu 10-12 nm Durchmesser synthetisiert werden [171].

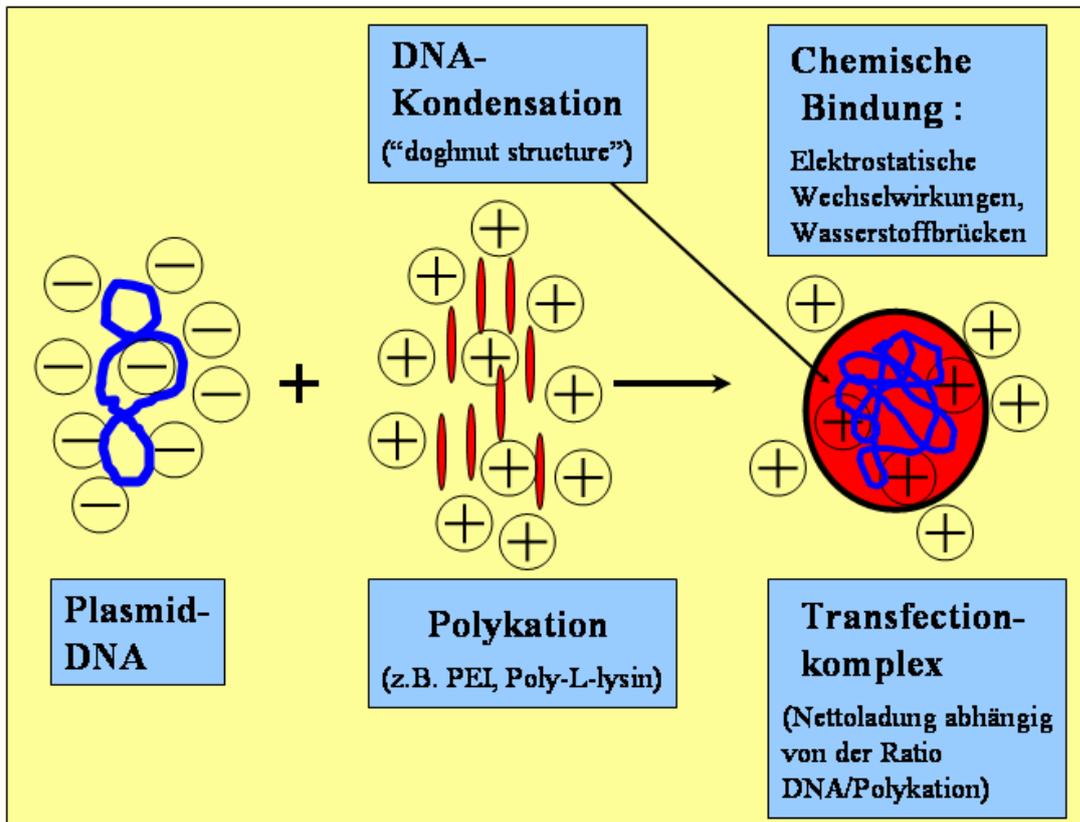


Abb. 12:

Schema der Kondensation von Plasmid-DNA durch ein kationisches Polymer

2.8.4 Liganden

Es besteht die Möglichkeit, Liganden für Rezeptoren auf jeweiligen Zielzellen an verschiedene DNA-Carriermoleküle kovalent zu binden. Solche Liganden können Antikörper gegen extrazelluläre Rezeptor-Epitope sein, die gebunden und internalisiert werden. In Organismen vorkommende Makromoleküle oder Proteine mit guter Affinität zum Zielrezeptor stellen natürliche Liganden dar. Minimale Liganden enthalten schließlich nur das entscheidende strukturelle Motiv für die Rezeptor-Interaktion, z.B. eine Zuckerstruktur.

Durch die Ligand-Rezeptor Bindung wird die Endozytose des Komplexes durch Invagination der Zellmembran initiiert. Diese Aufnahme erfolgt über „coated pits“, Einstülpungen der Zellmembran, die durch Clathrin-Moleküle in der sich bildenden Vesikelwand gekennzeichnet sind. Im weiteren Schicksal des Ligand-Rezeptor Komplexes unterscheidet man einen nicht-degradierenden von einem degradierenden Weg. Beim degradierenden Weg gelangt der Komplex in ein endolysosomales Kompartiment. Um hier einer Zerstörung durch endosomale Enzyme, insbesondere Proteasen und Nukleasen zu entgehen, bedarf es hierbei des oben bereits erwähnten „Escape“-Mechanismus.

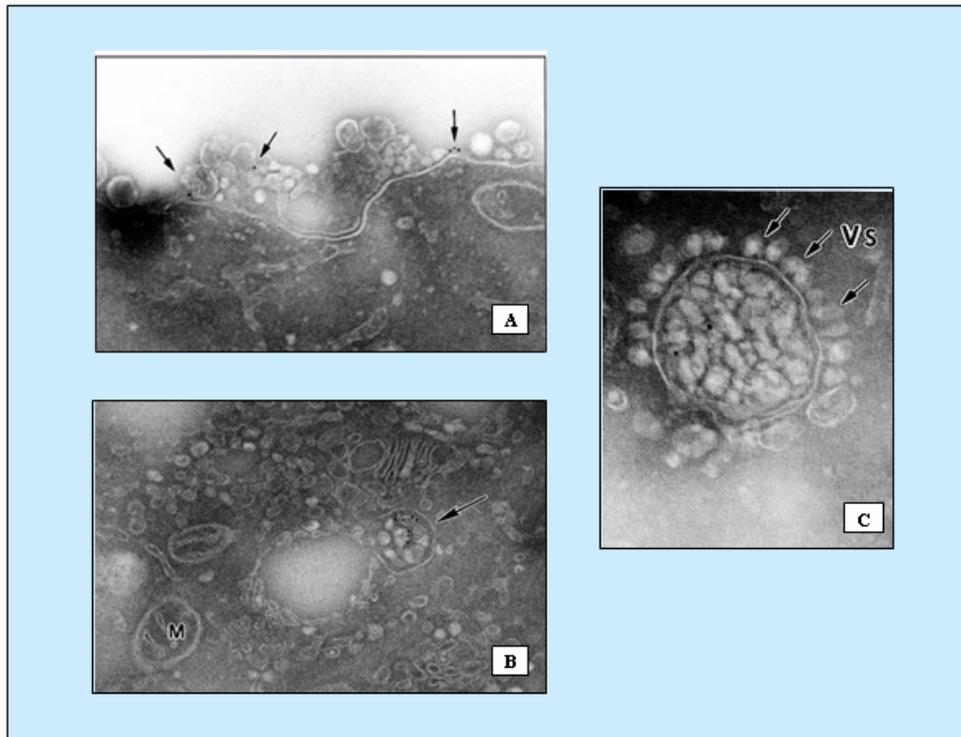


Abb. 13:

Beispiel einer Rezeptor-vermittelten Endozytose: B-Lymphozyten-Zelllinie „Raji“ und CD19-Rezeptor /CD19-Ligand (Goldpartikel markierter muriner CD19-Antikörper). Initialphasen der Rezeptor/Ligand-Interaktion - (A) Rezeptor-Ligand Bindung, (B) Endosomenlokalisierung, (C) Budding. Durchführung der Elektronenmikroskopie durch Dr. Vogel, Max-Delbrück-Zentrum Berlin-Buch.

2.8.5 Lysosomaler Escape

Endosomolytische und Fusogene Proteine ermöglichen es intrazellulären Erregern, insbesondere Viren, der lysosomalen Degradation zu entgehen [172]. Bei Adenoviren führt der pH-Abfall in den späten Endosomen zur Konformationsänderung von Kapsidproteinen (Penton-Base-Proteinen). Deren hydrophobe Domäne kann mit der endosomalen Vesikelwand interagieren und diese unterbrechen [173], [174], [175]. Bei Viren mit Envelope führen pH-induzierte Konformationsänderungen der Fusionsproteine auf der Virusoberfläche zur Verschmelzung der endosomalen mit der viralen Oberfläche. Beispiele sind das Influenzavirus-Hämagglutinin Subunit HA-2 [176] und das Fusions(F)-Protein des Respiratory Syncytial Virus [177]. Sowohl Psoralen-inaktivierte Adenoviren (blockierte RNA-Synthese bei intakter Kapsidstruktur) [161] als auch Fusionsproteine, d.h. virale Subkomponenten, wurden als endosomolytische Agentien in Gentransferkomplexe integriert. Eine Weiterführung dieses Ansatzes ist die Verwendung synthetischer Peptide, die funktionell entscheidende Abschnitte der genannten viralen Proteine, z.B. des Influenza-Hämagglutinins [178],

[176] enthalten. Synthetische Peptide dieser Art sind z.B. das kationische und amphotere KALA-Peptid [179].

Ein Escape ist auch durch nicht-virale lysosomolytische Substanzen wie Chloroquin und Monensin erreichbar. Chloroquin wirkt dabei über die Blockade der lysosomalen Protonen-ATPase und verhindert damit das Reaktionsoptimum der lysosomalen Enzyme. Es akkumuliert in Endosomen und führt zu deren Anschwellung und ggfs. Ruptur [180]. Monensin ist ein Protonen/Sodium-Ionophor und wirkt ebenfalls über den lysosomalen pH [181]. Bestimmte Polymere, die zur Kondensierung der Plasmid-DNA verwendet werden, können als so genannter „Protonenschwamm“ fungieren. Das heißt, sie haben bei neutralem pH viele protonierbare Gruppen und können eine Absenkung des pH zur Erreichung des lysosomalen Enzymoptimums verhindern oder verzögern. Im Verlauf kommt es zum Anschwellen des Endosomen und zu dessen Ruptur mit anschließender zytoplasmatischer Freisetzung des Transfektionskomplexes. Polyethylenimin ist beispielhaft dafür [158].

2.8.6 Kernlokalisierung und Transgen-Expression

Die zytoplasmatische Freisetzung des Transfektionskomplexes alleine ist für einen effizienten Gentransfer nicht ausreichend. Eine ausreichende Zahl von Transgen-tragenden Plasmiden muss in den Zellkern bzw. ins richtige Kernkompartiment gelangen [147]. Moleküle unter einem Größenlimit von ca. 40nm können sich frei zwischen Kern und Zytosol bewegen. Für Moleküle >40 kD ist der Zutritt zum Kernkompartiment hochselektiv und an "nuclear localisation signals" (NLS) gebunden, kurze Aminosäureabschnitte mit einem Lysinanteil von ca. 50% [182]. Zur nukleären Translokation adhären NLS-tragende Proteine an einen NLS-bindenden Rezeptorkomplex, der im beladenen Zustand in den Bereich eines Kernporen-Komplexes (engl., nuclear pore complex, NPC) gelangt. In einem zweiten, energieabhängigen Schritt wird das NLS-tragende Protein durch diese Pore befördert [183]. Chromosomale Proteine (z.B. Histone) und Viren (z.B. Simian Virus 40 oder HIV-1 Virus) weisen auch ein NLS auf. Durch solch ein NLS (Lys-Lys-Lys-Tyr-Lys-Leu-Lys) ist HIV-1 z.B. in der Lage, sich in nicht replizierenden Zellen mit intakter Kernmembran zu vermehren. Durch Punktmutationen im NLS-Gen mit Funktionsverlust verliert das HIV-1-Virus diese Eigenschaft und ist nur noch in mitotischen Zellen zur intrazellulären Virusreplikation fähig (die Barriere der Kernmembran entfällt während der Zellteilung) [162].

Ein anderer Mechanismus für den nukleären Import von Glykoproteinen bzw. Neoglykoproteinen (alpha-L-Fucosid, alpha-L-Mannosid und alpha-L-Galaktosid substituierte Glykoproteine) wurde kürzlich beschrieben. Wie beim klassischen NLS-Mechanismus findet hier eine Bindung an die Kernmembran über Lektinrezeptoren statt, woraufhin sich eine energieabhängige Passage durch die Kernporen anschließt [184]. Prä-messenger-RNA bindende Proteine, so genannte Ribonukleoproteine (hnRNP-Proteine), die Transportfunktionen zwischen Nukleo- und Zytoplasma erfüllen und die Kernmembran von beiden Seiten passieren, enthalten ebenfalls kein klassisches Peptid-NLS. Lektin-

tragende hnRNP-Proteine ermöglichen ebenfalls den Kerneintritt zytoplasmatischer Glykoproteine [185].

Da die in Gentransfer-Protokollen verwendeten Plasmid/Carrier-Komplexe in der Regel größer als 40nm sind, ist die Integration funktioneller Einheiten zur Kernlokalisierung für einen effizienten Gentransfer essentiell. NLS-haltige Proteine oder Peptide, wie z.B. das SV40-NLS-Peptid, wurden mit Transfektionskomplexen zur Effizienzsteigerung verknüpft [186]. Nach dem Kerneintritt verbleibt ein Großteil der DNA extrachromosomal bzw. episomal [144]. Die genauen Umstände der Transkription des Transgens sind bisher noch nicht völlig geklärt.

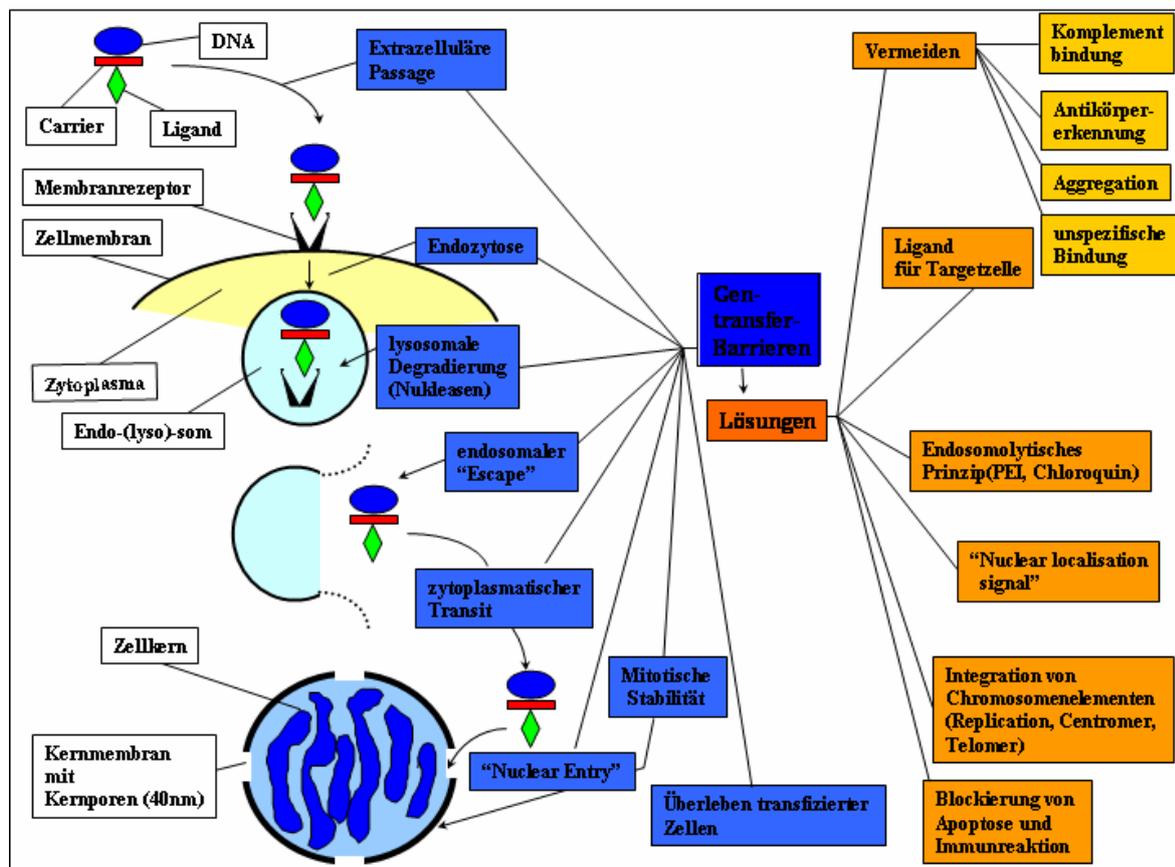


Abb. 14:
Barrieren eines Rezeptor-vermittelten Gentransfers

3.0 Fragestellung und Versuchsaufbau

Ziel:

Etablierung eines Mannose-Rezeptor vermittelten Gentransfersystems zur gezielten Transfektion von Dendritischen Zellen (DC) *in vitro*, als Vorstufe für *In-Vivo*-Experimente.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Eignung des Mannose-Rezeptors (MMR) als Target für einen rezeptor-spezifischen nichtviralen Gentransfer in DC untersucht. Unreife DC weisen eine starke Expression des MMR auf, der sich durch eine starke endozytotische Aktivität auszeichnet [82]. Als Modellsystem wurde zunächst eine MMR-transgene Zell-Linie, die Ratten-Fibroblasten-Zelllinie MMR61 benutzt, anschließend erfolgte die Übertragung des Transfektionssystems auf humane DC.

Fragestellungen:

1. Sind Mannose-Rezeptor exprimierende Zellen, wie die MMR61-Zellen, über den MMR transfizierbar?
2. Welches kationische Polymer ist für *In-vitro*-Transfektionen geeignet?
3. Welches sind die optimalen Transfektionsbedingungen?
4. Läßt sich das an MMR61-Zellen etablierte System auf humane Dendritische Zellen übertragen?

Versuchsaufbau:

Als DNA-Carrier wurden die kationischen Polymere Poly-L-Lysin und Polyethylenimin ausgewählt.

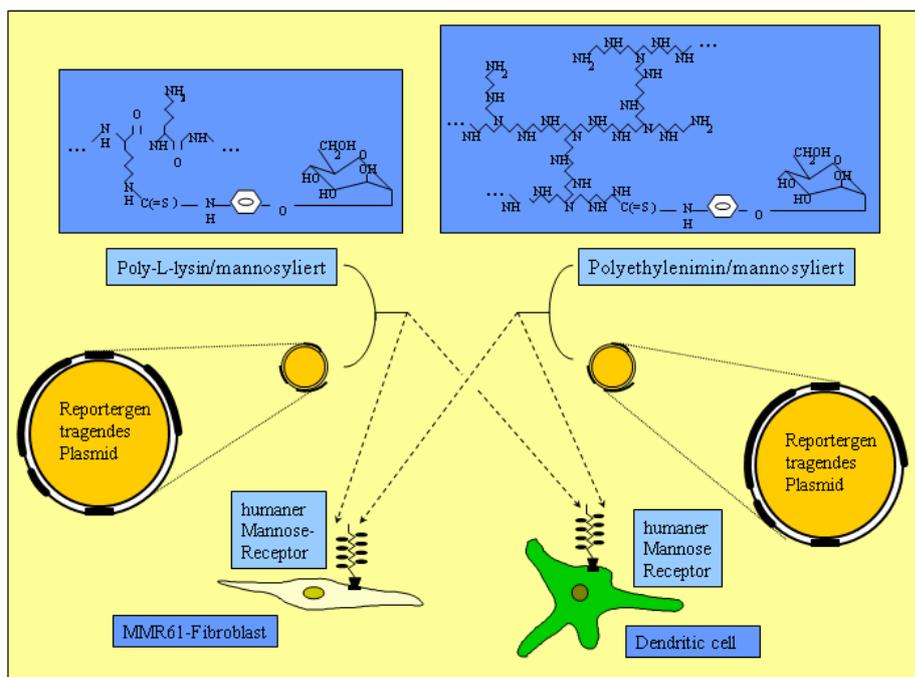


Abb. 15:
Versuchsaufbau: mannosylierte polykationische DNA-Carrier Poly-L-Lysin und Polyethylenimin, Kondensation von Plasmid-DNA, Transfektion von MMR61-Fibroblasten und Dendritischen Zellen.

4.0 Materialien und Methoden

4.1 Puffer

1. PBS (engl., Phosphate buffered saline)

Ansatz pro 1,0 l Aqua bidest.:

- 8,0 g Natriumchlorid (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 0,2 g Kaliumchlorid (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 0,2 g Kaliumhydrogenphosphat (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 2,85 g Dinatriumhydrogenphosphat (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- pH-Einstellung auf 7,2 und Autoklavieren

2. Erythrozytenlysepuffer-ACT-Puffer (Ammoniumchlorid Tris)

Ansatz pro 0,5 l Aqua bidest.:

- 4,15 g Ammoniumchlorid (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 0,5 g Natriumcarbonat (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 0,2 g EDTA (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- pH-Einstellung auf 7,2 und Sterilfiltration

3. Lysepuffer für Luciferaseassay

Ansatz für 100 ml Lysepuffer:

- 100 µl 1M DTT (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 0,2 ml Triton X-100 (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 0,92 ml 1M Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 9,08 ml 1M Kaliumhydrogenphosphat
- 90 ml Aqua dest.

4. Reaktionspuffer für Luciferaseassay

für 1 ml Reaktionspuffer:

- 0,25 ml 0,1M Kaliumhydrogenphosphat (pH 7,8)
- 10 µl 0,2M EDTA(pH 8,0)
- 15 µl 1M Magnesiumsulfat (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 1 µl 1M DTT

- 10 µl 100 mM ATP (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 714 µl Aqua dest.

5. TBE-Puffer

Ansatz pro 1,0 l Aqua bidest.:

- 9 g Tris-Base (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 5,5 g Borsäure (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 4 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- pH-Einstellung auf 8,2

6. FACS-Blockpuffer

- 10%iges Immunglobulin G aus Humanserum in PBS (©Fluka Chemie AG, CH-9471 Buchs, Schweiz)

4.2 Zellkulturmedien

1. MMR61-Fibroblasten:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL®, Eggenstein, D-76131 Karlsruhe, Deutschland)
- 10% hitzeinaktiviertes und sterilfiltriertes fetales Kälberserum FCS (engl., Fetal Calf Serum) (Gibco BRL®, D-76131 Karlsruhe, Deutschland)
- 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 200 µg/ml G418 (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)

2. Rat6-Fibroblasten:

- Es wurde dasselbe Medium wie für MMR61-Zellen ohne G418 Zusatz verwendet.

3. Standard-Kulturmedium:

- für 500 ml RPMI 1640 Medium (Gibco BRL®, D-76131 Karlsruhe, Deutschland)
- 4 mM L-Glutamin (Gibco BRL®, D-76131 Karlsruhe, Deutschland)
- 100 U/ml Penicillin/Streptomycin
- 172,5 µl 2-Mercaptoethanol 99% (Roth AG®, Karlsruhe, Deutschland)
- 5 ml 100 mM Natriumpyruvat (Sigma®, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 10% hitzeinaktiviertes und sterilfiltriertes Fetales Kälber Serum (FCS)

4. Dendritische Zellen:

- Standard-Kulturmedium (siehe oben)
- 100 ng/ml Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) (engl., Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor) (zur Verfügung gestellt von Sandoz, Nürnberg/Essex Pharma, München, Deutschland)
- 1000 U/ml Interleukin-4 (IL-4) (zur Verfügung gestellt von Schering Plough Research Institute, Kenilworth, N. J., USA)

5. Escherichia coli DH5 α (transformiert):

LB-Medium (Luria Bertani):

- 10 g Trypton (Difco Laboratories, Detroit MI 48232-7058 USA)
- 5g Yeast Extrakt (Difco Laboratories, Detroit MI 48232-7058 USA)
- 10 g Natriumchlorid
- 1000 ml Aqua dest.
- pH-Einstellung: 7,5 und Autoklavieren
- 1000 U/ml Ampicillin (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)

6. Einfriermedium:

- 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merk KG, D-64293 Darmstadt, Deutschland) in hitzeinaktiviertem und sterilfiltriertem FCS

4.3 Biologisches Material

1. Zelllinien:

- MMR61-Fibroblasten
- Rat6-Fibroblasten

(jeweils freundlich zur Verfügung gestellt von von Dr. M.E. Taylor, University of Oxford, Department of Biochemistry, Oxford, UK)

2. Primäre Zellen:

- Dendritische Zellen

(Präparation aus Buffy Coats, freundlich zur Verfügung gestellt von der Blutbank der Charité, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie und Onkologie, Campus Virchow Klinikum, Med. Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin)

3. Plasmidvektoren:

- Luciferase-Expressions-Vektor: pCluc4

(mit dem Luciferasegen unter der Kontrolle des humanen CMV-Promotors, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. M. Zenke, Max-Delbrück-Zentrum, Berlin-Buch)

- GFP-Expressions-Vektor: pBS-kRSPA-GFP

(mit dem „green fluorescent protein“ Gen unter der Kontrolle des RSV-LTR (Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat) Promotors, freundlich zur Verfügung gestellt von Prof. Ch. Hagemeyer, Institut für Pädiatrische Molekularbiologie, Universitätsklinikum Charité der Humboldt-Universität zu Berlin)

4.4 Antikörper

Für FACS-Analysen wurden, wenn nicht anders angegeben, Maus-anti-humane, monoklonale Antikörper verwendet:

- α CD1a-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α CD3-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α CD4-FITC (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α CD14-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α CD19-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α CD80-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α CD83-PE (Immunotech, Hamburg, Deutschland)
- α CD86-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α HLA-DR-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- α Human Mannose Receptor-PE (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)
- entsprechende Isotyp Kontrollen (BD Biosciences, D-69126 Heidelberg, Deutschland)

4.5 Sonstige Materialien

- DNA-Präparations Kits: Maxi und Midi (Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland)
- Ficoll-Gradient: Ficoll Separating Solution (Seromed, Berlin, Deutschland, Ficoll Dichte: 1,077)
- Poly-L-Lysin Hydrobromid (MW 30000-50000, Polymerisationsgrad: 230-390) (Bachem Biochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Polyethylenimin 800 kD (Polymerisationsgrad: 18600, MW: 80000, MW-Monomer: 43, Amino-Gruppen/Polymer: 18600), (©Fluka Chemie AG, CH-9471 Buchs, Schweiz)
- Polyethylenimin 50 kD (©Fluka Chemie AG, CH-9471 Buchs, Schweiz)

- α -D-Mannopyranosyl-Phenylisothiocyanat (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- 10%ige p-Toluen-Schweflige-Säure (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- alpha-D-Mannose (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- BSA (Bovines Serum Albumin) (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- Diisopropylethylamine (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- Slide-A-Lyser™ Dialysis Cassette, 10,000 MW cutoff Membran (Pierce™ a Perstorp Biotec Company, USA)
- Trypanblau (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- Ethidiumbromid (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- Agarose (Gibco BRL®, D-76131 Karlsruhe, Deutschland)
- Propidiumjodid (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- Loadingbuffer (Gibco BRL®, D-76131 Karlsruhe, Deutschland)
- Bredford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80901 München, Deutschland)
- Resorcinol Lösung 6 mg/ml (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- Luciferin-Lösung 10 μ M Luciferin in Aqua dest.(Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)
- Trypsin-EDTA Lösung 0,5 g/l Trypsin und 0,2 g/l EDTA (Sigma, Chemical CO. P.O. 14508 St. Louis, MO 63178 USA)

4.6 Zellkultur

1. MMR61

Die Ratten-Fibroblasten-Zelllinie MMR61 wurde durch stabile Transfektion des humanen Mannose-Rezeptors in Rat6-Zellen generiert (Taylor Zellen eine Subkonfluenz von ca. 80%, wurden durch Trypsinierung geerntet und neu mit einer Zelldichte von ca. 3×10^5 Zellen/ml Medium ausgesät.

2. Rat6-Fibroblasten-Zellen

Die Kulturbedingungen der Ratten-Fibroblasten-Zelllinie Rat6 entsprechen denen der MMR61 Fibroblasten, jedoch ohne G418, d.h. ohne Neomycin-Selektionsdruck.

3. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden entsprechend der Methode von Romani et al. aus mononukleären Zellen (PBMC, engl., Peripheral Blood Mononuclear Cells) des peripheren Blutes gewonnen [67]. Die Isolierung der PBMC erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation nach einer von Böyum et al. beschriebenen Methode [187]. Buffy-Coats (50-60 ml) von gesunden Spendern wurden mit sterilem PBS im Verhältnis 1:1 verdünnt. In 50 ml Plastikröhrchen (Falcon[®], Oxnard, CA., USA) wurden anschließend jeweils 30 ml dieses Gemisches über 15 ml Ficoll-Hypaque (Ficoll Dichte 1,077) geschichtet. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 2200 U/min ohne Bremse, wurde der Plasmaüberstand vorsichtig abgenommen. Dann wurden die in der Interphase befindlichen PBMC aspiriert und dreimal in PBS gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte bei niedriger Geschwindigkeit (7 min bei 700 U/min), um kontaminierende Thrombozyten mit dem Sedimentüberstand zu entfernen. Nach 5-minütiger Inkubation in 4-5 ml Erythrozytenlysepuffer (Raumtemperatur) wurden die Zellen erneut in PBS gewaschen und dann in 20 ml RPMI 1640 Standard-Kulturmedium resuspendiert. Die durchschnittliche Ausbeute betrug 5×10^8 – 1×10^9 Zellen pro Buffy Coat. Nach 30-minütiger Kultivierung in einer 50 ml Flasche zeigte sich eine starke Monozytenadhärenz zur Plastikoberfläche. Nach 3 h wurde das Kulturmedium verworfen und der Flaschenboden unter vorsichtigem Schwenken mit PBS gewaschen. Zu den in der Kulturflasche verbleibenden Zellen wurden 20 ml Standard-Kulturmedium unter Zusatz von 100 ng/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 gegeben. Nach zweitägiger Kultur unter Standardbedingungen hatte der Großteil der mononukleären Zellen die Adhärenz verloren. Sie konnten in 6-Loch-Platten (Nunc[®], Naperville, IL, USA) überführt werden, wo sie bei einer Zelldichte von $0,6$ – $1,0 \times 10^6$ Zellen pro ml Medium zu DC ausdifferenziert wurden. Die Zellen wurden 6-7 Tage mit zweimaligem Halbmediumwechsel kultiviert. Der Phänotyp der Zellen wurde durch FACS-Analyse mit Antikörpern gegen CD1a, CD3, CD14, CD19, CD80, CD83, CD86, HLA-DR und MMR-Expression bestimmt. Die Zählung der Zellen erfolgte mit einer Neubauer-Zählkammer.

4. Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Pro Aliquot wurden 2×10^7 bis 5×10^7 MMR61- bzw. Rat6-Zellen in 1 ml Einfriermedium in 1,5 ml Kryoröhrchen (Nunc[®]) bei -80°C eingefroren. Nach maximal 7 Tagen wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Zur Weiterverwendung wurden die Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und zweimal in PBS gewaschen. Das erstmalige Zugeben von PBS zur M.E. 1990). Durch Koexpression des Neomycin-Resistenzgens unter Kontrolle des Herpesvirus Thymidinkinase-Promotors können die Zellen unter Selektionsdruck gehalten werden. Die Zelllinie wurde in DMEM-Standardmedium, unter Zusatz von $200 \mu\text{g/ml}$ G418, in 250 ml-Zellkulturflaschen als Monolayer bei 37°C in einer angefeuchteten Atmosphäre mit einem CO_2 -Anteil von 5% kultiviert. Nach 2-3 Tagen erreichten die adhärennten Zellsuspension erfolgte tropfenweise. Die Zentrifugation bei jedem Waschen erfolgte für 5 min bei 1500rpm und bei 20°C .

4.7 FACS-Analysen

Die Expression von Zelloberflächen-Antigenen wurde mittels direkter Immunfluoreszenz durch einen Fluoreszenz-aktivierten Zell-Sorter (FACScan, Becton Dickinson, Mountain View, CA, USA) bestimmt. Als Software wurde das Programm „Cell-Quest“ (Becton Dickinson) verwendet. Dabei wurden Phykoerythrin (PE)-konjugierte und Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierte Antikörper (mAb) benutzt. Jeweils 10.000 Zellen wurden gemessen. Zum Meßansatz wurden je $1-2 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l FACS-Blockpuffer (10%iges humanes Immunglobulin in PBS) für 10 min bei 4°C inkubiert, um unspezifische Fc-Bindungen abzusättigen. Nach Zugabe der Antikörper entsprechend den Herstellerangaben folgte eine Inkubationsphase von 30 min bei 4°C mit anschließend zweimaligem Waschen in PBS. Zur Messung wurden die Zellen in 200 μ l PBS resuspendiert.

Das GFP (Grün-fluoreszierende Protein) wird bei 488 nm angeregt und hat sein Emissionsmaximum bei ca. 510 nm. Somit können GFP- transfizierte Zellen im FACScan mit dem gleichen Filter gemessen werden, wie FITC markierte Zellen (Anregung: 491 nm, Emission: 515 nm). Hierzu wurden je $2-3 \times 10^5$ Zellen zweimal in PBS gewaschen und in 200 μ l PBS resuspendiert.

Zur Bestimmung des Anteils an toten Zellen wurde die Membranintegrität mittels zellulärer Propidiumjodid Aufnahme untersucht. Je $1-2 \times 10^5$ Zellen wurden zweimal in PBS gewaschen und unfixiert in 200 μ l PBS resuspendiert. Unmittelbar vor der FACS Analyse wurde den Proben Propidiumjodid (Endkonzentration 2 μ g/ml) zugegeben. Die Messung erfolgte mit dem FSC-FL3 Profil.

4.8 Plasmidvektoren

E. coli DH5 α Bakterien wurden mit dem Plasmidvektor pLuc4 transformiert. Dieser enthält das Firefly-Luciferase-Reportergen unter Kontrolle des humanen CMV-Promotors sowie ein Ampicillin-Resistenzgen. Der Plasmidvektor KRSPA-GFP enthält das Gen für das Grün-fluoreszierende Protein (GFP) unter Kontrolle des RSV-LTR (Rous Sarcoma Virus Long Terminal Repeat) Promotors sowie ebenfalls ein Ampicillin-Resistenzgen. Die Selektion positiv transformierter E.coli (DH5 α) erfolgte in ampicillinhaltigen LB-Agar (100 μ g/ml Ampicillin). Nach Anlegen einer Vorkultur in LB-Medium (ca. 8 h, 37°C, Schüttler mit 225 rpm, 1000 U Ampicillin/ml Medium, aerob) wurden 200-500 ml LB-Medium mit 1-2 ml Vorkultur inokuliert und über Nacht inkubiert (Bedingungen wie Vorkultur). Die Plasmid-DNA wurde mit dem Maxi- (150-500 ml Kultur) bzw. dem Midi- (30-150 ml Kultur) Präparations Kit (Quiagen GmbH, 40724 Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben präpariert. Hierzu wurde die Bakterienkultur durch Zentrifugation pelletiert (15 min, 5000 rpm, RT), resuspendiert (4 oder 10 ml Puffer P1) und durch Zugabe eines weiteren Puffers (4 oder 10 ml Puffer P2) sowie Inkubation (5 min, RT) lysiert. Durch Zugabe von Puffer P3 (4 oder 10 ml) wurden die Zellproteine ausgefällt und pelletiert (30 min, 11000 rpm, 4°C). Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Reinigungssäule aufgetragen, gewaschen (10 oder 30 ml Puffer QC) und anschließend eluiert (5 oder 15 ml Puffer QF). Nach Ausfällung mit 7-11 ml Isopropanol wurde die DNA pelletiert (1100 rpm, 30 min, RT), in 70

%igem Ethanol gewaschen und in sterilem Aqua dest. gelöst. Die DNA wurde abschließend aliquotiert und bei -20°C gelagert.

4.9 DNA Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Beckman DU-600, Beckman Coulter GmbH, D-47807 Krefeld, Deutschland). Einer Absorption (bei 260 nm) von 1 ($A_{260}=1$) entsprechen dabei $50\mu\text{g}/\mu\text{l}$ DNA. Das Verhältnis $A_{260/280}$ gibt Rückschlüsse auf Proteinverunreinigungen der DNA-Lösung. Bei reiner DNA beträgt das Verhältnis $A_{260/280}$ 1,7-1,9, bei einem 1:1 Verhältnis Protein zu DNA beträgt es 1,5.

4.10 Mannosylierung von Poly-L-Lysin und Polyethylenimin sowie Analyse der Konstrukte

1. Mannosylierung

Zur Mannosylierung der kationischen Polymere wurde eine Methode nach Midoux et al. [188] verwendet. Dieser Methode liegt folgendes Reaktionsprinzip zugrunde:

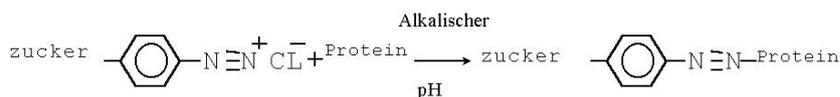


Abb. 16:

Verknüpfung von Monosacchariden mit Amino-Gruppen (von Proteinen) über Isothiozyanatbrücken.

Poly-L-Lysin Hydrobromid (1 g in 200ml Aqua dest.) wurde durch eine Anionen-Austauscher-Säule (Mono-Q-Säule) passiert, um zytotoxische Bromidionen zu entfernen. Anschließend wurde die passierte Lösung mit 10%iger p-Toluen-Schwefliger-Säure in Wasser neutralisiert und lyophilisiert (mit freundlicher Unterstützung durch Prof. Wittmann, MDC Berlin-Buch und Wita GmbH, Wittmann Institute of Technology and Analysis of Biomolecules, Teltow, Germany). 36 mg der Trockensubstanz wurden in 0,9 ml DMSO gelöst, unter Zusatz von $18\mu\text{l}$ Diisopropylethylamine. Analog wurde Polyethylenimin (36 mg Polyethylenimin 800 kD in 50%iger wässriger Lösung bzw. 36 mg

Polyethylenimin 50 kD in 50%iger wässriger Lösung) in 0,9 ml DMSO unter Zusatz von 18 µl Diisopropylethylamine gelöst. Der pH wurde jeweils mit 1 M HCL-Lösung auf 9,0 eingestellt. 12,5 mg α-D-Mannopyranosyl-Phenylisothiocyanat wurden in 0,1 ml DMSO gelöst und unter vorsichtigem Mischen zur Polymerlösung addiert. Nach 24 h Reaktionszeit bei 20 °C und unter Lichtschutz wurde die Reaktionslösung für 3 Tage gegen Aqua dest. dialysiert (Slide-A—Lyser™ Dialysis Cassette, Pierce a Perstorp Biotec Company), um freies α-D-Mannopyranosyl-Phenylisothiocyanat aus der Lösung zu entfernen. Die in der Dialysekammer verbleibende Lösung wurde aliquotiert und bei 20 °C gelagert.

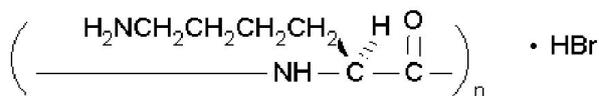
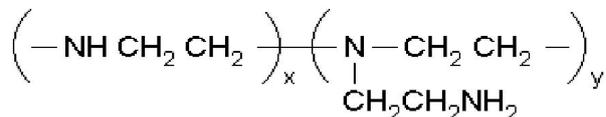


Abb. 17:

Strukturformel eines Monomers von Poly-L-Lysin Hydrobromid

Abb. 18:

Strukturformel eines Monomers von Polyethylenimin



2. Poly-L-Lysin Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung erfolgte mit einer von Shen et al. beschriebenen Methode [189]. Sie basiert auf der Fähigkeit von polykationischem Poly-L-Lysin, Trypanblau zu präzipitieren. Bei Polylysin Molekulargewichten von >13000 kD wird eine maximale Präzipitation erreicht, so dass verlässliche Standardkurven erstellt werden können. Zu 0,12 ml einer wässrigen Trypanblaulösung (1 mg/ml) wurden 2,88 ml der Poly-L-Lysin-Lösung unbekannter Konzentration addiert. Nach kräftigem Mischen erfolgte die Inkubation in einem Glasgefäß (Vermeidung der Adhärenz des Poly-L-Lysins an der Plastikoberfläche) für 1h bei 37°C. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 5000 rpm zentrifugiert und die Absorption des Überstandes bei 580 nm (Absorptionsmaximum von Trypanblau) photometrisch gemessen (Beckmann DU-600). Anhand einer Verdünnungsreihe, mit Poly-L-Lysin-Konzentrationen (MW:30000-50000) zwischen 0,5 µg/ml-25 µg/ml, wurde eine Standardkurve erstellt, aus der die photometrisch bestimmte Konzentration abgelesen werden konnte.

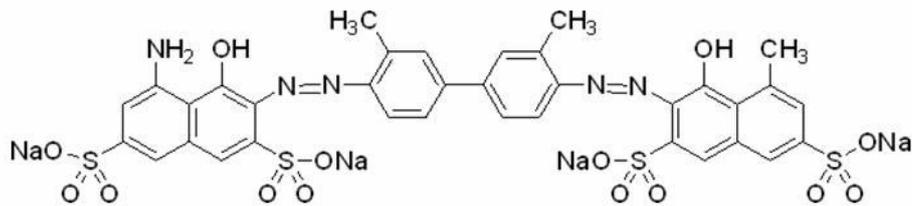


Abb. 19:

Strukturformel von Trypanblau (Die Sulfat-Gruppen sind verantwortlich für die Interaktion mit Poly-L-Lysin)

3. Polyethylenimin Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der PEI Konzentration erfolgte nach einer von Perrine et al. beschriebenen Methode [190]. Kupferionen bilden mit PEI Chelate von dunkelblauer Farbe und einem Absorptionsmaximum bei 635 nm. Das Verhältnis von Stickstoff- zu Kupferatomen beträgt im Chelat ca. 5:1. Zu 40 µl einer 0,02 M CuCl-Lösung wurden 0,1 ml der PEI-Lösung unbekannter Konzentration gegeben und die Absorption bei 635 nm photometrisch gemessen (Beckmann DU-600). Die Konzentrationsbestimmung erfolgt mit Hilfe einer Standardkurve, einzeln für PEI 800 kD und PEI 50 kD. Bei Zugabe von 100 µl PEI-Lösung steigender Konzentration zu 40 µl einer 0,02 M CuCl-Lösung, zeigt sich ein typischer Sättigungsverlauf. Nach Bindung aller Kupferionen führt eine weiter steigende PEI-Konzentration zu keiner weiteren Zunahme der Extinktion. Der für die Konzentrationsbestimmung verwertbare Bereich der Standardkurve befindet sich im linear ansteigenden Teil der Extinktionskurve.

4. Mannose Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der Mannosekonzentration erfolgte mit der von Monsigny et al. beschriebenen „Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod“ [191]. Zu 0,2 ml der wässrigen Lösung eines neutralen Zuckers unbekannter Konzentration wurden 0,2 ml einer Resorcinollösung (Konzentration 6 mg/ml) sowie 1 ml einer 75%igen Schwefligen Säure gegeben. Es folgte eine Inkubation in einem Glasröhrchen (Reduktion von Adhärenz) im Wasserbad für 30 min bei 90 °C. Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation bei 10 °C im Dunkeln für 30 min.

Die Absorption wurde bei 420 nm (lineare Extinktion für den Konzentrationsbereich 1-20 nM) und bei 480 nm (lineare Extinktion für den Konzentrationsbereich 10-100 nM) (Beckmann DU-600) gemessen. Die Mannosekonzentration wurde aus einer Standardkurve mit α-D-Mannose in Aqua dest. abgelesen. Der Assay wird durch in der Testlösung anwesende Proteine nicht beeinflusst [191].

4.11 Transfektionskomplexe

1. Synthese

PEI/M-PEI: Die Präparation erfolgte grundsätzlich nach der von Boussif et al. beschriebenen Methode [158]. 0,5-7,5 µg DNA (entsprechend den Einzelexperimenten) sowie der 1-3-fache Massenanteil an Polymer (entsprechend den Einzelexperimenten) wurden in jeweils 50 µl steriler 150 mM NaCl-Lösung angesetzt. Unter Sterilbedingungen und ständigem Mischen wurde die Polymerlösung langsam und tropfenweise zur DNA-Lösung gegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min bei RT inkubiert, um dann den vorbereiteten Zellen zugesetzt zu werden.

PL/PL-M: Zugrunde gelegt wurden die von Midoux et al. und Perales bzw. Ferkol et al. beschriebenen Methoden [188], [171], [55]. 2,5-10 µg DNA bzw. der 2-2,5-fache Massenanteil an Polymer wurden in jeweils 12 µl sterilem 700 mM NaCl gelöst. Unter den oben beschriebenen Bedingungen wurden beide Komponenten zusammengegeben und inkubiert. Beim Auftreten von Trübungen durch Bildung unlöslicher Aggregate wurden Einheiten von 3 µl 5 M NaCl bis zur optischen Klärung zugesetzt.

2. Ladungsanalyse der Polykationen

Zur Ermittlung des DNA/Polykationen-Verhältnisses das zur Bildung elektrisch neutraler Komplexe führt wurde ein „gel retardation assay“ durchgeführt. Hierzu wurde ein 1%iges Agarosegel (1 g Agarose auf 100 ml 1xTBE) unter Zusatz von 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Gel hergestellt. Nach Abkühlung wurde das Gel in eine Standardform gegossen und mit einem Kamm für Probenlöcher (20 µl) versehen. 10-15 µl Probe (jeweils mit 0,2 µg DNA und 3µl Loadingbuffer) wurden pro Loch pipettiert. Anschließend wurde das Gel in eine Elektrophoresekammer (Gibco BRL[®], D-76131 Karlsruhe, Deutschland) eingelegt, wo es bei einer Spannung von 80 V bis zur optimalen Auftrennung der Proben verblieb. Anschließend wurden die Banden im UV-Licht fotografiert.

4.12 Transfektion

24 h vor der Transfektion wurden $2,25 \times 10^5$ Zellen pro Well (MMR61 bzw. Rat6 und Dendritische Zellen) in 6-Well-Nunclon-Platten (Nunc[®]) ausgesät. Am Tag der Transfektion betrug die Konfluenz 40-70%. Den Zellen wurde 2 ml frisches RPMI 1460-Medium mit 10% FCS und den zellspezifischen Zusätzen in Standardkonzentration zugegeben (MMR61 mit G418, DC mit GM-CSF und IL-4). Vor der Transfektion wurde das Medium entfernt und die Zellen, mit sterilem PBS gewaschen (adhärente Fibroblasten wurden leicht mit PBS gespült, DC in Suspension wurden vorher bei 700 rpm für 5 min zentrifugiert). Den Zellen wurde Medium mit niedriger Serumkonzentration (2% FCS), je nach Experiment, zugesetzt. Nach tropfenweiser Zugabe des Transfektionskomplexes zum Zellmedium (Gesamtvolumen von 1 ml pro Well) wurden die 6-Well-Platten 10 min vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden für 4 h unter Standardbedingungen mit dem Transfektionsmedium inkubiert, abweichende Kultivierungszeiten sind in den entsprechenden Experimenten angegeben. Die

Transfektion wurde durch vollständige Entfernung des Mediums und den Zusatz von 2 ml frischem Medium pro Well mit 10% FCS beendet.

4.13 Luciferase-Assay

Die Zellen wurden in Eppendorf®-Röhrchen überführt und bei Raumtemperatur bei 14000 rpm für 5-10 min zentrifugiert (Heraeus Minifuge, Heraeus AG, Zürich, Switzerland). Anschließend wurden sie mit PBS gewaschen und die Pellets in 150 µl kaltem Lysepuffer (2-3 °C) resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben für 3 min bei 14.000 rpm und 4 °C wurden jeweils 50 µl des Überstandes resp. Zellysates zu 180 µl Reaktionspuffer in gegeben, um sofort im Lumineszenzmesser (Biolumat LB 9502, Berthold, Nashua, USA) gemessen zu werden. Zur Messung injiziert das Gerät automatisch 50 µl 10 µM Luciferin-Lösung. Die Luciferaseaktivität wurde auf die Proteinkonzentration des Zellysates bezogen.

4.14 Proteinbestimmung nach Bredford

200 µl Bredford-Reagenz (Bio-Rad Laboratories GmbH, D-80901 München, Deutschland) wurden zu 800 µl Proteinlösung gegeben und bei Raumtemperatur für 15 min inkubiert. Die Proteinlösung wurde durch Zugabe von 2 µl Zellysat zu 798 µl PBS hergestellt. Für die Standardkurve wurden 1 µl, 2 µl, 4µl, 8 µl und 10 µl einer BSA (Bovines Serum Albumin)-Lösung (PBS) mit einer Konzentration von 1mg/ml zur entsprechenden PBS-Menge gegeben, so dass Endvolumina von 800 µl entstanden. Die Absorptionen wurden bei 562 nm gemessen (Beckmann DU-600). Aus der Standardkurve wurde die Eiweißkonzentration der Probe abgelesen.

4.15 Bestimmung der Toxizität der Transfektionskomplexe

Die Bestimmung des Anteils toter Zellen erfolgte über das Prinzip der verstärkten Farbstoffaufnahme toter Zellen durch Verlust der Zellmembran-Integrität. Hierzu wurde Trypanblau (0,5%ige Lösung in PBS, 0,9% NaCl, Auszählung von 200 Zellen im Durchlichtmikroskop) und Propidiumjodid (siehe FACS-Analyse) verwendet.

5.0 Ergebnisse

5.1 Expression des humanen Mannose-Rezeptors auf Ratten MMR61-Fibroblasten und RAT6-Fibroblasten

MMR61- und Rat6-Zellen wurden mit dem α -Human-Mannose-Rezeptor-Antikörper gefärbt und durchflußzytometrisch untersucht. Hierbei zeigte sich eine MMR Expression auf 98% der MMR61-Zellen gegenüber 0% der Rat6-Zellen.

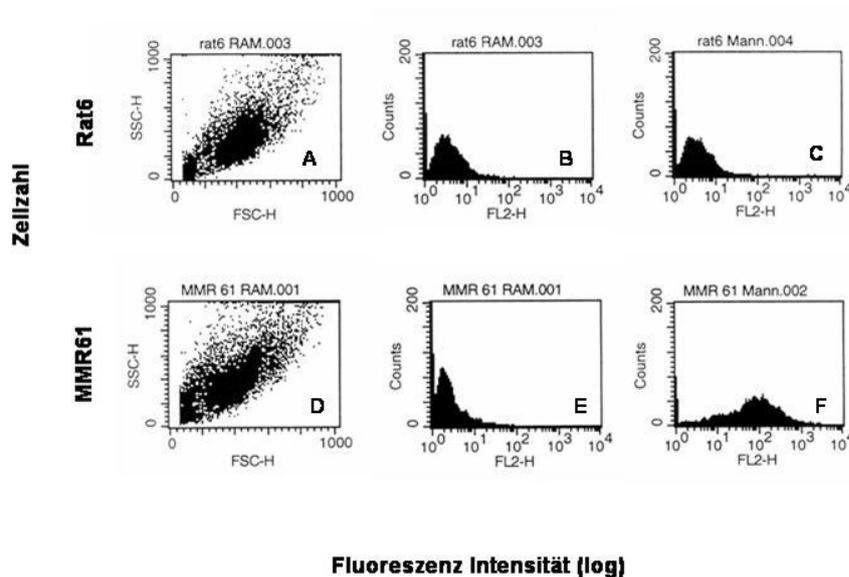


Abb. 20:

FACS-Analyse von MMR61- und RAT6-Fibroblasten auf Expression des Humanen Mannose-Rezeptors, A: Dotplot von Rat6 Zellen, B: Isotypkontrolle von Rat6 Zellen, C: Mannose-Rezeptor auf Rat6 Zellen, D: Dotplot von MMR61 Zellen, E: Isotypkontrolle von MMR61 Zellen, F: Mannose-Rezeptor auf MMR61 Zellen

5.2 Generierung und Charakterisierung Dendritischer Zellen

Dendritische Zellen wurden aus peripheren mononukleären Zellen durch Selektion von Monozyten mittels Plastikadhärenz und anschließende 6-7 tägige Differenzierung im IL-4- und GM-CSF-haltigen Medium nach einer Methode von Romani N. et al. [67] gewonnen. Mit dieser Methode konnten aus einem Buffy-Coat bis zu 2×10^6 DC generiert werden. Die Ausdifferenzierung zu unreifen Dendritischen Zellen wurde durch morphologische Begutachtung und FACS-Analyse relevanter Oberflächenmarker verifiziert. Nach 6-7 Tagen Zellkultur zeigten sich die für Dendritische Zellen typischen feinen Zytoplasmaausläufer.

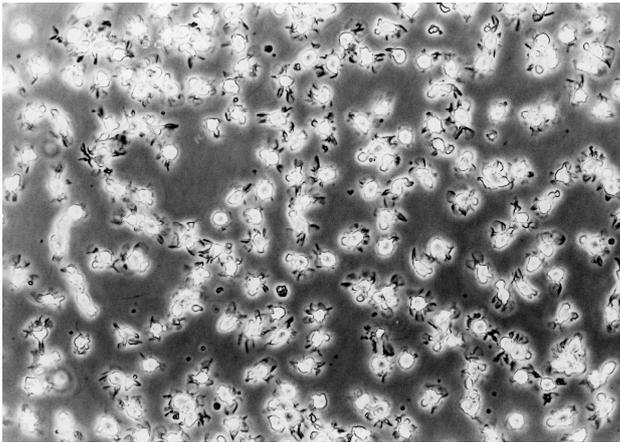


Abb. 21:

Dendritische Zellen am 7.Tag der Differenzierungskultur

Die durchflußzytometrische Untersuchung einer typischen Zellkultur am Tag 6 ergab die Expression des für unreife Dendritische Zellen spezifischen Oberflächenmarker-Musters: CD1a bei 79,3%, CD4 bei 96,7%, CD80 bei 90%, CD86 bei 75% und HLA-DR bei 99% der Zellen. Die Expression von CD83 bei 2% der Zellen weist darauf hin, dass die terminale Reifung noch nicht stattgefunden hat, wohingegen die Expression von CD3 bei 1,7% und von CD19 bei 1% der Zellen für eine geringe lymphozytäre Verunreinigung spricht. Der humane Mannose-Rezeptor war auf 93,6% der Zellen exprimiert.

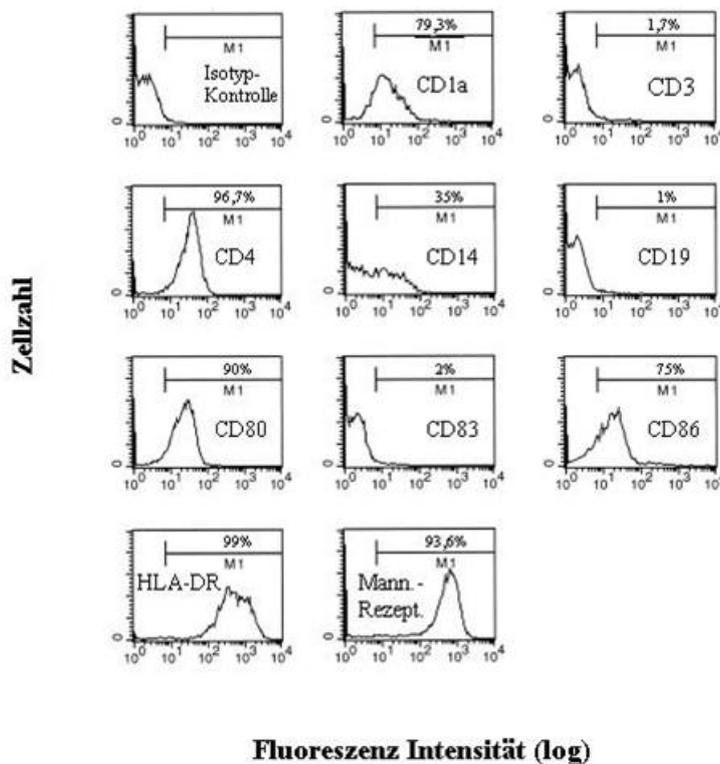


Abb. 22:

Phänotyp von Dendritischen Zellen am Tag 6 der Kultur.

5.3 Mannosylierung der Polymere

Für ein spezifisches Zell-Targetting wurden Mannose-Gruppen als Liganden des humanen Mannose-Rezeptors an die kationischen Polymere Poly-L-Lysin und Polyethylenimin kovalent gebunden. Anschließend wurden die Komplexe einer Qualitätskontrolle unterzogen, wobei aus der Konzentrationsbestimmung der Polymere und des Monosaccharides das molare Verhältnis bzw. die Absättigung der verfügbaren Amino-Gruppen mit Mannose-Resten berechnet wurde. Bei mannosyliertem Poly-L-Lysin betrug der berechnete Anteil mannosylierter Amino-Gruppen 6,4%. In Abhängigkeit vom Reaktionsverhältnis von Polyethylenimin und dem Mannosylierungsreagenz betrug dieser Prozentsatz bei hochmolekularem PEI (800kD) 1% bis 7% bzw. bei niedermolekularem PEI (50kD) <1% bis 13,8%.

Verhältnis \ Polymer	Poly-L-Lysin (30-50kD)/Ia	Polyethylenimin (800kD)/Ib	Polyethylenimin (50kD)/Ic
(1) Polymer/ α -D-Manno-pyranosyl-Phenyl-Isothiocyante 3:1	<u>-Poly-L-Lysin Konzentration:</u> 15mg/ml bzw. $3,0 \times 10^{-4}$ mol/l bis $4,9 \times 10^{-4}$ mol/l <u>α-D-Mannose Konzentration:</u> $7,4 \times 10^{-3}$ mol/l <u>-molares Verhältnis: α-D-Mannose/Poly-L-Lysin:</u> $1,5 \times 10^1$ bis $2,46 \times 10^1$, entspricht einer <u>-Absättigung der Aminogruppen</u> von ca 6,4%	<u>-PEI Konzentration:</u> 4,6mg/ml bzw. $5,52 \times 10^{-6}$ mol/l <u>α-D-Mannose Konzentration:</u> $1,2 \times 10^{-3}$ mol/l <u>-molares Verhältnis: α-D-Mannose/Polyethylenimin:</u> $2,2 \times 10^2$, entspricht einer <u>-Absättigung der Aminogruppen:</u> von ca. 1,2%	<u>-PEI Konzentration:</u> 3,56mg/ml bzw. $7,12 \times 10^{-5}$ mol/l <u>α-D-Mannose Konzentration:</u> nicht bestimmbar <u>-molares Verhältnis: α-D-Mannose/Polyethylenimin</u> und <u>-Absättigung der Aminogruppen:</u> unterhalb der Nachweisgrenze
(2) Polymer/ α -D-Manno-pyranosyl-Phenyl-Isothiocyante 2:1	X	<u>-PEI Konzentration:</u> 3,7mg/ml bzw. $4,4 \times 10^{-6}$ mol/l <u>α-D-Mannose Konzentration:</u> $5,9 \times 10^{-3}$ mol/l <u>-molares Verhältnis: α-D-Mannose/Polyethylenimin:</u> $1,3 \times 10^2$, entspricht einer <u>-Absättigung der Aminogruppen:</u> von ca. 7%	<u>-PEI Konzentration:</u> 4,3mg/ml bzw. $8,6 \times 10^{-5}$ mol/l <u>α-D-Mannose Konzentration:</u> $4,4 \times 10^{-3}$ mol/l <u>-molares Verhältnis: α-D-Mannose/Polyethylenimin:</u> $5,1 \times 10^1$, entspricht einer <u>-Absättigung der Aminogruppen:</u> von ca. 4,4%
(3) Polymer/ α -D-Manno-pyranosyl-Phenyl-Isothiocyante 1:1	X	<u>-PEI Konzentration:</u> 3,4mg/ml bzw. $4,08 \times 10^{-6}$ mol/l <u>α-D-Mannose Konzentration:</u> $4,2 \times 10^{-3}$ mol/l <u>-molares Verhältnis: α-D-Mannose/Polyethylenimin:</u> $1,0 \times 10^2$, entspricht einer <u>-Absättigung der Aminogruppen:</u> von ca. 5,4%	<u>-PEI Konzentration:</u> 0,7mg/ml bzw. $1,4 \times 10^{-5}$ mol/l <u>α-D-Mannose Konzentration:</u> $2,2 \times 10^{-3}$ mol/l <u>-molares Verhältnis: α-D-Mannose/Polyethylenimin:</u> $1,6 \times 10^2$, entspricht einer <u>-Absättigung der Aminogruppen:</u> von ca. 13,8%

Tab. 1:
Qualitätskontrolle der mannosylierten Polymere

5.4 Elektrophorese der Transfektionskomplexe

Für die Transfektionskonjugate musste das optimale Polymer/DNA-Verhältnis, bei dem fast die gesamte DNA kondensiert wird, experimentell bestimmt werden. Die Größe der multimolekularen Transfektionskomplexe macht eine Wanderung im 1% Agarosegel bei 80V vernachlässigbar gering. Beim angestrebten Polymer/DNA-Verhältnis sollte sich daher keine frei wandernde Plasmid-DNA mehr nachweisen lassen. Zur Minimierung einer unspezifischen Zellaufnahme sind Komplexe mit geringer anionischer Nettoladung zu bevorzugen. Deshalb wurden, von einem Überschuss an DNA ausgehend, abnehmende Massenanteile an DNA gegenüber nicht-komplexierter Kontroll-DNA untersucht. Beim Massenverhältnis von mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD gegenüber Plasmid-DNA von 1:1 bis 2:1 wurde der Großteil der DNA in der Ausgangsposition zurückgehalten, womit der Bereich dieses Polymer/DNA-Verhältnisses für Transfektionen besonders geeignet schien.

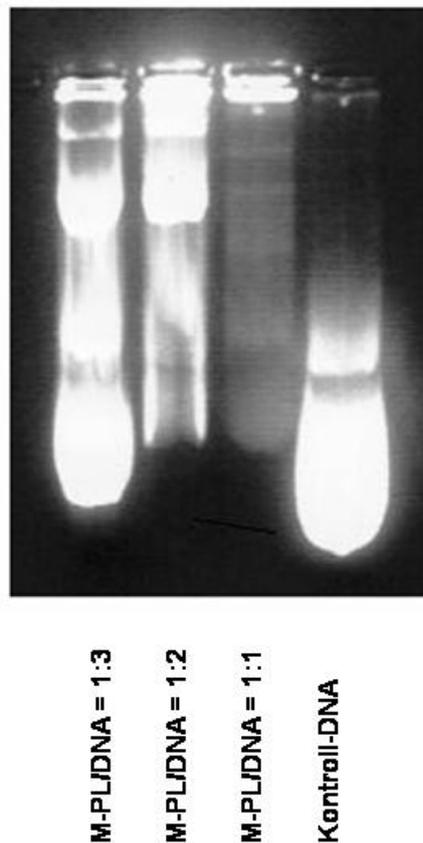
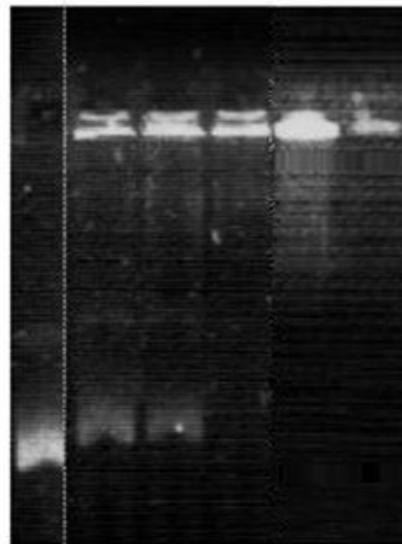


Abb. 23:

Elektrophorese im 1%igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel, Plasmid-DNA, komplexiert mit mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD in den Massenverhältnissen (Polymer/DNA) 1:3 bis 1:1, im Vergleich zu nicht komplexierter Kontroll-DNA

Bei Polyethylenimin/800kD zeigte sich mit zunehmendem Polymer-Massenanteil ebenfalls ein Abnehmen der im elektrischen Feld wandernden DNA. Ein fast vollständiges Zurückhalten der DNA-Wanderung war jedoch erst bei einem 2- bis 3fachen Massenanteil von PEI gegenüber DNA zu verzeichnen. Dieser Bereich von Massenverhältnissen wurde für Transfektionsexperimente eingesetzt.



Kontroll-DNA
M-PEI/DNA = 1:3
M-PEI/DNA = 1:2
M-PEI/DNA = 1:1
M-PEI/DNA = 1,5:1
M-PEI/DNA = 2:1

Abb. 24:

Elektrophorese im 1%igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel von Plasmid-DNA, komplexiert mit mannosyliertem Polyethylenimin/800kD in den Massenverhältnissen (Polymer/DNA) 1:3 bis 1:1 bzw. 1,5:1 bis 2:1 im Vergleich zu nicht komplexierter Kontroll-DNA. Ab einem Polymer/DNA-Verhältnis von 2:1 wandert keine DNA mehr ins 1%ige Agarosegel.

5.5 Transfektionsexperimente

An MMR61-Fibroblasten-Zellen wurde ein nicht-virales, über den Humanen Mannose-Rezeptor vermitteltes Gentransfersystem etabliert.

5.5.1 Vergleich von Rat6-Zellen und MMR61-Zellen

MMR61-Zellen wurden mit ihren nicht-transfizierten parentalen Wildtyp-Zellen Rat6, in Bezug auf ihre Transfizierbarkeit mit PEI und M-PEI hin verglichen. Eine spezifische Aufnahme von M-PEI konnte bei Rat6-Zellen nicht beobachtet werden. Mannosyliertes PEI war in allen Experimenten einfachem PEI gegenüber unterlegen.

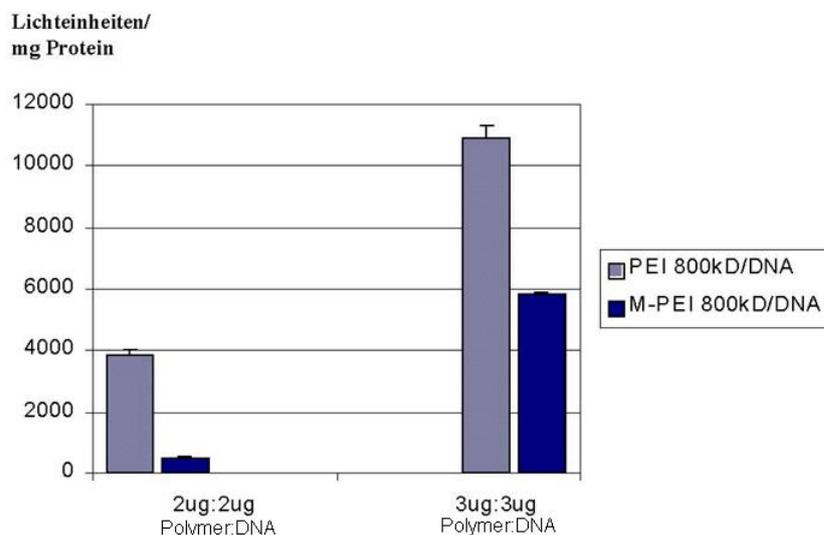


Abb. 25:

Luciferaseexpression in Rat6-Zellen nach Transfektion mit PEI/800kD und M-PEI/800kD, Luciferaseassay 24h nach Transfektion. Die Resultate sind dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) \pm Standardabweichung (SD), Stichprobenumfang $n = 3$.

Im Gegensatz zu Rat6-Zellen zeigte sich bei Mannose-Rezeptor positiven MMR61-Zellen ein bis zu 50facher Transfektionsvorteil von M-PEI gegenüber PEI. Trotz zu berücksichtigender Einschränkungen beim Vergleich unterschiedlicher Experimente im Hinblick auf die Transfizierbarkeit der Zellen, fällt eine bis zu 20fach höhere Luciferaseaktivität bei MMR61 gegenüber Rat6-Zellen auf.

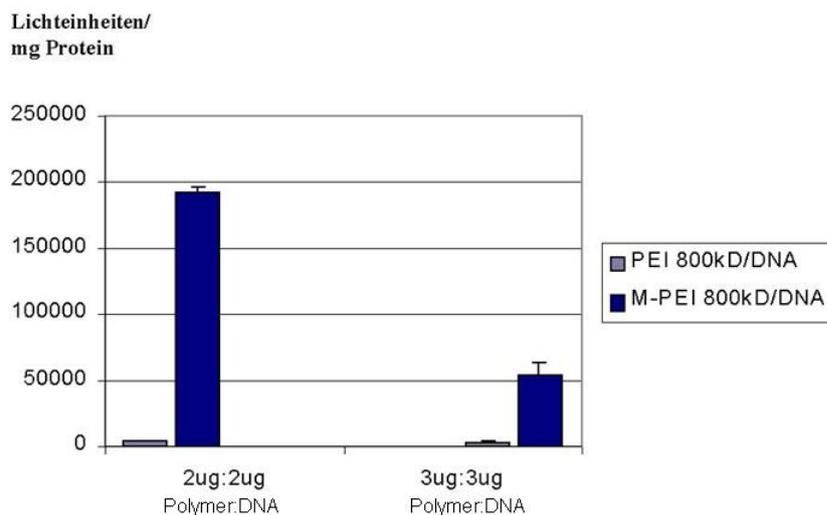


Abb. 26:

Luciferaseexpression in MMR61-Zellen nach Transfektion mit PEI/800kD und M-PEI/800kD, Polymer/DNA-Verhältnis von 1:1, Luciferaseassay 24h nach Transfektion. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

5.5.2 Transfektionsexperimente an MMR61-Fibroblasten

5.5.2.1 Poly-L-Lysin/DNA-Komplexe

5.5.2.1.1 Gentransfer-Effizienz von mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD

In diesen Experimenten wurden MMR61 Fibroblasten mit mannosyliertem vs. nicht-mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD transfiziert. Bei einem Polymer/DNA-Verhältnis von 2:1 (10 μ g:5,0 μ g) wurde eine ca. 10fach höhere Luciferaseexpression der mannosylierten Polymerform gegenüber der nicht-mannosylierten Form ermittelt.

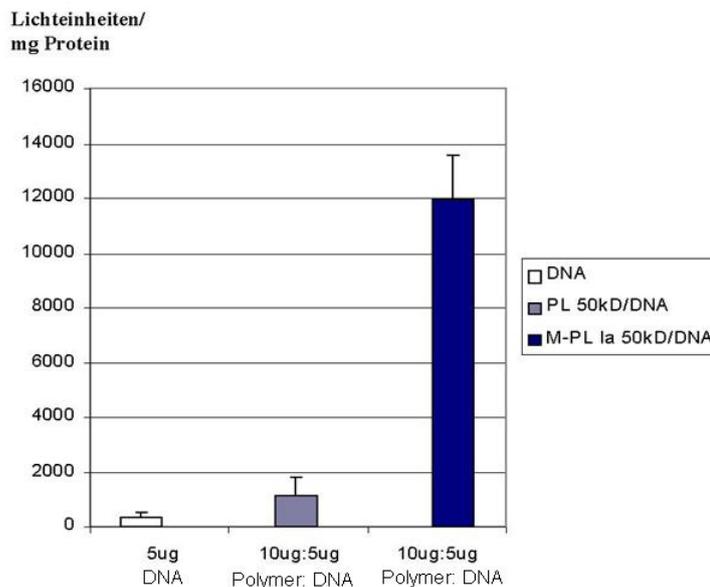


Abb. 27:

Gentransfer mit mannosyliertem und nicht-mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD, Polymer/DNA-Verhältnis von 2:1 (10 μ g/5,0 μ g), Luciferaseassay 24h nach Transfektion. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

5.5.2.1.2 Dauer der Genexpression nach Transfektion von MMR61 mit mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD

Nach Transfektion von MMR61-Zellen mit mannosyliertem vs. nicht-mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD wurde die Luciferaseexpression an den Tagen 1., 2., 4. und 6. gemessen, um den zeitlichen Verlauf der Transgen-Expression zu zeigen. Das gewählte Polymer/DNA-Verhältnis betrug 2:1 (10 μ g:5 μ g). Es zeigte sich hierbei ein linearer Abfall der Luciferaseexpression vom ersten bis zum sechsten Tag. Die Luciferaseexpression von mannosyliertem und nicht-mannosyliertem Poly-L-Lysin am 6. Tag entsprach der Negativkontrolle.

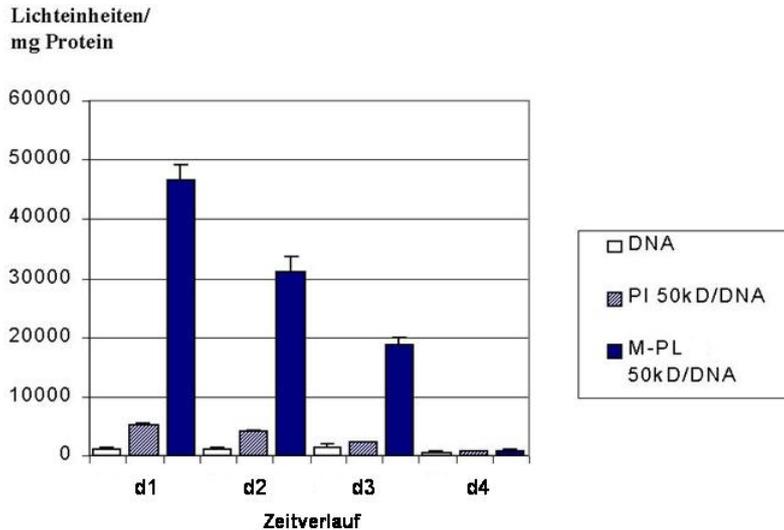


Abb. 28:

Zeitverlauf der Luciferaseexpression in MMR61-Zellen über 6 Tage nach Transfektion mit DNA bzw. PL 30-50kD/DNA und PL-M 30-50kD/DNA, Polymer/DNA-Verhältnis 2:1 (10 μ g:5 μ g). Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

5.5.2.1.3 Bestimmung der optimalen DNA-Menge bei konstantem Verhältnis von mannosyliertem/nicht-mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD und Plasmid-DNA von 2:1

Nachdem in Vorexperimenten ein optimales Poly-L-Lysin/DNA-Verhältnis von 2:1 empirisch ermittelt wurde, sollte in diesem Experiment der Zusammenhang zwischen DNA-Menge und Luciferaseexpression bei konstantem Polymer/DNA-Verhältnis untersucht werden. Im Bereich von 2,5 μ g bis 10 μ g DNA stieg die Luciferaseexpression bei Verwendung des mannosylierten Poly-L-Lysin/30-50kD von 890 bis zu 6895 light units pro mg Protein an. Hierbei vergrößerte sich der Vorteil von mannosyliertem Poly-L-Lysin gegenüber nicht-mannosyliertem Poly-L-Lysin mit der DNA-Menge vom 1,4- bis zum 6,9fachen.

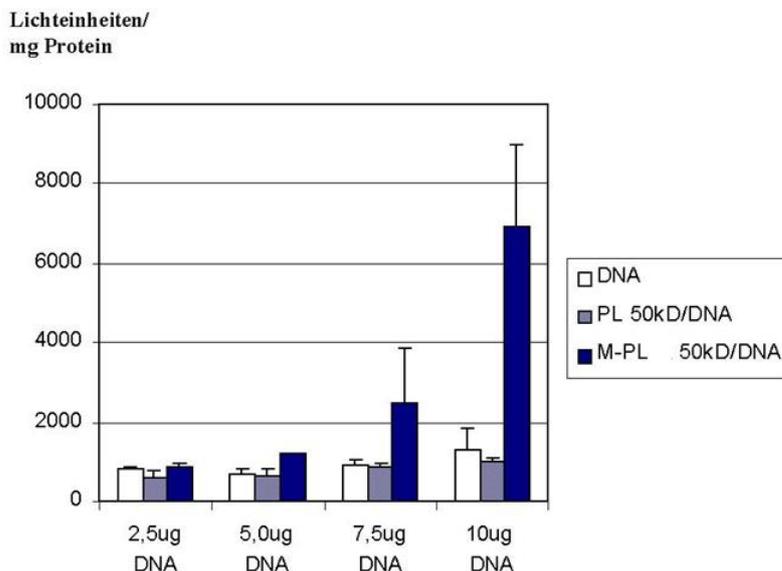


Abb. 29:

Vergleich der Gentransfer-Effizienz unterschiedlicher DNA-Mengen bei konstantem Polymer/DNA Verhältnis =2:1, Luciferaseassay nach 24h. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

5.5.2.2. Polyethylenimin/DNA-Komplexe

5.5.2.2.1 Gentransfer-Effizienz von mannosyliertem PEI/800kD

Es wurde mannosyliertes vs. nicht-mannosyliertes PEI/800 kD verglichen. Das Polymer/DNA-Verhältnis betrug 3:1, bei 22,5 µg Polymer zu 7,5 µg DNA. Wie bei Poly-L-Lysin zeigte sich auch bei hochmolekularem PEI eine erhöhte (2,4fache) Transfektionseffizienz des mannosylierten Polymers.

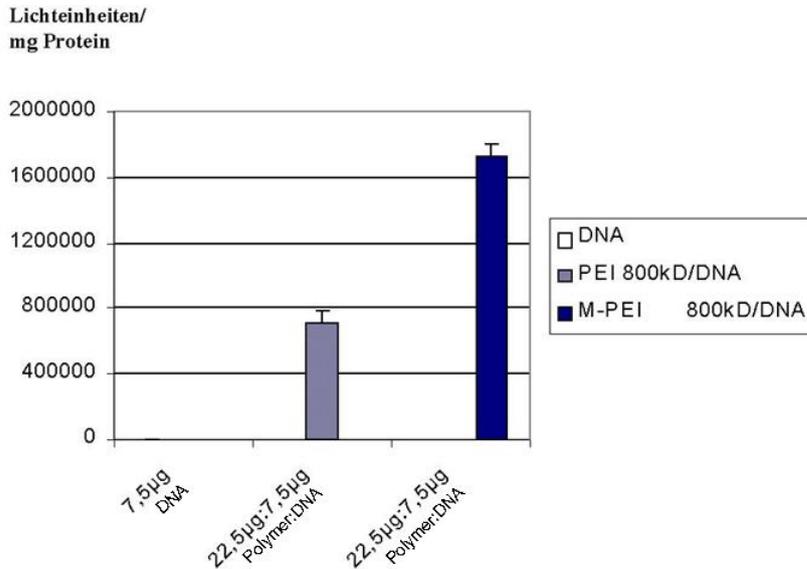


Abb. 30:

Vergleich der Gentransfer-Effizienz von mannosyliertem vs. nicht-mannosyliertem PEI/800kD, Polymer-DNA-Verhältnis=3:1 (22,5 µg:7,5 µg), Luciferaseassay 24 h nach Transfektion. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

5.5.2.2.2 Zeitverlauf der Luciferaseexpression nach Transfektion mit M-PEI/800kD vs. PL-M/30-50kD

Die Kinetik der Luciferaseexpression über 6 Tage nach Transfektion mit M-PEI/800kD (Polymer/DNA-Verhältnis 3:1) im Vergleich zu PL-M/30-50kD (Polymer/DNA-Verhältnis 2:1) wurde hier ermittelt. In beiden Experimenten wurden jeweils 5µg Plasmid-DNA für einen Transfektionsansatz verwendet. Bei M-PEI/800kD zeigte sich ein langsamer Abfall vom ersten bis zum sechsten Tag, an dem jedoch noch eine erhebliche Luciferaseexpression nachweisbar war. Bemerkenswert war ein verzögerter Anstieg der Luciferaseexpression am Tag 4 über den gleich 100% gesetzten Wert des Tag 1. Im Gegensatz hierzu zeigte die Transgen-Expression bei PL-M 50kD einen steileren Abfall über die Zeit. Am Tag 6 war bei PL-M/30-50kD nur noch eine wenig über dem Hintergrund liegende Luciferaseaktivität nachweisbar.

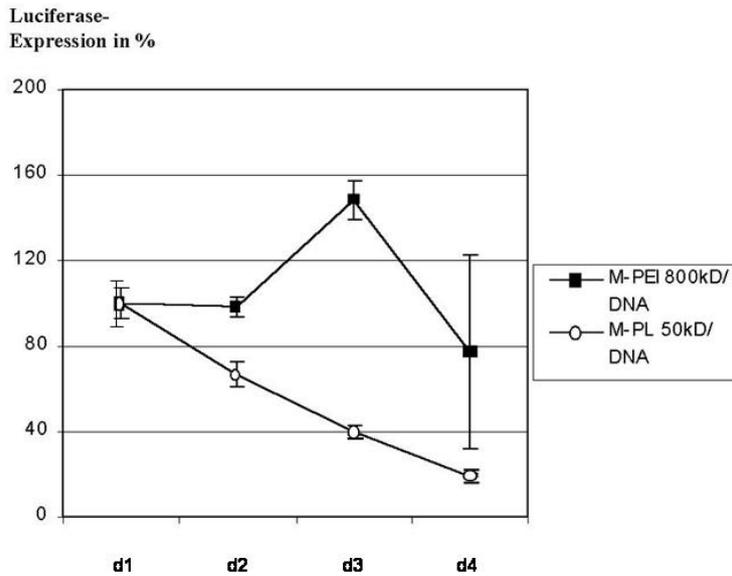


Abb. 31:

Expressionsverlauf des Firefly-Luciferase-Gens über 6 Tage, Tag 1 gleich 100%, Transfektion mit M-PEI/800kD (Polymer/DNA-Verhältnis 3:1) und PL-M/30-50kD (Polymer/DNA-Verhältnis 2:1), pro Ansatz je 5µg Plasmid-DNA, Luciferaseassay nach 24 h, 48 h, 96 h und 144 h. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

5.5.2.2.3 Einfluß des Polymer/DNA-Verhältnisses auf die Transfektionseffizienz bei konstanter DNA-Menge

Zur weiteren Optimierung des Polymer/DNA-Massenverhältnisses, unabhängig von der DNA-Menge, wurde bei konstant 2,5µg Plasmid-DNA die Polymermenge (PEI/800kD und M-PEI/800kD) von 1,8µg bis 12,5µg variiert (Polymer/DNA-Verhältnis von 0,75:1 bis 5:1). Das Verhältnis von 3:1 war hierbei den anderen Verhältnissen gegenüber deutlich überlegen, sowohl beim mannosylierten als auch beim nicht-mannosylierten Polymer. Der Vorteil der mannosylierten gegenüber der nicht-mannosylierten Form betrug bei diesem Verhältnis ca. 1,7. Der größte spezifische Vorteil der mannosylierten Polymerform zeigte sich hingegen bei einem Polymer/DNA-Verhältnis von 1,5:1. Ober- und unterhalb des Verhältnisses von 3:1 fiel die Luciferaseexpression deutlich ab.

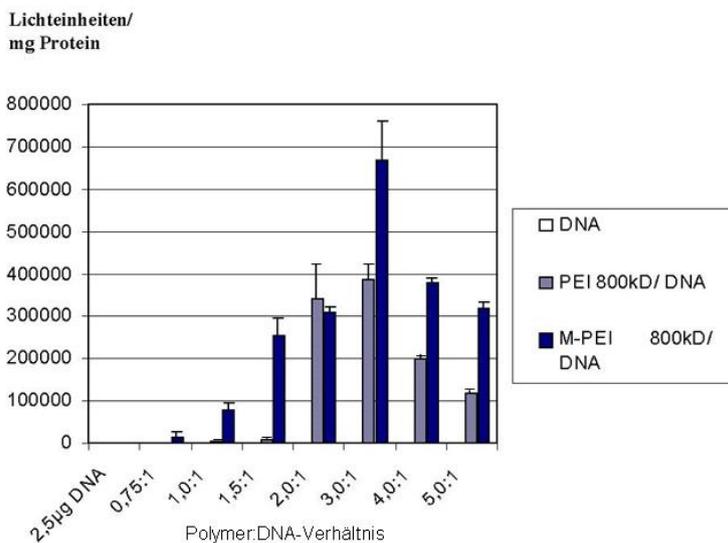


Abb. 32:

Luciferaseexpression unterschiedlicher Polymer/DNA Verhältnisse (konstante DNA Menge von 2,5µg, Variation der Polymer Menge, PEI/800kD und M-PEI/800kD). Luciferaseassay 24h nach Transfektion. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, n = 3.

5.5.2.2.4 Einfluß der DNA-Menge auf die Luciferaseexpression bei konstantem Verhältnis von mannosyliertem/nicht-mannosyliertem PEI/800kD und DNA von 3:1

Nach der Bestimmung eines Polymer/DNA-Verhältnisses von 3:1 als am besten für die Transfektionen geeignet, wurde die DNA-Menge bei konstantem Polymer/DNA-Verhältnis variiert. Bei einer Reduktion unterhalb 2,5 mg/ml zeigte sich, dass die Transfektionseffizienz linear mit der DNA-Menge abnahm. Die Überlegenheit der mannosylierten über die nicht-mannosylierte Polymerform (PEI/800kD) blieb hierbei erhalten.

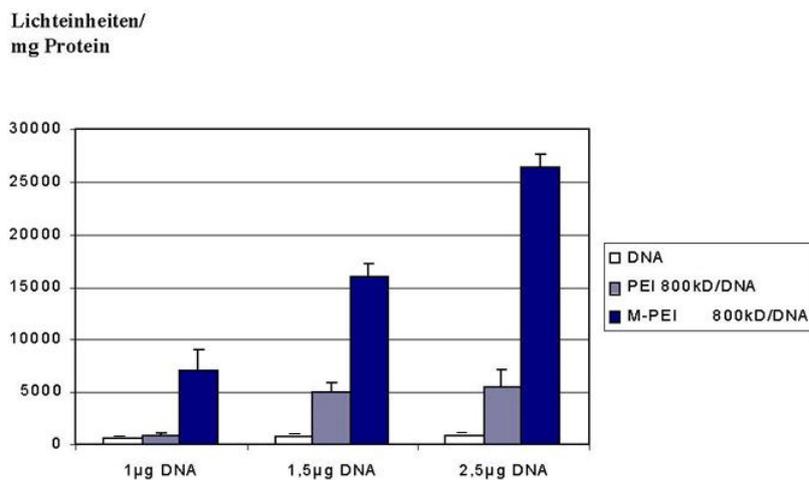


Abb. 33:

Luciferaseexpression bei unterschiedlichen DNA-Mengen und konstantem Polymer:DNA-Verhältnis von 3:1, PEI/800kD und M-PEI/800kD, Luciferaseassay 24h nach Transfektion. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

Bei einer Erhöhung der DNA-Menge zeigte sich oberhalb von 2,5µg ebenfalls ein Abfall der Luciferase Expressionsstärke bei M-PEI/800kD. Ein Verlust der Spezifität der mannosylierten Polymerform gegenüber nativem PEI/800kD zeigte sich ab 7,5µg DNA pro Transfektionsansatz.

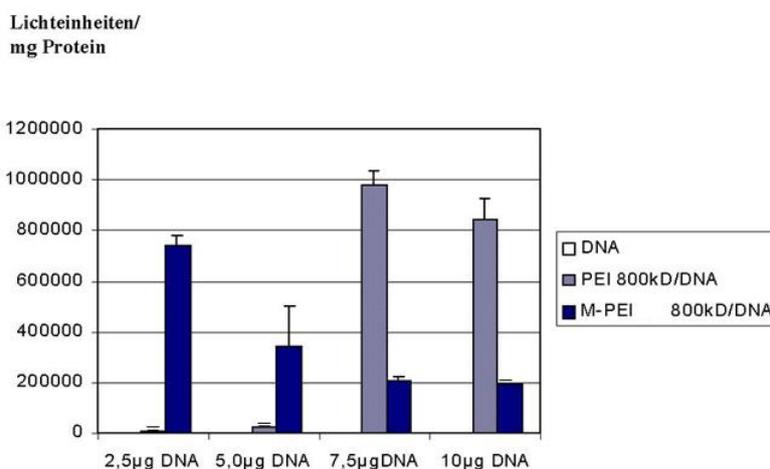


Abb. 34:

Luciferaseexpression bei Vergleich unterschiedlicher DNA-Mengen bei konstantem Polymer/DNA-Verhältnis (3:1), PEI/800kD und M-PEI/800kD, Luciferaseassay 24h nach Transfektion. Die Resultate sind dargestellt als $\bar{x} \pm SD$, $n = 3$.

5.5.2.2.5 Prozentsatz transfizierter Zellen

Zur Bestimmung des prozentualen Anteils transfizierter MMR61-Zellen wurde ein für das GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) kodierendes Plasmid als Reportergen gewählt. Hierbei wurde das zuvor optimierte Verhältnis von PEI/800kD bzw. M-PEI/800kD zu Plasmid-DNA von 3:1, bei 2,5 µg Plasmid eingesetzt. In der FACS-Analyse, die 24h nach Beginn der Transfektion durchgeführt wurde, betrug der Anteil transfizierter Zellen bei alleiniger Transfektion mit Plasmid-DNA 2%, bei Transfektion mit PEI 800kD/DNA-Komplexen 4% und bei Transfektion mit M-PEI 800kD/DNA-Komplexen 13%. Somit führte das mannosylierte PEI/800kD zu einer etwa 3fach höheren Transgen-Expression gegenüber dem nicht-mannosylierten Polyethylenimin.

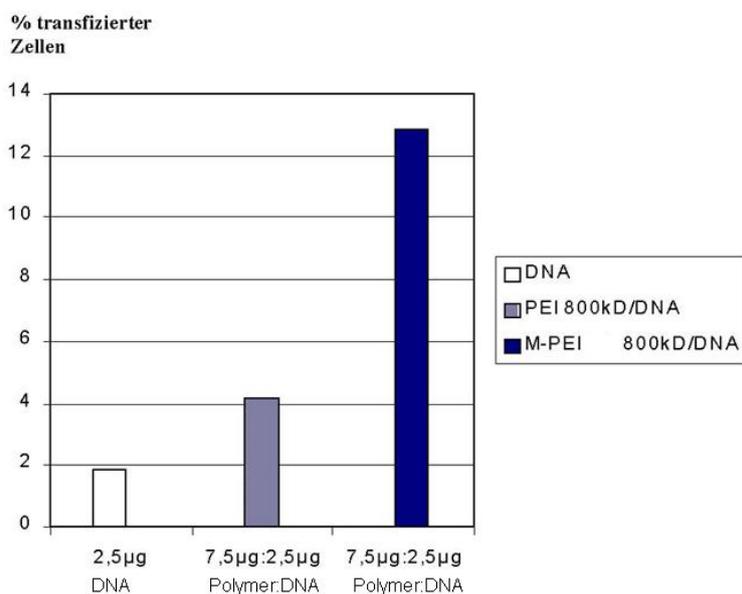


Abb.35:

Expression des GFP (Grün-fluoreszierendes Protein) in MMR61-Zellen, PEI/800kD und M-PEI/800kD, Anteil transfizierter Zellen, FACScan 24h nach Transfektion, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

5.5.2.2.6 Toxizität von PEI/800kD und M-PEI/800kD in MMR61-Zellen

MMR61-Zellen wurden für 4h dem polymerhaltigen Medium ausgesetzt und anschließend für weitere 20h unter Standardbedingungen kultiviert. Als Negativkontrolle wurde Standardmedium verwendet. Tote Zellen wurden anschließend mit Propidiumjodid markiert und mittels FACS-Analyse quantitativ bestimmt. Die Darstellung der Daten erfolgte als Prozent überlebender Zellen, aufgetragen gegen die Polymerkonzentration. Bei PEI/800kD betrug der Anteil toter Zellen 25%-40% bei 2,5µg-7,5% Polymer/ml Zellkultur (Konzentrationsbereich der Transfektionsexperimente). Bei M-PEI/800kD betrug der Anteil toter Zellen in diesem Konzentrationsbereich 42%-62%. In der Negativkontrolle zeigten sich bereits 11% tote Zellen.

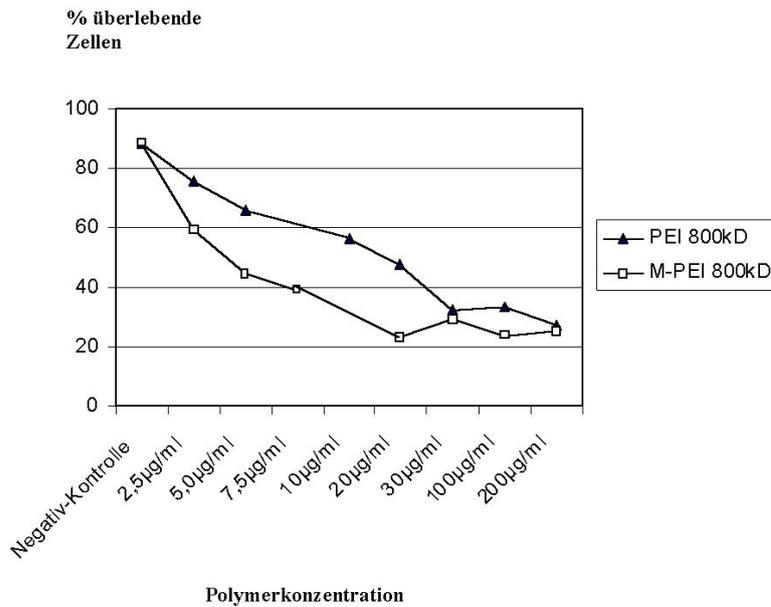


Abb. 36:

Toxizität von PEI und PEI-M gegenüber MMR61 Zellen, 24h nach Zusatz von PEI/800kD vs. M-PEI/800kD, Prozent überlebender Zellen, Propidiumjodidfärbung, FACS-Analyse, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

5.5.3. Transfektionsexperimente an humanen Dendritischen Zellen

5.5.3.1 Gentransfer mit mannosyliertem Poly-L-Lysin/30-50kD

Die im MMR61-System optimierten Bedingungen wurden auf humane Dendritische Zellen übertragen. Es wurden unreife Dendritische Zellen mit mannosyliertem und nativem Poly-L-Lysin/30-50kD im Polymer/DNA-Verhältnis von 2:1 (20µg:10µg) transfiziert. Hierbei zeigte sich keine Überlegenheit des mannosylierten über das nicht-mannosylierte Poly-L-Lysin. Die Luciferaseexpression der Polymeransätze war gegenüber der von nackter DNA ebenfalls nur unerheblich überlegen.

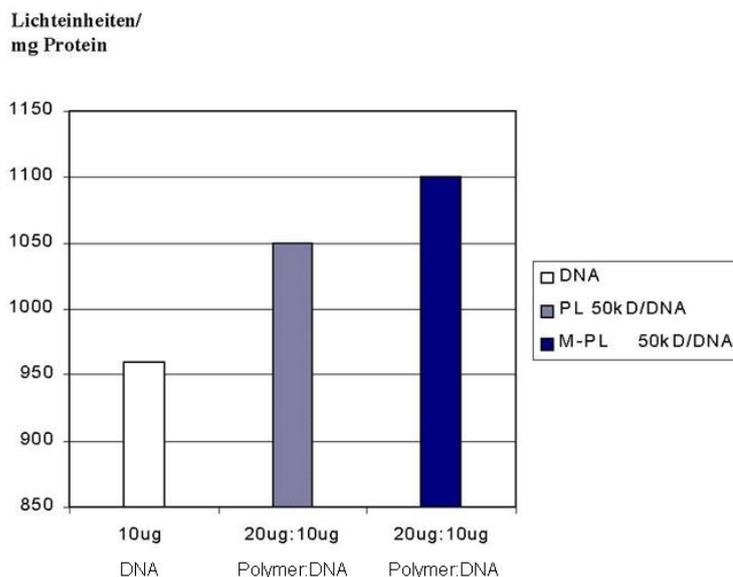


Abb. 37:

Luciferaseexpression in DC, Polymer/DNA-Verhältnis von 2:1 (20µg:10µg), Luciferaseassay 24h nach Transfektion, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

5.5.3.2 Gentransfer mit hochmolekularem mannosyliertem Polyethylenimin/800kD

5.5.3.2.1 Transfektionsexperimente

Für die Transfektion von humanen DC mit M-PEI/800 kD bzw. PEI/800 kD wurden ebenfalls die im MMR61-System optimierten Bedingungen herangezogen. Die verwendeten Polymer/DNA-Verhältnisse betragen 3:1 und 1:1. Beim 3:1 Verhältnis (7,5 µg: 2,5 µg) zeigte sich im Luciferaseassay nach 24 h eine 4,5fach höhere Expression des mannosylierten gegenüber dem nicht-mannosylierten PEI. Beim Verhältnis von 1:1 (4 µg:4 µg) zeigte sich eine ca. 3fach höhere Genexpression bei M-PEI/800 kD gegenüber PEI/800 kD.

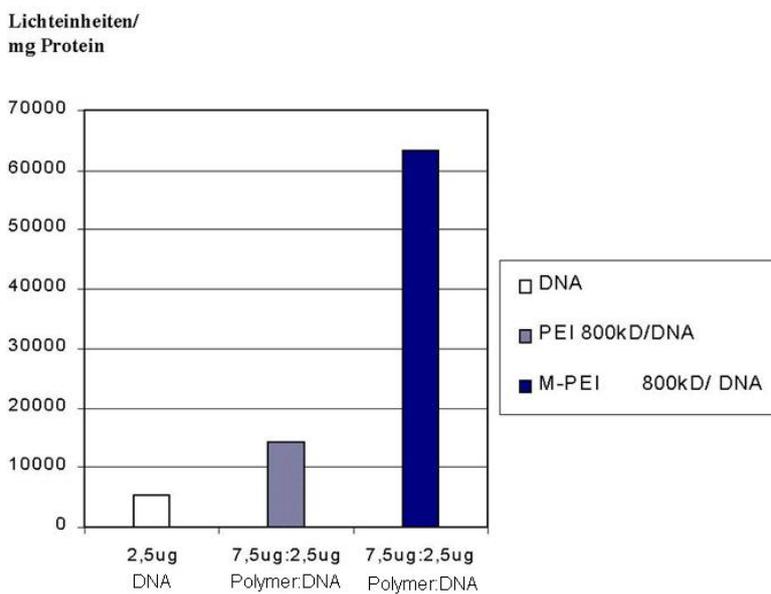


Abb. 38:

Luciferaseexpression in DC, Polymer/DNA-Verhältnis 3:1 (7,5µg:2,5µg), PEI/800kD und M-PEI/800kD, Luciferaseassay 24h nach Transfektion, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

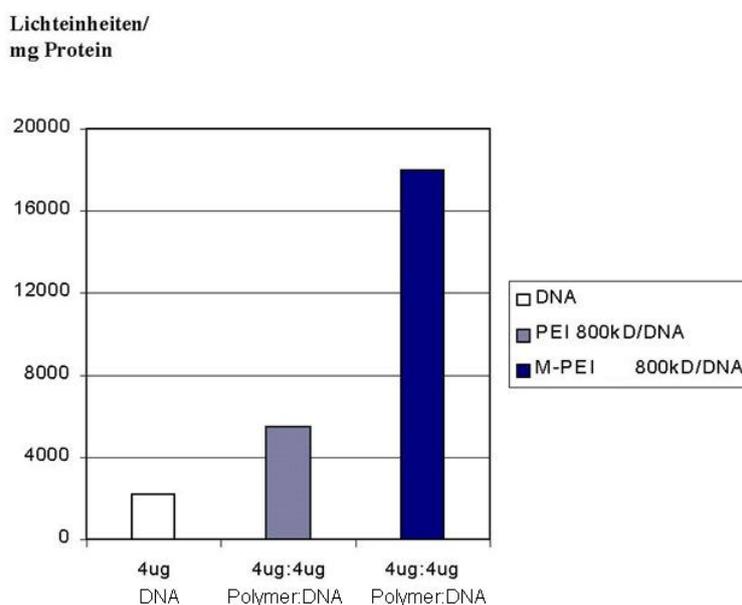


Abb. 39:

Luciferaseexpression in DC, Polymer/DNA-Verhältnis 1:1 (4,0µg:4,0µg), PEI/800kD und M-PEI/800kD, Luciferaseassay 24h nach Transfektion, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

5.5.3.2.2 Toxizität von PEI/800kD und M-PEI/800kD in DC

Zur Bestimmung der Toxizität von nicht-mannosyliertem und mannosyliertem PEI/800 kD auf humane Dendritische Zellen, im Vergleich zu nackter DNA, wurden diese für 4h dem Transfektionsmedium (Polymer/DNA=1:1) ausgesetzt und anschließend für weitere 20h unter Standardbedingungen kultiviert. Aufgrund der geringen Zahl verfügbarer Zellen wurde die Vitalität in diesem Experiment mittels Trypanblaumethode und nicht durchflußzytometrisch mit Propidiumjodid bestimmt. Die Darstellung der Daten erfolgt als Prozentsatz der überlebenden Zellen, aufgetragen gegen die Polymer- bzw. DNA-Menge pro ml Zellkultur. Bei Plasmid-DNA zeigten sich 8%-20% tote Zellen, bei PEI/800kD 18%-75% tote Zellen und bei M-PEI/800 kD 24%-80% tote Zellen im untersuchten Konzentrationsbereich von 4 µg-8 µg Polymer/DNA pro ml Zellkultur.

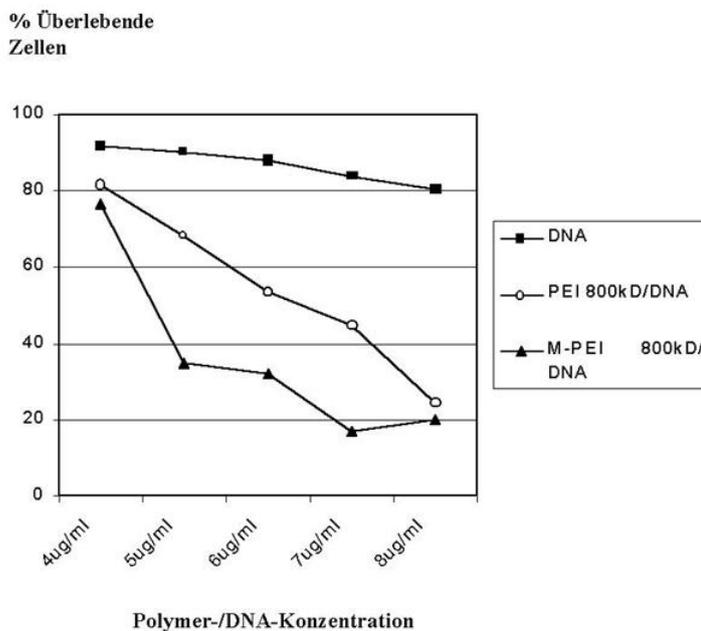


Abb.40:

Toxizität von Plasmid-DNA, PEI/800 kD und M-PEI/800 kD gegenüber humanen DC, % überlebender Zellen, Trypanblau-Färbung, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

5.5.3.2.3 Transfizierte DC-Präparationen/M-PEI/800 kD

An insgesamt 33 Präparationen von humanen DC unterschiedlicher Spender wurden Transfektionsexperimente mit hochmolekularem Polyethylenimin (PEI und M-PEI/800kD) durchgeführt. Der Anteil von DC-Präparationen mit Transgen-Expression betrug 21% (absolut 7). In diese Kategorie wurden diejenigen Zellpräparationen von DC gezählt, bei denen eine spezifische Transfektion (mittels M-PEI/800 kD) mit einer Reporter-gen-Expression über der Nachweisgrenze möglich war.

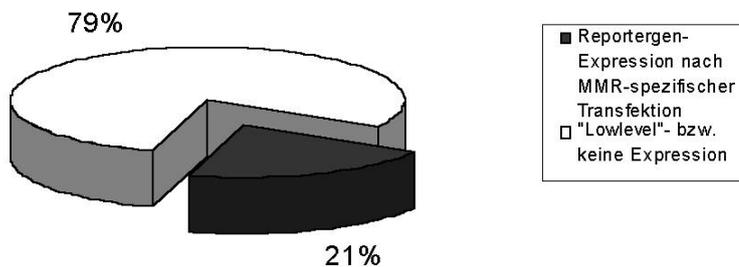


Abb. 41:
% DC-Präparationen mit Transgen-Expression nach Transfektion mit M-PEI/800kD, Gesamtzahl DC-Experimente: 33.

5.5.3.3. Gentransfer mit niedermolekularem mannosyliertem Polyethylenimin/50kD

5.5.3.3.1 Transfektionsexperimente

Zusätzlich zu dem in MMR61-Zellen optimiertem Transfektionssystem mit M-PEI/800 kD wurde in humanen DC niedermolekulares M-PEI/50 kD eingesetzt. Es wurden die mit hochmolekularem M-PEI optimierten Bedingungen übertragen. Bei einem Polymer/DNA Verhältnis von 3:1 zeigte sich bei M-PEI/50 kD eine 3,5 bis 11fache Transgen-Expressionsstärke gegenüber dem nativen Polymer.

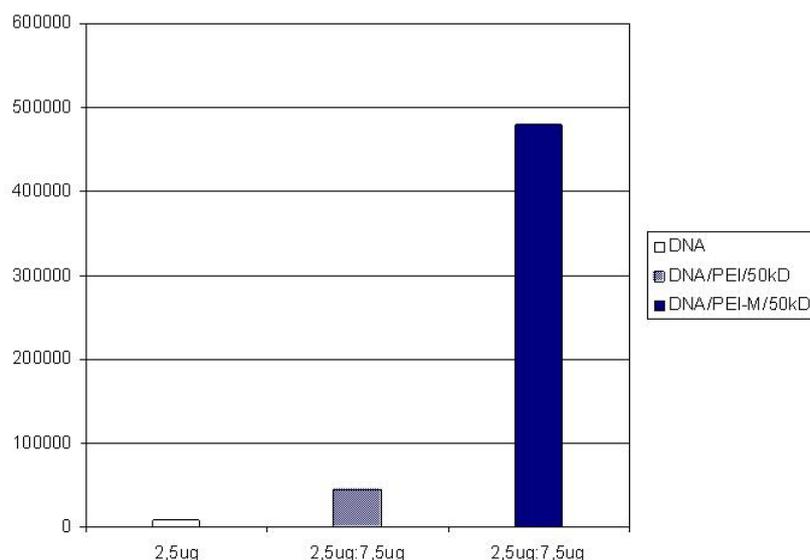


Abb. 42:
Expression des Firefly-Luciferase-Gens in humanen DC, Polymer/DNA-Verhältnis=3:1 (7,5µg:2,5µg), Luciferaseassay 24h nach Transfektion, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

Bei Verwendung eines Polymer/DNA-Verhältnisses von 1:1 (4 µg:4 µg) konnte eine bis zu 3,5fach höhere Luciferaseexpression mit dem mannosylierten gegenüber dem nativen Polymer nachgewiesen werden.

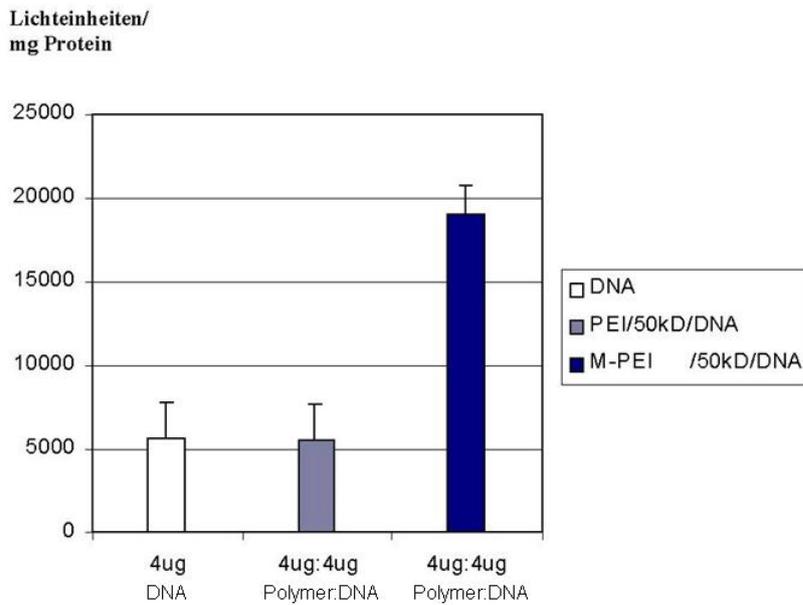


Abb. 43:

Luciferase-Expression in humanen DC, Polymer/DNA-Verhältnis=1:1 (4,0µg:4,0µg), Luciferaseassay 24h nach Transfektion, $\bar{x} \pm SD$, n=3.

5.5.3.3.2 Toxizität von PEI/50 kD und M-PEI/50 kD in DC

Im Toxizitätsassay mit PEI/50 kD und M-PEI/50 kD (gegenüber DNA) wurden humane DC für 4h dem entsprechendem Transfektionsmedium (Polymer/DNA=1:1) ausgesetzt und anschließend für weitere 20 h unter Standardbedingungen kultiviert. Tote Zellen wurden mit Trypanblau angefärbt und ausgezählt. Der Prozentsatz überlebender Zellen ist gegen die Polymer- bzw. DNA-Konzentration aufgetragen. Im untersuchten Konzentrationsbereich (2 µg/ml-8 µg/ml) betrug der Anteil toter Zellen bei DNA 13%-20%, bei PEI/50 kD 14%-51% und bei M-PEI/50 kD 15%-44%.

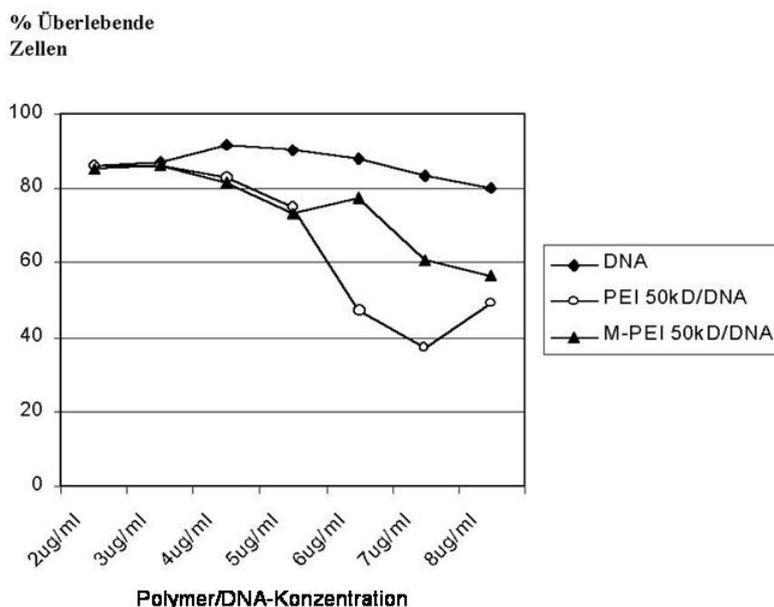


Abb. 44:

Toxizität von DNA, PEI/50 kD und M-PEI/50 kD gegenüber humanen DC, % überlebender Zellen, Trypanblaufärbung, Daten aus einem repräsentativen Experiment.

5.5.3.3.3 Transfizierte DC-Präparationen/M-PEI/50 kD

Niedermolekulares Polyethylenimin (PEI/50 kD und M-PEI/50 kD) wurde in Transfektionsexperimenten für 23 DC-Präparationen unterschiedlicher Spender eingesetzt. In 26% der Präparationen (absolut 6) konnten mittels M-PEI/50 kD DC spezifisch transfiziert werden. Zu dieser Kategorie wurden DC-Präparationen gezählt, bei denen eine spezifische Transfektion (mittels M-PEI/50 kD) mit einer Reporter-Expression über der Nachweisgrenze möglich war.

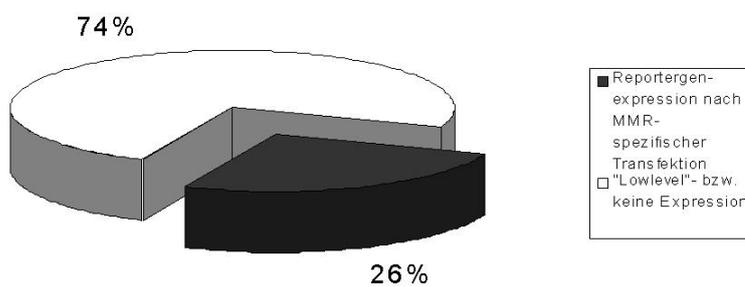


Abb. 45:

% DC-Präparationen mit Transgen-Expression nach Transfektion mit M-PEI/50 kD, Gesamtzahl DC-Experimente: 23.

6.0 Diskussion

Nicht-virale Transfektionssysteme stellen eine attraktive Alternative zu viralen Systemen dar, da Integrationsereignisse im Sinne einer Insertionsmutagenese sehr unwahrscheinlich sind [192], [193]. Hieraus ergibt sich die Perspektive eines risikoarmen klinischen Einsatzes von nicht-viralen Gentherapieprotokollen. Im Gegensatz hierzu belegen aktuelle klinische Daten von A. Fischer et al. die Risiken viraler Vektoren, mit dem Auftreten Akuter Leukämien als Nebenwirkung retroviraler Gentherapien bei Patienten mit X-chromosomaler „Schwerer Kombiniertes Immunschwäche“ (SCID-X) [192]. Durch nicht-virale Methoden lassen sich mitotisch ruhende Zellen selbst mit größeren DNA-Fragmenten transfizieren [143]. Mit dem Ziel eines zellspezifischen Gentransfers in vitro und der langfristigen Perspektive eines In-Vivo-Targeting wurde in der vorliegenden Arbeit eine Rezeptor-vermittelte Transfektion Dendritischer Zellen etabliert. Da der humane Makrophagen-Mannose-Rezeptor (MMR) auf DC in vitro stark exprimiert wird und wegen seiner vermuteten Funktion bei der Antigenaufnahme endozytotisch sehr aktiv ist, bot er sich als Target für einen Rezeptor-vermittelten Gentransfer an [76], [82], [110]. Wegen seiner Bindungsstärke zum MMR wurde α -D-Mannose als Ligand im Rahmen des vorgestellten Gentransfersystems ausgewählt (höchste Bindungsstärke zum MMR innerhalb der Monosaccharide). Als DNA-Trägermoleküle wurden die kationischen Polymere Poly-L-Lysin und Polyethylenimin eingesetzt. Für Poly-L-Lysin liegen langjährige Erfahrungen beim nicht-viralen Gentransfer vor [146], wohingegen PEI wegen seiner allgemein außerordentlich hohen Transfektionseffizienz attraktiv ist [158].

Die Herstellung von Poly-L-Lysin- bzw. Polyethylenimin-Glyco-Konjugaten wurde analog zur Bildung von Hydrolase-resistenten Thioharnstoffbindungen zwischen Aminosäuren und Monosacchariden durchgeführt [194], [195]. Der Anteil mannosylierter Monomere betrug mit dieser Methode ca. 6% bei Poly-L-Lysin (entspricht ca. 28 Mannose-Gruppen pro Poly-L-Lysin-Molekül) und bis zu 14% bei Polyethylenimin (entspricht ca. 54 Mannose-Gruppen pro Polyethylenimin-Molekül). Damit lag die Mannosylierungsrate im Größenbereich des von Monsigni et al. gefundenen Prozentsatzes glykosylierter Poly-L-Lysin-Monomere von ca. 10%, die für eine optimale Liganden-Erkennung durch Lektinrezeptoren notwendig sind [194].

Zur Etablierung des nicht-viralen Mannose-Rezeptor-vermittelten Gentransfersystems wurden die Transfektionsbedingungen zunächst in einem Modellsystem optimiert. Dies erfolgte in der Ratten-Fibroblasten-Zelllinie MMR61, die mit dem humanen MMR stabil transfiziert wurde. Als Negativkontrolle wurde deren parentaler Wildtyp, die Zell-Linie Rat6 benutzt. Für seine Eignung in der vorliegenden Arbeit waren die Daten von Taylor et al. entscheidend, die zeigten, dass der MMR auf MMR61-Zellen stark exprimiert wird und endozytotisch aktiv ist [115]. Die starke Proliferationsrate der Ratten-Fibroblasten-Linie machte größere Transfektionsserien zur systematischen Evaluation aller relevanten Transfektionsparameter durchführbar.

Das Prinzip einer spezifischen Transfektion über den MMR konnte durch Vergleich von M-PEI zu nativem PEI bestätigt werden. Hiermit zeigte sich eine bis zu 50fach höhere Transgen-Expression in MMR 61-Zellen bei M-PEI, wohingegen dieser Vorteil in der MMR-negativen Wildtyp-Zell-Linie Rat6 (Negativkontrolle) nicht nachweisbar war. Hierfür wird die höhere Effektivität der MMR-spezifischen

zytoplasmatischen Komplexaufnahme durch MMR61-Zellen gegenüber einer unspezifischen adsorptiven Endozytose nativer PEI-Komplexe bei Rat6-Zellen verantwortlich gemacht [196].

Bei Rat6-Zellen zeigte sich überraschenderweise ein Transfektionsvorteil des nativen gegenüber dem mannosylierten Polymer. Polyethylenimin ist jedoch per se ein sehr gutes Transfektionsagens, welches über unspezifische Interaktionen mit den negativ geladenen sulfatierten Proteoglykanen der Zellmembran aufgenommen wird. Es ist diesbezüglich möglich, dass die kovalente Bindung von Mannose-Resten an das Polymer zu Änderungen von Ladungseigenschaften, Lipophilie oder sterischen Faktoren führt, wodurch nachteilige Bedingungen für eine unspezifische Interaktion von PEI mit der negativ geladenen Zelloberfläche sowie den anschließenden Zelleintritt entstehen. Entsprechend zeigten Kunath et al. in einem systematischen Vergleich mit zunehmender Bindung von PEI-Amino-Gruppen an Laktose-Reste eine Abnahme der DNA-Komplexierungs- und Kondensationsfähigkeit, eine Zunahme der Polymer-DNA-Komplexgröße sowie eine Abnahme der kationischen Oberflächenladung (Zeta-Potential), bedingt durch einen Abschirmeffekt der Zucker-Liganden [197]. In der vorliegenden Arbeit ist möglicherweise ebenfalls von einer Abnahme des kationischen Oberflächenpotentials durch die Ligation von Mannose-Resten an die Polymere Poly-L-Lysin und Polyethylenimin auszugehen, obwohl in dem hier vorgestellten "gel retardation assay" sich bereits bei einem M-PEI/DNA-Verhältnis von 1:1 bis 2:1 eine überwiegende Komplexbildung der Plasmid-DNA zeigte. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass zwischen nativem und mannosyliertem PEI Unterschiede hinsichtlich des endosomolytischen „Escape“-Potentials sowie der Nukleasenresistenz bestehen, die die Verdauung eines größeren Anteils mannosylierter Transfektionskomplexe zur Folge haben.

Beim Vergleich von Poly-L-Lysin (50 KD) und Polyethylenimin (800 KD) zeigte sich ein eindeutiger Transfektionsvorteil von PEI. Die Transfektionseffizienz von mannosyliertem PEI (800 KD) war hierbei 30fach höher gegenüber der von mannosyliertem Poly-L-Lysin (50 KD). Eine ca. 100fach höhere Transgen-Expression bei Verwendung von nativem PEI im Vergleich zu nativem Poly-L-Lysin bestätigt die außerordentlich guten Transfektionseigenschaften des nativen Polyethylenimin. Zur Erklärung der Transfektionsunterschiede zwischen beiden Polymeren lassen sich die höhere Effektivität des endolysosomal Escape (hohe Pufferkapazität von PEI bewirkt Einstrom von Protonen und Wassermolekülen ins Endolysosomen und führt zur Desintegration der Vesikelmembran) sowie der stärkere Schutz vor zellulären Nukleasen bei PEI diskutieren [198], [199]. Diese Annahme wird durch Daten gestützt, die zeigen, dass sich die Transfektionseffizienz von Poly-L-Lysin durch zusätzliche Verwendung lysosomolytischer Substanzen (z.B. Influenza-Hämagglutinin) verbessern lässt, wohingegen dieser Effekt bei Kombination von PEI mit lysosomolytischen Substanzen geringer ausgeprägt ist [176], [161], [200], [201]. Dass die Plasmid-Halbwertszeit die Transgen-Expression beeinflusst ist zu erwarten, durch den zusätzlichen Einsatz von Nukleaseinhibitoren während der Transfektion und einer damit erzielten verbesserten Transgen-Expression konnten Ross et al. diesen Zusammenhang indirekt belegen [199]. Schließlich wird PEI, im Gegensatz zu Poly-L-Lysin ein Kerntropismus zugeschrieben (NLS-Aktivität), dessen Mechanismus bisher ungeklärt ist [202].

In den Optimierungsexperimenten mit MMR61 Fibroblasten zeigte sich eine stärkere Transgen-Expression bei Verwendung von mannosyliertem Poly-L-Lysin gegenüber nativem Polymer (bis 10fach), wobei sich das Polymer/DNA-Verhältnis von 2:1 als am besten erwies. Bei schrittweiser

Erhöhung der DNA-Menge und konstantem Polymer/DNA-Verhältnis stieg die Transgen-Expression bis zu einer DNA-Konzentration von 10µg/ml an und fiel oberhalb davon wieder ab. Parallel hierzu zeigten sich oberhalb einer DNA-Konzentration von 10µg/ml zunehmende Toxizitätszeichen in der Zellkultur. Analog war bei mannosyliertem PEI (800 KD) die Transgen-Expression in MMR61-Zellen gegenüber dem nativen Polymer bis 5fach stärker. In den Optimierungsexperimenten zum Polymer zu DNA-Verhältnis wurde beim Verhältnis von 3:1 die stärkste Transgen-Expression erzielt, wohingegen sich beim Verhältnis von 1:1 ein stärkerer spezifischer Transfektionsvorteil des mannosylierten gegenüber dem nativen PEI zeigte. Als ursächlich für den schwächeren spezifischen Transfektionsvorteil des mannosylierten PEI bei Erhöhung des Polymeranteils im Transfektionskomplex lassen sich ungünstigere sterische Bedingungen, insbesondere die mögliche Bildung größerer Aggregate aus Transfektionskomplexen diskutieren [203]. Unter diesen Bedingungen wird ebenfalls der prozentuale Anteil an ungebundenem Polymer zunehmen, welches mit dem Transfektionsprozess z.B. durch Konkurrenz um spezifische Bindungsstellen auf der Zelloberfläche interferieren kann [204].

Analog zu Poly-L-Lysin zeigte sich bei mannosyliertem Polyethylenimin eine Abnahme der Transfektionseffizienz ab einer bestimmten Polymerkonzentration, nach schrittweiser Erhöhung der Menge des Transfektionskomplexes (Polymer/DNA-Verhältnis 3:1 ab 22,5µg/ml, Polymer/DNA-Verhältnis 1:1 ab 7,5µg/ml). Parallel hierzu zeigte sich in diesem Konzentrationsbereich ein Verlust des spezifischen Transfektionsvorteils von mannosyliertem Polyethylenimin. Ursächlich hierfür sind wahrscheinlich toxische Effekte auf die transfizierten Zellen, insbesondere durch mannosyliertes Polyethylenimin. Hierbei ist zu bemerken, dass die Mannose-Liganden von glykosyliertem Polyethylenimin und Poly-L-Lysin Thiozyanat-Gruppen enthalten, welche ihre zelltoxische Wirkung durch Hemmung und Inaktivierung von P450-Isoformen entfalten [205], [206].

Neben der absoluten Transgen-Expressionsstärke ist für mögliche therapeutische Applikationen die Expressionsdauer von erheblichem Interesse. Beim Vergleich von Poly-L-Lysin und Polyethylenimin zeigte sich nach einmaliger Transfektion von MMR61-Fibroblasten bei mannosyliertem Poly-L-Lysin ein schneller Abfall der Transgen-Expression, so dass am Tag 6 nur noch eine geringe Genexpression nachweisbar war. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei mannosyliertem Polyethylenimin am Tag 6 noch eine Genexpression von ca. 60%. Als mögliche Erklärung hierfür ist eine verlängerte Halbwertszeit der transfizierten Plasmide durch einen besseren Schutz vor intrazytoplasmatischen Nukleasen nach Transfektion mit mannosyliertem Polyethylenimin zu diskutieren [198]. Die Wahrscheinlichkeit einer stärkeren Kernlokalisierung von Polyethylenimin-Transfektionskomplexen durch die vermutete NLS-Aktivität von PEI könnte ebenfalls hier einen wichtigen Einfluß haben [23].

Zur Beurteilung der Effizienz eines Rezeptor-vermittelten Gentransfersystems wird neben der Spezifität und der Stärke der Transgen-Expression insbesondere der Prozentsatz transfizierter Zellen bewertet. Die Transgen-Expressionsstärke hängt erheblich von der Art des verwendeten Promotors im Transfektionsplasmid sowie vom jeweiligen Zelltyp ab, wobei der jeweils optimale Promotor z.T. empirisch ermittelt werden muss. Als Beispiel sei hierfür ein Vergleich zwischen Renilla-Luciferase-Plasmiden (jeweils PromegaTM) mit CMV-Immediate Early Enhancer Promotor (sehr starke konstitutive Expression in vielen Säugerzellen, Genbank Nr. AF025843), SV40-Early Enhancer Promotor (starke konstitutive Expression in vielen Säugerzellen, transiente episomale Replikation durch „SV40-Origin of

Replication“ in immortalisierten Zellen mit „Large T-Antigen“, Genbank Nr. AF025845) oder HSV-TK-Promotor (niedrige bis mittelstarke Expression in Säugerzellen, Genbank Nr. AF025846) erwähnt. Folglich ist bei der Ermittlung des Prozentsatzes transfizierter Zellen zu beachten, dass bei der Benutzung von Plasmiden (z.B. für das Grün-fluoreszierende Protein) mit schwächeren Promotoren ein relativer Prozentsatz falsch negativer Zellen, d.h. von Zellen mit einer Transgen-Expressionsstärke unter der Nachweisgrenze, in Kauf zu nehmen ist. Das während der Durchführung der vorliegenden Experimente verfügbare GFP-Plasmid besitzt einen RSV-LTR-Promotor mit schwächerer Expression in vielen eukaryotischen Zellen als ein CMV- oder SV40-Promotor. Im Vergleich zum aktuell verfügbaren EGFP (enhanced green fluorescent protein) kodiert es des Weiteren ein mit schwächerer Intensität fluoreszierendes GFP-Reporterprotein [207]. Es ist somit davon auszugehen, dass die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Transfektionsrate von 12,8% in MMR61-Fibroblasten bei Transfektion mit mannosyliertem PEI (800 KD) gegenüber 4,1% bei Verwendung des nativen PEI (800 KD) unterhalb der tatsächlichen prozentualen Transfektionsrate liegt. Dabei ist anzumerken, dass z.B. mit laktosyliertem PEI in Atemwegsepithelien Transfektionsraten bis ca. 60% erzielt werden können [208].

Im Weiteren wurden die im MMR61-Fibroblastensystem optimierten Transfektionsbedingungen auf humane Dendritische Zellen übertragen. Dies war notwendig, da die begrenzte Zahl Dendritischer Zellen, die pro Buffy-Coat-Spender gewonnen werden konnte, nur begrenzt weitere Optimierungsexperimente gestattete. Als weiteres Problem erwies sich die eingeschränkte Vergleichbarkeit der DC-Präparationen unterschiedlicher Buffy-Coat-Spender, die sich unter anderem in einer individuell unterschiedlichen Transfizierbarkeit zeigte. Ein „Pooling“ verschiedener Buffy-coat-Präparationen zur Gewinnung größerer Zellmengen ist wegen der zu erwartenden Alloreaktivität aufgrund kontaminierender T-Zellen problematisch. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich DC prinzipiell, jedoch mit geringer Effizienz über den humanen Mannose-Rezeptor nicht-viral transfizieren lassen.

Da in MMR61-Fibroblasten mannosyliertes Poly-L-Lysin im Vergleich zu mannosyliertem PEI wesentlich weniger effektiv transfizierte, wurde in den Folgeexperimenten nur mit M-PEI in DC weitergearbeitet. Neben hochmolekularem PEI (800 KD) wurde hier zusätzlich niedermolekulares PEI (50 KD) eingesetzt. Mit mannosyliertem PEI (800 KD und 50 KD) konnten so ca. 25% der DC-Präparationen transfiziert werden. Die Verwendung von PEI-Derivaten mit kleineren Molekulargewichten wird durch eine Arbeit von Kunath et al. gestützt, die einen 2- bis 110fachen Transfektionsvorteil von 5,4 KD PEI gegenüber 48 KD PEI zeigte [209].

Im Weiteren hat bei der Transfektion humaner DC der Zeitpunkt innerhalb der mehrtägigen Differenzierungskultur der DC aus monozytären Vorläuferzellen eine erhebliche Bedeutung für die Effizienz des Mannose-Rezeptor-vermittelten Gentransfers. Irwin et al. konnten die besten Transfektionseffizienzen am Tag 4 der Differenzierungskultur aus monozytären Vorläuferzellen und somit bei unreifen DC erzielen. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Transfektion am Tag 5 bis 6, womit ebenfalls unreife DC zum Einsatz kamen. Ein Vergleich unreifer und reifer DC lässt vermuten, dass die reduzierte In-vitro-Expression des MMR auf reifen DC bei Verwendung mannosylierter Transfektionskomplexe zu Effizienzeinbußen führt [210]. Andererseits konnten Steinman et al. zeigen, dass die weitere Ausreifung transfizierter DC unkompliziert möglich ist [211], [212].

Als problematisch erwies sich im Weiteren die Toxizität, insbesondere von mannosyliertem Polyethylenimin auf Dendritische Zellen. Wie erwartet zeigte sich hier eine größere Empfindlichkeit von humanen DC im Vergleich zu MMR61-Fibroblasten. Wie bei MMR61-Zellen wird auch bei DC die Thiozyanat-Gruppe in M-PEI für die zusätzliche Toxizität verantwortlich gemacht [205]. Durch die Verwendung anderer Glykosylierungsmethoden, ohne den Einschluß von Thiozyanat-Gruppen, ließen sich in diesem Zusammenhang möglicherweise höhere Transfektionsraten durch eine geringere Toxizität der glykosylierten Polymere erreichen. Hierzu böte sich z.B. die reduktive Aminierung von Mannobiose nach Planck et al. als alternative Neoglykoprotein-Synthesemethode an [213], [214]. Interessanterweise zeigte sich bei niedermolekularem PEI (50 KD) in DC eine geringere Toxizität als beim hochmolekularen Polymer (800 KD). Eine vergleichbare Abhängigkeit der Toxizität vom Molekulargewicht des verwendeten PEI wurde jüngst von anderen Autoren beschrieben [209]. Für die PEI-vermittelte Toxizität scheint andererseits die Freisetzung lysosomaler Enzyme (Nukleasen und Proteasen) ins Zytoplasma durch eine Polymer-induzierte Endo-/Lysosomolyse hauptverantwortlich zu sein [158], [215]. Weiterhin konnte kürzlich gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den vom Autor benutzten verzweigten PEI-Molekülen, lineares PEI eine geringere Zytotoxizität aufweist [216]. Darüber hinaus ist zu diskutieren, ob interindividuelle Unterschiede der Empfindlichkeit gegenüber M-PEI verschiedene Transfektionsraten zwischen DC-Präparationen bedingen.

Neben der Toxizität ist die Integrität der Zellfunktion transfizierter DC ein weiteres Eignungskriterium für mögliche klinische Applikationen. Die Daten zur Beeinflussung des Phänotyps von DC nach Transfektion sind hierbei uneinheitlich und abhängig vom verwendeten Transfektionssystem. Nach Transfektion mit Pockenvirus-Vektoren zeigt sich z.B. eine Suppression der allostimulatorischen Kapazität [217], andererseits zeigt sich ein neutraler Einfluß auf die Reifung und Funktion von DC bei Verwendung adenoviraler Vektoren [218]. Irwine et al. transfizierten vergleichbar mit der hier vorliegenden Arbeit unreife DC (HLA Klasse I + und II +, CD 86+, CD 40+, CD14-, CD83-) nicht-viral und konnten ähnliche Eigenschaften zur T-Zell-Stimulation bei transfizierten und nicht transfizierten DC nachweisen. Der Phänotyp der unreifen DC sowie deren Ausreifungsfähigkeit wurden durch die Transfektion nicht beeinträchtigt [210], [219].

Der Prozentsatz mittels nicht-viralen Methoden transfizierter Zellen liegt bei DC bisher lediglich bei maximal 20% [220], gegenüber bis zu 90% transfizierter DC bei Verwendung viraler Methoden [221]. Andererseits ist die zur Induktion einer ausreichend potenten CTL-Antwort notwendige DC-Transfektionsrate bisher unbekannt. Irwine et al. zeigten in diesem Zusammenhang, dass bereits eine Transfektionseffizienz von ca. 5% der DC zu einer mindestens vergleichbaren In-vitro-Zellstimulation führt wie ein Peptid-"Pulsing" [210]. Analog konnte in In-Vivo-Experimenten gezeigt werden, dass bereits geringe DC-Transfektionsraten zu einer CTL-Antwort führen [222], [223], [210]. Ein interessanter Mechanismus zur Potenzierung der Präsentation gering konzentrierter Antigene besteht in dem von Knight et al. beschriebenen möglichen Antigen-Transfer von transfizierten auf nicht transfizierte DC [224]. Ob es außerdem in DC wie in Makrophagen einen durch apoptotische Körper vermittelten horizontalen Gentransfer und somit einer Wiederverwendung externer DNA gibt, ist bisher noch ungeklärt [225], [226]. Im Hinblick auf die zur optimalen T-Zellstimulation notwendige Transgen-Expressionsdauer liegen ebenfalls derzeit noch keine abschließenden Daten vor [227], [228], [229]

wobei eine Transgen-Expression in DC von über 1 Woche nach viraler Transfektion [230] kürzeren Zeiträumen (Stunden bis Tage) nach nicht viraler Transfektion gegenübersteht [231].

Im Vergleich zur Ratten-Fibroblasten-Linie MMR61 erwiesen sich humane DC als wesentlich schwerer transfizierbar. Insbesondere ließen sich ca. 75% der DC-Präparationen überhaupt nicht transfizieren. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass DC in ihrer Funktion als professionelle APC über ein potenteres degradierendes Potential verfügen als MMR61-Zellen und nach MMR-vermittelter Endozytose die aufgenommenen Transfektionskomplexe möglicherweise in den degradativen „Pathway“ dirigieren. Außerdem ist eine Stimulation der Sekretion lysosomaler Enzyme mit weiterer Steigerung des degradativen Potentials nach Interaktion eines Liganden mit dem MMR in APC kürzlich beschrieben worden [232]. Zudem ist eine geringere Effizienz des nicht-viralen Gentransfers in primären Zellen gegenüber immortalisierten Zell-Linien allgemein bekannt. Als Erklärung hierzu lassen sich u.a. eine individuelle Variabilität primärer Zellpopulationen sowie intakte Prozesse der Transkriptions- und Translationsregulation [233] anführen. Diese Fähigkeit primärer Zellen dient hierbei u.a. der Kontrolle potentiell gefährlicher Fremd-DNA, beispielsweise bei der Abwehr viraler Infektionen [234]. In diesem Sinne stellen Transfektionsplasmide ebenfalls Fremd-DNA dar. Vergleicht man proliferierende primäre Zellen mit ausdifferenzierten bzw. postmitotischen Zellen, so sind letztere, wie z.B. Dendritische Zellen, noch schwerer transfizierbar [235]. Ein Grund hierfür ist u.a. die Auflösung der Kernmembran in der Prophase der Mitose, welche eine der Hauptbarrieren des nicht-viralen Gentransfers darstellt, indem sie eine effektive Kernlokalisation der Plasmid-DNA einschränkt. Analog konnte Brunner et al. bei Verwendung nicht-viraler Methoden wie Lipofektion und polykationische DNA-Carrier eine Abhängigkeit der Transfektionseffizienz von der Zellzyklusphase nachweisen. Es zeigte sich dabei eine 30- bis 500fach höhere Transfektionseffizienz von in der S/G1-Phase synchronisierten Zellen (prämitotisch) gegenüber in der G1-Phase synchronisierten Zellen (postmitotisch) [236].

Im Weiteren bedarf die uneingeschränkte Eignung des Mannose-Rezeptors (MMR) als Target eines gerichteten, nicht-viralen Gentransfers einer kritischen Prüfung. Es ist zu vermuten, dass der MMR wegen seiner starken In-vitro-Aktivität bei der Endozytose glykosylierter Antigene, Mannose-verknüpfte Transfektionskomplexe zwar effizient internalisiert, dann jedoch in ein lysosomal sehr aktives Zellkompartiment transferiert [128], [237], [238], [72], [76]. Als Einschränkung für geplante In-Vivo-Applikationen sind darüber hinaus lösliche Formen des MMR zu werten, die mit zellständigen Mannose-Rezeptoren um Ligand-verknüpfte Transfektionskomplexe konkurrieren würden [133]. In-vivo-Expressionsstudien an Mäusen waren darüber hinaus nicht in der Lage, die Expression des MMR auf Dendritischen Zellen nachzuweisen, woraus sich die Möglichkeit ergibt, dass die MMR-Expression auf DC lediglich ein In-vitro-Phänomen darstellt, welches Folge spezifischer Kulturbedingungen ist [239]. Entsprechende Expressionsstudien im humanen System sind derzeit jedoch noch ausstehend. Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit alternative Rezeptor-Targets auf DC zu identifizieren.

Dabei stellt der mit dem MMR strukturverwandte Lektinrezeptor DEC-205 wegen seiner Fähigkeit zur Induktion einer starken T-Zellantwort im Rahmen der Antigenpräsentation [240], [241] einen aussichtsreichen, kürzlich beschriebenen Kandidaten dar [112], [242]. Wittmer-Pack et al. konnten diesbezüglich eine starke Expression des DEC-205 auf DC in T-Zellzonen von Lymphknoten zeigen [243]. Kato N. et al. klonierten erstmalig cDNA des humanen DEC-205 aus DC [242], wohingegen Guo

N. et al. erstmalig einen mAb gegen den DEC-205 auf humanen DC entwickelten [137]. Nach der Interaktion mit einem glykosylierten Antigen kommt es zur raschen Endozytose des DEC-205-Ligandkomplexes, was ihn als Target eines Rezeptor-vermittelten Gentransfers qualifiziert [77], [41]. Da der natürliche Ligand des DEC-205 bisher noch nicht identifiziert ist, stellt die Verknüpfung eines Transfektionskomplexes mit einem DEC-205-spezifischen monoklonalen Antikörper hierbei einen möglichen experimentellen Ansatz darstellen [137]. Jiang et al. zeigten in DC, dass an DEC-205 gebundene Antigene effektiv über „coated pits“ in endozytotische Vesikel aufgenommen werden und anschließend in ein spätendosomales MHC-Klasse-II-reiches Kompartiment gelangen [77]. Im Gegensatz hierzu werden durch den MMR gebundene glykosylierte Antigene in ein frühes endosomales Kompartiment transportiert. Die Effektivität der Antigenpräsentation bei einem Transit durch DEC-205-vermittelte späte Endosomen und Lysosomen ist bis zu 100fach stärker als beim MMR-vermittelten Antigen-Prozessierungs- und Präsentations-Kompartiment [77], [240], [244]. Es ist somit möglich, dass der MMR aufgenommene Antigene in „oberflächlicher“ gelegene Endosomen mit höherem degradierendem Potential leitet. Der DEC-205 scheint hingegen durch Beförderung des Antigens in „tiefere“ MHC-Klasse-II-reiche Endosomen eine prominentere Funktion bei der Antigenpräsentation zu haben. Die genannten Unterschiede im Antigentransport beruhen dabei auf unterschiedlichen Signalsequenzen im intrazellulären Rezeptoranteil zwischen MMR und DEC-205 [240]. Ob sich durch chimäre Proteine, mit gewünschter Antigenstruktur und den genannten Signalsequenzen des DEC-205, der erwähnte Mechanismus zur Verstärkung der Antigenpräsentation ausnutzen lässt, bleibt zu überprüfen.

Nach der Rezeptor-vermittelten Endozytose stellt der endolysosomale Escape der Transfektionskomplexe den folgenden entscheidenden Schritt des Transfektionsprozesses dar. Die geringe endosomolytische Potenz von Poly-L-Lysin wurde für dessen geringere Transfektionseffizienz gegenüber PEI in der vorliegenden Arbeit im Wesentlichen verantwortlich gemacht. Durch die Integration zusätzlicher endosomolytischer Elemente, wie z.B. pH-sensitive fusogene Peptide bzw. Proteine, in die Transfektionskomplexe konnten andere Arbeitsgruppen die Transfektionseffizienz nicht-viraler Systeme in primären Zellen erhöhen [176]. Mit viralen Peptiden, wie dem N-Terminus des Influenzahämagglutinin HA-2 oder amphoteren Peptiden wie dem GALA-Peptid (Aminosäuresequenz: WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALAA) konnte z.B. die Transfektionseffizienz von Poly-L-Lysin bis 1000fach gesteigert werden [245], [246]. Da PEI selbst starke membrandestabilisierende Eigenschaften besitzt, lässt sich durch die Verwendung zusätzlicher endosomolytischer Elemente keine große Steigerung der Transfektionsrate mehr erzielen [25]. So ist anzunehmen, dass die kürzlich beschriebene PEI-„Adenofection“ (Komplexbildung aus PEI, DNA und Adenoviralen Partikeln) ihre zusätzliche Effizienzsteigerung eher über eine Adenovirus-spezifische Zellaufnahme, z.B. über den CAR-Rezeptor erzielt [247], [248], [229].

Nach dem endosomalen Escape sind die Transfektionskomplexe zytoplasmatisch lokalisiert, und müssen anschließend die Kernbarriere überwinden, damit der Transkriptionsprozess des Transgens ermöglicht wird [249], [250]. Für Molekülgrößen ab 40 bis 60kD stellt der Zugang zum Kernkompartiment jedoch einen aktiven, energieabhängigen Prozess dar, der an die Wirkung von NLS (nuclear localisation signal) gebunden ist [186]. PEI besitzt im Gegensatz zu Poly-L-Lysin wie erwähnt wahrscheinlich selbst eine gewisse NLS-Aktivität, andererseits lassen sich NLS zusätzlich in die

Transfektionskomplexe integrieren. Solche NLS sind typischerweise Bindungssequenzen für Transkriptionsfaktoren, welche, wenn sie im Transfektionsplasmid enthalten sind, über eine Erhöhung des nukleären Importes eine Steigerung der Transfektionseffizienz bewirken [251], [252], [253]. Besonders interessant für die vorliegende Arbeit sind Daten, die einen Kernzutritt über Lektinrezeptoren statt über klassische NLS-Rezeptoren beschreiben [254]. Da bereits nicht mannosyliertes Polyethylenimin über den Mechanismus der unspezifischen absorptiven Endozytose und nachfolgender Endosomolyse einen effektiven zytoplasmatischen Eintritt der Transfektionskomplexe ermöglicht, ließe sich der deutliche zusätzliche Transfektionsvorteil von mannosyliertem PEI evtl. auf dessen bessere Fähigkeit zur Kernlokalisierung über die genannten zuckerbindenden Rezeptoren (Lektine) auf der Kernmembran zurückführen.

Die Halbwertszeit der in den Zellkern gelangten Plasmid-DNA wird sowohl durch zelluläre Nukleasen [149] als auch durch den Verlust der episomal verbleibenden Plasmide bei der Zellteilung eingeschränkt [255]. Die alternativ mögliche Generierung stabiler Transfektanten (z.B. mittels des Neomycin-Resistenzgens und Selektion von Zellklonen mit chromosomaler Integration des mit dem Resistenzgen gekoppelten Fremdgens eignet sich zwar für die schnellproliferierende MMR61-Fibroblastenzelllinie, nicht jedoch für ausdifferenzierte, nicht-proliferierende humane DC [256]. Außerdem wäre bei einer stabilen Transfektion das erhöhte Risiko einer Insertionsmutagenese in Kauf zu nehmen.

Transfizierte DNA unterliegt im Weiteren einem „Gene-Silencing“ (Unterdrückung von Fremdgenexpression) [257], [258], [259]. Solche Mechanismen, für die insbesondere frisch transfizierte DNA anfällig ist, sind u.a. die Bildung von Heterochromatin durch Rekombination homologer DNA-Sequenzen (RIGS) [260], [261], [262] sowie die transkriptionelle Inaktivierung von Transgenen durch Hypermethylierung [263]. Durch Hemmung der Histon-Deacetylase-vermittelten Heterochromatinbildung (z.B. mit Trichostatin-A) ließen sich möglicherweise auch höhere Transfektionseffizienzen im nicht-viralen Transfektionssystem erzielen [264], [257]. Eine weitere Schlüsselstelle auf dem Weg zum transgenen Protein stellen posttranslationale Silencing-Mechanismen dar, die in die Expressionskontrolle involviert sind. Neben der RNA-Interferenz [265] scheint es hierbei auch eine Abhängigkeit von dem Intron Gehalt im Transfektionsplasmid zu geben, wobei Intron-reichere Plasmide als die in dieser Arbeit verwendeten, stärkere Transgen-Expressionen ermöglichen [266].

Die im „read-out“ gemessene Transgen-Expression ist proportional der Menge des transkribierten Fremdproteins, dessen Quantität von der Proteinsyntheserate einerseits und der Protein-Halbwertszeit andererseits determiniert wird. Nach Ubiquitinierung des transgenen Proteins erfolgt die weitere Degradation durch Proteasomen, die sich jedoch nicht spezifisch für das transgene Protein hemmen lassen [267].

Verschiedene Weiterentwicklungen in Teilproblemen des nicht-viralen Gentransfers lassen auch für die Transfektion humaner DC weitere Optimierungen erwarten. Innovationen zeichnen sich auf dem Gebiet DNA-aggregierender Substanzen, gewebespezifischer Promotoren, selbstreplizierender Plasmide sowie dem Design transgener Proteine ab. Als alternative DNA-aggregierende Substanzen, die sich für einen nicht-viralen Gentransfer in DC eignen, lassen sich Polyamidoamin-Dendrimere und Cholesterolderivate nennen. Von besonderem Interesse ist jedoch das kationische Peptid CL-22, mit

dem bereits bis zu 17% unreifer MoDC (aus Monozyten generierte DC) transfiziert werden konnten [210], [219]. Bei Plasmiden beziehen sich weitere Neuerungen auf die Entwicklung von gewebe- bzw. zellspezifischen Promotoren, wie der für humane reife DC spezifische Fascin-Promotor [268], [269], [270] sowie die Entwicklung eines zellspezifischen „nuclear entry“ [251]. Hiermit ist eine weitere Erhöhung der Spezifität des Gentransfers zu erwarten, was für mögliche In-vivo-Applikationen mit Expression des Zielrezeptors auch außerhalb Dendritischer Zellen von erheblicher Bedeutung ist [271], [112], [243]. Ferner lassen sich Transfektionsplasmide für TAA bzw. transgene Proteine durch die Integration von molekularen Mustern bakterieller DNA im Sinne eines „internen Adjuvans“ so verändern, dass Effekte der unspezifischen Immunstimulation am Ort der Transgen-Expression erzielt werden können. Solche typischen Motive stellen z.B. gehäufte CpG-Dinukleotide oder Formyl (-CHO)-Methionin dar [272], [47]. Beim Design transgener Proteine eröffnet die Möglichkeit der Bildung von Fusionsproteinen eine Vielzahl von Optimierungs- und Variationsmöglichkeiten. Beispiele hierfür sind chimäre Proteine aus TAA und spezifischen Signalsequenzen, z.B. intrazytoplasmatische Sequenzen des DEC-205, die eine Beförderung in späte endosomale Kompartments und damit eine verstärkte MHC-Präsentation bewirken [240]. Grundsätzlich besteht das Ziel in der weiteren Entwicklung einfacher, sicherer und klinisch einsetzbarer nicht-viraler Vektoren, die im Sinne „künstlicher Viren“ leistungsfähige Merkmale bezogen auf das „Targeting“, die Expressionsstärke und die Expressionsdauer aufweisen [253].

Resümierend läßt sich feststellen, dass eine spezifische nicht-virale Transfektion über den MMR in Zell-Linien mit hervorragender Effizienz möglich ist und sich prinzipiell für die Transfektion von DC eignet. In humanen MoDC zeigt jedoch der alleinige Einsatz von mannosyliertem Polyethylenimin zur nicht-viralen Transfektion eine geringere Effizienz. Diese ist durch zusätzliche „Enhancer“, adenovirale Partikel oder von adenoviralen Proteinen abgeleitete Peptide (PEI-„Adenofection“) weiter steigerbar [248], [229], [273]. Hierbei ist jedoch noch nicht geklärt ist, ob für den Effizienzgewinn die endosomolytische Komponente [173] oder eine verstärkte Zellaufnahme über den CAR-Rezeptor verantwortlich ist [247], [274].

Abschließend stehen zur In-vitro-Transfektion von DC derzeit effektivere Methoden als das hier vorgestellte Transfektionssystem zur Verfügung, obwohl ein „proof of principle“ für sein Funktionieren erbracht werden konnte und es sich durch biologische Sicherheit auszeichnet. Die im Gegensatz zu den Arbeiten von M. Zenke et al. [229], [273] erzielte schlechte Transfektionseffizienz in MoDC ist auf die wahrscheinlich zusätzliche Notwendigkeit adenoviraler Komponenten zurückzuführen. Über die Eignung des Mannose-Rezeptor-vermittelten Gentransfers für ein In-vivo-Targeting werden jedoch weitere Experimente im Tiermodell entscheiden.

7.0 Anhang

Bei der Auswahl des Humanen Mannose-Rezeptors (MMR) war dessen hohe endozytotische Aktivität maßgeblich. Die von Taylor et al. durchgeführten Experimente an MMR61-Zellen zeigten einen hohen Ligandumsatz. ^{125}I markiertes mannosyliertes bovines Albumin wurde über den in MMR61-Fibroblasten transfizierten Mannose-Rezeptor endozytiert und im endolysosomalen Kompartiment prozessiert. Die Radioaktivität des Mediums ist proportional zur Menge der von MMR61-Zellen abgegebenen Digestionsprodukte und somit ein Maß für die endozytotische Aktivität.

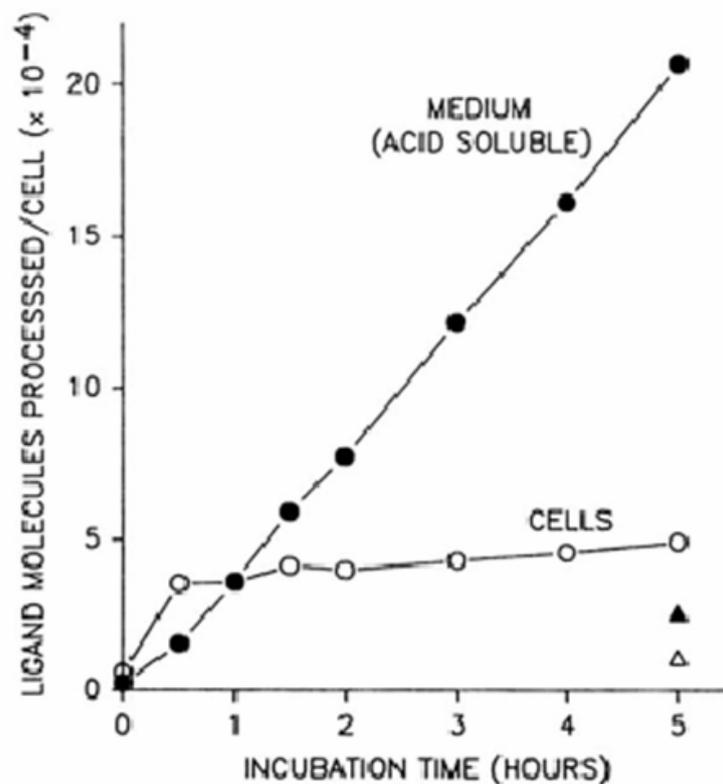


Abb. 46:

Aufnahme von mannosyliertem ^{125}I -markiertem bovinem Albumin. (30-40mol Mannose/mol Protein) durch MMR61 Fibroblasten, Präinkubation des Liganden mit MMR61 ($2,5 \times 10^6$ Zellen/35mm-plate) für 30min bei 4°C , nachfolgend Inkubation bei 37°C über die angegebenen Inkubationszeiten, gemessen wurde die Zell-assoziierte Radioaktivität (offene Kreise und Dreieck) und die mit säurelöslichen Fragmenten assoziierte Radioaktivität im Medium (geschlossene Kreise und Dreieck), Übernahme der Abb. von M.E. Taylor, [115].

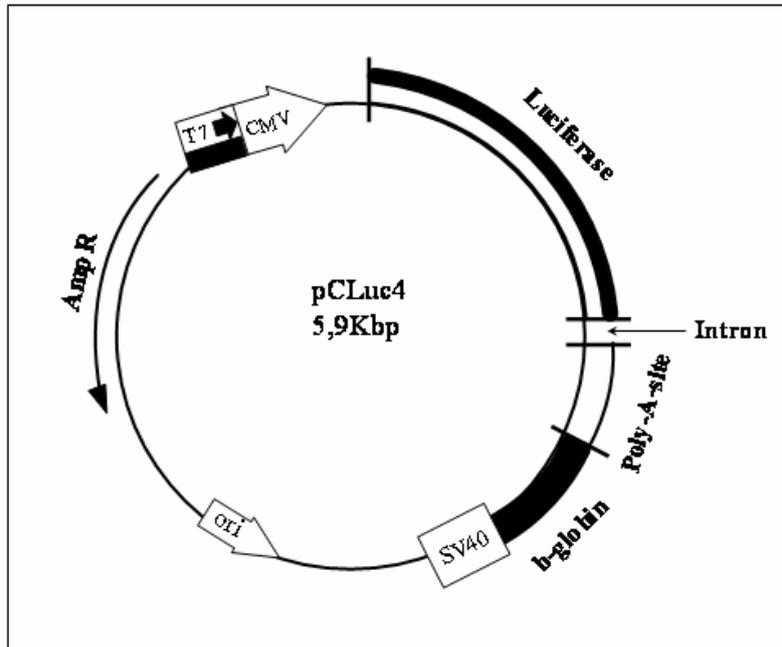


Abb. 47:

Schema des Plasmidvektors pCLuc4, Luciferasegen unter Kontrolle des CMV-Promotors

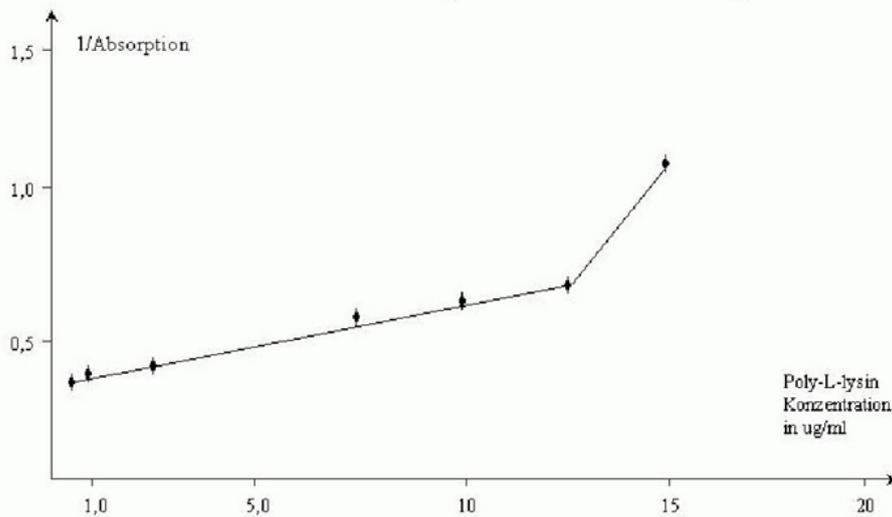


Abb. 48:

Standardkurve für Poly-L-Lysin (MW:26.500kD), Konzentrationsbestimmung mit Trypanblau, Kehrwert der Absorption des Überstandes aufgetragen zur Poly-L-Lysin-Konzentration, Wellenlänge:580nm, linearer Extinktionskoeffizient nur bis zur Poly-L-Lysin Konzentration von 12,5µg/ml daher nur Berechnung des Extinktionskoeffizienten für den Konzentrationsbereich von 0,5µg/ml bis 12,5µg/ml: - 0,08225/µg/ml.

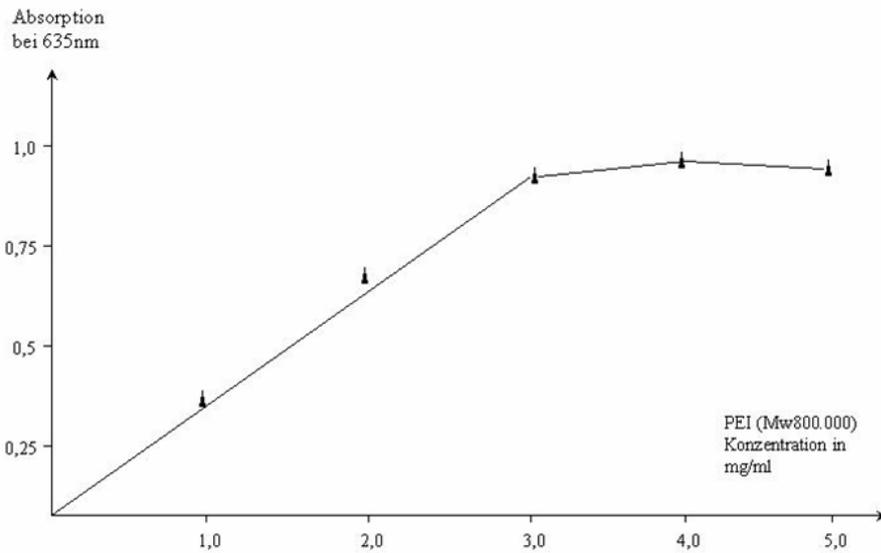


Abb. 49:

Standardkurve für Polyethylenimin (MW:800.000), Konzentrationsbestimmung mittels Kupferchelatformung, Absorptionsmessung bei $\lambda=635\text{nm}$, verwertbarer Konzentrationsbereich < 3,0mg/ml PEI.

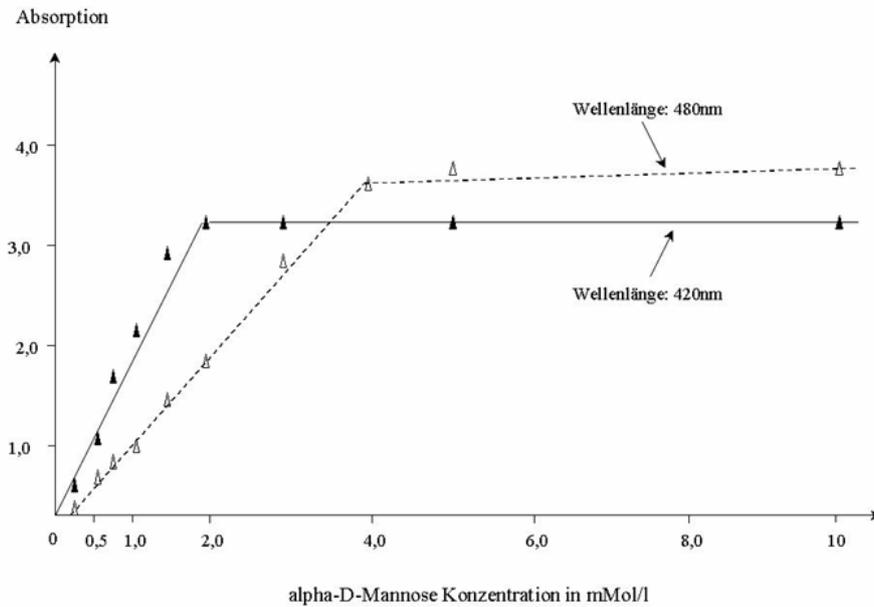


Abb.

50:

Standardkurve für α -D-Mannose, „Resorcinol Sulfuric Acid Micromethod“, Messung bei $\lambda=420\text{nm}$ und 480nm .

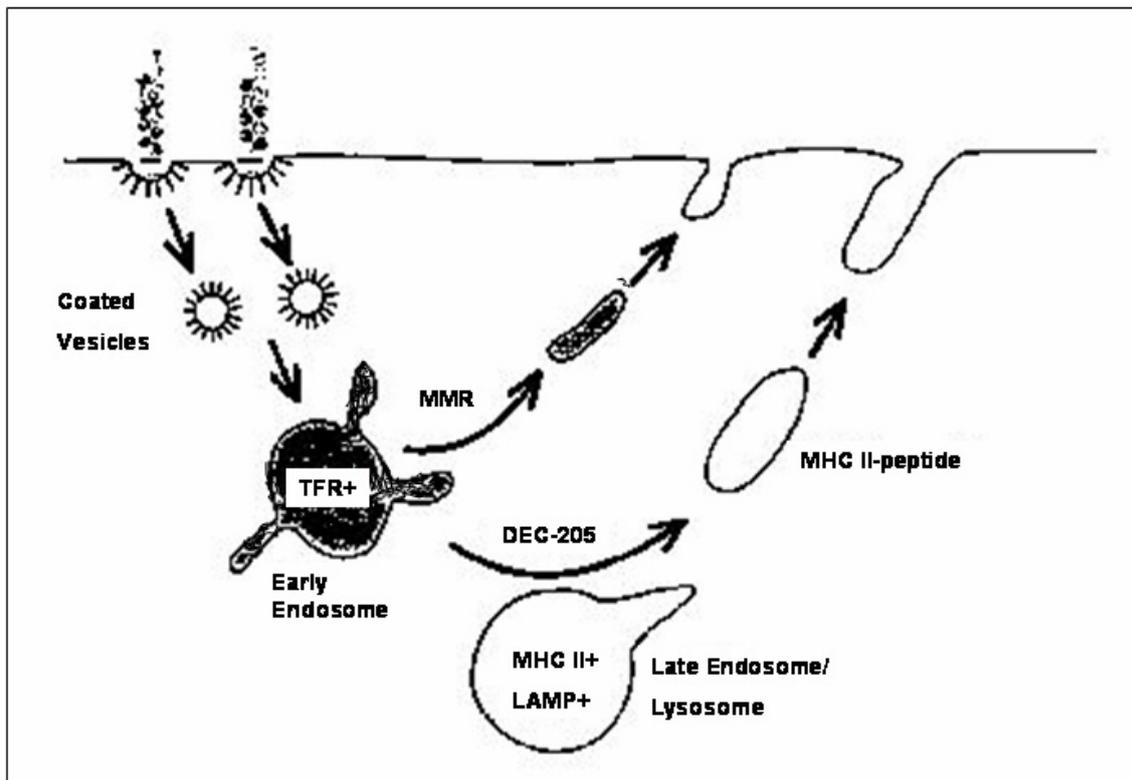


Abb. 51:

Unterschiedliche Intrazelluläre Passage des Mannose-Rezeptors (MMR) und des DEC-205. Der MMR dient der adsorptiven Endozytose und liefert Antigene in frühe endosomale Kompartments (Transferrin-Rezeptor (TFR) positiv). DEC-205 hingegen liefert Antigene in tiefe spätendosomale MHC-Klasse-II reiche Kompartments (Lysosomen-assoziierte-Membran-Proteine-LAMP-positiv). Hier erfolgt eine teilweise Verdauung zu Peptiden, die mit hoher Effizienz über MHC-Klasse-II-Komplexe T-Zellen präsentiert werden können. Abb. nach R.M. Steinman et al., [69].

8.0 Literaturverzeichnis

1. Penn, I., *Depressed immunity and the development of cancer*. Cancer Detect.Prev., 1994. **18**(4): p. 241-252.
2. Pardoll, D., *T cells and tumours*. Nature, 2001. **411**(6841): p. 1010-2.
3. Greenberg, P.D., *Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells*. Adv.Immunol., 1991. **49**: p. 281-355.
4. Matzinger, P., *Tolerance, danger, and the extended family*. Annu.Rev.Immunol., 1994. **12**: p. 991-1045.
5. Pardoll, D.M. and S.L. Topalian, *The role of CD4+ T cell responses in antitumor immunity*. Curr.Opin.Immunol., 1998. **10**(5): p. 588-594.
6. Boon, T., P.G. Coulie, and B. Van den Eynde, *Tumor antigens recognized by T cells*. Immunol.Today, 1997. **18**(6): p. 267-268.
7. Van den Eynde, B.J. and T. Boon, *Tumor antigens recognized by T lymphocytes*. Int.J.Clin.Lab.Res., 1997. **27**(2): p. 81-86.
8. Van Der Bruggen, P., et al., *Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells*. Immunol Rev., 2002. **188**: p. 51-64.
9. Brichard, V., et al., *The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas*. J.Exp.Med., 1993. **178**(2): p. 489-495.
10. Cox, A.L., et al., *Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines*. Science, 1994. **264**(5159): p. 716-719.
11. Bakker, A.B., et al., *Melanocyte lineage-specific antigen gp100 is recognized by melanoma-derived tumor-infiltrating lymphocytes*. J.Exp.Med., 1994. **179**(3): p. 1005-1009.
12. Wang, R.F., et al., *Identification of a gene encoding a melanoma tumor antigen recognized by HLA-A31-restricted tumor-infiltrating lymphocytes [published erratum appears in J Exp Med 1995 Mar 1;181(3):1261]*. J.Exp.Med., 1995. **181**(2): p. 799-804.
13. Boel, P., et al., *BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes*. Immunity., 1995. **2**(2): p. 167-175.
14. Gaugler, B., et al., *A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma*. Immunogenetics, 1996. **44**(5): p. 323-330.
15. Van den Eynde, B., et al., *Human tumour antigens recognized by T-cells: perspectives for new cancer vaccines*. Biochem.Soc.Trans., 1995. **23**(3): p. 681-686.
16. Theobald, M., et al., *Targeting p53 as a general tumor antigen*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1995. **92**(26): p. 11993-11997.
17. Gedde-Dahl, T., et al., *T-cell responses against products of oncogenes: generation and characterization of human T-cell clones specific for p21 ras-derived synthetic peptides*. Hum.Immunol., 1992. **33**(4): p. 266-274.
18. Wolfel, T., et al., *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1281-1284.
19. Chen, L., P.S. Linsley, and K.E. Hellstrom, *Costimulation of T cells for tumor immunity*. Immunol.Today, 1993. **14**(10): p. 483-486.
20. Archimbaud, E., et al., *Expression of surface adhesion molecules CD54 (ICAM-1) and CD58 (LFA-3) in adult acute leukemia: relationship with initial characteristics and prognosis*. Leukemia, 1992. **6**(4): p. 265-271.
21. Jager, E., et al., *Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for*

- immunoselection of antigen-loss variants in vivo*. Int.J.Cancer, 1996. **66**(4): p. 470-476.
22. Restifo, N.P., et al., *Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenotherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I*. J.Immunother., 1993. **14**(3): p. 182-190.
 23. Seliger, B., et al., *Analysis of the major histocompatibility complex class I antigen presentation machinery in normal and malignant renal cells: evidence for deficiencies associated with transformation and progression*. Cancer Res., 1996. **56**(8): p. 1756-1760.
 24. Gedde-Dahl, T., et al., *Oncogene-derived peptides: a new class of tumor rejection antigens?* Transplant.Proc., 1993. **25**(1 Pt 2): p. 1385-1386.
 25. Qin, Z., et al., *Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells*. J.Immunol., 1997. **159**(2): p. 770-776.
 26. Wahl, S.M., N. McCartney-Francis, and S.E. Mergenhagen, *Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta*. Immunol.Today, 1989. **10**(8): p. 258-261.
 27. Bell, D., et al., *In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas*. J Exp Med, 1999. **190**(10): p. 1417-26.
 28. Zou, W., et al., *Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells*. Nat Med, 2001. **7**(12): p. 1339-46.
 29. Toriyama, K., et al., *Variations in the distribution, frequency, and phenotype of Langerhans cells during the evolution of malignant melanoma of the skin*. J Invest Dermatol, 1993. **100**(3): p. 269S-273S.
 30. Troy, A.J., et al., *Minimal recruitment and activation of dendritic cells within renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 1998. **4**(3): p. 585-93.
 31. Ghiringhelli, F., et al., *Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 919-29.
 32. Gabrilovich, D., *Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(12): p. 941-52.
 33. Inaba, K., et al., *The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro*. J.Exp.Med., 1994. **180**(5): p. 1849-1860.
 34. Rock, K.L., *A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world*. Immunol.Today, 1996. **17**(3): p. 131-137.
 35. Janeway, C.A., Jr and K. Bottomly, *Signals and signs for lymphocyte responses*. Cell, 1994. **76**(2): p. 275-285.
 36. Knuth, A., et al., *T-cell-mediated cytotoxicity against autologous malignant melanoma: analysis with interleukin 2-dependent T-cell cultures*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1984. **81**(11): p. 3511-3515.
 37. Townsend, A. and H. Bodmer, *Antigen recognition by class I-restricted T lymphocytes*. Annu.Rev.Immunol., 1989. **7**: p. 601-624.
 38. Parmiani, G., A. Anichini, and G. Fossati, *Cellular immune response against autologous human malignant melanoma: are in vitro studies providing a framework for a more effective immunotherapy?* J.Natl.Cancer Inst., 1990. **82**(5): p. 361-370.
 39. Inaba, K., J.W. Young, and R.M. Steinman, *Direct activation of CD8+ cytotoxic T lymphocytes by dendritic cells*. J.Exp.Med., 1987. **166**(1): p. 182-194.
 40. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. Annu.Rev.Immunol., 1991. **9**: p. 271-296.

41. Steinman, R.M., *Dendritic cells and immune-based therapies*. Exp.Hematol., 1996. **24**(8): p. 859-862.
42. Steinman, R.M., M. Witmer-Pack, and K. Inaba, *Dendritic cells: antigen presentation, accessory function and clinical relevance*. Adv.Exp.Med.Biol., 1993. **329**: p. 1-9.
43. Mellman, I., S.J. Turley, and R.M. Steinman, *Antigen processing for amateurs and professionals*. Trends.Cell Biol., 1998. **8**(6): p. 231-237.
44. Mayordomo, J.I., et al., *Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity*. Nat.Med., 1995. **1**(12): p. 1297-1302.
45. Nestle, F.O., et al., *Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells [see comments]*. Nat.Med., 1998. **4**(3): p. 328-332.
46. Akbari, O., et al., *DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity*. J.Exp.Med., 1999. **189**(1): p. 169-178.
47. Jakob, T., et al., *Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA*. J.Immunol., 1998. **161**(6): p. 3042-3049.
48. Aicher, A., et al., *Successful retroviral mediated transduction of a reporter gene in human dendritic cells: feasibility of therapy with gene-modified antigen presenting cells*. Exp.Hematol., 1997. **25**(1): p. 39-44.
49. Wan, Y., et al., *Dendritic cells transduced with an adenoviral vector encoding a model tumor-associated antigen for tumor vaccination*. Hum.Gene Ther., 1997. **8**(11): p. 1355-1363.
50. Casares, S., et al., *Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope*. J.Exp.Med., 1997. **186**(9): p. 1481-1486.
51. Bregni, M., et al., *Adenovirus vectors for gene transduction into mobilized blood CD34+ cells*. Gene Ther., 1998. **5**(4): p. 465-472.
52. Alijagic, S., et al., *Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation*. Eur.J.Immunol., 1995. **25**(11): p. 3100-3107.
53. Condon, C., et al., *DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells*. Nat.Med., 1996. **2**(10): p. 1122-1128.
54. Erbacher, P., et al., *Gene transfer by DNA/glycosylated polylysine complexes into human blood monocyte-derived macrophages*. Hum.Gene Ther., 1996. **7**(6): p. 721-729.
55. Ferkol, T., et al., *Receptor-mediated gene transfer into macrophages*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1996. **93**(1): p. 101-105.
56. Grabbe, S., et al., *Dendritic cells as initiators of tumor immune responses: a possible strategy for tumor immunotherapy?* Immunol.Today, 1995. **16**(3): p. 117-121.
57. Chen, L., *Manipulation of T cell response to tumors by targeting on costimulatory pathway*. Leukemia, 1997. **11 Suppl 3**: p. 567-569.
58. Cayeux, S., et al., *Tumor cells cotransfected with interleukin-7 and B7.1 genes induce CD25 and CD28 on tumor-infiltrating T lymphocytes and are strong vaccines*. Eur.J.Immunol., 1995. **25**(8): p. 2325-2331.
59. Cayeux, S., et al., *Coexpression of interleukin-4 and B7.1 in murine tumor cells leads to improved tumor rejection and vaccine effect compared to single gene transfectants and a classical adjuvant*. Hum.Gene Ther., 1996. **7**(4): p. 525-529.
60. Cayeux, S., et al., *Influence of gene-modified (IL-7, IL-4, and B7) tumor cell vaccines on tumor antigen presentation*. J.Immunol., 1997. **158**(6): p. 2834-2841.
61. Blankenstein, T., et al., *Tumor suppression after tumor cell-targeted tumor necrosis factor alpha gene transfer*. J.Exp.Med., 1991. **173**(5): p. 1047-1052.

62. Cayeux, S., et al., *Lack of correlation between rejection of tumor cells co-expressing interleukin-2 and B7.1 and vaccine efficiency*. Eur.J.Immunol., 1997. **27**(7): p. 1657-1662.
63. Aoki, T., et al., *Expression of murine interleukin 7 in a murine glioma cell line results in reduced tumorigenicity in vivo*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1992. **89**(9): p. 3850-3854.
64. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, 1973. **137**(5): p. 1142-62.
65. Steinman, R.M., D.S. Lustig, and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo*. J Exp Med, 1974. **139**(6): p. 1431-45.
66. Caux, C., et al., *GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells*. Nature, 1992. **360**(6401): p. 258-261.
67. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J.Exp.Med., 1994. **180**(1): p. 83-93.
68. Romani, N., et al., *Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability*. J.Immunol.Methods, 1996. **196**(2): p. 137-151.
69. Steinman, R.M., *Dendritic cells and the control of immunity: enhancing the efficiency of antigen presentation*. Mt.Sinai.J.Med.2001.May.;68.(3.):106.-66., 2001. **68**(3): p. 106-166.
70. O'Doherty, U., et al., *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature*. Immunology, 1994. **82**(3): p. 487-493.
71. Winzler, C., et al., *Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures*. J.Exp.Med., 1997. **185**(2): p. 317-328.
72. Lanzavecchia, A., *Mechanisms of antigen uptake for presentation*. Curr.Opin.Immunol., 1996. **8**(3): p. 348-354.
73. Inaba, K., et al., *Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo*. J.Exp.Med., 1993. **178**(2): p. 479-488.
74. Steinman, R.M. and J. Swanson, *The endocytic activity of dendritic cells [comment]*. J.Exp.Med., 1995. **182**(2): p. 283-288.
75. Stahl, P.D., *The mannose receptor and other macrophage lectins*. Curr.Opin.Immunol., 1992. **4**(1): p. 49-52.
76. Stahl, P.D. and R.A. Ezekowitz, *The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense*. Curr.Opin.Immunol., 1998. **10**(1): p. 50-55.
77. Jiang, W., et al., *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing*. Nature, 1995. **375**(6527): p. 151-155.
78. Anderson, D.M., et al., *A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function*. Nature, 1997. **390**(6656): p. 175-179.
79. Rescigno, M., et al., *Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways*. J.Exp.Med., 1998. **188**(11): p. 2175-2180.
80. De Smedt, T., et al., *Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo*. J.Exp.Med., 1996. **184**(4): p. 1413-1424.
81. Steinbrink, K., et al., *Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells*. Blood, 1999. **93**(5): p. 1634-42.
82. Sallusto, F., et al., *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 [see comments]. J.Exp.Med., 1995. 182(2): p. 389-400.*
83. Zhou, L.J. and T.F. Tedder, *Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily.* J.Immunol., 1995. **154**(8): p. 3821-3835.
 84. Steinman, R.M., M. Pack, and K. Inaba, *Dendritic cells in the T-cell areas of lymphoid organs.* Immunol.Rev., 1997. **156**: p. 25-37.
 85. Cella, M., et al., *Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells [see comments].* Nature, 1997. **388**(6644): p. 782-787.
 86. Bhardwaj, N., et al., *Small amounts of superantigen, when presented on dendritic cells, are sufficient to initiate T cell responses.* J.Exp.Med., 1993. **178**(2): p. 633-642.
 87. Ingulli, E., et al., *In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells.* J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2133-41.
 88. Zitvogel, L., et al., *Therapy of murine tumors with tumor peptide-pulsed dendritic cells: dependence on T cells, B7 costimulation, and T helper cell 1-associated cytokines [see comments].* J.Exp.Med., 1996. **183**(1): p. 87-97.
 89. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes.* Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
 90. Young, J.W., P. Szabolcs, and M.A. Moore, *Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha.* J Exp Med, 1995. **182**(4): p. 1111-9.
 91. Caux, C., et al., *In vitro regulation of development and function of dendritic cells.* Hematol Cell Ther, 1996. **38**(5): p. 463.
 92. Caux, C., et al., *CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha.* J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 695-706.
 93. Strobl, H., et al., *TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors.* J Immunol, 1996. **157**(4): p. 1499-507.
 94. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha.* J.Exp.Med., 1994. **179**(4): p. 1109-1118.
 95. Bender, A., et al., *Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood.* J Immunol Methods, 1996. **196**(2): p. 121-35.
 96. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking [see comments].* Science, 1998. **282**(5388): p. 480-483.
 97. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.* J Exp Med, 1997. **185**(6): p. 1101-11.
 98. Res, P.C., et al., *Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus.* Blood, 1999. **94**(8): p. 2647-57.
 99. Spits, H., et al., *Id2 and Id3 inhibit development of CD34(+) stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2.* J Exp Med, 2000. **192**(12): p. 1775-84.
 100. Tanaka, H., et al., *Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio.* J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 405-12.
 101. Kalinski, P., et al., *Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN-gamma and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of*

- mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells.* J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3231-6.
102. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens.* J Exp Med, 2001. **194**(6): p. 863-9.
 103. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation.* Science, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
 104. Shortman, K. and W.R. Heath, *Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells.* Nat Immunol, 2001. **2**(11): p. 988-9.
 105. Kamath, A.T., et al., *The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations.* J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6762-70.
 106. Inaba, K., et al., *Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.* J.Exp.Med., 1992. **176**(6): p. 1693-1702.
 107. Winzler, C., et al., *Checkpoints and functional stages in DC maturation.* Adv.Exp.Med.Biol., 1997. **417**: p. 59-64.
 108. Reddy, A., et al., *A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells.* Blood, 1997. **90**(9): p. 3640-3646.
 109. Feuerstein, B., et al., *A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen- preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use.* J Immunol Methods, 2000. **245**(1-2): p. 15-29.
 110. Avrameas, A., et al., *Expression of a mannose/fucose membrane lectin on human dendritic cells.* Eur.J.Immunol., 1996. **26**(2): p. 394-400.
 111. Engering, A.J., et al., *The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells.* Eur.J.Immunol., 1997. **27**(9): p. 2417-2425.
 112. Swiggard, W.J., et al., *DEC-205, a 205-kDa protein abundant on mouse dendritic cells and thymic epithelium that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145: purification, characterization, and N-terminal amino acid sequence.* Cell Immunol., 1995. **165**(2): p. 302-311.
 113. Stahl, P.D., et al., *Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1978. **75**(3): p. 1399-1403.
 114. Wileman, T.E., M.R. Lennartz, and P.D. Stahl, *Identification of the macrophage mannose receptor as a 175-kDa membrane protein.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1986. **83**(8): p. 2501-2505.
 115. Taylor, M.E., et al., *Primary structure of the mannose receptor contains multiple motifs resembling carbohydrate-recognition domains.* J.Biol.Chem., 1990. **265**(21): p. 12156-12162.
 116. Taylor, M.E., K. Bezouska, and K. Drickamer, *Contribution to ligand binding by multiple carbohydrate-recognition domains in the macrophage mannose receptor.* J.Biol.Chem., 1992. **267**(3): p. 1719-1726.
 117. Ezekowitz, R.A., et al., *Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells.* J.Exp.Med., 1990. **172**(6): p. 1785-1794.
 118. Fiete, D.J., M.C. Beranek, and J.U. Baenziger, *A cysteine-rich domain of the "mannose" receptor mediates GalNAc-4-SO4 binding.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1998. **95**(5): p. 2089-2093.

119. Iobst, S.T., et al., *Binding of sugar ligands to Ca(2+)-dependent animal lectins. II. Generation of high-affinity galactose binding by site-directed mutagenesis and NMR.* J.Biol.Chem., 1994. **269**(22): p. 15512-15519.
120. Taylor, M.E. and K. Drickamer, *Structural requirements for high affinity binding of complex ligands by the macrophage mannose receptor.* J.Biol.Chem., 1993. **268**(1): p. 399-404.
121. Mullin, N.P., P.G. Hitchen, and M.E. Taylor, *Mechanism of Ca²⁺ and monosaccharide binding to a C-type carbohydrate- recognition domain of the macrophage mannose receptor.* J.Biol.Chem., 1997. **272**(9): p. 5668-5681.
122. Shepherd, V.L., et al., *Characterization of the mannose/fucose receptor on human mononuclear phagocytes.* J.Reticuloendothel.Soc., 1982. **32**(6): p. 423-431.
123. Kery, V., et al., *Ligand recognition by purified human mannose receptor.* Arch.Biochem.Biophys., 1992. **298**(1): p. 49-55.
124. Fiete, D., M.C. Beranek, and J.U. Baenziger, *The macrophage/endothelial cell mannose receptor cDNA encodes a protein that binds oligosaccharides terminating with SO₄-4- GalNAcβ1,4GlcNAcβ or Man at independent sites.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1997. **94**(21): p. 11256-11261.
125. Taylor, M.E., M.S. Leaning, and J.A. Summerfield, *Uptake and processing of glycoproteins by rat hepatic mannose receptor.* Am.J.Physiol., 1987. **252**(5 Pt 1): p. E690-E698.
126. Agnes, M.C., et al., *Strongly increased efficiency of altered peptide ligands by mannosylation.* Int.Immunol., 1998. **10**(9): p. 1299-1304.
127. Tan, M.C., et al., *Mannose receptor mediated uptake of antigens strongly enhances HLA- class II restricted antigen presentation by cultured dendritic cells.* Adv.Exp.Med.Biol., 1997. **417**: p. 171-174.
128. Ezekowitz, R.A., et al., *Uptake of Pneumocystis carinii mediated by the macrophage mannose receptor.* Nature, 1991. **351**(6322): p. 155-158.
129. Marodi, L., et al., *Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors.* J.Clin.Invest., 1993. **91**(6): p. 2596-2601.
130. Piemonti, L., et al., *Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation.* J Immunol, 1999. **162**(11): p. 6473-81.
131. Longoni, D., et al., *Interleukin-10 increases mannose receptor expression and endocytic activity in monocyte-derived dendritic cells.* Int.J.Clin.Lab.Res., 1998. **28**(3): p. 162-169.
132. DeFife, K.M., et al., *Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression.* J.Immunol., 1997. **158**(7): p. 3385-3390.
133. Jordens, R., et al., *Human dendritic cells shed a functional, soluble form of the mannose receptor.* Int Immunol, 1999. **11**(11): p. 1775-80.
134. Kruskal, B.A., et al., *Phagocytic chimeric receptors require both transmembrane and cytoplasmic domains from the mannose receptor.* J.Exp.Med., 1992. **176**(6): p. 1673-1680.
135. Muller, C.D. and F. Schuber, *Neo-mannosylated liposomes: synthesis and interaction with mouse Kupffer cells and resident peritoneal macrophages.* Biochim.Biophys.Acta, 1989. **986**(1): p. 97-105.
136. Liang, W.W., et al., *Oligonucleotide targeting to alveolar macrophages by mannose receptor- mediated endocytosis.* Biochim.Biophys.Acta, 1996. **1279**(2): p. 227-234.
137. Guo, M., et al., *A monoclonal antibody to the DEC-205 endocytosis receptor on human dendritic cells.* Hum.Immunol.2000.Aug.;61.(8.):729.-38., 2000. **61**(8): p. 729-738.

138. Crystal, R.G., *Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.* Science, 1995. **270**(5235): p. 404-410.
139. Eglitis, M.A. and W.F. Anderson, *Retroviral vectors for introduction of genes into mammalian cells.* Biotechniques, 1988. **6**(7): p. 608-614.
140. Verma, I.M. and N. Somia, *Gene therapy -- promises, problems and prospects [news].* Nature, 1997. **389**(6648): p. 239-242.
141. Miller, D.G., M.A. Adam, and A.D. Miller, *Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection [published erratum appears in Mol Cell Biol 1992 Jan;12(1):433].* Mol.Cell Biol., 1990. **10**(8): p. 4239-4242.
142. Cooper, M.J., et al., *Safety-modified episomal vectors for human gene therapy.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1997. **94**(12): p. 6450-6455.
143. Cotten, M. and E. Wagner, *Non-viral approaches to gene therapy.* Curr.Opin.Biotechnol., 1993. **4**(6): p. 705-710.
144. Perales, J.C., et al., *An evaluation of receptor-mediated gene transfer using synthetic DNA- ligand complexes.* Eur.J.Biochem., 1994. **226**(2): p. 255-266.
145. Abdallah, B., et al., *A powerful nonviral vector for in vivo gene transfer into the adult mammalian brain: polyethylenimine.* Hum.Gene Ther., 1996. **7**(16): p. 1947-1954.
146. Wu, G.Y. and C.H. Wu, *Receptor-mediated in vitro gene transformation by a soluble DNA carrier system [published erratum appears in J Biol Chem 1988 Jan 5;263(1):588].* J.Biol.Chem., 1987. **262**(10): p. 4429-4432.
147. Labat-Moleur, F., et al., *An electron microscopy study into the mechanism of gene transfer with lipopolyamines.* Gene Ther., 1996. **3**(11): p. 1010-1017.
148. Perales, J.C., et al., *Biochemical and functional characterization of DNA complexes capable of targeting genes to hepatocytes via the asialoglycoprotein receptor.* J.Biol.Chem., 1997. **272**(11): p. 7398-7407.
149. Lechardeur, D., et al., *Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer.* Gene Ther, 1999. **6**(4): p. 482-97.
150. Zelphati, O. and F.C. Szoka, Jr, *Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1996. **93**(21): p. 11493-11498.
151. Behr, J.P., et al., *Efficient gene transfer into mammalian primary endocrine cells with lipopolyamine-coated DNA.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1989. **86**(18): p. 6982-6986.
152. Felgner, P.L., et al., *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1987. **84**(21): p. 7413-7417.
153. Wu, G.Y. and C.H. Wu, *Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo.* J.Biol.Chem., 1988. **263**(29): p. 14621-14624.
154. Zhu, N., et al., *Systemic gene expression after intravenous DNA delivery into adult mice.* Science, 1993. **261**(5118): p. 209-211.
155. Mumper, R.J., et al., *Protective interactive noncondensing (PINC) polymers for enhanced plasmid distribution and expression in rat skeletal muscle.* J.Controlled Release., 1998. **52**(1-2): p. 191-203.
156. Haensler, J. and F.C. Szoka, Jr, *Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture.* Bioconjug.Chem., 1993. **4**(5): p. 372-379.
157. Haensler, J. and F.C. Szoka, Jr, *Synthesis and characterization of a trigalactosylated bisacridine compound to target DNA to hepatocytes.* Bioconjug.Chem., 1993. **4**(1): p. 85-93.
158. Boussif, O., et al., *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1995. **92**(16): p. 7297-7301.
159. Mumper, R.J., et al., *Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle.* Pharm.Res., 1996. **13**(5): p. 701-709.

160. Erbacher, P., et al., *Chitosan-based vector/DNA complexes for gene delivery: biophysical characteristics and transfection ability*. Pharm.Res., 1998. **15**(9): p. 1332-1339.
161. Cotten, M., et al., *Psoralen treatment of adenovirus particles eliminates virus replication and transcription while maintaining the endosomolytic activity of the virus capsid*. Virology, 1994. **205**(1): p. 254-261.
162. Bukrinsky, M.I., et al., *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells [see comments]*. Nature, 1993. **365**(6447): p. 666-669.
163. Chen, J., R.J. Stickles, and K.A. Daichendt, *Galactosylated histone-mediated gene transfer and expression*. Hum.Gene Ther., 1994. **5**(4): p. 429-435.
164. Gosule, L.C. and J.A. Schellman, *Compact form of DNA induced by spermidine*. Nature, 1976. **259**(5541): p. 333-335.
165. Bottger, M., et al., *Condensation of vector DNA by the chromosomal protein HMG1 results in efficient transfection*. Biochim.Biophys.Acta, 1988. **950**(2): p. 221-228.
166. Tang, M.X. and F.C. Szoka, *The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes*. Gene Ther., 1997. **4**(8): p. 823-832.
167. Vengerov, Y.Y. and T.E. Semenov, *Electron microscopy of DNA complexes with synthetic oligopeptides*. Electron Microsc.Rev., 1992. **5**(2): p. 193-207.
168. Marquet, R., A. Wyart, and C. Houssier, *Influence of DNA length on spermine-induced condensation. Importance of the bending and stiffening of DNA*. Biochim.Biophys.Acta, 1987. **909**(3): p. 165-172.
169. Reich, Z., et al., *Chiral and structural discrimination in binding of polypeptides with condensed nucleic acid structures*. J.Biol.Chem., 1990. **265**(10): p. 5590-5594.
170. Ong, E.C., C. Snell, and G.D. Fasman, *Chromatin models. The ionic strength dependence of model histone-DNA interactions: circular dichroism studies of lysine-leucine polypeptide-DNA complexes*. Biochemistry, 1976. **15**(3): p. 468-477.
171. Perales, J.C., et al., *Gene transfer in vivo: sustained expression and regulation of genes introduced into the liver by receptor-targeted uptake*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1994. **91**(9): p. 4086-4090.
172. Fernandez-Puentes, C. and L. Carrasco, *Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins*. Cell, 1980. **20**(3): p. 769-775.
173. Curiel, D.T., et al., *Adenovirus enhancement of transferrin-polylysine-mediated gene delivery*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1991. **88**(19): p. 8850-8854.
174. Cotten, M., et al., *High-efficiency receptor-mediated delivery of small and large (48 kilobase gene constructs using the endosome-disruption activity of defective or chemically inactivated adenovirus particles*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1992. **89**(13): p. 6094-6098.
175. Seth, P., *Adenovirus-dependent release of choline from plasma membrane vesicles at an acidic pH is mediated by the penton base protein*. J.Virol., 1994. **68**(2): p. 1204-1206.
176. Wagner, E., et al., *Influenza virus hemagglutinin HA-2 N-terminal fusogenic peptides augment gene transfer by transferrin-polylysine-DNA complexes: toward a synthetic virus-like gene-transfer vehicle*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1992. **89**(17): p. 7934-7938.
177. Gonzalez-Reyes, L., et al., *Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(17): p. 9859-64.

178. Plank, C., et al., *The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems*. J.Biol.Chem., 1994. **269**(17): p. 12918-12924.
179. Wyman, T.B., et al., *Design, synthesis, and characterization of a cationic peptide that binds to nucleic acids and permeabilizes bilayers*. Biochemistry, 1997. **36**(10): p. 3008-3017.
180. Cotten, M., et al., *Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1990. **87**(11): p. 4033-4037.
181. Midoux, P., A.C. Roche, and M. Monsigny, *Quantitation of the binding, uptake, and degradation of fluoresceinylated neoglycoproteins by flow cytometry*. Cytometry, 1987. **8**(3): p. 327-334.
182. Nigg, E.A., P.A. Baeuerle, and R. Luhrmann, *Nuclear import-export: in search of signals and mechanisms*. Cell, 1991. **66**(1): p. 15-22.
183. Newmeyer, D.D. and D.J. Forbes, *Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation*. Cell, 1988. **52**(5): p. 641-653.
184. Duverger, E., et al., *Sugar-dependent nuclear import of glycoconjugates from the cytosol*. Exp.Cell Res., 1993. **207**(1): p. 197-201.
185. Duverger, E., et al., *Nuclear import of glycoconjugates is distinct from the classical NLS pathway*. J.Cell Sci., 1995. **108**(Pt 4): p. 1325-1332.
186. Zanta, M.A., P. Belguise-Valladier, and J.P. Behr, *Gene delivery: a single nuclear localization signal peptide is sufficient to carry DNA to the cell nucleus*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1999. **96**(1): p. 91-96.
187. Boyum, A., *Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g*. Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl., 1968. **97**: p. 77-89.
188. Midoux, P., et al., *Specific gene transfer mediated by lactosylated poly-L-lysine into hepatoma cells*. Nucleic.Acids.Res., 1993. **21**(4): p. 871-878.
189. Shen, W.C., D. Yang, and H.J. Ryser, *Colorimetric determination of microgram quantities of polylysine by trypan blue precipitation*. Anal.Biochem., 1984. **142**(2): p. 521-524.
190. Perrine, T.D. and W.R. Landis, *Analysis of polyethylenimine by spectrophotometry of its copper chelate*. J.Polym.Sci.[A1.], 1967. **5**(8): p. 1993-2003.
191. Monsigny, M., C. Petit, and A.C. Roche, *Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod*. Anal.Biochem., 1988. **175**(2): p. 525-530.
192. Baum, C., et al., *Chance or necessity? Insertional mutagenesis in gene therapy and its consequences*. Mol Ther, 2004. **9**(1): p. 5-13.
193. Williams, D.A. and C. Baum, *Medicine. Gene therapy--new challenges ahead*. Science, 2003. **302**(5644): p. 400-1.
194. Monsigny, M., A.C. Roche, and P. Midoux, *Uptake of neoglycoproteins via membrane lectin(s) of L1210 cells evidenced by quantitative flow cytofluorometry and drug targeting*. Biol.Cell, 1984. **51**(2): p. 187-196.
195. Roche, A.C., et al., *Sugar-specific endocytosis of glycoproteins by Lewis lung carcinoma cells*. J Cell Biochem, 1983. **22**(3): p. 131-40.
196. Ogris, M., et al., *DNA/polyethylenimine transfection particles: influence of ligands, polymer size, and PEGylation on internalization and gene expression*. AAPS PharmSci, 2001. **3**(3).

197. Kunath, K., et al., *Galactose-PEI-DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection efficiency*. J Control Release, 2003. **88**(1): p. 159-72.
198. Kircheis, R., L. Wightman, and E. Wagner, *Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **53**(3): p. 341-58.
199. Ross, G.F., et al., *Enhanced reporter gene expression in cells transfected in the presence of DMI-2, an acid nuclease inhibitor*. Gene Ther, 1998. **5**(9): p. 1244-50.
200. Cotten, M., et al., *Chicken adenovirus (CELO virus) particles augment receptor-mediated DNA delivery to mammalian cells and yield exceptional levels of stable transformants*. J.Virol., 1993. **67**(7): p. 3777-3785.
201. Wagner, E., *Effects of membrane-active agents in gene delivery*. J.Controlled Release., 1998. **53**(1-3): p. 155-158.
202. Pollard, H., et al., *Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells*. J.Biol.Chem., 1998. **273**(13): p. 7507-7511.
203. Erbacher, P., et al., *Transfection and physical properties of various saccharide, poly(ethylene glycol), and antibody-derivatized polyethylenimines (PEI)*. J Gene Med, 1999. **1**(3): p. 210-22.
204. Clamme, J.P., J. Azoulay, and Y. Mely, *Monitoring of the Formation and Dissociation of Polyethylenimine/DNA Complexes by Two Photon Fluorescence Correlation Spectroscopy*. Biophys J, 2003. **84**(3): p. 1960-8.
205. Musk, S.R., T.K. Smith, and I.T. Johnson, *On the cytotoxicity and genotoxicity of allyl and phenethyl isothiocyanates and their parent glucosinolates sinigrin and gluconasturtiin*. Mutat Res, 1995. **348**(1): p. 19-23.
206. Nakajima, M., et al., *Inhibition and inactivation of human cytochrome P450 isoforms by phenethyl isothiocyanate*. Drug Metab Dispos, 2001. **29**(8): p. 1110-3.
207. Ramiro, A.R., et al., *Enhanced green fluorescent protein as an efficient reporter gene for retroviral transduction of human multipotent lymphoid precursors*. Hum Gene Ther, 1998. **9**(7): p. 1103-9.
208. Grosse, S., et al., *Lactosylated polyethylenimine for gene transfer into airway epithelial cells: role of the sugar moiety in cell delivery and intracellular trafficking of the complexes*. J Gene Med, 2004. **6**(3): p. 345-56.
209. Kunath, K., et al., *Low-molecular-weight polyethylenimine as a non-viral vector for DNA delivery: comparison of physicochemical properties, transfection efficiency and in vivo distribution with high-molecular-weight polyethylenimine*. J Control Release, 2003. **89**(1): p. 113-25.
210. Irvine, A.S., et al., *Efficient nonviral transfection of dendritic cells and their use for in vivo immunization*. Nat Biotechnol, 2000. **18**(12): p. 1273-8.
211. Steinman, R.M., et al., *The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells*. J.Exp.Med.2000.Feb.7.;191.(3.):411.-6., 2000. **191**(3): p. 411-416.
212. Steinman, R.M., et al., *Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **987**: p. 15-25.
213. Plank, C., et al., *Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra- antennary galactose ligand*. Bioconjug.Chem., 1992. **3**(6): p. 533-539.
214. Monsigny, M., et al., *Glycotargeting: the preparation of glyco-amino acids and derivatives from unprotected reducing sugars*. Biochimie, 1998. **80**(2): p. 99-108.
215. Klemm, A.R., D. Young, and J.B. Lloyd, *Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability*. Biochem.Pharmacol., 1998. **56**(1): p. 41-46.
216. Furgeson, D.Y., et al., *Modified linear polyethylenimine-cholesterol conjugates for DNA complexation*. Bioconjug Chem, 2003. **14**(4): p. 840-7.

217. Jenne, L., et al., *Poxvirus as a vector to transduce human dendritic cells for immunotherapy: abortive infection but reduced APC function*. Gene Ther, 2000. **7**(18): p. 1575-83.
218. Zhong, L., et al., *Recombinant adenovirus is an efficient and non-perturbing genetic vector for human dendritic cells*. Eur J Immunol, 1999. **29**(3): p. 964-72.
219. Haines, A.M., et al., *CL22 - a novel cationic peptide for efficient transfection of mammalian cells*. Gene Ther, 2001. **8**(2): p. 99-110.
220. Strobel, I., et al., *Human dendritic cells transfected with either RNA or DNA encoding influenza matrix protein M1 differ in their ability to stimulate cytotoxic T lymphocytes*. Gene Ther, 2000. **7**(23): p. 2028-35.
221. Van Tendeloo, V.F., et al., *Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells*. Blood, 2001. **98**(1): p. 49-56.
222. Casares, S., et al., *Protective immunity elicited by vaccination with DNA encoding for a B cell and a T cell epitope of the A/PR/8/34 influenza virus*. Viral Immunol, 1997. **10**(3): p. 129-36.
223. Grunebach, F., et al., *Delivery of tumor-derived RNA for the induction of cytotoxic T-lymphocytes*. Gene Ther, 2003. **10**(5): p. 367-74.
224. Knight, S.C., et al., *Transfer of antigen between dendritic cells in the stimulation of primary T cell proliferation*. Eur J Immunol, 1998. **28**(5): p. 1636-44.
225. Holmgren, L., et al., *Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies*. Blood, 1999. **93**(11): p. 3956-63.
226. Labarriere, N., et al., *Apoptotic body-loaded dendritic cells efficiently cross-prime cytotoxic T lymphocytes specific for NA17-A antigen but not for Melan-A/MART-1 antigen*. Int J Cancer, 2002. **101**(3): p. 280-6.
227. Dietz, A.B. and S. Vuk-Pavlovic, *High efficiency adenovirus-mediated gene transfer to human dendritic cells*. Blood, 1998. **91**(2): p. 392-398.
228. Mulders, P., et al., *Highly efficient and consistent gene transfer into dendritic cells utilizing a combination of ultraviolet-irradiated adenovirus and poly(L-lysine) conjugates*. Cancer Res., 1998. **58**(5): p. 956-961.
229. Diebold, S.S., et al., *Efficient gene delivery into human dendritic cells by adenovirus polyethylenimine and mannose polyethylenimine transfection*. Hum.Gene Ther., 1999. **10**(5): p. 775-786.
230. de Gruijl, T.D., et al., *Prolonged maturation and enhanced transduction of dendritic cells migrated from human skin explants after in situ delivery of CD40-targeted adenoviral vectors*. J Immunol, 2002. **169**(9): p. 5322-31.
231. Nishikawa, M. and L. Huang, *Nonviral vectors in the new millennium: delivery barriers in gene transfer*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(8): p. 861-70.
232. Ohsumi, Y. and Y.C. Lee, *Mannose-receptor ligands stimulate secretion of lysosomal enzymes from rabbit alveolar macrophages*. J.Biol.Chem., 1987. **262**(17): p. 7955-7962.
233. Gebara, M.M., et al., *Inactivation of a transfected gene in human fibroblasts can occur by deletion, amplification, phenotypic switching, or methylation*. Mol.Cell Biol., 1987. **7**(4): p. 1459-1464.
234. Wagner, E., M. Ogris, and W. Zauner, *Polylysine-based transfection systems utilizing receptor-mediated delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 1998. **30**(1-3): p. 97-113.
235. Chowdhury, N.R., et al., *Fate of DNA targeted to the liver by asialoglycoprotein receptor-mediated endocytosis in vivo. Prolonged persistence in cytoplasmic vesicles after partial hepatectomy*. J.Biol.Chem., 1993. **268**(15): p. 11265-11271.

236. Brunner, S., et al., *Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus*. Gene Ther, 2000. **7**(5): p. 401-7.
237. Schlesinger, L.S., *Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors*. J.Immunol., 1993. **150**(7): p. 2920-2930.
238. Prigozy, T.I., et al., *The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endosomes for presentation to T cells by CD1b molecules*. Immunity., 1997. **6**(2): p. 187-197.
239. Linehan, S.A., et al., *Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells*. J Exp Med, 1999. **189**(12): p. 1961-72.
240. Mahnke, K., et al., *The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments*. J.Cell Biol.2000.Oct.30.;151.(3.):673.-84., 2000. **151**(3): p. 673-684.
241. Bonifaz, L.C., et al., *In Vivo Targeting of Antigens to Maturing Dendritic Cells via the DEC-205 Receptor Improves T Cell Vaccination*. J Exp Med, 2004. **199**(6): p. 815-24.
242. Kato, M., et al., *cDNA cloning of human DEC-205, a putative antigen-uptake receptor on dendritic cells*. Immunogenetics, 1998. **47**(6): p. 442-50.
243. Witmer-Pack, M.D., et al., *Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. II. Expression in situ in lymphoid and nonlymphoid tissues*. Cell Immunol, 1995. **163**(1): p. 157-62.
244. Dhodapkar, M.V., et al., *Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells*. J.Exp.Med.2001.Jan.15.;193.(2.):233.-8. **193**(2): p. 233-238.
245. Parente, R.A., S. Nir, and F.C. Szoka, Jr, *Mechanism of leakage of phospholipid vesicle contents induced by the peptide GALA*. Biochemistry, 1990. **29**(37): p. 8720-8728.
246. Wagner, E., *Application of membrane-active peptides for nonviral gene delivery*. Adv Drug Deliv Rev, 1999. **38**(3): p. 279-289.
247. Cohen, C.J., et al., *The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15191-6.
248. Meunier-Durmort, C., et al., *Adenovirus enhancement of polyethylenimine-mediated transfer of regulated genes in differentiated cells*. Gene Ther., 1997. **4**(8): p. 808-814.
249. Zabner, J., et al., *Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid*. J.Biol.Chem., 1995. **270**(32): p. 18997-19007.
250. Bieber, T., et al., *Intracellular route and transcriptional competence of polyethylenimine-DNA complexes*. J Control Release, 2002. **82**(2-3): p. 441-54.
251. Vacik, J., et al., *Cell-specific nuclear import of plasmid DNA*. Gene Ther, 1999. **6**(6): p. 1006-14.
252. Wiethoff, C.M. and C.R. Middaugh, *Barriers to nonviral gene delivery*. J Pharm Sci, 2003. **92**(2): p. 203-17.
253. Niidome, T. and L. Huang, *Gene therapy progress and prospects: nonviral vectors*. Gene Ther, 2002. **9**(24): p. 1647-52.
254. Wang, J.L., J.G. Laing, and R.L. Anderson, *Lectins in the cell nucleus*. Glycobiology., 1991. **1**(3): p. 243-252.
255. Wilson, J.M., et al., *A novel mechanism for achieving transgene persistence in vivo after somatic gene transfer into hepatocytes*. J.Biol.Chem., 1992. **267**(16): p. 11483-11489.
256. Ardeschna, K.M., et al., *Monocyte-derived dendritic cells do not proliferate and are not susceptible to retroviral transduction*. Br J Haematol, 2000. **108**(4): p. 817-24.

257. Chen, W.Y. and T.M. Townes, *Molecular mechanism for silencing virally transduced genes involves histone deacetylation and chromatin condensation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(1): p. 377-82.
258. Garrick, D., et al., *Repeat-induced gene silencing in mammals*. Nat Genet, 1998. **18**(1): p. 56-9.
259. McBurney, M.W., et al., *Evidence for repeat-induced gene silencing in cultured Mammalian cells: inactivation of tandem repeats of transfected genes*. Exp Cell Res, 2002. **274**(1): p. 1-8.
260. Ye, F. and E.R. Signer, *RIGS (repeat-induced gene silencing) in Arabidopsis is transcriptional and alters chromatin configuration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10881-6.
261. Birchler, J.A., M.P. Bhadra, and U. Bhadra, *Making noise about silence: repression of repeated genes in animals*. Curr Opin Genet Dev, 2000. **10**(2): p. 211-6.
262. Pomerantz, B.J., M. Naujokas, and J.A. Hassell, *Homologous recombination between transfected DNAs*. Mol Cell Biol, 1983. **3**(9): p. 1680-5.
263. Pikaart, M.J., F. Recillas-Targa, and G. Felsenfeld, *Loss of transcriptional activity of a transgene is accompanied by DNA methylation and histone deacetylation and is prevented by insulators*. Genes Dev, 1998. **12**(18): p. 2852-62.
264. Chen, W.Y., et al., *Reactivation of silenced, virally transduced genes by inhibitors of histone deacetylase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(11): p. 5798-803.
265. McBurney, M.W., et al., *A role for RNA processing in regulating expression from transfected genes*. Somat Cell Mol Genet, 1998. **24**(4): p. 203-15.
266. Webster, J., et al., *Intronic sequences modulate the sensitivity of beta-lactoglobulin transgenes to position effects*. Gene, 1997. **193**(2): p. 239-43.
267. An, W.G., et al., *Protease inhibitor-induced apoptosis: accumulation of wt p53, p21WAF1/CIP1, and induction of apoptosis are independent markers of proteasome inhibition*. Leukemia, 2000. **14**(7): p. 1276-83.
268. Nettelbeck, D.M., V. Jerome, and R. Muller, *Gene therapy: designer promoters for tumour targeting*. Trends Genet, 2000. **16**(4): p. 174-81.
269. Ross, R., et al., *Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin*. Gene Ther, 2003. **10**(12): p. 1035-40.
270. Bros, M., et al., *The human fascin gene promoter is highly active in mature dendritic cells due to a stage-specific enhancer*. J Immunol, 2003. **171**(4): p. 1825-34.
271. Inaba, K., et al., *Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes*. Cell Immunol., 1995. **163**(1): p. 148-156.
272. Sparwasser, T., et al., *Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins*. Eur J Immunol, 2000. **30**(12): p. 3591-7.
273. Diebold, S.S., et al., *Mannose polyethylenimine conjugates for targeted DNA delivery into dendritic cells*. J.Biol.Chem., 1999. **274**(27): p. 19087-19094.
274. Einfeld, D.A. and P.W. Roelvink, *Advances towards targetable adenovirus vectors for gene therapy*. Curr Opin Mol Ther, 2002. **4**(5): p. 444-51.

9.0 Publikationen

- Posterpräsentation auf dem Meeting der American Society of Hematology San Diego/USA, Dez. 1998: „**Mannose Receptor Mediated Gene Transfer in Dendritic Cells**“.
- Posterpräsentation auf dem Meeting der American Association for Cancer Research Washington/USA, Juli 2003: “**The Notch Pathway in Ovarian Cancer**”.
- Posterpräsentation auf dem Meeting der American Society of Hematology Atlanta/USA, Dez. 2005: “**Epigenetic signature of MDS CD34+ cells during lineage specific differentiation**”
- **Hopfer, O., Zwahlen, D., Fey, M.F. & Aebi, S. The Notch pathway in ovarian carcinomas and adenomas.** Br J Cancer. 93, 709-18. (2005).

10.0 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in Zusammenarbeit zwischen der Medizinischen Fakultät Charité, Universitätsmedizin Berlin, Campus Berlin-Buch, Robert-Rössle-Klinik, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hämatologie, Onkologie und Tumorummunologie und dem Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. A. Pezzutto, danke ich für die Themenstellung zu dieser Arbeit und für seine Betreuung sowie für seine konstruktive Kritik.

Insbesondere Herrn Dr. Jörg Westermann möchte ich für die sehr intensive Zusammenarbeit und fachliche Betreuung danken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Wittmann-Diebold für die anregenden Diskussionen und technische Unterstützung sowie bei Prof. Dr. Ch. Hagemeier für die Bereitstellung von Plasmiden. Prof. Dr. M. Zenke sei für seine technische Unterstützung ebenfalls herzlich gedankt.

Frau Kerstin Daemen möchte ich ausdrücklich für ihre praktische Unterstützung danken.

Besonders dankbar bin ich meiner Familie, insbesondere meiner Frau Gantuja Bold, für ihre Unterstützung während meiner Ausbildung und bei der Erstellung der Doktorarbeit.

11.0 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

12.0 Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter sowie nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe. Die vorliegende Arbeit ist auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten.

Olaf Hopfer

Berlin, den 26.07.2006

13.0 Abstract

Receptor mediated gene transfer facilitates cell specific targeting in vitro and in vivo. The generation of sufficient numbers of Dendritic Cells (DC) for adaptive cellular therapy has been established by culturing CD34+ stem cells or CD14+ mononuclear cells in the presence of specific cytokines. Loading antigen presenting cells (APC) effectively can be accomplished by transfection with tumor antigen (TAA) coding DNA (combination of multiple tumor epitopes, presentation via MHC class I molecules and priming of CD8+ T cells). Potential risks with viral gene transfer (insertional mutagenesis, lack of cell specificity, antibody mediated inactivation) make non viral gene transfer methods an attractive alternative for potential clinical applications (transfection of differentiated non dividing cells, episomal plasmid DNA with long inserts). This work describes the establishment of a non viral receptor mediated in vitro gene transfer system for human dendritic cells. The target receptor is the human mannose receptor (MMR), that is highly expressed on immature DC and that has a strong endocytotic capacity. As DNA carrier Poly-L-lysine (50kD) and Polyethyleneimine (50kD and 800kD) were used. Neoglycopolymers were synthesized by ligation with mannose that has the strongest affinity to the MMR among the monosaccharides. Transfections conditions were optimized using a rat fibroblast cell line stably expressing the human MMR (MMR61). Transfection efficiency was quantified using an luciferase expression plasmid as reporter gene. It could be shown that mannosylated PEI (800kD) was highly suitable for specific transfection of MMR61 cells. Luciferase expression values were 3 times higher with mannosylated PEI compared to native PEI. The percentage of transfected MMR61 cells was at least 13% with mannosylated polymer. Expression kinetics showed a durable transgene expression of up to 1 week with mannosylated PEI but lasted only 2-3 days with mannosylated Poly-L-lysine. Human primary DC could be specifically transfected with mannosylated PEI (800kD 4,5 times and 50kD 11 times higher) albeit with greatly varying efficiencies comparing different individual DC preparations. Up to 26% of all DC cultures could be transfected. A major limitation though was prominent cell toxicity of the transfection complex, depending possibly on the high degradative potential of the downstream endocytotic pathway. Summarizing this work shows the feasibility of a MMR dependent non viral gene transfer. In comparison to other transfection methods, particularly viral gene transfer, the efficiency is inferior for primary DC transfection. The suitability of the established method for in vivo transfection of DC remains to be analyzed.