

**„Delivery“ funktioneller
Nukleinsäuren in Antigen-
präsentierende Säugerzellen
mittels rekombinanter Hefen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Barbara Walch

Saarbrücken 2009

Tag des Kolloquiums:

11. Dezember 2009

Dekan:

Prof. Dr.-Ing. Stefan Diebels

Prüfungsausschuss:

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Manfred J. Schmitt

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Sigrun Smola

Vorsitzender:

Prof. Dr. Karin Römisch

Akademischer Mitarbeiter:

Dr. Gert-Wieland Kohring

„Was will ich?“ fragt der Verstand.
„Worauf kommt es an?“ fragt die Urteilskraft.
„Was kommt heraus?“ fragt die Vernunft.

Immanuel Kant

Für meine stolze Familie

Aus der vorliegenden Arbeit hervorgegangene Manuskripte:

Barbara Walch, Tanja Breinig, Gernot Geginat, Manfred J. Schmitt und Frank Breinig (2008):

“Mycofection”: the effective delivery of functional DNA and messenger RNA to mammalian antigen-presenting cells by recombinant yeast.

Int. J. Med. Microbiol. 298, S2; 49.

Barbara Walch, Tanja Breinig, Manfred J. Schmitt und Frank Breinig:
Delivery of functional DNA and messenger RNA to mammalian phagocytic cells by recombinant yeast.

Zur Publikation eingereicht.

Barbara Walch, Tanja Breinig, Gernot Geginat, Manfred J. Schmitt und Frank Breinig:

Yeast-based protein delivery to mammalian phagocytic cells is increased by coexpression of bacterial listeriolysin.

Zur Publikation eingereicht.

Barbara Walch, Tanja Breinig, Manfred J. Schmitt und Frank Breinig:
Coexpression of pore-forming proteins enhances yeast-mediated delivery of functional nucleic acids to mammalian antigen-presenting cells.

Manuskript in Vorbereitung.

Silvia Boschi-Bazan*, **Barbara Walch***, Tanja Breinig, Manfred J. Schmitt, Gernot Geginat und Frank Breinig:

Differences in maturation of dendritic cells and T cell activation induced by various yeast genera.

Manuskript in Vorbereitung.

*: gleichberechtigte Koautoren

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	
Abstract	
I. Einleitung	1
1. Das Immunsystem	1
1.1. Initiation von adaptiven Immunantworten	2
1.2. Die Funktion Dendritischer Zellen als Antigen-präsentierende Zellen	3
1.3. Antigenprozessierung und –präsentation	5
1.4. Zellulärer Teil der adaptiven Immunantwort und Rolle verschiedener CD4 ⁺ T-Zellpopulationen	7
1.5. Effektormechanismus zytotoxischer T-Lymphozyten	8
1.6. Humoraler Teil der adaptiven Immunantwort und Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis	10
2. Impfstoffe	11
2.1. Geschichte und Entwicklung von Impfstoffen	11
2.2. Passive Immunisierung	12
2.3. Aktive Immunisierung	13
2.3.1. Lebendimpfstoffe	13
2.3.2. Totimpfstoffe	14
2.4. DNA- und RNA-Vakzinen	15
3. Hefen als Lebendimpfstoffe	19
4. Ziele der Arbeit	22
II. Material und Methoden	24
1. Organismen	24
1.1. Hefestämme	24
1.2. <i>E. coli</i> Stämme	24
1.3. Zelllinien	25
2. Plasmide	25
3. Nährmedien	31

3.1. <i>Escherichia coli</i>	31
3.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
3.3. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	34
3.4. Zellkulturmedien	36
4. Primer	37
5. Antikörper	39
6. Chemikalien, Kits und Enzyme	40
7. Kulturbedingungen	42
7.1. <i>Escherichia coli</i>	42
7.2. Hefen	42
7.3. Säugerzellen	42
7.4. Kultivierung von Säugerzellen	43
7.4.1. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen	43
7.5. Kryokulturen von Bakterien und Hefen	43
8. Zellzahlbestimmung	44
8.1. Gesamtzellzahl	44
8.2. Optische Dichte	44
9. Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	44
9.1. Alkalische Lyse	44
9.2. E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II	46
10. Isolierung genomischer Hefe-DNA	47
11. Isolierung chromosomaler DNA aus der murinen Makrophagen-Zelllinie IC21	47
12. Isolierung von RNA aus humanen Zellen	48
13. Polymerasekettenreaktion (PCR)	49
13.1. SOE-PCR	50
13.2. Reverse Transkriptase-PCR	51
13.3. VenorGem Mycoplasmen-PCR	52
14. TOPO- und Acceptor-Klonierung von PCR-Produkten	52
15. DNA-Sequenzierung	53
16. Restriktion von Plasmid-DNA	54

17. Agarosegelelektrophorese	54
18. DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels „E.Z.N.A. Gelextraction Kit“ der Firma Omega	56
19. Bestimmung von DNA-Konzentration und –Reinheit	56
20. Ligation	57
21. Transformations-Methoden	57
21.1. Transformation von <i>E.coli</i> mit rekombinanter Plasmid-DNA (Elektroporation)	57
21.1.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen	58
21.1.2. Elektroporation	58
21.2. Transformation von Hefen mit rekombinanter Plasmid-DNA (Lithium-Acetat-Methode)	59
21.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	59
21.2.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	61
22. Wachstumstest zur Toxizitätsbestimmung	61
23. Trypan-Blau-Färbung	62
24. Zellaufschluss	62
24.1. S80-Zellaufschluss von Hefezellen	62
24.2. Proteinfällung aus Hefekulturüberständen	62
24.3. Zellaufschluss von Säugerzellen	63
25. SDS-Gelelektrophorese	64
26. Western-Analyse	67
26.1. „Semi-Dry“-blotting	67
26.2. Immundetektion mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Antikörper	68
27. Fluoreszenzmikroskopie	69
28. Gesamt RNA-Präparation nach der Hot-Phenol-Methode	70
29. Northern-Blot-Analyse	71
29.1. Herstellung einer DIG-markierten Sonde	72
29.2. Northern-Blot	73

30. Isolierung peripherer Blutzellen	76
30.1. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradienten-Zentrifugation	76
30.2. Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen	77
30.3. Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY®	78
30.4. <i>In vitro</i> Differenzierung von humanen Dendritischen Zellen	79
31. Stimulation antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen durch autologe Dendritische Zellen	80
32. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)	81
32.1. Färbung von Oberflächen-Antigenen	85
32.2. Färbung von intrazellulären Antigenen	86
33. <i>In vitro</i> Aktivierung epitopspezifischer T-Lymphozyten	87
III. Ergebnisse	88
1. Etablierung eines Systems zum „Delivery“ Antigen-kodierender DNA und mRNA mittels Hefen in APC	88
1.1. Untersuchungen zur Ausreifung humaner DC durch verschiedene <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stämme	89
1.2. Das DNA-„Delivery“-System: Hefen als Vehikel für Antigen-kodierende DNA	92
1.2.1. Konstruktion der Plasmide zum DNA-„Delivery“	92
1.2.2. Untersuchungen zur Aktivität der zum DNA-„Delivery“ verwendeten Promotoren in <i>S. cerevisiae</i>	93
1.3. Das RNA-„Delivery“ System: Hefen als Vehikel für Antigen-kodierende mRNA	96
1.3.1. Konstruktion der Plasmide zum RNA-„Delivery“	96
1.3.2. Induktion der regulierbaren Promotoren <i>MLS1</i> und <i>ICL1</i> nach Aufnahme von <i>S. cerevisiae</i> durch verschiedene APC	97
1.3.3. Blockade der Translation in Hefe durch eine virale „internal ribosomal entry site“ (IRES)	100
1.4. Charakterisierung der Bedingungen zum Hefe-vermittelten „Delivery“ Antigen-kodierender DNA und mRNA	102

2.	Nachweis der Antigen-Expression in APC nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“	112
2.1.	eGFP-Expression nach „Delivery“ von eGFP-DNA und -mRNA in murinen Makrophagen und humanen DC	112
2.2.	Untersuchungen zum Einsatz von Ovalbumin als Antigen im Hefe-basierten „Delivery“-System	118
2.2.1.	Heterologe Expression verschiedener Ovalbumin Varianten in <i>S. cerevisiae</i>	119
2.2.2.	„Delivery“ von rekombinant in Hefe exprimiertem Ovacyt sowie Ovacyt-kodierender DNA und mRNA in APC	121
3.	Optimierung des „Delivery“-Systems	125
3.1.	Optimierung des DNA-„Delivery“ durch Verwendung der APC-spezifischen Promotoren DC-STAMP und Fascin	125
3.2.	Optimierung der DNA / RNA-Expression durch Plasmid-/ Selektionsmarkerwechsel	129
3.3.	Steigerung der Antigenexpression in APC durch Verwendung eines säugerzellspezifischen Polyadenylierungssignals	132
3.4.	Optimierung der DNA / RNA-Freisetzung aus Phagolysosomen in das Zytosol durch Koexpression porenbildender Proteine	136
3.4.1.	Expression von Listeriolysin O und Perforin in Hefe	138
3.4.2.	Überprüfen der Funktionalität von rekombinantem Listeriolysin O und Perforin in APC	141
3.4.3.	Steigerung der Antigenexpression nach DNA- und RNA-„Delivery“ in APC durch Koexpression porenbildender Proteine	145
4.	Stimulation humaner antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen durch autologe DC nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“	150
4.1.	<i>S. cerevisiae</i> als Vehikel für pp65-kodierende DNA und mRNA zur Stimulation pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Lymphozyten	151
4.2.	Steigerung der Stimulation an antigenspezifischen Gedächtnis-T-Lymphozyten durch Verwendung des SV40 Polyadenylierungssignals	155

5.	Verwendung von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> als Vehikel zum Nukleinsäure-„Delivery“-System	159
5.1.	Ausreifung humaner iDC zu mDC durch die Spalthefe <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	160
5.2.	Konstruktion eines Plasmidsystems für DNA- und RNA-„Delivery“ mittels <i>Sz. pombe</i>	162
5.3.	Charakterisierung der Bedingungen zum DNA- und RNA-„Delivery“ mittels <i>Sz. pombe</i> in verschiedene APC	163
5.4.	Expression des Modellproteins eGFP in APC nach DNA- und RNA-„Delivery“ mittels <i>Sz. pombe</i>	168
IV.	Diskussion	170
	Etablierung eines Systems zum Nukleinsäure-„Delivery“ mittels rekombinanter Hefen	172
	Expression von Antigenen nach DNA- und RNA-„Delivery“ in verschiedenen APC	178
	Optimierung des DNA- und RNA-„Delivery“-Systems	183
	1) Verwendung APC-spezifischer Promotoren und Durchführung eines Plasmid-/ Selektionsmarkerwechsels	183
	2) Austausch des Hefetranskriptionsterminators durch das SV40 Polyadenylierungssignal	186
	3) Koexpression porenbildender Proteine	187
	Stimulation humaner antigenspezifischer Gedächtnis-T-Lymphozyten durch autologe DC	191
	<i>Schizosaccharomyces pombe</i> als Vehikel zum Nukleinsäure-„Delivery“ in APC	197
	Vergleich des in dieser Arbeit etablierten Nukleinsäure „Delivery“-Systems mit bekannten Systemen	200
	Ausblick	203
V.	Zusammenfassung/Summary	205
VI.	Literaturverzeichnis	210
	Erklärung	235
	Danksagung	236
	Lebenslauf	238

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	„antigen presenting cell“
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CASY	„cell counter and analyser system“
CD	„cluster of differentiation“
CMV	Zytomegalievirus
C-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
d/o	„drop out“
Da	Dalton
DC	„dendritic cell“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	ER-assozierte Degradation
FACS	„fluorescence activated cell sorting“
Fc	„fragment crystallisable“
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
g	„gravity“, Erdanziehungskraft
GLB	„Gel loading buffer“
GM-CSF	„granulocyte macrophages-colony stimulating factor“
GTE	Glukose-Tris-EDTA
GZZ	Gesamtzellzahl
CMV	Zytomegalievirus
HLA	„human leukocyte antigen“

HRP	„horse raddish peroxidase“
iDCs	„immature Dendritic Cells“
IL	Interleukin
INF γ	Interferon γ
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
LB	„Luria Bertani Broth“
LiAc	Lithiumacetat
M-CSF	„macrophages-colony stimulating factor“
mDCs	„mature Dendritic Cells“
MHC	„major histocompatibility complex“
mRNA	“messenger” RNA
NK Zellen	„natural killer cells“
N-Terminus	Aminoterminus eines Proteins
OD	Optische Dichte
ori	Replikationsursprung
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	„peripheral blood lymphocytes“
PBMCs	„peripheral blood mononuclear cells“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„Polymerase Chain Reaction“
PE	Phycoerythrin
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5-Konjugat
PEG	Polyethylenglykol
PGK	Phosphoglyzeratkinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
SC	„Synthetic Complete“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOE-PCR	„Splicing by overlapping extension“ PCR
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	„Tris-buffered saline“
TCR	„T cell receptor“
TE	Tris-EDTA

TEMED	N,N,N,N'-Tetramethyldiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	„Unit“
ü.N.	über Nacht
upm	Umdrehung per Minute
UV	Ultraviolett
v/v	„volume per volume“
VLP	„Virus like particle“
w/o	„without“
w/v	„weight per volume“
WB	Western-Blot
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl- β -D-Thiogalaktosid
YCB	„Yeast carbon base“
YNB	„Yeast nitrogen base“
YPD	„Yeast extract/peptone/dextrose“

Abstract

Among the different vaccination approaches, DNA/RNA vaccination represents a promising means in particular for the induction of effective cellular immune response conferred by CD8-positive T lymphocytes. To achieve such an immune response, there is a need for novel delivery systems that allow the introduction of nucleic acids to the cytosol of immune cells. In this study the delivery of functional DNA and messenger RNA to mammalian antigen-presenting cells including murine macrophages and human dendritic cells using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as delivery vehicle was demonstrated. After transfer of the particular nucleic acid, subsequent antigen processing and presentation were verified in a humane system. Remarkably, release of DNA/mRNA did not require additional "helper" proteins such as listeriolysin. However, coexpression of the pore-forming proteins listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* and human perforin improved translocation of delivered DNA/mRNA. In conclusion, the yeast-based system described here is superior to many bacterial and viral systems in terms of efficacy, safety and targeting suggesting "mycofection" as a promising approach for the development of a novel type of live vaccine.

Die Vakzinierung mit DNA oder RNA stellt unter verschiedenen Immunisierungsmöglichkeiten einen vielversprechenden Ansatz insbesondere zur Generierung effektiver Immunantworten dar, welche durch CD8-positive T-Lymphozyten induziert werden. Um eine zelluläre Immunität zu erzielen, müssen neue „Delivery“-Systeme entwickelt werden, die einen Transport von Nukleinsäuren in das Zytosol von Antigen-präsentierenden Zellen (APC) vermitteln. In dieser Arbeit konnte ein „Delivery“ funktioneller DNA und messenger RNA mittels der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* in Säuger-APC (darunter murinen Makrophagen und humanen Dendritischen Zellen) gezeigt werden. Nach Transfer der einzelnen Nukleinsäuren konnte eine Antigenprozessierung und -präsentation in einem humanen System nachgewiesen werden. Bemerkenswerterweise benötigt die Hefe-vermittelte Transfektion der DNA oder mRNA keine zusätzlichen Helferproteine wie zum Beispiel Listeriolysin O. Jedoch konnte die Translokation von DNA und mRNA durch Koexpression porenbildender Proteine, wie Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes* und humanem Perforin, gesteigert werden. Das hier beschriebene Hefe-vermittelte „Delivery“-System besitzt im Vergleich zu vielen bakteriellen und viralen Systemen einige Vorteile in Bezug auf Wirksamkeit, Sicherheit und Targeting zu APC, wodurch „Mycofection“ einen aussichtsreichen Ansatz in der Entwicklung einer neuen Art von Lebendvakzinen darstellt.

I. Einleitung

1. Das Immunsystem

Infektionen stellen immer noch die häufigste Todesursache beim Menschen dar. In der heutigen Zeit kämpft der Körper eines Menschen ständig gegen eine Vielzahl derartiger Erkrankungen. Im Laufe der Evolution haben mehrzellige Organismen ein Verteidigungssystem entwickelt, um sich gegen Infektionen mit Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten zu schützen. Dieses Verteidigungssystem basiert auf einer Reihe von Zellen und Proteinen, die fremde Strukturen gezielt erkennen und eine Abfolge von Reaktionen zur Eliminierung solcher Infektionen starten. Unter „normalen“ Bedingungen findet keine Immunreaktion gegen den Körper statt („immunologische Toleranz“). Zur Bekämpfung für den Organismus fremder Strukturen lässt sich die Abwehr in ein angeborenes und ein erworbenes Immunsystem (vom Lateinischen „immunis-unberührt, frei, rein“) unterteilen.

Das angeborene Abwehrsystem wird als erstes bereits nach Minuten aktiv, wenn ein Erreger die äußeren Schutzschranken des Körpers überwunden hat. Es reagiert jedoch relativ unspezifisch auf die Infektion mit einem Erreger. Zu ihm zählen physikalische und chemische Barrieren wie die Schleimhäute oder der saure pH-Wert der Magensäure sowie Schweiß, wodurch der Eintritt von Pathogenen in den Organismus verhindert werden soll. Gelangen diese dennoch in den Körper, z.B. über Wunden, nehmen phagozytierende Zellen wie Makrophagen oder Neutrophile den Erreger auf. Sie erkennen einen Krankheitserreger mithilfe von Rezeptoren an der Zelloberfläche, die zwischen den Oberflächenmolekülen von Pathogenen und körpereigenen Zellen unterscheiden können. Dazu gehören z. B. der Makrophagen-Mannoserezeptor, welcher bestimmte Zuckermoleküle an der Oberfläche von zahlreichen Bakterien und einigen Viren bindet, CD14, ein Rezeptor für bakterielles Lipopolysaccharid oder

Komplementrezeptoren, wodurch das Komplementsystem als Reaktion auf viele Arten von Infektionen schnell aktiviert wird. „Toll-like-Rezeptoren“ (TLR) erkennen Lipide, Proteine und DNA von Erregern und sind zusätzlich noch an der Signalweiterleitung zur Auslösung einer Immunantwort beteiligt. Lösliche Faktoren des angeborenen Immunsystems werden sehr schnell nach Beginn einer Infektion rekrutiert. Zu ihnen zählen Lysozym, Akutphaseproteine, Zytokine, Komplementproteine und Typ-I Interferone (INF- α und INF- β). Als Reaktion auf die Bildung von Interferonen und Zytokinen werden Natürliche Killerzellen aktiviert. Deren Tötungsmechanismus ist dem von zytotoxischen T-Lymphozyten gleich. Sie setzen zytotoxische Granula frei, welche die Membran von Zielzellen durchdringen und den programmierten Zelltod auslösen. Das angeborene Immunsystem kann somit schnell auf einen eindringenden Erreger reagieren und eine Infektion über vier bis sieben Tage bis zum Einsetzen der adaptiven Immunität eindämmen und bekämpfen (Janeway, 2002).

1.1. Initiation von adaptiven Immunantworten

Dem adaptiven Immunsystem ist es möglich pathogene Erreger, die die Fähigkeit besitzen die angeborene Immunität zu überwinden, in infizierten Zellen gezielt abzutöten. Die adaptive Immunabwehr setzt erst später nach Beginn einer Infektion ein. In infizierten Geweben nehmen Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen Antigene der Erreger auf. Die APC präsentieren Peptide von Antigenen im Kontext mit MHC-Molekülen, welche von T-Lymphozyten mithilfe des T-Zellrezeptors erkannt werden. Bei Induktion einer adaptiven Immunreaktion kommt es in den peripheren lymphatischen Organen zu einer Antigen-spezifischen T-Zellantwort und zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis. DC, die die potentesten APC darstellen, besitzen die Fähigkeit, naive T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung zu stimulieren. Mit erfolgter

Antigenaufnahme kommt es zur Reifung der DC und zu deren Wanderung aus den primären in die peripheren lymphatischen Organe. Dabei erfolgt ein Wechsel des Funktionsprofils dieser Zellen von der Antigenaufnahme zur Antigenpräsentation. Neben kostimulatorischen Molekülen werden zusätzlich Moleküle der „major histocompatibility complexe“ (MHC) I und II exprimiert, wodurch eine verstärkte Antigenpräsentation gewährleistet wird.

Neben dem primären Signal über den TCR ist zur Stimulation naiver T-Zellen ein sekundäres Signal erforderlich. Dies erfolgt über Interaktion von CD28 der T-Zelle mit den Membranproteinen CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), welche von reifen DC in hohem Maße zur Verfügung gestellt werden. Erkennt dagegen eine naive T-Zelle ihr Antigen ohne Kostimulation, geht sie in einen anergen Zustand über (Bachmann et al., 1999). Nach Aktivierung einer naiven T-Zelle folgen die Phase der klonalen Expansion und die Differenzierung zu CD4⁺ T_H-Zellen oder CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Die T-Zelle durchläuft dabei mindestens sieben bis zehn Zellteilungen und entwickelt sich zu einer Effektor- oder Gedächtniszelle. Dabei ist kein Antigenkontakt für die Tochterzellen notwendig (Kaech & Ahmed, 2001). Durch die Sekretion inflammatorischer Zytokine und dem Abtöten infizierter Zellen kann eine akute virale Infektion innerhalb von sieben bis zehn Tagen durch die adaptiven Immunreaktionen eliminiert werden.

1.2. Die Funktion Dendritischer Zellen als Antigen-präsentierende Zellen

Die Aufgabe von APC ist es, nach Infektion den jeweiligen Erreger im Gewebe aufzunehmen, die Antigene in Form von Peptiden auf der Zelloberfläche zu präsentieren und zu den sekundären lymphatischen Organen zu transportieren, um eine T-Zellantwort auszulösen. Die potentesten Antigenpräsentierer sind DC. Sie wurden erstmals als

Langerhans Zellen der Haut beschrieben und besitzen die Fähigkeit, naive T-Zellen effizient zu stimulieren und dadurch die Bildung von Gedächtniszellen zu generieren (Steinman, 1991). DC differenzieren von CD34⁺ hämatopoetischen Vorläufern. Es existieren zwei Stadien von DC: unreife DC (iDC) wandern aus dem Knochenmark in das Blut und von dort aus in nicht-lymphatische Gewebe und an die äußeren Barrieren des Körpers, wie die Haut. Nach Kontakt mit dem Antigen und nach erfolgter Reifung wandern sie über afferente lymphatische Gefäße in die sekundären lymphatischen Organe. iDC sind sehr effizient in der Lage, Antigene in der Peripherie aufzunehmen und zu prozessieren (Mellman & Steinman, 2001). Sie nehmen Antigene über rezeptorvermittelte Endozytose, Makropinozytose oder Phagozytose auf.

Erst nach erhaltenem Reifungsstimulus differenzieren sie zu reifen DC (mDC) und wandern in die sekundären lymphatischen Organe. Bakterien, Viren, LPS, dsRNA, CpG-Motive oder Toxine aktivieren DC über TLR (Kaisho & Akira, 2001, Underhill & Ozinsky, 2002; Underhill 2003; Kumar et al., 2009). Diese Rezeptoren werden in der Keimbahn kodiert und erkennen konservierte pathogen-assoziierte molekulare Strukturen, die „pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPs) (Armant & Fenton, 2002, Underhill & Ozinsky, 2002). Durch Antikörper opsonierte Erreger werden über F_c-Rezeptoren gebunden (Rodriguez et al., 1999; Mellman & Steinman, 2001). Nach einem inflammatorischen Stimulus werden endogene Faktoren wie TNF- α , INF- γ und Prostaglandine lokal begrenzt gebildet (Jonuleit et al., 1997). Diese werden als „danger“-Signale bezeichnet und tragen auch zur Aktivierung von iDC bei. Reife DC sind auf die Antigenpräsentation spezialisiert. Sie präsentieren vermehrt MHC-Peptid-Komplexe auf der Zelloberfläche und verlieren die Fähigkeit zur Antigenaufnahme. Weiterhin kommt es zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 (Mellman & Steinman, 2001). Durch die Interaktion von CD40-CD40 Ligand können mDC naive CD8⁺ T-Lymphozyten aktivieren (Ridge et al., 1998; Bennett et al., 1998; Schoenberger et al., 1998). Nach Ausreifung präsentieren mDC Antigene im Kontext mit

MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche den CD4⁺- und CD8⁺-Lymphozyten.

1.3. Antigenprozessierung und –präsentation

Antigenpeptide werden als Peptid-MHC-Komplex auf Oberflächen von APC präsentiert. Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II, die in ihrer Struktur und dem Expressionsmuster in Geweben des Körpers unterschiedlich sind. MHC I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Körperzellen exprimiert, MHC II-Moleküle hauptsächlich auf B-Lymphozyten, DC und Makrophagen. Über 200 Gene kodieren für die Proteine des MHC-Peptid-Bindungskomplexes. Die benötigte Variabilität von MHC I- und MHC II-Molekülen wird zum Einen durch drei verschiedene Gene für die MHC I-Moleküle und vier kodierende Gene für die MHC II-Moleküle sowie durch einen hohen Polymorphismus des MHC gewährleistet. Dieser Polymorphismus betrifft besonders die Peptidbindungsgrube der MHC-Moleküle. Dadurch können eine hohe Anzahl verschiedener Peptidbindungseigenschaften mit Spezifität für bestimmte Aminosäuren an den Ankerpositionen eines Peptids sichergestellt werden. MHC I- und MHC II-Moleküle sind aus jeweils vier Domänen aufgebaut, von welchen jeweils zwei die Peptidbindungsgrube bilden (Janeway, 2002). Ein entscheidender Unterschied liegt jedoch in der Länge der Peptide, die in den jeweiligen Bindungsgruben gebunden werden können. So weisen Peptide, die von MHC I-Molekülen präsentiert werden, eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren auf (Rammensee et al., 1997), in MHC II-Molekülen präsentierte Peptide können hingegen 13 Aminosäuren und länger sein.

Antigene intrazellulärer Erreger werden durch das Proteasom zu Peptiden abgebaut (Rock & Goldberg, 1999; Schubert, 2000; Yewdell et al., 2001; Kloetzel, 2004). Das Proteasom einer Zelle, welches sich im Zytoplasma der Zelle befindet und als konstitutives Proteasom

bezeichnet wird, besteht aus mehreren Untereinheiten, die zum Teil katalytische Aktivität besitzen. Die drei konstitutiv katalytisch aktiven Untereinheiten dieser Endopeptidase können durch INF- γ -induzierbare Untereinheiten mit ebenfalls katalytischer Aktivität ausgetauscht werden. Dadurch entsteht das in APC dominierende Immunoproteasom (Tanaka & Kasahara, 1998; York et al., 1999; Rock & Goldberg, 1999). Diese beiden Varianten des Proteasoms unterscheiden sich in ihrer Schnittspezifität und produzieren somit verschiedenartige Peptide (Toes et al., 2001). Das Immunoproteasom erzeugt bevorzugt Peptide mit hydrophoben oder basischen C-Termini, die hochaffin für MHC I-Moleküle und den „transporter associated with antigen processing“ (TAP) sind. Die prozessierten Peptide werden in das Endoplasmatische Retikulum (ER) eingeschleust und ein vollständiger Abbau der Peptide dadurch verhindert (Neefjes et al., 1993). Der Transport erfolgt durch die speziellen Transportproteine TAP, welche aus den Molekülen TAP1 und TAP2 bestehen. Sie durchspannen die ER-Membran, wodurch ein Transport vom Zytosol ins ER möglich ist. Die Bindungsaffinität von TAP ist abhängig vom C- sowie vom N-Terminus und auf eine Länge des Peptids von acht bis 16 Aminosäuren beschränkt (Momburg et al., 1994; Howard, 1995; Momburg & Hämmerling, 1998; van Edert, 1996). Im ER gehen die Peptide eine Bindung mit dem durch verschiedene Chaperone (z.B. Calnexin und Calreticulin) stabilisierten MHC I-Molekül ein (Pamer & Cresswell, 1998). Die effizienteste Bindung erfolgt zwischen der MHC I-Bindungstasche und Peptiden mit einer Länge von acht bis zehn Aminosäuren, welche zusätzlich hydrophobe oder basische Bereiche an ihren C-Termini aufweisen (Rammensee et al., 1997). Dazu muss das neu synthetisierte und durch die Chaperone stabilisierte MHC I-Molekül mittels Tapasin, welches als Bindungsglied zwischen dem Klasse I-Heterodimer und TAP fungiert, in Nähe zu dem an TAP gebundenen Peptid gebracht werden. Die so entstandenen Komplexe aus MHC I-Molekülen und Peptiden dissoziieren vom Beladungskomplex und werden an die Zelloberfläche transportiert und dort exponiert.

Exogene Antigene werden mittels MHC II-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Hier erfolgt die Bindung des MHC II-Moleküls mit dem Peptid in Vesikeln. Nach Abschnürung vom ER befinden sich die MHC II-Moleküle in endozytotischen Vesikeln, ihre Bindungsstelle ist jedoch durch das Molekül „invariant chain“ blockiert. Erst durch die saure Umgebung der Endosomen wird die „invariant chain“ gespalten, das MHC II-Molekül bleibt jedoch durch „class-II-associated invariant-chain peptid“ (CLIP) blockiert. Diese Blockade wird durch „human leukocyte antigen“ (HLA)-DM aufgehoben, welches das MHC II-Molekül bindet und dadurch die Dissoziation von CLIP bewirkt. Nach Vesikelverschmelzung können exogene Peptide aus den endozytotischen Vesikeln nun eine Bindung mit passenden MHC II-Molekülen eingehen und die entstehenden Komplexe werden zur Zelloberfläche transportiert (Hiltbold und Roche 2002; Lennon-Dumenil et al., 2002). Jedoch können exogene Antigene in DC auch via MHC I präsentiert werden, ein Phänomen, welches als „cross-presentation“ beschrieben ist (Albert et al., 1998).

1.4. Zellulärer Teil der adaptiven Immunantwort und Rolle verschiedener CD4⁺ T-Zellpopulationen

Die Zellpopulation der T-Lymphozyten lässt sich anhand von T-Zell-Rezeptor (TCR)-assoziierten Membranproteinen in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterteilen. Diese Korezeptoren interagieren mit konstanten Regionen von MHC I- bzw. MHC II-Molekülen. CD4⁺ T-Lymphozyten erkennen dabei Peptidfragmente exogener Antigene im Kontext mit MHC II-Molekülen auf der Zelloberfläche von APC, CD8⁺ T-Zellen hingegen interagieren mit Peptid-MHC I-Komplexen.

Naive CD4 T-Zellen können sich nach ihrer Aktivierung in T_H1-, T_H2-Zellen oder regulatorische T-Zellen (T_{regs}) differenzieren, die jeweils unterschiedliche Zytokine synthetisieren und sich daher in ihrer Funktion unterscheiden (Tada et al., 1978; Mosman et al., 1986). T_H1-

Zellen synthetisieren vorwiegend INF- γ , TNF- α und IL-2, T_H2-Zellen hingegen vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 (Robinson & O`Garra, 2002; Jonuleit & Schmitt, 2003). Die von T_H1-Zellen produzierten Zytokine sind an der Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Lymphozyten beteiligt, wohingegen Zytokine der T_H2-Zellen für die Induktion einer B-Zellantwort benötigt werden (Depoil et al., 2005; Kupfer et al., 1991; Schoenberger et al., 1998). Ob sich eine naive CD4 T-Zelle in eine T_H1- oder T_H2-Zelle differenziert, ist vom vorliegenden Zytokinmilieu und somit von den APC abhängig. Produzieren infizierte Makrophagen oder aktivierte DC IL-12, so entstehen T_H1-Zellen, liegt jedoch von Mastzellen synthetisiertes IL-4 vor, so differenzieren T_H2-Zellen. T_H1-Zellen sind somit zur Eliminierung intrazellulärer Pathogene durch die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischer T-Lymphozyten wichtig. T_H2-Zellen sind an der Induktion einer B-Zellantwort beteiligt, wodurch eine Antikörper-Antwort gegen Erreger ausgelöst wird, die sich im extrazellulären Raum befinden.

1.5. Effektormechanismus zytotoxischer T-Lymphozyten

Naive CD8 T-Zellen differenzieren nach Binden ihres TCR an den Komplex aus Antigen und MHC I-Molekül sowie nach Erhalt eines kostimulatorischen Signals zu zytotoxischen T-Lymphozyten. CTL sind für das gezielte Abtöten infizierter Zellen verantwortlich, um so eine Ausbreitung intrazellulärer Erreger zu verhindern. Um infizierte Körperzellen zu zerstören, bedienen sich CTL unterschiedlicher Effektormechanismen. Dazu zählen die Zytokinproduktion, die Exozytose von Granula mit zelllysierendem Perforin und apoptose-induzierenden Granzymen sowie die Oberflächenexpression des Moleküls Fas-Ligand (Russel & Ley, 2002). Beim nicht-sekretorischen Weg der Induktion der Apoptose kann durch die Interaktion zwischen Fas-Ligand auf der Oberfläche der CTL und Fas-Rezeptor auf der

Oberfläche der Zielzelle eine Caspase-vermittelte Apoptose in der Zielzelle ausgelöst werden (Maher et al., 2002; Strasser et al., 2009). Die Wirkung der CTL durch den sekretorischen Weg beruht darauf, dass sie kalziumabhängig spezielle lytische Granula freisetzen. Diese werden in den Zellzwischenraum zur Zielzelle abgegeben und enthalten zytotoxische Effektorproteine (Barry & Bleackley, 2002). Ein Effektor-molekül von CTL und Natürlichen Killerzellen ist Perforin. Es ist in der Lage, in Anwesenheit von Kalzium zu polymerisieren und Poren innerhalb der Membran von Zielzellen zu bilden. Daraufhin können weitere Komponenten der lytischen Granula in die Zielzelle gelangen. Beim Menschen beinhalten lytische Granula die Granzyme A, B, H, K und M sowie Granulysin und Serinproteasen; in der Maus sind die Granzyme A, B, C, D, E, F, G und K bekannt (Lieberman, 2003; Cullen & Martin, 2008; Chávez-Galán et al., 2009). Granzym A führt in infizierten Zellen zu Einzelstrangbrüchen der DNA, Granzym B löst durch die Aktivierung von Caspasen und der am Apoptosesignalweg beteiligten Proteine Bax und Bak die Induktion der Apoptose aus (Chowdhury & Lieberman 2008). Granzym C vermittelt durch das Anschwellen der Zelle eine Fehlfunktion der Mitochondrien (Shresta et al., 1998; Stenger et al., 1999; Johnson et al., 2003). Neben der Aufnahme durch die Perforin-Pore wird vermutet, dass die Granzyme auch in Form Endosomen-ähnlicher Strukturen in die Zielzelle gelangen (Giesubel et al., 2005; Pipkin & Lieberman, 2007). Weiterhin wurde die Rezeptor-vermittelte Internalisierung von Granzym B nach Bindung an den Mannose-6-Phosphat-Rezeptor gezeigt (Motyka et al., 2000). CTL setzen neben Perforin und Granzymen auch Zytokine wie INF- γ , TNF- α und TNF- β frei. INF- γ hemmt direkt die virale Replikation und führt dazu, dass MHC I-Moleküle verstärkt exprimiert werden. Weiterhin aktiviert es zusammen mit TNF- α und TNF- β Makrophagen, welche auch als Effektorzellen am Infektionsort wirken können (Stout & Bottomly, 1989; Munoz Fernandez et al., 1992).

1.6. Humorale Teil der adaptiven Immunantwort und Ausbildung eines immunologischen Gedächtnis

Um eine effiziente Immunreaktion zu gewährleisten, ist ein Zusammenspiel zwischen zellvermittelter und humoraler Immunantwort wichtig. Für die humorale Immunantwort sind B-Lymphozyten verantwortlich, die nach Aktivierung zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen ausdifferenzieren.

T_H2-Zellen erkennen den Peptid-MHC II-Komplex auf B-Zellen. Durch die Sekretion von IL-3, IL-4 und IL-12 kommt es zur Aktivierung der B-Zelle, zusätzlich kann die T_H2-Zelle mit Hilfe des CD40-Liganden an das CD40-Oberflächenmolekül der B-Zelle binden (Croft & Swain, 1991). Diese Bindung trägt dazu bei, dass ruhende B-Zellen in den Zellzyklus eintreten und somit induzieren T_H2-Zellen die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen (Noelle et al., 1992; Jaiswal & Croft, 1997). Die von ausdifferenzierten B-Zellen synthetisierten Immunglobuline teilen sich in fünf Klassen ein und sind spezifisch für Epitope des erkannten Antigens. Durch sie kommt es zur Neutralisierung und Opsonisierung des Erregers in seiner extrazellulären Form und zur Aktivierung des Komplementsystems (Cooper, 1985; Possee et al., 1982; Ward & Ghetie, 1995).

Die Folge einer adaptiven Immunantwort ist die Ausbildung eines Immunologischen Gedächtnis. Darunter versteht man die Fähigkeit des Immunsystems, schneller und effektiver auf Krankheitserreger zu reagieren, welche schon einmal eine Infektion im Körper verursachten. Gelingt es dem Immunsystem, den Erreger zu eliminieren, reduziert sich die Anzahl der spezifischen Effektorzellen. Nur ca. 10 % überdauern über längere Zeiträume und bieten dem Körper somit die Möglichkeit, den Ausbruch einer weiteren Infektion mit den verbundenen Krankheitssymptomen zu verhindern. Sie können nach erneutem Antigenkontakt auch ohne Kostimulation schneller und effektiver als naive T-Zellen reagieren (Homann et al., 2001; Kaech et al., 2002; Sprent & Surh, 2001; Sprent & Surh, 2002). Die Gedächtnis-

zellpopulation besteht aus B-Gedächtniszellen und aus CD4⁺ und CD8⁺ T-Gedächtniszellen. Die so erlangte Immunität durch die Induktion der Bildung von Gedächtniszellen ist das Ziel und die Grundlage jeder Impfung.

2. Impfstoffe

Eine Impfung stellt eine vorbeugende Maßnahme gegen verschiedene Infektionskrankheiten dar, mit dem Ziel, das Immunsystem zu stimulieren, um nach Kontakt mit dem jeweiligen Antigen eine Infektion zu verhindern. Neben einer daraus resultierenden individuellen Immunität kann durch eine hohe Durchimpfungsrate eine kollektive Immunisierung der Gesamtbevölkerung (Herdenimmunität) erreicht werden. Dadurch kann die Zirkulation eines Erregers innerhalb einer Population verringert oder unterbrochen werden, wodurch Säuglinge oder immundefiziente Menschen geschützt werden. Die heute eingesetzten Impfstoffe richten sich gegen bakterielle und virale Infektionen und lassen sich in vier Gruppen einteilen. Es existieren lebende attenuierte und inaktivierte Mikroorganismen, Untereinheit- und DNA-Vakzinen.

2.1. Geschichte und Entwicklung von Impfstoffen

Durch die Entwicklung von Vakzinen in den letzten 200 Jahren konnten Infektionen und somit die Ausbreitung von Krankheiten deutlich reduziert werden. Aufzeichnungen des 11. Jahrhunderts aus China und Indien belegen bereits Versuche zur Variolation mit Krustenstücken von Pocken (Fenner et al., 1988; Plotkin & Plotkin, 2004). Auch eine englische Schriftstellerin berichtete 1718, dass Türken sich den Körperflüssigkeiten von mit Pocken infizierten Menschen aussetzten. Diese Art der „Impfung“ blieb jedoch bis zu dem von Edward Jenner

1796 entwickelten Verfahren umstritten. Jenner postulierte, dass die Infektion von Kuhpocken, welche beim Menschen nur eine leicht verlaufende Krankheit darstellt, dem Menschen eine Immunität gegenüber einer Infektion mit Pocken verleiht (Plotkin, 2005). Da der Impfstoff von der Kuh stammte, prägte Jenner der Begriff „Vaccine“ (vom Lateinischen „vacca-Kuh“) und die Technik der künstlichen Immunisierung „Vaccination“ (vom Lateinischen „vaccinus-von Kühen stammend“). Die Ursache für Infektionskrankheiten blieb jedoch weiter unbekannt.

Den endgültigen Beweis der Existenz von bakteriellen Krankheitserregern lieferten gegen Ende des 19. Jahrhunderts Louis Pasteur und Robert Koch. Pasteur formulierte 1864 die Keimtheorie und Koch erbrachte den Nachweis der Krankheitserreger von Milzbrand (*Bacillus anthracis* (1876) und der Tuberkulose (*Mycobacterium tuberculosis*) (1881). Pasteur und Roux entwickelten weiterhin den Impfstoff gegen Milzbrand (1881) und gegen Tollwut (1885) (Plotkin, 2005). Darüberhinaus wurden bakterielle Impfstoffe gegen Typhus, Cholera und Pest entwickelt (Salmon & Smith, 1886; Kolle, 1896; Haffkine, 1897).

Seit Mitte des 20. Jahrhunderts wurden zahlreiche weitere Impfstoffe gegen Infektionskrankheiten hergestellt, wie z.B. den von Salk & Sabin entwickelten Impfstoff gegen Kinderlähmung (Polyomyelitis). Seit 1967 existieren durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) weltweite Impfprogramme.

2.2. Passive Immunisierung

Die passive Immunisierung dient als Notfallmaßnahme nach bewiesenem unmittelbarem Kontakt mit dem Erreger, beispielsweise bei Tollwut nach Biss durch ein potentiell infektiöses Tier. Die passive Immunisierung wurde 1890 von Emil von Behring als Heilverfahren gegen Diphtherie eingeführt (Plotkin, 2005). Sie beruht auf der Gabe von Immunglobulinen. Dadurch muss der Körper selbst keine Antikörper gegen einen Erreger herstellen, die verabreichten Antikörper

können jedoch den Erreger erkennen und für das Immunsystem markieren. Jedoch werden die erteilten Immunglobuline nach Wochen aufgrund ihrer Halbwertszeit abgebaut. Dadurch besteht die Möglichkeit einer Neuinfektion, da das Immunsystem selbst nicht aktiviert und somit kein immunologisches Gedächtnis ausgebildet wurde. Weiterhin besteht die Gefahr von Reaktionen gegen die verabreichten Antikörper.

2.3. Aktive Immunisierung

Bei der aktiven Immunisierung erfolgt eine Unterteilung zwischen Lebend- und Totimpfstoffen. Sie spielt eine wichtige Rolle in der gängigen Gesundheitsprophylaxe, beginnend mit der Schutzimpfung in den ersten Monaten nach der Geburt gegen die Erreger von Diphtherie, Tetanus und Keuchhusten, bis hin zur jährlichen Gripeschutzimpfung.

2.3.1. Lebendimpfstoffe

Lebendimpfstoffe stellen abgeschwächte, noch vermehrungsfähige Erreger dar, welche das Immunsystem des Impflings auf natürliche Art und Weise stimulieren, was in einer Immunantwort auf sowohl humoraler und zellulärer Ebene resultiert (Leclerc, 2003). Diese attenuierten Erreger sind in ihrem Aufbau und Infektionsverhalten identisch mit dem natürlichen Erreger, verursachen aber eine stark abgeschwächte Pathogenese. Gewonnen werden sie durch kontinuierliches Züchten und Passagieren in Zellkultur, wo durch ein Anhäufen von Mutationen ein Erreger mit abgeschwächter Virulenz erhalten wird. Die Entdeckung der Attenuation von Erregern machte Pasteur mit einer Kultur des bei Hühner verursachenden Cholera Erregers *Pasteurella multocida*, welcher nach mehrmaligen Passagieren keine Infektion mehr in Hühnern auslöste (Pasteur, 1880). Weiterhin fand er an Arbeiten mit *Bacillus anthracis*, dem Erreger von Anthrax, heraus, dass Erreger

durch hohe Temperaturen und Chemikalien attenuiert werden können (Pasteur et al, 1881).

Beispiele von Lebendimpfstoffen auf Basis attenuierter Erreger sind die Impfstoffe gegen Masern, Röteln und Pocken. Durch letzteren gelten die Pocken seit 1972 als ausgerottet (Fenner, 1982). Einen weiteren Lebendimpfstoff stellt die Polio-Vakzine nach Sabin dar, welcher aber auch als Beispiel für die Gefahr in der Anwendung von Lebendimpfstoffen steht, wenn es zum Beispiel zur Ausbildung von Impfkrankheiten bei immunsuprimierten Personen oder durch die Rückmutation der Impfviren zur Erkrankung geimpfter Personen kommt (Lofquist et al., 2003; Nafziger, 2005).

Eine Alternative zu attenuierten Erregern stellen rekombinante Erreger dar. Durch den Weg der Klonierung von Genen ist die Expression heterologer Antigene in attenuierten Bakterien oder Viren möglich, was eine gleichzeitige Impfung gegen den Vektororganismus und den heterologen Erreger erlaubt.

2.3.2. Totimpfstoffe

Als Totimpfstoffe werden Erreger eingesetzt, die nach chemischer Behandlung nicht mehr vermehrungsfähig sind und keine Erkrankung mehr auslösen können. Es existieren Ganzzellvakzinen, die aus einer Komplettpräparation des gesamten Erregers bestehen, oder Spaltvakzinen, welche nur bestimmte Epitope eines Proteins als Antigen enthalten. Ein Beispiel dafür ist der Impfstoff für das Hepatitis-B-Virus, welcher aus dem partikelbildenden Oberflächenprotein (HBsAg) des Virus besteht (Yu et al., 2004). Totimpfstoffe folgen nicht dem natürlichen Infektions- und Replikationsverlauf des Erregers, wodurch keine umfangreiche Immunantwort hervorgerufen wird. Da die Erreger sich nicht mehr vermehren können, bleibt eine intrazelluläre Proteinexpression und somit eine MHC I-Präsentation aus, wodurch keine CTL-Antwort generiert werden kann. Da Totimpfstoffe als extrazelluläre Substanz aufgenommen werden, folgen sie dem Prozessierungs- und

Präsentationsweg eines extrazellulären Erregers. Es kommt dadurch vor allem zur Ausbildung einer humoralen Immunantwort und der Produktion von spezifischen Antikörpern. Dadurch ergibt sich die Notwendigkeit zur wiederholten Gabe des Impfstoffes. Da die induzierte Immunantwort nur sehr schwach ist, ist die Verabreichung des Impfstoffes meist an die Kombination mit immunstimulatorischen Adjuvantien gekoppelt (Francis & Durham, 2004). Beispiele für Totimpfstoffe sind Impfstoffe gegen Tollwut, Hepatitis-A, Frühsommer-Meningo-Encephalitis und der Polio-Impfstoff nach Salk.

2.4. DNA- und RNA-Vakzinen

DNA-Vakzinen besitzen bezüglich ihrer Anwendung einige Vorteile gegenüber traditionellen Vakzinen. Hinsichtlich ihrer Immunogenität können DNA-Vakzine sowohl eine humorale wie auch eine zelluläre Immunantwort generieren. Im Gegensatz zu einer Immunisierung mit Proteinen können die jeweiligen Antigene, da sie innerhalb der Säugerkelle exprimiert wurden, korrekt gefaltet, glykosyliert und post-translational modifiziert werden. DNA-Vakzinen sind im Gegensatz zu Lebendvakzinen in ihrer Anwendung sicherer, da sie kein Potenzial besitzen, wieder eine virulente Form anzunehmen und Attenuierungsmethoden nicht nötig sind. Die zur Immunisierung einzusetzende Plasmid-DNA ist leicht genetisch zu manipulieren, so dass es möglich ist, viele verschiedene Gene zu klonieren und als Antigene einzusetzen. Weiterhin können Plasmide sehr einfach und kostengünstig in Bakterien vervielfältigt und isoliert werden. Da Plasmid-DNA temperaturstabil ist und eine lange Halbwertszeit besitzt, ist das Einhalten von Kühlketten nicht nötig, was eine einfache Handhabung des Impfstoffes mit sich bringt (Shedlock & Weiner, 2000).

Die Immunisierung mit DNA erlaubt die *in vivo* Expression von Antigenen, die durch die verabreichte DNA kodiert werden, und induziert

somit eine humorale wie auch zelluläre antigenspezifische Immunantwort (Shedlock & Weiner, 2000; Donnelly et al., 2005). Obwohl bereits in der Mitte des 20. Jahrhunderts mit der Arbeit an DNA-Vakzinen begonnen wurde, wiesen erst 40 Jahre später eine Reihe von Gruppen eine Antigenexpression kodiert durch die applizierte Plasmid-DNA in Tieren nach (Will et al., 1982; Dubensky et al., 1984; Wolff et al., 1990). Wenig später wurde gezeigt, dass es nach DNA-Immunisierung zu einer humoralen Immunantwort kommt, welche spezifisch für das kodierte Antigen ist (Tang et al., 1992; Ulmer et al., 1993). Bis heute gibt es mehrere Ansätze zur Etablierung einer DNA-Vakzine, um eine Immunantwort gegen Malaria, Tuberkulose, Hepatitis-B, Ebola und HIV zu induzieren (Hoffman et al., 1997; Kalinna, 1997; Wang et al., 1998; Kaufmann, 1995; Strugnell et al., 1997; Lowrie et al., 1997; Davis et al., 1994; Tacket et al., 1999; Xu et al., 1998; Boyer et al., 1997; Boyer et al., 1999). Ein Nachteil der DNA-Immunisierung ergibt sich aus dem onkogenen Potential der Vakzine, da die Möglichkeit der Integration ins Wirtsgenom besteht, was ein mögliches Sicherheitsproblem darstellt (Nichols et al., 1995; Beláková et al., 2007).

Nach Einbringen der DNA in die Zelle liegt diese entweder in den endosomalen Kompartimenten oder direkt im Zytosol vor. Voraussetzung für eine folgende Transkription stellt das Eintreten der DNA in den Zellkern dar. In sich teilenden Zellen hat die DNA während der Mitose und dem damit verbundenen Auflösen der Kernmembran die Möglichkeit, in den Kern zu gelangen und die dort befindliche Transkriptionsmaschinerie zu nutzen (Wilke et al., 1996; Brunner et al., 2000). In mitotisch inaktiven Zellen wie Neuronen oder DC hingegen muss die DNA entweder aktiv in den Kern transportiert werden oder gelangt über passive Diffusion durch die Kernpore in den Kern. Jedoch lässt die Kernpore aufgrund ihres eigenen Durchmessers nur Partikel mit einem Durchmesser bis zu 9 nm mittels passiver Diffusion passieren (Pante & Kann, 2002). Da Plasmid-DNA meist jedoch einen Durchmesser von etwa 25 nm besitzt, ist deren Eintritt in den Zellkern mittels passiver Diffusion eher

ineffizient. Die Expression von Genen innerhalb der Zelle führt dann zu einer MHC I-vermittelten Präsentation des Antigens. Andererseits können APC auch Antigene aufnehmen, die von transfizierten Körperzellen stammen. Diese werden dann endozytiert und im Kontext mit MHC II-Molekülen präsentiert oder in DC über MHC I-Moleküle „cross“-präsentiert.

In vivo beobachtete primäre Immunantworten nach Gentransfer von Plasmid-DNA entstehen wahrscheinlich hauptsächlich durch Transfektion verschiedener Körperzellen. Je nach Applikationsort kommt es hierbei zu einer Antigen-Expression in teilungsaktiven Fibroblasten, Keratinozyten, Haarfollikeln oder Muskelzellen (Fuller & Haynes, 1994; Boyle et al., 1997; Fan et al., 1999; Sin et al., 1999; Yu et al., 1999). Für die Induktion einer MHC I-vermittelten CTL-Antwort nach intramuskulärer DNA-Vakzinierung ist die Anwesenheit von APC wichtig (Corr et al., 1996; Fu et al., 1997). In Geweben befindliche, unreife DC sind in der Lage, das von Körperzellen exprimierte Antigen aufzunehmen und zu präsentieren (Harshyne et al., 2001). In geringem Umfang können DC, wie Langerhans-Zellen der Haut, auch direkt mit Plasmid-DNA transfiziert werden (Banchereau & Steinman, 1998; Chattergoon et al., 1998). Die Applikation von Plasmid-DNA mittels „gene-gun“ verläuft durchaus effizient, ist aber für den Menschen schmerzhaft und somit in der Anwendung eher ungeeignet. Außerdem kann freie Plasmid-DNA die Bildung von Auto-Antikörpern gegen DNA induzieren (Donnelly et al., 1997). Somit ist die Entwicklung von Trägersystemen zum Einbringen von DNA in DC von Nöten.

Zum Transfer von Plasmid-DNA in DC werden verschiedene Trägersysteme eingesetzt. Es existieren eine Vielzahl von synthetischen, natürlichen und nicht-viralen Trägersystemen. Zu den synthetischen Systemen gehören vor allem Liposomen und kolloidale Systeme wie Mikro- oder Nanopartikel (D`Souza et al., 2002). Nanopartikel werden bereits als Trägerstoffe für Arzneimittel und Impfstoffe verwendet

(Pandey & Khuller, 2004). Durch das Anfügen von Protein-Transduktions-Domänen (PDT) wird die Internalisierung von Plasmid-DNA in unterschiedliche Zelltypen vermittelt (Leifert & Whitton, 2003). Es existieren weiterhin Trägersysteme, die auf human-pathogenen Viren wie Adeno-, Vaccinia-, Influenza- und Lentiviren basieren. Diese weisen eine hohe Effizienz im Transfer von DNA in DC auf, beinhalten jedoch auch einige Nachteile. So besitzt die Mehrzahl der Bevölkerung Adenovirus-spezifische Antikörper, durch die adenovirale Vektoren inaktiviert werden (Verma & Somia, 1997). Auch nicht-human-pathogene Viren wie das Baculovirus AcMNPV („*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus“) können Säugerzellen infizieren (Volkman & Goldsmith, 1983). Sie bieten als apathogene-Viren ein hohes Maß an Sicherheit, replizieren aber nur ineffektiv oder gar nicht im Wirtsorganismus, woraus eine geringe Immunogenität resultiert (Ada & Blanden, 1994).

RNA-Vakzinen haben im Vergleich zu DNA-Vakzinen den Vorteil, dass die kodierten Antigene sofort im Zytosol der Zelle translatiert werden können. Der Schritt der Transkription und ein damit verbundenes Eintreten in den Zellkern sind somit nicht erforderlich. Dies ist der limitierende Schritt einer DNA-Vakzine und erforderlich für eine effiziente Genexpression (Wilke et al., 1996). Somit können durch eine RNA-Vakzine höhere Expressionsraten des Antigens erreicht werden. Im Gegensatz zu DNA-Vakzinen ist die Möglichkeit einer Integration ins Wirtszellgenom bei Verwendung einer RNA-Vakzine nicht gegeben. Zudem benötigen für eine RNA-Vakzine eingesetzte Plasmide keine Säuger-Promotoren, deren Einsatz zu unerwünschten Nebeneffekten führen können. So konnte eine unkontrollierte Expression von Proteinen durch den Säugerpromotor nach Integration in das Wirtsgenom nachgewiesen werden (Hacein-Bey-Abina, 2003).

Ein durch Bakterien vermitteltes „Delivery“ translationskompetenter mRNA in Säugerzellen führt zu einer Proteinexpression und Antigenpräsentation, welche in einer antigenspezifischen T-Zell-Antwort resul-

tiert (Mercado et al., 2000; Badovinac et al., 2002; Corbin & Harty, 2004). Mittels *Listeria monocytogenes* war es möglich, eGFP- und Ovalbumin-kodierende DNA und mRNA in Säugerzellen einzubringen und eine antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellaktivierung nachzuweisen (Schoen et al., 2005; Loeffler et al., 2006). Weiterhin existieren Versuche zum Einsatz von RNA-Vakzinen zur Tumorbekämpfung (Caruso et al., 2005; Cheng et al., 2004).

3. Hefen als Lebendimpfstoffe

Je nach Art des infizierenden Organismus sind die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Impfung unterschiedlich. Somit beruht die effiziente Immunantwort gegen verschiedene Erreger, wie z.B. Hepatitis-C- oder HI-Virus, auf einer ausgeprägten zellulären Immunität mit Etablierung einer CTL-Antwort. Eine erfolgreiche Vakzine muss somit generell bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Neben einer kostengünstigen Herstellung sollte der Impfstoff sicher sein, d. h. es sollte zu keiner Übertragung des zur Impfung eingesetzten Erregers kommen, und er sollte eine effektive Immunantwort induzieren, welche in einer lebenslangen Immunität resultiert. Weiterhin wären eine einfache Applikation und einmalige Immunisierung wünschenswert, erstere würde auch zu einer höheren Akzeptanz des Impfstoffes in der Bevölkerung führen. Eine Möglichkeit wäre eine orale Vakzine, welche eine IgA-vermittelte Immunantwort in mukosalen Geweben erzeugt und die zur Abwehr von Erregern, wie HIV, Influenza oder Malaria, von Bedeutung ist (Raychaudhuri & Rock, 1998; Ogra et al., 2001).

Hefen als Lebendimpfstoff erfüllen viele dieser Voraussetzungen. Die Hefe verbindet die Vorteile eines Einzellers wie geringe Zellgröße, schnelles Wachstum und einfache Kultivierung mit den Fähigkeiten eines eukaryotischen Organismus wie N-Glykosylierung und komplexe posttranslationale Modifikationen von Proteinen. Sie ist molekular-

biologisch und genetisch gut charakterisiert und es existieren eine Reihe von Expressionssystemen, wodurch eine einfache genetische Manipulation und dadurch die Expression einer Vielzahl von klinisch relevanten Antigenen möglich sind (Breinig et al., 2003). Es besteht zudem die Möglichkeit, Hefen als oralen Impfstoff zu verabreichen (Schreuder et al., 1996). Ein Vorteil hierbei wäre die Akzeptanz der Bevölkerung hinsichtlich eines Einsatzes von Hefen, da diese von Bier- und Brotherstellung bekannt ist. Zusätzlich besitzen viele Hefegattungen einen GRAS-Status („generally regarded as safe“). Von großem Interesse zur Herstellung eines auf Hefe basierenden Impfvehikels sind die beiden Hefegattungen *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*, da sie sich durch eine geringe Eigenimmunität auszeichnen (Heintel et al., 2003). Die Effektivität von *Schizosaccharomyces pombe* als Vehikel wurde von Breinig und Mitarbeitern (2003) belegt, wo nach Expression des pp65-Antigens aus CMV in *Sz. pombe* in einem *ex vivo* Assay eine Aktivierung pp65-spezifischer T-Zellen nachgewiesen werden konnte. Diese Stimulation CD4 positiver und CD8 positiver T-Lymphozyten entsprach der Antwort nach Kontakt mit intaktem CMV. Die Aktivierung von CD8⁺ T-Lymphozyten nach Zugabe eines exogenen Antigens lässt sich hierbei durch das Phänomen der „cross-presentation“ erklären. Nach Verwendung rekombinanter *S. cerevisiae* Zellen als Vehikel konnten sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunität beobachtet werden (Stubbs & Wilson, 2002; Franzusoff et al., 2005). Ebenso ist ein Einschleusen rekombinant in Hefe exprimierter exogener Antigene in den MHC I- und MHC II-Präsentationsweg möglich, wo durch „cross-presentation“ neben einer Antigen-spezifischen CD4-Antwort auch eine CD8-Immunantwort detektiert werden kann (Stubbs et al., 2001; Haller et al., 2007; Boehm et al., 2009).

Zur Etablierung einer Immunantwort sind DC als APC notwendig, da sie naive T-Lymphozyten stimulieren können und die Fähigkeit zur „cross-presentation“ besitzen (Stubbs & Wilson, 2002). Hefen werden von DC

effektiv phagozytiert (Newman & Holly, 2001) und stimulieren diese, was zur gesteigerten Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen auf der Zelloberfläche von DC führt, wie MHC II, CD40, CD80 und CD86 (Newman & Holly, 2001; Stubbs et al., 2001; Stubbs & Wilson, 2002; Buentke & Scheynius, 2003; Bernstein et al., 2007; Remondo et al., 2009). Diese Aktivierung könnte durch Komponenten der Hefezellwand ausgelöst werden. So führt Mannan, ein Bestandteil der Hefezellwand, zur gesteigerten Oberflächenexpression von CD40, CD80 und CD86 auf DC und zur Produktion inflammatorischer Zytokine, die an der T_H1- und T_H2-Immunantwort beteiligt sind (Sheng et al., 2006). Aufgrund der Tatsache, dass Hefen die Aktivierung von iDC zu mDC und somit einen adjuvantischen Effekt vermitteln, ist die Voraussetzung zur Stimulierung naiver CD8⁺ T-Zellen gegeben, was das Potential von Hefen als Lebendimpfstoff weiter unterstreicht.

Der Einsatz rekombinanter Hefezellen als neuartige Impfstoff-Vehikel stellt somit einen interessanten und viel versprechenden Ansatz in der Entwicklung neuer Impfstrategien dar. In Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass durch einen antigenexprimierenden *S. cerevisiae* Stamm eine schützende Immunität gegen Tumorantigene in Mäusen hervorgerufen werden konnte (Stubbs et al., 2001). Folglich eignen sich Hefen als Antigen-„Carrier“ und zur Induktion einer zellulären Immunantwort. In den letzten Jahren wurden *S. cerevisiae* Stämme von verschiedenen Arbeitsgruppen als Vehikel zur Protein-Immunisierung eingesetzt. So wurden neben Tumorantigenen auch virale Proteine in Hefen rekombinant exprimiert und eine antigenspezifische Immunantwort *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen (Barron et al., 2006; Haller et al., 2007; Riemann et al., 2007; Bernstein et al., 2008).

Im Unterschied zur Hefe als Impfstoffvehikel, sind „Delivery“-Systeme, die auf attenuierten Bakterien basieren, schon länger bekannt. Attenuierte Erreger wie *Escherichia coli*, *Shigella*, *Salmonella* oder *Listeria* werden dazu eingesetzt (Weiss & Krusch, 2001). Ein Nachteil dieses durch Bakterien vermittelten „Delivery“ ist die Toxizität der Bakterien

hinsichtlich der Säugierzelle, was in einer verringerten Transformationseffizienz resultiert (Guzmán et al., 1996; Barsig & Kaufmann, 1997; Merrick et al., 1997; Carrero et al., 2004). Nach Aufnahme von Hefen durch APC wurde hingegen kein toxischer Effekt der Hefen auf Säugierzellen beobachtet (Breinig et al., 2003), was das Potenzial der Hefe als Antigen-Vehikel untermauert.

4. Ziele der Arbeit

Infektionskrankheiten stellen immer noch ein weltweites Problem dar, an denen jährlich etwa 15 Millionen Menschen sterben. Zur Bekämpfung global relevanter Infektionskrankheiten wie HIV, Hepatitis-C oder Malaria, ist die Ausbildung einer CTL-Antwort von Nöten, jedoch existiert bis heute noch kein Impfstoff gegen diese Vireninfektionen, der eine adaptive Immunität vermittelt. Somit ist die Erforschung neuer Impfmethoden, welche eine zelluläre Immunantwort generieren, von entscheidender Bedeutung.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Etablierung eines Hefe-basierten „Delivery“-Systems für funktionelle Nukleinsäuren. Dieses nicht-pathogene und nicht-virale Trägersystem für Antigen-kodierende DNA und mRNA sollte auf Induktion einer zellulären Immunantwort getestet werden. Nach Durchführung grundlegender Untersuchungen sollte ein „Delivery“-System entwickelt werden, mit dem es möglich ist, funktionelle Antigen-kodierende DNA und mRNA in Säuger-APC einzubringen. Für ein „DNA-Delivery“ in Säuger wurden virale und APC-spezifische Promotoren verwendet und hinsichtlich ihrer Effizienz zur Vermittlung einer Antigen-Expression in verschiedenen APC miteinander verglichen. Für ein „RNA-Delivery“ sollte das System durch die Verwendung konstitutiver und induzierbarer Hefepromotoren so modifiziert werden, dass der Zeitpunkt der Bildung Antigen-kodierender Transkripte in der Hefe variiert werden kann. Nach Etablierung des Systems in murinen Makrophagen, sollte die Funktion auch in humanen

DC überprüft werden. Weiterführende Experimente zielten darauf, die Menge an transfizierter Nukleinsäure und somit an exprimiertem Antigen nach DNA- und RNA-„Delivery“ in den verschiedenen APC zu steigern. Dazu sollte der Einfluss der Koexpression der porenbildenden Proteine Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes* und Perforin, ein Effektormolekül zytotoxischer T-Lymphozyten, auf das „Delivery“-System untersucht werden. Abschließend sollte überprüft werden, ob nach Hefe-vermitteltem „Delivery“ Antigen-kodierender Nukleinsäuren eine antigenspezifische Aktivierung von Gedächtnis-T-Zellen stattfindet. Hierbei diene pp65, das Haupttegumentprotein des humanen Zytomegalovirus (hCMV), als Antigen.

II. Material und Methoden

1. Organismen

Die während der vorliegenden Arbeit verwendeten Hefe- und *E. coli* Stämme wurden der Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen. Die Hefestämme sind in Tabelle 1, die *E. coli* Stämme in Tabelle 2 dargestellt.

1.1. Hefestämme

Tabelle 1: Verwendete Hefestämme, deren Genotyp und Herkunft

Hefestamm	Genotyp	Herkunft
S86c	<i>MATα, ura3-2, leu2, his3, pra1, prb2, prc1, cps1 [L-O], [M-O]</i> , Verlust der viralen L- und M-Genome nach Hitzebehandlung des Stammes S86c	Schmitt (1995)
192.2d	<i>MATα ura3 leu2</i>	Schmitt et al., (1996)
BY4742	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	Open Biosystem
PW260	<i>h⁻ leu1.32 ura4.dl18 ade 6. 210</i>	Heintel et al., (2001)

1.2. *E. coli* Stämme

Für Klonierungsarbeiten wurden TOP10- und DH5 α -Zellen verwendet. TOP10F⁻-Zellen kamen zur pYES2.1V5-His-TOPO-Klonierung und Nova Blue Singles bei der AccepTor™-Klonierung zum Einsatz.

Tabelle 2: Verwendete *E. coli* Stämme, deren Genotyp und Herkunft

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Herkunft
DH5 α	F ⁻ <i>recA1 endA1 gyr A96 thi hsdR17 supE44 relA1</i> $\Delta(\text{argF-lac-ZYA})$ U169 ($\Phi 80\text{d}lacZ\Delta M15$) λ ⁻	Pharmacia
TOP10	F ⁻ <i>mcrA</i> $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mrcBC})$ $\Phi 80\text{d}lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1 deoR araD139</i> $\Delta(\text{ara-leu})7697$ <i>galU galK rspL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
TOP10F ⁻	F ⁻ { <i>lacI</i> ^q Tn10 (Tet ^R)} <i>mcrA</i> $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mrcBC})$ $\Phi 80\text{d}lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1 deoR araD139</i> $\Delta(\text{ara-leu})7697$ <i>galU galK rspL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen
Nova Blue Singles	<i>endA1 hsdR17 (r_{K12}⁻m_{K12}⁺) supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac</i> F ⁻ [<i>proA</i> ⁺ B ⁺ <i>lacI</i> ^q Z Δ M15::Tn10] (Tet ^R)	Novagen

1.3. Zelllinien

IC21:

Die IC21 Makrophagenzelllinie wurde aus SV 40 transformierten Peritonealmakrophagen der C57BL/6 Maus entwickelt. Die Zelllinie hat grundlegende Eigenschaften der ursprünglichen peritonealen Mausmakrophagen beibehalten und eignet sich somit als Modell zur Untersuchung von Mausmakrophagenaktivitäten (Mauel & Defendi, 1971).

2. Plasmide

Die in der vorliegenden Arbeit zu Klonierungsarbeiten verwendeten Plasmide wurden der Plasmid-Stammsammlung des Lehrstuhls für Molekular- und Zellbiologie der Universität des Saarlandes entnommen und sind in Tabelle 3 dargestellt. Alle während dieser Arbeit konstruierten Plasmide sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 3: Verwendete Plasmide, deren Eigenschaften und Herkunft

Plasmid	Eigenschaften	Herkunft
pPGK-M28-I	2 μ Hefe/ <i>E.coli</i> „shuttle“ Multi-Copy-Vektor mit hefeeigenem <i>URA3</i> -Gen; enthält den offenen Leserahmen des K28pptoX-Gens zwischen den Restriktionsschnittstellen <i>XhoI</i> und <i>BglII</i>	(Schmitt, 1995)
YEp351	2 μ Hefe/ <i>E.coli</i> „shuttle“ Multi-Copy-Vektor mit <i>LEU2</i> - und Amp ^R -Marker; MCS aus pUC18	(Hill et al., 1986)
YEp352	2 μ Hefe/ <i>E.coli</i> „shuttle“ Multi-Copy-Vektor mit <i>URA3</i> - und Amp ^R -Marker; MCS aus pUC18	(Hill et al., 1986)
pEGFP-C1	Expressionsvektor; eGFP-Gen; hCMV-IE Promotor	(BD-Clontech)
pREB-BD	pREB1 mit alternativer MCS durch <i>XRASX</i> (<i>NdeI/MaeI/SmaI</i>)	(Diehl, 2008)
pYES2.1/ V5-His-TOPO	“TA-Cloning“-Vektor, der die Insertion eines PCR-Produktes mit 3'-A-Überhängen erlaubt; induzierbarer <i>GAL1</i> -Promotor; <i>URA3</i> -Marker; Amp ^R	(Invitrogen)
pCRII-TOPO	Amp ^R , Kan ^R , T7-, SP6-Promotor, LacZ α -Reporter-Gen zur Blau-Weiß-Selektion	(Invitrogen)
pSTBlue-1	<i>E.coli</i> Expressionsvektor mit LacZ-Gen zur Blau-Weiß-Selektion, Amp ^R - und Kan ^R -Selektionsmarker und MCS	(Novagen)
jw4304	Enthält 1,6 kb großes hCMV-pp65 <i>BamHI</i> Fragment	(Meyerhans, Homburg)
pMK-RQ-Fascin	Enthält synthetisches Gen des humanen Fascins als 1,6 kb <i>HindIII/XhoI</i> Fragment	(GENEART)
pPGK-GFP	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält anstelle des K28-Gens das GFP-Gen als <i>XhoI/BglII</i> Fragment	(Drescher, 2006)
pSPO-pCMV-Ovalbumin	Expressionsvektor für Listerien, enthält CMV-Promotor und Ovalbumin-Gen, Erythromycin-Marker	(Stritzker, Würzburg)
pFLO-IRES-cytova	Expressionsvektor für Listerien, enthält IRES-Sequenz und Ovacyt-Gen, Erythromycin-Marker	(Stritzker, Würzburg)

Tabelle 4: Während dieser Arbeit konstruierte Plasmide, deren Eigenschaften und Größe

Plasmid	Größe	Eigenschaft
pCMV	5,8 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des CMV-Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment
pDC-STAMP	6,8 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des DC-STAMP-Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment
pFascin	6,8 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des Fascin-Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment
pMLS1	5,7 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des <i>MLS1</i> -Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment
pICL1	5,7 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des <i>ICL1</i> -Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment
pCMV-eGFP	6,5 kb	Grundvektor pCMV; enthält das eGFP Gen als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pDC-STAMP-eGFP	7,5 kb	Grundvektor pDC-STAMP; enthält das eGFP Gen als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pFascin-eGFP	7,5 kb	Grundvektor pFascin; enthält das eGFP Gen als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pMLS1-eGFP	6,4 kb	Grundvektor pMLS1; enthält das eGFP Gen als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pICL1-eGFP	6,4 kb	Grundvektor pICL1; enthält das eGFP Gen als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pPGK-eGFP		Grundvektor pPGK-M28-I; enthält das eGFP Gen als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pPGK-IRES-eGFP	7,1 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pCMV-IRES-eGFP	6,9 kb	Grundvektor pCMV; enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pICL1-IRES-eGFP	6,9 kb	Grundvektor pICL1; enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pMLS1-IRES-eGFP	6,9 kb	Grundvektor pMLS1; enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment

pDC-STAMP-IRES-eGFP	8,1 kb	Grundvektor pDC-STAMP; enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pFascin-IRES-eGFP	8,1 kb	Grundvektor pFascin; enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pPGK-Ovalbumin	7,0 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält das Gen des Volllängen Ovalbumin als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pPGK-Ovacyt	6,7 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält das Gen der zytosolischen Ovalbumin Variante Ovacyt als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pCMV-IRES-Ovacyt	7,0 kb	Grundvektor pCMV; enthält die Sequenz der IRES-Ovacyt Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pMLS1-IRES-Ovacyt	7,0 kb	Grundvektor pMLS1; enthält die Sequenz der IRES-Ovacyt Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pICL1-IRES-Ovacyt	7,0 kb	Grundvektor pICL1; enthält die Sequenz der IRES-Ovacyt Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pPGK-IRES-Ovacyt	7,2 kb	Grundvektor pPGK-M28-I; enthält die Sequenz der IRES-Ovacyt Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment
pCMV-IRES-eGFP-2	7,034 kb	Grundvektor pCMV-IRES-eGFP; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der kurzen Variante (134 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment
pCMV-IRES-eGFP-3	7,125 kb	Grundvektor pCMV-IRES-eGFP; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment
pICL1-IRES-eGFP-2	7,034 kb	Grundvektor pICL1-IRES-eGFP; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der kurzen Variante (134 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment
pICL1-IRES-eGFP-3	7,125 kb	Grundvektor pICL1-IRES-eGFP; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment

pPGK-IRES-eGFP-2	7,234 kb	Grundvektor pPGK-IRES-eGFP; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der kurzen Variante (134 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>Bgl</i> II/ <i>Sac</i> I Fragment
pPGK-IRES-eGFP-3	7,325 kb	Grundvektor pPGK-IRES-eGFP; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>Bgl</i> II/ <i>Sac</i> I Fragment
p*ICL1-LLO	8,0 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>ICL1</i> -Promotor Sequenz als <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I, die Sequenz von LLO (ohne Signalsequenz) als <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI und die Sequenz von CYCTT als <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I Fragment
p*ICL1-ssLLO	8,1 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>ICL1</i> -Promotor Sequenz als <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I, die Sequenz von ssLLO (mit K1-Signalsequenz) als <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI und die Sequenz von CYCTT als <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I Fragment
p*ICL1-Perforin Δ C	7,4 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>ICL1</i> -Promotor Sequenz als <i>Hind</i> III/ <i>Xho</i> I, die Sequenz von Perforin (C-terminal verkürzt) als <i>Xho</i> I/ <i>Xba</i> I und die Sequenz von CYCTT als <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I Fragment
p*GAL1-LLO	7,9 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>GAL1</i> -Promotor Sequenz als <i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I, die Sequenz von LLO (ohne Signalsequenz) als <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI und die Sequenz von CYCTT als <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I Fragment
p*GAL1-ssLLO	8,0 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>GAL1</i> -Promotor Sequenz als <i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I, die Sequenz von ssLLO (mit K1-Signalsequenz) als <i>Xho</i> I/ <i>Bam</i> HI und die Sequenz von CYCTT als <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I Fragment
p*GAL1-Perforin Δ C	7,3 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>GAL1</i> -Promotor Sequenz als <i>Sal</i> I/ <i>Xba</i> I, die Sequenz von Perforin (C-terminal verkürzt) als <i>Xho</i> I/ <i>Xba</i> I und die Sequenz von CYCTT als <i>Xba</i> I/ <i>Sac</i> I Fragment
pICL1-Ovacyt		Grundvektor pICL1; enthält das Gen der zytosolischen Ovalbumin Variante Ovacyt als <i>Xho</i> I/ <i>Bgl</i> II Fragment

p*CMV-IRES-eGFP	7,6 kb	Grundvektor YEp351; enthält die CMV-Promotor Sequenz als <i>HindIII/XhoI</i> und die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment (Riplinger, 2008)
p*MLS1-IRES-eGFP	7,5 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>MLS1</i> -Promotor Sequenz als <i>HindIII/XhoI</i> und die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment (Riplinger, 2008)
p*ICL1-IRES-eGFP	7,5 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>ICL1</i> -Promotor Sequenz als <i>HindIII/XhoI</i> und die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment (Riplinger, 2008)
p*PGK-IRES-eGFP	7,7 kb	Grundvektor YEp351; enthält die <i>PGK</i> -Promotor Sequenz als <i>HindIII/XhoI</i> und die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment (Riplinger, 2008)
pCMV-IRES-pp65	7,9 kb	Grundvektor pPGK-6His/Xa/GST; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des CMV-Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment und die Sequenz der IRES-pp65 Fusion als <i>XhoI/XbaI</i> Fragment
pMLS1-IRES-pp65	7,9 kb	Grundvektor pPGK-6His/Xa/GST; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des <i>MLS1</i> -Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment und die Sequenz der IRES-pp65 Fusion als <i>XhoI/XbaI</i> Fragment
pICL1-IRES-pp65	7,9 kb	Grundvektor pPGK-6His/Xa/GST; enthält anstelle des <i>PGK</i> -Promotors die Sequenz des <i>ICL1</i> -Promotors als <i>HindIII/XhoI</i> Fragment und die Sequenz der IRES-pp65 Fusion als <i>XhoI/XbaI</i> Fragment
pPGK-IRES-pp65	8,2 kb	Grundvektor pPGK-6His/Xa/GST; enthält die Sequenz der IRES-pp65 Fusion als <i>XhoI/XbaI</i> Fragment
pCMV-IRES-pp65-3	8,1 kb	Grundvektor pCMV-IRES-pp65; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment
pICL1-IRES-pp65-3	8,1 kb	Grundvektor pICL1-IRES-pp65; enthält anstelle der Sequenz des <i>PGK</i> -Transkriptionsterminators (<i>tPGK</i>) die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment

pREP1-IRES-eGFP	11,1 kb	Grundvektor pREP-BD; enthält die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment und die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment
pREP1-DC-STAMP-IRES-eGFP	11,6 kb	Grundvektor pREP-BD; enthält anstelle der <i>nmt1</i> Promotor Sequenz die des DC-STAMP-Promotors als <i>PstI/XhoI</i> Fragment, die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment und die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment
pREP1-ICL1-eGFP	9,4 kb	Grundvektor pREP-BD; enthält anstelle der <i>nmt1</i> Promotor Sequenz die des <i>ICL1</i> -Promotors als <i>PstI/XhoI</i> Fragment, das eGFP Gens als <i>XhoI/BglII</i> Fragment und die Sequenz der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment
pREP1-ICL1-IRES-eGFP	11,7 kb	Grundvektor pREP-BD; enthält anstelle der <i>nmt1</i> Promotor Sequenz die des <i>ICL1</i> -Promotors als <i>PstI/XhoI</i> Fragment, die Sequenz der IRES-eGFP Fusion als <i>XhoI/BglII</i> Fragment und die der langen Variante (225 bp) des SV40 Polyadenylierungssignals als <i>BglII/SacI</i> Fragment

3. Nährmedien

3.1. *Escherichia coli*

LB-Medium:

Pepton	1,0 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
(Agar	1,7 %)

Das Medium wurde autoklaviert und bei 20°C aufbewahrt. Zur Herstellung von LB-Agar wurden 1,7 % Agar hinzugefügt. Zur Selektion

von Klonen mit erworbener Ampicillin-Resistenz wurden 7 ml Flüssigmedium mit 14 µl Ampicillin-Stammlösung (Konzentration 50 mg/ml) versetzt. Bei einer Selektion über Kanamycin wurden 7 µl einer Kanamycin-Stammlösung (Konzentration 25 mg/ml) für 7 ml Medium verwendet. Zur Anfertigung von LB-X-Gal-Agarplatten wurden 40 µl einer X-Gal-Stammlösung mit 80 µl sterilem Aqua dest. versetzt und auf LB-Platten ausplattiert.

X-Gal-Stammlösung:

X-Gal	40 mg/ml
-------	----------

Die Stammlösung wurde mit N,N-Dimethylformamid angesetzt.

Ampicillinlösung:

Ampicillin	100 mg/ml
------------	-----------

Die Lösung wurde mit 50 % EtOH hergestellt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

Kanamycinlösung:

Kanamycin	50 mg/ml
-----------	----------

Die Lösung wurde mit H₂O steril hergestellt, sterilfiltriert und bei -20°C gelagert.

SOC-Medium:

Hefeextrakt	0,5 %
Trypton	2,0 %
NaCl	10,0 mM
Glukose	20,0 mM
MgCl ₂	10,0 mM
MgSO ₄	10,0 mM
KCl	2,5 mM

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.2. *Saccharomyces cerevisiae*

YPD-Medium:

Pepton	2,0 %
Hefeextrakt	1,0 %
Aqua dest.	ad 0,9 l

Das Medium wurde durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend mit 0,1 l 20 % Glukose (Endkonzentration 2 %) versetzt. Das Medium wurde bei Raumtemperatur gelagert.

SC-Medien:

Lösung A:

SC-Mix	1,3 g
Ammoniumsulfat	5,0 g
Aqua dest.	ad 0,85 l

Lösung B:

„YNB w/o amino acids and ammonium sulfate“	1,7 g
Aqua dest.	ad 0,05 l

Lösung C:

Glukose/Galaktose	20,0 g/30,0 g
Aqua dest.	ad 0,1 l

Die Lösungen A und C wurden autoklaviert, die Lösung B sterilfiltriert. Im Anschluss wurden die Lösungen vereinigt.

Der SC-Mix mit einer Gesamtmenge von 74,4 g setzt sich wie folgt zusammen, wobei für einen je nach Hefegenotyp gewünschten d/o-Mix die jeweilige Komponente weggelassen wurde:

Adenin	2,5 g
L-Arginin	1,2 g
L-Asparaginsäure	6,0 g
L-Glutaminsäure	6,0 g
L-Histidin x HCl x H ₂ O	1,2 g
L-Leucin	3,6 g
L-Lysin x H ₂ O	1,8 g
L-Methionin	1,2 g
L-Phenylalanin	3,0 g
L-Serin	22,5 g
L-Threonin	12,0 g
L-Thryptophan	2,4 g
L-Tyrosin	1,8 g
Uracil	1,2 g
L-Valin	9,0 g

3.3. *Schizosaccharomyces pombe*

YE-Medium:

Hefeextrakt	5 g/l
Glukose	30 g/l
Uracil	75 mg/l
Adenin	75 mg/l

Minimalmedium nach Moreno et al. (1991):

KH-Phthalat	3,0 g/l
Na ₂ HPO ₄	2,2 g/l
NH ₄ Cl	5,0 g/l
Glukose	20,0 g/l
Salzstammlösung (50 x)	20 ml/l
Spurenelemente (100 x)	0,1 ml/l
Vitamine (100 x)	1,0 ml/l
Aminosäuren bzw. Basen	75 mg/l

Spurenelement-Stammlösung (100 x):

Borsäure	200 mg/l
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	200 mg/l
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	200 mg/l
AlCl ₃	200 mg/l
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	100 mg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	100 mg/l
Li ₂ SO ₄ x H ₂ O	100 mg/l
KJ	100 mg/l
Kaliumhydrogentartrat	2,0 g/l

Vitamin-Stammlösung (100 x)

4-Aminobenzoesäure	20 mg/l
Biotin	2 mg/l
Folsäure	2 mg/l
Nicotinsäure	100 mg/l
Pyridoxolhydrochlorid	100 mg/l
Riboflavin	50 mg/l
Thiaminiumdichlorid	50 mg/l
Ca-D-Panthenat	100 mg/l

Biotin: in 5 g KH₂PO₄/50 ml Aqua dest. lösen.

Folsäure: in 50 ml Aqua dest. unter Zusatz von einigen Tropfen verdünnter NaOH lösen.

Riboflavin: in 500 ml Aqua dest. unter einigen Tropfen HCl unter Erwärmen lösen.

Die übrigen Vitamine sind in wenig Aqua dest. zu lösen.

Die Spurenelement- und Vitaminsammlösung wurden nach dem Autoklavieren des Minimal-Grundmediums zugegeben.

Salz-Stammlösung (50 x):

MgCl ₂ x 6 H ₂ O	5,2 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,1 mM
KCl	13,4 mM
Na ₂ SO ₄	0,3 mM

3.4. Zellkulturmedien

Das Inaktivieren der den Medien zugesetzten Seren erfolgte grundsätzlich für 20 min bei 42°C.

Medium zur Kultivierung muriner Makrophagen (IC21):

RPMI 1640	
Hitzeinaktiviertes FKS	10 % (v/v)

Medium zur Kultivierung Dendritischer Zellen:

RPMI 1640	
Hitzeinaktiviertes FKS	10 % (v/v)
(Endotoxin < 5 EU/ml)	
Penicillin	50 U/ml
Streptomycin	50 µg/ml
IL-4	1000 U/ml
GM-CSF	800 U/ml

Einfriermedium:

RPMI 1640	
Hitzeinaktiviertes FKS	30 % (v/v)
DMSO	10 % (v/v)

4. Primer**Tabelle 5: In dieser Arbeit zur PCR verwendete Oligonukleotide**

Die Sequenzangabe erfolgt jeweils in 5'-3'-Orientierung. Die Start- und Stoppcodons sind fettgedruckt und die Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen sind grau hinterlegt. In den zur SOE-PCR verwendeten Primern ist die Sequenz von IRES kursiv dargestellt. Die Kozak-Sequenz vor eGFP ist unterstrichen, das K1-Sekretions-signal in kleinen Buchstaben dargestellt.

Name	5'-3' Sequenz
5'eGFP	GAA TTC CTC GAG <u>GGC CAC CAT</u> GGT GAG CAA GGG CGA GGA G
3'eGFP	GTC GAC AGA TCT TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GAG
5'IRES	GAA TTC CTC GAG GCC CCT CTC CCT CCC CCC
5'IRES-eGFP	GAA AAA CAC GAT GAT AAG CTT GCC ACA ATG GTG AGC AAG GGC GAG GAG C
3'IRES-eGFP	GCT CCT CGC CCT TGC TCA CCA TTG TGG CAA GCT TAT CAT CGT GTT TTT C
5'pp65	GAA TTC CTC GAG GAG CTC ATG ATA TCC GTA CTG GGT CCC ATT TCG
3'pp65	TCT AGA GTC GAC TCA ACC TCG GTG CTT TTT GGG C
5'IRES-pp65	GAA AAA CAC GAT GAT AAG CTT GCC ACA ATG ATA TCC GTA CTG GGT CCC ATT TCG
3'IRES-pp65	CGA AAT GGG ACC CAG TAC GGA TAT CAT TGT GGC AAG CTT ATC ATC GTG TTT TTC
5'Ova/Ovacyt	GAA TTC CTC GAG ATG GGC TCC ATC GGC GCA G

3`Ova/Ovacyt	GTC GAC AGA TCT TTA AGG GGA AAC ACA TCT GCC AAA GAA G
5`IRES-Ovacyt	GAA AAA CAC GAT GAT AAG CTT GCC ACA ATG GGC TCC ATC GGC GCA G
3`IRES-Ovacyt	CTG CGC CGA TGG AGC CCA TTTG TGG CAA GCT TAT CAT CGT GTT TTT C
5`CMV	AAG CTT TAG TTA TTA ATA GTA ATC AAT TAC GGG GTC ATT AGT TCA TAG C
3`CMV	CTC GAG ATC TGA CGG TTC ACT AAA CCA GCT CTG C
5`ICL1	AAG CTT ATT TAT TGA AAA GTA AAT ATC TCG TAA CCC GGA TG
3`ICL1	CTC GAG CAT TTT TCG TTG ACT TTT TGT TAT GTT ATG CTA AGA
5`MLS1	AAG CTT CCA TTG GGC CGA TGA AGT TAG TCG
3`MLS1	CTC GAG CAT TTT CTT AAT TCT TTT ATG TGC TTT TAC TAC TTT GTT TAG T
5`DC-STAMP	GTC GAC GCG GCC GCC TGC ATA GAA ATC ACT TGT GAC CTT GGG
3`DC-STAMP	CTC GAG TCT CCC TGT GTC TAA GTT CCG CTT AGG TT
5`Fascin	GAA TTC GTC GAC GGA TCC AAG CTT TCC TGA GTA GCT GGG ACC ACA GGC
3`Fascin	TCT AGA AGA TCT CTC GAG GGC GGC GCC CCT GCT C
5`LLO	GTC GAC CTC GAG ATG AAG GAT GCA TCT GCA TTC AAT AAA GAA AA
5`ssLLO	GTC GAC CTC GAG ATG _acg aag cca acc caa gta tta ggt aga tcc gtc agt ata tta ttt ttc atc aca tta cta cac cta gtc gta gcg AAG GAT GCA TCT GCA TTC AAT AAA GAA AA
3`LLO	AGA TCT GGA TCC TTA TTC GAT TGG ATT ATC TAC ACT ATT ACT ATA TTT CGG A

5' PerforinΔC	CTC GAG GAA TTC ATG GGT TCA CTG CCA CGG ATG CCT ATG
3' Perforin	TCT AGA GTC GAC TCA CCA CAC GGC CCC ACT CC

5. Antikörper

Die in dieser Arbeit zur FACS-Analyse oder bei Experimenten mit Säugerzellen eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 6 zusammen mit der jeweiligen Konjugation aufgelistet.

Tabelle 6: Zur FACS-Analyse und zu Experimenten mit Säugerzellen verwendete Antikörper

[h] gegen humane Antigene gerichtet; [m] aus Maus gewonnen; FITC Fluoresceinisothiocyanat; PE Phycoerythrin; PE-Cy5 „Tandem“-Farbstoff, bestehend aus Phycoerythrin kovalent mit Cyanin 5 verknüpft.

Antigen	Klon	Konjugation	Isotyp	Hersteller
CD1a [h]	NA1/34	FITC	IgG2a κ [m]	DAKO
CD3 [h]	UCHT1	FITC		Coulter Immunotech
CD4 [h]	13B8.2	PE-Cy5	IgG1 κ [m]	Coulter Immunotech
CD8 [h]	B9.11	PE-Cy5	IgG1 [m]	Coulter Immunotech
CD14 [h]	TÜK 4	PE	IgG2a κ [m]	DAKO
CD19 [h]	J4.119	PE	IgG1 [m]	Coulter Immunotech
CD28 [h]	L293	-	IgG1 [m]	Becton Dickinson
CD49d [h]	9F10	-	IgG1 κ [m]	PharMingen
CD69 [h]	TP1.55.3	PE	IgG2b [m]	Coulter Immunotech
CD80 [h]	MAB104	PE	IgG1 [m]	PharMingen

CD83 [h]	HB15a	PE	IgG2b κ [m]	Coulter Immunotech
CD86 [h]	2331 (FUN-1)	FITC	IgG1 κ [m]	
HLA-DR [h]	CR3/43	FITC	IgG1 κ [m]	DAKO
HLA-I [h]	W6/32	PE	IgG2a κ [m]	DAKO
INF-γ [h]	4S.B3	FITC	IgG1 κ [m]	PharMingen

Der in dieser Arbeit zur Western-Analyse eingesetzte Antikörper ist, zusammen mit Verdünnungsangaben und Inkubationsbedingungen, in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Zur Western-Analyse verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Primärer Antikörper	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung	Blockingpuffer
Anti-Ovalbumin (Sigma)	1:5.000	anti-rabbit-HRP-gekoppelt (Sigma)	1:10.000	5 % Magermilch in 1 x PBS + 0,05 % Tween

6. Chemikalien, Kits und Enzyme

Die während der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien, Kits und Enzyme sowie deren Hersteller sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien, Kits und Enzyme sowie deren Hersteller

Firma (Firmensitz)	Produkt
5 Prime (Hamburg)	Taq DNA-Polymerase
AppliChem (Darmstadt)	T4 DNA-Ligase, -puffer X-Gal Ammoniumsulfat

	Ampicillin-Natriumsalz Borsäure NaOH Tricin
Biochrom KG, Berlin	FKS (Endotoxin < 5 EU/ml) Penicillin/Streptomycin
BioRad (München)	Elektroporationsküvetten Whatman Blotting-Papier
BioWhittaker	CMV-Lysat
Biozym (Oldendorf)	Agarose
Difco (Detroit, USA)	YNB ohne Aminosäuren und Ammonium-sulfat
Eurogentec (Seraing, B)	„smart ladder“, DNA-Marker
Fermentas (St. Leon-Roth)	DNA-freie RNase Restriktionsenzyme und -puffer T4 DNA-Ligase, -puffer PageRuler™ Prestained Protein Ladder
Formedium™ (Hunstanton, GB)	Galaktose
GibcoBRL (Karlsruhe)	FKS
Invitrogen (Karlsruhe)	“pYES2.1 Cloning Kit” “TOPO®TA Cloning Kit”
Marcor (New Jersey, USA)	Agar, Trypton, Pepton, Hefextrakt
Millipore Corporation (Eschborn)	Dialysefilter
Nalgene Cryoware (Roskilde, Dänemark)	Kryoröhrchen
Neuss & Wilke GmbH (Gelsenkirchen)	Dextrose
Novagen (Darmstadt)	Acceptor pSTBlue-1 Vektor Kit
OMEGA bio-Tec (Norcross, USA)	“E.Z.N.A.® Gel Extraction Kit”
PAA Laboratories (Linz)	BSA RPMI 1640 Medium
PeqLab (Erlangen)	“E.Z.N.A.® Plasmid Miniprep Kit II”
Pierce (Bonn)	SuperSignal West Dura Trial Kit
Promega (Mannheim)	“The Access Quick™ RT-PCR System”
QUIAGEN (Hilden)	peqGOLD TriFast-Systems
Riedel de Haën (Seelze)	Glyzerin
Roche Diagnostic (Mannheim)	Restriktionsenzyme und -puffer “Expand™ High Fidelity PCR System” PVDF-Membran CSPD anti-Digoxigenin-AP

	Complete Protease Inhibitor
Schärfe (Reutlingen)	Casyton
Serva (Heidelberg)	DMSO Chloroform Triton X-100
Sigma-Aldrich (Deisenhofen)	Ampicillin Bromphenolblau TEMED Lachs-Sperma-DNA Brefeldin A Saponin Anti-rabbit-IgG
Töpfer GmbH (Dietmannsried)	Magermilch
Merck (Darmstadt) Roth (Karlsruhe)	Alle weiteren Chemikalien

7. Kulturbedingungen

7.1. *Escherichia coli*

Die Anzucht der *E. coli* Kulturen erfolgte in Flüssigmedium in einem Rundschtüttler bei 37°C und 250 upm. Die Festmedien wurden im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

7.2. Hefen

Die Anzucht von Hefen in Flüssigmedium erfolgte in einem Rundschtüttler bei 30°C und 220 upm. Beimpfte Agar-Platten wurden bei 30°C im Brutschrank inkubiert.

7.3. Säugerzellen

Die Inkubation der verwendeten Säugerzellen erfolgte bei konstanter Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt von 5 %.

7.4. Kultivierung von Säugerzellen

Adhärente IC21 Zellen wurden zu 70-80 % konfluent in Kultur gehalten. Zweimal pro Woche wurden die Zellen mit 1 x PBS abgelöst, in frischem RPMI Medium aufgenommen und zur Stammhaltung 1:3 gesplittet. Die Zellen wurden mit der VenorGem Mycoplasmen-PCR untersucht und waren Mycoplasmen-negativ.

7.4.1. Einfrieren und Auftauen von Säugerzellen

Einfrieren:

Die Zellen wurden in kaltem Einfriermedium in einer Konzentration von 2×10^7 Zellen/ml aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Um ein langsames Absinken der Temperatur zu gewährleisten, wurden die Zellen zunächst für einen Tag in einem Styroporbehälter bei -80°C , danach in der Gasphase über flüssigem Stickstoff auf Dauer gelagert.

Auftauen:

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

7.5. Kryokulturen von Bakterien und Hefen

Zur längeren Lagerung von Kulturen wurden 700 μl steriles 100 % Glycerin zu 700 μl Kultur in Kryoröhrchen gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

8. Zellzahlbestimmung

8.1. Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl (GZZ) von Hefezellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Kammerfläche 0,0025 mm²; Kammertiefe 0,1 mm) mikroskopisch ermittelt und nach folgender Formel berechnet:

$$\text{GZZ/ml} = \text{Zellzahl in 5 Gruppenquadraten} \times 10^6 \times 20^{-1} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

8.2. Optische Dichte

Zur Ermittlung der optischen Dichte (OD) von Proben wurde mit dem „UV-visible Spectrophotometer“ eine Extinktionsmessung bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen unbeimpftes Medium als Referenz durchgeführt. Die Schichtdicke der Küvetten betrug 1 cm.

9. Plasmidisolierung aus *E. coli*

9.1. Alkalische Lyse

GTE-Lösung:

Glukose	50 mM
Tris-HCl pH 8,0	25 mM
Na ₂ EDTA	10 mM

Die Lösung wurde autoklaviert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

NaOH/SDS-Lösung:

NaOH	0,2 M
SDS	1,0 % (w/v)

5 M Kaliumacetat-Lösung pH 4,8:

99,5 % Eisessig	57,4 ml
Aqua dest.	ad 0,2 l

Der pH-Wert der Lösung wurde mit KOH-Plätzchen auf pH 4,8 eingestellt.

Diese Arbeitsweise stellt die gebräuchlichste Methode zur Lyse von Bakterien dar, um niedermolekulare DNA zu gewinnen. Durch Zugabe von EDTA-haltigem Puffer werden zweiwertige Kationen, die für die Stabilität der Bakterienzellwand wichtig sind, komplexiert und die Zellwand somit destabilisiert. Die vollständige Lyse erfolgt nach Inkubation mit einer Mischung aus SDS und NaOH. SDS löst als Detergenz die Phospholipide und Proteinkomponenten der Zellwände und denaturiert bakterielle Proteine. Die Natronlauge denaturiert hingegen chromosomale sowie Plasmid-DNA. Durch Zugabe von saurer Kaliumacetat-Lösung wird das Lysat neutralisiert. Dadurch wird ein schnelles „Reannealing“ der Plasmid-DNA möglich, während chromosomale DNA, bakterielle Proteine und SDS, welches einen Komplex mit dem Kalium bildet, präzipitieren. Die Plasmid-DNA wird dann mit Ethanol gefällt. Die Durchführung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Birnboim und Doly (1979).

Zur alkalischen Lyse wurden 1,5 ml einer Zellsuspension 1 min bei 13.000 upm abzentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde in 100 µl GTE-Lösung resuspendiert und 3 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Zugabe von 200 µl NaOH/SDS-Lösung wurden die Ansätze 10x invertiert und 3-4 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 150 µl Kaliumacetat-Lösung, der Ansatz wurde 10x invertiert und 3 min auf Eis belassen. Nach Zentrifugation von 10 min bei 13.000 upm und 4°C wurde der Überstand ohne Zelldebris in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die sich in dem überführten Überstand befindliche Plasmid-DNA wurde mit 1 ml Ethanol (99%) gefällt. Nach Inkubation für 3 min bei RT, wurde 5 min bei RT und 13.000 upm

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 5 min bei 60°C getrocknet. Daraufhin wurde das Pellet in 20 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde anschließend direkt zur Restriktion eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

9.2. E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II

Zur Gewinnung RNA-freier Vektor-DNA fand das E.Z.N.A Plasmid Minipräp-Kitt II der Fa. PeqLab Anwendung. Die Methode dieser Plasmidpräparation basiert auf einer modifizierten alkalischen Lyse mit anschließender selektiver Adsorption der Plasmid-DNA an einer Silikamembran. Dazu wurden 4 ml der Zellkultur 1 min bei 13.000 upm geerntet. Das Pellet wurde in 500 µl Lösung I (enthält RNase) resuspendiert und nach Zugabe von 500 µl Lösung II (enthält SDS) 10x invertiert. Danach wurde der Ansatz 3 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 700 µl Lösung III wurde wieder 10x invertiert und 10 min bei 13.000 upm bei 4°C zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein frisches 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Im Anschluss wurde der Überstand in Portionen zu 800 µl auf eine Säule gegeben und 1 min bei 10.000 upm zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Danach wurden 600 µl HB-Puffer auf die Säule gegeben und wieder 1 min bei 10.000 upm zentrifugiert. Nach Zugabe von 800 µl DNA-Waschpuffer wurde 1 min bei 10.000 upm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nach Zentrifugation für 1 min bei 10.000 upm zum Trocknen der Säule, wurde sie in ein neues 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Durch die Zugabe von 60 µl sterilem Wasser und der Zentrifugation von 1 min bei 10.000 upm wurde die DNA von der Säule eluiert. Mit der erhaltenen DNA wurde eine DNA-Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

10. Isolierung genomischer Hefe-DNA

„Breaking“-Puffer:

Triton X-100	2 %
SDS	1 %
NaCl	100 mM
Tris, pH 8,0	10 mM
EDTA, pH 8,0	1 mM
Aqua dest.	ad 10 ml

Zur Isolierung genomischer Hefe-DNA wurde 1 ml einer Übernachtskultur durch Zentrifugation für 3 min bei 11.000 upm geerntet und im Anschluss mit 1,5 ml sterilem Wasser gewaschen. Danach wurde das Pellet in 20 µl „Breaking“-Puffer resuspendiert, mit 0,03 g (20 µl) Glasperlen und danach mit 20 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl-Alkohol versetzt. Daraufhin wurde der Ansatz 3 min gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 µl TE-Puffer und der Ansatz wurde kurz gevortext. Daran schließt sich ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 12.500 upm und RT an. Die dabei entstandene wässrige Phase wurde in ein steriles Eppendorf-Gefäß überführt und mit 1 ml 100% Ethanol (p.a.) versetzt. Die chromosomale DNA wurde über Nacht bei -20°C gefällt, der Ansatz 3 min bei 12.500 upm zentrifugiert, das erhaltene Pellet getrocknet und in 30 µl Wasser dest. aufgenommen.

11. Isolierung chromosomaler DNA aus der murinen Makrophagen-Zelllinie IC21

Zur Isolierung chromosomaler DNA aus der murinen Makrophagen-Zelllinie IC21 wurde das „QIAmp DNA Mini Kit and QIAmp DNA Blood Mini Kit“ der Firma QUIAGEN verwendet. Die Präparation erfolgte nach

Angaben des Herstellers. Dazu wurden 5×10^6 Zellen eingesetzt, die nach Ernten und Waschen in PBS aufgenommen wurden. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Anionenaustauschersäule. Die DNA wurde durch steriles Wasser von dem Säulenmaterial eluiert und bei -20°C gelagert.

12. Isolierung von RNA aus humanen Zellen

Zur Isolierung von RNA aus PBMC (mononukleären Zellen des peripheren Blutes) wurde das „peqGOLD TriFast-Kit“ der Fa. peqLab verwendet. Dazu wurde 1 ml der peqGOLD TriFast-Lösung zu $5-10 \times 10^6$ Zellen gegeben, die zuvor nicht gewaschen werden sollten, da dies den Abbau von RNA fördern würde. Der Ansatz wurde 5 min bei RT inkubiert, bevor zu pro eingesetztem Milliliter peqGOLD TriFast-Lösung 0,2 ml Chloroform zugegeben wurde. Der Ansatz wurde 15 sec kräftig geschüttelt, 10 min bei RT inkubiert und im Anschluss zur Phasentrennung 5 min bei 12.000 g zentrifugiert. Es bilden sich dabei drei Phasen, eine rote untere Phase, die Phenol-Chloroform-Phase, welche DNA und Proteine enthält, eine obere farblose, wässrige Phase, die die RNA beinhaltet und eine dazwischenliegende Interphase, in der sich DNA und Proteine ansammeln. Die wässrige, RNA enthaltende Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und pro eingesetzten Milliliter peqGOLD TriFast-Lösung 0,5 ml 2-Propanol zugegeben. Nach Mischen der Proben und Inkubation für 10 min auf Eis wurden sie 10 min bei 12.000 g abzentrifugiert. Der Isopropanol Überstand wurde vorsichtig entfernt und das Pellet zweimal mit 1 ml 75 %-igem Ethanol gewaschen, wobei der Ansatz jeweils gevortext und 10 min bei 4°C und 12.000 g zentrifugiert wurde. Das kurz an der Luft getrocknete erhaltene RNA-Pellet wurde in RNase-freiem Wasser bei $55-60^\circ\text{C}$ gelöst.

13. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) dient zur Amplifikation eines bestimmten DNA-Abschnittes, sofern die Sequenzen der beiden Enden bekannt sind. Die Amplifikation des DNA-Bereiches erfolgt durch temperaturabhängige DNA-Polymerasen, die die Eigenschaft besitzen, DNA-Einzelstränge zu DNA-Doppelsträngen zu ergänzen, falls ihnen ein kurzer dsDNA-Bereich als Primer zur Verfügung steht (Saiki et al., 1988). Die Primer stellen synthetische Oligonukleotide dar, die zu den 3'-Enden beider DNA-Stränge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes komplementär sind.

Die PCR lässt sich in eine unterschiedliche Anzahl von Zyklen unterteilen, wobei jeder Zyklus aus drei Phasen besteht. In einem ersten Schritt bei 95°C erfolgt die Denaturierung der eingesetzten DNA-Matrize. In einem zweiten Schritt kommt es bei spezifischer Annealing-Temperatur der eingesetzten Primer zur Anlagerung der Primer an die komplementären Bereiche der DNA-Matrize. Der dritte Schritt (Elongation) erfolgt bei 68-74°C. Die Polymerase fügt dabei die eingesetzten dNTPs komplementär zur Matrize an die Primer an. Durch mehrfaches Wiederholen dieser Zyklen und der darin beinhaltenden Schritte kommt es zur exponentiellen Vermehrung des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes.

Ein Standard PCR-Ansatz von 50 µl setzt sich wie folgt zusammen:

Aqua dest.	41,9 µl
10x Hifi-Puffer	5,0 µl
25 mM dNTPs	0,4 µl
100 µM 5`Primer	0,5 µl
100 µM 3`Primer	0,5 µl
DNA	1,0 µl
DNA-Polymerase	0,7 µl

Die PCR wurde im Thermocycler „OmniGene“ (MWG Biotech) durchgeführt. Die einzelnen Parameter wurden bezüglich der Annealing-Temperatur, der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes und der eingesetzten Polymerase variiert. Es wurde Polymerasen mit Proof-Reading-Funktion verwendet. Eine Standard PCR verlief nach folgendem Programm:

95°C	4 min
95°C	30 sec
57°C	30 sec
72°C	30 sec
72°C	7 min
4°C	∞

Zur Größenbestimmung wurden die PCR-Produkte nach Amplifikation auf einem 0,8 %-igen Agarosegel aufgetrennt.

13.1. SOE-PCR

Für die Herstellung von Fusionsgenen wurde die von Horton und Mitarbeitern entwickelte Methode des „splicing by overlapping extension“ (SOE) verwendet (Horton et al., 1990). Bei dieser Methode werden in einer ersten PCR zwei DNA-Fragmente erzeugt, die an der späteren Verknüpfungsstelle komplementäre, überlappende Sequenzbereiche aufweisen, welche durch entsprechende Primer eingefügt wurden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Reisolation werden diese Fragmente in einer weiteren PCR als „Template“ eingesetzt, wobei die nach Denaturierung erhaltenen einzelsträngigen, komplementären Bereiche „annealen“ und gegenseitig als Primer wirken können, wodurch schließlich ein Vollängenprodukt entsteht, das unter Verwendung flankierender Primer selbst wiederum amplifiziert werden kann.

13.2. Reverse Transkriptase-PCR

Reverse Transkriptasen sind retroviralen Ursprungs. Sie katalysieren das Umschreiben von RNA in DNA und beinhalten drei unterschiedliche enzymatische Aktivitäten. Zunächst synthetisieren sie als RNA-abhängige DNA-Polymerase die Synthese eines komplementären DNA (cDNA) an einer RNA-Matrize, wobei ein an der Matrize hybridisierter Primer verlängert wird und RNA:DNA-Heteroduplices entstehen. Mittels RNase H-Aktivität der reversen Transkriptase wird der RNA-Anteil aus dem Duplex entfernt. Die einzelsträngige DNA wird dann in Gegenwart von Primern durch die DNA-abhängige DNA-Polymerase Aktivität zum Doppelstrang vervollständigt. Zur vielfachen Amplifikation der cDNA folgt der reversen Transkription eine PCR.

Ein 50 µl PCR-Ansatz unter Verwendung des „The Access Quick™ RT-PCR System“ der Firma Promega setzt sich folgendermaßen zusammen:

AccessQuick Master Mix, 2 x	25 0 µl
100 µM 5`Primer	2,5 µl
100 µM 3`Primer	2,5 µl
RNA-Template	5,0 µl
Nuklease-freies Wasser	15,0 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl

Der Ansatz wurde für 45 min bei 45°C inkubiert. Die anschließende PCR verlief nach angegebenem Programm:

95°C	4 min
95°C	30 sec
54°C	30 sec
72°C	1 min
72°C	7 min
4°C	∞

Zur Kontrolle der RT-PCR wurde der Ansatz in einem Agarosegel aufgetrennt.

13.3. VenorGem Mycoplasmen-PCR

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

14. TOPO- und Acceptor-Klonierung von PCR-Produkten

Mit dem „Acceptor Vector Kit“ der Firma Novagen und „pYES2.1 Cloning[®] Kit“ der Firma Invitrogen ist eine einfache und schnelle Zwischenklonierung von PCR-Produkten in den jeweiligen Vektor möglich. Ungefähr die Hälfte der mit Hilfe der Hifi-Polymerase amplifizierten PCR-Produkte weisen 3`-A-Überhänge auf, wodurch eine direkte Ligation in die linearisiert vorliegenden Vektoren möglich ist, die

5`dU-Überhänge besitzen. Nach der Klonierung, die nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde, wurden die rekombinanten Plasmide in Nova Blue Singles, *E. coli* TOP10 bzw. TOP10F` durch Hitzeschock transformiert (30 sec, 42°C). Die positiven Klone wurden bei pSTBlue-1 mittels Blau-Weiß-Selektion identifiziert, bei pYES2.1/V5-His-TOPO durch die Ampicillin-Resistenz des Vektors. Durch die Integration des PCR-Produktes in den pSTBlue-1 wird der Leserahmen des Vektor-eigenen *lacZ*-Gens zerstört, wodurch die Expression des Enzyms β -Galaktosidase ausbleibt. Ein empfindlicher kolorimetrischer Test für die β -Galaktosidase basiert auf dem Molekül X-Gal, ein farbloses Analogon der Laktose. Die Hydrolyse von X-Gal durch die β -Galaktosidase führt zu einem blau gefärbten Produkt. Nach Ausplattieren der mit den rekombinanten Plasmiden transformierten *E. coli* Zellen auf X-Gal-haltigen LB_{Kan}-Platten sind diejenigen Kolonien weiß, die das PCR-Produkt im pSTBlue-1 enthalten, da die Expression der β -Galaktosidase und dadurch die Hydrolyse von X-Gal unterbleiben. Zur Überprüfung der korrekten Integration des PCR-Produktes in den pSTBlue-1 oder pYES2.1/V5-His-TOPO wurden weiße Kolonien mittels Restriktionsanalyse auf Anwesenheit des entsprechenden Inserts untersucht und zur Sequenzierung eingesetzt.

15. DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der in dieser Arbeit hergestellten Konstrukte wurden von der Firma GATC BOITECH (Konstanz) durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte anschließend mit Hilfe der Sequenziersoftware „SeqMan“ und des Programmes „DNA-Star“ (Lasergene).

16. Restriktion von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen bakteriellen Ursprungs, welche in Anwesenheit von Mg^{2+} -Ionen die Phosphodiesterbindungen beider Stränge eines DNA-Moleküls hydrolytisch spalten. Restriktionsenzyme unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, ihrer Spaltstelle und ihrem Ursprungsorganismus. Bei Restriktionsendonukleasen vom Typ II entspricht die DNA-Bindungsstelle, welche meist eine palindromische Sequenz darstellt, auch der Schnittstelle, wodurch die DNA meist innerhalb ihrer definierten Erkennungssequenz gespalten wird und somit DNA-Fragmente definierter Länge entstehen.

Jeweils 0,5-2 μ g der Plasmid-DNA-haltigen Probe wurden mit 5 U des/der entsprechenden Restriktionsenzymes/-enzyme versetzt. Der Ansatz wurde mit Reaktionspuffer und Wasser nach Angaben des Herstellers auf 20 μ l aufgefüllt. Zum Verdau von DNA, welche durch alkalische Lyse isoliert wurde, wurden zusätzlich 5 U DNase-freie RNase zugegeben. Die Restriktion verlief nach alkalischer Lyse 1 - 1,5 h, nach Miniprep über mehrere Stunden bei 37°C. Der Restriktionsansatz wurde vor dem Auftragen auf das Gel mit GLB-Puffer versetzt. Das verwendete Volumen an GLB-Puffer entsprach 1/5 des Reaktionsansatz-Volumens.

17. Agarosegelelektrophorese

10x TBE-Puffer:

Tris	0,89 M
Borsäure	0,89 M
Na ₂ EDTA pH 8,3	20 mM

„Gel-loading“-Puffer (GLB):

Glycerin (96 %)	50 % (v/v)
Na ₂ EDTA pH 8,5	0,5 % (v/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol	0,05 % (w/v)

Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Eigenschaft geladener Moleküle, im elektrischen Feld zu wandern. Hierbei werden DNA-Fragmente verschiedener Größe in einem elektrischen Feld voneinander getrennt. Dabei wird die Wanderungsgeschwindigkeit der Moleküle beeinflusst von der Nettoladung, der Stärke des elektrischen Feldes und der Porengröße des Gels. Die Agarose wird in einer Lösung aufgekocht und geliert beim Abkühlen, dabei lagert sich das Polysaccharid zu dicken Fäden zusammen. Anhand der Konzentration der Agarosegele lässt sich die Porengröße der Gele variieren. Es wurden 0,8 %-ige Agarosegele (TBE-Puffer) verwendet. Der bei der Agarosegelelektrophorese verwendete DNA-Marker ist in Abbildung 1 dargestellt.

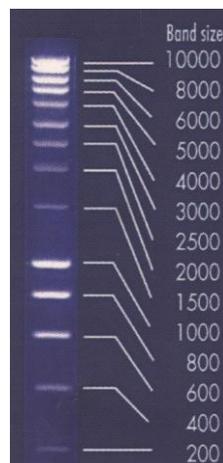


Abbildung 1: Fragmentgrößen des DNA-Längenstandards „Smart-Ladder“.

18. DNA-Extraktion aus Agarosegelen mittels „E.Z.N.A. Gelextraction Kit“ der Firma Omega

Die gewünschte Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in ein frisches 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Der Ansatz wurde mit 100 µl Bindepuffer pro 0,1 g Agarose versetzt und durch Erhitzen bei 55-60°C verflüssigt. Nach dem Lösen der DNA in Hochsalzpuffer wurde diese an eine Silikamembran einer Zentrifugationssäule adsorbiert und in Waschschritten von Proteinen, Salzen, Agarose und Ethidiumbromid befreit. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt zum Trocknen der DNA an der Säule erfolgte die Elution über steriles Wasser oder Niedrigsalzpuffer in ein frisches Reaktionsgefäß.

19. Bestimmung von DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Konzentrationsbestimmung von DNA basiert auf der Absorptionsmessung wässriger DNA-Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gegen steriles Wasser als Referenz. Für die Absorption der DNA sind dabei die aromatischen Ringe der Basen verantwortlich. Die Absorption bei 260 nm wird photometrisch in Quarzküvetten gemessen, da diese das UV-Licht nicht absorbieren. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption der aromatischen Aminosäurenreste, bei 280 nm. Durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption sowohl bei 260 nm als auch bei 280 nm lässt sich die Reinheit einer DNA Lösung bestimmen. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen OD_{260}/OD_{280} -Wert von 1,8, eine reine RNA-Lösung einen solchen von 2,0.

Zur DNA-Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl eluierte DNA mit 59 µl sterilem H₂O verdünnt und gegen 60 µl steriles H₂O als Referenz gemessen.

20. Ligation

DNA-Ligasen können die Bildung einer 3`→5`-Phosphodiesterbindung zwischen dem 3`-Hydroxylende eines Restriktionsfragmentstranges und dem 5`-Phosphatende eines anderen Restriktionsfragmentes unter ATP-Verbrauch katalysieren. Dadurch ist das Einfügen von Fremd-DNA in einen linearisierten Vektor möglich.

Die „sticky-end“-Ligation erfolgte durch Inkubation mit T4-DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers. Das Volumen des Ligationsansatzes betrug 20 µl. Der Ligationspuffer wurde nach Angabe des Herstellers eingesetzt, wobei die ATP-Konzentration auf 3 mM eingestellt wurde. Die zur Ligation eingesetzten Insertmengen variieren in Abhängigkeit der Insert- und Vektorgröße.

Die Ligation verlief über Nacht bei 14°C. Danach wurde der Ansatz bei RT 1 h auf einer Nitrocellulose-Membran (Millipore) gegen 10 %-iges Glycerin dialysiert.

21. Transformations-Methoden

21.1. Transformation von *E. coli* mit rekombinanter Plasmid-DNA (Elektroporation)

Der Begriff Transformation beschreibt die stabile genetische Veränderung eines Organismus durch das Einschleusen oder die Aufnahme von DNA in Form extrachromosomaler (Plasmid) oder chromosomaler DNA. *E. coli* ist ein gram-negatives Bakterium, das natürlicherweise keine DNA selbstständig aufnehmen kann. Durch die Elektroporation kann diese Aufnahme jedoch forciert werden. Bei der Elektroporation werden suspendierte Zellen in ein elektrisches Feld gebracht und kurzen elektrischen Impulsen hoher Frequenz ausgesetzt. Dabei entstehen kurzzeitig Poren in der Zellmembran, durch die

hochmolekulare DNA in die Zelle gelangen kann. Nach Zugabe von nährstoffhaltigem SOC-Medium kann die Zelle die Membran wieder reparieren. Vor der Elektroporation wird der Ligationsansatz gegen 10 %-iges Glycerin dialysiert, um Salze zu entfernen und einen Kurzschluss während der Elektroporation zu vermeiden.

21.1.1. Herstellung elektrokompetenter Zellen

Hierfür wurden 100 ml LB-Medium 1 %-ig mit einer frischen Übernachtskultur von *E. coli* TOP10 beimpft und bei 37°C auf dem Schüttler bis zu einer OD₅₇₈ von 0,6-0,8 angezogen. Danach wurde die Kultur 15 min bei 7.000 upm bei 4°C geerntet. Das Pellet wurde mit gekühltem 10 %-igem Glycerin gewaschen (10 min bei 7.000 upm bei 4°C). Das Pellet wurde im restlichen 10 %-igem Glycerin resuspendiert, in ein 2 ml-Eppendorf-Gefäß überführt und mit 10 %-igem Glycerin auf 2 ml aufgefüllt. Nach einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 7.500 upm und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet noch einmal mit 2 ml gekühltem 10 %-igem Glycerin gewaschen. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und das Pellet im gleichen Volumen in 10 %-igem Glycerin aufgenommen. Das erhaltene Endvolumen wurde in sterile Eppendorfgefäße zu 45 µl aliquotiert.

21.1.2. Elektroporation

Für die Elektroporation wurden in einer eisgekühlten Elektroporationsküvette (2 mm Elektrodenabstand) 10-50 ng DNA in einem Volumen von 1-4 µl zu 45 µl kompetenten Zellen gegeben und bei 200 Ω, 2,5 kV/cm, 25 µF (BioRad Gene Pulser II) elektroporiert. Im Anschluss wurde sofort 1 ml SOC-Medium zu den elektroporierten Zellen gegeben, um die Zellen zu stabilisieren. Nach 1 h auf dem Schüttler bei 37°C wurden 100 µl, 200 µl und 400 µl zur Selektion auf Platten mit dem jeweiligen Antibiotikum ausplattiert und diese bei 37°C über Nacht inkubiert.

21.2. Transformation von Hefen mit rekombinanter Plasmid-DNA (Lithium-Acetat-Methode)

21.2.1. *Saccharomyces cerevisiae*

10x LiAc-Lösung:

Lithium-Acetat	1 M
----------------	-----

Der pH-Wert der Lösung wurde mit Essigsäure auf pH 7,5 eingestellt.
Im Anschluss wurde die Lösung autoklaviert.

10x TE-Puffer:

Tris	100 mM
Na ₂ EDTA	10 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf 7,5 eingestellt. Im
Anschluss wurde die Lösung autoklaviert.

50 % Polyethylenglycol:

PEG-4000	50 % (w/v)
----------	------------

Die Lösung wurde durch Autoklavieren sterilisiert.

Carrier-DNA:

Heringssperma	10 mg
1 x TE-Puffer, pH 7,5	ad 1 ml

Das gelöste Heringssperma wurde zur Nukleinsäure-Fragmentierung
ultraschallbehandelt und anschließend sterilfiltriert. Seine Lagerung
erfolgte bei -20°C.

LiAc/TE-Lösung:

10x TE pH 7,5	1 Teil
10x LiAc pH 7,5	1 Teil
Aqua dest.	8 Teile

PEG/LiAc-Lösung:

50 % PEG 4000	8 Teile
10x TE pH 7,5	1 Teil
10x LiAc pH 7,5	1 Teil

Die Transformation nach der Lithium-Acetat-Methode beruht auf der Feststellung, dass Alkalimetall-Kationen die Kompetenz von Hefezellen zur DNA-Aufnahme stark erhöhen (Ito et al., 1983). Lithiumacetat führt zu einer Porenbildung in der Hefezellwand, was in einer Steigerung der DNA-Aufnahmekapazität der Hefe resultiert.

2 ml einer Übernachtskultur wurde durch 5 min Zentrifugation bei 7.000 upm geerntet und mit 500 µl LiAc/TE-Puffer gewaschen. Zu 200 µl kompetenten Hefezellen wurden 0,2-2 µg Plasmid-DNA (maximal 5 µl) und 15 µl Carrier-DNA (Heringssperma-DNA, 10 mg/ml, hitzedenaturiert) gegeben. Nach Zugabe von 600 µl PEG/LiAc-Lösung wurde der Ansatz 30 min bei 30°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach anschließendem Hitzeschock (15 min, 42°C) wurden die Zellen geerntet (20 s, 13.000 upm) und zweimal in 500 µl 1x TE-Puffer gewaschen (2 min, 11.000 upm). Die Zellen wurden in 200 µl 1x TE-Puffer aufgenommen und zur Selektion auf entsprechenden Mangelmedien ausplattiert.

21.2.2. *Schizosaccharomyces pombe*

Lithiumacetat/EDTA-Lösung:

Lithiumacetat	100 mM
EDTA	1 mM

Der pH-Wert der Lösung wurde auf pH 4,9 eingestellt.

2 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation von 5 min bei 9.000 upm geerntet und im Anschluss einmal mit 500 µl Aqua dest. steril gewaschen. Nach einem weiterem Waschschrift mit 0,1 M LiAc, pH 4,9 wurde das Pellet in 200 µl 0,1 M LiAc, pH 4,9 aufgenommen und 1 h bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 0,2-2 µg Plasmid-DNA (maximal 5 µl) und der Ansatz wurde 1 h bei RT inkubiert, bevor 290 µl PEG-Lösung zugegeben wurden. Der Ansatz wurde wieder 1 h bei RT belassen. Nach anschließendem Hitzschock wurden die Zellen geerntet (20 sec, 13.000 upm) und zweimal mit 500 µl 1 x TE-Puffer gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl 1 x TE-Puffer aufgenommen und zur Selektion auf entsprechendes Mangel-medium ausplattiert.

22. Wachstumstest zur Toxizitätsbestimmung

Zur Bestimmung der Toxizität der rekombinant exprimierten porenbildenden Proteine auf Hefezellen wurden Drop-Tests durchgeführt. Die Hefetransformanten wurden in Selektionsmedium mit Raffinose als C-Quelle angezogen, um eine Katabolit-Repression, wie sie bei Anziehen auf Glukose nach Shiften auf Galaktose auftreten würde, zu verhindern. 1×10^7 Zellen wurden geerntet und in 50 µl Raffinose-d/o-Medium aufgenommen. Es wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe mit einem Volumen von je 50 µl bis zu einer Zellzahl von 1×10^1 Zellen hergestellt. Je 5 µl einer Verdünnungsstufe wurden als Tropfen auf eine galaktosehaltige und als Negativkontrolle auf eine

glukosehaltige d/o-Platte aufgetragen. Nach fünftägiger Inkubation der Platten bei 30°C wurde das Wachstum dokumentiert.

23. Trypan-Blau-Färbung

Zur Bestimmung der Anzahl lebender Säugerzellen wurden diese im gleichen Volumen mit Trypan-Blau (0,4 %, Sigma) 1 min bei RT gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Dabei wurden Triplettansätze bestehend aus jeweils 300 Hefezellen gezählt.

24. Zellaufschluss

24.1. S80-Zellaufschluss von Hefezellen

Der S80-Zellaufschluss von Hefezellen stellt ein schnelles Verfahren zur Gewinnung von Hefe-Rohextrakten dar. Dazu wurden 3×10^8 Zellen einer Übernachtskultur durch Zentrifugation von 5 min und 7.000 upm geerntet und anschließend mit 500 µl Aqua dest. steril gewaschen. Das Zellpellet wurde in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert und 1 h bei -80°C inkubiert. Nach Auftauen der Proben auf Eis wurden sie mit 50 µl 3 x Tricin-Probenpuffer versetzt, kräftig gevortext und 10 min bei 100°C aufgeköcht. Anschließend wurde der Aufschluss abzentrifugiert (1 min, 13.000 upm, RT) und der debrisfreie Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die Proben konnten nun zur SDS-PAGE eingesetzt werden, restliche Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

24.2. Proteinfällung aus Hefekulturüberständen

Zur Konzentrierung heterolog exprimierte sekretorischer Proteine wurde eine Ethanol-fällung angewandt. Dabei wurde der vereinigte, zellfreie

Kulturüberstand von 3×10^8 Zellen mit Ethanol (Endkonzentration 70 %) versetzt und über Nacht bei -80°C gefällt. Nach Zentrifugation für 30 min bei 13.000 upm und 4°C wurde das erhaltene Pellet getrocknet und in 20 μl Aqua dest. steril gesammelt und mit 3 x SDS-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden im Anschluss zur SDS-PAGE eingesetzt.

24.3. Zellaufschluss von Säugerzellen

Zur Proteinisolierung aus Säugerzellen wurde ein verändertes Protokoll nach Helenius et al. (1979) mittels RIPA-Puffer verwendet. Die Zellen lagen dazu in „6-well“-Platten in einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen pro „well“ vor. Das Medium wurde entfernt und die Zellen durch Zugabe von 2 ml 1 x PBS und Inkubation für 5 min bei RT von dem Untergrund der Platte gelöst. Die Zellen wurden in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt und zweimal mit 1 x PBS gewaschen (1 min, 13.000 upm). Das erhaltene Zellpellet wurde im doppelten Volumen RIPA-Puffer resuspendiert und mit Proteinaseinhibitor „Complete“ (Firma Roche) nach Angaben des Herstellers versetzt. Der Ansatz wurde über mehrere Stunden auf Eis gelagert, wobei gelegentlich gevortext wurde. Zur Sedimentation der Zelltrümmer schloss sich ein Zentrifugationsschritt von 30 min bei 13.000 upm und 4°C an. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, mit Probenpuffer versetzt und 5-10 min bei 80°C aufgekocht. Die Proben wurden zur SDS-PAGE eingesetzt, restliche Proben bei -20°C gelagert.

25. SDS-Gelelektrophorese

3x Tricin-Probenpuffer:

4x Tris-HCl/SDS pH 6,8	3 ml
86 % Glycerin	3,6 ml
SDS	1,2 g
Coomassie Brillant Blau R250	3 mg
(β -Mercapthoethanol	0,5 ml)
Aqua dest.	ad 10 ml

Der Puffer wurde bei 4°C gelagert und vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Herstellung des reduzierenden Probenpuffers wurde β -Mercapthoethanol zur Reduktion der Disulfidbrücken zugegeben.

Tris-HCl/SDS pH 8,45:

Tris-HCl pH 8,45	3 M
SDS	0,5 % (w/v)

5 x Kathodenpuffer:

Tris	0,1 M
Tricin	0,1 M
SDS	0,5 % (w/v)
Aqua dest.	ad 1 Liter

Die Lösungen wurden bei 4°C gelagert.

5 x Anodenpuffer:

Tris	0,2 M
Aqua dest.	ad 1 Liter

Der pH-Wert der Lösung wurde mit HCl auf pH 8,9 eingestellt. Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Transferpuffer:

Tris	25 mM
Glycin	190 mM
Methanol	20 % (v/v)
SDS	0,1 % (w/v)

Die Lösung wurde bei 4°C gelagert.

10 x TBS:

Tris	1 M
NaCl	1,5 M

Die Lösung wurde mit HCl auf pH 7,5 eingestellt.

Waschpuffer:

10 x TBS	10 % (v/v)
Tween 20	0,05 % (v/v)

Blocking/Inkubations-Puffer:

10 x TBS	10 % (v/v)
Tween 20	0,05 % (v/v)
Magermilchpulver	5 % (w/v)

Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch hergestellt. Die Magermilch wurde gleichmäßig in den Waschpuffer eingerührt.

Die von Shapiro et al. (1967) eingeführte SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese trennt Proteine in Gegenwart eines SDS-Überschusses und Denaturierungsreagenzien entsprechend ihrer Größe elektrophoretisch auf. Bei der SDS-PAGE wird die Eigenladung des Proteins durch die Bindung des anionischen Detergenz SDS (= Sodiumdodecylsulfat), welches an die hydrophoben Aminosäure-Reste des Proteins bindet, überdeckt. Die Proteine verbinden sich mit SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Masse-zu-Ladungsverhältnis (1,4 g SDS/g Protein in 1 % SDS-

Lösungen). SDS denaturiert Proteine, besonders nach Erhitzen der Probe. Die Menge an gebundenem SDS bestimmt somit die Wanderungseigenschaften der Proteine. Die Porengröße der zur Auftrennung verwendeten chemisch inerten Polyacrylamidgele wird durch die Konzentration von Acrylamid und dem quervernetzenden Methylenbisacrylamid bestimmt. Ammoniumperoxidisulfat (APS) führt zur durch N,N,N,N'-Tetramethyldiamin (TEMED) katalysierten Polymerisation. In der vorliegenden Arbeit fanden Tris-Tricin-Gele in einem Tricin-Puffersystem Anwendung (Schagger & von Jagow, 1987). Zur schärferen Bandentrennung kamen zusätzlich Sammel- und Trenngele zum Einsatz, wodurch eine Konzentration der Proben im großporigen Sammelgel und eine Auftrennung der Komponenten im engporigen Trenngel erreicht wurden. Der Ansatz für Sammel- und Trenngele setzt sich wie folgt zusammen:

Trenngele:	2 Gele
Rotiphorese 30	5,88 ml
Tris HCl/SDS, pH 8,45	5,0 ml
Aqua dest.	2,12 ml
Glycerin 79 %	2,0 ml
TEMED	25 µl
10 % APS	80 µl

Die einzelnen Substanzen wurden in der dargestellten Reihenfolge miteinander vermischt und die Gele zügig gegossen. Das gegossene Trenngel wurde vor dem Auspolymerisieren mit 2-Propanol überschichtet, welches vor dem Hinzufügen des Sammelgels durch Waschen mit Wasser vollständig entfernt wurde.

Sammelgele:	2 Gele
Rotiphorese 30	1,62 ml
Tris HCl/SDS, pH 8,45	3,1 ml
Aqua dest.	7,78 ml
TEMED	25 µl
10 % APS	80 µl

Die Proben wurden wie folgt zur SDS-Gelelektrophorese vorbereitet: 20 µl der jeweiligen Probe wurden mit 10 µl 3 x Tricin-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 100°C im Wasserbad denaturiert. Nach Abkühlen der Proben wurden sie auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte im vertikalen Elektrophoresesystem „Mini-Protean II“ (BioRad) zuerst 30 min bei 80 V, danach 60 min bei 100 V. Als Marker wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Abb. 2) verwendet, von welchem 7,5 µl aufgetragen wurden.

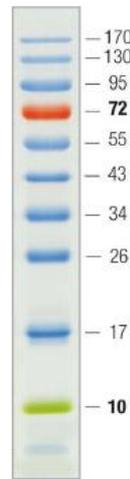


Abbildung 2: Größe des verwendeten Proteinstandards PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas).

26. Western-Analyse

Die Western-Analyse stellt eine Methode zum immunologischen Nachweis von Proteinen dar. Zuvor werden die Proteine während einer Gelelektrophorese aufgetrennt und im Anschluss auf eine Membran geblottet, fixiert und daraufhin detektiert (Gershoni et al., 1983).

26.1. „Semi-Dry“-blotting

Nach durchgeführter Gelelektrophorese wurde das Gel 15-30 min in kaltem Transferpuffer äquilibriert, um Salze und Detergenzien zu entfernen. Die für den Blot benötigte PVDF-Membran (9 cm x 6,5 cm)

wurde 5 s in 100 %-igem Methanol getränkt und anschließend 10 min in kaltem Transferpuffer unter Taumeln belassen. Die beiden ebenfalls für den Blot benötigten Filterpapiere (9 cm x 6,5 cm) wurden 10 min in kaltem Transferpuffer unter Taumeln inkubiert. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte in einer „Trans-Blot SD Electrophoretic Transfer Cell“ (BioRad), bei einer Stromstärke von $0,9 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche (50 mA/Gel, Spannung auf 13 V begrenzt).

26.2. Immundetektion mit Meerrettich-Peroxidase gekoppeltem Sekundärantikörper

Nach Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde diese über Nacht in 30 ml Blocking-Puffer belassen, um unspezifische Bindungsstellen für den Antikörper zu blockieren. Nach Dekantieren wurde die Membran 1 h in der primären Antikörperlösung (anti-Ovalbumin-Antikörper, 1:5.000 in 20 ml Blockingpuffer) belassen. Im Anschluss wurde die Membran mit Waschpuffer gespült. Nach Dekantieren der Waschlösung erfolgte die Zugabe der sekundären Antikörper-Lösung (anti-Rabbit-Antikörper, 1:10.000 in 20 ml Blocking-Puffer). Die Membran wurde darin 1 h inkubiert. Alle Schritte erfolgten bei 20°C unter ständigem Taumeln. Nach weiteren vier Waschrunden von je fünf Minuten mit jeweils 20 ml Waschpuffer, wurden 600 µl Substrat des Chemilumineszenz-Kits „SuperSignal West Dura Trial Kit“ (PIERCE) zugegeben. Dazu wurden je 300 µl der Luminol/Enhancer- und der Peroxid-Lösung vermischt und auf die Membran geträufelt. Die Detektion der Lichtemission erfolgte mit Hilfe des „ChemiDoc XRS system“ (BioRad).

27. Fluoreszenzmikroskopie

Fluoresceindiacetat:

FDA	1 mg/ml
in Aceton	

Propidium-Iodid:

Propidium-Iodid	1 mg/ml
in Aqua dest.	

Zur Fluoreszenzmikroskopie wurden Zellen der späten exponentiellen Phase eingesetzt. Die verwendeten Hefezellen wurden zuvor mit 1 x PBS gewaschen.

Zur Überprüfung der Porenbildung in der Plasmamembran von Hefezellen wurde Propidiumiodid verwendet. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäureinterkalator, welcher nur in Zellen mit perforierter Zellmembran eindringen kann. Das Eindringen von Propidiumiodid kann fluoreszenzmikroskopisch beobachtet werden. Sein Absorptionsmaximum liegt bei 488 nm und das Emissionsmaximum bei 590 nm. Diese Maxima verschieben sich zu 535 nm respektive 617 nm, wenn Propidiumiodid in DNS interkaliert. Zur Propidiumiodid Färbung wurden 10^5 - 10^6 Hefezellen mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit 20 µg/ml Propidiumiodid für 10-15 min bei 4°C im Dunkeln gefärbt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 1 x PBS wurden die Hefezellen hinsichtlich einer roten Fluoreszenz untersucht. Es wurde das BX-51 Mikroskop (Olympus) verwendet.

Zur FDA-Färbung wurden die in 500 µl 1 x PBS aufgenommenen Hefezellen mit 2 µl FDA-Stammlösung versetzt und 5 min bei RT im Dunkeln gefärbt. Nach dreimaligem Waschen mit 1 ml 1 x PBS konnten die Hefen zu Aufnahmeversuchen eingesetzt werden.

28. Gesamt RNA-Präparation nach der Hot-Phenol-Methode

Die Gesamt-RNA-Präparation aus Hefezellen wurde nach der „Hot-Phenol“-Methode durchgeführt. Sie basiert auf einem Zellaufschluss unter Hitzeeinwirkung mit sauer gepuffertem Phenol und einer anschließenden Fällung der RNA mittels Ethanol.

Dazu wurden 3 ml einer *S. cerevisiae* ü. N. Kultur 5 min bei 8.000 upm geerntet und in 1 ml eiskaltem, sterilem Aqua dest. gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl TES-Lösung aufgenommen, mit 400 µl Aqua Roti-Phenol versetzt und 10 sec gevortext. Ein Aufschluss der Zellen und ein Abtrennen der Proteine wurden durch 60-minütiges Inkubieren bei 65°C unter gelegentlichem Vortexen erreicht. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis abgekühlt und dann 15 min bei 4°C und 12.000 upm zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, wieder mit 400 µl Aqua Roti-Phenol versetzt und stark gevortext. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt und dem Überführen in ein neues Eppendorfgefäß wurde das restliche Phenol durch Zugabe von 400 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol abgetrennt. Nach starkem Vortexen und einem Zentrifugationsschritt bei 10.000 upm wurde die wässrige Phase erneut in ein Eppendorfgefäß überführt. Das Fällern der RNA erfolgte 30 min nach Zugabe von 40 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,3) und 1 ml eiskaltem 100 %-igem Ethanol bei 20°C. Die ausgefallene Gesamt-RNA wurde 5 min bei 10.000 upm abzentrifugiert und das RNA-Pellet mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Nach Trocknen des Pellets wurde die RNA in 20 µl sterilem DEPC-Wasser aufgenommen. Zur Überprüfung der isolierten RNA wurde ein Aliquot von 2 µl auf ein Agarosegel aufgetragen.

29. Northern-Blot-Analyse

TES:

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
EDTA	10 mM
SDS	0,5 %
Aqua dest.	Ad 100 ml

Aqua dest.-DEPC:

Aqua dest.	1000 ml
DEPC	1,0 ml

DEPC wurde unter kräftigem Rühren in Aqua dest. gelöst und anschließend durch Autoklavieren inaktiviert.

Alle folgenden Puffer wurden mit Aqua dest.-DEPC angesetzt.

10 x MOPS-Laufpuffer:

MOPS	0,4 M
NaAcetat	0,1 M
EDTA	10 mM

Es wurde ein pH von 7,0 eingestellt. Der Puffer wurde lichtgeschützt gelagert.

10 x SSC:

NaCl	1,5 M
NaCitrat	0,15 M

Der pH wurde auf 7,0 eingestellt.

Maleinsäurepuffer:

Maleinsäure	100 mM
NaCl	150 mM

Waschpuffer:

Maleinsäurepuffer, ergänzt um 0,3 % Tween 20.

Blockingpuffer:

Blocking-Stammlösung 1:10 in Maleinsäurepuffer.

Die Blocking-Stammlösung ist eine 10 %-ige Lösung von Blocking-reagenz in Maleinsäurepuffer.

Detektionspuffer:

Tris-HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM

Bei der Northern-Blot-Analyse werden RNA-Moleküle in einem denaturierenden Formaldehyd-haltigem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, wodurch die Ausbildung von Sekundärstrukturen weitgehend verhindert wird. Im Anschluss wird die RNA auf eine Nylonmembran übertragen und immobilisiert, auf der sie mittels Digoxigenin-markierten Sonden nachgewiesen werden kann.

29.1. Herstellung einer DIG-markierten Sonde

Zum Nachweis von RNA-Fragmenten innerhalb einer Northern-Analyse wurden Digoxigenin (DIG)-markierte Sonden verwendet, die eine Detektion mittels einer spezifischen Antikörper-Reaktion ermöglichen. Die Herstellung der Sonde erfolgte mit Hilfe des „PCR DIG Probe Synthesis Kit“ der Firma Roche nach Angaben des Herstellers. In einer PCR werden die Proben unter Verwendung des „Expand High Fidelity“ Enzym Mix amplifiziert, wobei neben herkömmlichen dNTPs auch DIG-dUTPs in die wachsende Polynukleotidkette eingebaut werden. Dies erlaubt die spätere Blot-Entwicklung mittels anti-DIG-Antikörper-Konjugaten. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Sonde sowie die zu ihrer Herstellung benötigten Primer sind in Tabelle 9 dargestellt:

Tabelle 9: Zur Herstellung der DIG-markierten Sonde verwendete Primer

Sonde	Verwendete Primer
eGFP	5` eGFP_ <i>EcoRI/XhoI</i> 3` eGFP_ <i>BglII/SalI</i>

Der Ansatz zur Amplifikation der eGFP-Sonde setzt sich folgendermaßen zusammen:

Matrizen-DNA	1,0 µg
PCR-Puffer (1,5 mM MgCl ₂)	0,5 µl
PCR DIG Labeling-Mix	0,5 µl
5` Primer	50 pmol (1,6 %)
3` Primer	50 pmol (1,6 %)
Polymerase-Mix	52 mU/µl

Die Sonde wurde über 35 Zyklen amplifiziert, wobei sich der PCR-Programmablauf nach der „Annealing“-Temperatur der verwendeten Primer und nach der Größe des entstehenden PCR-Produktes richtet. Zur Überprüfung der PCR wurden 10 µl der hergestellten Sonde in einem Agarosegel aufgetrennt. Durch den Einbau der DIG-Gruppe in die Sonde ist ihr Wanderungsverhalten im Vergleich zu unmarkierten Proben verlangsamt.

29.2. Northern-Blot

Um die RNA vor dem Abbau durch RNAsen zu schützen, wurden alle verwendeten Puffer und Lösungen mit DEPC versetzt sowie die Komponenten des Elektrophorese-Apparates und sonstige zum Gießen der Gele benutzten Glaswaren 1 h in 3 % Wasserstoffperoxidlösung belassen und anschließend mit Aqua dest./DEPC gespült.

Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese:

Zur Herstellung eines Formaldehyd-Agarosegels wurden 0,8 g Agarose in 58 ml DEPC-Wasser aufgekocht, im Wasserbad auf 60°C abgekühlt und vor dem Gießen unter dem Abzug mit 8 ml 10 x MOPS-Laufpuffer und 14,4 ml 12,3 M Formaldehyd (37 %) versetzt. 11 µl des jeweiligen RNA-Rohextraktes wurden mit 2,5 µl 10 x MOPS-Laufpuffer, 9 µl 12,3 M Formaldehyd und 25 µl Formamid ergänzt und nach 5-7 minütiger Denaturierung bei 65°C auf das Gel aufgetragen. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte bei einer konstanten Spannung von 5 V/cm über 3 h unter dem Abzug, wobei 1 x MOPS als Laufpuffer verwendet wurde. Als Marker diente der Digoxigenin-markierte RNA-Längenstandart der Firma Roche.

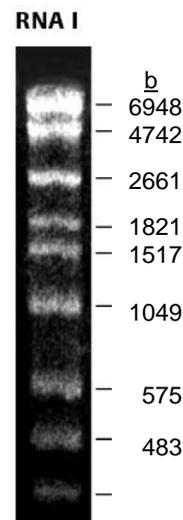


Abbildung 3: RNA-Längenstandard DIG-labeled I (Fa. Roche).

Unterdruck-Blotting:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in DEPC-Wasser gewaschen und zum Entfernen von Formaldehyd zweimal 15 min in 20 x SSC äquilibriert. Ein „Whatman-Blottingpapier“ und eine Nylonmembran wurden in 20 x SSC angefeuchtet, auf die Vakuum-Blottingapparatur (Hybaid) gelegt und mit der Maske bedeckt. Die Maske wurde mit dem Gel luftdicht abgeschlossen und das Gel mit 20 x SSC überschichtet. Das „Blotting“ erfolgte über 60 bis 90 min. Die transferierte RNA wurde

nach Trocknen der Membran durch dreiminütiges UV-„Crosslinking“ mit dem Crosslinker der Firma GATC auf der Nylonmembran immobilisiert. Um die Sondenaktivität und Spezifität zu überprüfen, erfolgte vor dem Cross-Linking ein „Drop-down“ der Plasmidprobe am Randbereich der Membran. Zur Entfernung eventuell störender Salze auf der Membran wurde diese zweimal 30 sec mit 2 x SSC-Puffer gespült.

Hybridisierung mit DIG-markierten DNA-Sonden:

Die Prähybridisierung der Membran erfolgte mit 20 ml „DIG Easy Hyb“ von Roche unter Drehen bei Hybridisierungstemperatur (T_{Hyb}), um unspezifische Bindungsstellen der Membran abzudecken. Die Hybridisierungstemperatur errechnet sich aus nachfolgender Formel, ausgehend von der Schmelztemperatur der Sonde (T_M), wobei „% GC“ dem prozentualen Gehalt an Guanin- und Cytosin-Nukleotiden und „L“ der Länge der Sonde entsprechen:

$$T_M[^\circ\text{C}] = 49,82 + 0,41 \times \%GC - 600/L \qquad T_{Hyb} = T_M - (10-20)^\circ\text{C}$$

Nach 1 h Prähybridisierung wurde dem Prähybridisierungspuffer DIG-markierte DNA-Sonde in einer Konzentration von 25 ng/ml zugegeben, die zuvor 5 min bei 100°C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt wurde. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht.

Nichtradioaktiver Nachweis immobilisierter RNA über Chemilumineszenz:

Nach Dekantieren der Hybridisierungslösung wurde die Membran zweimal 5 min in 10 ml 2 x SSC/0,1 % SDS und danach zweimal 15 min in 10 ml Waschpuffer bei 55°C gewaschen. Nach 1 h Inkubation in 10 ml Blockingpuffer erfolgte die Zugabe von anti-DIG/Alkalische Phosphatase-Konjugat (1:10.000 in 10 ml Blockingpuffer). Die Membran wurde 1 h darin inkubiert und danach dreimal 10 min in 10 ml Waschpuffer gewaschen. Zur Äquilibration wurde die Membran 2 min in Detektionspuffer belassen, dem im Anschluss CSPD in einer Verdünnung von 1:250 zugegeben wurde. Nach 5 min Inkubation in der

CSPD-Lösung wurde die Membran auf Blotting-Paper abgetrocknet, mit Klarsichtfolie ummantelt und 10 min bei 37°C belassen.

Das CSPD wird durch die alkalische Phosphatase dephosphoryliert, wobei ein metastabiles Phenolat-Anion entsteht, das bei seinem Zerfall Licht mit einer Wellenlänge von 477 nm emittiert. Die Dokumentation der Lichtemission erfolgte mit Hilfe des „ChemiDoc XRS system“ (Biorad).

30. Isolierung peripherer Blutzellen

30.1. Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Leukozyten-Konzentrate („buffy coats“) wurden von der Blutbank der Winterbergklinik in Saarbücken zur Verfügung gestellt. Die Blutspender waren HIV-1, HIV2- sowie Hepatitis B- und -C-Virus-negativ.

1 x PBS:

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

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

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC, „peripheral blood mononuclear cells“) wurden aus Leukozyten-Konzentraten mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert. „Buffy coats“ fallen bei der Herstellung von Blutkonserven durch Zentrifugation und Abnahme des Plasmas an und enthalten neben PBMC Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Die Konservenbeutel, in die das Blut abgenommen

wird, enthalten Antikoagulantien, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern.

Der Inhalt eines „buffy coats“ wurde zu gleichen Teilen mit PBS verdünnt. 15 ml Lymphocyte Separation Medium (=Ficoll, Dichte $1,077 \pm 0,001$ g/ml) wurden in einem 50 ml Röhrchen vorgelegt und vorsichtig mit 35 ml der verdünnten Suspension überschichtet. Um den Gradienten nicht zu zerstören, wurde 20 Minuten bei 560 g ohne Bremse zentrifugiert. Dabei trennen sich die Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte. Die Erythrozyten und Granulozyten besitzen eine hohe Dichte und sedimentieren, während sich die PBMC in der Interphase zwischen Serum/PBS und Ficoll befinden. Da Thrombozyten die geringste Dichte besitzen, sammeln sie sich im Überstand über der Zwischenschicht. Die PBMC-enthaltende Zwischenschicht wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen. Verbleibende Erythrozyten wurden entfernt, indem die PBMC zwischen den Waschschritten für ca. 15 Sekunden in 5 ml Aqua_{bidest.} resuspendiert und unmittelbar danach mit 45 ml PBS versetzt wurden. Die Behandlung ermöglicht die selektive Lyse der Erythrozyten, während die PBMC intakt bleiben. Beim Aufnehmen der Zwischenschicht wird stets ein Teil des Überstandes mitüberführt, so dass die PBMC mit Thrombozyten verunreinigt sind. Um diese zu entfernen, wurde am Ende ein Waschschriff mit 10-minütiger Zentrifugation bei 800 upm durchgeführt. Das Pellet wurde in 30 -40 ml PBS aufgenommen und die Zellzahl nach 30.3. im CASY[®] bestimmt.

30.2. Adhärenz von Monozyten an Plastikoberflächen

PBMC wurden mittels Adhärenz an Plastik weiter in unterschiedliche Zellpopulationen getrennt. Hierzu wurden die PBMC in einer Dichte von $7,5 \times 10^6$ Zellen/ml in RPMI mit 10 % FKS (Endotoxin <5 EU/ml) aufgenommen. Pro 175 cm^2 -Zellkulturflasche wurden 20 ml dieser Zellsuspension zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Die nicht adhärennten Lymphozyten des peripheren Blutes (PBL, „peripheral blood

lymphocytes“) wurden abgenommen, mit PBS gewaschen und weiterverarbeitet. Die adhärenenten Monozyten wurden vorsichtig mit PBS gewaschen und durch Zugabe von Zytokinen zu DCs ausdifferenziert.

30.3. Charakterisierung und Zellzahlbestimmung mit dem Zellanalysegerät CASY®

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

Zur Messung wurde eine Zellsuspension definierten Volumens 1:1.000 in der Elektrolytlösung (Casyton) verdünnt und mit konstanter Strömungsgeschwindigkeit durch eine Kapillare bekannter Geometrie gesaugt. Die elektrolytgefüllte Kapillare stellt einen definierten elektrischen Widerstand dar. Beim Durchtritt durch die Kapillare verdrängen die Zellen eine ihrem Volumen entsprechende Menge an Elektrolytlösung. Da intakte Zellen in erster Näherung als Isolatoren betrachtet werden können, kommt es zu einer Widerstandserhöhung entlang der Kapillarstrecke. Unter der Voraussetzung, dass die Zelle die Kapillare einzeln passiert, ist die Widerstandsänderung ein Maß für das Volumen der Zelle. Der Computer errechnet aus drei Messsignalen einen Mittelwert in Form eines Integrals, das dem Zelldurchmesser proportional ist. Das Ergebnis der Messung ergibt ein Histogramm, bei dem die relative Zellzahl gegen den Zelldurchmesser aufgetragen ist (siehe Abb. 4). Diese Methode wurde für die Bestimmung der Zellzahl

der PBMC nach deren Isolierung eingesetzt. Weiterhin konnte der Erfolg der anschließend durchgeführten Adhärenz über die relative Zellgröße bestimmt werden, da Lymphozyten einen kleineren Zelldurchmesser besitzen als Monozyten.

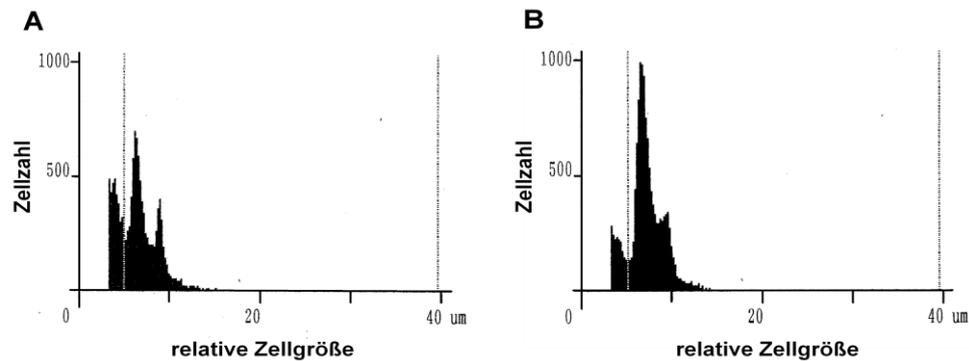


Abbildung 4: Zellpopulationen des peripheren Blutes nach Isolierung mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (A) und anschließender Adhärenz (B).

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

30.4. *In vitro* Differenzierung von humanen Dendritischen Zellen

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

Zur Differenzierung von DCs wurden Monozyten in einer 175 cm²-Zellkulturflasche mit 20 ml RPMI zur Kultivierung von DCs überschichtet. Die Zellen wurden fünf Tage bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Am Tag drei wurden 5 ml des Mediums abgenommen und die darin enthaltenen Zellen sechs Minuten bei 1.200 upm abzentrifugiert.

Nach Verwerfen des Überstandes erfolgte die Aufnahme der Zellen in 5 ml frisches RPMI mit insgesamt 4×10^4 U IL-4 und $2,8 \times 10^5$ U GM-CSF. Im Anschluss wurden die Zellen in die Zellkulturflaschen zurückgegeben.

31. Stimulation antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen durch autologe Dendritische Zellen

Gedächtnis-T-Zellen in PBL-Fraktionen können durch die Zugabe autologer DCs als Antigen-präsentierende Zellen aktiviert werden (Scheller, 2006). Die PBL werden von PBMC durch Adhärenz gewonnen und bis zur Simulation eingefroren (siehe 7.4.1.), die dabei gewonnen Monozyten werden über fünf Tage zu DC ausdifferenziert (siehe 30.4.) und vor Zugabe zu den PBL mit den Antigenen inkubiert.

FACS-Puffer:

FKS	5 % (v/v)
BSA	0,5 % (w/v)
Natriumazid	0,07 % (w/v)
PBS	ad 1000 ml

Fixierlösung (FACS-FIX):

NaCl	8,5 g/l
Paraformaldehyd (1 %)	10 g/l

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

Fixierlösung PBL-DC:

Paraformaldehyd	4 % (v/v)
PBS	

Zur PBL-Stimulation durch Dendritische Zellen wurden die PBL in RPMI-Medium mit 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin aufge-

nommen. Pro FACS-Färbung werden 5×10^5 PBL benötigt, wobei pro Ansatz 2×10^6 für drei Färbungen stimuliert wurden. Zur Stimulation wurden die kostimulatorischen Antikörper α CD28 und α CD49d in einer Konzentration von jeweils $1 \mu\text{g/ml}$ zu den PBL in ein 15 ml Falcon zugegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe der DC im Verhältnis 1:1 zu den PBL. Die Ansätze wurden für 30 min bei 37°C im Brutschrank mit $5\% \text{CO}_2$ mit angeschraubtem Deckel inkubiert und dann 5 min bei 1.100 upm abzentrifugiert, um den Zell-Zell-Kontakt zu erleichtern. Die Ansätze wurden insgesamt sechs Stunden bei 37°C und $5\% \text{CO}_2$ inkubiert, wobei nach zwei Stunden der Inkubationszeit Brefeldin A in einer Konzentration von $10 \mu\text{g/ml}$ zugegeben wurde. Brefeldin A ist eine aus *Penicillium brefeldianum* gewonnene Substanz, die den Aufbau und die Funktion des Golgi-Apparates zerstört, wodurch die Zytokinsekretion unterbunden wird und die gebildeten Zytokine mittels FACS-Analyse nach FACS-Färbung nachgewiesen werden können.

Nach sechs Stunden wurden die Zellen mit 20 mM EDTA versetzt und für 10 sec kräftig gevortext. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurde $2 \text{ ml } 1 \times \text{PBS}$ mit $0,02\% \text{ EDTA}$ hinzugefügt und die Ansätze abzentrifugiert (6 min, 1.400 upm). Anschließend wurden die Zellen exakt 5 min bei RT in $4\% \text{ Paraformaldehyd}$ fixiert. Der Fixiervorgang wurde durch Zugabe von 2 ml FACS-Puffer pro Ansatz abgestoppt. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und bis zur FACS-Färbung bei 4°C gelagert.

32. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Die durchflusszytometrischen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Tanja Breinig am Institut für Infektionsmedizin (Institut für Virologie) am Universitätsklinikum Homburg durchgeführt.

Die Durchflusszytometrie oder „fluorescence activated cell sorting“ stellt eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von

Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften dar. Während des Messvorgangs werden die Zellen durch Überdruck stark beschleunigt, so dass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt und am Messpunkt fokussiert werden (hydrodynamische Fokussierung). Durch gleichzeitige Messung des Vorwärts- und des 90°-Seitwärtsstreulichtes wird die relative Zellgröße beziehungsweise die relative Zellgranularität von Einzelzellen bestimmt, wobei sowohl die Granularität als auch die Größe direkt mit der Lichtintensität korreliert sind (Abb. 5). Die Einheit der FACS-Analyse ist somit die relative Lichtintensität. Mittels beider Lichtstreuparameter können einzelne Zellpopulationen unterschieden werden.

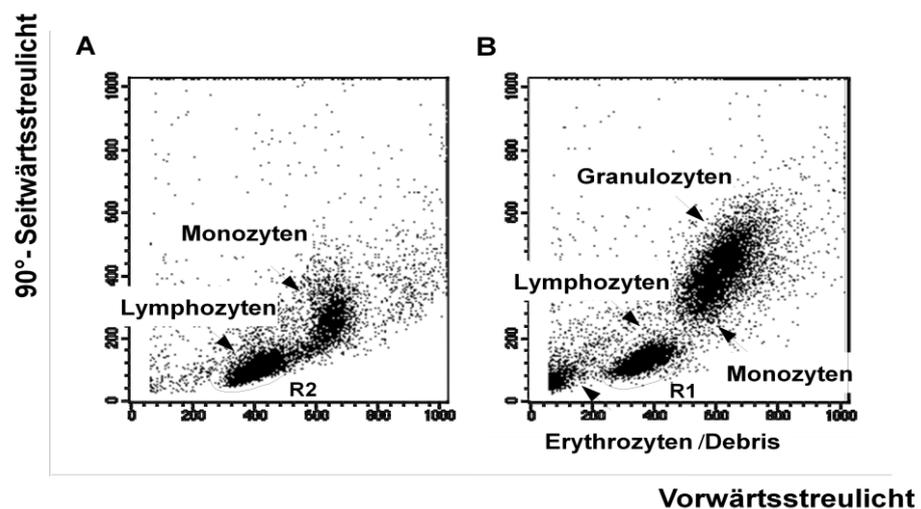


Abbildung 5: Darstellung der Größe und Granularität von PBMC (A) und Vollblut (B) im Punktwolkenendiagramm ("dot plot").

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

Werden die zu untersuchenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Primär- oder Sekundärantikörpern markiert, erfolgt durch den Argon-Laser, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm generiert, eine Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes. Das emittierte Licht wird schließlich über ein optisches System gemessen. Der Messbereich in der FACS-Analyse gliedert sich in 1024 Kanäle, in welche die Zellen nach unterschiedlicher Expression der Oberflächenantigene, die sich in

der Intensität der Fluoreszenz widerspiegelt, eingeteilt werden. Die Ergebnisse der Messungen wurden durch Erstellen von Histogrammen beziehungsweise Punktwolkendiagrammen der Fluoreszenz 1 für FITC (Fluorescein-Isothiocyanat), Fluoreszenz 2 für PE (Phycoerythrin) und Fluoreszenz 3 für PE-Cy5 (Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin 5) verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde ein FACScan der Firma Becton Dickinson benutzt. Die Messung und Auswertung erfolgten mit Hilfe des CellQuest™ Programms Version Mac App^R 3.0.1.

Die Analyse von mDC oder IC21 erfolgte, indem die Größe gegen die Granularität aufgetragen und ein „gate“ über die Population der lebenden Zellen gesetzt wurde (Abb. 6 A). Eine eGFP Expression wurde in einem Histogramm dargestellt. Zusätzlich wurden unmarkierte Zellen als Negativkontrolle über das eigentliche Histogramm gelegt, um die Zellen eindeutig als positiv identifizieren zu können (Abb. 6 (B)). Durch das Setzen eines „Markers“ lässt sich eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils und der Fluoreszenzintensität der Population berechnen (Abb. 6 C).

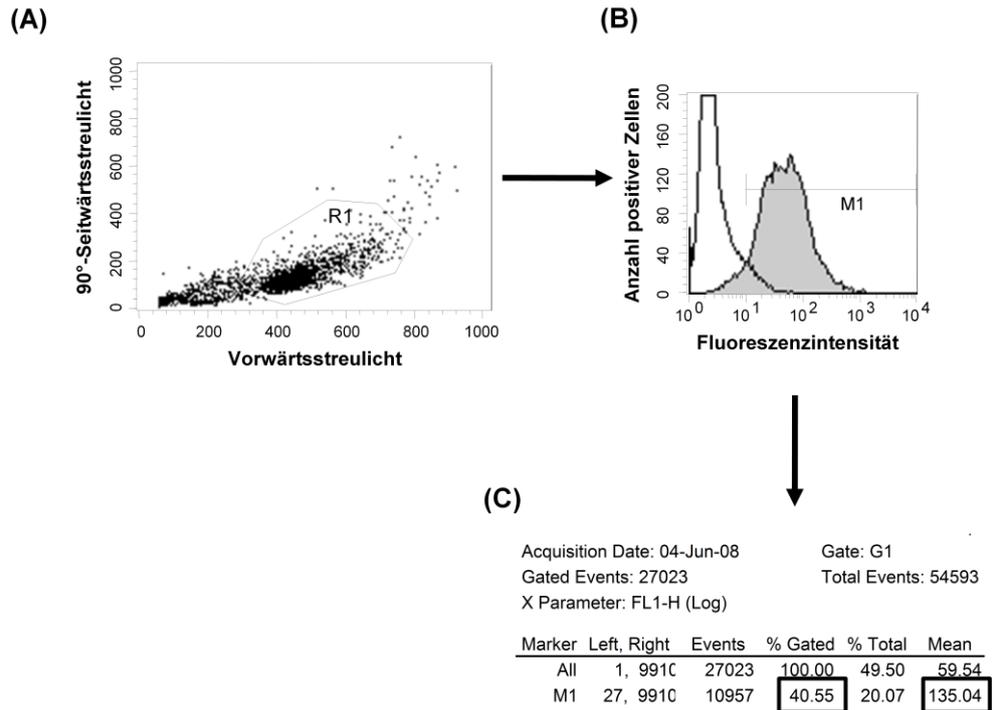


Abbildung 6: Darstellung der Größe und Granularität von mDC oder IC21 (A), der Expression von eGFP innerhalb der mDC oder IC21 Population (B) und der statistischen Auswertung (C).

Bei der Darstellung der Größe gegen die Granularität können mit Hilfe eines „gates“ nur die lebenden Zellen in die Messung eingeschlossen werden (A). Innerhalb der Population wurden als Histogramm die eGFP-positiven Zellen dargestellt (grau), zusätzliche wurde als Negativkontrolle unmarkierte Zellen als „Overlay“ aufgeführt (B). Durch das Setzen eines Markers (M1) lässt sich eine Statistik bezüglich des prozentualen Anteils und der Fluoreszenzintensität der Population berechnen (C). In diesem Fall sind 40,55 % der Zellen eGFP positiv und weisen eine Fluoreszenzintensität von 135,04 auf.

Die Auswertung der Expression zweier verschiedener Moleküle in einer Zellpopulation erfolgt mit Hilfe eines "dot plots", bei dem die beiden Fluoreszenzen gegeneinander aufgetragen werden. Durch das Setzen eines Quadranten können die einzelpositiven von den doppelpositiven Zellen getrennt analysiert werden (Abb. 7 A). Dieselbe FACS-Analyse ist in Abbildung 7 B in Form eines "contour plot" gezeigt. Diese Darstellungsmethode erleichtert die Abgrenzung nahe beieinander liegender Populationen. Mit dem im Rahmen dieser Arbeit benutzten Gerät ist es möglich, drei Fluoreszenzen parallel in einem Ansatz zu verwenden.

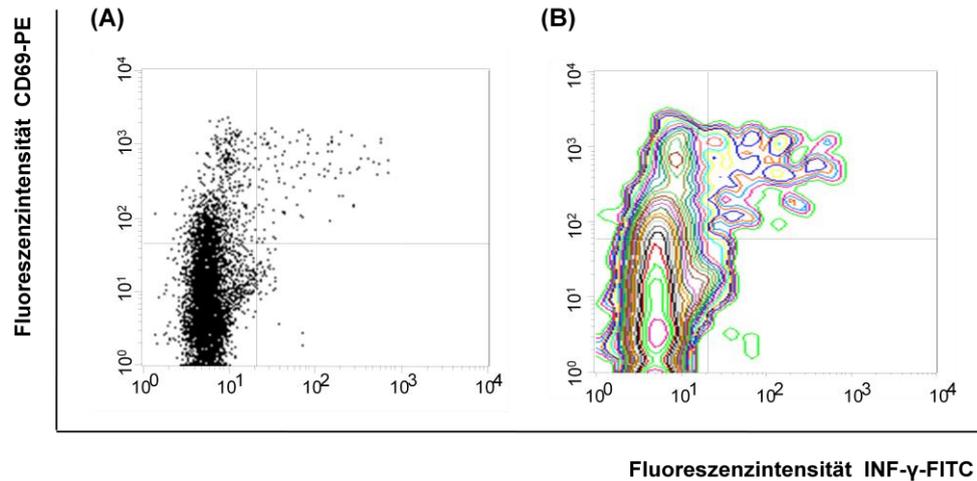


Abbildung 7: Darstellung der CD69- und INF- γ -Expression von T-Lymphozyten am Beispiel eines Punktwolkendiagrammes bzw. eines "contour plots".

Die Zwei-Kanal-Analyse in Form eines "dot plot" (A) bzw. in Form eines "contour plot" (B) zeigt die Expression des Oberflächenmolekül CD69 und des Effektormoleküls INF- γ von T-Lymphozyten. Der Einsatz eines Quadranten ermöglicht die statistische Analyse der einzelnen Zellpopulationen bezüglich ihres prozentualen Anteils und Fluoreszenzintensität.

Auswertung der FACS-Daten:

Zur Auswertung der Histogramme wurden der "mean", die mittlere Fluoreszenzintensität, oder der Median benutzt. Der "mean" ist der Kanal, bei dem die Summe aller Punkte geteilt durch die Zahl an Ereignissen berechnet wird. Der Median ist der Kanal, bei dem ein Histogramm in zwei Teile mit gleicher Anzahl von Ereignissen aufgeteilt wird. Gezählt wurden 30.000 Zellen bei Versuchen mit IC21 Zellen oder humanen DC. Zur Analyse von Hefen wurden 50.000 Zellen gezählt.

32.1. Färbung von Oberflächen-Antigen

FACS-Puffer:

FKS	5 % (v/v)
BSA	0,5 % (w/v)
Natriumazid	0,07 % (w/v)
PBS	ad 1000 ml

Fixierlösung (FACS-FIX):

NaCl	8,5 g/l
Paraformaldehyd (1 %)	10 g/l

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

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

1×10^5 bis 1×10^6 der zu untersuchenden Zellen wurden in ein FACS-Röhrchen überführt und mit PBS mit 10 % FKS oder FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 6 min, 1.400 upm). Der Überstand wurde verworfen, die restlichen Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die benötigte Menge an Antikörpern wurde in Vorexperimenten durch Titration bestimmt. Nach Zugabe der erforderlichen Antikörper wurde der Ansatz gründlich gevortext und 30-45 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Bei fixierten Zellen erfolgte die Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln, bei unfixierten Zellen auf Eis im Dunkeln. Im Anschluss wurden die Zellen in 2 ml PBS mit 10 FKS oder FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation 6 min, 1.400 upm), der Überstand verworfen und die Zellen in 100 μ l FACS-Fix aufgenommen. Die Zellen können nun bis zur FACS-Analyse mehrere Tage im Dunkeln bei 4°C gelagert werden.

32.2. Färbung von intrazellulären Antigenen

Zum Nachweis intrazellulärer Antigene ist eine Permeabilisierung der Zellmembran fixierter Zellen notwendig, um dem Antikörper das Eintreten in die Zelle zu ermöglichen. Hierzu wurde Saponin, ein aus der Rinde des Baumes *Quillaya saponaria* stammendes Protein, verwendet, welches die Zelle permeabilisiert ohne die Morphologie der Zelle zu beeinflussen (Jacob et al., 1991).

Die fixierten Zellen wurden in 2 ml FACS-Puffer mit 0,1 % Saponin resuspendiert und exakt 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation

von 6 min bei 1.600 upm wurde der Überstand dekantiert und die restlichen Zellen in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. Die Antikörper wurden direkt zu den Zellen pipettiert. Die anschließende Färbung wurde wie unter 32.1. beschrieben durchgeführt. Fixierte Zellen wurden im Gegensatz zu unfixierten Zellen bei 1.600 upm abzentrifugiert.

33. *In vitro*-Aktivierung epitopspezifischer T-Lymphozyten

Die Versuche zur *in vitro*-Aktivierung epitopspezifischer T-Zellen wurden in Kooperation mit Prof. Geginat, Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene am Klinikum Mannheim durchgeführt.

Zum Nachweis der Effizienz der Antigenexpression und -prozessierung bzw. -präsentation wird eine murine, epitopspezifische CD8-T-Zelllinie verwendet. Als APC dienen dabei murine Makrophagen aus dem Knochenmark (BMM), welche zuvor durch Zugabe des Wachstumsfaktors M-CSF ausgereift wurden. Diese werden mit den jeweiligen rekombinanten Hefezellen inkubiert und die Präsentation des Ova-CTL-Epitopes SIINFEKL im Kontext mit MHC I-Molekülen via T-Zellstimulation überprüft. Nach Zugabe der Hefezellen im Verhältnis von 1:5 (Hefen zu APC) wurden die entsprechenden APC nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zur Stimulation der Ovalbumin-spezifischen T-Zellen eingesetzt. Als Positivkontrolle dient ein Ansatz, bei dem direkt rekombinantes Ovalbumin-Protein ohne Hefe zu den APC gegeben wurde. Die Interaktion der MHC I-Ova-Peptid-Komplexe mit den Ovalbumin-spezifischen T-Zellen führt zu deren Aktivierung und in der Folge zur Sekretion von Interferon- γ (INF- γ), welches in einem ELISA quantifiziert werden kann.

III. Ergebnisse

Ziel dieser Dissertation war die Etablierung eines Hefe-vermittelten „Delivery“-Systems für Antigen-kodierende DNA und mRNA. *Saccharomyces cerevisiae* wurde bereits erfolgreich als Impfvehikel für rekombinante Proteine zur Induktion einer protektiven Immunantwort eingesetzt. Dabei wurde eine Aktivierung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten nach Verwendung unterschiedlicher viraler Antigene oder Tumorantigene beobachtet (Stubbs et al., 2001; Breinig et al., 2003; Barron et al., 2006; Riemann et al., 2007; Boehm et al., 2009). In dieser Arbeit sollten die Vorteile der Hefe als Lebendvakzine mit denen einer DNA- und RNA-Vakzine kombiniert werden. Nach Auswahl geeigneter Hefestämme wurde die Expression unterschiedlicher Antigene nach DNA- und RNA-„Delivery“ in verschiedenen APC untersucht und die Effizienz dieses Nukleinsäure-„Delivery“-Systems hinsichtlich einer Aktivierung Antigen-spezifischer T-Zellen getestet.

1. Etablierung eines Systems zum „Delivery“ Antigen-kodierender DNA und mRNA mittels Hefen in Säuger-APC

In dieser Arbeit sollte ein Plasmid-System konstruiert werden, mit welchem Antigen-kodierende DNA und mRNA mittels Hefen in Antigen-präsentierende Zellen von Säugern eingebracht werden kann. Neben säugerzell-spezifisch viralen und APC-spezifischen Promotoren zum DNA-„Delivery“ kamen konstitutive sowie induzierbare Hefepromotoren für ein RNA-„Delivery“ zum Einsatz. Das System basiert auf dem von Hill et al. (1986) beschriebenen Grundvektor YEp352. Zunächst musste

jedoch ein geeigneter Stamm identifiziert werden, welcher als „Carrier“ fähig ist, einen Transport von Nukleinsäuren vermitteln.

1.1. Untersuchungen zur Ausreifung humaner DC durch verschiedene *Saccharomyces cerevisiae* Stämme

Im Hinblick auf den Einsatz von Hefen als „Carrier“ für Nukleinsäuren in APC, sollte zunächst ein dafür geeigneter Hefestamm identifiziert werden. *S. cerevisiae* zeichnet sich durch eine geringe Eigenimmunität aus, da in einem *ex vivo* Assay nur geringe Frequenzen an Hefespezifischen Gedächtnis-T-Zellen nachgewiesen werden konnten (Heintel et al., 2003). Für den *S. cerevisiae* Stamm W303α wurde gezeigt, dass er humane unreife DC (iDC) effektiv zu reifen DC (mDC) ausreift (Bernstein et al., 2007; Remondo et al., 2009). Somit bietet sich die Verwendung eines *S. cerevisiae* Stammes als Vehikel für Nukleinsäuren an. Aus diesem Grund wurden drei *S. cerevisiae* Wildtypstämme (192.2d, BY4742 und S86c) auf ihre Fähigkeit untersucht, unreife humane DC auszureifen. Dazu wurden die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Leukozyten-Konzentraten von Blutspendern isoliert und Monozyten durch Adhärenz an Plastik gewonnen. Diese wurden durch Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF über fünf Tage zu iDC differenziert. Pro Stimulationsansatz wurden 1×10^6 iDC eingesetzt. Nach Zugabe der verschiedenen Hefestämme im Verhältnis von 1:1 und Inkubation von 48 Stunden bei 37°C, 5 %CO₂, wurde die Ausreifung der iDC zu mDC anhand von Oberflächenfärbungen bestimmter Aktivierungsmarker mittels FACS-Analyse untersucht. Dazu wurde eine FACS-Färbung gegen die Aktivierungsmarker CD80, CD83 und CD86 sowie gegen HLA-I und HLA-II durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 8 und Tabelle 6 zusammengefasst. Alle drei eingesetzten *S. cerevisiae* Stämme vermittelten eine Reifung humaner iDC zu mDC. Es konnte eine verstärkte Oberflächenexpression der kostimulatorischen Oberflächenproteine CD80, CD83

und CD86 nachgewiesen werden. Weiterhin wurde eine verstärkte Produktion von HLA-Molekülen und deren Präsenz an der Zelloberfläche der DC im Vergleich zu unreifen DC beobachtet. Die beste Ausreifung wurde durch den Stamm S86c erzielt, da durch ihn die Expression von CD80, CD86 und HLA-II am effizientesten gesteigert werden konnte.

Zur Etablierung des Hefe-basierten „Delivery“-Systems sollte das „enhanced GFP“ des Säugers als Modellprotein eingesetzt werden. Aus diesem Grund wurden die drei *S. cerevisiae* Wildtypstämme auch hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Expression von Säuger eGFP untersucht, da ein Protein-„Delivery“ mittels *S. cerevisiae*, durch welches bereits die effektive Induktion einer CD4- und CD8-T-Zellantwort beschrieben wurde, als Positivkontrolle im Nukleinsäure-„Delivery“-System mitgeführt werden sollte (Stubbs et al., 2001; Barron et al., 2006). Bei Untersuchungen der eGFP-Expression konnte beobachtet werden, dass lediglich der Stamm S86c eine deutliche eGFP-Expression zeigte, die Stämme 192.2d und BY4742 hingegen nur sehr schwach eGFP exprimierten (Daten nicht gezeigt). Aufgrund seiner Fähigkeit zur Ausreifung von iDC zu mDC und zur Expression von eGFP wurde der Stamm S86c für alle weiteren Experimente zur Etablierung des „Delivery“-Systems verwendet.

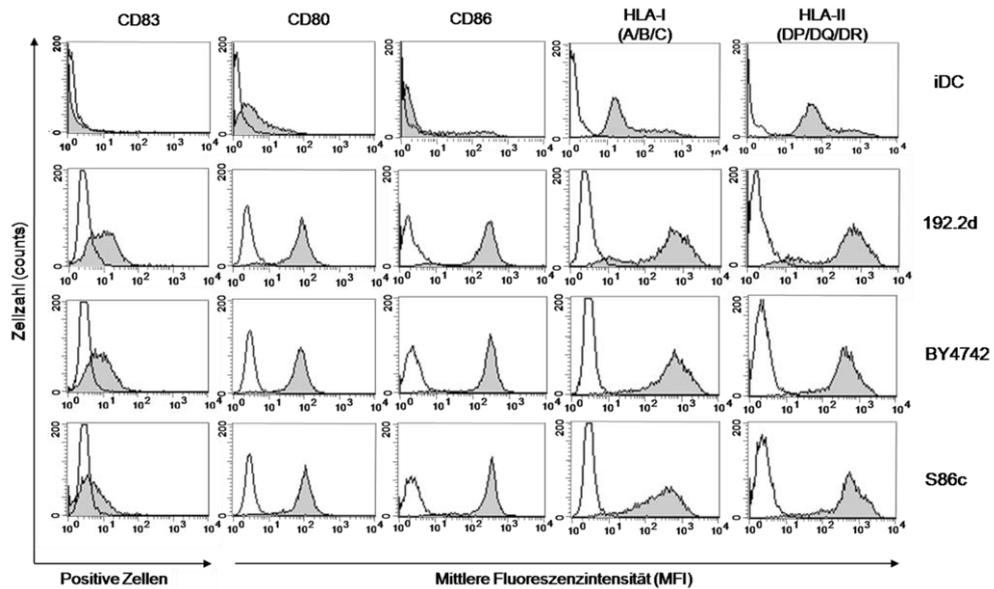


Abbildung 8: Quantifizierung der Ausreifung humaner iDC zu mDC durch verschiedene *S. cerevisiae* Stämme anhand der Expression kostimulatorischer Oberflächenproteine und HLA-Moleküle.

1×10^6 iDC wurden mit Hefezellen der *S. cerevisiae* Stämme 192.2d, BY4742 oder S86c mit einer MOI 1 infiziert und 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen, gefärbt und die Expression der charakteristischen Reifungsmarker im Durchflusszytometer bestimmt. Im Histogramm ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bzw. die Anzahl positiver Zellen [%] gegen die Anzahl vermessener Zellen aufgetragen. In grau dargestellt ist die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenantigene, in weiß die dazugehörige Hintergrundfluoreszenz. Die dazugehörigen Werte der mittleren Fluoreszenzintensität sowie der Anzahl positiver Zellen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Expression der charakteristischen Reifungsmarker auf humanen DC nach Inkubation mit verschiedenen *S. cerevisiae* Stämmen.

Dargestellt sind die im Durchflusszytometer bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Oberflächenmarker CD80, CD86, HLA-I und HLA-II sowie der prozentuale Anteil an CD83 positiven Zellen nach Inkubation mit unterschiedlichen *S. cerevisiae* Hefestämmen.

Ansatz	Mittlere Fluoreszenzintensität				Positive Zellen [%]
	CD80	CD86	HLA-I (A/B/C)	HLA-II (DR/DQ/DP)	
iDC	13,6	102,5	74,7	156,9	1,2
192.2d	85,4	265,4	690,7	669,3	47,8
BY4742	76,1	282,5	737,8	491,1	59,4
S86c	103,3	306,1	344,5	692,6	27,1

1.2. Das DNA-„Delivery“-System:

Hefen als Vehikel für Antigen-kodierende DNA

1.2.1. Konstruktion der Plasmide zum DNA-„Delivery“

Der hier verwendete säugerzell-spezifische virale CMV-Promotor gewährleistet eine konstitutive Expression von Antigenen in Säugerzellen, darunter auch in humanen DC (Linette et al., 2000; Mangeot et al., 2000). Er ist daher in vielen kommerziell erhältlichen Säugerepressionsvektoren vorhanden. Der CMV-Promotor wurde bereits zum DNA-„Delivery“ mittels *Listeria monocytogenes* eingesetzt (Löffler et al., 2006). Als APC-spezifischer Promotor fanden die Promotoren des murinen „dendritic cell specific transmembrane protein“ (DC-STAMP) und des humanen Fascin Verwendung. Das murine DC-STAMP weist eine 90 %-ige Homologie zum humanen DC-STAMP auf, welches sieben Transmembranregionen enthält. Beide werden bevorzugt in DC exprimiert (Hartgers et al., 2000; Eleveld-Trancikova et al., 2005). Fascin ist ein Aktin-bündelndes Protein des Zytoskeletts von DC, welches an der Formation von Dendriten beteiligt ist (Ross et al., 1998). Der Fascin-Promotor vermittelt eine starke Antigenexpression und seine Aktivität ist auf DC beschränkt (Ross et al., 2003).

Der CMV-Promotor wurde mittels der Primer 5`CMV und 3`CMV an der Matrize pEGFP-C1 amplifiziert. Die murine Form des DC-STAMP-Promotors wurde unter Verwendung des Primerpaares 5`DC-STAMP und 3`DC-STAMP an genomischer DNA aus murinen Makrophagen (IC21) amplifiziert. Beide wurden zur Sequenzierung in pST-Blue1 bzw. pYES2.1/V5-His-TOPO zwischenklontiert. Die DNA des Fascin-Promotors wurde von der Firma GENEART (Regensburg) synthetisiert. Die Sequenz der Promotoren wurde am 5`-Ende um die Sequenz der Restriktionsschnittstelle *HindIII*, am 3`-Ende um die der Restriktionsschnittstelle *XhoI* verlängert. Die Promotoren wurden in YEp352 als *HindIII/XhoI*-Fragment einkloniert (Abbildung 9).

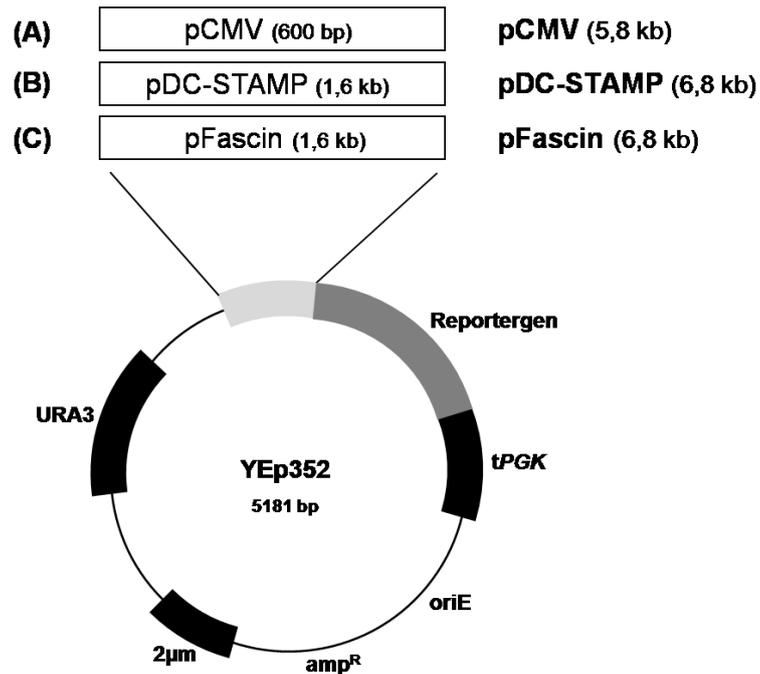


Abbildung 9: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pCMV, pDC-STAMP und pFascin.

Die Vektoren enthalten die Sequenz des CMV-Promotors (A), des DC-STAMP-Promotors („dendritic cell-specific transmembrane protein“) (B) und des Fascin-Promotors (C) sowie die des *PGK*-Transkriptionsterminators (*tPGK*) der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der Promotor-Sequenzen als *HindIII/XhoI* Fragment und der Insertion der *tPGK* Sequenz als *XbaI/SacI* Fragment.

1.2.2. Untersuchungen zur Aktivität der zum DNA-„Delivery“ verwendeten Promotoren in *S. cerevisiae*

Für die zum DNA-„Delivery“ eingesetzten Promotoren musste zunächst eine transkriptionelle Aktivität in *S. cerevisiae* ausgeschlossen werden, um das Einbringen Antigen-kodierender DNA zu gewährleisten. Eine Aktivität des CMV-Promotors wurde bisher nur für *Sz. pombe*, nicht für *S. cerevisiae* beschrieben (Toyama & Okayama, 1990). DC-STAMP- und Fascin-Promotoren wurden bislang noch nicht zur Protein-expression in Hefen herangezogen.

Das „enhanced green fluorescence protein“ (eGFP) des Säugers, welches für Säuger kodonoptimiert ist, aber auch in Hefe funktionelle ist (Breinig, 2003), wurde im *S. cerevisiae* Stamm S86c unter Kontrolle des CMV-, DC-STAMP- und Fascin-Promotors exprimiert. Als Negativ-

kontrollen dienten Zellen, welche mit dem Grundvektor YEp352 oder dem Expressionsvektor pPGK-eGFP (Positivkontrolle) transformiert wurden. Eine mögliche eGFP Expression wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 10 A) und FACS-Analyse (Abb. 10 B) überprüft. Keine der eingesetzten Vektoren vermittelte eine eGFP-Expression in S86c Zellen.

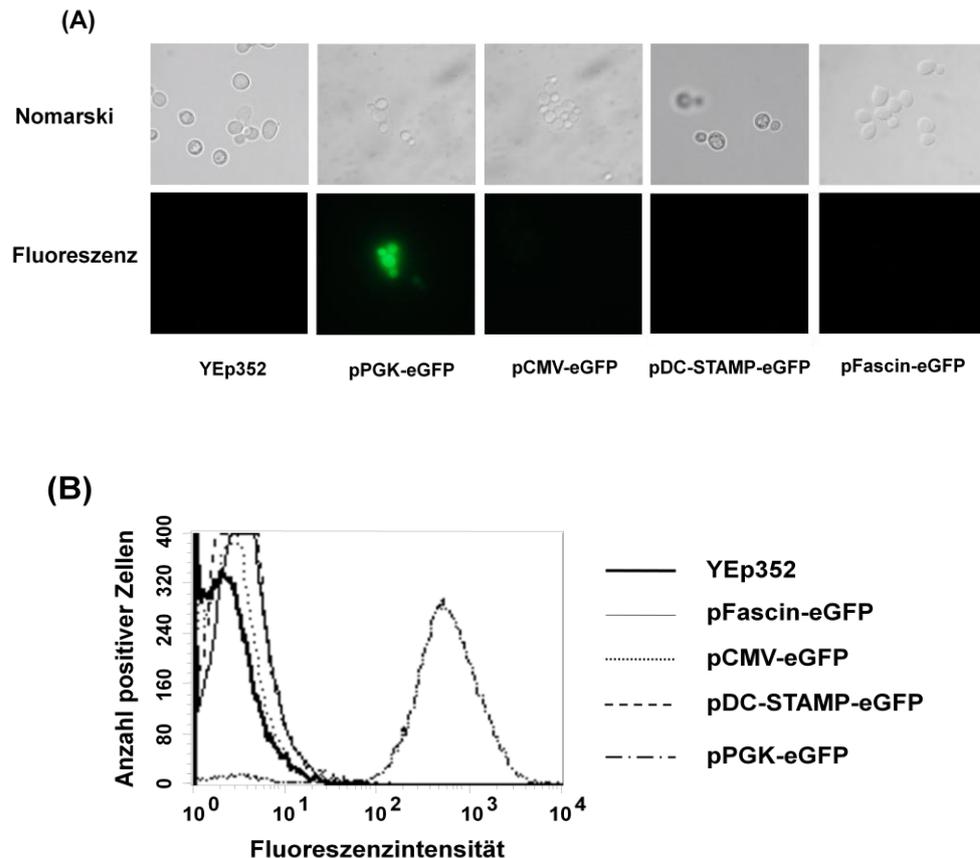


Abbildung 10: Die Promotoren pCMV, pDC-STAMP und pFascin vermitteln keine eGFP-Expression in *S. cerevisiae*.

(A) Zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung wurden Hefezellen der späten exponentiellen Wachstumsphase einmal mit 1 x PBS gewaschen. Untersucht wurden Zellen des *S. cerevisiae*-Stammes S86c, welche mit dem Leervektor YEp352, den Plasmiden pPGK-eGFP, pCMV-eGFP, pDC-STAMP-eGFP oder pFascin-eGFP transformiert wurden.

(B) Zellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c wurden mit dem Leervektor YEp352, den Plasmiden pPGK-eGFP, pCMV-eGFP, pDC-STAMP-eGFP oder pFascin-eGFP transformiert und im Durchflusszytometer hinsichtlich einer eGFP-Expression untersucht. Dazu wurden 50.000 Hefezellen analysiert.

Um eine durch den CMV-, DC-STAMP- und Fascin-Promotor induzierte *in vivo*-Transkription des eGFP-Gens in *S. cerevisiae* ausschließen zu können, wurde eine Northern-Analyse durchgeführt. Dazu wurde die

aus exponentiell wachsenden Zellen isolierte Gesamt-RNA in einem Formaldehyd-Gel aufgetrennt (Abb. 11 A) und auf eine Nylonmembran transferiert. Zum Nachweis der eGFP-mRNA wurde eine Digoxigenin-markierte 700 bp lange Sonde verwendet, die nach Hybridisierung mittels Chemilumineszenz detektiert wurde.

Die in Abbildung 11 B dargestellte Northern-Analyse zeigt eine deutliche eGFP-mRNA-Bande bei ~700 b in der Spur der Positivkontrolle, welche die eGFP-Expression unter Kontrolle des konstitutiven *PGK*-Promotors zeigt (Spur 1), jedoch keine eGFP-Transkripte in den Ansätzen, bei denen die eGFP-Expression unter Kontrolle des CMV-, DC-STAMP- oder Fascin-Promotors stand (Spuren 3-5).

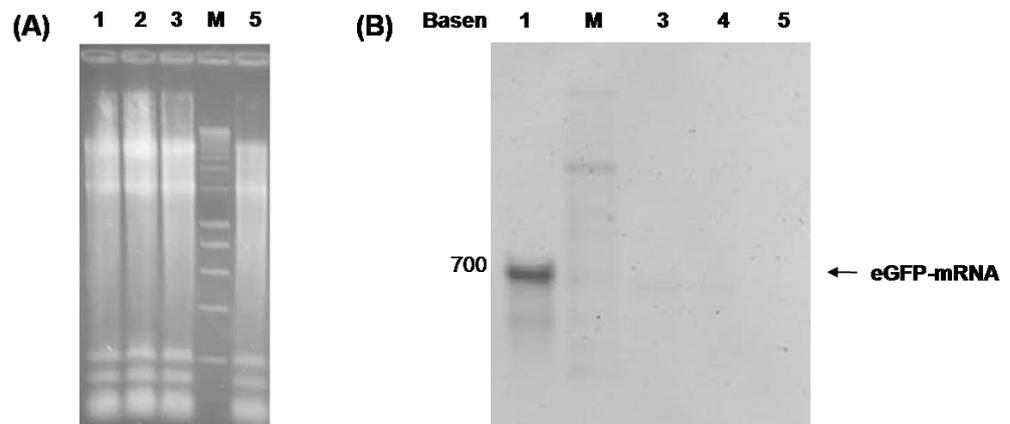


Abbildung 11: Gelelektrophoretische Auftrennung (A) und Northern-Analyse (B) der Gesamt-RNA eGFP-exprimierender Hefezellen.

(A) Die Gesamt-RNA von 3 ml einer üN-Kultur wurde mittels der „Hot-Phenol“-Methode isoliert. Nach Auftrennung im 1 %igen TBE-Agarosegel wurde die RNA mittels Ethidiumbromid gefärbt [Spur 1: pPGK-eGFP; Spur 2: pCMV-eGFP; Spur 3: pDC-STAMP-eGFP; Spur 4: Größenstandard „Smart-Ladder“; Spur 5: pFascin-eGFP]. **(B)** Zum Nachweis einer durch den CMV-, DC-STAMP- und Fascin-Promotor gesteuerten *in vivo* Transkription von eGFP wurde eine Northern-Analyse durchgeführt. Ein Aliquot der Gesamt-RNA aus mit den entsprechenden Expressionsvektoren transformierten *S. cerevisiae* S86c Zellen wurde in einem Formaldehyd-Gel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Der Nachweis der eGFP-RNA erfolgte mittels Chemilumineszenz nach Hybridisierung mit einer Digoxigenin-markierten Sonde [Spur 1: pPGK-eGFP; Spur 2: DIG-labeled RNA-Marker; Spur 3: pCMV-eGFP; Spur 4: pDC-STAMP-eGFP; Spur 5: pFascin-eGFP].

Eine Transkription des eGFP-Gens durch CMV-, DC-STAMP- oder Fascin-Promotor konnte mittels Northern-Analyse nicht nachgewiesen werden. Eine Aktivität aller Promotoren in *S. cerevisiae* konnte somit

ausgeschlossen werden, wodurch der Einsatz der drei Promotoren für ein DNA-„Delivery“ möglich war.

1.3. Das RNA-„Delivery“-System:

Hefen als Vehikel für Antigen-kodierende mRNA

1.3.1. Konstruktion der Plasmide zum RNA-„Delivery“

Für ein RNA-„Delivery“ kamen sowohl ein konstitutiver Hefepromotor als auch induzierbare Hefepromotoren zum Einsatz. Neben dem in *S. cerevisiae* konstitutiv aktiven Phosphoglyceratkinase-Promotor wurden die induzierbaren Hefepromotoren der Hauptenzyme des Glyoxylatzyklus Malat-Synthase (MLS1) und Isocitrat-Lyase (ICL1) zum RNA-„Delivery“ verwendet. Lorenz und Fink beschrieben, dass es nach Aufnahme von *S. cerevisiae* durch Makrophagen zur Induktion der Gene des Glyoxylatzyklus kommt (Lorenz & Fink, 2002). Der Glyoxylatzyklus ermöglicht es Zellen auf Verbindungen wie Acetat zu wachsen, also C₂-Körper als Kohlenstoffquelle zu nutzen (Piekarska et al., 2008). Durch die Induktion der Promotoren von Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase nach Aufnahme von *S. cerevisiae* durch APC in das für komplexe Kohlenstoffe arme Milieu der Phagolysosomen ist das Starten der Transkription noch in den Hefezellen möglich (Lorenz et al., 2001).

Die beiden Promotoren von *MLS1* und *ICL1* wurden an genomischer DNA des *S. cerevisiae* Stammes S86c mittels des Primerpaares 5`MLS1 und 3`MLS1 bzw. 5`ICL1 und 3`ICL1 amplifiziert und zur Sequenzierung in pYES2.1/V5-His-TOPO zwischenkloniert. Die Sequenz der Promotoren wurde am 5`Ende um die der Restriktionsschnittstelle *HindIII*, am 3`Ende um die der Restriktionsschnittstellen *XhoI* verlängert. Die beiden Promotoren von Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase wurden in den Grundvektor YEp352 als *HindIII/XhoI*-Fragment einkloniert (Abb. 12). Der *PGK*-Promotor lag bereits im

Expressionsvektor pPGK-M28-I vor (Schmitt, 1995). Als Grundvektor für dieses Plasmid diente YEp352 (Hill et al., 1986), so dass das K28-Gen einfach durch die später verwendeten Antigene ersetzt werden konnte.

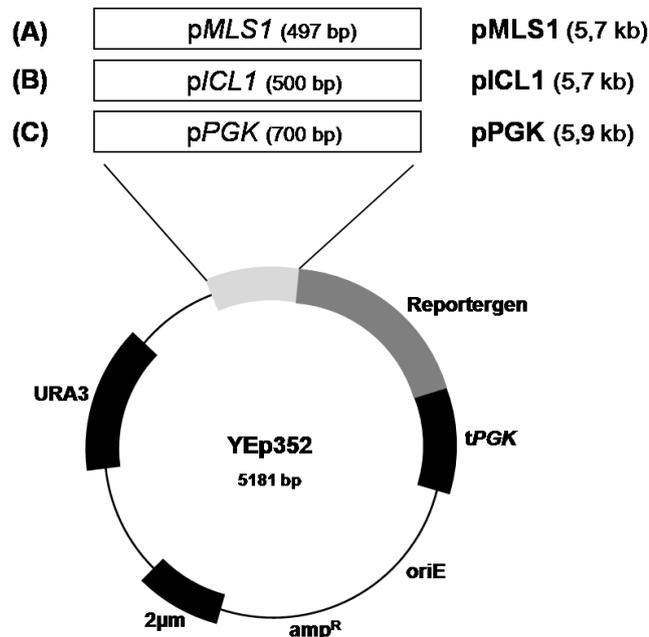


Abbildung 12: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pMLS1, pICL1 und pPGK.

Die Vektoren enthalten die Sequenz des *MLS1*-Promotors (Promotor der Malat-Synthase) **(A)**, des *ICL1*-Promotors (Promotor der Isocitrat-Lyase) **(B)** und des *PGK*-Promotors (Promotor der Phosphoglyceratkinase) **(C)** sowie die des *PGK*-Transkriptionsterminators (*tPGK*) der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der Promotor Sequenzen als *HindIII/XhoI* Fragment und der Insertion der *tPGK* Sequenz als *XbaI/SacI* Fragment.

1.3.2. Induktion der regulierbaren Hefepromotoren *MLS1* und *ICL1* nach Aufnahme von *S. cerevisiae* durch verschiedene APC

Um die beiden Promotoren *MLS1* und *ICL1* zum RNA-„Delivery“ einsetzen zu können, musste zunächst die Induktion beider Promotoren *in vivo* durch Kultivieren der Hefezellen in C₂-haltigem Medium und *in vivo* nach Aufnahme der Hefezellen durch APC nachgewiesen werden. Als APC wurden murine Makrophagen sowie humane DC verwendet,

welche Hefen effektiv aufnehmen (Lorenz & Fink, 2002; Stubbs et al., 2001). Dazu wurde eGFP unter Kontrolle von *MLS1* und *ICL1* in S86c Zellen transformiert. Zur Untersuchung der eGFP-Expression in Hefe wurden die Zellen 24 h in Acetat-haltigem Medium inkubiert und anschließend im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Beide regulierbaren Promotoren konnten durch Kultivierung auf C₂-haltigem Medium induziert werden und führten *in vivo* zu einer effizienten eGFP-Expression (Abb. 13).

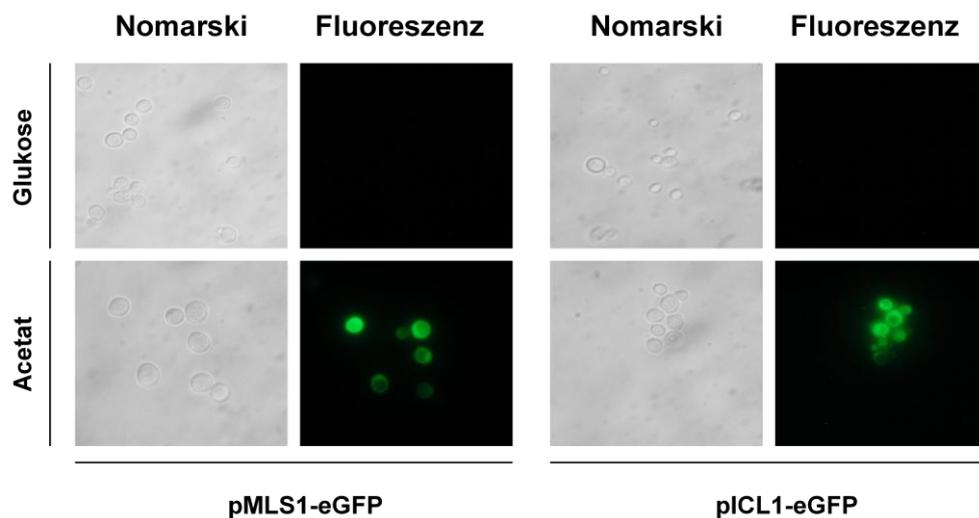


Abbildung 13: Induktion der Promotoren von Malat-Synthase (*MLS1*) und Isocitrat-Lyase (*ICL1*) nach Kultivierung eGFP-exprimierender Hefen auf Acetat-haltigem Medium.

Zur Untersuchung der *in vivo* Induktion des *MLS1*- und *ICL1*-Promotors wurden die mit pMLS1-eGFP und pICL1-eGFP transformierten Hefen des *S. cerevisiae* Stammes S86c für 24 h in Acetat-haltigem Medium inkubiert und im Anschluss hinsichtlich einer eGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

Zum Nachweis der *in vivo* Induktion beider Promotoren in APC wurde eine eGFP-Expression nach Aufnahme der S86c Zellen durch murine Makrophagen IC21 und humane DC untersucht. Nach Zugabe der Hefen zu den jeweiligen APC wurde nach unterschiedlichen Zeitpunkten eine Probe genommen und zur FACS-Analyse eingesetzt. Eine Induktion der Promotoren in den Phagolysosomen der APC konnte in IC21-Zellen (Abb. 14 A) und humanen DC (Abb. 14 B) durch den Nachweis einer eGFP-Expression gezeigt werden. Die Induktion der Promotoren erfolgte in IC21-Zellen sowie humanen DC nach 1 - 1,5 h nach Zugabe der Hefezellen, wobei der *ICL1*-Promotor im Vergleich

zum *MLS1*-Promotor jeweils etwas früher und stärker induziert wurde. Dieser Effekt hob sich zumindest in IC21 zu späteren Zeitpunkten weitestgehend auf (Abb. 14 A). Durch die *MLS1*- und *ICL1*-Promotor-kontrollierte eGFP-Expression konnten in IC21 sowie in humanen DC bis zu 35 % eGFP-positive Zellen erhalten werden. Beide Promotoren konnten somit für ein induzierbares RNA-„Delivery“ verwendet werden.

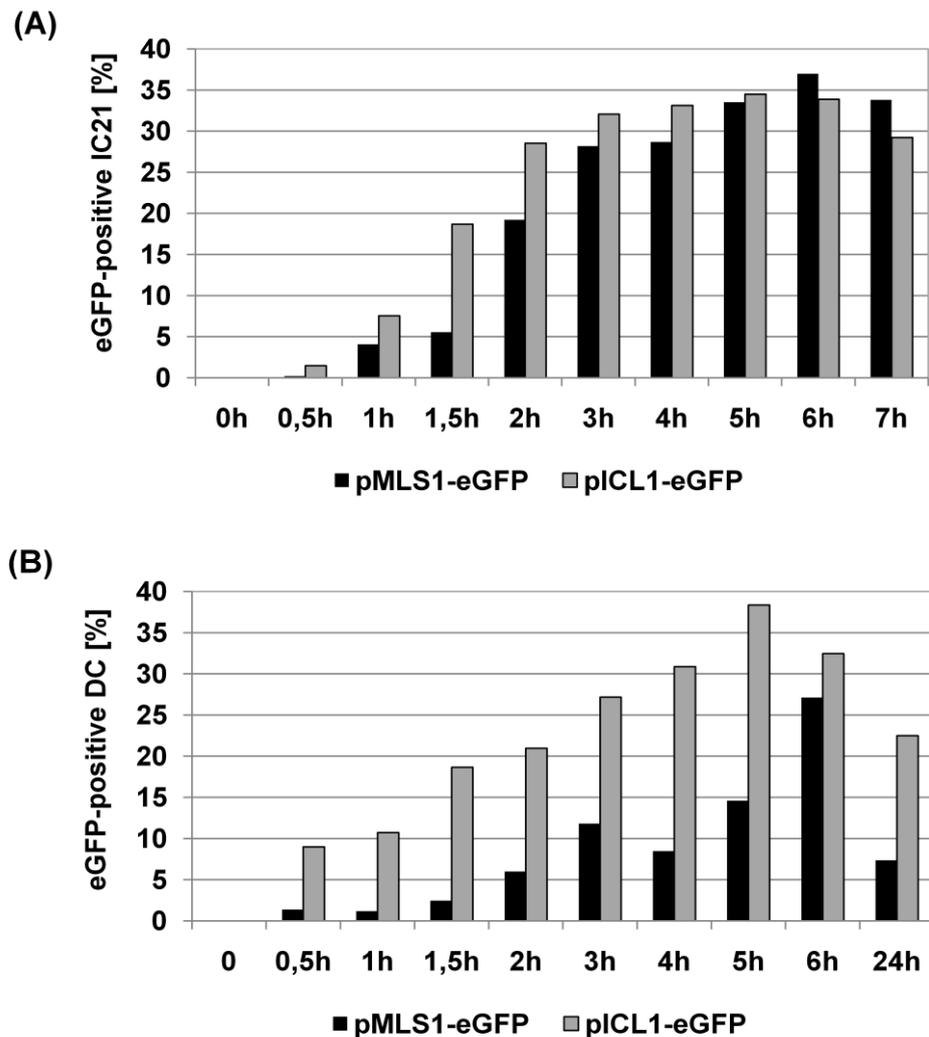


Abbildung 14: Induktion der Promotoren von Malat-Synthase (*MLS1*) und Isocitrat-Lyase (*ICL1*) nach Aufnahme der Hefezellen durch (A) murine IC21-Makrophagen und (B) humane DC.

Zum Nachweis der Induktion des *MLS1*- und *ICL1*-Promotors wurden die mit pMLS1-eGFP und pICL1-eGFP transformierten Hefen des *S. cerevisiae* Stammes S86c zu (A) murinen IC21-Makrophagen und (B) humanen DC gegeben. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die APC geerntet und die erhaltenen Proben hinsichtlich einer eGFP-Expression durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden 30.000 Zellen analysiert.

1.3.3. Blockade der Translation in Hefe durch eine virale „internal ribosomal entry site“ (IRES)

Um ein RNA-„Delivery“ mittels Hefe zu gewährleisten, musste eine Translation der entsprechenden Antigen-Transkripte in der Hefe verhindert werden. Durch das Anfügen einer viralen IRES-Sequenz des *Encephalomyocarditis* Virus an das 5`Ende der Antigen-Gensequenz sollte die Translation in Hefe unterdrückt werden (Estefania et al., 1993), die Translation in Säugerzellen hingegen effizienter verlaufen (Clontech, Palo Alto, CA; Schoen et al., 2005).

Die IRES-Sequenz wurde nach der Methode der SOE-PCR (Horton et al., 1990) an die Sequenz von eGFP anfusioniert. Zur Amplifikation von IRES wurden die Primer 5`IRES und 3`IRES-eGFP, zur Herstellung der eGFP-Sequenz die Primer 5`IRES-eGFP und 3`eGFP verwendet. Dabei wurde die IRES-Sequenz am 5`Ende um die Sequenz der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI*, das 3`Ende die eGFP-Sequenz um die Restriktionsschnittstellen *BglII* und *SaII* verlängert. Zur Sequenzierung wurde die IRES-eGFP Fusion in pSTBlue-1 zwischenkloniert und als *XhoI/BglII* Fragment in den Expressionsvektor pPGK einkloniert. Zur Untersuchung der Blockade einer eGFP-Translation durch die 5` an das eGFP-Gen angefügte IRES-Sequenz, wurden die mit der IRES-eGFP Fusion unter Kontrolle des *PGK*-Promotors transformierten S86c Zellen im Fluoreszenzmikroskop (Abb. 15 A) und durch FACS-Analyse (Abb. 15 B) hinsichtlich einer eGFP-Expression untersucht. Als Kontrollen dienten S86c Zellen, die mit dem Grundvektor YEp352 und dem Expressionsvektor pPGK-eGFP transformiert wurden.

Anhand von Abbildungen 15 A und 15 B ist zu erkennen, dass die virale IRES-Sequenz eine Translation von eGFP verhinderte. Somit wurde durch das Anfügen der viralen IRES-Sequenz die Translation in Hefe ausgeschlossen und ein RNA-„Delivery“ sichergestellt.

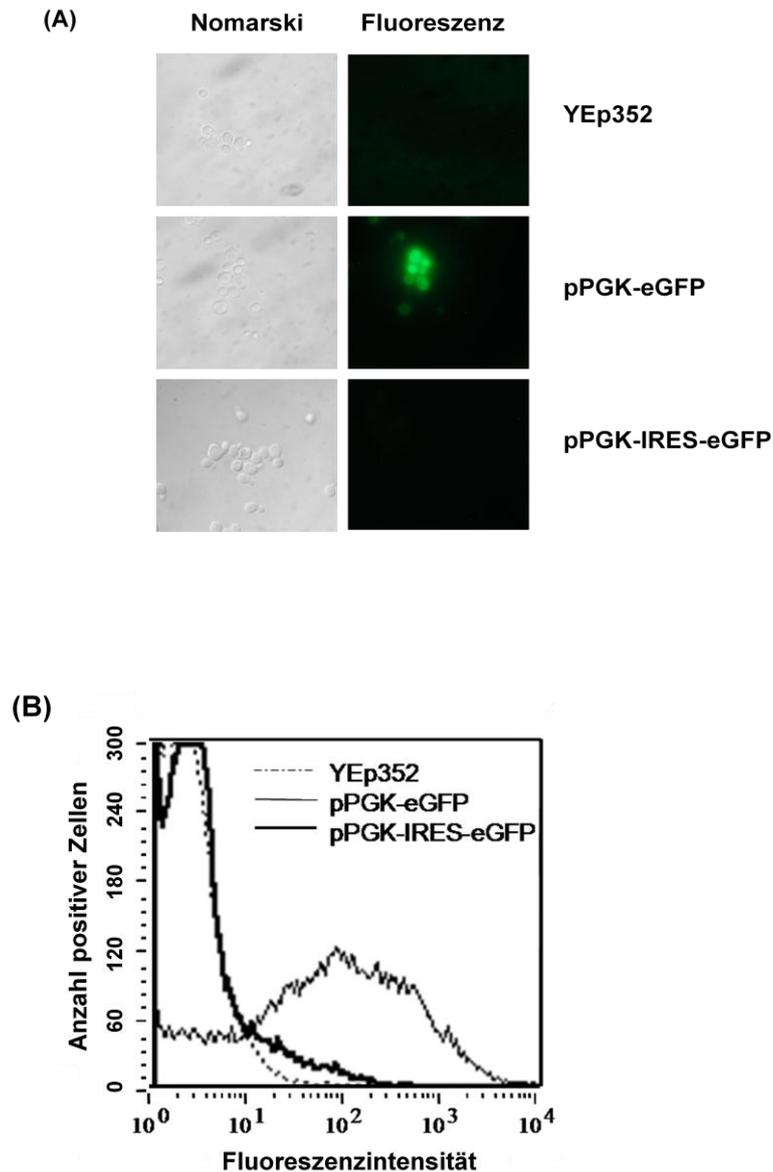


Abbildung 15: Die virale IRES-Sequenz des *Enzcephalomyocarditis* Virus verhindert eine eGFP-Translation in Hefe.

Die mit dem Plasmid pPGK-IRES-eGFP transformierten Zellen des *S cerevisiae* Stammes S86c wurden hinsichtlich einer eGFP-Expression im Fluoreszenzmikroskop (A) und mittels FACS-Analyse (B) untersucht. Als Negativkontrolle dienen Zellen des gleichen Hefestammes, die mit dem Leervektor YEp352, als Positivkontrolle Zellen, die mit dem Expressionsvektor pPGK-eGFP transformiert wurden. Mittels FACS-Analyse wurden 50.000 Hefezellen analysiert.

1.4. Charakterisierung der Bedingungen zum Hefe-vermittelten „Delivery“ Antigen-kodierender DNA und mRNA

Im Folgenden wurden die Bedingungen zum Hefe-vermittelten DNA- und RNA-„Delivery“ charakterisiert. Die Aufnahme von Hefezellen durch verschiedene APC konnte bereits in mehreren Arbeiten gezeigt werden (Heintel et al., 2003; Breinig et al., 2003; Stubbs et al., 2001; Bernstein et al., 2008). Für diese Arbeit musste zunächst ein optimales Verhältnis von APC zu Hefen gefunden werden, um ein stabiles und reproduzierbares „Delivery“-System zu etablieren.

Für Aufnahmeuntersuchungen von Hefezellen durch APC wurden S86c Zellen verwendet, die mit dem Expressionsvektor pPGK-GFP transformiert wurden und durch die konstitutive GFP-Expression eine grüne Fluoreszenz zeigten. Zusätzlich wurden diese Zellen mit FDA gefärbt, wodurch nur lebende und stoffwechselaktive Zellen angefärbt wurden und nach Anregung eine grüne Fluoreszenz vermitteln. Zur Aufnahme von Hefezellen wurden 1×10^5 IC21/ „well“ in einem Milliliter Medium in 24 -„well“-Platten ausgesät. Nach 8 h Inkubation bei 37°C und 5 % CO₂ und mikroskopischer Kontrolle der Adhärenz der Zellen wurden die Hefen in einem Verhältnis von 1:1 bis 1:10 zu den IC21 gegeben. Nach erfolgter Aufnahme der Hefezellen wurden die IC21 Zellen geerntet, fixiert und zur FACS-Analyse eingesetzt. Zur Aufnahme von Hefezellen durch humane DC wurden 1×10^6 DC / Ansatz in zwei Milliliter Medium verwendet. Weiterhin wurde untersucht, ob die Inkubation in 15 ml oder 50 ml Falcon-Gefäßen eine bessere Aufnahme der Hefen durch die DC erlaubt. Die Hefen wurden in einem DC:Hefe Verhältnis von 1:1 bis 1:5 zugegeben. Die Ansätze wurden 8 h in 15 ml oder 50 ml Falcons bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert, im Anschluss geerntet und fixiert. Mittels FACS-Analyse wurde die Anzahl GFP / FDA-positiver IC21 bzw. DC ermittelt.

Anhand der erhaltenen Ergebnisse wurde für ein „Delivery“ in IC21-Zellen ein optimales Verhältnis IC21:Hefen von 1:7 ermittelt (59 % Aufnahme) (Abb. 16 A). Durch das Verhältnis von 1:10 konnte keine

weitere Steigerung in der Anzahl GFP / FDA-positiver IC21 erreicht werden. Dies beruht auf einer unvollständigen Aufnahme der Hefezellen, was durch mikroskopische Untersuchungen bestätigt werden konnte. Für das „Delivery“ in humane DC stellten sich ein Verhältnis DC:Hefen von 1:5 als bestmögliches Verhältnis und eine Inkubation in 50 ml Falcon-Gefäßen als geeignete Bedingung heraus (Abb. 16 B). Dabei konnte eine Aufnahmeeffizienz von 90 % erreicht werden.

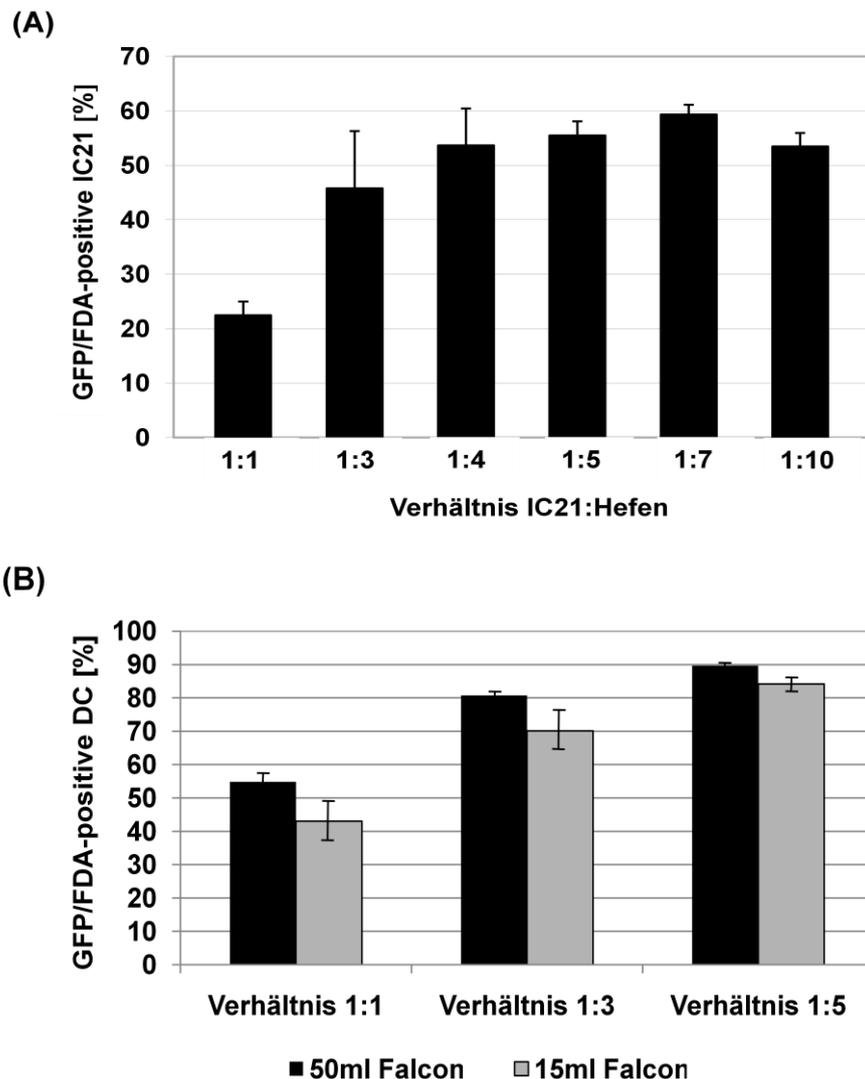


Abbildung 16: Aufnahme von Hefezellen durch (A) murine IC21-Makrophagen und (B) humane DC.

Zur Ermittlung des optimalen Verhältnis von Hefen zu IC21 (A) bzw. DC (B) wurden Hefen des *S. cerevisiae* Stammes S86c, welche mit dem Expressionsvektor pPGK-GFP transformiert und mit FDA gefärbt wurden, in unterschiedlichen Verhältnissen zu APC gegeben. Die Aufnahme der Hefen wurde mikroskopisch kontrolliert und die Anzahl GFP / FDA-positiver Zellen durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse ermittelt. Dazu wurden 30.000 IC21 bzw. DC im FACS untersucht.

Bakterielle „Delivery“-Systeme haben den Nachteil, dass die eingesetzten Bakterienstämme, wie z.B. Listerien, toxisch auf Säuger-APC wirken (Guzmán et al., 1996; Schoen et al., 2005). Ein eventueller toxischer Effekt der Hefe auf die verwendeten APC wurde mittels Trypan-Blau-Test untersucht. Trypan-Blau ist ein anionischer Diazofarbstoff, welcher nur von abgestorbenen Zellen aufgenommen wird; dadurch werden diese dunkelblau angefärbt. Zur Untersuchung der Vitalität der APC nach Aufnahme von Hefezellen wurden 1×10^5 IC21 / ml in 24 - „well“-Platten ausgesät, mit Hefen im Verhältnis von IC21:Hefen von 1:1 bis 1:7 infiziert und 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Aufnahme der Hefen wurden die IC21 geerntet und mit Trypan-Blau nach Angaben des Herstellers angefärbt. Es wurden für jedes untersuchte Verhältnis zur statistischen Absicherung Triplett-Ansätze gewählt, wobei pro Ansatz 300 IC21 Zellen ausgezählt wurden. Die Ergebnisse des Trypan-Blau-Tests (Abb. 17) zeigen, dass Hefen bei keinem der eingesetzten Verhältnisse einen toxischen Effekt auf APC ausüben. Alle Ansätze zeigten sehr wenige blaue und somit tote Zellen, so dass bei allen Verhältnissen über 95 % lebende Zellen erhalten wurden.

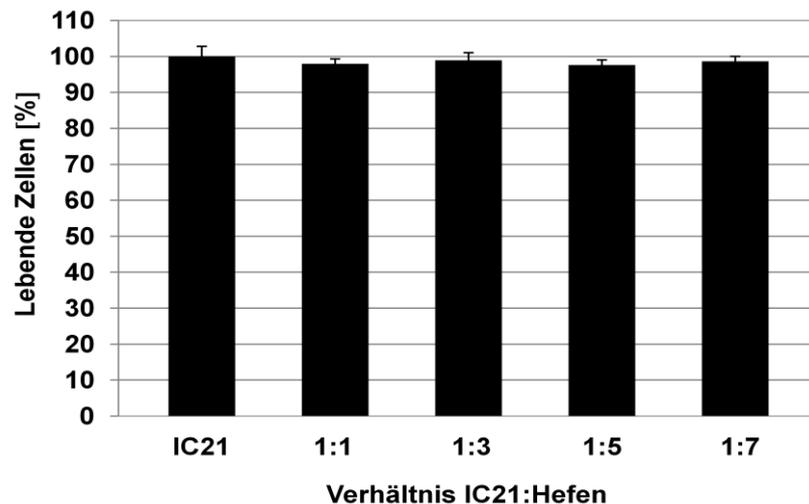


Abbildung 17: Trypan-Blau-Test zur Bestimmung der Vitalität von IC21-Zellen nach Aufnahme von Hefezellen.

Murine Makrophagen wurden mit einem IC21 zu Hefe Verhältnis von 1:1 bis 1:7 infiziert, 16 h inkubiert und im Anschluss mittels Trypan-Blau-Färbung auf Vitalität untersucht. Dabei wurden pro Infektionsverhältnis Triplett-Ansätze verwendet und für jeden Ansatz 300 IC21 Zellen mikroskopisch ausgezählt.

Nach gezeigter, sehr effizient verlaufender Aufnahme von Hefezellen durch APC wurde im Folgenden untersucht, ob es nach Einbringen von eGFP-kodierender DNA und mRNA zu einer eGFP-Expression innerhalb der APC kommt. Weiterhin wurde überprüft, ob die Menge an exprimiertem eGFP in Abhängigkeit von der eingesetzten Anzahl an Hefen steigt. Dazu wurden Hefezellen des Stammes S86c verwendet, die mit dem Expressionsvektor pCMV-IRES-eGFP oder pICL1-IRES-eGFP transformiert wurden. Durch die Verwendung der viralen IRES-Sequenz und des CMV-Promotors wurde ein DNA-„Delivery“, durch die IRES-Sequenz und den *ICL1*-Promotor ein RNA-„Delivery“ mittels Hefe gewährleistet. Es blieb nun zu untersuchen, bei welcher „Multiplicity of infection“ (MOI), also bei welcher Anzahl an infektiösen Einheiten (Hefen) pro Zielzelle, die größte Menge an eGFP nach DNA-„Delivery“ und RNA-„Delivery“ nachgewiesen werden konnte. Dazu wurden 1×10^5 IC21 / „well“ in einem Milliliter Medium in 24-„well“-Platten ausgesät und mit steigender MOI (1, 3, 5, und 7) infiziert. Die Infektion mit größeren Hefemengen wurde aufgrund der erhaltenen Ergebnisse zur Aufnahmeoptimierung ausgeschlossen, wobei ein optimales Verhältnis IC21:Hefen von 1:7 ermittelt wurde. Nach Inkubation von 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ wurden die Ansätze geerntet und zur FACS-Analyse eingesetzt. Abbildung 18 zeigt, dass mit steigender MOI, also mit steigender Anzahl an eingesetzten Hefezellen pro Zielzelle, die Menge an exprimiertem eGFP und folglich die Anzahl eGFP-positiver IC21-Zellen zunimmt (Gendosiseffekt). Somit wurde mit steigender Anzahl an Hefezellen auch eine größere Menge an eGFP-kodierender DNA und mRNA in IC21-Zellen eingebracht, was zu einer verstärkten eGFP-Expression mittels IC21 führte. Nach DNA-„Delivery“ wurde deutlich, dass die durch verschiedene MOI eingebrachte Menge an Antigenkodierender DNA jeweils zu einer deutlichen Steigerung der Anzahl eGFP-positiver Zellen führte. Nach RNA-„Delivery“ konnte ein großer Anstieg an eGFP-positiven Zellen bei einer MOI 1 im Vergleich zu MOI 3 beobachtet werden. Die Unterschiede zwischen MOI 3, 5 und 7 fielen geringer aus. Dies deutet darauf hin, dass nur eine bestimmte

Menge an Antigen-kodierender mRNA in APC zu einem gewissen Zeitpunkt translatiert werden kann und somit jede weitere Steigerung der Menge an mRNA zu keinem signifikanten Anstieg in der Anzahl eGFP-positiver Zellen führt.

Die erhaltenen Ergebnisse zeigen deutlich, dass es möglich ist, Antigen-kodierende Nukleinsäuren mittels Hefen in APC einzuschleusen und beweisen zum ersten Mal eine Antigen-Expression resultierend aus Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“.

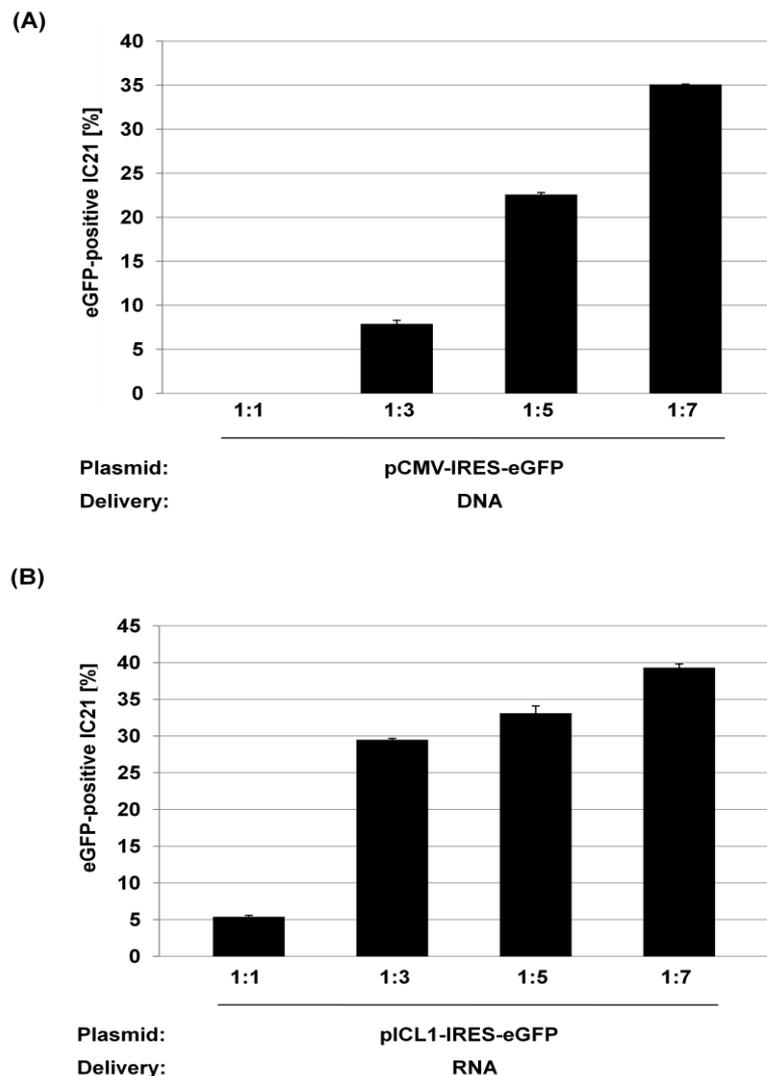


Abbildung 18: Eine steigende MOI an Hefen vermittelt eine verstärkte eGFP-Expression nach „Delivery“ eGFP-kodierender DNA und mRNA.

Murine Makrophagen wurden mit Hefezellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c, welche mit dem Expressionsvektor pCMV-IRES-eGFP (A) bzw. pICL1-IRES-eGFP (B) transformiert wurden, mit einer MOI 1 bis 7 infiziert. Nach Inkubation, 16 h bei 37°C und 5 % CO₂, wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch hinsichtlich einer eGFP-Expression mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden 30.000 Zellen im FACS analysiert.

Weiterhin wurde der Frage nachgegangen, zu welchem Zeitpunkt nach DNA- und RNA-„Delivery“ die größte Menge an eGFP in den APC nachgewiesen werden kann. Dazu muss die Hefe zunächst aufgenommen und in den Phagolysosomen verdaut werden. Die freigesetzte DNA bzw. mRNA liegt dann im Zytosol der APC vor, wo eine Translation der antigenkodierenden mRNA erfolgen kann. Die DNA muss zusätzlich in den Kern gelangen, wo es zur Bildung der Antigenkodierenden Transkripte kommt, welche folgend im Zytosol translatiert werden können.

Zur Bestimmung des Zeitpunktes, an welchem die größte Menge an exprimiertem Antigen nach DNA- und RNA-„Delivery“ in der APC vorliegt, wurden S86c Zellen verwendet, die entweder das IRES-eGFP-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotors enthielten und somit für ein „Delivery“ eGFP-kodierender DNA sorgten, oder S86c Zellen, die nach Induktion des *ICL1*-Promotors die IRES-eGFP-kodierende mRNA einbrachten. Nach Zugabe der Hefen zu 1×10^5 IC21 Zellen/ „well“ im Verhältnis IC21:Hefen von 1:7 wurden die Zellen der jeweiligen Ansätze nach vier, acht, 16, 24, 40 und 48 h geerntet, fixiert und mittels FACS-Analyse untersucht. Bereits nach acht Stunden konnte eine eGFP-Expression unabhängig von der eingebrachten Nukleinsäure nachgewiesen werden (Abb. 19). Jedoch wurde erst nach 16 h eine vollständige Aufnahme der Hefen durch die Makrophagen beobachtet, was die große Standardabweichung nach acht Stunden erklärt. Die größte Menge an exprimiertem eGFP wurde jedoch nach 16 h detektiert (pICL1-IRES-eGFP: 36 %; pCMV-IRES-eGFP: 23 %). Zu jedem späteren Zeitpunkt wurde eine verringerte eGFP Menge beobachtet, was durch einen Abbau der Hefe, der DNA oder mRNA und des exprimierten eGFPs durch die APC verursacht sein kann. Für alle folgenden Experimente, bei welchen IC21 als APC Verwendung fanden, wurden die Zellen 16 h nach Infektion mit Hefen inkubiert, bei Verwendung von humanen DC wurde eine Inkubationsdauer von acht Stunden gewählt. Eine längere Inkubation bei DC führte zum Abbau

des exprimierten eGFPs und somit zu einer geringeren Anzahl eGFP-positiver Zellen (Daten nicht gezeigt).

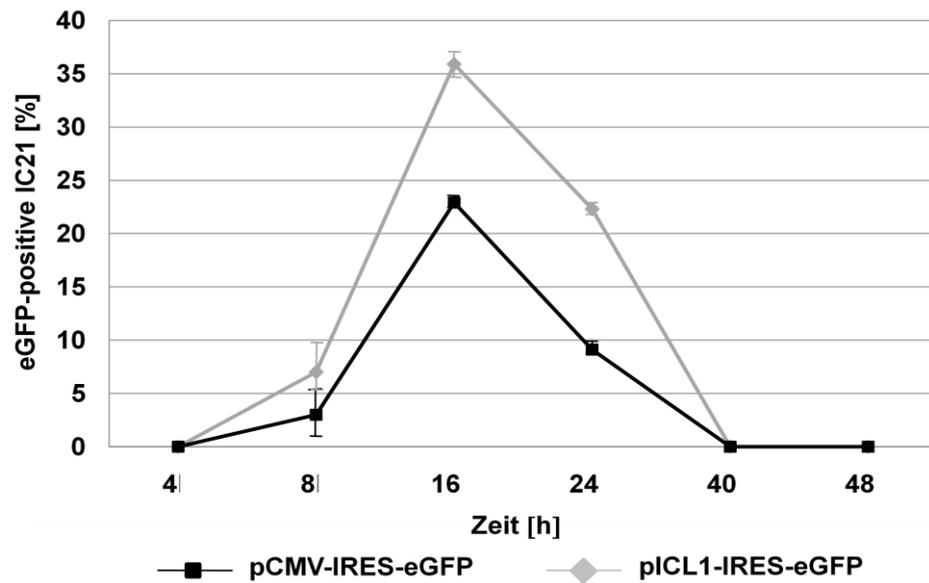


Abbildung 19: Kinetik zur Bestimmung des optimalen Zeitpunktes der eGFP-Expression in IC21 nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“.

Murine Makrophagen wurden mit Hefezellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c, welche mit dem Expressionsvektor pCMV-IRES-eGFP bzw. pICL1-IRES-eGFP transformiert wurden, mit einer MOI 7 infiziert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse hinsichtlich einer eGFP-Expression untersucht. Dazu wurden 30.000 Zellen im FACS analysiert.

Das durch die vorangegangenen Ergebnisse erhaltene „Delivery“-System für IC21 Zellen (A) und humane DC (B) ist in Abbildung 20 zusammengefasst.

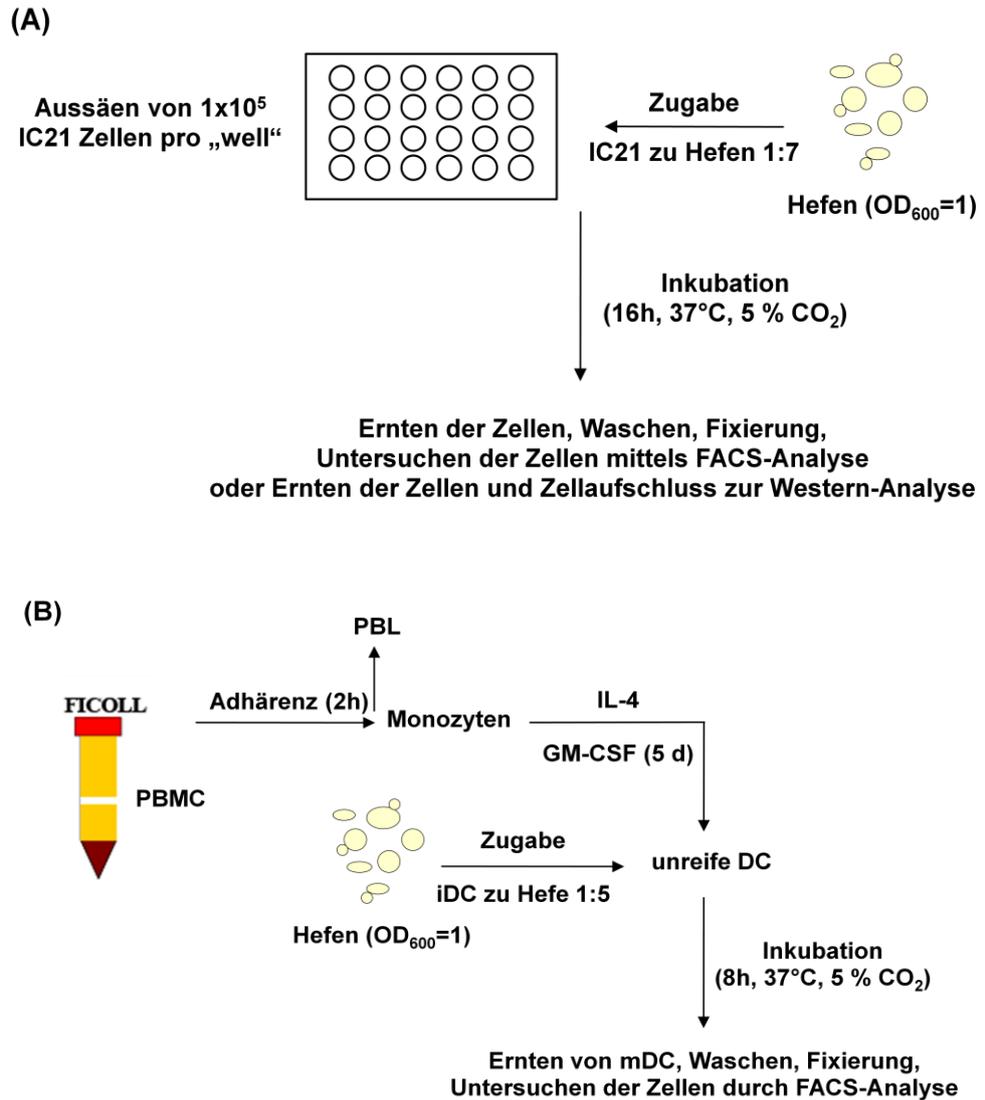


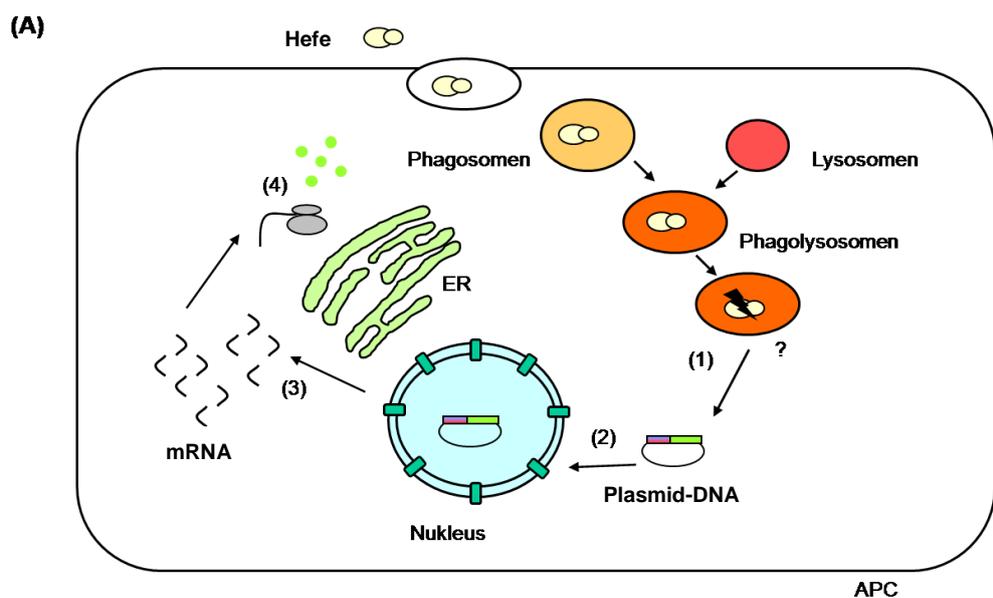
Abbildung 20: Zusammenfassende Darstellung der charakterisierten Bedingungen für ein Nukleinsäure-„Delivery“ in murine IC21-Makrophagen (A) und humane DC (B).

(A) 1×10^5 IC21 Zellen wurden in einem Milliliter Medium pro „well“ einer 24-„well“-Platte ausgesät. Sie wurden mit dem als optimal ermitteltes Verhältnis von IC21 zu Hefe von 1:7 infiziert und 16 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. 16 h später kann dann nach Ernten der Säugerzellen die größte Menge an exprimierten Antigen nachgewiesen werden. Durch Verwendung des Modellproteins eGFP können die Zellen durchflusszytometrisch untersucht werden.

(B) Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus Leukozyten-Konzentraten isoliert und mittels Adhärenz an Plastik in Monozyten und peripheren Blutlymphozyten vereinzelt. Die Monozyten wurden durch Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF zu unreifen DC differenziert. Die Zugabe der Hefen erfolgte im Verhältnis iDC zu Hefen von 1:5. Nach achtstündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet, fixiert und bei Verwendung des Modellproteins eGFP durchflusszytometrisch untersucht.

Eine schematische Darstellung des DNA- sowie des RNA-„Delivery“ Systems ist in Abbildung 21 dargestellt. Zum DNA-„Delivery“ werden Hefezellen eingesetzt, welche die Antigen-kodierende DNA unter Kontrolle von säugerzell-spezifischen viralen oder APC-spezifischen Promotoren enthalten. Eine Aktivität dieser Promotoren in Hefe konnte ausgeschlossen werden (siehe 1.2.2.). Somit gelangt die Antigen-kodierende DNA nach Aufnahme der Hefen und deren Abbau in den Phagolysosomen über einen noch unbekanntem Mechanismus ins Zytosol der APC. Für eine Expression des Antigens muss die DNA zum Ablauf der Transkription in den Zellkern gelangen, die anschließende Translation erfolgt im Zytosol der APC.

Beim RNA-„Delivery“ bringt bereits die Hefezelle die für das Antigen kodierende mRNA in die APC ein. Dabei erfolgt die Transkription in der Hefe entweder konstitutiv oder wird nach Aufnahme der Hefen in den Phagolysosomen induziert. Eine *in vivo* Induktion der verwendeten induzierbaren Promotoren konnte gezeigt werden (siehe 1.3.2.). Nach Abbau der Hefen in den Phagolysosomen gelangt die mRNA über einen noch unbekanntem Weg ins Zytosol der APC, wo die Translation des Antigens erfolgen kann.



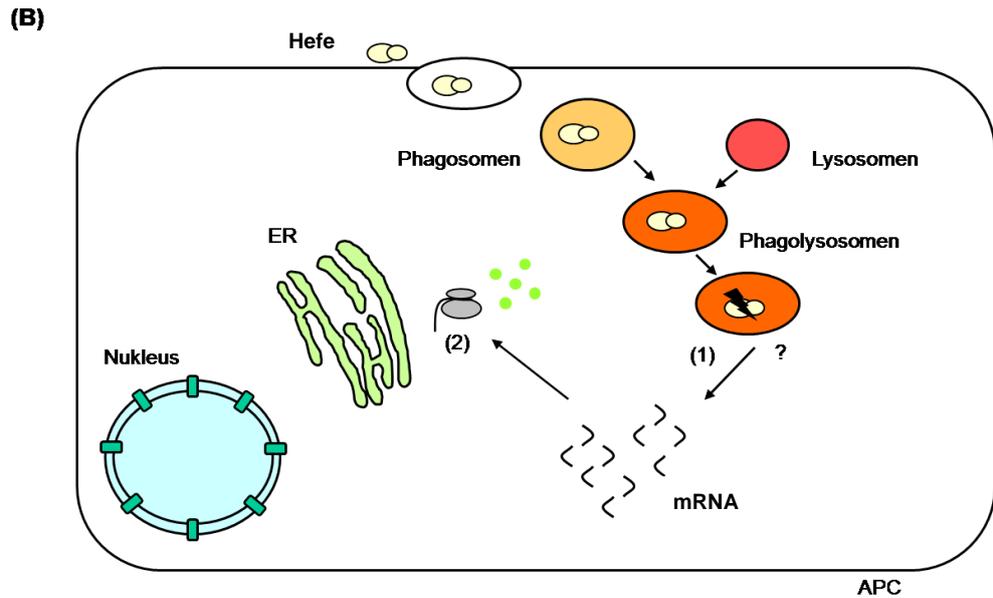


Abbildung 21: Schematische Darstellung des Hefe-vermittelten DNA- (A) und RNA-„Delivery“ (B) in APC.

(A) Nach Aufnahme der Hefen durch die APC gelangen diese in die Phagolysosomen, wo sie abgebaut werden. Die für das DNA-„Delivery“ eingesetzten Hefen enthalten die für das Antigen kodierende Sequenz unter Kontrolle von viralen oder APC-spezifischen Promotoren, für die eine Aktivität in Hefe ausgeschlossen wurde. Während des Abbaus der Hefen wird die antigenkodierende DNA freigesetzt. Über einen noch unbekanntem Mechanismus muss diese ins Zytosol der APC gelangen und zur Synthese der Antigen-kodierenden Transkripte den Zellkern erreichen (2). Die Transkripte werden aus dem Nucleus ins Zytosol transportiert (3), wo die Translation des Antigens erfolgt (4). Im Falle des hier zunächst verwendeten Modellproteins eGFP zeigen die APC nach eGFP-Expression eine grüne Fluoreszenz, welche mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden kann.

(B) Nach Aufnahme der Hefen durch die APC gelangen diese ins Phagolysosom. Die für das RNA-„Delivery“ verwendeten Hefen bringen die für das Antigen kodierenden Transkripte in die APC ein. Dabei wird in Abhängigkeit vom verwendeten Promotor zwischen einem konstitutiven RNA-„Delivery“, bei dem die Hefe die Antigen-kodierende mRNA bereits vor Aufnahme durch die APC enthält, und einem induziertem RNA-„Delivery“, wobei die Transkription erst nach Aufnahme der Hefen in den Phagolysosomen induziert wird, unterschieden. Nach Verdau der Hefe gelangt die Antigen kodierende mRNA über einen noch unbekanntem Mechanismus ins Zytosol der APC (1), wo die Translation des Antigens erfolgt (2). Im Falle des hier zunächst verwendeten Modellproteins eGFP zeigen die APC nach eGFP-Expression eine grüne Fluoreszenz, welche mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden kann.

2. Nachweis der Antigen-Expression in APC nach Hefevermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“

2.1. eGFP-Expression nach „Delivery“ von eGFP-DNA und -mRNA in murinen Makrophagen und humanen DC

Nach erfolgreicher Etablierung des Nukleinsäure-„Delivery“-Systems sollte im Folgenden der Einfluss verschiedener Parameter, wie die Verwendung verschiedener Promotoren beim RNA-„Delivery“, auf das System untersucht werden.

Nach Aufnahme der Hefen durch die APC gelangen sie in die Phago-lysosomen, wo sie durch das dort herrschende saure Milieu verdaut und abgebaut werden (Hybiske & Stephens, 2008). Die dadurch freigesetzte, Antigen-kodierende DNA und mRNA gelangt durch einen noch unbekanntem Mechanismus aus dem Phagolysosom in das Zytosol der APC. Bei einem „Delivery“ durch Listerien erreicht das Antigen-kodierende genetische Material das Zytosol der APC, da Listerien natürlicherweise Listeriolysin O exprimieren, ein Protein, welches Poren innerhalb der Membran der Phagolysosomen ausbildet (Kayal & Charbit, 2006). Weiterhin muss die DNA in den Zellkern gelangen, um die Herstellung Antigen-kodierender mRNA zu gewährleisten. Diese werden im Anschluss im Zytosol der APC translatiert, wie auch die eingebrachte Antigen-kodierende mRNA.

Als Reporterprotein wurde eGFP eingesetzt, welches unter Kontrolle der verschiedenen Promotoren für DNA- und RNA-„Delivery“ steht. eGFP ist eine zur Expression in Säugerzellen kodonoptimierte Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) aus der Qualle *Aequorea victoria*. Weiterhin weist eGFP durch den Austausch einzelner Aminosäuren eine verstärkte Fluoreszenzintensität auf. Das Absorptionsmaximum des 29 kDa großen Proteins liegt bei 470 nm, sein Emissionsmaximum bei 507 nm (Shimomura et al., 1962; Shaner et al., 2005).

Für eine effiziente Expression in Säugerzellen wurde die IRES-Sequenz des *Encephalomyocarditis* Virus an das 5' Ende des eGFP Gens wie unter 1.3.3. beschrieben angefügt. Die IRES-EGFP Fusion wurde als *XhoI/BglII* Fragment in die Expressionsvektoren pCMV, pICL1, pMLS1 und pPGK (siehe 1.2.1. und 1.3.1.) einkloniert (Abb. 22).

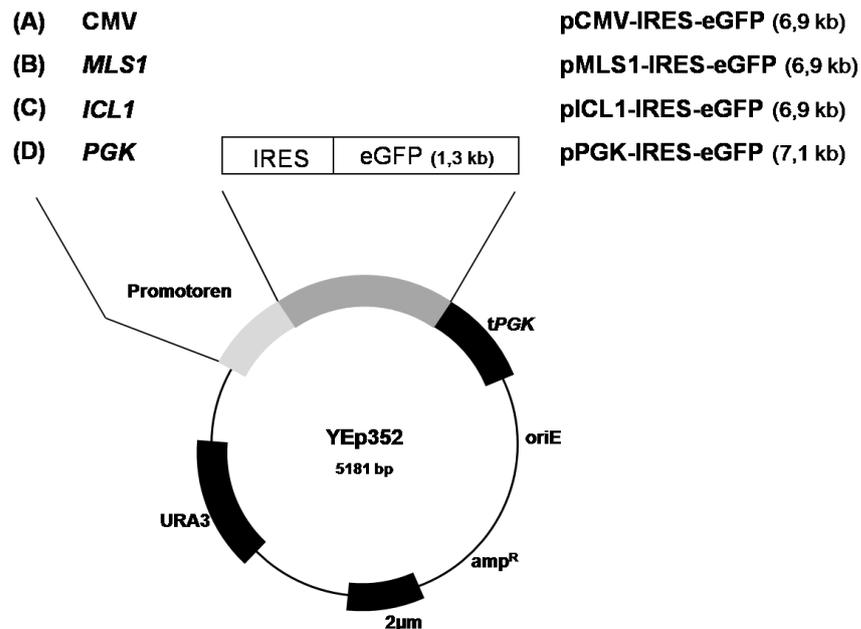


Abbildung 22: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pCMV-IRES-eGFP, pMLS1-IRES-eGFP, pICL1-IRES-eGFP und pPGK-IRES-eGFP.

Die Vektoren enthalten die Sequenz der IRES-eGFP Fusion sowie die Sequenz des CMV-Promotors (A), des *MLS1*-Promotors (Promotor der Malat-Synthase) (B), des *ICL1*-Promotors (Promotor der Isocitrat-Lyase) (C) und des *PGK*-Promotors (Promotor der Phosphoglyceratkinase) (D) sowie die des *PGK*-Transkriptionsterminators (*tPGK*) der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der IRES-eGFP Sequenz als *XhoI/BglII* Fragment.

Ein „Delivery“ und eine anschließende eGFP-Expression wurden in murinen Makrophagen und humanen DC untersucht, wobei für den Versuch die unter 1.4. charakterisierten Bedingungen Verwendung fanden. Zum Einsatz kamen Hefen, welche mit den Expressionsvektoren pCMV-IRES-eGFP, pMLS1-IRES-eGFP, pICL1-IRES-eGFP oder pPGK-IRES-eGFP transformiert wurden. Die Hefezellen wurden zu den murinen Makrophagen im Verhältnis IC21:Hefe von 1:7, zu den DC im Verhältnis DC:Hefe von 1:5 gegeben. Nach Inkubation von 16 h

(IC21 Zellen) bzw. acht Stunden (DC) wurden die Zellen geerntet, fixiert und zur FACS-Analyse eingesetzt.

Abbildung 23 zeigt, dass sowohl nach Einbringen eGFP-kodierender DNA als auch mRNA mittels Hefe eine eGFP-Expression nachgewiesen werden konnte. In murinen IC21 wurden nach DNA-„Delivery“ 30 % eGFP-positive IC21 erhalten. Im Vergleich dazu verlief ein RNA-„Delivery“ noch effektiver; hierbei konnten zwischen 30 und 42 % eGFP-positive IC21 detektiert werden. Dabei wurden beim Ansatz des Promotors der Isocitrat-Lyase 42 % eGFP-positive Zellen im Vergleich zum *MLS1*-Promotor mit 37 % und dem *PGK*-Promotor mit 31 % erhalten. Somit ist eine konstitutive Bildung Antigen-kodierender mRNA in den Hefen vor Aufnahme durch IC21 Zellen weniger effektiv für ein RNA-„Delivery“ als eine induzierte mRNA Transkription nach Aufnahme der Hefezellen. Ein Unterschied hinsichtlich der Effizienz der Antigenexpression zwischen den induzierbaren Promotoren konnte im Falle der IC21 nicht beobachtet werden.

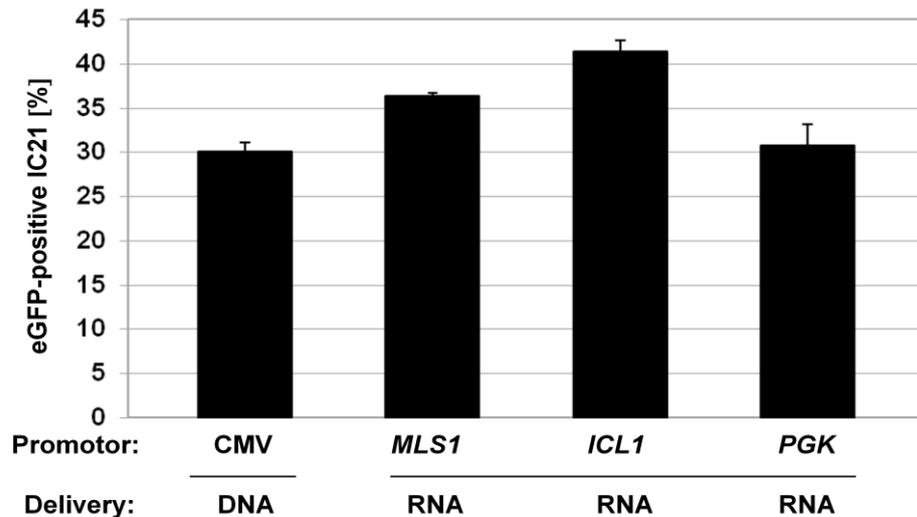


Abbildung 23: Vergleich verschiedener Promotoren hinsichtlich einer eGFP-Expression in IC21-Zellen nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“.

Murine Makrophagen wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 7 infiziert. Die Hefen enthielten für ein DNA-„Delivery“ den Expressionsvektor pCMV-IRES-eGFP bzw. für ein RNA-„Delivery“ die Expressionsvektoren pMLS1-IRES-eGFP, pICL1-IRES-eGFP und pPGK-IRES-eGFP. Zum Nachweis einer eGFP-Expression in IC21-Zellen wurden die Proben durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden 30.000 Zellen analysiert.

Um ein „Delivery“ unter „*in vivo*“-Bedingungen zu simulieren, wurde die eGFP-kodierende DNA bzw. mRNA mittels Hefe auch in humane DC eingebracht. In Abbildung 24 sind die Ergebnisse von vier unabhängigen Spendern und die ermittelten Median-Werte dargestellt, die eine eGFP-Expression in humanen DC belegen. Nach DNA-„Delivery“ wurde ein Median-Wert von 17 % eGFP-positiver DC erhalten. Nach RNA-„Delivery“ erwies sich der *MLS1*-Promotor als stärkster Promotor, obwohl er in humanen DC später und schwächer induziert wird als der *ICL1*-Promotor (vgl. Abb. 14). Hierbei wurde ein Median-Wert von 20 % eGFP-positiver humaner DC erreicht. Bei den Ansätzen von *ICL1*- und *PGK*-Promotor wurde ein Median-Wert von 12 % erhalten.

Diese Ergebnisse unterstreichen das Potenzial der Hefe als effektives Vehikel zur Antigen-Expression in Säugerzellen. Sowohl in murinen Makrophagen als auch in humanen DC ist sie somit als „Carrier“ für Antigen-kodierende DNA und mRNA einsetzbar. Das etablierte Nukleinsäure-„Delivery“-System vermittelt eindeutig eine Antigen-Expression in Säuger-APC.

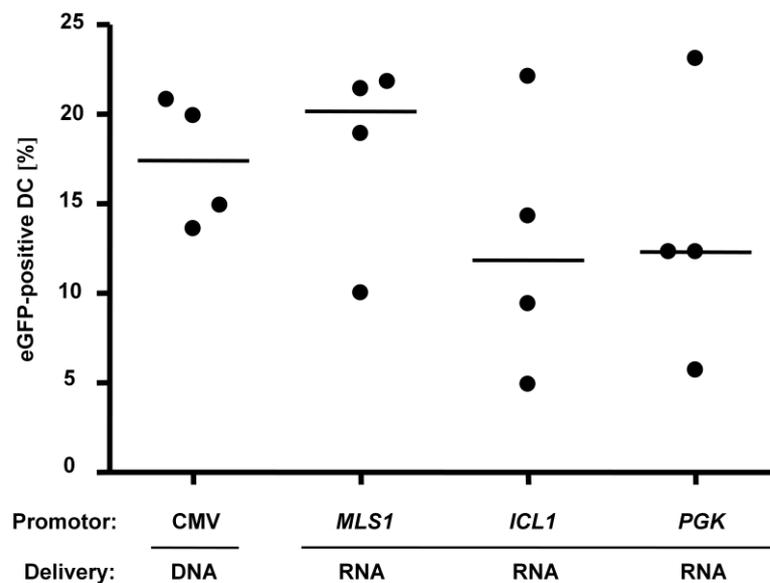
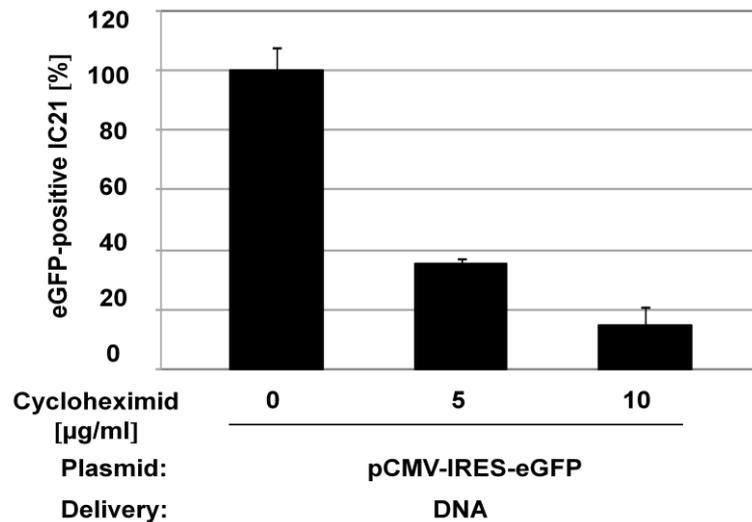


Abbildung 24: Vergleich verschiedener Promotoren hinsichtlich einer eGFP-Expression in humanen DC nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“. Humane DC wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 5 infiziert. Die Hefen enthielten für ein DNA-„Delivery“ den Expressionsvektor pCMV-IRES-eGFP bzw. für ein RNA-„Delivery“ die Expressionsvektoren pMLS1-IRES-eGFP, pICL1-IRES-eGFP und pPGK-IRES-eGFP. Zum Nachweis einer eGFP-Expression in den humanen DC wurden die Proben durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden 30.000 Zellen analysiert.

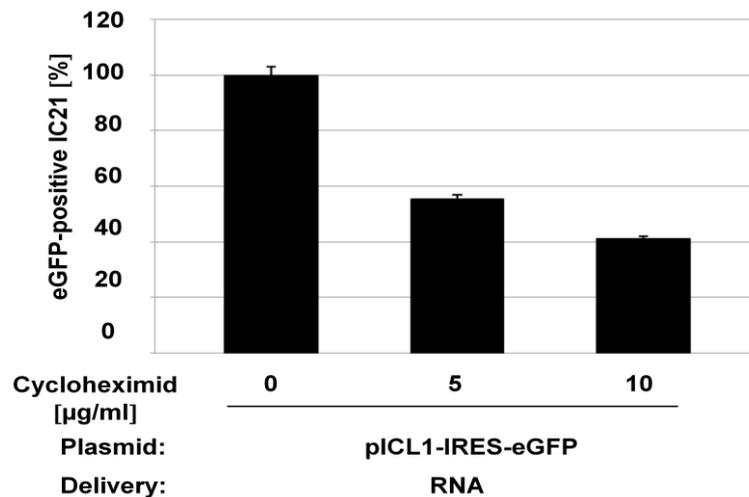
Um einen zusätzlichen Beweis zu liefern, dass die Translation der Antigene nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“ in den APC erfolgt, sollte diese durch Verwendung von Cycloheximid unterdrückt werden. Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches von Streptomyceten (*Streptomyces griseus*) produziert wird. Es wirkt als Translationshemmer bei Eukaryonten durch Unterbinden der Proteinsynthese (Obrig et al., 1971). Für diesen Versuch wurden Hefen verwendet, die IRES-eGFP-kodierende DNA unter Kontrolle des CMV-Promotors und IRES-eGFP-Transkripte unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors in murine IC21 einbringen. Unter Verwendung der von Schoen und Mitarbeitern beschriebenen Konzentration an Cycloheximid von 50 µg / ml (Schoen et al., 2005) blieb eine Aufnahme der Hefezellen durch die Makrophagen aus. Aus diesem Grund musste die Cycloheximidkonzentration soweit austitriert werden, dass noch eine Aufnahme der Hefen erfolgte, aber gleichzeitig noch eine Hemmung der Translation untersucht

werden konnte. Es wurden schließlich Cycloheximidkonzentrationen von 5 µg / ml und 10 µg / ml verwendet; bei einer Konzentration größer als 10 µg / ml blieb eine Aufnahme der Hefen durch die Makrophagen aus. Durch die Zugabe von Cycloheximid konnte die eGFP-Translation nach DNA- und RNA-„Delivery“ in murinen Makrophagen IC21 gehemmt werden (Abb. 25 A und B).

(A)



(B)



**Abbildung 25: Hemmung der eGFP-Translation in IC21 Zellen nach Hefe-
vermitteltem DNA- (A) und RNA-„Delivery“ (B) durch Zugabe von Cycloheximid.** Murine Makrophagen wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 7 infiziert. Die Hefezellen wurden mit den Expressionsvektoren pCMV-IRES-eGFP (A) bzw. pICL1-IRES-eGFP (B) transformiert. Zur Hemmung der eGFP-Expression wurde Cycloheximid in steigender Konzentration von 5 µg / ml und 10 µg / ml zugegeben. Die Proben wurden hinsichtlich einer eGFP-Expression durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden 30.000 Zellen analysiert.

Mit steigender Cycloheximidkonzentration konnte die Anzahl eGFP-positiver IC21-Zellen bis zu 59 % nach RNA-„Delivery“ (Abb.25 B) und bis zu 88 % nach DNA-„Delivery“ (Abb. 25 A) reduziert werden. Somit wurde gezeigt, dass die Translation von Antigenen nach Hefe-vermitteltem DNA und RNA-„Delivery“ zusammen mit den Ergebnissen aus 1.3.3., wobei eine Translation in der Hefe durch Einsatz einer viralen IRES-Sequenz unterbunden werden konnte, nach Zugabe der Hefen ausschließlich in den APC erfolgt. Um einen weiteren Beweis, neben der Inaktivität der zum DNA-„Delivery“ eingesetzten Promotoren in Hefe, zu liefern, dass die Transkription nach DNA-„Delivery“ ebenfalls innerhalb der APC verläuft, müssten Transkriptioninhibitoren wie α -Amanitin eingesetzt werden, ein Hemmstoff der eukaryotischen RNA-Polymerase II (Somers et al., 1975; Lin et al., 2001). Jedoch sind solche Untersuchungen hier nicht möglich, da die Hefe selbst ein Eukaryont ist, wodurch eine genaue Lokalisierung des Ortes der Transkription im Gegensatz zu bakteriellen „Delivery“-Systemen nicht möglich ist.

2.2. Untersuchungen zum Einsatz von Ovalbumin als Antigen im Hefe-basierten „Delivery“-System

Zur Untersuchung der Expression weiterer Antigene in APC nach DNA- und RNA-„Delivery“ sollte nach Etablierung des Systems durch Verwendung des Modelproteins eGFP auch das in der immunologischen Forschung etablierte Protein Ovalbumin verwendet werden. Ovalbumin ist ein Glykoprotein mit einer Größe von 45 kDa, welches ein internes Signalpeptid besitzt, wodurch das Einschleusen des Proteins in den Sekretionsweg eukaryotischer Zellen gewährleistet wird (Tabe et al., 1984). Sekretorische Proteine werden im Allgemeinen jedoch weniger effektiv im Kontext mit MHC I-Molekülen präsentiert. Aus diesem Grund wurde zusätzlich eine zytosolische Ovalbumin-Variante hergestellt, welcher das interne Sekretionssignal fehlt (Ovacyt)

(Loeffler et al., 2006). Für diese verkürzte Ovalbumin Form, die durch das Fehlen eines Sekretionssignales innerhalb der Zelle verbleibt, wurde eine stärkere CD8⁺ T-Zell-aktivierung im Vergleich zum natürlichen Ovalbumin beschrieben (Rush et al., 2002). Ovalbumin enthält ein H-2K^b restringiertes Epitop (Ova 257-264, SIINFEKL), welches zur Aktivierung Ovalbumin-spezifischer CD8⁺ T-Zelllinien führt (Schoen et al., 2005).

Ovalbumin und die Ovacyt Variante wurde mittels der Primer 5`Ova und 3`Ova unter Verwendung der Matrize pSPO-pCMV-Ovalbumin für Ovalbumin und pFLO-IREScytova für Ovacyt hergestellt. Dabei wurde an das 5`Ende die Sequenz der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI*, an das 3`Ende die von *BglII* und *SalI* angefügt. Zur Sequenzierung wurden beide Varianten in pYES2.1/V5-His-TOPO zwischenkloniert.

2.2.1. Heterologe Expression verschiedener Ovalbumin Varianten in *S. cerevisiae*

Als Positivkontrolle im etablierten Nukleinsäure-„Delivery“-System sollten Hefen verwendet werden, welche beide Ovalbumin Varianten heterolog exprimieren und somit ein Protein-„Delivery“ vermitteln. Dazu wurden Ovalbumin und Ovacyt als *XhoI/BglII* Fragment in den Expressionsvektor pPGK einkloniert (Abb. 26).

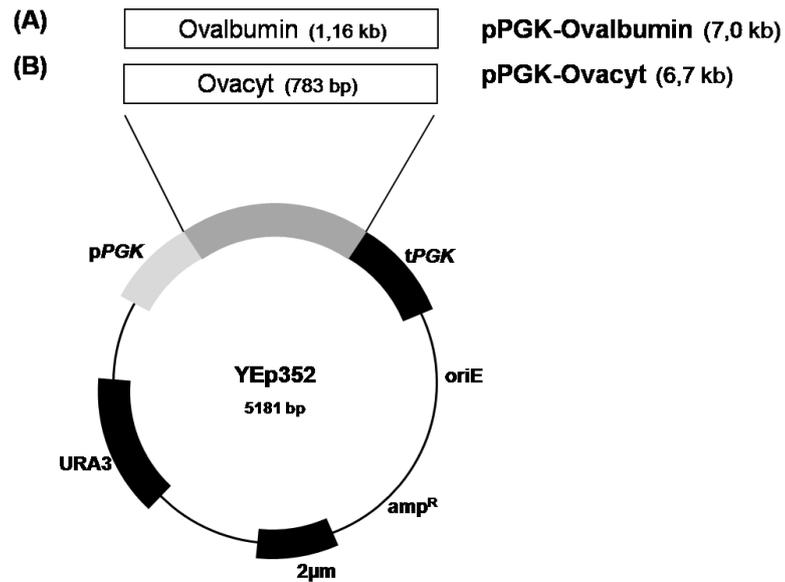


Abbildung 26: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pPGK-Ovalbumin und pPGK-Ovacyt.

Die Vektoren enthalten die Sequenz von Ovalbumin (A) und Ovacyt (B) und die Sequenz des *PGK*-Promotors sowie des *PGK*-Transkriptionsterminators (*tPGK*) der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der Ovalbumin- bzw. Ovacyt-Sequenz als *Xho*I/*Bgl*II Fragment.

Die unter Kontrolle des konstitutiven *PGK*-Promotors verlaufende Expression von Ovalbumin und Ovacyt sollte durch Western-Analyse mittels polyklonaler anti-Ovalbumin Antikörper nachgewiesen werden. Dazu wurde der *S. cerevisiae* Stamm S86c mit den Expressionsvektoren pPGK-Ovalbumin und pPGK-Ovacyt transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden in *ura* d/o Glukose Medium drei Tage bei 30°C angezogen und zu jeweils 3×10^8 Zellen zu einem S80-Zellaufschluss eingesetzt. Als Negativkontrolle diente ein Zellaufschluss von S86c Zellen, die mit dem Leervektor YEp352 transformiert wurden. Die in Abb. 27 dargestellte Western-Analyse zeigt, dass S86c sowohl das Vollängen-Ovalbumin (42 kDa) als auch die verkürzte zytosolische Ovalbumin Form Ovacyt (27 kDa) exprimiert. In der Negativkontrolle (Spur 6) wurde keine Bande erhalten. Ovacyt konnte, wie zu erwarten, nur in der Probe des Zellaufschlusses (Spur 2) und nicht im Überstand (Spur 3) nachgewiesen werden. Das im Vollängen Ovalbumin enthaltene Huhn-spezifische Sekretionssignal scheint auch einen Eintritt in den Sekretionsweg zu vermitteln. So konnte Ovalbumin nicht

nur in der Probe des Zellaufschlusses (Spur 4), sondern auch im Überstand (Spur 5) nachgewiesen werden.

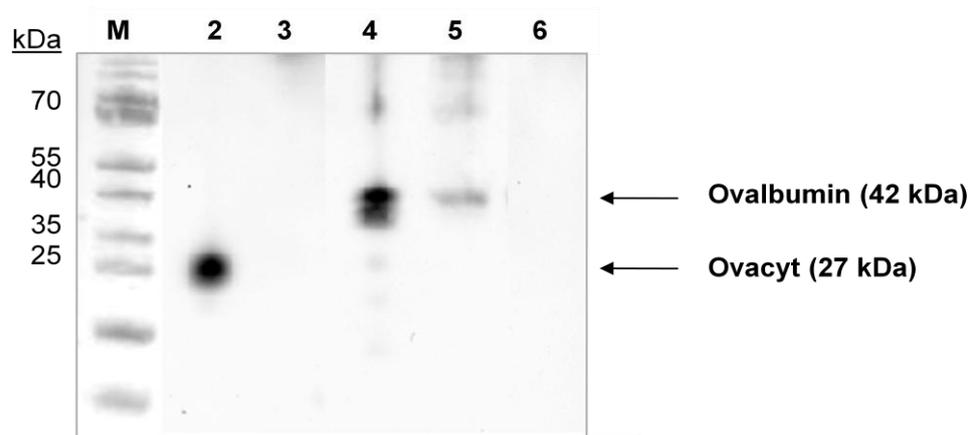


Abbildung 27: Western-Analyse zum Nachweis der Expression von Ovalbumin und Ovacyt in *S. cerevisiae*.

Mit 3×10^8 Zellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c wurden nach Transformation mit den Expressionsvektoren pPGK-Ovalbumin bzw. pPGK-Ovacyt ein S80-Zellaufschluss durchgeführt. 30 μ l des jeweiligen Zellaufschlusses sowie der gefällten Überstände wurden zur Western-Analyse eingesetzt. Der Nachweis der Ovalbumin-Expression erfolgte mittels polyklonaler anti-Ovalbumin Antikörper (1:5.000) [Spur 1: Proteinstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fa. Fermentas); Spur 2: pPGK-Ovacyt Zellextrakt; Spur 3: pPGK-Ovacyt Überstand; Spur 4: pPGK-Ovalbumin Zellextrakt; Spur 5: pPGK-Ovalbumin Überstand; Spur 6: Zellextrakt YEP352 Leervektor Negativkontrolle].

2.2.2. „Delivery“ von rekombinant in Hefe exprimiertem Ovacyt sowie Ovacyt-kodierender DNA und mRNA in APC

Zum „Delivery“ Ovalbumin-kodierender DNA und mRNA wurde im Hinblick auf eine später erwünschte CD8⁺ T-Zellaktivierung nur die verkürzte zytosolische Ovalbumin Variante Ovacyt verwendet. Für diese ist eine Präsentation des Ovalbumin Epitops SIINFEKL in MHC I-Komplexen mit anschließender Aktivierung CD8 spezifischer T-Zellen nach „Delivery“ Ovalbumin-kodierender mRNA durch Listerien beschrieben (Schoen et al., 2005). Zur Gewährleistung eines RNA-„Delivery“ (siehe 1.3.3.) und zur verstärkten Expression von Ovacyt in Säugerzellen, wurde die IRES Sequenz mittels SOE-PCR stromauf-

wärts an die Ovacyt Sequenz fusioniert und in die entsprechenden Expressionsvektoren (siehe 1.2.1. und 1.3.1.) kloniert (Abb. 28).

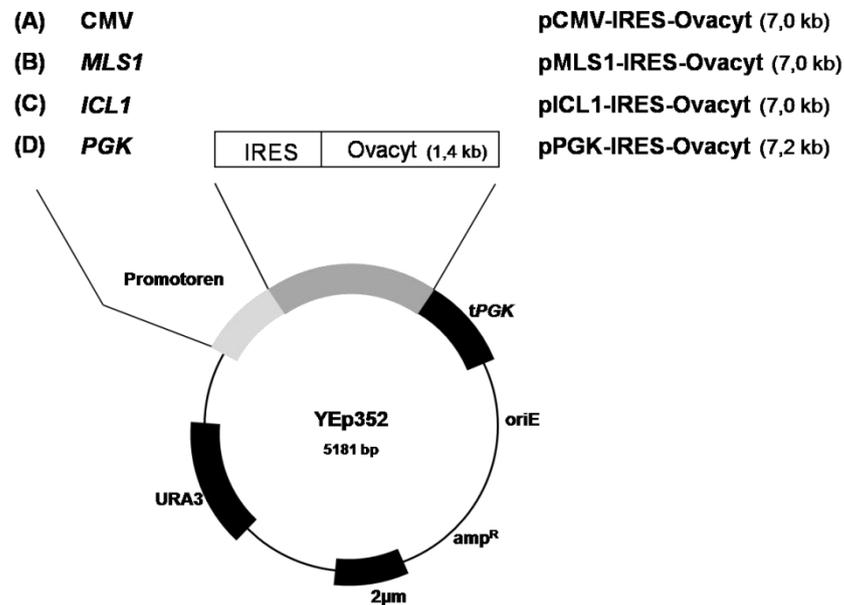


Abbildung 28: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pCMV-IRES-Ovacyt, pMLS1-IRES-Ovacyt, piCL1-IRES-Ovacyt und pPGK-IRES-Ovacyt.

Die Vektoren enthalten die Sequenz der IRES-Ovacyt Fusion sowie die Sequenz des CMV-Promotors (A), des *MLS1*-Promotors (Promotor der Malat-Synthase) (B), des *ICL1*-Promotors (Promotor der Isocitrat-Lyase) (C) und des *PGK*-Promotors (Promotor der Phosphoglyceratkinase) (D) sowie die des *PGK*-Transkriptionsterminators (*tPGK*) der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der IRES-Ovacyt Sequenz als *XhoI/BglII* Fragment.

Das „Delivery“ und die anschließende Ovacyt-Expression wurde in murinen Makrophagen untersucht, wobei für den Versuch die unter 1.4. charakterisierten Bedingungen Anwendung fanden. Zum Einsatz kamen Hefen, welche mit den Expressionsvektoren pCMV-IRES-Ovacyt, pMLS1-IRES-Ovacyt, piCL1-IRES-Ovacyt oder pPGK-IRES-Ovacyt transformiert wurden. Als Positivkontrolle wurden Hefen mitgeführt, welche mit dem Expressionsvektor pPGK-Ovacyt transformiert wurden und somit ein Protein-„Delivery“ vermitteln. 1×10^6 IC21 Zellen wurden mit Hefen infiziert (MOI 7), 16 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss ein Zellaufschluss mittels RIPA-Puffer durchgeführt. 30 µl der erhaltenen Zellextrakte wurden zur Western-Analyse eingesetzt und die Expression von Ovacyt in den Säugerzellen nach DNA- und RNA-

„Delivery“ mittels polyklonalen anti-Ovalbumin Antikörpern detektiert. Die Ergebnisse der Western-Analyse (Abb. 29) zeigten eine starke Expression der zytosolischen Ovalbumin Variante bei 27 kDa nach DNA- und RNA-„Delivery“. Dieser Nachweis erwies sich als spezifische Ovacyt Detektion, da keine Bande in der Probe der Negativkontrolle (Spur 2) zu erkennen war, bei der IC21 mit Hefen infiziert wurden, die nur den Leervektor YEp352 enthielten. Nach Protein-„Delivery“ von heterolog in Hefe exprimiertem Ovacyt in IC21-Zellen zeigte die Probe in Spur 3 auch die 27 kDa Bande des zytosolischen Ovalbumins, aber auch eine etwas kleinere Bande bei ~ 20 kDa, welche auf einen Abbau des Ovalbumin nach Verdau der Hefen in den IC21-Zellen schließen lässt. Nach DNA-„Delivery“ (Spur 4) wie auch nach RNA-„Delivery“ (Spur 5, 6 und 7) erfolgte die Expression von Ovacyt in den Säugerkzellen und konnte eindeutig in der erwarteten Größe von 27 kDa nachgewiesen werden. Eine Aussage über die exprimierte Proteinmenge oder Vergleiche hinsichtlich der Effektivität der unterschiedlichen Promotoren konnte für diese Western-Analyse nicht getroffen werden. Somit konnte, nach Nachweis einer eGFP-Expression, durch den Nachweis der Ovacyt-Expression nach DNA- und RNA-„Delivery“ ein zusätzlicher Beweis erbracht werden, der die Effektivität der Hefe als Vehikel für Nukleinsäuren untermauert und die anschließende Expression verschiedener Proteine in APC erlaubt.

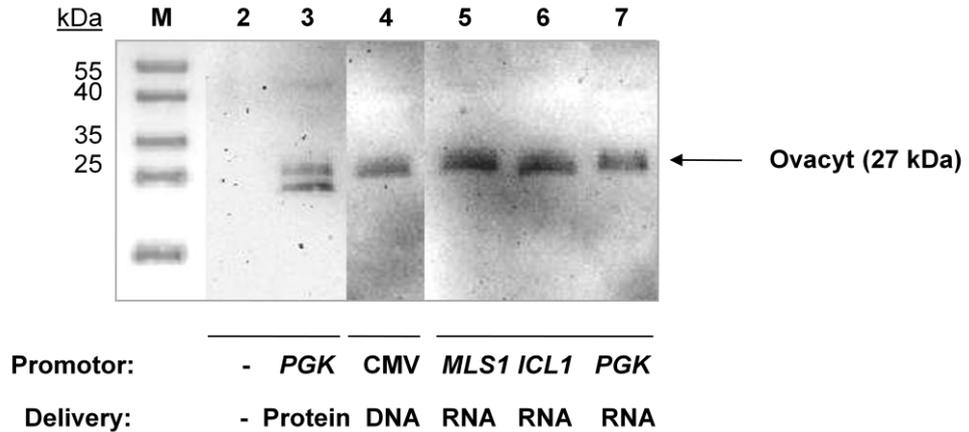


Abbildung 29: Western-Analyse zum Nachweis der Ovacyt-Expression nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“ in murinen IC21-Makrophagen.

1 x 10⁶ murine Makrophagen wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 7 infiziert. Die Hefen enthielten die Plasmide pCMV-IRES-Ovacyt, pMLS1-IRES-Ovacyt, pICL1-IRES-Ovacyt oder pPGK-IRES-Ovacyt. Als Negativkontrolle dienten mit dem Leervektor YEp352 transformierte Hefen. Zum Protein-„Delivery“ wurden Hefen eingesetzt, die das Plasmid pPGK-Ovacyt enthielten. Nach Aufnahme der Hefen wurden die IC21 geerntet und mittels RIPA-Puffer aufgeschlossen. 30 µl der erhaltenen Zellextrakte wurden zur Western-Analyse eingesetzt, die Detektion von Ovacyt erfolgte mittels polyklonaler anti-Ovalbumin Antikörpern [Spur 1: Proteinstandard PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fa. Fermentas); Spur 2: YEp352, Leervektor; Spur 3:pPGK-Ovacyt, Protein-„Delivery“; Spur 4: pCMV-IRES-Ovacyt, DNA-Delivery“, Spur 5: pMLS1-IRES-Ovacyt, RNA-„Delivery“; Spur 6: pICL1-IRES-Ovacyt, RNA-„Delivery“; Spur 7: pPGK-IRES-Ovacyt, RNA-„Delivery“].

3. Optimierung des „Delivery“-Systems

Nach der erfolgreichen Etablierung werden in diesem Kapitel Versuche zur Optimierung des durch Hefe vermittelten „Delivery“-Systems vorgestellt. Neben der Verwendung weiterer Promotoren für das DNA-„Delivery“ wurden Ansätze zur Steigerung der Antigenexpression in Antigen-präsentierenden Zellen untersucht. Zudem sollte in einem weiteren Optimierungsansatz die Translokation der DNA und mRNA aus dem Phagolysosom ins Zytosol der APC durch Koexpression porenbildender Proteine verbessert werden.

3.1. Optimierung des DNA-„Delivery“ durch Verwendung der APC-spezifischen Promotoren DC-STAMP und Fascin

Zur Expression von Antigenen nach DNA-„Delivery“ wurden neben dem für viele Säugerzellen einsetzbaren CMV-Promotor die APC-spezifischen Promotoren von DC-STAMP und Fascin verwendet, um eine Antigen-Expression in APC zu verbessern. Die Aktivität des murinen DC-STAMP-Promotors ist bevorzugt für DC beschrieben (Eleveld-Trancikova et al., 2005; Hartgers et al., 2000), die des humanen Fascin-Promotors ausschließlich für reife DC (Ross et al., 2003). Die eGFP-Expression unter Kontrolle des DC-STAMP- und Fascin-Promotors nach DNA-„Delivery“ mittels Hefe sollte in humanen DC untersucht und mit der durch den CMV-Promotor gesteuerten eGFP-Expression verglichen werden. Durch das Anfügen der viralen IRES-Sequenz an das 5` Ende der Antigensequenz soll die Translation in Säugerzellen effizienter verlaufen (Clontech, Palo Alto, CA, Schoen et al., 2005). Deshalb wurde versucht, die Effizienz der eGFP-Expression nach DNA-„Delivery“ durch Fusion der eGFP-Sequenz mit der IRES-Sequenz zu steigern. Für ein RNA-„Delivery“ ist diese Fusion zur Blockierung der Translation in Hefezellen nötig, ein DNA-„Delivery“ sollte auch ohne

virale IRES-Sequenz, wenn auch ineffizienter, erfolgen. Dazu wurde die IRES-eGFP Fusion als *XhoI/BglII* Fragment in die Expressionsvektoren pDC-STAMP und pFascin (siehe 1.2.1.) inkloniert (Abb. 30). Das Plasmid pCMV-IRES-eGFP lag bereits vor (siehe 2.1.).

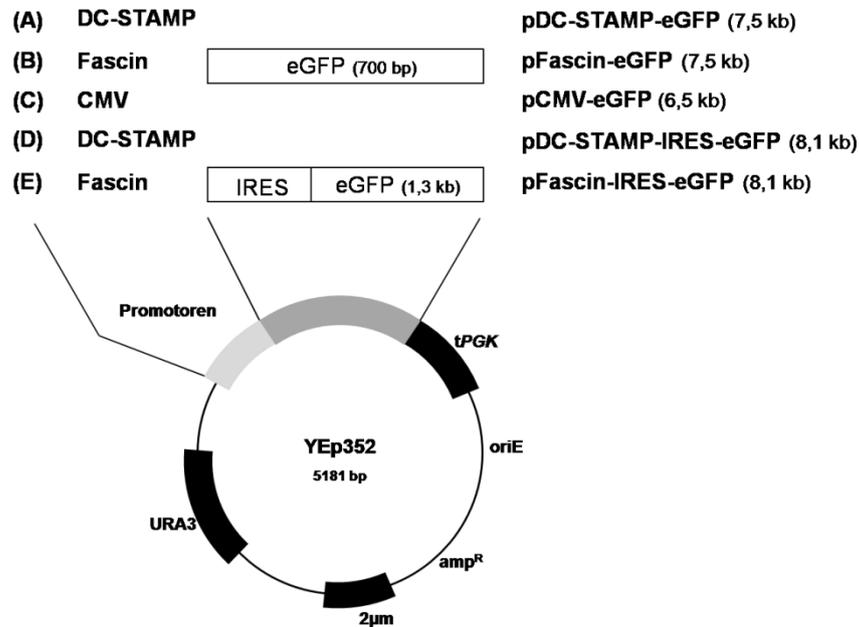


Abbildung 30: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pDC-STAMP-eGFP, pFascin-eGFP, pCMV-eGFP, pDC-STAMP-IRES-eGFP und pFascin-IRES-eGFP.

Die Vektoren enthalten die Sequenz des eGFP-Gens bzw. der IRES-eGFP Fusion sowie die Sequenz des DC-STAMP-Promotors (A) und (D), des Fascin-Promotors (B) und (E) und des CMV-Promotors (C) sowie die des *PGK*-Transkriptionsterminators (*tPGK*) der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der eGFP-bzw. IRES-eGFP Sequenz als *XhoI/BglII* Fragment.

Das eGFP-Gen und die IRES-eGFP Fusion wurden unter Kontrolle von pCMV, pDC-STAMP und pFascin mittels Hefe in humane DC eingebracht und die resultierende eGFP-Expression mittels FACS-Analyse detektiert. Dargestellt sind die repräsentativen Ergebnisse eines Spenders (Abb. 31). Nach DNA-„Delivery“ und anschließender eGFP-Expression unter Kontrolle von pDC-STAMP konnten 8 % eGFP-positive humane DC detektiert werden. Somit ist der Promotor von DC-STAMP annähernd so effektiv wie der CMV-Promotor, bei welchem 9 % eGFP-positive humane DC nachgewiesen wurden. Durch die Verwendung einer viralen IRES-Sequenz konnte die eGFP-Expression in den

humanen DC gesteigert werden. Stand die IRES-eGFP Fusion unter Kontrolle des CMV-Promotors, konnten 20 % eGFP-positive DC nachgewiesen werden, im Falle des DC-STAMP-Promotors 19 %. Somit wurde die Expressionseffizienz des Antigens durch die IRES-Sequenz um 100 % gesteigert. Eine Aktivität des Fascin-Promotors für humane DC konnte auch nach Testen von DC dreier unabhängiger Spender nicht gezeigt werden.

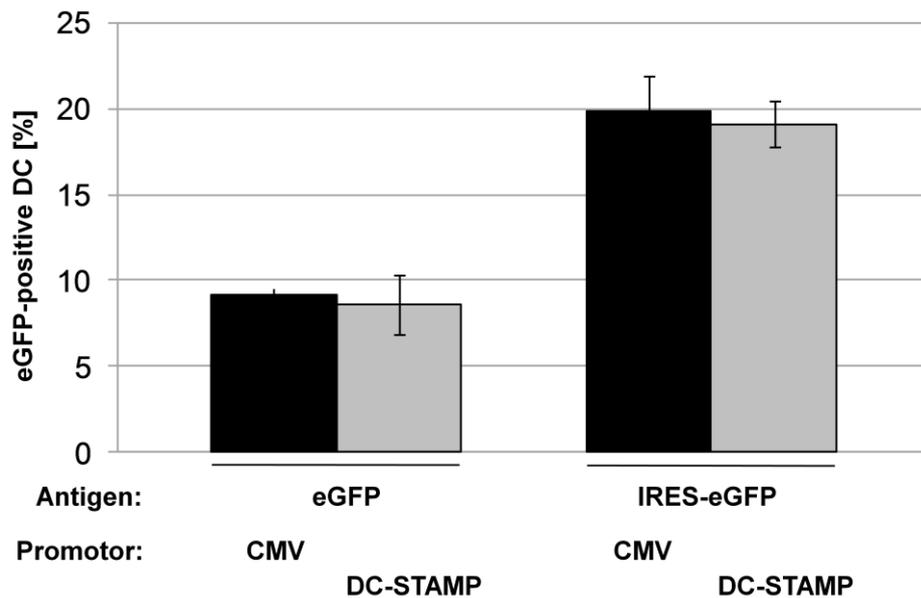


Abbildung 31: eGFP-Expression nach Hefe-vermitteltem DNA-„Delivery“ unter Kontrolle des CMV- und DC-STAMP-Promotors in humanen DC.

Humane DC wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 5 infiziert. Die Hefen enthielten die Expressionsvektoren pCMV-eGFP, pDC-STAMP-eGFP, pCMV-IRES-eGFP oder pDC-STAMP-IRES-eGFP. Zum Nachweis einer eGFP-Expression wurden die Proben durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Es wurden 30.000 Zellen analysiert.

Für den murinen DC-STAMP-Promotor ist eine Aktivität bevorzugt in DC beschrieben ((Eleveld-Trancikova et al., 2005; Hartgers et al., 2000). Für den Promotor des humanen Fascins wurde eine Aktivität nur für DC publiziert (Ross et al., 2003). Beide Promotoren wurden dennoch hinsichtlich ihrer Aktivität nach DNA-„Delivery“ in IC21-Makrophagen untersucht und mit dem CMV-Promotor verglichen. Beide Promotoren vermitteln eine eGFP-Expression in IC21-Zellen

(CMV: 10,3 %, DC-STAMP: 2,4 %, Fascin: 8,8 %) (Abb. 32). Auch in den Makrophagen IC21 führt die IRES-Sequenz zu einer verstärkten eGFP-Expression. Für den murinen DC-STAMP-Promotor wurden hierbei 41,5 % eGFP-positive IC21 nachgewiesen, für den humanen Fascin-Promotor 38,2 %. Im Vergleich zum viralen CMV-Promotor (30,5 %) induzierten beide eine stärkere eGFP-Expression in murinen Makrophagen. Die eGFP-Expression wurde durch die IRES-Sequenz unter Kontrolle des CMV-Promotors um das Dreifache, bei DC-STAMP um das 17-fache und bei Fascin um das Achtfache gesteigert. Somit sind alle drei Promotoren für ein DNA-„Delivery“ mit anschließender Antigen-Expression in IC21-Zellen und in humanen DC geeignet.

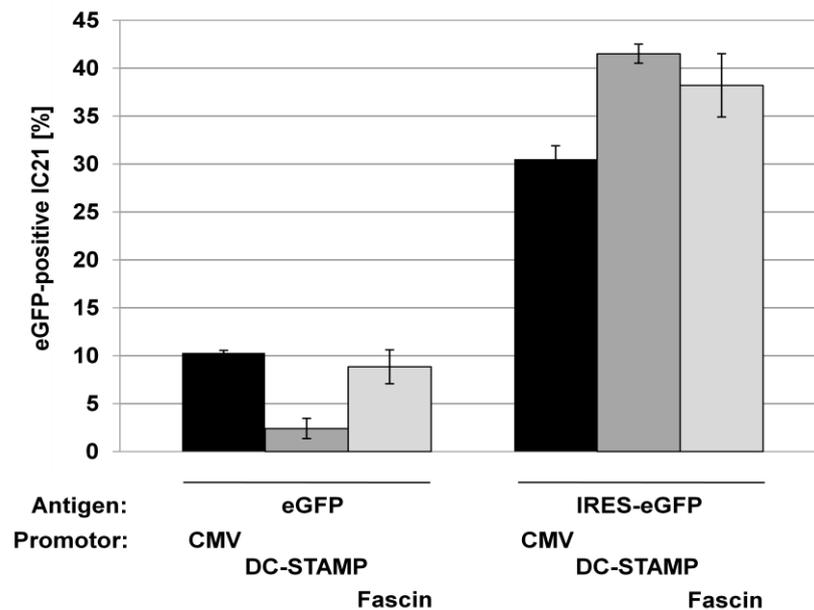


Abbildung 32: eGFP-Expression nach Hefe-vermitteltem DNA-„Delivery“ unter Kontrolle des CMV-, DC-STAMP- und Fascin-Promotors in IC21-Makrophagen.

Murine Makrophagen wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 7 infiziert. Die Hefen enthielten die Expressionsvektoren pCMV-eGFP, pDC-STAMP-eGFP, pFascin-eGFP, pCMV-IRES-eGFP, pDC-STAMP-IRES-eGFP oder pFascin-IRES-eGFP. Zum Nachweis einer eGFP-Expression wurden die Proben durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Es wurden hierbei 30.000 Zellen analysiert.

3.2. Optimierung der DNA / RNA-Expression durch Plasmid-/ Selektionsmarkerwechsel

Zur Optimierung der DNA / RNA-Expression sollte der Hefe / *E. coli*- Shuttle-Vektor YEp352 durch den Vektor YEp351 ersetzt werden. YEp352 enthält ein *URA3*-Selektionsgen. Durch den Plasmidwechsel zum Vektor YEp351 mit *LEU2d*-Gen als Selektionsmarker sollte eine erhöhte Kopienzahl des Vektors innerhalb der transformierten Hefezelle vorliegen. Das Selektionsgen *LEU2d* stellt eine mutierte Form von *LEU2* dar, welche zu einer verminderten Leucinexpression führt. Diese abgeschwächte Variante bedingt die verstärkte Replikation des betreffenden *LEU2d*-Plasmids, um den Bedarf der Hefezelle an Leucin zu decken (Erhart & Hollenberg, 1983). Dies vermittelt weiterhin eine verstärkte Expression der Testproteine, welche im Vergleich der Experimente mit YEp352 in einer Steigerung der exprimierten Antigen-Menge resultieren sollte.

Die Konstruktion der Plasmide basierend auf dem Grundvektor YEp351 (Abb. 33) und erste Experimente zum „Delivery“ eGFP-kodierender DNA und mRNA in IC21-Zellen wurden von Selina Riplinger in ihrer Diplomarbeit durchgeführt (Riplinger, 2008). Weiterführend wurden für die vorliegende Arbeit vergleichende Versuche basierend auf den beiden Plasmidsystemen von YEp352 und YEp351 zum DNA- und RNA-„Delivery“ bearbeitet.

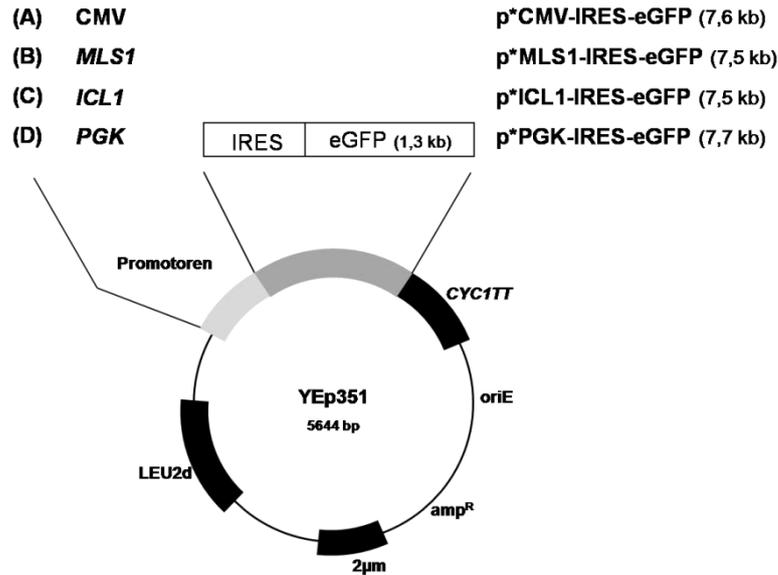


Abbildung 33: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren p*CMV-IRES-eGFP, p*MLS1-IRES-eGFP, p*ICL1-IRES-eGFP und p*PGK-IRES-eGFP.

Die Vektoren enthalten die Sequenz der IRES-eGFP Fusion und die Sequenz des CMV-Promotors (A), des *MLS1*-Promotors (Promotor der Malat-Synthase) (B), des *ICL1*-Promotors (Promotor der Isocitrat-Lyase) (C) und des *PGK*-Promotors (Promotor der Phosphoglyceratkinase) (D) sowie die des Transkriptionsterminators *CYC1TT* der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der IRES-eGFP Sequenz als *XhoI/BglII* Fragment über kompatibel Enden in die mit *XhoI/BamHI* geöffneten Expressionsvektoren [Ripplinger, 2008].

Um den Effekt des Selektionsmarkerwechsels und dem damit verbundenen theoretischen Einbringen von mehr Antigen-kodierender DNA oder mRNA zu untersuchen, wurden 1×10^5 IC21 Zellen in 24-„wells“ ausgesät, acht Stunden inkubiert und mit Hefen mit einer MOI 7 infiziert. Die eingesetzten Hefen enthielten die Plasmide zum DNA- und RNA-„Delivery“ entweder basierend auf dem Grundvektor YEp352 mit einem *URA3* Marker (siehe 2.1.) oder basierend auf dem Grundvektor YEp351 mit dem *LEU2d* Marker (siehe oben). Nach 16 Stunden wurden die Zellen geerntet und hinsichtlich einer eGFP-Expression im Durchflusszytometer untersucht. Die erhaltenen Ergebnisse und errechneten Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, wobei jeweils Triplett-Ansätze gewählt wurden, sind in Abbildung 34 dargestellt. Eine Steigerung der eGFP-Expression und ein höherer Anteil an eGFP-positiven Zellen konnte durch den Plasmidwechsel nicht erzielt werden. Die erhaltenen eGFP-positiven Zellen lagen bei

den Ansätzen basierend auf dem Plasmidsystem mit dem *LEU2d* Selektionsmarker (YEp351, grau) deutlich unter den Daten des Plasmidsystems mit YEp352 als Grundvektor (schwarz). Der Unterschied betrug nach DNA-„Delivery“ 23 %, nach RNA-„Delivery“ bis zu 29 %.

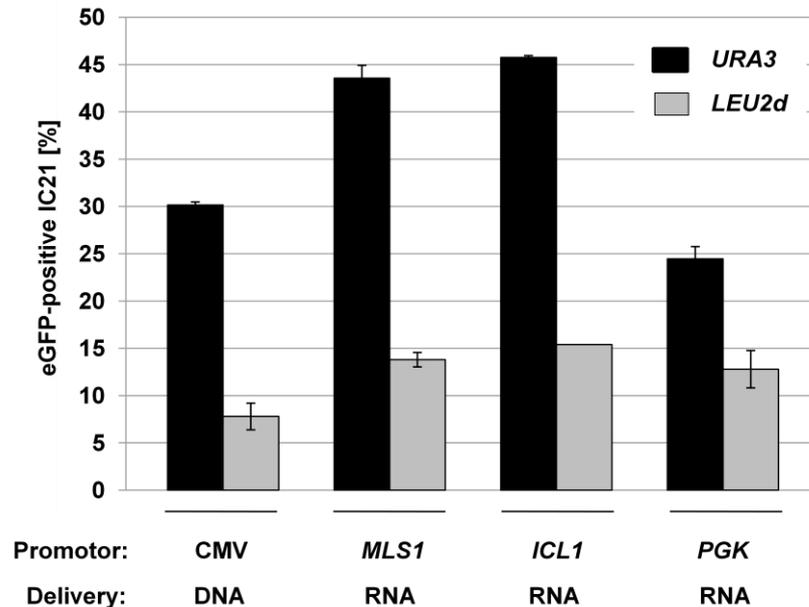


Abbildung 34: Nachweis der eGFP-Expression nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“ unter Verwendung der konstruierten Plasmidsysteme basierend auf den Vektoren YEp352 und YEp351 in IC21-Makrophagen.

Murine Makrophagen wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 7 infiziert. Die Hefen enthielten die Plasmide zum DNA- und RNA-„Delivery“ basierend auf den Grundvektoren YEp352 und YEp351. Zum Nachweis einer eGFP-Expression wurden die Proben durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Es wurden hierbei 30.000 Zellen analysiert.

3.3. Steigerung der Antigenexpression in APC durch Verwendung eines säugerzellspezifischen Polyadenylierungssignals

Eine Expression des Antigens war nach DNA- und RNA-„Delivery“ auch nach Verwendung des Hefeterminators *tPGK* in Säugerzellen möglich (siehe 2.1. und 2.2.2.). Im Folgenden sollte durch den Austausch des Hefeterminators durch das SV40 Polyadenylierungssignal der eingebrachte Expressionsvektor bzw. das zu translatierende Transkript für die Antigenexpression in Säugerzellen optimiert werden. Die Präsentation von mit Antigen-Peptiden beladenen MHC I-Komplexen ist ein sehr ineffizient verlaufender Prozess (Princiotta et al., 2003; Yewdell et al., 2003; Lehner & Cresswell, 2004). Dabei wird nur ein Peptid von 10.000 degradierten, hoch affinen MHC I-Komplex-Liganden in diesen an der Zelloberfläche präsentiert, über 99 % werden von zytosolischen Exo- und Endopeptidasen abgebaut (Reits et al., 2003). Somit ist die Expression großer Mengen des zur Vakzinierung eingesetzten Antigens in einer APC von entscheidender Bedeutung.

Das SV40 Polyadenylierungssignal ist ein effizientes und oft verwendetes Signal in Säugerexpressionsvektoren (Van den Hoff et al., 1993). Es vermittelt die Stabilität und erhöht die Translationseffizienz der mRNA (Jackson & Standart, 1990; Gray & Wickens, 1998). Die Sequenz des Signals in Säugerexpressionsvektoren verschiedener Anbieter ist prinzipiell identisch, unterscheidet sich jedoch hinsichtlich seiner Länge. Deshalb wurden für das folgende Experiment eine kurze Variante des Signals aus dem Expressionsvektor pSG5 (Stratagene) mit 134 bp und eine lange Variante aus pEGFP-C1 mit 225 bp (Clontech) verwendet. Die beiden Polyadenylierungssignale wurden mittels der Primer 5`SV40PolyA⁺-lang bzw. 5`SV40PolyA⁺-kurz und 3`SV40PolyA⁺ an den entsprechenden Matrizen pSG5 und pEGFP-C1 amplifiziert. Dabei wurden die Sequenzen beider Varianten am 5`Ende um die Sequenz der Restriktionsschnittstellen *Bgl*II und *Xba*I, am 3`Ende um die von *Sac*I verlängert. Beide Varianten wurden zur Sequenzierung in pSTBlue-1 zwischenkloniert. Die Klonierung zum

Ersetzen des Hefeterminators *tPGK* in den Plasmiden zum DNA- und RNA-„Delivery“ erfolgte über die Restriktionsenzyme *XbaI* und *SacI*. Die beiden Varianten wurden in die Expressionsvektoren pCMV-IRES-eGFP, pICL1-IRES-eGFP und pPGK-IRES-eGFP (siehe 2.1.) ein-kloniert (Abb. 35). Für diesen Versuch wurde der in IC21-Zellen effizienter induzierbare *ICL1*-Promotor verwendet.

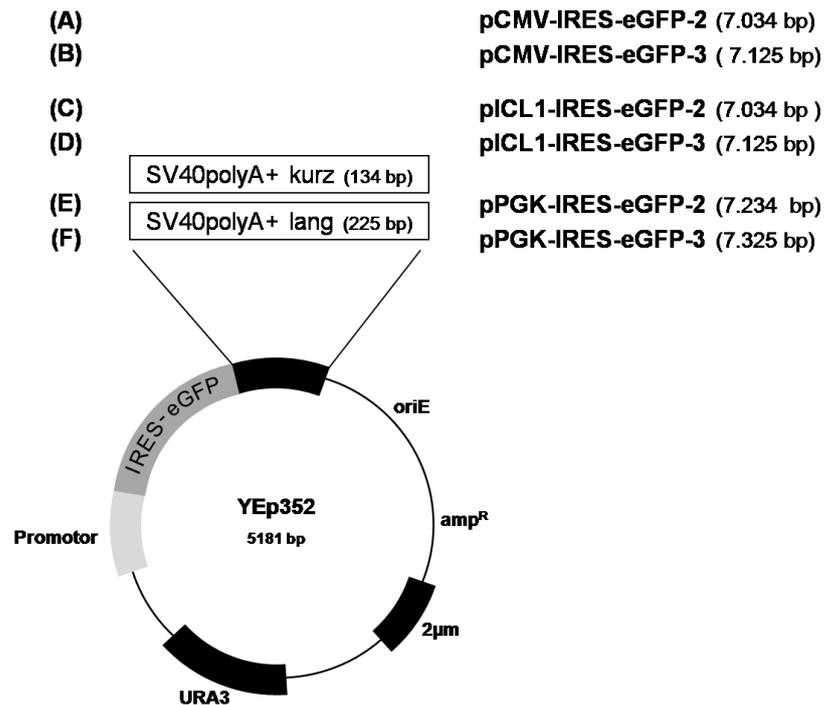


Abbildung 35: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren mit unterschiedlich langem SV40 Polyadenylierungssignals.

Die Expressionsvektoren basieren auf den Plasmiden zum DNA- und RNA-„Delivery“. Sie enthalten die Sequenz der kurzen Variante des SV40 Polyadenylierungssignals (SV40polyA+kurz) (A), (C) und (E) oder die der langen Variante (SV40polyA+lang) (B), (D) und (F) als *XbaI/SacI* Fragment. Die IRES-eGFP Fusion liegt als *XhoI/BglII* Fragment unter Kontrolle des CMV-, *ICL1*- und *PGK*- Promotors vor.

Beide Varianten wurden bezüglich ihrer Effizienz hinsichtlich einer Antigenexpression nach DNA- und RNA-„Delivery“ in Säugerzellen mit dem Hefeterminator *tPGK* verglichen. Untersucht wurde zunächst ein „Delivery“ in IC21, wobei das DNA-„Delivery“ unter Kontrolle des CMV-Promotors stand, für das RNA-„Delivery“ die Promotoren *ICL1* (induzierbar) und *PGK* (konstitutiv) verwendet wurden, da sie sich als effizienteste Promotoren in IC21 erwiesen hatten. Die nach Einsatz des

Hefeterminators erhaltene Anzahl an eGFP-positiven Zellen wurde auf 100 % gesetzt und die Steigerung nach Einsatz des Polyadenylierungssignals errechnet. Nach Verwendung beider Varianten des SV40 Polyadenylierungssignals konnte nach DNA- und RNA-„Delivery“ eine größere Anzahl eGFP-positiver IC21 Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 36 A). Somit konnte die eGFP-Expression bzw. Translation in noch weiteren Zellen erfolgen als nach Verwendung des Hefeterminators. Nach DNA-„Delivery“ war eine ähnliche Anzahl eGFP-positiver Zellen nach Gebrauch der kurzen und langen Variante zu beobachten. Bei der kurzen Variante konnte eine Steigerung auf 338 %, bei der langen Variante auf 301 % erreicht werden. Beide Varianten liegen in Säugerexpressionsvektoren verschiedener Anbieter vor und sind für eine Expression in Säugerzellen optimiert worden. Somit war ein Unterschied hinsichtlich ihrer Effizienz nach DNA-„Delivery“, bei welchem die Expression des Antigens komplett im Säuger verläuft, nicht zu erwarten. Nach RNA-„Delivery“ konnte unter Kontrolle beider Promotoren eine erhöhte Anzahl eGFP-positiver Zellen nachgewiesen werden, wobei die größten Steigerungen beim Einsatz der langen Variante erzielt wurden. Beim *ICL1*-Promotor betrug die Steigerung 669 %, beim *PGK*-Promotor 244 %. Dies kann auf die gesteigerte Stabilität der eingebrachten mRNA nach Anfügen eines längeren polyA „tails“ zurückgeführt werden, wodurch die Bedingungen für eine verstärkte eGFP-Translation in noch weiteren Zellen gegeben sind. Weiterhin wurden nach Verwendung der Varianten des SV40 Polyadenylierungssignals nicht nur mehr eGFP-positive Zellen, sondern bei diesen Zellen auch eine gesteigerte mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) erhalten, welche die Menge an exprimiertem eGFP wiedergibt (Abbildung 36 B). So wurde nach DNA-„Delivery“ unter Kontrolle des CMV-Promotors nach Verwendung der kurzen Variante eine Steigerung auf 127 %, nach Verwendung der langen Variante eine Steigerung auf 120 % MFI erhalten. Nach RNA-„Delivery“ unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors und der langen Variante waren es 128 % MFI. Die Steigerung nach Verwendung des *PGK*-Promotors und der kurzen Variante betrug

110 %, bei der langen Variante 112 %. Somit konnte in diesen Zellen aufgrund der erhöhten mRNA-Stabilität die eGFP-Expression effizienter verlaufen, was in einer Steigerung der eGFP-Menge und somit der Fluoreszenzintensität resultiert.

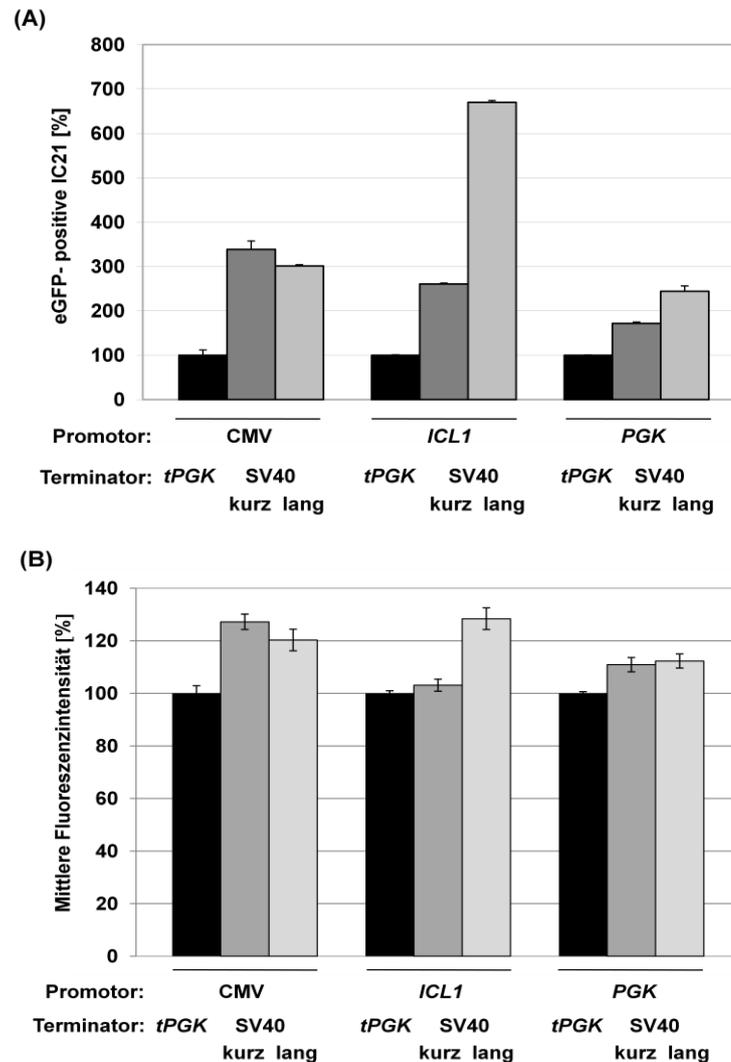


Abbildung 36: Steigerung der eGFP-Expression nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“ in IC21 Zellen durch Verwendung zweier Varianten des SV40 Polyadenylierungssignals.

Murine Makrophagen wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 7 infiziert. Die Hefezellen wurden zuvor mit den Expressionsvektoren pCMV-IRES-eGFP-2, pCMV-IRES-eGFP-3, pICL1-IRES-eGFP-2, pICL1-IRES-eGFP-3, pPGK-IRES-eGFP-2 und pPGK-IRES-eGFP-3 transformiert. Sie enthalten eine kurze (aus pSG5, Stratagene) und eine lange Form (aus pEGFP-C1, Clontech) des SV40 Polyadenylierungssignals. Die Effizienz hinsichtlich einer eGFP-Expression in IC21 Zellen beider Poly-A Varianten wurde mit der des *PGK*-Transkriptionsterminators (*tPGK*) (= 100 %) verglichen. Die Analyse der Proben erfolgte durchflusszytometrisch. Hierbei wurden 30.000 Zellen gezählt und die Anzahl eGFP-positiver Zellen (A) sowie die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) (B) in % ermittelt.

3.4. Optimierung der DNA / RNA-Freisetzung aus Phagolysosomen in das Zytosol durch Koexpression porenbildender Proteine

Bestimmte intrazelluläre Erreger der Gattung *Clostridium*, *Streptococcus*, *Bacillus* und *Listeria* exprimieren verschiedene porenformende Proteine, um aus dem Phagolysosom austreten zu können (Hybiske & Stephens, 2008). In Analogie zu seiner natürlichen Aufgabe sollte Listeriolysin O (LLO) aus *Listeria monocytogenes* in der Hefe koexpressiert werden, um eine Translokation der DNA und mRNA aus dem Phagolysosom in das Zytosol zu erleichtern. Es gehört zur Familie der „cholesterol-dependent pore-forming cytolysins“ (CDC). Diese Proteine bilden in Abhängigkeit von Cholesterol Poren innerhalb der Membran der Phagolysosomen, ohne dabei die Zytoplasmamembran infizierter Zellen zu zerstören (Tweten, 2005; Glomski et al., 2002), wodurch Listerien sich im Zytosol der infizierten Zelle ansiedeln können (Kayal & Charbit, 2006). LLO besitzt eine N-terminale Signalsequenz (Mengaud et al., 1988). Dieses wurde zur Koexpression in Hefe entfernt, so dass eine LLO Variante ohne Sekretionssignal (LLO) entstand. Zudem wurde eine Variante mit hefeeigenem Sekretionssignal des Killertoxins K1 hergestellt (ssLLO), welches einen kotranslationalen Import in das ER vermittelt (Frank Breinig, persönliche Mitteilung). Weiterhin sollte die Translokationseffizienz von DNA und mRNA durch Koexpression von humanem Perforin gesteigert und mit der Koexpression von bakteriellem LLO verglichen werden. Perforin ist das Haupteffektormolekül Natürlicher Killerzellen und zytotoxischer T-Lymphozyten und führt bei Polymerisation zur Ca^{2+} -abhängigen Bildung von Poren in der Membran von Zielzellen (Tschopp et al., 1986; Sauer et al., 1991). Für die folgenden Versuche wurde eine auf 125 Aminosäuren verkürzte C-terminale Perforin-Variante verwendet, die von Li und Mitarbeitern als zytotoxisch beschrieben wurde (Li et al., 2001).

Beide Varianten von Listeriolysin O wurden mittels der Primer 5`LLO bzw. 5`ssLLO und 3`LLO an chromosomaler Listerien-DNA amplifiziert.

Dabei wurden an das 5`Ende beider Varianten die Sequenz der Restriktionsschnittstellen *SalI* und *XhoI*, an das 3`Ende die der Restriktionsschnittstellen *BglII* und *BamHI* angefügt. Zur Sequenzierung wurde die Variante ohne Sekretionssignal in pYES2.1/V5-His-TOPO, die Variante mit K1-Sekretionssignal in pCRII-TOPO zwischenkloniert. Die verkürzte Form von Perforin wurde mittels RT-PCR unter Verwendung der Primer 5`Perforin Δ C und 3`Perforin an genomischer DNA aus PBMC (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) hergestellt. Dabei wurden an das 5`Ende die Schnittstellen *XhoI* und *EcoRI*, an das 3`Ende die Schnittstellen *XbaI* und *SalI* angefügt. Zur Sequenzierung wurde die Perforin Variante in pSTBlue-1 zwischenkloniert. Die LLO-Varianten (*XhoI/BamHI*) sowie die verkürzte Peforin-Variante (*XhoI/XbaI*) wurden in den Expressionsvektor YEp351 (Hill et al., 1986) einkloniert, in welchen zuvor die induzierbaren Hefepromotoren *MLS1* und *ICL1* als *HindIII/XhoI* Fragment, der Galaktose-induzierbare *GAL1*-Promotor als *SalI/XbaI* Fragment sowie der *CYC1TT*-Transkriptionsterminator als *XbaI/SacI* Fragment (beide aus Diplomarbeit Esther Gießelmann, 2007) eingebracht wurde (Abb. 37).

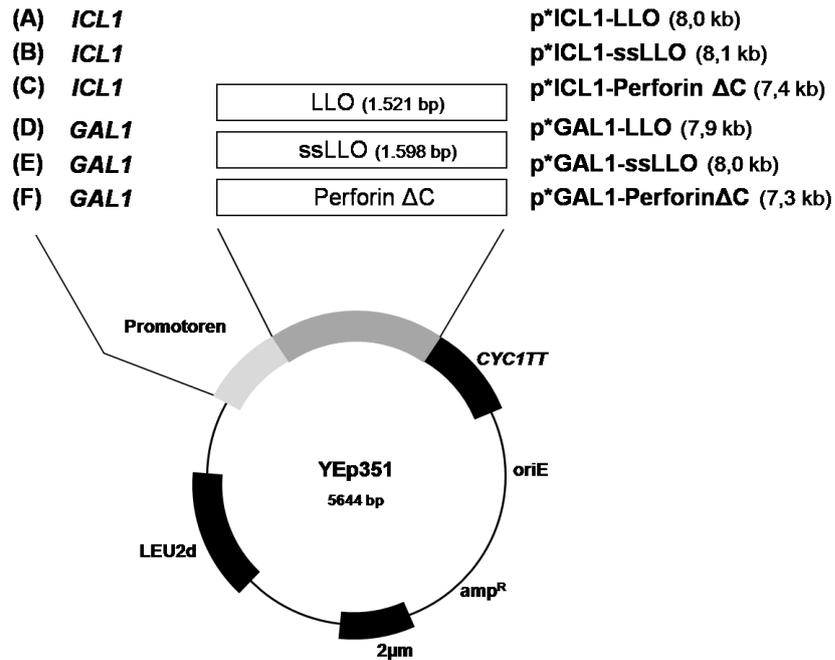


Abbildung 37: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren zur Koexpression von Listeriolysin O und Perforin in Hefezellen.

Die Plasmide enthalten die Sequenz des Isocitrat-Lyase Promotors (*ICL1*) (A), (B), (C) als *HindIII/XhoI* Fragment oder des Galaktose-induzierbaren *GAL1*-Promotors (*GAL1*) (D), (E) und (F) als *SalI/XbaI* Fragment sowie die Sequenz des Transkriptionsterminators *CYC1TT* als *XbaI/SacI* Fragment. Die Expressionsvektoren entstanden durch die Insertion von LLO und ssLLO als *XhoI/BamHI* Fragment und von PerforinΔC als *XhoI/XbaI* Fragment.

3.4.1. Expression von Listeriolysin O und Perforin in Hefe

Listeriolysin O und Perforin wurden beide als porenformende Proteine beschrieben (Sauer et al., 1991; Tweten, 2005). Durch Koexpression beider Proteine in Hefen sollte somit eine Translokation der mittels Hefen eingebrachten Nukleinsäuren aus den Phagolysosomen in das Zytosol der APC erleichtert werden. Zunächst musste jedoch der Effekt der heterologen Expression beider Proteine auf die Hefe selbst untersucht werden. Dazu wurde ein Wachstumstest durchgeführt. Nach Transformation des *S. cerevisiae* Stammes S86c mit den Plasmiden p**GAL1*-LLO und p**GAL1*-ssLLO wurden die Transformanten über Nacht in *ura* d/o Raffinose Medium bei 30°C angezogen. Als Negativkontrolle dienten Hefezellen des gleichen Stammes, welche mit dem

Leervektor YEp351 transformiert wurden. Durch Verwendung von Raffinose als Kohlenstoffquelle zur Anzucht der Transformanten konnte eine Katabolitrepression ausgeschlossen werden, welche beim „shiften“ der Zellen von Glukose- auf Galaktose-haltiges Medium auftritt. Von mindestens drei verschiedenen Transformanten wurden jeweils 1×10^7 Zellen geerntet und parallele Verdünnungsreihen hergestellt. Jeweils 5 μ l jeder Verdünnungsstufe wurden parallel auf Selektionsagar mit 2 % Galaktose zur Induktion der Expression aufgetropft. Nach Inkubation der Platten über fünf Tage bei 30°C wurde das Wachstum der Transformanten bei den verschiedenen Verdünnungsstufen nach Induktion der Expression von LLO und ssLLO untersucht.

Anhand der in Abbildung 38 dargestellten Ergebnisse lässt sich schließen, dass beide Formen von Listeriolysin O (LLO und ssLLO) toxisch für Hefezellen sind. Im Falle der Variante ohne Sekretionssignal (LLO) konnte bei keiner Verdünnungsstufe ein Wachstum auf Galaktose-haltigen Platten unter induzierten Bedingungen ausgemacht werden. Bei der Variante mit hefeeigenem K1-Sekretionssignal wurde ein Wachstum bis zu einer Verdünnung von 10^{-4} beobachtet. Eine intrazelluläre Expression des Toxins ist somit toxischer für Hefezellen als die Expression einer sekretorischen LLO-Variante. Ob dieser Selbstmörder-Phänotyp mit einer Porenbildung innerhalb der Membran von Hefezellen einhergeht, wurde mittels Propidiumiodid-Färbung untersucht. Propidiumiodid ist ein Nukleinsäureinterkalator, welcher nur in Zellen mit perforierter Zellmembran eindringen kann, was fluoreszenzmikroskopisch beobachtet wird. Nach Expression beider LLO-Varianten konnte eine rote Fluoreszenz innerhalb der Hefezellen nachgewiesen werden (Abb. 38 B), was auf ein Eindringen von Propidiumiodid in die Hefezellen schließen lässt. Somit ist die Hefe in der Lage, funktionelles und biologisch aktives Listeriolysin O zu exprimieren, welches zur Porenbildung innerhalb von Membranen fähig ist.

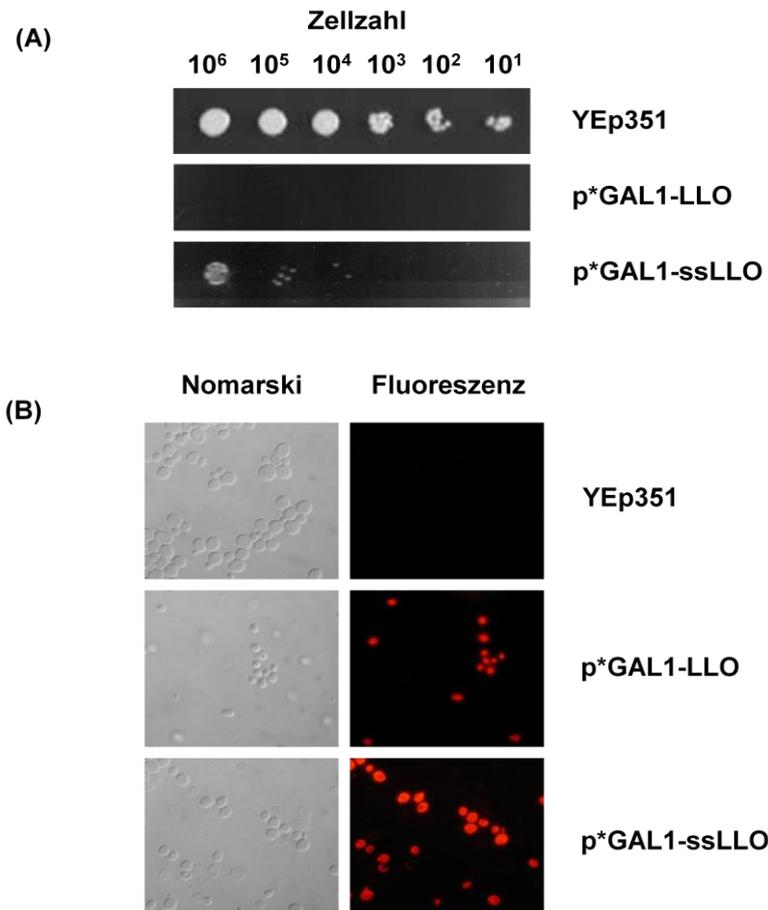


Abbildung 38: Wachstumstest (A) und Propidiumiodid-Färbung (B) zur Untersuchung der Wirkung von heterolog in Hefe exprimiertem Listeriolysin O.

(A) Hefezellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c wurden mit den Plasmiden YEp351 (Negativkontrolle), p*GAL1-LLO und p*GAL1-ssLLO transformiert. Nach Anzucht der Transformanten in *ura* d/o Raffinose Medium wurden von jeweils 1×10^7 Zellen logarithmische Verdünnungen hergestellt und von jeder Verdünnung $5 \mu\text{l}$ auf eine Selektionsagarplatte mit 2 % Galaktose aufgetropft. Die Platten wurden fünf Tage bei 30°C bebrütet und im Anschluss das Wachstum der einzelnen Transformanten bei den verschiedenen Verdünnungsstufen unter induzierenden Bedingungen dokumentiert. Es wurden mindestens drei unterschiedliche Transformanten pro eingesetztem Konstrukt untersucht; eine repräsentative Transformante ist gezeigt.

(B) Hefezellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c, welche die Plasmide YEp351 (Negativkontrolle), p*GAL1-LLO oder p*GAL1-ssLLO enthielten, wurden in $1 \times \text{PBS}$ gewaschen und 10 Minuten mit Propidiumiodid gefärbt. Die Auswertung der Proben erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Zur Untersuchung der Expression der verkürzten Perforin-Form wurde der *S. cerevisiae* Stamm S86c mit dem Plasmid p*GAL1-Perforin ΔC transformiert. Als Negativkontrolle dienten S86c Zellen, welche den Leervektor YEp351 enthielten. Mit den erhaltenen Transformanten wurde, wie oben beschrieben, ein Wachstumstest durchgeführt. Im Falle der verkürzten Perforin-Variante konnte ein Wachstum bei allen

Verdünnungsstufen nachgewiesen werden (Abb. 39); sie ist demzufolge nicht toxisch für Hefezellen.

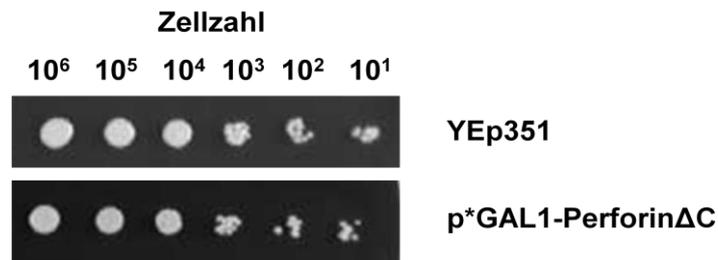


Abbildung 39: Wachstumstest zur Untersuchung der Wirkung einer heterolog in Hefe exprimierten verkürzten Perforin-Variante.

Hefezellen des *S. cerevisiae* Stammes S86c wurden mit den Plasmiden YEp351 (Negativkontrolle) oder p*GAL1-PerforinΔC transformiert. Nach Anzucht der Transformanten in *ura d/o* Raffinose Medium, wurden von 1×10^7 Zellen logarithmische Verdünnungen hergestellt und von jeder Verdünnung 5 μ l auf eine Selektionsagarplatte mit 2 % Galaktose aufgetropft. Die Platten wurden fünf Tage bei 30°C bebrütet und im Anschluss das Wachstum der Transformanten bei den verschiedenen Verdünnungsstufen unter induzierenden Bedingungen dokumentiert. Es wurden mindestens drei unterschiedliche Transformanten untersucht; eine repräsentative Transformante ist gezeigt.

3.4.2. Überprüfen der Funktionalität von rekombinatem Listeriolysin O und Perforin in APC

Nach Überprüfen der heterologen Expression der porenbildenden Proteine in Hefe wurde im Folgenden die Wirkung von rekombinatem Listeriolysin O und Perforin auf APC untersucht. Eine antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort nach Protein-„Delivery“ mittels Hefen konnte bisher in mehreren Studien nachgewiesen werden (Stubbs et al., 2001; Barron et al., 2006; Riemann et al., 2007). Durch die Koexpression porenformender Proteine in Hefen, welche das exprimierte Antigen in die APC einbringen, sollte die antigenspezifische T-Zellantwort gesteigert werden können, da die Translokation der Antigene ins Zytosol erleichtert werden würde. Dazu wurde Ovalbumin verwendet, welches zuvor schon mehrfach als Antigen zum Nachweis einer Aktivierung Ovalbumin-spezifischer T-Zellen eingesetzt wurde (Schoen et al., 2005; Loeffler et al., 2006). Die Präsentation des Epitops

SIINFEKL (Ovalbumin 257-264) führt zur Aktivierung Ovalbumin-spezifischer T-Zelllinien (Schoen et al., 2005).

Die zytosolische Ovalbumin Variante Ovacyt (*Xhol/BgII*) wurde in den Expressionsvektor pICL1 (siehe 1.3.1.) inkloniert. Durch die Wahl des Promotors wurde die Ovalbumin-Expression erst nach Aufnahme der Hefezellen in den Phagolysosomen induziert. Die folgenden Versuche zur Aktivierung Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten nach Protein-„Delivery“ wurden von Gernot Geginat am Klinikum Mannheim durchgeführt. Als „Read out“-System wurde eine murine, epitop-spezifische CD8⁺ T-Zelllinie verwendet. Als APC dienten dabei murine Makrophagen aus dem Knochenmark (BMM), welche zuvor durch Zugabe des Wachstumsfaktors M-CSF ausgereift wurden. Diese wurden mit rekombinanten Hefezellen inkubiert und die Präsentation des Ova-CTL-Epitops SIINFEKL im Kontext mit MHC I-Molekülen via T-Zellstimulation überprüft. Dabei wurde die INF- γ Produktion aktivierter T-Zellen im ELISA bestimmt. Es wurden Hefezellen eingesetzt, welche Ovacyt unter Kontrolle des induzierbaren Hefepromotors *ICL1* exprimieren. Zusätzlich wurden diese Hefezellen mit den Expressionsvektoren YEp351, p*ICL1-LLO bzw. p*ICL1-Perforin Δ C aus 3.4. kotransformiert. Für diesen Versuch wurde nur die LLO-Form ohne Sekretionssignal (LLO) verwendet, da sie sich nach Expression in Hefe als toxischere Variante mit größerem Potential zur Porenbildung erwies. Durch die unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors verlaufende Expression der LLO-Varianten und von Perforin Δ C wurden diese erst nach Aufnahme der Hefezellen in den Phagolysosomen induziert; eine vorherige Induktion der LLO-Expression würde ein Abtöten der Hefezellen zur Folge haben. Ein Schema des durchgeführten Versuches ist in Abbildung 40 dargestellt.

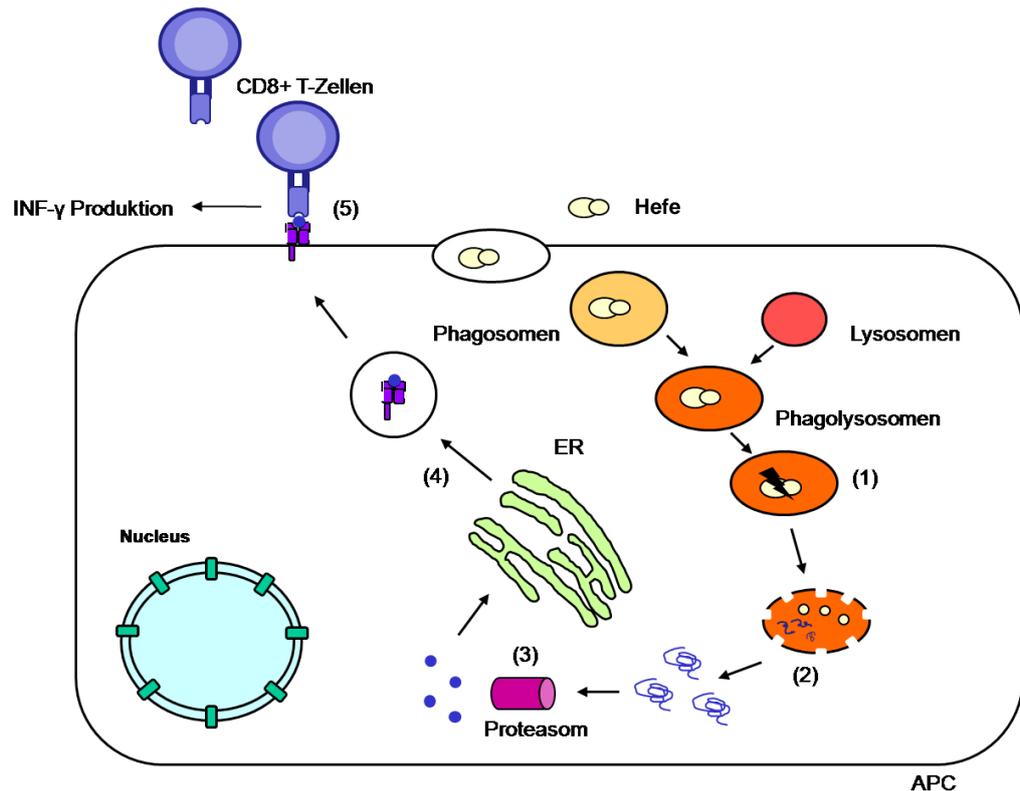


Abbildung 40: Schematische Darstellung der gesteigerten Antigenpräsentation nach Protein-„Delivery“ durch Koexpression von Listeriolysin O und Perforin.

Nach Aufnahme der Hefen durch APC gelangen diese in die Phagolysosomen, wo sie abgebaut werden (1). Durch induzierte Koexpression von Listeriolysin O und Perforin in der Hefe kommt es nach deren Freisetzung zur Porenbildung innerhalb der Membran der Phagolysosomen (2), wodurch die Translokation des mittels Hefe eingebrachten Antigens verstärkt ablaufen kann. Durch das Proteasom werden die im Zytosol vorhandenen Antigene zu Peptiden abgebaut (3) und im ER auf MHC I-Moleküle geladen (4). Es folgt die Präsentation des Antigens im Kontext mit MHC I auf der Zelloberfläche der APC, wodurch es zur Stimulation antigenspezifischer CD8⁺ T-Zellen kommt (5). Stimulierte T-Zellen produzieren INF-γ, welches im ELISA nachgewiesen werden kann.

Die Ergebnisse aus Abbildung 41 zeigen, dass sowohl nach Koexpression von Listeriolysin O (LLO) als auch PerforinΔC eine größere Menge an INF-γ nachgewiesen werden konnte. Bei dem Ansatz, bei welchem neben dem Expressionsvektor pICL1-Ovacyt nur der Leervektor kontransformiert wurde, konnten bei einer MOI 3 insgesamt 33 ng / ml INF-γ, bei einer MOI 1,5 etwa 30 ng / ml INF-γ nachgewiesen werden. Somit führt ein Protein-„Delivery“ mittels Hefen auch ohne Koexpression zu einer Induktion von Antigen-spezifischen CTL und zur Produktion von INF-γ. Durch die Koexpression von LLO und PerforinΔC unter Kontrolle des *ICL1* Promotors konnte jedoch die nachzuweisende

INF- γ Menge um das ungefähr Elffache bei LLO auf 464 ng / ml (MOI 3) und 443,5 ng / ml (MOI 1,5) und um das ungefähr Zehnfache bei Perforin Δ C auf 318 ng / ml (MOI 3) und 282 ng / ml (MOI 1,5) gesteigert werden. Somit wurde durch die Koexpression beider porenbildender Proteine die Aktivierung Ovalbumin-spezifischer T-Lymphozyten signifikant verstärkt und somit die Menge an produziertem INF- γ deutlich erhöht. Nach Expression in Hefe liegen somit biologisch aktive Listeriolysin O und Perforin-Varianten vor, die zur Porenbildung innerhalb von Membranen in Säugerzellen fähig sind.

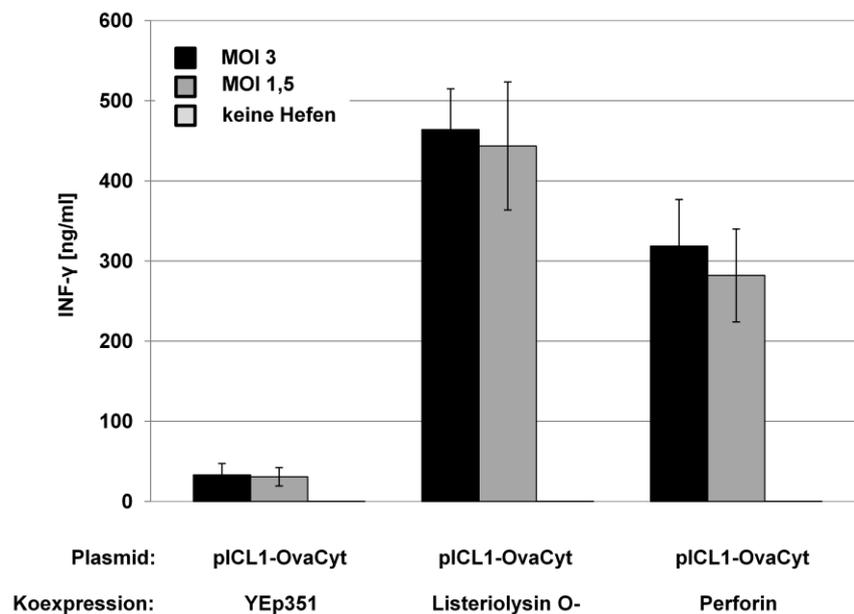


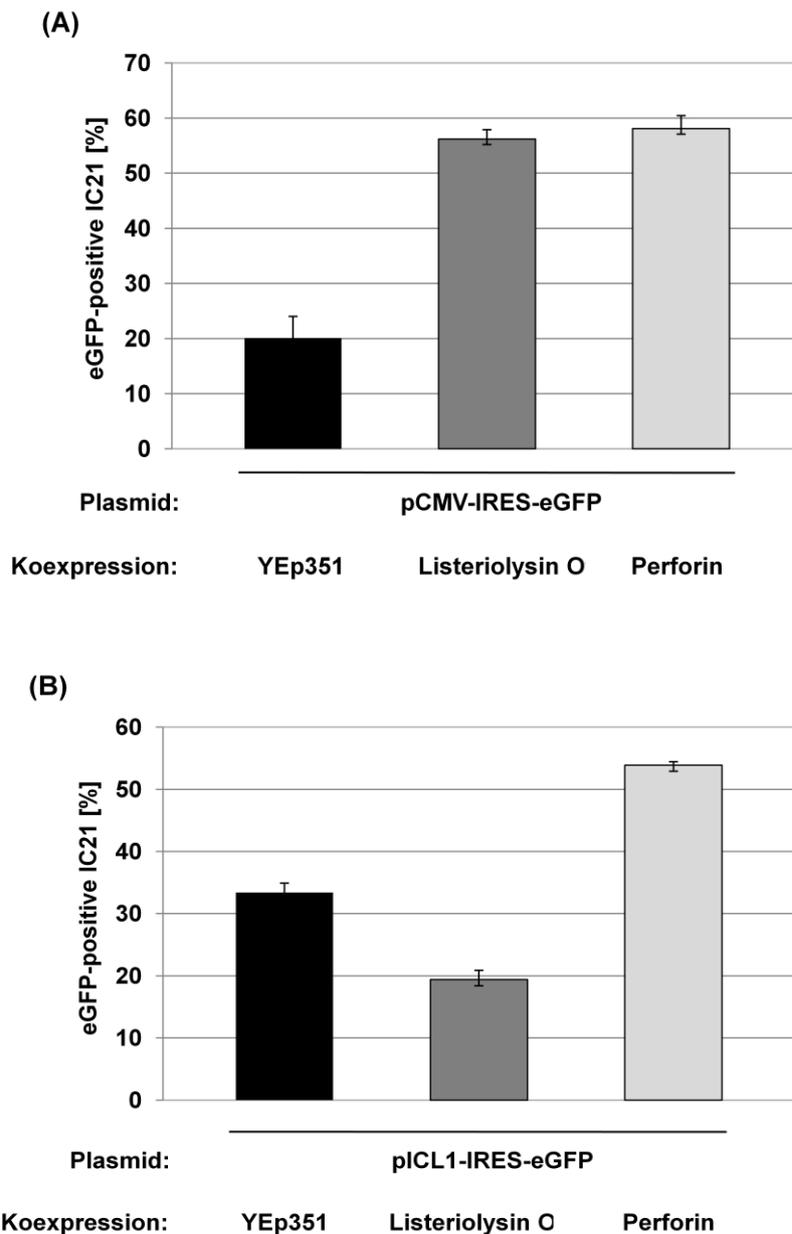
Abbildung 41: Verstärkte Ova-spezifische T-Zellaktivierung durch Koexpression von Listeriolysin O und Perforin nach Hefe-vermitteltem Protein-„Delivery“. Murine Knochenmarksmakrophagen (BMM) wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 3 bzw. MOI 1,5 infiziert, welche mit dem Expressionsvektor pICL1-Ovacyt transformiert und mit dem Leervektor YEp351, dem Plasmid p*ICL1-LLO bzw. p*ICL1-Perforin Δ C kotransformiert wurden. Die Präsentation des Ova-CTL-Epitops SIINFEKL im Kontext mit MHC I-Molekülen wurde mittels T-Zellstimulation durch die Produktion von INF- γ im ELISA überprüft.

3.4.3. Steigerung der Antigenexpression nach DNA- und RNA-„Delivery“ in APC durch Koexpression porenbildender Proteine

Nachdem ein Protein-„Delivery“ durch Koexpression von LLO und Perforin gesteigert werden konnte, wurde im folgenden Abschnitt der Einfluss der Koexpression auf ein DNA- und RNA-„Delivery“ untersucht. Durch die Porenbildung innerhalb der Membran der Phagolysosomen und die dadurch verbesserte Translokation von DNA und mRNA in das Zytosol der APC sollte eine verstärkte Antigenexpression nachweisbar sein. Zunächst wurde der Einfluss der Koexpression auf ein „Delivery“ eGFP-kodierender DNA untersucht. Das „Delivery“ in IC21-Zellen wurde wie unter 1.4. beschrieben durchgeführt. Verwendet wurden Hefestämme, die neben dem Expressionvektor pCMV-IRES-eGFP entweder mit YEp351 (Negativkontrolle), p*ICL1-LLO oder p*ICL1-Perforin Δ C kotransformiert wurden. Eine eGFP-Expression in den Säugerzellen wurde mittels FACS-Messung analysiert. Die Ergebnisse aus Abbildung 42 zeigen, dass nach Koexpression von Listeriolysin O und Perforin Δ C eine größere Anzahl eGFP-positiver Zellen detektiert werden konnte. Die Anzahl konnte von 20,1 % nach Koexpression des Leervektors um das ungefähr Dreifache nach Koexpression von LLO und Perforin Δ C auf 56,2 % und 58,1 % gesteigert werden. Somit gelangt mehr Antigen-kodierende DNA in das Zytosol der APC, wodurch es in einer größeren Anzahl von APC zu einer eGFP-Expression kommen konnte.

Nach Koexpression von LLO und Perforin Δ C beim RNA-„Delivery“ zeigte sich eine Verringerung im Anteil eGFP-positiver Zellen nach Koexpression von LLO. Die Anzahl sank auf 19,4 %. Nach Koexpression des Leervektors wurden 33,4 %, nach Koexpression von Perforin Δ C wurde eine Steigerung auf 54,5 % nachgewiesen (Abb. 42 B). Einen toxischen Effekt der Hefen, die nach Aufnahme LLO und Perforin unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors exprimierten, nach Koexpression auf die Säugerzellen konnte mittels Trypan-Blau-Test

ausgeschlossen werden (Abb. 42 C). Die verringerte Anzahl eGFP-positiver Zellen nach Koexpression von LLO ließe sich folglich nur auf die toxische Wirkung von LLO auf die Hefe selbst erklären, wodurch die Transkription eGFP-kodierender mRNA verhindert werden würde. Eine toxische Wirkung auf die Hefe nach intrazellulärer Expression von LLO konnte in 3.4.1. nachgewiesen werden. Somit wurde nach Koexpression von LLO weniger eGFP exprimiert, was eine verminderte Anzahl eGFP-positiver Zellen zur Folge hatte.



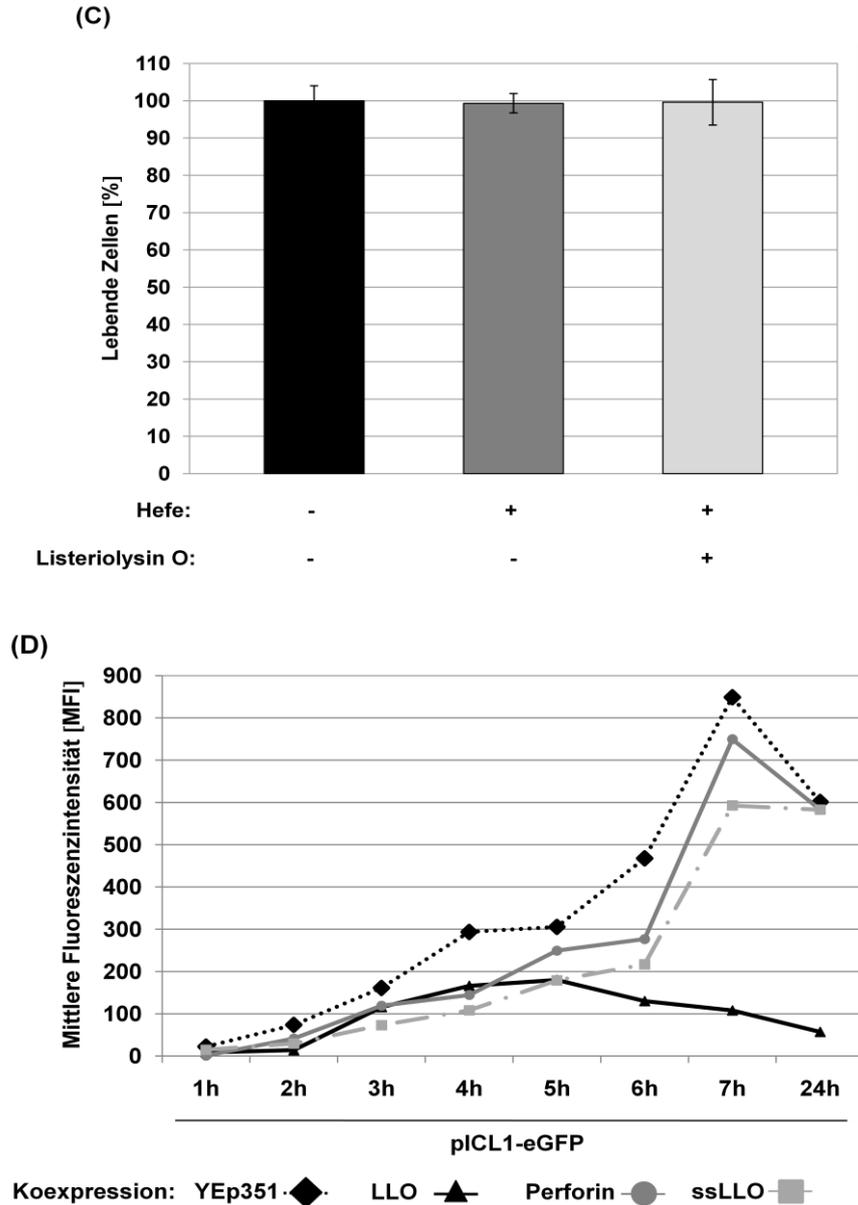


Abbildung 42: Einfluss der Koexpression von Listeriolysin O und Perforin auf DNA- (A) und RNA-„Delivery“ (B) sowie auf APC (C) und Protein-„Delivery“ in murinen IC21-Makrophagen.

1×10^5 murine Makrophagen wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 7 infiziert. Für das DNA-„Delivery“ (A) enthielten die eingesetzten Hefen das Plasmid pCMV-IRES-eGFP, für das RNA-„Delivery“ (B) das Plasmid pICL1-IRES-eGFP. Zusätzlich wurden die Hefen mit dem Leervektor YEp351 (Negativkontrolle), p*ICL1-LLO bzw. p*ICL1-Perforin Δ C kotransformiert. Ein toxischer Effekt der Koexpression auf IC21-Zellen wurde mittels Trypan-Blau-Test ausgeschlossen (C). Dazu wurden von jedem Versuchsansatz Triplet-Ansätze hergestellt. Pro Ansatz wurden 300 Zellen gezählt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. Für das Protein-„Delivery“ (D) enthielten die Hefen das Plasmid pICL1-eGFP und wurden mit den Plasmiden YEp351 (Negativkontrolle), p*ICL1-LLO, p*ICL1-ssLLO oder p*ICL1-Perforin Δ C kotransformiert. Nach Ernten der Zellen zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und im Durchflusszytometer hinsichtlich einer grünen Fluoreszenz untersucht. Es wurden 30.000 IC21-Zellen analysiert.

Um zu überprüfen, ob eine nach Aufnahme der Hefen durch APC induzierte LLO-Expression toxisch auf Hefen wirkt, wurde der Effekt der Koexpression von Listeriolysin O und Perforin Δ C auf Hefen untersucht, die eGFP in IC21 Zellen einbringen. Sollte Listeriolysin O toxisch auf Hefen wirken, sollte dies in einer verminderten eGFP-Expression und somit einer geringeren Anzahl eGFP-positiver IC21 Zellen resultieren. Dazu wurde eGFP unter Kontrolle des induzierbaren *ICL1* Promotors in Hefen exprimiert, die mit dem Leervektor YEp351 (Negativkontrolle), mit p*ICL1-LLO, p*ICL1-Perforin Δ C oder p*ICL1-ssLLO kotransformiert wurden. IC21-Zellen wurden mit diesen Hefen infiziert (MOI 7) und die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) eGFP-positive Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Abbildung 42 (D) zeigt, dass nach Koexpression von LLO die mittlere Fluoreszenzintensität deutlich geringer war als nach Koexpression des Leervektors oder Perforin Δ C. Nach Koexpression von LLO konnte nach sieben Stunden eine MFI von 108 nachgewiesen werden, nach Koexpression des Leervektors eine MFI von 849 und nach Koexpression von Perforin Δ C von 749. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass nach Koexpression von LLO die Hefe durch die Porenbildung in der Plasmamembran (siehe 3.4.1.) abgetötet wird und somit weniger eGFP exprimieren kann. Folglich war die MFI bei den IC21-Zellen dieses Ansatzes deutlich geringer im Vergleich zum Ansatz, bei dem der Leervektor kotransformiert wurde. Perforin, welches sich als nicht toxisch für Hefezellen erwies (siehe 3.4.1.), hatte keinen negativen Einfluss auf ein eGFP-„Delivery“ mittels Hefen. ssLLO, welches durch Fusion des K1-Sekretionssignales eine sekretorische Variante von Listeriolysin O darstellt, erwies sich im Wachstumstest als vermindert toxisch (siehe 3.4.1.). Somit wurden nach dessen Koexpression MFI-Werte im Bereich zwischen Perforin Δ C und LLO erwartet und auch nachgewiesen. Nach sieben Stunden wurde eine MFI von 592 detektiert. Die Hefen wurden durch die Koexpression von ssLLO auch abgetötet, aber in geringerem Umfang als bei LLO.

Zusammenfassend sprechen alle Daten der Koexpression von Listeriolysin O und Perforin Δ C dafür, dass die Translokation der Antigenkodierenden DNA aus dem Phagolysosom gesteigert werden kann, die mRNA Translokation hingegen durch die Koexpression von LLO durch den Abbau der Hefe vermindert wird.

4. Stimulation humaner antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen durch autologe DC nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“

Nach erfolgreicher Etablierung und Optimierung des Hefe-basierten Nukleinsäure-„Delivery“-Systems sollte abschließend die Fähigkeit des Systems untersucht werden, antigenspezifische Gedächtnis-T-Zellen zu stimulieren. Dadurch könnte, neben einer bereits bewiesenen Antigenexpression nach DNA- und RNA-„Delivery“, weiterhin eine korrekte Antigenprozessierung und –präsentation sichergestellt werden. Die Stimulation von antigenspezifischen Gedächtnis-T-Zellen durch autologe DC wurde bereits als geeignete Methode beschrieben, um die Cross-Präsentation von pp65 im Zusammenhang mit CMV-Partikeln zu testen (Tabi et al., 2001). Die DC sollen dabei die Antigene aufnehmen und präsentieren. Eine Übersicht über die hier verwendete Methode ist in Abbildung 43 dargestellt und wurde nach Scheller (2006) modifiziert. Aus humanen Leukozyten-Konzentraten wurden zunächst Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC) isoliert und diese durch Adhärenz in Monozyten und „peripheral blood lymphocytes“ (PBL) getrennt. Die PBL wurden dann in flüssigem Stickstoff eingefroren, während die Monozyten über fünf Tage zu iDC ausdifferenziert wurden. Im Anschluss erfolgte die Zugabe der Hefen. Während der folgenden Inkubation der Ansätze (48 h) sollten die DC die Hefen aufnehmen und das nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“ exprimierte Antigen präsentieren. Die PBL wurden aufgetaut, zu den Antigen-beladenen DC gegeben und nach der unter II., 31. beschriebenen Methode stimuliert. Nach Fixierung der Zellen wurde das Effektor-molekül INF- γ in Kombination mit CD69, welches früh nach Aktivierung auf den T-Zellen exprimiert wird, mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Antikörper angefärbt (Reddy et al., 2004). Zusätzlich wurden noch CD4 oder CD8 angefärbt, um die stimulierten T-Zellpopulationen unterscheiden zu können. Die Analyse erfolgte durchflusszytometrisch.

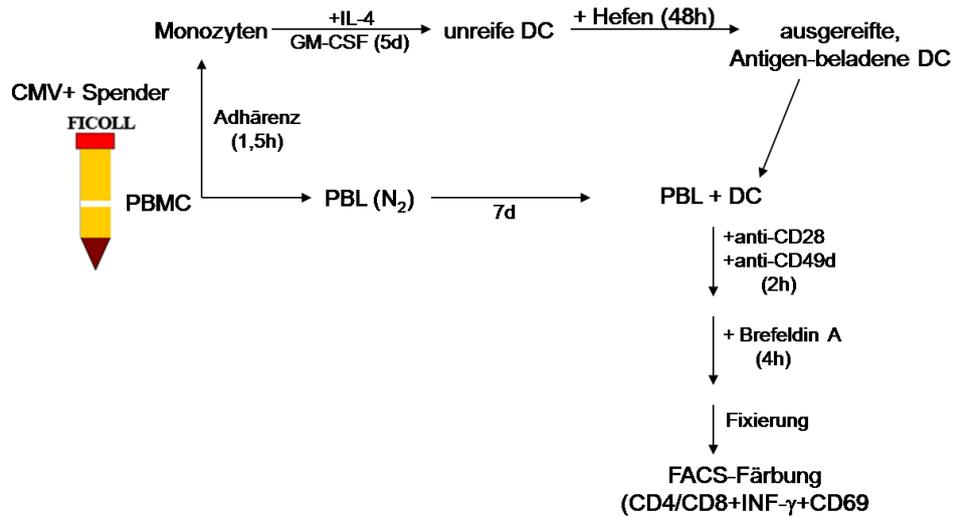


Abbildung 43: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes zur Stimulation von pp65-spezifischen Gedächtnis-T-Lymphozyten durch autologe DC.

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation aus einem Lymphozytenkonzentrat CMV-positiver Spender isoliert und mittels Adhärenz in Monozyten und PBL aufgetrennt. Die PBL wurden bis zur Weiterverwendung eingefroren und in flüssigem Stickstoff über sieben Tage gelagert. Die Monozyten wurden durch Zugabe der Zytokine IL-4 und GM-CSF zu unreifen DC differenziert. Nach Zugabe der Hefen und Inkubation über 48 Stunden entstehen ausgereifte, mit Antigen-beladene DC. Die beladenen DC wurden mit den aufgetauten PBL im Verhältnis 1:1 zusammengesetzt, mit kostimulatorischen Antikörpern (anti-CD28 und anti-CD49d) versetzt und 6 h inkubiert. Nach zwei Stunden erfolgt die Zugabe von Brefeldin A zur Hemmung der Zytokinsekretion. Nach Fixierung der Zellen folgt eine FACS-Färbung gegen die Oberflächenrezeptoren CD4 oder CD8, sowie gegen CD69 und eine intrazelluläre Färbung gegen INF-γ.

4.1. *S. cerevisiae* als Vehikel für pp65-kodierende DNA und mRNA zur Stimulation pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Lymphozyten

Zur Stimulation Antigen-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen wurde das Tegumentprotein pp65 von CMV als Antigen verwendet (Moss & Khan, 2004). Im Hinblick auf einen Einsatz der rekombinanten Hefen als Lebendvaccine ist es von Bedeutung sicherzustellen, dass durch eingebrachte Nukleinsäuren in den APC exprimierte Antigene korrekt von den Zellen des Immunsystems erkannt werden. Dies beinhaltet die Prozessierung des Antigens und die Präsentation von Peptiden im Kontext mit MHC I- und MHC II-Molekülen auf der Zelloberfläche der

APC als Grundlage für die Induktion einer Immunantwort. Sollte das „Delivery“-System die Induktion einer Immunantwort gegen das exprimierte Antigen vermitteln, so könnte diese auch das natürlich vorkommende Antigen effektiv erkennen und bekämpfen.

Das Tegument von CMV besteht zu etwa 95 % aus pp65 (Irmieri & Gibson, 1983; Landini et al., 1987). Darüber hinaus sind bis zu 95 % der CMV-spezifischen CTL pp65-spezifisch (McLaughlin-Taylor et al., 1994), was das Protein zu einem vielversprechenden Vakzine-Kandidaten macht. Weiterhin konnten pp65-spezifische CD8⁺ T-Lymphozyten nach Protein-„Delivery“ mittels *Sz. pombe* in einem Vollblut-Assay *ex vivo* (Breinig et al., 2003) und durch autologe, mit pp65 beladene DC (Scheller et al., 2007) antigenspezifisch stimuliert werden. Der Zugang zu Blutproben CMV-positiver Spender erlaubt die Stimulation von pp65-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen nach Hefe-„Delivery“ im humanen System.

Zur Herstellung der IRES-pp65 Fusion wurden die Primer 5`IRES und 3`IRES-pp65 zur Amplifikation der IRES-Sequenz, zur Amplifikation von pp65 die Primer 5`IRES-pp65 und 3`pp65 verwendet. Dabei wurde das 5`Ende der IRES-Sequenz um die Sequenz der Restriktionsschnittstellen *EcoRI* und *XhoI*, das 3`Ende von pp65 um die von *XbaI* und *SaII* verlängert. Zur Sequenzierung wurde die Fusion in pSTBlue-1 zwischenkloniert. IRES-pp65 wurde als *XhoI/XbaI* Fragment in den Vektor pPGK-6His/Xa/GST (Bernardy, 2006) einkloniert, in den zuvor die Promotoren CMV, *MLS1* und *ICL1* als *HindIII/XhoI* Fragment eingebracht wurden (Abb. 44).

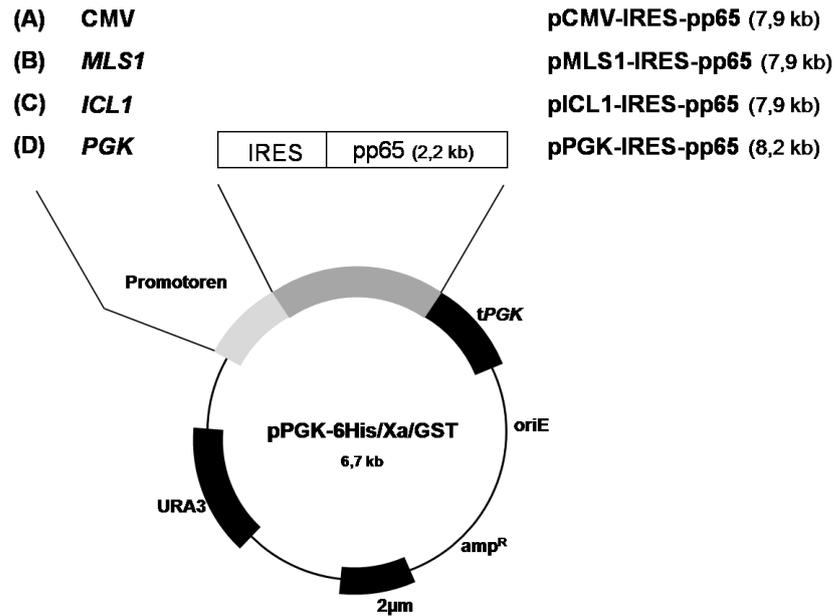


Abbildung 44: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pCMV-IRES-pp65, pMLS1-IRES-pp65, pICL1-IRES-pp65 und pPGK-IRES-pp65.

Die Vektoren enthalten die Sequenz der IRES-pp65 Fusion und die Sequenz des CMV-Promotors (A), des *MLS1*-Promotors (Promotor der Malat-Synthase) (B), des *ICL1*-Promotors (Promotor der Isocitrat-Lyase) (C) und des *PGK*-Promotors (Promotor der Phosphoglyceratkinase) (D) sowie die des *PGK*-Transkriptionsterminators der Hefe. Die Vektoren entstanden durch Insertion der IRES-pp65 Sequenz als *XhoI/XbaI* Fragment.

Im Folgenden wurde untersucht, ob nach „Delivery“ pp65-kodierender DNA und mRNA mittels Hefe eine Stimulation pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Lymphozyten aus CMV-positiven Spendern beobachtet werden kann. Da die Expression von pp65 in den DC erfolgte, sollten die mit pp65-beladenen DC in der Lage sein, CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen antigenspezifisch zu stimulieren. Dazu wurden 2×10^6 humane iDC 48 h mit den entsprechenden Hefen inkubiert. Danach wurden die DC mit FACS-Puffer gewaschen und zusammen mit anti-CD28 und anti-CD49d im Verhältnis von 1:1 zu autologen PBL gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Zytokinsekretion durch BFA-Zugabe inhibiert, nach weiteren vier Stunden wurden die Zellen fixiert und eine Färbung mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 in Kombination mit Antikörpern gegen CD69 und INF- γ durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 45 dargestellt.

Bei Durchführung des Experimentes mit Zellen eines CMV-positiven Spenders zeigte sich, dass durch Zugabe von mit pp65 beladenen iDC zu autologen PBL CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen stimuliert wurden (Abb. 45). Die von DC präsentierten pp65-Peptide stammten dabei von nach DNA- und RNA-„Delivery“ in DC exprimiertem pp65. Dabei wurden Frequenzen an INF- γ / CD69-doppelt-positiven CD8⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten nach DNA-„Delivery“ von 1,1 % erhalten. Die ermittelten Frequenzen nach RNA-„Delivery“ lagen höher als nach DNA-„Delivery“ (*MLS1*:1,24 %; *ICL1*: 1,04 %; *PGK*: 1,65 %). Die Stimulation CD4⁺ T-Zellen war deutlich geringer und lag bei 0,1 % Prozent (Daten nicht gezeigt). Die Stimulation der Gedächtniszellen war antigenspezifisch, da Hefen, welche mit dem Leervektor YEp352 transformiert wurden und somit kein pp65 in die DC einbrachten, nur eine schwache Hintergrundstimulation der Gedächtnis-T-Zellen auslösten (0,2 %). Dafür sprach auch, dass bei einem CMV-negativen Spender nach „Delivery“ pp65-kodierender DNA und mRNA nur schwache Gedächtnis-T-Zell-Antworten ausgelöst wurden, die vergleichbar mit den erhaltenen Daten des Leervektors waren (Daten nicht gezeigt). Bei dem dargestellten CMV-positiven Spender konnte nach RNA-„Delivery“ eine stärkere CD8⁺ Gedächtnis-T-Zell-Stimulation erhalten werden im Vergleich zu dem als Kontrolle mitgeführten CMV-Lysat (1,19 %). Die erhaltenen Daten an stimulierten pp65-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen zeigen deutlich, dass durch ein Hefe-vermitteltes Nukleinsäure-„Delivery“ eine effektive Antigenexpression, -prozessierung und -präsentation innerhalb der APC erfolgt. Diese verläuft so effizient, dass nach DNA- und RNA-„Delivery“ Frequenzen an Gedächtnis-T-Zellen erhalten wurden, die vergleichbar oder sogar höher waren als durch das CMV-Lysat stimulierte Frequenzen an CTL.

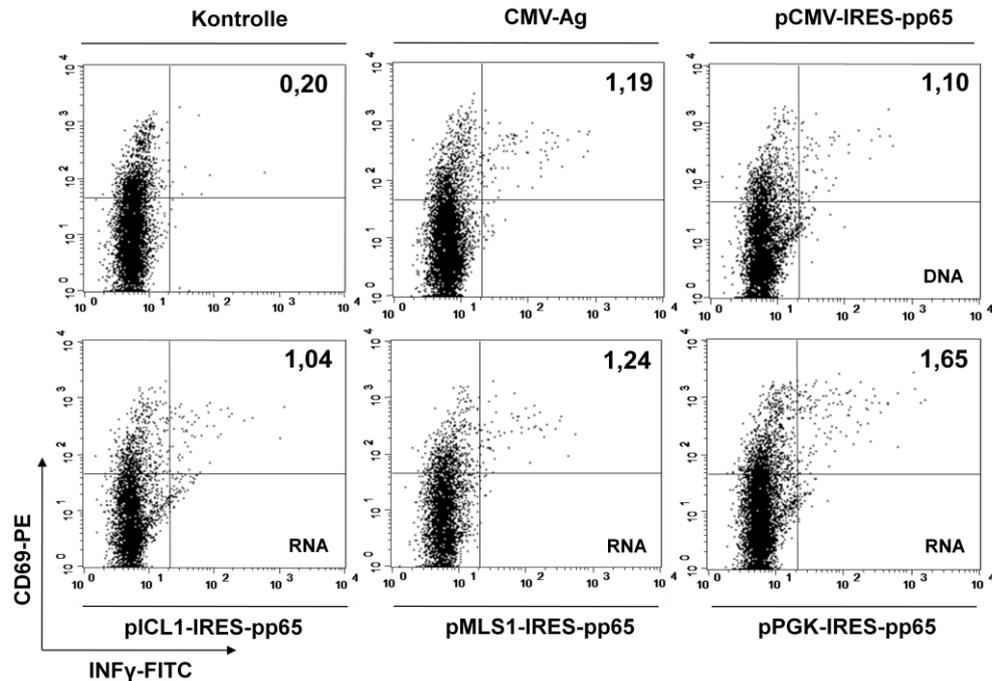


Abbildung 45: Stimulation pp65-spezifischer CD8⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten durch autologe DC nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“.

2 x 10⁶ iDC wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 5 infiziert und 48 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die eingesetzten Hefen enthielten die Plasmide pCMV-IRES-pp65, pICL1-IRES-pp65, pMLS1-IRES-pp65 oder pPGK-IRES-pp65. Als Negativkontrolle wurden Hefen verwendet, die mit dem Leervektor YEp352 transformiert wurden. Im Anschluss wurden die DC zusammen mit CD28 und CD49d im Verhältnis DC zu PBL von 1:1 zu autologen PBL gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Zytokinsekretion inhibiert, nach weiteren vier Stunden wurden die Zellen fixiert und einer Färbung gegen CD4 oder CD8 in Kombination mit CD69 und INF-γ unterzogen. Dargestellt sind die Prozentzahlen CD8⁺CD69⁺INF-γ⁺ T-Zellen eines repräsentativen CMV-positiven Spenders. Die Standardabweichung der parallelen Ansätze lautet wie folgt: Kontrolle: 0,14; CMV-Ag: 0,13; CMV: 0,15; ICL1: 0,12; MLS1: 0,12; PGK: 0,13.

4.2. Steigerung der Stimulation antigenspezifischer Gedächtnis-T-Lymphozyten durch Verwendung des SV40 Polyadenylierungssignals

Im folgenden Abschnitt wurde der Versuch unternommen, die in 4.1. gezeigte Stimulationseffizienz pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Lymphozyten noch weiter zu steigern. Dazu wurde das SV40 Polyadenylierungssignal anstelle des Hefeterminators *tPGK* als Transkriptionsterminator verwendet. Durch dieses Polyadenylierungssignal konnte

bereits in vorherigen Versuchen eine Steigerung der Antigenexpression in den APC erreicht werden (siehe 3.3.). Dabei vermittelte die lange Variante des SV40 Polyadenylierungssignals die größte Zunahme an Antigen-exprimierenden Zellen. Somit wurde der Hefeterminator *tPGK* in den Expressionsvektoren pCMV-IRES-pp65 und pICL1-IRES-pp65 durch die lange Variante des SV40polyA⁺ als *Bgl*II/*Sac*I Fragment ersetzt. Daraus resultieren die Expressionsvektoren pCMV-IRES-pp65-3 und pICL1-IRES-pp65-3 (Abb. 46).

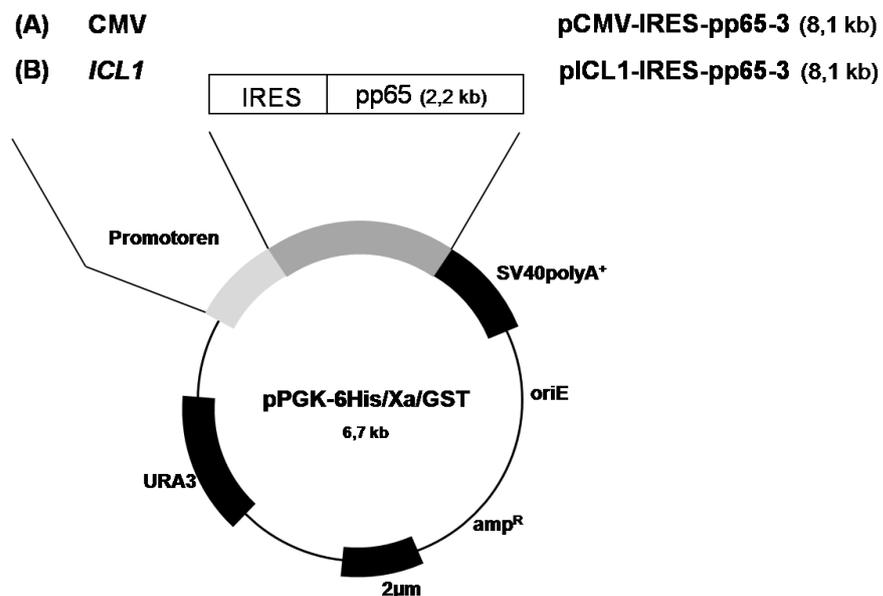


Abbildung 46: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren pCMV-IRES-pp65-3 und pICL1-IRES-pp65-3.

Die Vektoren enthalten die Sequenz der IRES-pp65 Fusion und die Sequenz des CMV-Promotors (A) und des *ICL1*-Promotors (Isocitrat-Lyase) (B) sowie die der langen Variante des SV40 Polyadenylierungssignals. Die Vektoren entstanden durch Insertion der Sequenz des SV40polyA⁺ als *Bgl*II/*Sac*I Fragment.

Da die Expression von pp65 in den DC erfolgte, sollten durch das Polyadenylierungssignal die Antigenexpression gesteigert und die Antigenpeptidpräsentation auf der Oberfläche der DC verbessert werden. Die mit pp65-beladenen DC sollten daraufhin verstärkt in der Lage sein, CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen antigenspezifisch zu stimulieren. Dazu wurden 2×10^6 humane iDC 48h mit den entsprechenden Hefen inkubiert. Danach wurden die DCs mit FACS-Puffer gewaschen und zusammen mit anti-CD28 und anti-CD49d im Verhältnis von 1:1 zu

autologen PBL gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Zytokinsekretion durch BFA-Zugabe inhibiert, nach weiteren vier Stunden wurden die Zellen fixiert und einer Färbung mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 in Kombination mit Antikörpern gegen CD69 und INF- γ unterzogen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 47 dargestellt. Die nach DNA- und RNA-„Delivery“ unter Kontrolle des CMV- und *ICL1*-Promotors erhaltene Anzahl an INF- γ / CD69-doppelt-positiven CD8⁺ T-Zellen wurde als 100 % gesetzt und die durch das Polyadenylierungssignal erhaltene Steigerung an INF- γ / CD69-doppelt-positiven CD8 T-Zellen errechnet. Beim DNA-„Delivery“ konnte eine Steigerung um 11 % an CD8⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten erhalten werden. Nach RNA-„Delivery“ betrug die Steigerung 67 %. Somit konnte durch eine verbesserte pp65 Expression in den DC die Stimulation pp65-spezifischer Gedächtnis-CD8 T-Zellen durch Verwendung des SV40 Polyadenylierungssignals verstärkt werden.

Durch die erhaltenen Ergebnisse wurde gezeigt, dass auch im humanen System nach Hefe-vermitteltem Nukleinsäure-„Delivery“ nicht nur eine Antigenexpression, -prozessierung und -präsentation sondern auch eine Aktivierung funktioneller T-Zellen möglich ist.

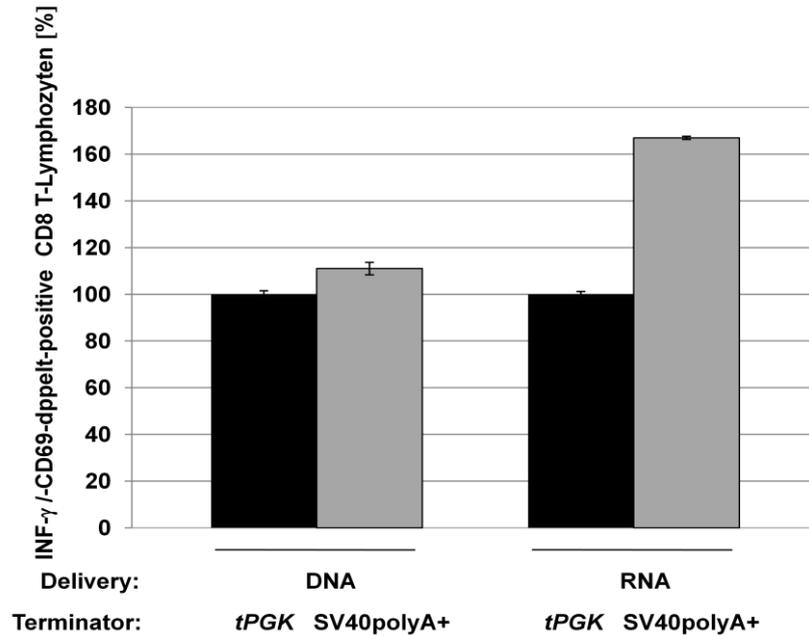


Abbildung 47: Steigerung der Stimulation pp65-spezifischer CD8⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten durch autologe DC nach Hefe-vermitteltem DNA- und RNA-„Delivery“ durch Verwendung des SV40 Polyadenylierungssignals.

2×10^6 iDC wurden mit Hefezellen (*S. cerevisiae* S86c) mit einer MOI 5 infiziert und 48 h bei 37°C, 5 %CO₂ inkubiert. Die eingesetzten Hefen enthielten die Plasmide pCMV-IRES-pp65, pICL1-IRES-pp65, pCMV-IRES-pp65-3 oder pICL1-IRES-pp65-3. Als Negativkontrolle wurden Hefen verwendet, die mit dem Leervektor YEp352 transformiert wurden. Im Anschluss wurden die DC zusammen mit CD28 und CD49d im Verhältnis DC:PBL von 1:1 zu autologen PBL gegeben. Nach zwei Stunden wurde die Zytokinsekretion durch Zugabe von BFA inhibiert, nach weiteren vier Stunden wurden die Zellen fixiert und einer Färbung gegen CD4 oder CD8 in Kombination mit CD69 und INF- γ unterzogen. Dargestellt sind die Prozentzahlen CD8⁺CD69⁺INF- γ ⁺ T-Zellen für einen CMV-positiven Spender. Die durch die Negativkontrolle erhaltene Hintergrundstimulation von 0,2 % wurde abgezogen. Die Fehler-balken repräsentieren die Standardabweichung zweier paralleler Versuchsansätze.

5. Verwendung von *Schizosaccharomyces pombe* als Vehikel zum Nukleinsäure-„Delivery“ in APC

Für *S. cerevisiae* konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Hefen dieser Gattung als Transportvehikel für Antigen-kodierende Nukleinsäuren geeignet sind. Analog zu dem für *S. cerevisiae* konstruierten „Delivery“-System wären auch Zellen weiterer Hefegattungen als Carrier zum Nukleinsäure-Transport in APC denkbar. Im folgenden Abschnitt wurden grundlegende Versuche zur Etablierung des „Delivery“-Systems für *Sz. pombe* durchgeführt. Heintel und Mitarbeiter wiesen nach, dass Hefen 14 verschiedener Gattungen Gedächtnis-T-Lymphozyten in menschlichem Vollblut unterschiedlich stark aktivieren. Dabei konnten sehr hohe Antworten hefespezifischer CD8⁺, jedoch nur geringe Antworten der entsprechenden CD4⁺ T-Lymphozyten beobachtet werden (Heintel et al., 2003). Dabei stimulierten intakte Zellen der Bäckerhefe *S. cerevisiae* und der Spaltheefe *Sz. pombe* lediglich eine geringe Anzahl an Gedächtnis-T-Lymphozyten. Somit stellt *Sz. pombe* neben *S. cerevisiae* einen potentiellen Kandidaten zur Impfstoffentwicklung dar. Nach Protein-„Delivery“ für rekombinant in der Spaltheefe exprimiertes pp65 konnte eine antigenspezifische CD4⁺ und CD8⁺ Gedächtnis-T-Zell Stimulation *ex vivo* in humanem Vollblut nachgewiesen werden (Breinig et al., 2003). Die Spaltheefe *Sz. pombe* weist mehr Merkmale höherer Eukaryonten auf als *S. cerevisiae*; darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Spaltheefe in der Lage ist, humane Gene unter der Kontrolle des CMV-Promotors sehr effektiv zu exprimieren (Giga-Hama et al., 1994; Toyama und Okayama, 1990). Aus diesem Grund sollte im folgenden Kapitel untersucht werden, ob *Sz. pombe* auch für einen Nukleinsäure-Transport in APC geeignet ist.

5.1. Ausreifung humaner iDC zu mDC durch die Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe*

Für *S. cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass Hefezellen verschiedener Stämme humane iDC zu mDC ausreifen (siehe 1.1.; Remondo et al., 2009). Analog dazu wurde untersucht, ob intakte Zellen der Spaltheefe *Sz. pombe* Stamm PW260 auch eine Ausreifung humaner iDC zu mDC bewirken, was eine Voraussetzung für die Stimulation naiver T-Lymphozyten darstellt. Dazu wurden aus Monozyten generierte iDC, analog zu Untersuchungen zur Ausreifung durch *S. cerevisiae*, im Verhältnis iDC:Hefe von 1:1 mit Spaltheften infiziert und 48 h inkubiert. Pro Stimulationsansatz wurden 1×10^6 iDC eingesetzt. Nach Zugabe des Hefestammes konnte eine Ausreifung der iDC zu mDC anhand von Oberflächenfärbungen distinkter Aktivierungsmarker auf DC mittels FACS-Analyse untersucht werden. Dargestellt sind die Ergebnisse zweier unabhängiger Spender (Abb. 48). Dabei konnte zwar kein Anstieg in der Anzahl CD83 positiver DC, aber eine erhöhte Expression von CD80, CD86, HLA-I und HLA-II verzeichnet werden. Somit kommt es durch den *Sz. pombe* Stamm PW260 zur Ausreifung von DC. Die Ergebnisse sind auch in Tabelle 7 wiedergegeben.

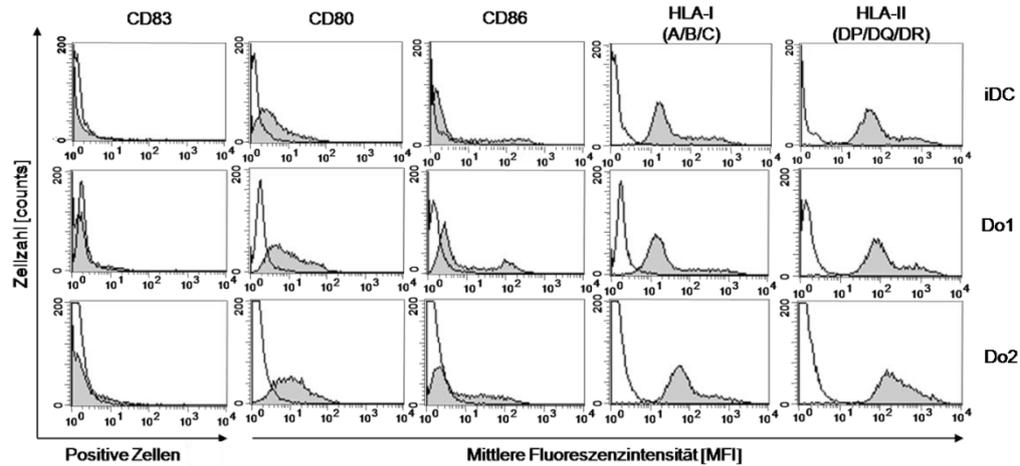


Abbildung 48: Quantifizierung der Ausreifung humaner iDC zu mDC durch den *Sz. pombe* Stamm PW260 anhand der Expression kostimulatorischer Oberflächenproteine und HLA-Moleküle.

1×10^6 iDC wurden mit Hefezellen des *Sz. pombe* Stammes PW260 mit einer MOI 1 infiziert und 48 h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, gewaschen, gefärbt und die Expression der charakteristischen Reifungsmarker im Durchflusszytometer bestimmt. Im Histogramm ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) bzw. die Anzahl positiver Zellen [%] gegen die Anzahl vermessener Zellen aufgetragen. In grau dargestellt ist die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenantigene, in weiß die dazugehörige Hintergrundfluoreszenz. Die dazugehörigen Werte der mittleren Fluoreszenzintensität sowie der Anzahl positiver Zellen sind in Tabelle 7 aufgeführt.

Tabelle 7: Expression der charakteristischen Reifungsmarker auf humanen DC zweier Spender nach Inkubation mit *Sz. pombe*.

Dargestellt sind die im Durchflusszytometer bestimmten mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Oberflächenmarker CD80, CD86, HLA-I und HLA-II, sowie der prozentuale Anteil an CD83 positiven Zellen nach Inkubation mit dem *Sz. pombe* Stamm PW260.

Ansatz	Mittlere Fluoreszenzintensität				Positive Zellen [%]
	CD80	CD86	HLA-I (A/B/C)	HLA-II (DR/DQ/DP)	CD83
iDC	13,6	102,5	74,7	156,9	1,2
Do1	18,0	40,1	133,9	375,4	11,5
Do2	19,4	68,9	69,4	239,1	5,8

5.2. Konstruktion eines Plasmidsystems für DNA- und RNA-„Delivery“ mittels *Sz. pombe*

Auf der Basis des episomalen Vektors pREP1 wurde in Analogie zum Vektorsystem aus *S. cerevisiae* ein Plasmidsystem zum DNA- und RNA-„Delivery“ für *Sz. pombe* hergestellt. Für ein DNA-„Delivery“ wurde nur der Promotor des murinen DC-STAMP verwendet, da eine Aktivität des CMV-Promotors für *Sz. pombe* nachgewiesen werden konnte (Toyama & Okayama, 1990). Für ein RNA-„Delivery“ sollte der induzierbare *ICL1*-Promotor eingesetzt werden, obwohl für *Sz. pombe* kein funktioneller Glyoxylatzyklus beschrieben ist (Lorenz & Fink, 2002; De Jong-Gubbels et al., 1996). Dazu wurde der *ICL1*-Promotor mittels PCR amplifiziert und dabei am 5`Ende um die Sequenz der Restriktionsschnittstelle *Pst*I verlängert. Am 3`Ende wurde die Sequenz für *Xho*I angefügt. Zur Sequenzierung wurde das Amplifikat in pSTBlue-1 zwischenkloniert. *ICL1*- und DC-STAMP-Promotor wurden als *Pst*I/*Xho*I-Fragment in den Vektor pREB1-BD eingefügt. Zusätzlich wurde der Hefeterminator *tnmt1* durch die lange Variante des SV40 Polyadenylierungssignals ersetzt, welches eine Steigerung der Antigenexpression bewirkt (siehe 3.3.). Das Polyadenylierungssignal wurde als *Bgl*II/*Sac*I Fragment in die konstruierten Expressionsvektoren integriert. Zur Untersuchung der Induktion des *ICL1*-Promotors in *Sz. pombe* wurde eGFP als *Xho*I/*Bgl*II Fragment in das Plasmid pREP1-*ICL1* einkloniert. Zum DNA-„Delivery“ wurden eGFP sowie die Fusion IRES-eGFP als *Xho*I/*Bgl*II Fragment in pREP1-DC-STAMP, zum RNA-„Delivery“ die IRES-eGFP Fusion in die Plasmide pREP1-*ICL1* und pREP1, eingebracht. Alle Plasmide zur Etablierung des „Delivery“ Systems in *Sz. pombe* sind in Abbildung 49 dargestellt.

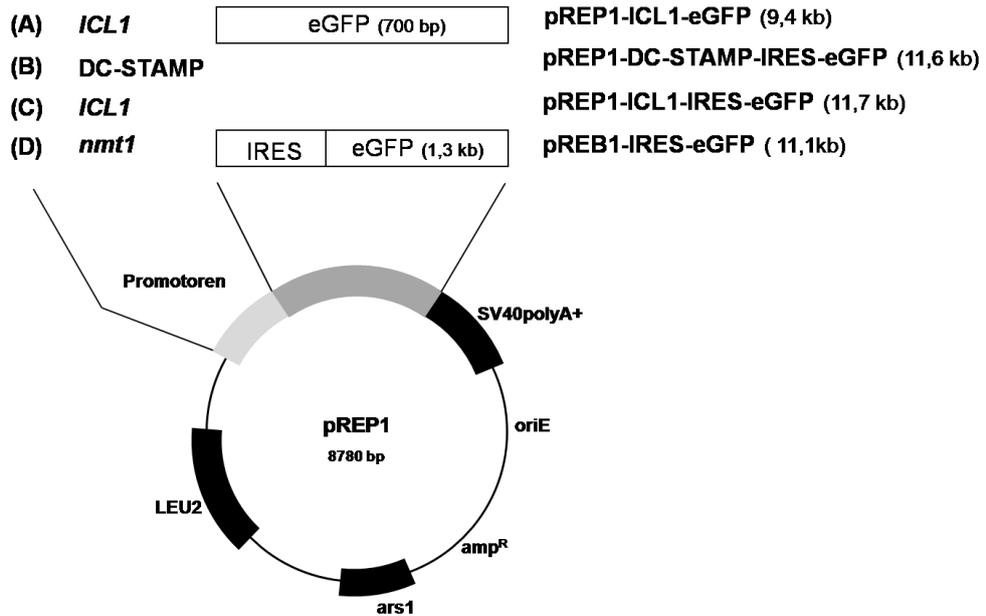


Abbildung 49: Schematische Darstellung der konstruierten Expressionsvektoren für ein DNA- und RNA-„Delivery“ in *Schizosaccharomyces pombe*.

Die Vektoren enthalten die Sequenz von eGFP oder der IRES-eGFP Fusion und die Sequenz des DC-STAMP (B), des *ICL1*-Promotors (Promotor der Isocitrat-Synthase) (A) und (C) und des *nmt1*⁺-Promotors („no message in thiamine“) (D) sowie die der langen Variante der SV40-Polyadenylierungssequenz (SV40polyA⁺). Die Vektoren entstanden durch Insertion der eGFP oder IRES-eGFP Sequenz als *XhoI/BglII* Fragment.

5.3. Charakterisierung der Bedingungen zum DNA- und RNA-„Delivery“ mittels *Sz. pombe* in verschiedene APC

Analog zum „Delivery“-System für *S. cerevisiae* mussten zunächst die Bedingungen für ein „Delivery“ mittels *Sz. pombe* untersucht werden. Dies beinhaltete die Optimierung der Aufnahmebedingungen der Spalt-hefe durch murine IC21-Makrophagen und humane DC. Zudem musste überprüft werden, ob der Promotor der Isocitrat-Lyase (*ICL1*) auch in *Sz. pombe* nach deren Aufnahme durch APC in den Phagolysosomen induziert wird.

Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von APC zu *Sz. pombe* wurden 1×10^5 IC21 / ml in einem „well“ einer 24-„well“ Platte ausgesät und acht Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit Spalthefen im Verhältnis IC21:Hefe von 1:1 bis 1:10

infiziert, welche GFP unter Kontrolle des *nmt1*-Promotors exprimierten und zusätzlich mit FDA angefärbt wurden. Nach mikroskopischer Kontrolle der Aufnahme der Hefezellen wurden die IC21 Zellen geerntet, fixiert und mittels Durchflusszytometer analysiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 50 dargestellt. Schon während der mikroskopischen Kontrolle der Aufnahme konnte festgestellt werden, dass ab einem Verhältnis von 1:6 keine vollständige Aufnahme der Hefen mehr erfolgte. Daraus resultieren auch die größeren Standardabweichungen bei einem Verhältnis von 1:6 bis 1:10. Die Anzahl GFP / FDA-positiver Zellen konnte ab Verhältnissen von 1:6 noch gesteigert werden, jedoch ergab sich für eine Aufnahme von *Sz. pombe* durch IC21-Zellen für ein reproduzierbares „Delivery“-System ein Verhältnis von 1:5 als optimales Verhältnis, wobei 31 % GFP / FDA-positiv IC21-Zellen erhalten wurden. Zur Untersuchung der Aufnahme von Spalthefen durch humane DC wurden 1×10^6 aus Monozyten generierte iDC mit GFP exprimierenden und FDA gefärbten Hefen in einem Verhältnis von iDC:Hefen von 1:1 bis 1:9 infiziert. Nach acht Stunden Inkubation bei wurden die DC geerntet, fixiert und zur FACS-Analyse zur Bestimmung von GFP / FDA-positiven DC eingesetzt. Die Ergebnisse der FACS-Messung sind in Abbildung 50 dargestellt. Es wurden nur Proben bis zu einem Verhältnis von 1:5 ausgewertet. Bei allen größeren Verhältnissen wurden kaum noch Hefen aufgenommen. Bei einem Verhältnis von 1:5 konnten 42 % GFP / FDA-positiv Zellen nachgewiesen werden. Zusammenfassend ist festzustellen, dass IC21 und humane DC im Vergleich zu *S. cerevisiae* mit einer geringeren MOI an *Sz. pombe* Zellen infiziert werden können.

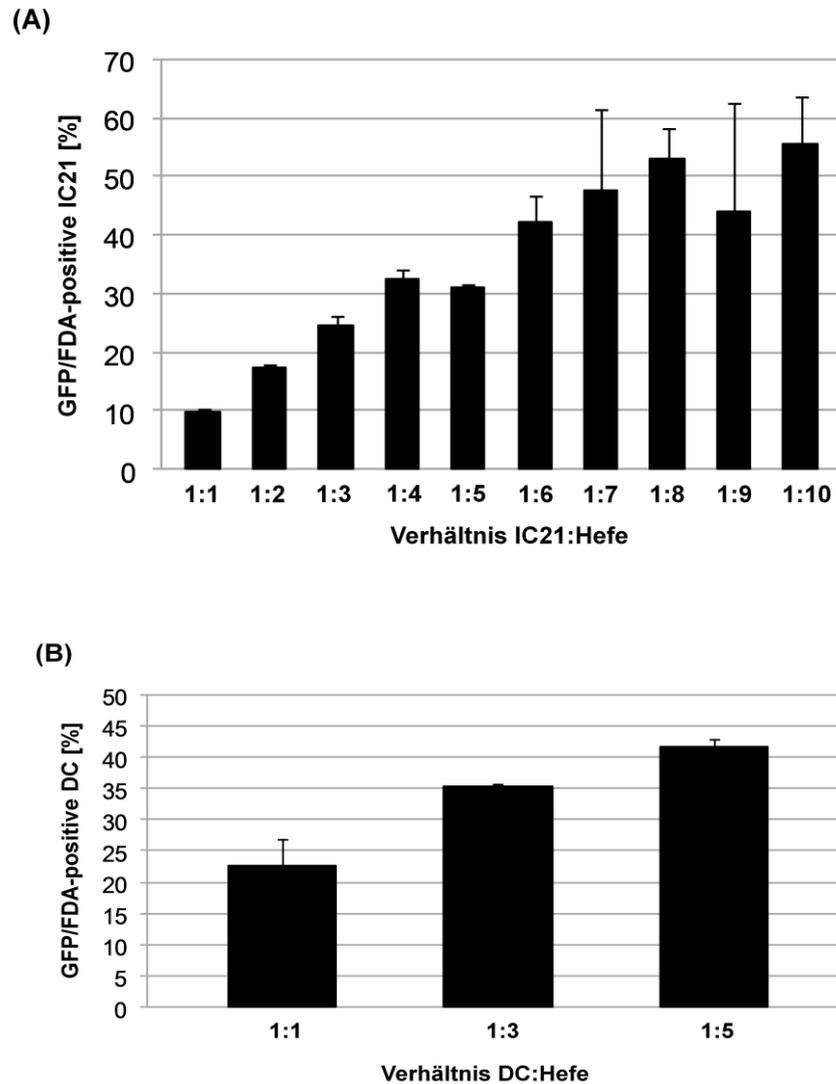


Abbildung 50: Aufnahmeoptimierung von Zellen der Spaltheefe *Sz. pombe* in murine IC21-Makrophagen (A) und humane DC (B).

Zur Ermittlung des optimalen Verhältnisses von Hefen zu IC21 bzw. DCs wurden Hefezellen des *Sz. pombe* Stammes PW260, welche mit dem Expressionsvektor pREP1-GFP transformiert und mit FDA gefärbt wurden, in unterschiedlichen Verhältnissen zu den APC gegeben. Die Aufnahme der Hefen wurde mikroskopisch kontrolliert und die Anzahl GFP / FDA-positiver Zellen durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse ermittelt. Dazu wurden jeweils 30.000 IC21-Zellen/DC im FACS untersucht.

Neben dem reprimierbaren *nmt1*-Promotor, der in Abwesenheit von Thiamin eine Expression erlaubt und durch Thiamin reprimiert wird, sollte der für *S. cerevisiae* beschriebene, induzierbare Promotor der Isocitrat-Lyase *ICL1* für das RNA-„Delivery“ mittels *Sz. pombe* verwendet werden. Dazu musste die Induktion des Promotors nach Kultiv-

ieren der Hefezellen auf Acetat-haltigem Medium sowie nach Aufnahme der Spalthefezellen durch DC überprüft werden. Zellen des *Sz. pombe* Stammes PW260 wurden dazu mit dem Expressionsvektor pREP1-ICL1-eGFP transformiert. Nach Anzucht der Hefezellen in leu d/o Medium, welches als Kohlenstoffquelle Glukose enthielt, wurden die Zellen in Medium, das Acetat als C-Quelle enthielt, überführt und 24 h bei 30°C inkubiert. Die Hefezellen wurden anschließend fixiert und im Durchflusszytometer auf eine Induktion des *ICL1*-Promotors mit folgender eGFP-Expression untersucht. Die Ergebnisse aus Abbildung 51 zeigen, dass durch Kultivierung der Hefen auf Acetat-haltigem Medium eine eGFP-Expression in den Hefezellen nachgewiesen werden konnte. Somit ist die Induktion des *ICL1* Promotors in *Sz. pombe* möglich, obwohl ein funktioneller Glyoxylatzyklus in Spalthefe bisher nicht beschrieben wurde (De Jong-Gubbels et al., 1996). Zur Induktion des *ICL1*-Promotors in den Phagolysosomen wurden die mit dem Plasmid pREP1-ICL1-eGFP transformierten Hefezellen im Verhältnis von 1:5 zu humanen iDC gegeben. Nach vier, acht, 16 und 20 Stunden Inkubation wurden die DC geerntet, fixiert und hinsichtlich einer eGFP-Expression im FACS analysiert. Die Ergebnisse aus Abbildung 51 zeigen, dass auch nach Aufnahme der Hefezellen eine Induktion des *ICL1*-Promotors in den Phagolysosomen erfolgt. Bereits nach vier Stunden konnten 44 % eGFP-positive DC nachgewiesen werden. Nach 16 h wurden dann weniger eGFP-positive Zellen detektiert, ein Trend, der sich auch nach 24 h fortsetzte und auf einen Abbau der Hefe sowie des exprimierten eGFP zurückzuführen ist. Es konnte gezeigt werden, dass der *ICL1*-Promotor in *Sz. pombe* induzierbar ist. Somit war der *ICL1*-Promotor für das RNA-„Delivery“ auch in dieser Hefegattung einsetzbar.

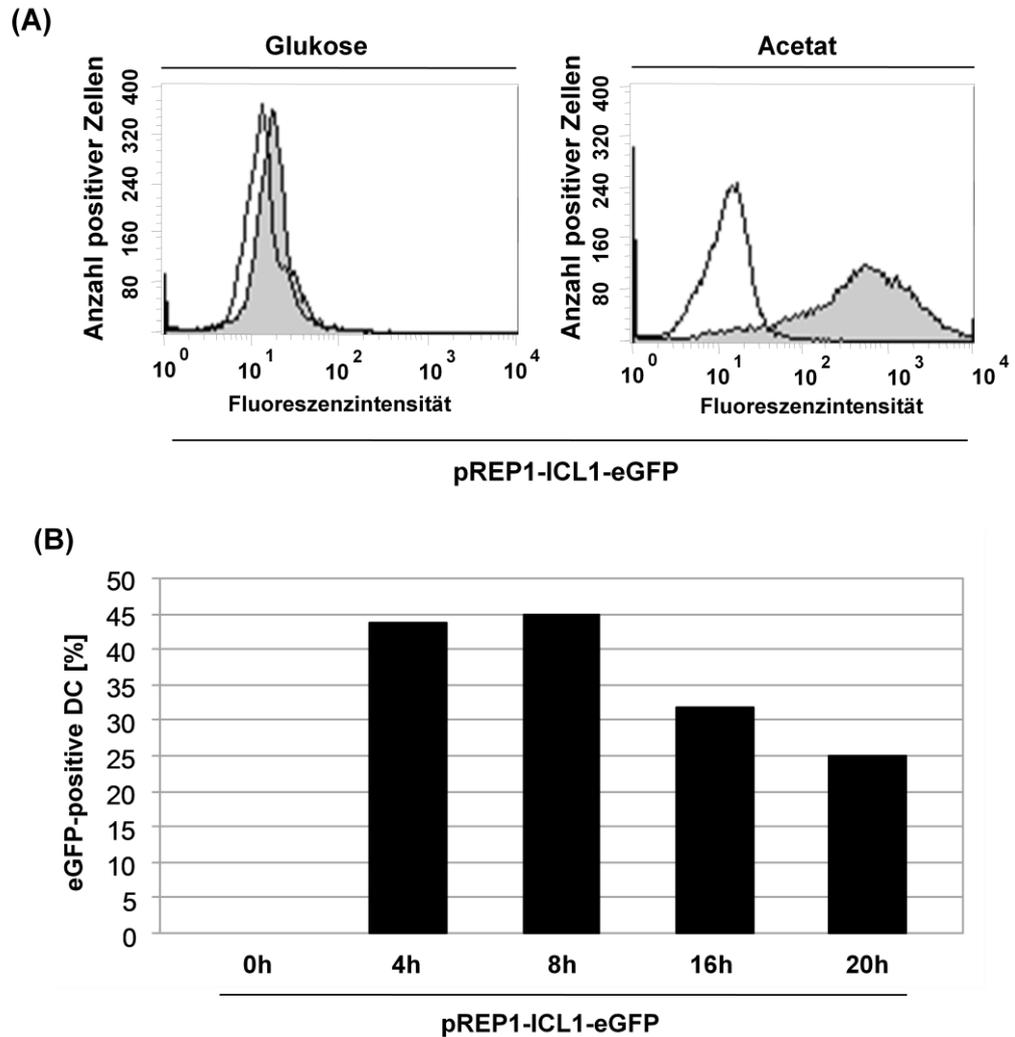


Abbildung 51: Induktion des Isocitrat-Lyase Promotors (*ICL1*) in *Sz. pombe* nach Kultivierung auf Acetat-haltigem Medium (A) sowie nach Aufnahme durch DC (B).

(A) Zur Untersuchung der Induktion des *ICL1*-Promotors wurden die mit pREP1-*ICL1*-eGFP transformierten Zellen des *Sz. pombe* Stammes PW260 (grau) 24 h in Acetat-haltigem Medium inkubiert und im Anschluss hinsichtlich einer eGFP-Expression mittels FACS-Analyse untersucht. Als „Overlay“ dienen Hefen des gleichen Stammes, die mit dem Leervektor pREP1 transformiert wurden.

(B) Zum Nachweis der Induktion des *ICL1*-Promotors in APC wurden die mit pREP1-*ICL1*-eGFP transformierten Hefen des *Sz. pombe* Stammes PW260 zu humanen DC gegeben. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die APC geerntet und die erhaltenen Proben hinsichtlich einer eGFP-Expression durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden 30.000 Zellen analysiert.

5.4. Expression des Modellproteins eGFP in APC nach DNA- und RNA-„Delivery“ mittels *Sz. pombe*

Ein „Delivery“ eGFP-kodierender DNA und mRNA mittels *Sz. pombe* und eine anschließende eGFP-Expression wurden in murinen Makrophagen untersucht, wobei für den Versuch die unter 5.3. charakterisierten Bedingungen Anwendung fanden. Zum Einsatz kamen Hefen des Stammes PW260, welche mit den Expressionsvektoren pREP1-DC-STAMP-IRES-eGFP, pREP1-ICL1-IRES-eGFP oder pREP1-IRES-eGFP transformiert wurden. Die Translation von eGFP in der Spaltheife konnte durch die Fusion der IRES-Sequenz an eGFP analog zu den Experimenten an *S. cerevisiae*, verhindert werden (Daten nicht gezeigt). Die Hefezellen wurden zu den murinen Makrophagen im Verhältnis IC21:Hefe von 1:5 gegeben. Nach Inkubation von 16 h wurden die Zellen geerntet, fixiert und zur FACS-Analyse eingesetzt.

Abbildung 52 zeigt, dass sowohl nach Einbringen eGFP-kodierender DNA als auch mRNA mittels *Sz. pombe* eine eGFP-Expression nachgewiesen werden konnte. Nach DNA-„Delivery“ wurden 19,4 % eGFP-positive IC21, nach RNA-„Delivery“ hingegen 25,2 % unter Verwendung des *ICL1*-Promotors und 30,8 % bei Gebrauch des *nmt1*-Promotors detektiert. Hierbei lieferte somit eine konstitutive Bildung Antigenkodierender mRNA (*nmt1*-Promotor) in den Hefen vor Aufnahme durch IC21-Zellen mehr eGFP-positive IC21 als eine induzierte mRNA Transkription (*ICL1*-Promotor) nach Aufnahme der Hefezellen. Die Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* ist somit neben *S. cerevisiae* ebenfalls als Transportvehikel für Nukleinsäure geeignet.

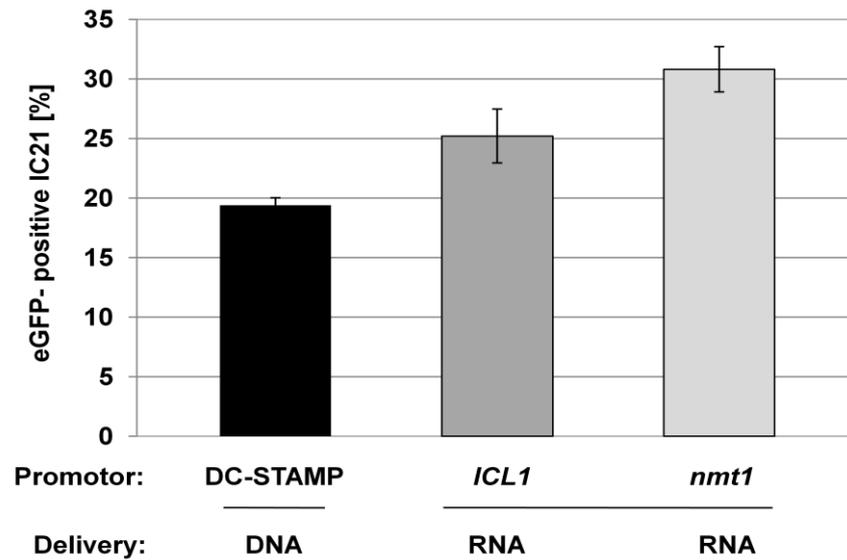


Abbildung 52: „Delivery“ eGFP-kodierender DNA und mRNA mittels *Sz. pombe* führt zur eGFP-Expression in IC21 Zellen

Murine Makrophagen wurden mit Hefen des *Sz. pombe* Stammes PW260 mit einer MOI 5 infiziert. Die Hefen enthielten den Expressionsvektor für ein DNA-„Delivery“ pREP1-DC-STAMP-IRES-eGFP bzw. die Expressionsvektoren für ein RNA-„Delivery“ pREP1-*ICL1*-IRES-eGFP und pREP1-IRES-eGFP. Zum Nachweis einer eGFP-Expression in IC21-Zellen wurden die Proben durchflusszytometrisch mittels FACS-Analyse untersucht. Dabei wurden 30.000 Zellen analysiert.

IV. Diskussion

Infektionskrankheiten stellen nach wie vor ein weltweites Problem dar. Aufgrund zunehmender Globalisierung und daraus folgend immer kürzeren Reisezeiten und globalen Handelswegen hat sich das Problem der schnellen Ausbreitung einer Infektion zunehmend verstärkt. Ein Beispiel dafür ist die schnelle Verbreitung des Influenza A Erregers H1N1, dem Erreger der Schweine Grippe, für den bis September 2009 18.797 Infizierte in Deutschland verzeichnet wurden (Robert Koch Institut, Berlin). Gegen viele Infektionskrankheiten wurden bereits Impfstoffe entwickelt, die erfolgreich gegen deren Ausbreitung eingesetzt wurden und teilweise lebenslangen Schutz vermitteln. So konnten aufgrund eines konsequent durchgeführten Impfprogramms gegen Pocken diese schließlich 1972 weltweit ausgerottet werden (Fenner, 1982). Jedoch existiert auch heute noch eine Reihe von Infektionen, gegen die es keinen wirksamen Impfschutz gibt. Besonders die Länder der Dritten Welt leiden unter Infektionskrankheiten, für die noch keine oder nicht ausgereifte Impfstoffe vorhanden sind. Ein Beispiel dafür ist das humane Immundefizienzvirus (HIV). 2008 waren weltweit insgesamt circa 33,2 Millionen Menschen HIV-positiv und somit mit dem Verursacher des „acquired immunodeficiency syndrom“ (AIDS) infiziert. Dazu kamen 2,5 Millionen Neuinfektionen weltweit. Es existiert keine Impfung gegen HIV. Es gibt heutzutage zwar wirksame Therapiemöglichkeiten, die den Krankheitsverlauf hinauszögern, allerdings finden sie aufgrund der hohen Kosten in Entwicklungsländern nahezu keine Anwendung. Neben HIV stellen Hepatitis-Infektionen ein weltweites Problem dar. Ungefähr 2 - 3 % der Weltbevölkerung sind mit dem Hepatitis-C-Virus infiziert. Dies entspricht 120 - 170 Millionen Menschen weltweit, von denen 100 - 130 Millionen als chronisch infiziert gelten (Perz, 2004). Jährlich kommen etwa drei bis vier Millionen Neuinfektionen dazu. Pro Jahr gibt es global ungefähr eine Million Todesfälle infolge von HCV-bedingten Leberzirrhosen oder

Leberkarzinomen (Perz et al., 2006). Gegen HCV kann therapiert werden, was im Gegensatz zu HIV auch zu einer Eliminierung des Virus führen kann, allerdings sprechen bis zu 40 % der Infizierten nicht oder nur schlecht auf die Therapie an (Braun & Vierling, 2003; Zeuzem, 2004). Gegenwärtig sterben jährlich etwa 15 Millionen Menschen an Infektionskrankheiten, darunter neben HIV- und HCV-Infizierten, Menschen, die an Malaria, Tuberkulose, Atemwegserkrankungen (Grippe, SARS) oder Durchfallerkrankungen (Cholera, Rotaviren) litten (Angaben WHO, 2008). Daher ist die Entwicklung von Impfstoffen essentiell.

Bis heute existieren verschiedene Impfstoffarten. Inaktivierte Pathogene sind in der Regel nur nach wiederholter Immunisierung in der Lage, Immunität zu erzeugen. Dabei werden meist nur schwache MHC I-restringierte CTL-Antworten induziert (Chanock et al., 1988). Die Induktion einer CTL-Antwort ist jedoch von besonderer Bedeutung bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger, wie beispielsweise Viren. Attenuierte Lebendimpfstoffe besitzen eine hohe Immunogenität und induzieren starke zelluläre T-Zellantworten (Leclerc, 2003). Jedoch existiert nicht von jedem Erreger ein attenuierter Lebendimpfstoff. Bei HIV zum Beispiel ist die Gefahr einer Reversion zum pathogenen Wildtyp aufgrund seiner hohen Mutationsrate enorm (Jetzt et al., 2000; Levy et al., 2004). Auch bei HCV besteht durch seine hohe Mutationsrate die Gefahr, dass attenuierte Viren zum pathogenen Wildtyp revertieren (Bartenschlager et al., 2004). Daher ist gerade bei diesen Pathogenen die Entwicklung alternativer Immunisierungsstrategien sinnvoll. Diese sollten sowohl eine humorale als auch zelluläre Immunität induzieren. In dieser Arbeit sollte die Hefe als Impfvehikel zum Transport Antigenkodierender Nukleinsäure in APC verwendet werden. Durch die Herstellung einer Lebendvakzine in Kombination mit einer DNA- oder RNA-Vakzine sollte gezielt eine antigenspezifische Gedächtnis-T-Zellantwort generiert werden.

Etablierung eines Systems zum Nukleinsäure-„Delivery“ mittels Hefen

Ein grundlegendes Problem bei der Entwicklung von Impfstoffen stellt die Induktion einer systemischen, durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelten Immunantwort dar, welche eine Präsentation von Epitopen über den MHC I-Weg benötigt. Der effektive Schutz gegen Infektionen wird durch CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen vermittelt. Die Präsentation von Antigenen durch reife DC führt zur effizienten Stimulation und Differenzierung naiver CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in Effektor- und Gedächtnis-Zellen (Dhodapkar et al., 2000; Dhodapkar et al., 2001). Ein wichtiger Parameter bei der Induktion einer Immunantwort durch DC ist die adäquate Aktivierung (Reifung) von DC, welche die Expression kostimulatorischer Moleküle und die Expressionssteigerung von HLA-Molekülen einleitet (Banchereau & Steinman, 1998). Nicht aktivierte Zellen induzieren bei der Präsentation eines Antigens an naive T-Zellen Toleranz (Jonuleit et al., 2000; Steinman et al., 2000). Die Verwendung von Hefen als Lebendvakzine und gleichzeitiges Trägersystem für Antigen-kodierende Nukleinsäure bietet viele Vorteile. Der Einsatz der Hefe vereint die Vorzüge eines Einzellers wie geringe Zellgröße, schnelles Wachstum und einfache Kultivierung mit denen eines eukaryotischen Organismus und dessen Fähigkeit zur N-Glykosylierung und komplexen posttranslationalen Modifikation von Proteinen. Weiterhin konnten Hefegattungen identifiziert werden, die eine geringe Eigenimmunität besitzen, darunter auch die mit Lebensmitteln oder Getränken aufgenommene Bäckerhefe *S. cerevisiae* (Heintel et al., 2003). Diese wurde bereits mehrfach als „Carrier“ zum Protein-„Delivery“, d. h. zum Transport verschiedener Antigene und zur Generierung einer Antigen-spezifischen zellulären Immunantwort verwendet (Stubbs & Wilson, 2002; Franzusoff et al., 2005). Ebenso ist ein Einschleusen rekombinant in Hefe exprimierter, exogener Antigene in den MHC I- und MHC II-Präsentationsweg möglich, wo durch „cross-

presentation“ neben einer Antigen-spezifischen CD4⁺- auch eine CD8⁺- Immunantwort generiert werden kann (Stubbs et al., 2001; Haller et al., 2007; Riemann et al., 2007; Boehm et al., 2009).

Zur Etablierung eines Hefe-basierten „Delivery“-Systems für Antigen-kodierende DNA und mRNA sollte in einem ersten Schritt ein geeigneter Hefestamm der Gattung *S. cerevisiae* identifiziert werden. Dazu wurden die verwendeten Stämme hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Aktivierung von DC untersucht. Für den *S. cerevisiae* Stamm W303- α konnte bereits eine Reifung von DC gezeigt werden (Bernstein et al., 2007; Remondo et al., 2009). Die in dieser Arbeit eingesetzten *S. cerevisiae* Stämme 192.2d, BY4742 und S86c vermittelten alle drei eine Ausreifung von iDC zu mDC. Dabei konnten sowohl eine Steigerung der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83 und CD86, als auch eine verstärkte MHC I- und MHC II-Expression beobachtet werden. Durch die Fähigkeit von Hefen, DC effektiv zu aktivieren, sind die Voraussetzungen zur Stimulierung naiver T-Zellen gegeben (Buentke & Scheynius, 2003). Somit wirkt die Hefe selbst als „Signal“ zur Aktivierung und Ausreifung Dendritischer Zellen. Diese Aktivierung wird durch Komponenten der Hefezellwand ausgelöst. Durch Mannan, ein Extrakt der Hefezellwand, wurde eine gesteigerte Oberflächenexpression von CD40, CD80 und CD86 auf DC und die Produktion inflammatorischer Zytokine, die an der T_H1- und T_H2-Immunantwort beteiligt sind, gezeigt (Sheng et al., 2006). Ebenso wird die Aktivierung von DC durch β -1,3-D-Glukane der Hefezellwand eingeleitet. Als Rezeptor für β -Glukan wurden Dectin-1, ein C-Typ Lektin, identifiziert, welches auf der Oberfläche von APC wie Makrophagen und DC exprimiert wird und die Internalisierung der Hefezellen vermittelt (Brown & Gordon, 2001; Reid et al., 2009; Goodridge et al., 2009). Darüber hinaus wurde ein Zusammenspiel von Dectin-1 und TLR-2 nachgewiesen, wodurch die Expression kostimulatorischer Moleküle und Aktivierungsmarker innerhalb der DC als Folge der durch TLR-2 vermittelten Signalkaskade erfolgen kann (Gantner et al., 2003).

Weiterhin musste zur Entwicklung des Hefe-basierten „Delivery“-Systems die Aufnahme der Hefen durch APC gewährleistet sein. Aufnahmeuntersuchungen in humanem Vollblut zeigten, dass Hefen vor allem von neutrophilen Granulozyten und Monozyten aufgenommen werden (Heintel et al., 2003). Weiterhin wurde die Aufnahme durch Makrophagen bzw. deren Vorläufern im Blut, den Monozyten, beschrieben (Owais & Gupta, 2000; Owais et al., 2001). Auch von DC werden Hefezellen effektiv phagozytiert (Newman & Holly, 2001; Stubbs & Wilson, 2002). Somit wurde für das in dieser Arbeit zu etablierende „Delivery“-System in einem weiteren Schritt das Verhältnis von APC zu Hefen zur optimalen Aufnahme bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, dass bei Verwendung der murinen Makrophagen Zelllinie IC21 das Verhältnis von IC21 zu Hefe von 1:7 die beste Aufnahme vermittelte. Bei Aufnahme der Hefen durch humane DC erwies sich das Verhältnis DC zu Hefe von 1:5 als bestes Verhältnis. Bei den als optimal bestimmten Verhältnissen bewies die mikroskopische Kontrolle die vollständige Aufnahme der Hefezellen, welche die Grundlage eines reproduzierbaren „Delivery“-Systems darstellt. Somit verläuft ein Hefe vermitteltes „Delivery“ viel effizienter im Vergleich zu einem auf Bakterien basierendem System. Dort müssen APC mit einer MOI von 50 infiziert werden, was dennoch in sehr niedrigen Transformations-effizienzen von unter 2 % resultiert (Schoen et al., 2005). Zudem haben Hefen den Vorteil, dass sie keine toxische Wirkung auf APC vermittelten. So konnte mittels Trypan-Blau-Test gezeigt werden, dass über 95 % aller IC21-Zellen auch nach Zugabe unterschiedlicher Hefemengen noch lebensfähig waren. Im Gegensatz dazu überlebten nur durchschnittlich 50 % der verwendeten Säugerzellen eine Listerien-infektion (Guzmán et al., 1996; Schoen et al., 2005).

Zum Transport von Antigen-kodierender DNA sowie mRNA wurde ein Plasmidsystem konstruiert, mit welchem, je nach Wahl des Promotors, ein DNA- oder RNA-„Delivery“ gewährleistet wurde. Von entschei-

dender Bedeutung für eine durch Hefe transportierte DNA-Vakzine ist die Inaktivität des gewählten Promotors in der Hefe selbst. Diese Voraussetzung konnte für die in dieser Arbeit verwendeten Promotoren für das DNA-„Delivery“, CMV-, DC-STAMP und Fascin-Promotor, durch Nachweis der Inaktivität der Promotoren in *S. cerevisiae* mittels Northern-Analyse erfüllt werden. Für alle drei eingesetzten Promotoren ist eine Aktivität in *S. cerevisiae* bisher nicht beschrieben und kann durch die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse ausgeschlossen werden. Lediglich für *Sz. pombe* konnte eine Aktivität des CMV-Promotors gezeigt werden (Toyama & Okayama, 1990). Das Ausbleiben der Bildung Antigen-kodierender mRNA Transkripte in der Hefe garantiert das „Delivery“ der Antigen-kodierenden DNA.

Zur Gewährleistung eines Hefe-vermittelten Transports von mRNA musste die Translation in Hefe verhindert werden. Durch Anfügen einer viralen IRES-Sequenz an das 5' Ende der Antigensequenz konnte die Antigentranslation in Hefe gehemmt werden. Diese Beobachtung deckt sich mit Literaturdaten von Estefania und Mitarbeitern, die nach Fusion der IRES-Sequenz des *Encephalomyocarditis* Virus an die Sequenz von Prothymosin α keine Translation des Reportertranskriptes in Hefezellen nachweisen konnten (Estefania et al., 1993). Ein „Delivery“ Antigen-kodierender mRNA mittels Hefe sowie eine anschließende Translation in der Säugierzelle konnte somit durch Fusion der IRES-Sequenz an die Sequenz des verwendeten Antigens garantiert werden. Die Bildung Antigen-kodierender Transkripte in der Hefe wird durch die Wahl des konstitutiven Hefepromotors der Phosphoglyzeratkinase (*PGK*) gesichert. Auch ein induziertes RNA-„Delivery“ konnte durch Verwendung der induzierbaren Hefepromotoren der Malat-Synthase (*MLS1*) und Isocitrat-Lyase (*ICL1*) gezeigt werden. Für die beiden Promotoren konnte sowohl in Hefe (in Abhängigkeit von der C-Quelle) als auch in APC eine Induktion nachgewiesen werden. Beschrieben ist die Induktion der beiden Promotoren nach Aufnahme der Hefezellen durch Makrophagen, wobei die Menge der unter Kontrolle der beiden Promotoren stehenden Enzyme Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase um

das 22-fache erhöht vorlag (Lorenz & Fink, 2001). Diese Ergebnisse deuteten auf die Anwesenheit starker Promotoren hin. Dies konnte anhand der erhaltenen Daten der Induktion nach Aufnahme der Hefezellen durch humane DC bestätigt werden. Bereits nach 1,5 Stunden konnte eine unter Kontrolle des *ICL1* Promotors erfolgte eGFP-Expression nachgewiesen werden, die eGFP-Expression unter Kontrolle des *MLS1* Promotors nach etwa 2,5 Stunden. Die dadurch exprimierte eGFP-Menge konnte in bis zu 40 % der DC nachgewiesen werden. Somit waren die Voraussetzungen zur Konstruktion eines Plasmid-Systems zum RNA-„Delivery“ erfüllt, welches ein konstitutives sowie induzierbares RNA-„Delivery“ erlaubt. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass unter den oben diskutierten Bedingungen ein Plasmid-System etabliert wurden, welches das „Delivery“ Antigen-kodierender DNA und mRNA mittels Hefe erlaubt.

Anhand einer durchgeführten Kinetik wurde der optimale Zeitpunkt bestimmt, an welchem die größte Menge an exprimiertem Antigen nach DNA- und RNA-„Delivery“ nachgewiesen werden konnte. Die durch Hefen eingebrachte eGFP-kodierende DNA stand dabei unter Kontrolle des CMV-Promotors, die eGFP-kodierende mRNA wurde unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors in Hefe transkribiert. Bereits acht Stunden nach Zugabe der Hefen zu IC21-Zellen wurde in den APC eine eGFP-Expression nachgewiesen. Die größte Menge an exprimiertem eGFP zeigte sich 16 Stunden nach Zugabe der Hefen. Mit ansteigender Inkubationsdauer wurde dann auch ein Abbau der Hefe und des exprimierten eGFP detektiert. Der Vergleich der erhaltenen Daten mit den Ergebnissen eines auf *Listeria monocytogenes* basierenden „Delivery“-Systems macht deutlich, dass nach Hefe-vermitteltem „Delivery“ Antigen-kodierender Nukleinsäuren bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine Antigenexpression nachzuweisen ist. Nach *L. monocytogenes* vermitteltem „Delivery“ war die stärkste eGFP Expression erst nach 48 Stunden erreicht. In den ersten 24 Stunden nach Infektion blieb die Anzahl eGFP-positiver Zellen konstant (Schoen

et al., 2005). Um eine Antigenexpression mit anschließender Immunantwort zu erhalten, müssen die verabreichten Listerien selbst zunächst replizieren (Gernot Geginat, persönliche Mitteilung). Dies könnte die insgesamt längere Zeitspanne mit bis zu 48 Stunden bis zum Erreichen der größten Menge an exprimiertem Antigen im Vergleich zum Hefesystem erklären. Insgesamt wurden weiterhin auch weniger eGFP-positive Zellen nach Listerien vermitteltem „Delivery“ im Vergleich zum Hefe-basierten „Delivery“ erhalten. Dies könnte auf die geringe Infektionsrate oder auf den toxischen Effekt der Listerien hinsichtlich der Säugerzellen selbst zurückgeführt werden (Barsig & Kaufmann, 1997; Carrero et al., 2004; Schoen et al., 2005), ein Effekt, der in eigenen Untersuchungen mittels Trypan-Blau-Test für die Hefe ausgeschlossen werden konnte.

Eine Steigerung der verabreichten Hefemenge, wodurch auch die eingebrachte Menge an DNA und mRNA erhöht wurde, führte zu einem Anstieg eGFP-positiver Zellen. Somit deutet die Steigerung der MOI („multiplicity of infection“), also die Anzahl infektiöser Partikel, auf einen dosis abhängigen Effekt bezüglich der Transformationseffizienz hin. Wurde mehr Antigen-kodierende DNA oder mRNA durch mehr eingesetzte Hefen in die APC eingeschleust, so konnten größere Mengen Antigen exprimiert werden.

Zusammenfassend war es möglich, ein Hefe-basiertes „Delivery“-System erfolgreich zu etablieren, welches in der Lage ist, Antigen-kodierende Nukleinsäuren effektiv in verschiedene APC einzubringen. Durch die sehr effizient verlaufende Aufnahme der Hefen durch APC konnte ein Targeting zu diesen Zellen sichergestellt werden. Da die Hefe keinen toxischen Effekt auf APC vermittelt, wurden hohe Transformationseffizienzen / Infektionsraten erreicht.

Expression von Antigenen nach Hefe-vermittelten DNA- und RNA-„Delivery“ in verschiedenen APC

Die Immunisierung mit DNA führt zur *in vivo* Expression der kodierten Antigene und induziert somit eine zelluläre Antigen-spezifische Immunantwort (Shedlock & Weiner, 2000; Donnelly et al., 2005). Für die DNA-Immunisierung konnte gezeigt werden, dass die Aufnahme nackter DNA durch DC *in vivo* eher gering ist (Casares et al., 1997). Es existieren verschiedene Trägersysteme zum Transfer der DNA in DC, die entweder auf modifizierten human-pathogenen Viren, wie Adenoviren und Vacciniaviren, oder natürlichen und synthetischen Systemen basieren. Jedoch gestaltet sich dabei das Targeting zu DC (oder generell zu APC) als schwierig. Dieses Problem konnte durch die Verwendung von Hefen als Vehikel für Antigen-kodierende DNA umgangen werden. Ein Targeting zu APC ist durch die effektive Aufnahme der Hefen durch Makrophagen wie auch DC gewährleistet (Owais & Gupta, 2000; Owais et al., 2001; Newman & Holly, 2001; Stubbs & Wilson, 2002). Somit kann durch den Impfvehikel „Hefe“ die DNA direkt in den APC exprimiert und zur Antigenpräsentation eingesetzt werden.

Zur Induktion einer Immunantwort ist neben anderen Parametern die Expressionsstärke des Immunogens in den DC entscheidend. Möglichst viele MHC-Moleküle sollten mit Peptiden des prozessierten Immunogens an der Oberfläche präsentiert werden, was zur verstärkten Stimulation naiver T-Zellen führt (Iezzi et al., 1998). Das auf der DNA kodierte Antigen stand zur Expression in APC unter Kontrolle des CMV-Promotors. Dieser Promotor umfasst ein sehr weites Wirtsspektrum und ist in unterschiedlichen Arten von Säugerzellen funktionell (Linette et al., 2000). Eine Aktivität des Promotors in DC konnte von Scheller (2006) gezeigt werden. Ein weiterer kritischer Faktor stellt, noch vor der Promotoraktivität, der Transport der Antigen-kodierenden DNA in den Zellkern dar. In mitotisch inaktiven Zellen wie DC muss die Antigen-

kodierende DNA durch die Kernpore in den Zellkern eingeschleust werden, um mit der Transkriptionsmaschinerie der Säugerzelle in Kontakt zu kommen (Kis et al., 2004); ein Phänomen, welches als „bottleneck“ für eine DNA-Vakzine bezeichnet wird. Aufgrund der Größe von Plasmid-DNA ist ihr Eintreten in den Nukleus über passive Diffusion eher unwahrscheinlich, da die Kernpore selbst nur Partikel von 9 nm passieren lässt (Pante & Kann, 2002). Es konnte allerdings gezeigt werden, dass Nukleokapside von rekombinanten „*Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus“ (rAcMNPV) komplett durch die Kernpore in den Zellkern gelangen (Ma et al., 2000; Sarkis et al., 2000; van Loo et al., 2001; Ho et al., 2004). Somit scheint der Zugang zum Zellkern für virale DNA nicht begrenzt und ein Eintreten Antigen-kodierender Plasmid-DNA nach DNA-„Delivery“ in den Nukleus könnte somit möglich sein. Dies bestätigen auch die erhaltenen Ergebnisse zum DNA-„Delivery“ eGFP-kodierender DNA in IC21 Zellen sowie auch humane DC. Dabei konnte bei beiden APC eine eGFP-Expression innerhalb der Säugerzellen nach DNA-„Delivery“ nachgewiesen werden. Die Anzahl eGFP-positiver Zellen fiel nach DNA-„Delivery“ in humanen DC im Vergleich zu den murinen Makrophagen geringer aus, was dadurch zu erklären ist, dass DC nicht teilungsaktiv sind. Bei Makrophagen kann Antigen-kodierende DNA auch während der Mitose und der damit verbundenen Auflösung der Kernmembran in den Zellkern gelangen. Eine durch den CMV-Promotor kontrollierte Transkription mit anschließender Expression von eGFP im Zytosol der Säugerzellen resultierte in 30 % eGFP-positiven Zellen bei IC21 und 17 % bei humanen DC.

Eine Vakzinierung mit Antigen-kodierender mRNA hat im Vergleich zur DNA-Vakzinierung den Vorteil, dass kein Eintreten in den Zellkern nötig ist. Die Transkripte können direkt im Zytosol der APC translatiert werden (Ponsaerts et al., 2002; Ponsaerts et al., 2003). Die spontane Aufnahme nackter mRNA und die anschließende Antigen-Expression konnte für verschiedene Säugerzellen gezeigt werden (Wolff & Budker,

1990; Probst et al., 2007). Dennoch wäre das „Delivery“ von mRNA mittels eines Trägersystems effizienter, da Antigen-kodierende mRNA innerhalb kürzester Zeit von extrazellulären RNAsen abgebaut werden kann (Probst et al., 2006). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass nach „Delivery“ eGFP-kodierender mRNA mittels Hefe eine effiziente eGFP-Expression in IC21 Zellen und humanen DC nachgewiesen werden kann. Dabei erwies sich ein induziertes RNA-„Delivery“ unter Kontrolle des *ICL1*- und *MLS1*-Promotors in murinen Makrophagen als effizienter verglichen mit einem konstitutiven RNA-„Delivery“ unter Kontrolle des *PGK*-Promotors. Die größte Anzahl eGFP-positiver Zellen wurde nach Expression eGFP-kodierender Transkripte, welche unter Kontrolle des *ICL1*-Promotors standen, erhalten. Dies deckt sich auch mit den erhaltenen Daten zur *in vivo* Induktion der beiden induzierbaren Promotoren, wobei der *ICL1*-Promotors als stärkerer Promotor im Vergleich zum *MLS1*-Promotor in IC21-Zellen deklariert werden konnte. Interessanterweise zeigte sich der *MLS1*-Promotor nach RNA-„Delivery“ in humanen DC als effizientester Promotor, obwohl er zeitlich später und schwächer im Vergleich zum *ICL1*-Promotor in DC induziert wird. Dennoch konnte bei ihm ein Median-Wert resultierend aus vier unabhängigen Spendern von 20 % eGFP-positiver Zellen ermittelt werden. Bei den Ansätzen des *ICL1*- und *PGK*-Promotors wurde ein Median-Wert von 12 % eGFP-positiver DC erreicht. Ein Vergleich der erhaltenen Ergebnisse mit Daten, die nach DNA- und RNA-„Delivery“ mittels *Listeria monocytogenes* erhalten wurden, zeigt, dass dort nach DNA-„Delivery“ unter Kontrolle des CMV-Promotors lediglich 1 % eGFP-positive humane DC nachgewiesen wurden. Nach RNA-„Delivery“, vermittelt durch den T7-Promotor, waren es 9 % eGFP-positive humane DC (Schoen et al., 2005). Dieser Vergleich macht deutlich, dass durch Verwendung der Hefe als „Carrier“ ein wesentlich effizienteres Nukleinsäure-„Delivery“-System geschaffen werden konnte.

Neben dem Beweis einer Antigenexpression in APC nach DNA- und RNA-„Delivery“ unter Verwendung des Modellproteins eGFP konnte eine Antigenexpression durch den Nachweis eines weiteren Antigens, Ovalbumin, bestätigt werden. Nach Infektion von IC21-Zellen mit Hefen, welche die Ovacyt-kodierende Nukleinsäure einbrachten, konnte mittels Western-Analyse die Expression von Ovacyt eindeutig nachgewiesen werden. Somit wurde die Expression zweier Proteine, eGFP und Ovacyt, mittels FACS- oder Western-Analyse unabhängig voneinander bestätigt. Die Funktionalität des konstruierten durch Hefen vermittelten Nukleinsäure-„Delivery“-Systems konnte dadurch wiederholt bewiesen werden.

Nach dem Beweis einer Antigen-Expression in APC nach DNA- und RNA-„Delivery“ stellt sich nun die Frage, wie die Antigen-kodierende DNA bzw. mRNA nach Verdau der Hefe in den Phagolysosomen aus diesen in das Zytosol der APC gelangen kann. Listerien lösen diesen Schritt durch die Expression porenbildender Proteine, wie Listeriolysin O. Dadurch kommt es zur Porenbildung innerhalb der Membran der Phagolysosomen, was in einem Entkommen der Listerien aus den Phagolysosomen in das Zytosol resultiert (Hybiske & Stephens, 2008). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten jedoch, dass eine Antigenexpression in den APC nach Einbringen von DNA und mRNA mittels Hefe auch ohne Koexpression eines porenbildenden Proteins möglich ist. Es muss somit ein noch unbekannter Weg existieren, welcher den Transport der Antigen-kodierenden DNA und mRNA aus dem Phagolysosom in das Zytosol vermittelt. In mehreren Arbeiten wurde bis jetzt beschrieben, dass rekombinant in Hefe exprimierte Proteine mittels „cross presentation“ über MHC I präsentiert werden können (Stubbs et al., 2001; Stubbs & Wilson, 2002; Heintel et al., 2003; Breinig et al., 2003). Der genaue Mechanismus der „cross presentation“ wird noch untersucht und diskutiert. Eine mögliche Erklärung wäre die Verschmelzung von Plasmamembran und ER während der Bildung von Phagolysosomen in APC, wie Makrophagen und DC (Gagnon et al.,

2002; Touret et al., 2005). Dadurch bestünde die Möglichkeit, dass exogene Antigene mit Komponenten der Retrotranslokationsmaschinerie in Kontakt kommen. Weitere Daten weisen daraufhin, dass Sec61, ein Kanal, welcher an der Retrotranslokation der ER-Proteinqualitätskontrolle („endoplasmatic reticulum associated degradation“. ERAD) beteiligt ist, in Membranen von Phagolysosomen präsent ist, was für seine Beteiligung an „cross presentation“ spricht (Kopito, 1997; Houde et al., 2003; Guermonprez et al., 2003). Somit könnten exogene Antigene das ER über Komponenten von ERAD verlassen (Desjardins, 2003; Rock, 2003). Einen Beleg dafür liefert das Blockieren der Proteintranslokation mittels *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, wodurch das Phänomen der „cross presentation“ ausbleibt (Ackerman et al., 2006). Im Zytosol werden die Antigene durch das Proteasom zu Peptiden abgebaut und können wieder über TAP zurückgeschleust werden, um eine Bindung mit MHC I-Molekülen einzugehen (Ackerman et al., 2005). Vielleicht bestünde durch Vorkommen eines noch unbekanntes Kanals in der ER-Membran eine Möglichkeit, wie extrachromosomale Nukleinsäuren von internalisierten Hefen aus dem Phagolysosom oder nach Verschmelzen mit dem ER aus diesem entkommen können oder sie nutzen einen anderen spezifischen, aber noch unbekanntes Mechanismus, um ins Zytosol der APC zu gelangen. Diesen nehmen vielleicht auch Listeriolysin O-defiziente Listerien-Stämme. Dies postulierten zwei unabhängige Arbeitsgruppen, deren Ergebnisse daraufhin deuten, dass LLO-defiziente Listerien-Stämme eine Antigen-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort in Verbindung mit einer protektiven Immunität vermitteln (Bahjat et al., 2006; Hamilton et al., 2006). Ein Entkommen der Listerien aus den Phagolysosomen muss somit auch hier stattfinden, um eine MHC I vermittelte T-Zellantwort zu generieren. Der genaue Mechanismus, wie diese LLO-defizienten Listerien Stämme ins Zytosol gelangen, ist weiterhin unbekannt. Für nichtphagozytierende Zellen ist für diese Stämme auch ein alternativer Weg über zwei bakterielle Phospholipasen C (PLC) beschrieben (Smith et al., 1995; Marquis & Harger, 2000; O`Riordan et al.,

2002). Die Hauptfunktion bakterieller Phospholipasen wird in der Zerstörung der Membran von Vakuolen gesehen, wodurch bakterielle Erreger einem Abbau durch die APC entgehen. Auch in *S. cerevisiae* kommen Phospholipasen vor (Demczuk et al., 2008). Vielleicht vermitteln sie in Analogie zu bakteriellen Phospholipasen eine Möglichkeit, wie Nukleinsäuren aus den Phagolysosomen in das Zytosol transloziert werden können. Eine weitere Erklärung wäre ein Platzen der Phagolysosomen nach effizienter Aufnahme von Hefezellen, wodurch die Antigen-kodierende Nukleinsäure das Zytosol der APC erreichen würde. Mikroskopische Untersuchungen von IC21-Zellen zeigten, dass Makrophagen sehr viele Hefezellen aufnehmen können, wodurch IC21-Zellen beobachtet wurden, die bis zu 10 Hefezellen internalisierten. Ein Platzen der Phagolysosomen wäre aufgrund dieser Hefemenge durchaus denkbar.

Optimierung des DNA- und RNA-„Delivery“-Systems

Nach der Etablierung eines Hefe-vermittelten Nukleinsäure-„Delivery“-Systems befasste sich ein weiterer Teil dieser Arbeit mit der Optimierung dieses Systems. Die Verbesserungsversuche hatten dabei jeweils das Ziel, eine Steigerung der Antigen-Expression zu erreichen, um im Folgenden eine verstärkte Antigenpräsentation und T-Zellstimulation zu vermitteln.

1) Verwendung APC-spezifischer Promotoren und Durchführung eines Plasmid-/ Selektionsmarkerwechsels

DC stellen neben Makrophagen und B-Zellen die effizientesten APC des Immunsystems dar. Sie besitzen die Fähigkeit, naive T-Zellen zu stimulieren (Steinman, 1991). Eine Antigenpräsentation über MHC-Moleküle durch DC ist zur Induktion einer Immunantwort von ent-

scheidender Bedeutung. Ein Targeting von Antigen-kodierender DNA und mRNA ist durch das „Delivery“ basierend auf Hefen als „Carrier“ zu DC gewährleistet und eine Antigenexpression nach DNA-„Delivery“ unter Kontrolle des CMV-Promotors konnte für DC in dieser Arbeit gezeigt werden. Durch Verwendung DC-spezifischer Promotoren, wie der Promotoren von murinem DC-STAMP und humanen Fascin, galt es die Antigen Expression in DC zu verbessern. Obwohl eine Aktivität des Fascin-Promotors für DC beschrieben ist, konnte diese in dieser Arbeit für humane DC nicht nachgewiesen werden. Unter Kontrolle des DC-STAMP-Promotors konnten nach DNA-„Delivery“ eine annähernd gleiche Anzahl eGFP-positiver DC im Vergleich zum CMV-Promotor erzielt werden. Beide Promotoren zeigten auch eine Aktivität in IC21-Makrophagen, was aufgrund ihrer beschriebenen Aktivität in DC nicht zu erwarten gewesen wäre. In IC21 konnte in drei unabhängigen Experimenten eine Steigerung der eGFP-Expression durch Verwendung des DC-STAMP- sowie auch des Fascin-Promotors nachgewiesen werden. Da es sich bei dem DC-STAMP-Promotor um die murine Variante des Promotors handelt, ist eine Aktivität in murinen Makrophagen noch denkbar. Seine Aktivität ist jedoch bevorzugt für DC beschrieben (Eleveld-Trancikova et al., 2005; Hartgers et al., 2000). Für Fascin hingegen ist bis heute ausschließlich eine Aktivität in humanen reifen DC publiziert (Ross et al., 2003).

Durch die Verwendung einer viralen IRES-Sequenz des *Enzephalomyokarditis* Virus kann die Translation in Säugerzellen gesteigert werden (Clontech, Palo Alto, CA, Schoen et al., 2005). Dies zeigte sich in dieser Arbeit, in der durch Fusion der IRES-Sequenz an die Sequenz von eGFP, dessen Translation nach DNA-„Delivery“ unter Kontrolle aller drei zum DNA-„Delivery“ eingesetzten Promotoren gesteigert werden konnte. Die IRES-Sequenz erlaubt die Bindung von Ribosomen unabhängig von der 5`-Cap-Struktur (Bergamini et al., 2000). Neben einer verbesserten Translation vermittelt die IRES-Sequenz weiterhin die Bildung von Sekundärstrukturen, wodurch es zu einer verminderten mRNA-Degradation kommen kann (Hambraeus et al., 2000). Somit

spielt die IRES-Sequenz eine duale Rolle hinsichtlich einer verbesserten Translation und Stabilität transkribierter mRNAs.

Eine weitere Optimierung sollte durch einen Plasmid-/ Selektionsmarkerwechsel erzielt werden. Dem lag die Idee zugrunde, durch Verwendung des Grundvektors YEp351, mit einem *LEU2d* Selektionsmarker, die Anzahl mittels Hefe eingebrachter DNA oder mRNA im Vergleich zu dem auf YEp352-basierenden System mit *URA3*-Marker zu steigern. Das Plasmid-System basierend auf dem Vektor YEp351 enthielt als Selektionsgen *LEU2d*. Dieses stellt eine mutierte Form des ursprünglichen *LEU2*-Gens dar, was in einer verminderten Leucin-Expression resultiert. Um die fehlende Menge an Leucin und somit den Bedarf der Hefezellen an Leucin zu decken, muss die Hefezelle die Replikation der Plasmide verstärken (Erhart & Hollenberg, 1983). Der Plasmidwechsel führte jedoch zu keiner Steigerung der Antigenexpression. Verglichen mit Daten des auf YEp352 basierenden Plasmid-Systems (*URA3*-Marker) wurde nach DNA- und RNA-„Delivery“ eine geringere Anzahl eGFP-positiver Zellen beobachtet. Ob durch den *LEU2d*-Selektionsmarker in den jeweiligen Hefetransformanten wirklich eine höhere Anzahl an Antigen-kodierenden Plasmiden vorlag, ist nicht nachzuweisen. Eine generelle Aussage über die genaue Kopienzahl von Plasmiden in einer Hefezelle ist nicht möglich. Beide Vektoren, YEp352 und YEp351, stellen „high copy“ Vektoren dar, welche mit einer Kopienzahl von 20 bis 200 in einer Hefezelle beschrieben sind (Hill et al., 1986). Dennoch kann das Vorkommen der Plasmide zwischen unterschiedlichen Hefetransformanten stark variieren.

2) Austausch des Hefetranskriptionsterminators durch das SV40 Polyadenylierungssignal

Eine weitere Steigerung der Antigenexpression sollte durch den Austausch des *PGK*-Transkriptionsterminators der Hefe durch das SV40 Polyadenylierungssignal erreicht werden. Dieses stellt ein effizientes und oft verwendetes Signal in Säugerexpressionsvektoren dar (van den Hoof et al., 1993). Es ist wichtig für die Stabilität der mRNA und erhöht deren Translationseffizienz (Jackson & Standart, 1990; Gray & Wickens, 1998). Dabei sollte es einen „poly-A tail“ von minimal 30 Resten, bevorzugt von mehr als 100 Resten generieren (Mockey et al., 2006; Holtkamp et al., 2006). Unter Verwendung zweier unterschiedlich langer Varianten des SV40 Polyadenylierungssignals konnte eine verstärkte eGFP-Expression nach DNA- und RNA-„Delivery“ durch eine erhöhte mittlere Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Weiterhin wurde die Anzahl eGFP-exprimierender Zellen nach RNA-„Delivery“ und Verwendung der langen Variante gesteigert. Folglich konnten mehr IC21-Zellen eGFP translatieren, was auf eine erhöhte Stabilität der Antigen-kodierenden mRNA hinweist. Nach DNA-„Delivery“ wurde bei den Ansätzen der kurzen wie auch der langen Variante des Poly-A-Signals kein Unterschied in der Anzahl positiver Zellen ausgemacht. Dies ist insofern nicht verwunderlich, da beide Varianten für eine Expression in Säugorzellen in dafür konstruierten Vektoren vorliegen und dafür geschaffen wurden. Die komplette Antigen-Expression erfolgt nach DNA-„Delivery“ in der Säugorzelle. Beim RNA-„Delivery“ jedoch wird die Antigen-kodierende mRNA mittels Hefe eingebracht. Somit muss sie zunächst nach Abbau der Hefen in den Phagolysosomen in das Zytosol der APC gelangen, was eine erhöhte Stabilität der mRNA erfordert. Aus diesem Grund ist es nicht erstaunlich, dass die größte Menge an eGFP nach Verwendung der langen Variante des Polyadenylierungssignals aufgrund der erhöhten Stabilität der mRNA exprimiert wurde. Weiterhin könnten Unterschiede innerhalb des Hefe-PolyA-„tail“ und dem Säuger-PolyA-„tail“ bestehen und demzufolge

Unterschiede zwischen von Hefe-transkribierten und im Säuger-gebildeten mRNAs existieren. Somit wäre eine verbesserte Translation des Antigens in Säugerzellen nach Verwendung des SV40 Polyadenylierungssignals zu erwarten.

3) Koexpression porenbildender Proteine

Um eine effiziente Antigenexpression in den APC nach DNA- und RNA-„Delivery“ zu erhalten, müssen große Mengen an Antigen-kodierender DNA oder mRNA nach Verdau der Hefen die Phagolysosomen verlassen und das Zytosol der APC erreichen. Eine Verbesserung der Translokation der Antigen-kodierenden Nukleinsäuren aus den Phagolysosomen in das Zytosol der APC sollte folglich in einer gesteigerten Antigenexpression resultieren. Listerien exprimieren natürlicherweise porenbildende Proteine wie das Listeriolysin O, welches cholesterol-abhängig Poren innerhalb von Membranen bilden kann, jedoch keine Porenbildung in der Plasmamembran infizierter Zellen selbst vermittelt (Glomski et al., 2002; Hybiske & Stephens, 2008). Über diesen Weg können Listerien aus den Phagolysosomen entkommen und erreichen das Zytosol von APC. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden Listerien in den letzten Jahren als Impfvehikel verwendet, um neben rekombinanten Antigenen auch Antigen-kodierende DNA und mRNA in APC zu transportieren (Schoen et al., 2005). In dieser Arbeit wurde Listeriolysin O (LLO) aus *Listeria monocytogenes* zur verbesserten Translokation von Nukleinsäuren aus dem Phagolysosom in der Hefe koexprimiert. LLO wird als Vorläuferprotein mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert (Mengaud et al., 1988). Diese wird entfernt und LLO wird als Monomer sezerniert (Geoffroy et al., 1989). Es gehört zu den „cholesterol-dependent pore-forming-cytolysins“ (CDC), einer Familie porenbildender Toxine, die von Vertretern der Gattungen *Clostridium*, *Streptococcus*, *Listeria* und *Bacillus* exprimiert werden und sich an Cholesterol innerhalb von Membranen binden (Tveten, 2005). Mehrere

LLO-Monomere polymerisieren dann nach Bindung an Cholesterol-enthaltende Membranen, oligomerisieren und bilden Poren mit einem Durchmesser von 20-30 nm in diesen (Kayal & Charbit, 2006). Neben LLO sollte auch humanes Perforin in Hefen koexprimiert werden. Perforin gehört zu den Haupteffektormolekülen cytotoxischer T-Lymphozyten und Natürlichen Killerzellen und vermittelt über den sekretorischen „Pathway“ zusammen mit Granzymen das Abtöten infizierter Zellen (Berke, 1995). Perforin wird als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und ungefähr 300 in der Mitte des Perforin Proteins befindliche Aminosäuren weisen Homologie zur C9 Komponente des Komplementsystems auf. Sie sind vermutlich auch für die Perforin-vermittelte Porenbildung in der Membran von Zielzellen verantwortlich (Uellner et al., 1997). Zur Ausbildung von Poren innerhalb der Membran von Zielzellen müssen Perforin-Monomere polymerisieren (Kataoka et al., 1994; Kataoka et al., 1996; Peters et al., 1991; Metkar et al., 2002; Persechini et al., 1989; Masson et al., 1990; Uellner et al., 1997). Dazu benötigt Perforin Kalzium (Blumenthal et al., 1984; Podack et al., 1985). Um eine maximale Perforin Aktivität zu erreichen, wurde eine Kalziumkonzentration von 30-1000 μM ermittelt (Henkart et al., 1984). Zur Bindung von Perforin an Phospholipide der Zielmembranen wurde eine Kalzium-abhängige Phospholipid-bindende C2 Domäne am C-Terminus von Perforin identifiziert und verantwortlich gemacht. Während der Passage von ER und Golgi der CTL ist diese Domäne durch die Bindung eines Glykans maskiert, wodurch keine Bindung an Phospholipide möglich ist. Jedoch wird das Glykan nach Verpackung von Perforin Proteinen in saure lytische Granula abgespalten, so dass die C2 Domäne freigesetzt wird. Nach Sekretion von Perforin und Kontakt mit Kalzium kann dieses an die C2 Domäne binden, so dass diese wiederum an Phospholipide binden kann (Uellner et al., 1997). Durch die Polymerisation bildet Perforin eine Pore von ~ 16 nm Durchmesser in Membranen von Zielzellen (Lowin et al., 1995; Liu et al., 1995; Voskoboinik et al., 2005). Diese Pore induziert den Zelltod der Zielzelle auf zwei unterschiedlichen Wegen, einmal durch osmotische

Lyse, zum Anderen durch das Eintreten weiterer Komponenten lytischer Granula wie Granzym B, welche Apoptose induzieren (Darmon et al., 1995; Darmon et al., 1996).

Frühere Studien beschrieben, dass der N-terminale Bereich von Perforin einen wichtigen Teil der Poren-bildenden Domäne darstellt (Ojcius et al., 1991; Persechini et al., 1992). Jedoch konnten Li und Mitarbeiter zeigen, dass eine auf 125 Aminosäuren verkürzte C-terminale Variante von Perforin funktionell ist (Li et al., 2001). Diese verkürzte Form wurde in der vorliegenden Arbeit in Hefe koexprimiert, zeigte im Wachstumstest aber keine Toxizität auf Hefezellen selbst. Auch nach Untersuchungen der Perforin-Aktivität im Wachstumstest bei verschiedenen Kalziumkonzentrationen konnte keine Wirkung von Perforin auf die Hefe nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu waren beide konstruierten LLO-Varianten, die intrazellulär oder sekretorisch mittels hefeeigenem K1 Sekretionssignal in Hefe exprimiert wurden, toxisch für Hefezellen. LLO bindet an Cholesterol innerhalb von Membranen (Tveten, 2005). Hefen besitzen jedoch kein Cholesterol in ihrer Plasmamembran, aber die nah verwandte Komponente Ergosterol (Dickson & Lester, 2002). Somit wäre es möglich, dass die von Hefen exprimierten LLO-Varianten zur Initiation der Porenbildung an Ergosterol innerhalb der Plasmamembran von Hefen binden. Eine Porenbildung konnte mittels Propidiumiodid-Färbung bestätigt werden.

Die Expression von biologisch funktionellem Perforin und Listeriolysin O durch die Hefe konnte weiterhin durch die Verbesserung der Ovalbuminpräsentation mit daraus resultierender Steigerung der Aktivierung Ova-spezifischer T-Lymphozyten nach Protein-„Delivery“ mittels Hefen und Koexpression von LLO und Perforin Δ C bestätigt werden. Die von aktivierten antigenspezifischen CD8⁺ T-Zellen produzierte Menge an INF- γ konnte durch die Koexpression um das Zehn- bis Elffache gesteigert werden. Durch die Koexpression dieser beiden porenbildenden Proteine wurde somit die Translokation von Ovalbumin ins Zytosol der

APC und darauf folgend die Ovalbumin-Präsentation gesteigert. Somit sollte auch die Translokation von Antigen-kodierenden Nukleinsäuren durch die Koexpression verbessert werden. Nach DNA-„Delivery“ konnte eine Steigerung der eGFP-Expression innerhalb der murinen Makrophagen IC21 nach Koexpression von LLO und Perforin Δ C nachgewiesen werden. Dies lässt den Schluss zu, dass beide Proteine eine Porenbildung innerhalb der Membran der Phagolysosomen vermitteln, so dass die eGFP-kodierende DNA leichter in das Zytosol der APC gelangen konnte. Dieser Effekt konnte nach RNA-„Delivery“ nur nach Koexpression von Perforin Δ C beobachtet werden, nach Koexpression von Listeriolysin O war die Anzahl eGFP-exprimierender Zellen deutlich reduziert. Diese Ergebnisse lassen sich durch den toxischen Effekt von LLO auf die Hefe selbst erklären. Tötet LLO die Hefe nach Aufnahme ab, steht dieser nicht mehr genug Zeit zur Verfügung, Antigen-kodierende Transkripte herzustellen. Diese Vermutung lässt sich auch durch Untersuchung des Effektes der Koexpression auf Hefen, die eGFP in IC21-Zellen einbringen, bestätigen. Hefen, die neben eGFP noch LLO oder ssLLO exprimierten, sterben deutlich schneller, was in einer verminderten eGFP-Expression und somit weniger eGFP-positiver IC21-Zellen resultierte, als Hefen, die Perforin Δ C koexprimierten. Ein Abtöten der Hefen nach Koexpression von Perforin Δ C konnte nicht beobachtet werden, folglich wurde nach RNA-„Delivery“ keine Verminderung der Anzahl eGFP-positiver Zellen, sondern eine Steigerung der eGFP-Expression beobachtet. Somit konnte gezeigt werden, dass Perforin nicht nur Poren innerhalb von Plasmamembranen bildet, wie zunächst für Perforin beschrieben (Tschopp et al., 1986), sondern auch in Membranen innerhalb von Säugerzellen, wie der Membran von Phagolysosomen. Diese Beobachtungen decken sich mit Ergebnissen zweier Arbeitsgruppen, die postulierten, dass Perforin nicht nur auf Ebene der Plasmamembran wirkt, sondern Granzyme aus Endosomen entlässt und dort seine porenformende Wirkung entfaltet (Froelich et al., 1996; Metkar et al., 2002). Weiterhin publizierten Pipkin & Lieberman ein Hybrid-Model.

Laut diesem Model bildet Perforin kleine Poren innerhalb der Plasmamembran, wodurch der Kalziumeintritt gesteigert wird. Dadurch kommt es zur Aktivierung einer Membranreparaturantwort, während der Vesikel zur Reparatur der Membranporen zur Plasmamembran gelangen, was zur Endozytose von Granzymen und Perforin und zur Bildung von Riesenendosomen führt. Aus diesen werden schließlich Granzyme mit Hilfe von Perforin entlassen (Pipkin & Lieberman, 2007).

Stimulation humaner antigenspezifischer Gedächtnis-T-Lymphozyten durch autologe DC

Zur Bekämpfung von intrazellulären Pathogenen ist die Ausbildung einer Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort mit folgender Etablierung von Gedächtnis-T-Zellen von größter Bedeutung und sollte das Ziel von neu entwickelten Impfsystemen sein. Somit wurde das etablierte DNA- und RNA-„Delivery“-System, nach bewiesener Expression verschiedener Antigene in den APC, hinsichtlich einer Antigenpräsentation und daraus resultierender Aktivierung antigenspezifischer T-Lymphozyten untersucht. Als Testsystem kam ein Versuchsansatz zur Stimulierung pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen, modifiziert nach Scheller und Mitarbeitern, zum Einsatz (Scheller et al., 2008). Das hierbei verwendete Antigen pp65 stellt ein Phosphoprotein aus der Matrix des humanen Cytomegalovirus dar. Diese gehören aufgrund ihrer Virusstruktur und Art ihrer Nukleinsäure zu den Herpesviren. Die Durchseuchungsrate weltweit beträgt 30-100 % bei Erwachsenen und die Übertragung erfolgt über Körperflüssigkeiten oder von der Mutter auf das Kind. pp65 besitzt vermutlich eine assoziierte Proteinkinase-Aktivität und wird sofort nach der Infektion in den Kern transportiert, wo es die Fähigkeit besitzt, an Chromosomen zu binden (Schmolke et al., 1995). Eine CMV-spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort richtet sich in erheblichem Maße gegen pp65 (Beninga et al., 1995; Wills et al.,

1996). Da es sich bei 95 % des Gesamtproteins des CMV-Tegumentes um pp65 handelt, empfiehlt sich dieses Protein als vielversprechender Kandidat für die Induktion protektiver Immunantworten gegen CMV (Irmiere & Gibson, 1983; Landini et al., 1987). pp65 stellt somit ein bedeutendes Antigen für CD8⁺ cytotoxische T-Lymphozyten aus dem Blut asymptomatischer seropositiver Spender dar (Riddell et al., 1991; McLaughlin-Taylor et al., 1994; Khattab et al., 1997; Gyulai et al., 2000; Moss & Khan, 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde das pp65-Protein aus CMV als Modellantigen verwendet, da die Stimulation humaner, bereits gegen das natürliche Protein gebildeter T-Zellen bei CMV-positiven Spendern untersucht werden kann. Nach Hefe-vermitteltem „Delivery“ pp65-kodierender DNA und mRNA konnte eine Stimulation pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen CMV-positiver Spender nachgewiesen werden. Dabei waren die erhaltenen Frequenzen an stimulierten CD8⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten nach DNA-„Delivery“ vergleichbar mit denen durch ein Lysat des kompletten Virus erhaltenen stimulierten CTL. Die Frequenzen stimulierter CTL nach RNA-„Delivery“ übertrafen größtenteils die durch das Gesamtvirus-Lysat stimulierten CD8⁺ T-Zellen. Die Frequenzen an stimulierten CD4⁺ T-Lymphozyten lagen deutlich unter denen der CD8⁺ T-Zellen. In pp65 treten im Vergleich zu CD8-Epitopen nur sehr wenige CD4-Epitope auf (Kreiter et al., 2007). Die Aktivierung der spezifischen Gedächtnis-T-Zellen konnte in dieser Arbeit eindeutig auf die Präsenz des in DC exprimierten pp65 zurückgeführt werden. *S. cerevisiae* Zellen, die nur den Leervektor enthielten, stimulierten nur Frequenzen an Gedächtnis-T-Zellen, die vergleichbar mit den Frequenzen eines CMV-negativen Spenders waren. Der erhaltene Unterschied der Frequenzen an stimulierten Gedächtnis-T-Zellen von Hefen, die den Leervektor enthielten, zu den Frequenzen, die nach DNA- und RNA-„Delivery“ nachgewiesen wurden, war signifikant, da in einem *ex vivo* Vollblut-Assay bereits ein Unterschied von 0,05 % an stimulierten Gedächtnis-T-Zellen als signifikant postuliert wird (Breinig et al., 2003;

Breinig et al., 2006). Die durch Hefen, die den Leervektor enthielten und als Negativkontrolle mitgeführt wurden, stimulierten CTL lassen sich auf hefespezifische Gedächtnis-T-Zellen zurückführen, welche durch die Hefe *S. cerevisiae* verursacht werden (Heintel et al., 2003).

Nach Vergleich der erhaltenen Ergebnisse nach DNA- und RNA-„Delivery“ mit den Frequenzen, die nach Verwendung des CMV-Lysats nachgewiesen wurden, ist festzuhalten, dass die Frequenzen nach DNA-„Delivery“ vergleichbar oder, nach RNA-„Delivery“, sogar besser waren. Da 95 % des Proteinanteils des Teguments von CMV aus pp65 bestehen und dieses Protein 95 % der CD8⁺ T-Zellantwort gegen CMV vermittelt, ist davon auszugehen, dass der größte Anteil an CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen durch das CMV-Lysat stimuliert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass ausreichend große Mengen an pp65 in den DC nach DNA und RNA-„Delivery“ exprimiert werden mussten und eine Präsentation von pp65 Peptiden auf der Zelloberfläche der DCs erfolgen musste, um solch hohe Frequenzen an stimulierten Gedächtnis-T-Lymphozyten zu erhalten. Nicht bei allen untersuchten Spendern konnte eine pp65-spezifische CD8⁺ Antwort detektiert werden. Wurde nach Verwendung des als Positivkontrolle mitgeführten CMV-Lysates keine Stimulation bei getesteten Spendern erreicht, konnte im Folgenden auch keine Stimulation pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen durch das „Delivery“ pp65-kodierender DNA oder mRNA nachgewiesen werden. Dies ist vermutlich auf den HLA-Typ des Spenders zurückzuführen. Die jeweilige HLA-Typisierung der freiwilligen, CMV-positiven Blutspender war nicht bekannt. Das bekannte immundominante CD8-Epitop von pp65 (pp65 417-426) ist HLA-B7-restringiert (Kern et al., 1998). Dieser HLA-Typ kommt nur bei 14 % der Europäer vor (Marco Schäfer, HLA-Labor Stefan-Morsch-Stiftung, Birkenfeld, persönliche Mitteilung). Aus diesem Grund ist das Ausbleiben einer Stimulation von pp65-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen in diesen Fällen beim HLA-Typ jedes Spenders zu suchen.

Die Effizienz des „Delivery“-Systems wird weiterhin deutlich nach Betrachten der Daten von Scheller et al., (2007), wo eine Stimulation

pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen aus CMV-positiven Spendern durch „cross presentation“ von pp65-Fusionsprotein-Peptiden nachgewiesen werden konnte. Die Ergebnisse des dort gezeigten CMV-positiven Spenders zeigten 1,4 % INF- γ / CD69-doppelt-positive CD8⁺ T-Lymphozyten. Auch wenn ein direkter Vergleich des dort dargestellten Spenders mit denen in dieser Arbeit untersuchten Spendern nicht möglich ist, lässt sich dennoch durch die in dieser Arbeit erhaltenen 1,1 % nach DNA- und 1,65% INF- γ / CD69-doppelt-positive CD8⁺ T-Lymphozyten nach RNA-„Delivery“ die Effizienz des auf Hefe basierenden Nukleinsäure „Delivery“-Systems betonen.

Durch Verwendung einer langen Variante des Polyadenylierungssignals des SV40 Virus konnte eine Steigerung der Antigen-Expression in den APC nach DNA und RNA-„Delivery“ erreicht werden. Die resultierende verstärkte Antigenpräsentation im Kontext mit MHC-Molekülen bewirkte weiterhin eine erhöhte Stimulation an pp65-spezifischen Gedächtnis-CD8⁺ T-Lymphozyten. Dabei wurde die Anzahl INF- γ / CD69-doppelt-positiver CD8⁺ T-Zellen nach „Delivery“ pp65-kodierender DNA um 11 %, nach RNA-„Delivery“ um 67 % gesteigert. Somit bedingt die erhöhte Stabilität der pp65-kodierenden mRNA eine größere Menge an exprimiertem Antigen und daraus folgend eine verstärkte Präsentation des Antigens und Stimulation an antigenspezifischen CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zur Konstruktion und Etablierung eines Nukleinsäure-„Delivery“-Systems, in welchem Hefezellen als „Carrier“ zum Transport von Antigen-kodierender DNA und mRNA verwendet wurden, können in Abbildung 53 zusammengefasst werden. Nach Aufnahme Nukleinsäure-transportierender Hefezellen durch APC werden diese in den Phagolysosomen abgebaut. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf einen bis jetzt noch unbekanntem Mechanismus hin, der den Transport der Antigen-kodierenden DNA und mRNA aus den Phagolysosomen vermittelt. Weiterhin konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Koexpression von porenformenden

Proteinen, wie Listeriolysin O und Perforin, die Translokation von DNA und mRNA ins Zytosol der APC verstärkt. Eine anschließende Expression des Antigens nach DNA- und RNA-„Delivery“ wurde durch Verwendung des Modellproteins eGFP und des Antigens Ovalbumin bestätigt. Somit muss eine Möglichkeit bestehen, wie die mittels Hefen eingebrachte Plasmid-DNA zur Bildung antigenkodierender Transkripte in den Zellkern gelangt. Dies wurde nicht nur für teilungsfähige Zellen wie Makrophagen, sondern auch für teilungsinaktive Zellen wie humane DC gezeigt. Die exprimierten Antigene unterliegen im Folgenden der Prozessierung durch das Proteasom zu Antigenpeptiden, die im ER auf MHC I-Moleküle geladen und an der Zelloberfläche der APC präsentiert wurden. Dies konnte durch Stimulation pp65-spezifischer CD8⁺ Gedächtnis-T-Lymphozyten in einem humanen System bestätigt werden.

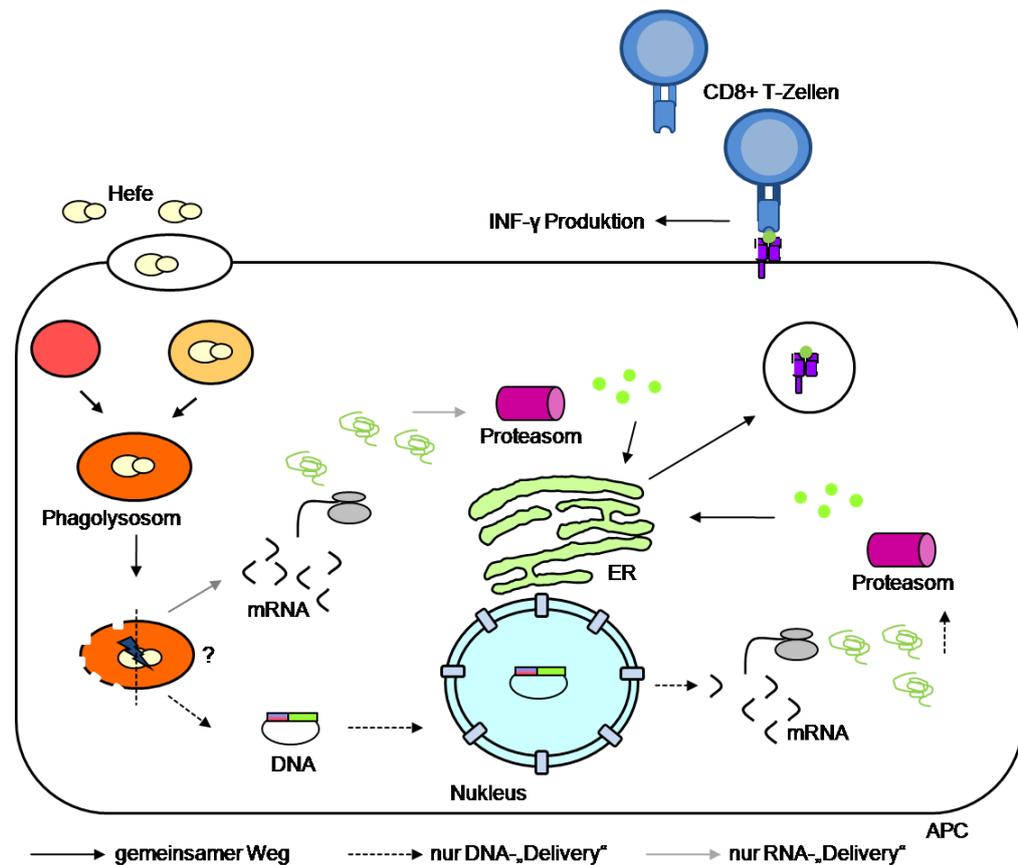


Abbildung 53: Modell des etablierten Hefe-basierten „Delivery“-Systems Antigen-kodierender DNA und mRNA

Nach Aufnahme von Hefezellen, die entweder Antigen-kodierende DNA oder mRNA transportieren, durch die APC gelangen die Hefezellen in die Phagolysosomen, in welchen sie abgebaut werden (1). Aus den Phagolysosomen erfolgt die Translokation in das Zytosol der APC über einen noch unbekanntes Mechanismus (2a) oder sie wird verstärkt durch die Koexpression porenformender Proteine wie Listeriolysin O und Perforin (2b). Die freigesetzte DNA gelangt im Folgenden zur Bildung Antigen-kodierender Transkripte in den Zellkern der APC (3). Die Antigen-kodierende mRNA liegt direkt im Zytosol vor, wo die Translation des Antigens erfolgen kann (4). Die exprimierten Antigene werden anschließend durch das Proteasom zu Peptiden abgebaut (5) und in das ER eingeschleust, wo die Bindung der Antigen-Peptide auf MHC I-Moleküle erfolgt (6). Die beladenen MHC I-Peptid-Komplexe werden über Vesikel zur Zelloberfläche transportiert, wodurch das Peptid Antigen-spezifischen CD8⁺ T-Zellen präsentiert wird, welche die Produktion von Effektormolekülen einleiten (7).

***Schizosaccharomyces pombe* als Vehikel zum Nukleinsäure-„Delivery“ in APC**

Das etablierte "Delivery"-System wurde während dieser Arbeit in ersten grundlegenden Untersuchungen auch für eine weitere Hefegattung entwickelt. Für *Schizosaccharomyces pombe* konnten geringe Frequenzen an hefespezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden (Heintel et al., 2003), was sie aufgrund der geringen Eigenimmunität als Impfvehikel neben *S. cerevisiae* interessant macht. *Sz. pombe* gehört neben *S. cerevisiae* zu den am besten untersuchten und charakterisierten Hefen und stellt einen viel genutzten Organismus zur Expression heterologer Proteine dar. Die Spalthefe wurde erstmals von P. Linder 1983 aus Ostafrikanischem Hirsebier isoliert und beschrieben. Bei *Sz. pombe* erfolgt das Wachstum durch äquale Teilung, wodurch sie den Namen Spalthefe erhielt. Der Name „pombe“ bedeutet im Suaheli Bier (Wixon, 2002). Für ihre Arbeiten an Zellzyklusuntersuchungen in *Sz. pombe* wurde 2001 der Nobelpreis für Medizin und Physiologie an P. Nurse, L. Hartwell und T. Hunt vergeben. Das Genom von *Sz. pombe* ist seit 2002 vollständig sequenziert und weist eine Größe von ungefähr 14 MB auf, welche sich auf drei Chromosomen verteilen (Wood et al., 2002). *Sz. pombe* und *S. cerevisiae* besitzen Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer Replikationsursprünge (van Houten & Newlon, 1990), jedoch zeigten phylogenetische Untersuchungen der 18S- und 5S-rRNA und Proteinsequenzanalysen, dass nur eine geringe Verwandtschaft zwischen den beiden Hefegattungen vorliegt. Es besteht die Annahme, dass die Entwicklungslinie von Archaeascomyceten, zu den *Sz. pombe* gezählt wird, und Protoascomyceten, welche *S. cerevisiae* beinhalten, bereits vor ungefähr 1,1 Milliarden Jahren divergierten (Heckman et al., 2001). Molekularbiologische Untersuchungen zeigten, dass *Sz. pombe* durch das Vorkommen von Introns sowie der Regulation des Zellzyklus größere Ähnlichkeiten zu höheren Eukaryoten aufweist (Fischli et al., 1996; Prabhala et al.,

1992). Aus diesem Grund stellt *Sz. pombe* ein interessantes Model zur Expression heterologer Proteine aus höheren Eukaryoten dar.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Aufnahmestudien mit *Sz. pombe* in IC21-Zellen zeigten, dass APC generell weniger Zellen dieser Hefegattung im Vergleich zu *S. cerevisiae* Zellen aufnehmen können. Aufnahmeuntersuchungen beider Hefegattungen in humanem Vollblut demonstrierten eine vergleichbare Aufnahmeeffizienz durch Monozyten und Granulozyten (Heintel, 2003; Breinig, 2003). Der durch IC21-Makrophagen und humane DC in dieser Arbeit beobachtete Unterschied bezüglich der Aufnahme ließe sich durch die unterschiedliche Größe beider Hefegattungen begründen. Durchschnittlich sind *Sz. pombe*-Zellen mit einem Durchmesser von 3-4 µm und einer Länge von 7-14 µm doppelt bis dreimal so groß als *S. cerevisiae*. Zellen der Bäckerhefe hingegen sind nur ungefähr 2,5 x 4,5 µm groß. Weiterhin konnte eine Ausreifung Dendritischer Zellen nach Aufnahme von *Sz. pombe* Zellen nachgewiesen werden. Durch Vergleich der Daten mit denen, die nach Ausreifung durch *S. cerevisiae*-Zellen erhalten werden konnten, wurde jedoch deutlich, dass nach *Sz. pombe* Kontakt weniger kostimulatorische Oberflächen- und MHC-Moleküle auf DC vorhanden waren. Die Ausreifung von DC durch *Sz. pombe* ist somit weniger stark. Dennoch vermittelt *Sz. pombe* die Reifung von DC, was in einer gesteigerten Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD83 und CD86 und der MHC I- und MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche im Vergleich zu unreifen DC resultierte.

In *Sz. pombe* konnte der CMV-Promotor für ein DNA-„Delivery“ aufgrund seiner nachgewiesenen Aktivität in der Spaltheife nicht verwendet werden (Toyama & Okayama, 1990). Hierbei fand der DC-STAMP-Promotor Anwendung, dessen Aktivität in IC21 und humanen DC in dieser Arbeit bewiesen werden konnte. Für ein RNA-„Delivery“ kam neben dem durch Thiamin reprimierbaren und in Abwesenheit von Thiamin aktiven *nmt1*-Promotor auch der induzierbare Promotor der Isocitrat-Lyase zum Einsatz. Dieser zeigte eine deutliche Aktivität in

Sz. pombe sowohl nach Induktion in Hefe als auch APC. Diese Beobachtung ist durchaus interessant, da für die Spalthefe kein funktioneller Glyoxylatzyklus beschrieben ist (De Jong-Gubbels et al., 1996). Zudem konnten die Hauptenzyme Malat-Synthase und Isocitrat-Lyase nicht nachgewiesen werden (Fiechter et al., 1981; Tsai et al., 1989). Dennoch scheint der *ICL1*-Promotor in *Sz. pombe* durch C₂-Kohlenstoffquellen induzierbar zu sein.

Ein „Delivery“ Antigen-kodierender DNA und mRNA ist auch nach Verwendung von *Sz. pombe* als Transportvehikel möglich. Jedoch wurden im Vergleich zu einem DNA- und RNA-„Delivery“ mittels *S. cerevisiae* weniger eGFP-positive IC21-Zellen erhalten. Durch ein *Sz. pombe* vermitteltes DNA-„Delivery“ wurden 19 % eGFP-positive IC21 nachgewiesen, nach DNA-„Delivery“ mittels *S. cerevisiae* hingegen 30 %. Auch nach RNA-„Delivery“ wurden bei *Sz. pombe* nur höchstens 30 % eGFP-positive IC21-Zellen erhalten, bei *S. cerevisiae* hingegen bis zu 42 %. Diese verringerte Anzahl an eGFP-positiven Zellen ist jedoch nicht verwunderlich, da zum Erhalten einer optimalen Aufnahme an *Sz. pombe*-Zellen lediglich ein Verhältnis von IC21 zu Hefen von 1:5 gewählt werden konnte. Somit wurden schon weniger Antigen-kodierende Nukleinsäuren in die APC eingebracht, woraus eine geringere Menge an exprimiertem Antigen resultieren kann. Dennoch stellt dieser auf *Sz. pombe* basierende „Carrier“ einen interessanten Ansatzpunkt dar, wobei weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden müssten. Zudem unterstreichen diese Ergebnisse das Potential der neuartigen Lebendvakzine „Hefe“.

Vergleich des in dieser Arbeit etablierten Nukleinsäure-„Delivery“-Systems mit bekannten Systemen

Bis vor 20 Jahren wurden im Rahmen der Impfstoffentwicklung bevorzugt attenuierte Pathogene oder inaktivierte Präparationen des vollständigen Erregers herangezogen. Attenuierte Erreger weisen jedoch neben ihrer hohen Immunogenität zusätzlich das Risiko einer Reversion zur ursprünglichen Pathogenität auf. Totimpfstoffe bergen hingegen die Gefahr einer unvollständigen Inaktivierung, wodurch die Erreger funktionsfähig verbleiben können. Aus diesem Grund erlangten im Zuge des Vakzine-Designs rekombinante Partikel-Impfstoffe immer mehr Beachtung. So konnte nach Verwendung von VLPs („virus like particles“) des Hefe-Virus L_A , an welche pp65-Epitope fusioniert waren, eine Aktivierung pp65-spezifischer $CD8^+$ T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Powilleit et al., 2007). Jedoch erfolgt die Expression des Antigens nach Immunisierung mit Proteinen oder Antigen-Epitopen nicht in den APC. Der Vorteil einer Nukleinsäure-Vakzine basiert hingegen darauf, dass die innerhalb der Säugerzelle exprimierten Antigene korrekt gefaltet, glykosyliert und posttranslational modifiziert werden können.

Es existieren verschiedene „Delivery“-Systeme zum Transport von Antigen-kodierenden Nukleinsäuren, die alle das Ziel haben, eine zelluläre Immunantwort zu vermitteln. Neben bakteriellen „Delivery“-Systemen, die z.B. auf attenuierten Vertretern verschiedener Gattungen basieren, existieren auch virale Vektoren. Diese stellen gezielt veränderte Viruspartikel dar, welche das Einschleusen von genetischem Material in eine Zielzelle vermitteln. Nach Vergleich der bakteriellen „Delivery“-Systeme und viraler Vektoren verschiedener Viren mit dem auf Hefe basierenden „Delivery“-System, bietet dieses neu etablierte System viele Vorteile. Zur Induktion einer potenten Immunantwort sollte ein Nukleinsäure „Delivery“-Vehikel idealerweise in der Lage sein, sowohl mitotisch aktive als auch mitotisch inaktive APC zu infizieren.

Dies wird durch die Verwendung von viralen Vektoren erfüllt, da sie humane Zellen infizieren und dabei eine natürliche Infektion imitieren. Jedoch wirken verschiedene virale Vektoren zytotatisch auf APC (Bonnet et al., 2000). Eine toxische Wirkung zeigen auch unterschiedliche attenuierte Bakterienstämme hinsichtlich APC, was in niedrigen Infektionsraten resultiert. So überleben nur weniger als die Hälfte der infizierten APC eine Infektion mit Listerien (Guzmán et al., 1996; Schoen et al., 2005). Im Gegensatz dazu konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Hefezellen der Gattungen *S. cerevisiae* und *Sz. pombe* effektiv von murinen Makrophagen wie auch humanen DC aufgenommen wurden, wodurch ein Targeting zu den wichtigsten APC erreicht werden kann. Weiterhin zeigten Hefen keine toxische Wirkung bezüglich der APC, wodurch durchschnittlich 95 % der IC21 eine Infektion mit Hefezellen überlebten. Zudem kommt es nach Aufnahme von Hefezellen der Gattung *S. cerevisiae* zur Ausreifung unreifer DC (Bernstein et al., 2008; Remondo et al., 2009), was in dieser Arbeit sowohl für diese Gattung als auch für *Sz. pombe* gezeigt werden konnte. Eine durch Bakterien vermittelte Ausreifung unreifer DC ist ebenfalls beschrieben (Rescigno et al., 2000; Radfort et al., 2003). Die Auswirkung viraler Vektoren auf DC ist jedoch noch größtenteils unbekannt. Für das Herpes simplex Virus wurde hingegen eine Blockierung der Ausreifung von DC publiziert (Bonnet et al., 2000). Bemerkenswerterweise wird, im Gegensatz zu einigen viralen oder bakteriellen Vehikeln, auch nach wiederholter Vakzinierung keine störende Immunität gegen den „Carrier“ Hefe aufgebaut, was die Möglichkeit multipler Impfungen mit unterschiedlichen Antigenen eröffnet (Franzussoff et al., 2005). Virale Vektoren sollten keine Bildung von anti-Virus Antikörpern induzieren, was ein „Boosten“ unmöglich machen würde. Jedoch existieren virale Vektoren, für die eine Vektor-bedingte Antikörperproduktion bekannt ist, wie im Falle von Adenoviren (Bonnet et al., 2000). Die Mehrheit der Erwachsenen ($\geq 85\%$) besitzen Antikörper gegen die meisten bekannten Adenoviren Serotypen, was einen limitierenden Faktor beim Einsatz adenoviraler Vektoren zu

Therapiezielen darstellt. Im Gegensatz dazu konnten für die Hefegattungen *S. cerevisiae* und *Sz. pombe* lediglich eine geringe Eigenimmunität durch den Nachweis niedriger Frequenzen an CD4⁺ oder CD8⁺ hefespezifischen Gedächtnis-T-Zellen bestätigt werden (Heintel et al., 2003).

Nach Betrachten nur einiger Aspekte von „Delivery“-Systemen, kann die Effizienz des neu entwickelten Nukleinsäure-„Delivery“-Systems auf Basis der Hefe nur noch einmal betont werden. Verglichen mit bekannten „Delivery“-Systemen ist die Herstellung der auf Hefe basierenden Lebendvaccine einfach, in großen Mengen möglich und Hefezellen können gefriergetrocknet und somit ohne Kühlkette gelagert und transportiert werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit der oralen Applikation der Hefe. Die Herstellung viraler Vektoren hingegen ist aufgrund der Kultivierung in Zellkulturen kosten- und zeitintensiv (Rai & Padh, 2001).

Zusammenfassend zeigen alle in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse die erfolgreiche Konstruktion und Etablierung eines Hefe-basierten Nukleinsäure-„Delivery“-Systems in Säuger-APC, die effiziente Antigenexpression, -prozessierung, und -präsentation innerhalb der APC und abschließend die Stimulation antigenspezifischer Gedächtnis-T-Zellen in einem humanen System. Weiterhin wurde die durch das „Delivery“ vermittelte Antigen-Expression in APC optimiert, was in einer Steigerung der Frequenzen stimulierter Gedächtnis-CTL resultierte. Aufbauend auf dem für *S. cerevisiae* etablierten System konnten zudem grundlegende Ergebnisse zur Konstruktion eines Nukleinsäure-„Delivery“ für *Sz. pombe* erhalten werden.

Ausblick

Ausgehend von den in dieser Arbeit erhaltenen grundlegenden Ergebnissen zur Entwicklung eines Hefe-vermittelten Nukleinsäure „Delivery“-Systems sind weitere Untersuchungen notwendig.

Nach gezeigter *ex vivo*-Stimulation Antigen-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen in einem humanen autologen System, müssten die zum DNA- und RNA-„Delivery“ konstruierten Hefestämme weiterhin zur Immunisierung eingesetzt werden, um im Tiermodell die *in vivo* Induktion einer effizienten, protektiven Immunantwort untersuchen zu können. In diesem Zusammenhang könnte der Einfluss des Applikationsortes, subcutan, intramuskulär oder intravenös, und somit auch der des Applikationsweges auf die Induktion einer Immunantwort bestimmt werden. Erste Untersuchungen dazu erfolgen derzeit in einem LCMV-Mausmodell in Kooperation mit Peter Aichele (Uniklinikum Freiburg), wobei ein Glykoprotein aus LCMV als Antigen verwendet wird.

Eine Steigerung der Antigen-spezifischen T-Zellantwort könnte durch weitere Optimierungsschritte zur Effizienz der Antigenpräsentation erreicht werden. Dem liegt eine optimale Antigenexpression in den APC und somit die Stabilität der Antigen-kodierenden Transkripte zu Grunde. Die Halbwertszeit von mRNA-Molekülen im Zytosol ist hoch reguliert und liegt im Bereich zwischen wenigen Minuten und mehreren Wochen (Ross, 1995), wobei letztere mRNAs Pyrimidin-reiche Sequenzen innerhalb ihrer 3'-UTR aufweisen (Holcik & Liebhaber, 1997). Durch Anfügen der 3'-UTR Bereiche des α - und β -Globingens an das jeweilige Antigen könnte die Stabilität der Antigen-kodierenden mRNA erhöht und die Expressionsstärke des Antigens verbessert werden (Russel & Liebhaber, 1996; Waggoner & Liebhaber 2003). Die zu therapeutischen Zwecken eingesetzten mRNAs weisen bereits diese stabilisierenden UTRs auf (Pascolo, 2008).

Voraussetzung zur Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort ist die Antigen-Peptid Präsentation im Kontext mit MHC I-Molekülen. Durch N-terminales Anfügen eines MHC Klasse-I-Signalpeptidfragmentes an die

Sequenz von pp65 konnte eine verstärkte pp65-Peptid Präsentation in MHC I-Molekülen mit resultierender verbesserter T-Zellantwort publiziert werden. Durch zusätzliche C-terminale Fusion eines MHC Klasse-I „trafficking signal“ (MITD) konnte die T-Zellantwort weiter gesteigert werden (Kreiter et al., 2007). In Analogie zu diesem Versuchsansatz liegen beide Sequenzen fusioniert an die Sequenz der zytosolischen Ovalbumin Variante (Ovacyt) vor. Die dazugehörigen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen werden derzeit durchgeführt.

Bei Untersuchungen zur Ausreifung humaner unreifer DC konnte während dieser Arbeit beobachtet werden, dass verschiedene Hefegattungen wie *Pichia pastoris*, die Spaltheefe *Sz. pombe* sowie die Milchhefe *Kluyveromyces lactis* einen unterschiedlichen Einfluss auf die Reifung humaner DC nehmen (Daten nicht gezeigt). Ein interessanter Ansatzpunkt wäre aus diesem Grund die Konstruktion von Plasmidsystemen zum Nukleinsäure-„Delivery“ für diese weiteren Hefegattungen, um die Auswirkungen auf ein Antigen-„Delivery“, die Antigenprozessierung und –präsentation und im Folgenden die Art der Immunantwort aufgrund der unterschiedlich starken Ausreifung von DC zu untersuchen. Die für *Sz. pombe* in dieser Arbeit begonnenen Analysen zum DNA- und RNA-„Delivery“ liefern erste Hinweise für die Erfolgsaussichten dieses Ansatzes.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden grundlegende Versuche zur Etablierung eines Nukleinsäure-„Delivery“-Systems auf Basis rekombinanter Hefen durchgeführt mit dem Ziel der Induktion zellulärer Immunantworten, die einen Schutz gegen intrazelluläre Erreger vermitteln. Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet: (1) Konstruktion eines Plasmidsystems zum DNA- und RNA-„Delivery“ mittels *S. cerevisiae* in APC, (2) Nachweis einer Antigen-Expression in den APC als Folge eines DNA- oder RNA-„Delivery“, (3) Optimierung des „Delivery“-Systems zur Steigerung der in APC exprimierten Menge an Antigenen, (4) Untersuchungen zur funktionellen T-Zellaktivierung und (5) Konstruktion eines Plasmid-Systems zum Nukleinsäure-„Delivery“ mittels *Sz. pombe*.

- (1) Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Plasmidsystem für *S. cerevisiae* konstruiert werden, welches ein „Delivery“ Antigenkodierender Nukleinsäuren erlaubt. Durch die Wahl säugerzell-spezifisch viraler oder APC-spezifischer Promotoren, deren Inaktivität in Hefen bestätigt wurde, konnte ein DNA-„Delivery“ sichergestellt werden. Für das „Delivery“ von mRNA konnte durch die Anwendung konstitutiver sowie induzierbarer Hefepromotoren der Zeitpunkt der Bildung von antigenkodierenden Transkripten in der Hefe variiert werden. Eine Translation der mRNA in Hefezellen wurde durch Verwendung einer viralen IRES-Sequenz unterbunden. Aufnahmestudien von Hefezellen bestätigten ein effektives „Targeting“ wie murinen Makrophagen und humanen DC. Weiterhin vermitteln Wildtypstämme der Hefe *S. cerevisiae* die Ausreifung von DC.
- (2) Nach Einbringen von eGFP-kodierender DNA und mRNA in APC mittels des etablierten „Delivery“-Systems konnte eine eGFP-

Expression sowohl in murinen Makrophagen als auch in humanen DC mittels FACS-Analyse nachgewiesen werden. Somit wurden die vollständige Expression des Antigens nach DNA-„Delivery“ und die Translation des Antigens nach RNA-„Delivery“ in APC bestätigt. Ein weiterer Beweis für die Expression von Antigenen nach Einsatz des etablierten Systems in APC konnte durch den Nachweis eines zweiten Antigens, Ovalbumin, mittels Western-Analyse erbracht werden.

- (3) Eine verstärkte eGFP-Expression nach DNA-„Delivery“ konnte durch Verwendung APC-spezifischer Promotoren erreicht werden. Der Austausch des Hefetranskriptionsterminators *tPGK* durch eine Variante des SV40 Polyadenylierungssignals in den für das „Delivery“ konstruierten Expressionsplasmiden führte aufgrund einer verbesserten Stabilität der eGFP-kodierenden Transkripte zu einer gesteigerten eGFP-Expression nach DNA- und RNA-„Delivery“.

Die Translokation eGFP-kodierender DNA und mRNA aus dem Phagolysosom von APC wurde durch Koexpression der porenbildenden Proteine Listeriolysin O aus *Listeria monocytogenes* und humanem Perforin in der Hefe gesteigert. Im Gegensatz zu Listeriolysin O, dessen intrazelluläre Expression toxisch für Hefezellen ist, zeigten Hefen, die Perforin exprimieren, einen resistenten Phänotyp. Beide heterolog in Hefe exprimierten Proteine lagen in biologisch aktiver Form vor. Somit bewirkte die Koexpression von Listeriolysin O und Perforin beim „Delivery“ einer rekombinant in Hefe exprimierten zytosolischen Variante von Ovalbumin eine Steigerung der Ova-spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort und eine verstärkte Produktion von INF- γ . Durch die Koexpression konnte weiterhin eine um den Faktor 3 verstärkte eGFP-Expression nach DNA- und RNA-„Delivery“ bei gleichzeitiger Koexpression von Perforin in den APC nachgewiesen werden. Listeriolysin O hingegen bewirkt ein Abtöten von Hefezellen nach

deren Aufnahme durch die APC, wodurch die Bildung der eGFP-kodierenden mRNA unterbunden wird. Die eGFP-Expression nach DNA-„Delivery“ konnte jedoch unbeeinflusst ebenfalls um den Faktor 3 gesteigert werden.

- (4) Die Expression des CMV-Antigens pp65 nach DNA- und RNA-„Delivery“ mittels *S. cerevisiae* in DC führte zu einer signifikanten Stimulation pp65-spezifischer CD8⁺ Gedächtnis T-Lymphozyten serumpositiver Individuen. Der Vergleich zu einem Gesamt-Virus-Lysat zeigte eine gleich starke Aktivierung nach DNA-„Delivery“ und eine ausgeprägtere Stimulation an CD8⁺ T-Lymphozyten nach RNA-„Delivery“. Die Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen konnte eindeutig auf die Präsenz des in DC exprimierten pp65 zurückgeführt werden, da mit dem Grundvektor transformierte Hefen keine signifikante Menge an CTL stimulierten. Die Verwendung einer Variante des SV40 Polyadenylierungssignals anstelle des Hefetranskriptionsterminators *tPGK* führte zu einer Steigerung der Stimulation pp65-spezifischer Gedächtnis T-Zellen um 11 % nach DNA- und 67 % nach RNA-„Delivery“.
- (5) Auch die Konstruktion eines Plasmidsystems für *Sz. pombe* verlief erfolgreich. Zellen der Spalthefe induzierten nach Kontakt mit unreifen DC deren Reifung zu mDC. Ein „Delivery“ eGFP-kodierender DNA und mRNA in IC21-Zellen mittels *Sz. pombe* resultierte in einer eGFP-Expression innerhalb der APC.

V. Summary

In this study a yeast-based system for delivery of functional nucleic acids to mammalian antigen-presenting cells (APC) was established. To do so, the following issues were addressed: (1) construction of a plasmid system allowing delivery of DNA and mRNA by *Saccharomyces cerevisiae*, (2) proof of antigen expression in murine and human APC after yeast-mediated DNA/mRNA-delivery, (3) improvement of the delivery system in order to increase the antigen amount, (4) verification of functional T cell stimulation in a human system and (5) development of an analogous system for DNA/mRNA delivery by the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

- (1) A set of plasmids was constructed which enables *S. cerevisiae* to deliver antigen-encoding nucleic acids to mammalian APC. For DNA delivery, the promoter of the human cytomegalovirus (CMV) was used which showed no transcriptional activity in yeast. Transcription of antigen-encoding mRNA in yeast was driven by either constitutive or inducible yeast promoters. In yeast, mRNA-translation was prevented by addition of a viral internal ribosomal entry site. Conditions ensuring an efficient uptake of yeast by either the murine macrophages-like cell line IC21 or human dendritic cells (DC) were determined and a yeast-mediated maturation of human DC was shown.
- (2) Efficient expression of the model protein eGFP after yeast-mediated delivery of DNA/mRNA was detected in both murine and human APC by FACS analysis confirming the delivery of functional nucleic acids to mammalian cells by *S. cerevisiae*. This observation was verified by expression of a second antigen, ovalbumin, in mammalian APC.

- (3) Replacement of the CMV-promoter by APC-specific promoters led to increased eGFP-expression in mammalian APC which could be further enhanced by using of a viral (SV40) polyadenylation signal.
- (4) Translocation of both eGFP-encoding DNA and mRNA could be improved by coexpression of the pore forming proteins listeriolysin O (LLO) from *Listeria monocytogenes* and human perforin in yeast leading to a suicide-phenotype of yeast cells after expression of LLO but not perforin. Both proteins were able to enhance the activation of epitope-specific CD8-positive T lymphocytes after yeast-mediated delivery of a proteinaceous ovalbumin-derivative demonstrating their biologic activity. Likewise, coexpression of perforin yielded a threefold increase in eGFP-expression after yeast-mediated DNA and RNA delivery whereas LLO coexpression was only effective after DNA delivery. Further experiments confirmed that the LLO-induced suicidal phenotype in yeast led to a decrease in yeast-delivered mRNA resulting in a diminished eGFP-expression.
- (5) Yeast-mediated delivery of pp65-encoding DNA and mRNA resulted in expression, processing and presentation of pp65/pp65-derived epitopes in human DC of seropositive donors. In comparison to a whole virus lysate, the detected frequencies of CD8-positive memory T cells were elevated after yeast-mediated delivery. This T cell response was shown to be pp65-specific as yeast cells containing an empty vector caused no significant stimulation of memory T-cells. As for eGFP-expression, usage of the SV40-polyadenylation signal was able to increase the frequency of activated T cells.
- (6) In first progressive experiments, *Sz. pombe* cells were shown to mature human DC. Analogous to *S. cerevisiae*, plasmids for DNA and RNA delivery were constructed and eGFP expression was detected after delivery of eGFP-encoding DNA and mRNA by *Sz. pombe* in murine macrophages.

VI. Literaturverzeichnis

- Ackerman, A. L., Giodini, A. & Cresswell, P. (2006):** A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25, 607-617.
- Ackerman, A. L., Kyritsis, C., Tampé, R. & Cresswell, P. (2005):** Access of soluble antigens to the endoplasmic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6, 107-113.
- Ada, G. L. & Blanden, R. V. (1994):** CTL immunity and cytokine regulation in viral infection. *Res. Immunol.* 145, 625-628; discussion 628-629.
- Albert, M. L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. (1998):** Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392, 86-89.
- Armant, M. A. & Fenton, M. J. (2002):** Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol* 3, REVIEWS3011.
- Bachmann, M. F., Barner, M., Viola, A. & Kopf, M. (1999):** Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *Eur J Immunol* 29, 291-299.
- Badovinac, V. P., Porter, B. B. & Harty, J. T. (2002):** Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat. Immunol.* 3, 619-626.
- Bahjat, K. S., Liu, W., Lemmens, E. E., Schoenberger, S. P., Portnoy, D. A., Dubensky, T. W. Jr. & Brockstedt, D.G. (2006):** Cytosolic entry controls CD8+-T-cell potency during bacterial infection. *Infect. Immun.* 74, 6387-97.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998):** Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252.
- Barron, M. A., Blyveis, N., Pan, S. C. & Wilson, C. C. (2006):** Human dendritic cell interactions with whole recombinant yeast: implications for HIV-1 vaccine development. *J. Clin. Immunol.* 26, 251-264.
- Barry, M. & Bleackley, R. C. (2002):** Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-409.
- Barsig, J. & Kaufmann, S. H. (1997):** The mechanism of cell death in *Listeria monocytogenes*-infected murine macrophages is distinct from apoptosis. *Infect. Immun.* 65, 4075-4081.
- Bartenschlager, R., Frese, M. & Pietschmann, T. (2004):** Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* 63, 71-180.

- Beláková, J., Horynová, M., Krupka, M., Weigl, E. & Raska, M. (2007):** DNA vaccines: are they still just a powerful tool for the future? *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)* 55(6), 387-398.
- Beninga, J., Kropff, B. & Mach, M. (1995):** Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J. Gen. Virol.* 76, 153-160.
- Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F. Flavell., R. A., Miller, J. F. & Heath, W. R. (1998):** Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393, 478-480.
- Bergamini, G., Preiss, T. & Hentze, M. W. (2000):** Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA* 6, 1781-1790.
- Berke, G. (1995):** The CTL's kiss of death. *Cell* 81, 9-12.
- Bernardy, G. (2006):** Herstellung von Polyepitopkassetten zur Etablierung einer Hefe-basierten Impfstrategie. *Diplomarbeit, Molekular- und Zellbiologie, Saarbrücken, Universität des Saarlandes.*
- Bernstein, M. B., Chakraborty, M., Wansley, E. K., Guo, Z., Franzusoff, A., Mostböck, S., Sabzevari, H., Schlom, J. & Hodge, J. W. (2007):** Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* (yeast-CEA) as a potent activator of murine dendritic cells. *Vaccine* 26, 509-521.
- Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979):** A rapide alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523.
- Blumenthal, R., Millard, P. J., Henkart, M. P., Reynolds, C. W. & Henkart, P. A. (1984):** Liposomes as targets for granule cytolysin from cytotoxic large granular lymphocyte tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 5551-5555.
- Boehm, A. L., Higgins, J., Franzusoff, A. & Hodge, J. W. (2009):** Concurrent vaccination with two distinct vaccine platforms targeting the same antigen generates phenotypically and functionally distinct T-cell population. *Cancer Immunol. Immunother.* Springer Verlag.
- Bonnet, M. C., Tartaglia, J., Verdier, F., Kourilsky, P., Lindberg, A., Klein, M. & Moingeon, P. (2000):** Recombinant viruses as a tool for therapeutic vaccination against human cancers. *Immunol. Lett.* 74, 11-25.
- Boyer, J. D., Chattergoon, M. A., Ugen, K. E., Shah, A., Bennett, M., Cohen, A., Nyland, S., Lacy, K. E., Bagarazzi, M. L., Higgins, T. J., Baine, Y., Ciccarelli, R. B., Ginsberg, R. S., MacGregor, R. R. & Weiner, D. B. (1999):** Enhancement of cellular immune response in HIV-1 seropositive individuals: A DNA-based trial. *Clin. Immunol.* 90, 100-107.

- Boyer, J. D., Ugen, K. E., Wang, B., Agadjanyan, M., Gilbert, L., Bagarazzi, M. L., Chattergoon, M., Frost, P., Javadian, A., Williams, W. V., Refaeli, Y., Ciccarelli, R. B., McCallus, D., Coney, L. & Weiner, D. B. (1997):** Protection of chimpanzees from high-dose heterologous HIV-1 challenge by DNA vaccination. *Nat. Med.* 3, 526-532.
- Boyle, J. S., Silva, A., Brady, J. L. & Lew, A. M. (1997):** DNA immunization: induction of higher avidity antibody and effect of route on T cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 14626-14631.
- Braun, M. & Vierling, J. M. (2003):** The clinical and immunologic impact of using interferon and ribavirin in the immunosuppressed host. *Liver Transpl.* 9, S79-89.
- Breinig, F. (2003):** Untersuchungen zum Einsatz rekombinanter Hefen als neuartige Lebendvakzine. *Dissertation, Molekular- und Zellbiologie, Saarbrücken, Universität des Saarlandes.*
- Breinig, F., Heintel, T., Schumacher, A., Meyerhans, A. & Schmitt, M. J. (2003):** Specific activation of CMV-primed human T lymphocytes by cytomegalovirus pp65 expressed in fission yeast. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 231-239.
- Breinig, T., Sester, M., Sester, U. & Meyerhans, A. (2006):** Antigen-specific T cell responses: determination of their frequencies, homing properties, and effector functions in human whole blood. *Methods* 38, 77-83.
- Brown, G. D. & Gordon, S. (2001):** A new receptor for β -glucans. *Nature* 413, 36-37.
- Brunner, S., Sauer, T., Carotta, S., Cotten, M., Saltik, M. & Wagner, E. (2000):** Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus. *Gene Ther.* 7, 401-407.
- Buentke, E. & Scheynius, A. (2003):** Dendritic cells and fungi. *APMIS* 111(7-8), 789-796.
- Carrero, J. A., Calderon, B. & Unanue, E. R. (2004):** Listeriolysin O from *Listeria monocytogenes* is a lymphocyte apoptogenic molecule. *J. Immunol.* 172, 4866-4874.
- Caruso, D. A., Orme, L. M., Amor, G. M., Neale, A. M., Radcliff, F. J., Downie, P., Tang, M. L. & Ashley, D. M. (2005):** Results of a Phase I study utilizing monocyte-derived dendritic cells pulsed with tumor RNA in children with Stage 4 neuroblastoma. *Cancer* 103, 1280-1291.
- Casares, S., Inaba, K., Brumeanu, T. D., Steinman, R. M. & Bona, C. A. (1997):** Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* 186, 1481-1486.
- Chanock, R. M., Murphy, B. R., Collins, P. L. et al., (1988):** Live viral vaccines for respiratory and enteric tract diseases. *Vaccine* 6, 129-133.

- Chattergoon, M. A., Robinson, T. M., Boyer, J. D. & Weiner, D. B. (1998):** Specific immune induction following DNA-based immunization through in vivo transfection and activation of macrophages/antigen-presenting cells. *J. Immunol.* 160, 5707-5718.
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chávez, R. & Lascurain, R. (2009):** Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 6, 15-25.
- Cheng, W. F., Hung, C. F., Lee, C. N., Su, Y. N., Chang, M. C., He, L., Wu, T. C., Chen, C. A. & Hsieh, C. Y. (2004):** Naked RNA vaccine controls tumors with down-regulated MHC class I expression through NK cells and perforin-dependent pathways. *Eur. J. Immunol.* 34, 1892-1900.
- Chowdhury, D. & Lieberman, J. (2008):** Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 389-420.
- Cooper, N. R. (1985):** The classical complement pathway activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol* 37, 151-216.
- Corbin, G. A. & Harty, J. T. (2004):** Duration of infection and antigen display have minimal influence on the kinetics of the CD4+ T cell response to *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* 173, 5679-5687.
- Corr, M., Lee, D. J., Carson, D. A. & Tighe, H. (1996):** Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J. Exp. Med.* 184, 1555-1560.
- Croft, M. & Swain, S. L. (1991):** B cell response to fresh and effector T helper cells. Role of cognate T-B interaction and the cytokines IL-2, IL-4 and IL-6. *J Immunol* 146, 4055-4065.
- Cullen, S. P. & Martin, S. J. (2008):** Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell. Death Differ.* 15, 251-262.
- Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W. & Bleackley, R. C. (1996):** Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J. Biol. Chem.* 271, 21709-21712.
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W. & Bleackley, R. C. (1995):** Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377, 446-448.
- Davis, H. L., Michel, M. L., Mancini, M., Schleef, M. & Whalen, R. G. (1994):** Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA-based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 12, 1503-1509.
- De Jong-Gubbels, P., van Dijken, J. P. & Pronk, J. T. (1996):** Metabolic fluxes in chemostat cultures of *Schizosaccharomyces pombe* grown on mixtures of glucose and ethanol. *Microbiology* 142, 1399-1407.

- Demczuk, A., Guha, N., Nguyen, P. H., Desai, P., Chang, J., Guzinska, K., Rollins, J., Ghosh, C. C., Goodwin, L. & Vancura, A. (2008):** *Saccharomyces cerevisiae* phospholipase C regulates transcription of Msn2p-dependent stress-responsive genes. *Eukaryot. Cell* 7, 967-979.
- Depoil, D., Zaru, R., Guiraud, M., Chauveau, A., Harriague, J., Bismuth, G., Utny, C., Muller, S. & Valitutti, S. (2005):** Immunological synapses are versatile structures enabling selective T cell polarization. *Immunity* 22, 185-194.
- Desjardins, M. (2003):** ER-mediated phagocytosis: a new membrane for new functions. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 280-91.
- Dhodapkar, M. V., Krasovsky, J., Steinman, R. M. & Bhardwaj, N. (2000):** Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J. Clin. Invest.* 105, R9-R14.
- Dhodapkar, M. V., Steinman, R. M., Krasovsky, J., Munz, C. & Bhardwaj, N. (2001):** Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193, 233-238.
- Dickson, R. C. & Lester, R. L. (2002):** Sphingolipid functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1583, 13-25.
- Donnelly, J. J., Ulmer, J. B., Shiver, J. W. & Liu, M. A. (1997):** DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 617-648.
- Donnelly, J. J., Wahren, B. & Liu, M. A. (2005):** DNA vaccines: progress and challenges. *J. Immunol.* 175, 633-639.
- D'Souza, S., Rosseels, V., Denis, O. & other authors (2002):** Improved tuberculosis DNA vaccines by formulation in cationic lipids. *Infect. Immun.* 70, 3681-3688.
- Dubensky, T. W., Campbell, B. A. & Villarreal, L. P. (1984):** Direct transfection of viral and plasmic DNA into the liver or spleen of mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 7529-7533.
- Eleveld-Trancikova, D., Triantis, V., Moulin, V., Looman, M. W., Wijers, M., Fransen, J. A., Lemckert, A. A., Havenga, M. J., Figdor, C. G., Janssen, R. A. & Adema, G. J. (2005):** The dendritic cell-derived protein DC-STAMP is highly conserved and localizes to endoplasmic reticulum. *L. Leuk. Bio.* 77, 337-343.
- Erhart, E. & Hollenberg, C. P. (1983):** The presence of a defective LEU2 gene on 2 mu DNA recombinant plasmids of *Saccharomyces cerevisiae* is responsible for curing and high copy number. *J. Bacteriol.* 156, 625-635.
- Fan, H., Lin, Q., Morrissey, G. R. & Khavari, P. A. (1999):** Immunization via hair follicles by topical application of naked DNA to normal skin. *Nat. Biotechnol.* 17, 870-872.

- Fenner, F. (1982):** A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev. Infect. Dis.* 4, 916-930.
- Fenner, F. (1982):**. A successful eradication campaign. Global eradication of smallpox. *Rev Infect. Dis.* 4, 916-930.
- Fenner, F., Henderson, D. A., Arita, I., Jezek, Z. & Ladnyi, I. D. (1988):** Early efforts at control: variolation, vaccination and isolation and quarantine. *History of International Public Health* 6, 245-276.
- Fiechter, A., Fuhrmann, G. F. & Käppeli, O. (1981):** Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Adv. Microb. Physiol.* 22, 123-183.
- Fischli, A., Schmid, S. R., Coppolecchia, R. und Linder, P. (1996):** The translation initiation factor eIF4A from *Schizosaccharomyces pombe* is closely related to its mammalian counterpart. *Yeast* 12, 977-981.
- Francis, J. N. & Durham, S. R. (2004):** Adjuvants for allergen immunotherapy: experimental results and clinical perspectives. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 4, 543-548.
- Franzusoff, A., Duke, R. C., King, T. H., Lu, Y. & Rodell, T. C. (2005):** Yeast encoding tumour antigens in cancer immunotherapy. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 5, 565-575.
- Froelich, C. J., Orth, K., Turbov, J., Seth, P., Gottlieb, R., Babior, B., Shah, G. M., Bleackley, R. C., Dixit, V. M. & Hanna, W. (1996):** New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. *J. Biol. Chem.* 271, 29073-29079.
- Fu, T. M., Ulmer, J. B., Caulfield, M. J., Deck, R. R., Friedman, A., Wang, S., Liu, X., Donnelly, J. J. & Liu, M. A. (1997):** Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol. Med.* 3, 362-371.
- Fuller, D. H. & Haynes, J. R. (1994):** A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 10, 1433-1441.
- Gagnon, E., Duclos, S., Rondeau, C., Chevet, E., Cameron, P. H., Steele-Mortimer, O., Paiement, J., Bergeron, J. J. & Desjardins, M. (2002):** Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* 110, 119-31.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. & Underhill, D. M. (2003):** Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197, 1107-1117.

- Geoffroy, C., Gaillard, J. L., Alouf, J. E. & Berche, P. (1989):** Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes* and related species. *J. Gen. Microbiol.* 135, 481-487.
- Gershoni, J. M. & Palade, G. E. (1983):** Protein blotting: principles and applications. *Anal. Biochem.* 131, 1-15.
- Gießelmann, E. (2007):** Analyse der *in vivo* Topologie des zellulären HDEL-Rezeptors Erd2p. *Diplomarbeit, Molekular- und Zellbiologie, Saarbrücken, Universität des Saarlandes.*
- Giesubel, U., Dalken, B., Mahmud, H. & Wels, W. S. (2005):** Cell binding, internalization and cytotoxic activity of human granzyme B expressed in the yeast *Pichia pastoris*. *Biochem J.* 394, 563-573.
- Giga-Hama, Y., Tohda, H., Okada, H., Owada, M. K., Okayama, H. & Kumagai, H. (1994):** High-level expression of human lipocortin I in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* using a novel expression vector. *Biotechnology* 12, 400-404.
- Glomski, I. J., Gedde, M. M., Tsang, A. W., Swanson, J. A. & Portnoy, D. A. (2002):** The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *J. Cell. Biol.* 156, 1029-1038.
- Goodridge, H. S., Wolf, A. J. & Underhill, D. M. (2009):** Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev.* 230, 38-50.
- Gray, N. K. & Wickens, M. (1998):** Control of translation initiation in animals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 399-458.
- Guermontprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P. & Amigorena S. (2003):** ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.
- Guzmán, C. A., Domann, E., Rohde, M., Bruder, D., Darji, A., Weiss, S., Wehland, J., Chakraborty, T. & Timmis, K. N. (1996):** Apoptosis of mouse dendritic cells is triggered by listeriolysin, the major virulence determinant of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 20, 119-126.
- Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K., Pincus, S., Toldy, J., Cox, W. I., Méric, C., Plotkin, S., Gönczöl, E. & Berencsi, K. (2000):** Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J. Infect. Dis.* 181, 1537-1546.

- Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M., McCormack, M. P., Wulffraat, N., Leboulch, P., Lim, A., Osborne, C. S., Pawliuk, R., Morillon, E., Sorensen, R., Forster, A., Fraser, P., Cohen, J. I., de Saint Basile, G., Alexander, I., Wintergerst, U., Frebourg, T., Aurias, A., Stoppa-Lyonnet, D., Romana, S., Radford-Weiss, I., Gross, F., Valensi, F., Delabesse, E., Macintyre, E., Sigaux, F., Soulier, J., Leiva, L. E., Wissler, M., Prinz, C., Rabbitts, T. H., Le Deist, F., Fischer, A. & Cavazzana-Calvo, M. (2003): LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science* 302, 415-419.
- Haffkine, W. M. (1897): Remarks on the plague prophylactic fluid. *Br. Med. J.* 1, 1461.
- Haller, A. A., Lauer, G. M., King, T. H., Kemmler, C., Fiolkoski, V., Lu, Y., Bellgrau, D., Rodell, T. C., Apelian, D., Franzusoff, A. & Duke R. C. (2007): Whole recombinant yeast-based immunotherapy induces potent T cell responses targeting HCV NS3 and Core proteins. *Vaccine* 25, 1452-1463.
- Hambraeus, G., Persson, M. & Rutberg, B. (2000): The aprE leader is a determinant of extreme mRNA stability in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146, 3051-3059.
- Hamilton, S. E., Badovinac, V. P., Khanolkar, A. & Harty, J. T. (2006): Listeriolysin O-deficient *Listeria monocytogenes* as a vaccine delivery vehicle: antigen-specific CD8 T cell priming and protective immunity. *J. Immunol.* 177, 4012-4020.
- Harshyne, L. A., Watkins, S. C., Gambotto, A. & Barratt-Boyes, S. M. (2001): Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J. Immunol.* 166, 3717-3723.
- Hartgers, F. C., Vissers, J. L., Looman, M. W., van Zoelen, C., Huffine, C., Figdor, C. G. & Adema, G. J. (2000): DC-STAMP, a novel multimembrane-spanning molecule preferentially expressed by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 30, 3585.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L. und Hedges, S. B. (2001): Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293, 1129-1133.
- Heintel, T., Breinig, F., Schmitt, M. J. & Meyerhans, A. (2003): Extensive MHC class I-restricted CD8 T lymphocyte response against various yeast genera in humans. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 279-286.
- Heintel, Tanja (2003): Untersuchungen zur Pathogenese des Humanen Immundefizienzvirus HIV: Virale Latenz und Funktionalität von T-Zell-Immunantworten gegen mikrobielle Erreger. *Dissertation, Institut für Virologie, Universität-klinikum Homburg*.
- Helenius, A., McCaslin, D., Fries, E. & Tanford, C. (1979): Properties of detergents. *Methods Enzymol.* 56, 734-749.

- Henkart, P. A., Millard, P. J., Reynolds, C. W. & Henkart, M. P. (1984):** Cytolytic activity of purified cytoplasmic granules from cytotoxic rat large granular lymphocyte tumors. *J. Exp. Med.* 160, 75-93.
- Hill, J. E., Myers, A. M., Koerner, T. J. & Tzagoloff, A. (1986):** Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* 2, 163-167.
- Hiltbold, E. M. & Roche, P. A. (2002):** Trafficking of MHC class II molecules in the late secretory pathway. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 30-35.
- Ho, Y. C., Chen, H. C., Wang, K. C. & Hu, Y. C. (2004):** Highly efficient baculovirus-mediated gene transfer into rat chondrocytes. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 643-651.
- Hoffman, S. L., Doolan, D. L., Sedegah, M., Wang, R., Scheller, L. F., Kumar, A., Weiss, W. R., Le, T. P., Klinman, D. M., Hobart, P., Norman, J. A. & Hedstrom, R. C. (1997):** Towards clinical trials of DNA vaccines against malaria. *Immunol. Cell Biol.* 75(4), 376-381.
- Holtkamp, S., Kreiter, S., Selmi, A., Simon, P., Koslowski, M., Huber, C., Türeci, O. & Sahin, U. (2006):** Modification of antigen-encoding RNA increases stability, translational efficacy, and T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Blood* 108, 4009-4017.
- Homann, D., Teyton, L. & Oldstone, M. B. (2001):** Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat. Med.* 7, 913-919.
- Horton, R. M., Cai, Z. L., Ho, S. N. und Pease, L. R. (1990):** Gene splicing by overlap extension: tailor-made genes using the polymerase chain reaction. *Biotechniques* 8, 528-535.
- Houde, M., Bertholet, S., Gagnon, E., Brunet, S., Goyette, G., Laplante, A., Princiotta, M. F., Thibault, P., Sacks, D. & Desjardins, M. (2003):** Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *Nature* 425, 402-406.
- Howard, J. C. (1995):** Supply and transport of peptides presented by class I MHC molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 7, 69-76.
- Hybiske, K. & Stephens, R. S. (2008):** Exit strategies of intracellular pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 99-110.
- Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. (1998):** The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells. *Immunity* 8, 89-95.
- Irmiere, A. & Gibson, W. (1983):** Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology* 130, 118-133.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. & Kimura, A. (1983):** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.

- Jackson, R. J. & Standart, N. (1990):** Do the Poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 62, 15-24.
- Jacob, M. C., Favre, M. & Bensa, J. C. (1991):** Membrane cell permeabilization with saponin and multiparametric analysis by flow cytometry. *Cytometry* 12, 550-558.
- Jaiswal, A. I. & Croft, M. (1997):** CD40 ligand induction on T cell subsets by peptide-presenting B cells. *J. Immunol* 159, 2282-2291.
- Janeway, J. A., Travers, P., Walport, M. & Shlomchik, M. (2002):** Immunologie, 5. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg/Berlin.
- Jetzt, A. E., Yu, H., Klarmann, G. J., Ron, Y., Preston, B. D. & Dougherty, J. P. (2000):** High rate of recombination throughout the human immunodeficiency virus type 1 genome. *J. Virol.* 74, 1234-1240.
- Johnson, H., Scorrano, L., Korsmeyer, S. J. & Ley, T. J. (2003):** Cell death induced by granzyme c. *Blood* 101, 3093-3101.
- Jonuleit, H. & Schmitt, E. (2003):** The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. Immunol* 171, 6323-6327.
- Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J. & Enk, A. H. (1997):** Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur. J. Immunol* 27, 3135-3142.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Schuler, G., Knop, J. & Enk, A. H. (2000):** Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J. Exp. Med.* 192, 1213-1222.
- Kaech, S. M. & Ahmed, R. (2001):** Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat. Immunol* 2, 415-422.
- Kaech, S. M., Hemby, S., Kersh, E. & Ahmed, R. (2002):** Molecular and functional profiling of memory CD8 T cell differentiation. *Cell* 111, 837-851.
- Kaisho, T. & Akira, S. (2002):** Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* 1589, 1-13.
- Kalinna, B. H. (1997):** DNA vaccines for parasitic infections. *Immunol. Cell Biol.* 75, 370-381.
- Kataoka, T., Shinohara, N., Takayama, H., Takaku, K., Kondo, S., Yonehara, S. & Nagai, K. (1996):** Concanamycin A, a powerful tool for characterization and estimation of contribution of perforin- and Fas-based lytic pathways in cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 156, 3678-3686.

- Kataoka, T., Takaku, K., Magae, J., Shinohara, N., Takayama, H., Kondo, S. & Nagai, K. (1994):** Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H(+)-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.* 153, 3938-3947.
- Kaufmann, S. H. (1995):** Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol. Today* 16, 338-342.
- Kayal, S. & Charbit, A. (2006):** Listeriolysin O: a key protein of *Listeria monocytogenes* with multiple functions. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 514-529.
- Kern, F., Surel, I. P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blasczyk, R., Reinke, P., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., Walden, P. & Volk, H. D. (1998):** T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat. Med.* 4, 975-978.
- Khattab, B. A., Lindenmaier, W., Frank, R. & Link, H. (1997):** Three T-cell epitopes within the C-terminal 265 amino acids of the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus recognized by human lymphocytes. *J. Med. Virol.* 52, 68-76.
- Kis, Z., Pallinger, E., Endresz, V., Burian, K., Jelinek, I., Gonczol, E. & Valyi-Nagy, I. (2004):** The interactions between human dendritic cells and microbes; possible clinical applications of dendritic cells. *Inflamm. Res.* 53, 413-423.
- Kloetzel, P. M. (2004):** Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat. Immunol.* 5, 661-669.
- Kolle, W. (1896):** Zur aktiven Immunisierung der Menschen gegen Cholera. *Cent.bl. Bakteriol. I. Abt. Jena* 19, 97-104.
- Kreiter, S., Konrad, T., Sester, M., Huber, C., Türeci, O. & Sahin, U. (2007):** Simultaneous ex vivo quantification of antigen-specific CD4+ and CD8+ T cell responses using in vitro transcribed RNA. *Cancer Immunol. Immunother.* 56, 1577-1587.
- Kumar, H., Kawai, T. & Akira, S. (2009):** Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 621-625.
- Kupfer, A., Mosmann, T. R. & Kupfer, H. (1991):** Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 88, 775-779.
- Landini, M. P., Severi, B., Furlini, G. & Badiali de Giorgi, L. (1987):** Human cytomegalovirus structural components: intracellular and intraviral localization of p28 and p65-69 by immunoelectron microscopy. *Virus Res.* 8, 15-23.

- Landini, M. P., Severi, B., Furlini, G., Badiali De Giorgi, L. (1987):** Human cytomegalovirus structural components: intracellular and intraviral localization of p28 and p65-69 by immunoelectron microscopy. *Virus Res.* 8, 15-23.
- Leclerc, C. (2003):** New approaches in vaccine development. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26, 329-341.
- Lehner, P.J. & Cresswell, P. (2004):** Recent developments in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 16, 82-89.
- Leifert, J. A. & Whitton, J. L. (2003):** "Translocatory proteins" and "protein transduction domains": a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. *Mol. Ther.* 8, 13-20.
- Lennon-Dumenil, A. M., Bakker, A. H., Wolf-Bryant, P., Ploegh, H. L. & Lagaudriere-Gesbert, C. (2002):** A closer look at proteolysis and MHC-class-II-restricted antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* 14, 15-21.
- Levy, D. N., Aldrovandi, G. M., Kutsch, O. & Shaw, G. M. (2004):** Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4204-4209.
- Li, F., Zhou, X., Qin, W. & Wu, J. (2001):** Full-length cloning and 3'-terminal portion expression of human perforin cDNA. *Clin. Chim. Acta.* 313, 125-131.
- Lieberman, J. (2003):** The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 361-370.
- Lin, S. L., Chuong, C. M. & Ying, S. Y. (2001):** A Novel mRNA-cDNA interference phenomenon for silencing bcl-2 expression in human LNCaP cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 639-644.
- Linette, G. P., Shankara, S., Longerich, S., Yang, S., Doll, R., Nicolette, C., Preffer, F. I., Roberts, B. L. & Haluska, F. G. (2000):** *In vitro* priming with adenovirus/gp100 antigen-transduced dendritic cells reveals the epitope specificity of HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells in patients with melanoma. *J. Immunol.* 164, 3402-3412.
- Liu, C. C., Walsh, C. M. & Young, J. D. (1995):** Perforin: structure and function. *Immunol. Today* 16, 194-201.
- Loeffler, D. I. M., Schoen, C. U., Goebel, W. & Pilgrim, S. (2006):** Comparison of different live vaccine strategies *in vivo* for delivery of protein antigen or antigen-encoding DNA and mRNA by virulence-attenuated *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 74, 3946-3957.
- Lofquist, J. M., Weimert, N. A. & Hayney, M. S. (2003):** Smallpox: a review of clinical diseases and vaccination. *Am. J. Health Syst. Pharm.* 60(8), 749-756.
- Lorenz, M. C. & Fink, G. R. (2002):** The glyoxylate cycle is required for

fungal virulence. *Nature* 412, 83-86.

Lorenz, M. C., Bender, J. A. & Fink, G. R. (2001): Transcriptional response of *Candida albicans* upon internalization by macrophages. *Eukaryot. Cell* 3, 1076-1087.

Lowin, B., Peitsch, M. C. & Tschopp, J. (1995): Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 198, 1-24.

Lowrie, D. B., Silva, C. L. & Tascon, R. E. (1997): DNA vaccines against tuberculosis. *Immunol. Cell Biol.* 75, 591-594.

Maher, S., Toomey, D., Condron, C. & Bouchier-Hayes, D. (2002): Activation-induced cell death: the controversial role of Fas and Fas ligand in immune privilege and tumour counterattack. *Immunol. Cell Biol.* 80, 131-137.

Mangeot, P. E., Negre, D., Dubois, B., Winter, A. J., Leissner, P., Mehtali, M., Kaiserlian, D., Cosset, F. L. & Darlix, J. L. (2000): Development of minimal lentivirus vectors derived from simian immunodeficiency virus (SIVmac251) and their use for gene transfer into human dendritic cells. *J. Virol.* 74, 8307-8315.

Marquis, H. & Hager, E. J. (2000): pH-regulated activation and release of a bacteria-associated phospholipase C during intracellular infection by *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35, 289-298.

Masson, D., Peters, P. J., Geuze, H. J., Borst, J. & Tschopp, J. (2002): Interaction of chondroitin sulfate with perforin and granzymes of cytolytic T-cells is dependent on pH. *Biochemistry* 29, 11229-11235.

Mauel, J. & Defendi, V. (1971): Infection and transformation of mouse peritoneal macrophages by simian virus 40. *J. Exp. Med.* 134, 335-350.

McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D. & Riddell, S. R. (1994): Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Med. Virol.* 43, 103-110.

McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D. & Riddell, S. R. (1994): Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Med. Virol.* 43, 103-110.

Mellman, I. & Steinman, R. M. (2001): Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.

Mengaud, J., Vicente, M. F., Chenevert, J., Pereira, J. M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C. & Cossart, P. (1988): Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 56,

766-772.

- Mengaud, J., Vicente, M. F., Chenevert, J., Pereira, J. M., Geoffroy, C., Gicquel-Sanzey, B., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C. & Cossart, P. (1988):** Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 56, 766-772.
- Mercado, R., Vijh, S., Allen, S. E., Kerksiek, K., Pilip, I. M. & Pamer, E. G. (2000):** Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J. Immunol.* 165(12), 6833-6839.
- Merrick, J. C., Edelson, B. T., Bhardwaj, V., Swanson, P. E. & Unanue, E. R. (1997):** Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am. J. Pathol.* 151, 785-792.
- Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J. A. & Froelich, C. J. (2002):** Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417-428.
- Mockey, M., Gonçalves, C., Dupuy, F. P., Lemoine, F. M., Pichon, C. & Midoux, P. (2006):** mRNA transfection of dendritic cells: synergistic effect of ARCA mRNA capping with Poly(A) chains in cis and in trans for a high protein expression level. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 340, 1062-1068.
- Momburg, F. & Hämmerling, G. J. (1998):** Generation of TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex I molecules. *Adv. Immunol.* 68, 191-256.
- Momburg, F., Roelse, J., Howard, J. C., Butcher, G. W., Hämmerling, G. J. & Neefjes, J. J. (1994):** Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367, 648-651.
- Moreno, S., Klar, A. & Nurse, P. (1991):** Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol.* 194, 795-823.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. & Coffman, R. L. (1986):** Two types of murine helper T cell clones. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136, 2348-2357.
- Moss, P. & Khan, N. (2004):** CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum. Immunol.* 65, 456-464.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F., Gaudie, J. & Bleackley, R. C. (2000):** Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500.

- Munoz Fernandez, M. A., Fernandez, M. A. & Freno, M. (1992):** Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 22, 301-307.
- Nafziger, S. D. (2005):** Smallpox. *Crit. Care Clin.* 21(4), 739-746.
- Neefjes, J. J., Momburg, F. & Hammerling, G. J. (1993):** Selective and ATP-dependent translocation of peptides by the MHC-encoded transporter. *Science* 261, 769-771.
- Newman, S. L. & Holly, A. (2001):** *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infection and Immunity* 6813-6822.
- Nichols, W. W., Ledwith, B. J., Manam, S. V. & Troilo, P. J. (1995):** Potential DNA vaccine integration into the host cell genome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772, 30-39.
- Noelle, R. J., Roy, M., Shepherd D. M., Stamenkovic, I., Ledbetter, J. A. & Aruffo, A. (1992):** A novel ligand on activated T helper cells binds CD40 and transduces the signal for the cognate activation of B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6550.
- O`Riordan, M., Yi, C. H., Gonzales, R., Lee, K.-D. & Portnoy, D. A. (2002):** Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 13861-13866.
- Obrig, T. G., Culp, W. J., McKeehan, W. L. & Hardesty, B. (1971):** The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J. Biol. Chem.* 246, 174-181.
- Ogra, P. L., Faden, H. und Welliver, R. C. (2001):** Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 430-445.
- Ojcius, D. M., Persechini, P. M., Zheng, L. M., Notaroberto, P. C., Adeodato, S. C. & Young, J. D. (1991):** Cytolytic and ion channel-forming properties of the N terminus of lymphocyte perforin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 4621-4625.
- Owais, M. und Gupta, C. M. (2000):** Liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecules and its possible use in vaccine development. *Eur. J. Biochem.* 267, 3946-3956.
- Owais, M., Masood, A. K., Agrewala, J. N., Bisht, D. und Gupta, C. M. (2001):** Use of liposomes as an immunopotentiating delivery system: in perspective of vaccine development. *Scand. J. Immunol.* 54, 125-132.
- Pamer, E. & Cresswell, P. (1998):** Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 323-358.

- Pandey, R. & Khuller, G. K. (2004):** Chemotherapeutic potential of alginate-chitosan microspheres as anti-tubercular drug carriers. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 635-640.
- Pante, N. & Kann, M. (2002):** Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol. Biol. Cell* 13, 425-434.
- Pasteur, L. (1880):** De l'attenuation du virus du cholera des poules. *C.R. Acad. Sci. Paris* 91, 673-680.
- Pasteur, L., Chamberland, C.-E. und Roux, R. (1881):** Sur la vaccination charbonneuse. *C. R. Acad. Sci. Paris* 92, 1378-1383.
- Persechini, P. M., Liu, C. C., Jiang, S. & Young, J. D. (1989):** The lymphocyte pore-forming protein perforin is associated with granules by a pH-dependent mechanism. *Immunol. Lett.* 22, 23-7.
- Persechini, P. M., Ojcius, D. M., Adeodato, S. C., Notaroberto, P. C., Daniel, C. B. & Young, J. D. (1992):** Channel-forming activity of the perforin N-terminus and a putative alpha-helical region homologous with complement C9. *Biochemistry* 31, 5017-5021.
- Perz, J. F. (2004):** Prevalence of HCV infection. *Estimated Global*.
- Perz, J. F., Armstrong, G. L., Farrington, L. A., Hutin, Y. J. & Bell, B. P. (2006):** The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J. Hepatol.* 45, 529-538.
- Peters, P. J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krähenbühl, O., Tschopp, J., Slot, J. W. & Geuze, H. J. (1991):** Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* 173, 1099-1109.
- Piekarska, K., Hardy, G., Mol, E., van den Burg, J., Strijbis, K., van Roermund, C., van den Berg, M. & Distel, B. (2008):** The activity of the glyoxylate cycle in peroxisomes of *Candida albicans* depends on a functional beta-oxidation pathway: evidence for reduced metabolite transport across the peroxisomal membrane. *Microbiology* 154, 3061-3072.
- Pipkin, M. E. & Lieberman, J. (2007):** Delivering of kiss of death: progress on understanding how Perforin works. *Curr. Opin. in Immunol.* 19, 301-308.
- Plotkin, S. A. (2005):** Vaccines: past, present and future. *Nature medicine* 11, 5-11.
- Plotkin, S. L. & Plotkin, S. A. (2004):** A short history of vaccination. *Vaccine* 4, 1-15.

- Podack, E. R., Young, J. D. & Cohn, Z. A. (1985):** Isolation and biochemical and functional characterization of perforin 1 from cytolytic T-cell granules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 8629-8633.
- Ponsaerts, P., Van den Bosch, G., Cools, N., Van Driessche, A., Nijs, G., Lenjou, M., Lardon, F., Van Broeckhoven, C., Van Bockstaele, D. R., Berneman, Z. N. & Van Tendeloo, V. F. (2002):** Messenger RNA electroporation of human monocytes, followed by rapid *in vitro* differentiation, leads to highly stimulatory antigen-loaded mature dendritic cells. *J. Immunol.* 169, 1669-1675.
- Ponsaerts, P., Van Tendeloo, V. F. & Berneman, Z. N. (2003):** Cancer immunotherapy using RNA-loaded dendritic cells. *Clin. Exp. Immunol.* 134, 378-84.
- Possee, R. D., Schild, G. C. & Dimmock, N. J. (1982):** Studies on the mechanism of neutralization of influenza virus by antibody: Evidence that neutralizing antibody (anti-hemagglutinin) inactivates influenza virus *in vivo* by inhibiting virion transcriptase activity. *J. Gen Virol.* 58, 373-386.
- Powilleit, F., Breinig, T. & Schmitt, M. J. (2007):** Exploiting the yeast L-A viral capsid for the *in vivo* assembly of chimeric VLPs as platform in vaccine development and foreign protein expression. *PLoS One.* 2, e415.
- Prabhala, G., Rosenberg, G. H. und Kaufer, N. F. (1992):** Architectural features of pre-mRNA introns in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 8, 171-182.
- Princiotta, M. F., Finzi, D., Qian, S. B., Gibbs, J., Schuchmann, S., Buttgereit, F., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2003):** Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18, 343-354.
- Probst, J., Brechtel, S., Scheel, B., Hoerr, I., Jung, G., Rammensee, H. G. & Pascolo, S. (2006):** Characterization of the ribonuclease activity on the skin surface. *Genet. Vaccines Ther.* 29, 4.
- Probst, J., Weide, B., Scheel, B., Pichler, B. J., Hoerr, I., Rammensee, H. G. & Pascolo, S. (2007):** Spontaneous cellular uptake of exogenous messenger RNA *in vivo* is nucleic acid-specific, saturable and ion dependent. *Gene. Ther.* 14, 1175-80.
- Radford, K. J., Jackson, A. M., Wang, J. H., Vassaux, G. & Lemoine, N. R. (2003):** Recombinant *E. coli* efficiently delivers antigen and maturation signals to human dendritic cells: presentation of MART1 to CD8+ T cells. *Int. J. Cancer* 105, 811-819.
- Rai, M. & Padh, H. (2001):** Expression systems for production of heterologous proteins. *Current Science* 80, 1121-1128.
- Rammensee, H-G., Bachmann, J., Stevanovic, S. (1997):** MHC ligands and peptide motifs: the function. *Landes Biosciences*, Austin, Texas, 217-369.

- Raychaudhuri, S. & Rock, K. L. (1998):** Fully mobilizing host defense: building better vaccines. *Nat. Biotechnol.* 16, 1025-1031.
- Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H. M. & Prabhakar, U. (2004):** Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *J. Immunol. Methods* 293, 127-142.
- Reid, D. M., Gow, N. A. & Brown, G. D. (2009):** Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr. Opin. Immunol.* 21, :30-37.
- Reits, E., Griekspoor, A., Neijssen, J., Groothuis, T., Jalink, K., van Veelen, P., Janssen, H., Calafat, J., Drijfhout, J. W. & Neefjes, J. (2003):** Peptide diffusion, protection, and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 18, 97-108.
- Remondo, C., Cereda, V., Mostböck, S., Sabzevari, H., Franzusoff, A., Schlom, J. & Tsang, K. Y. (2009):** Human dendritic cell maturation and activation by a heat-killed recombinant yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) vector encoding carcinoembryonic antigen. *Vaccine* 27, 987-994.
- Rescigno, M., Granucci, F. & Ricciardi-Castagnoli, P. (2000):** Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *J. Clin. Immunol.* 20, 161-166.
- Riddell, S. R., Reusser, P. & Greenberg, P. D. (1991):** Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients. *Rev. Infect. Dis.* 13, 966-973.
- Ridge, J. P., Di Rosa, F. & Matzinger, P. (1998):** A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature* 393, 474-478.
- Riemann, H., Takao, J., Shellman, Y. G., Hines, W. A., Edwards, C. K. 3rd, Franzusoff, A., Norris, D. A. & Fujita, M. (2007):** Generation of a prophylactic melanoma vaccine using whole recombinant yeast expressing MART-1. *Exp. Dermatol.* 16, 814-822.
- Riplinger, S. M. (2008):** Methoden zur Applikation funktioneller DNA/RNA durch rekombinante Hefezellen. *Diplomarbeit, Molekular- und Zellbiologie, Saarbrücken, Universität des Saarlandes.*
- Robinson, D. S. & O'Garra, A. (2002):** Further checkpoints in Th1 development. *Immunity* 16, 755-758.
- Rock, K. L. & Goldberg, A. L. (1999):** Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 739-779.
- Rock, K. L. (2003):** The ins and outs of cross-presentation. *Nat. Rev.* 4, 941-

943.

- Rodriguez, M. E., van der Pol, W. L., Sanders, L. A. & van de Winkel, J. G. (1999):** Crucial role of FcγRIIIa (CD32) in assessment of functional anti-Streptococcus pneumoniae antibody activity in human sera. *J. Infect. Dis.* 179, 423-433.
- Ross, R., Ross, X. L., Schwing, J., Längin, T. & Reske-Kunz A. B. (1998):** The actin-bundling protein fascin is involved in the formation of dendritic processes in maturing epidermal Langerhans cells. *J. Immunol.* 160, 3776-3782.
- Ross, R., Sudowe, S., Beisner, J., Ross, X. L., Ludwig-Portugall, I., Steitz, J., Tüting, T., Knop, J. & Reske-Kunz A. B. (2003):** Transcriptional targeting of dendritic cells for gene therapy using the promoter of the cytoskeletal protein fascin. *Gene Ther.* 10, 1035-1040.
- Rush, C., Mitchell, T. & Garside, P. (2002):** Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways. *J. Immunol.* 169, 4951-4960.
- Russel, J. H. & Ley, T. J. (2002):** Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 323-370.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988):** Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491.
- Salmon, D. E. und Smith, T. (1886):** On a new method of producing immunity from contagious diseases. *Am. Vet. Rev.* 10, 63-69.
- Sarkis, C., Serguera, C., Petres, S., Buchet, D., Ridet, J. L., Edelman, L. & Mallet, J. (2000):** Efficient transduction of neural cells *in vitro* and *in vivo* by a baculovirus-derived vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 14638-14643.
- Sauer, H., Pratsch, L., Tschopp, J., Bhakdi, S. & Peters, R. (1991):** Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1063, 137-46.
- Schagger, H. & von Jagow, G. (1987):** Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379.
- Scheller, N. (2006):** Untersuchungen zur Effizienz von DNA- und Protein-Trägersystemen zur Induktion von zellulären Immunantworten durch Dendritische Zellen. *Dissertation, Institut für Virologie, Universitätsklinikum Homburg.*
- Scheller, N., Furtwängler, R., Sester, U., Maier, R., Breinig, T. & Meyerhans, A. (2007):** Human cytomegalovirus protein pp65: an efficient protein carrier system into human dendritic cells. *Gene Ther.* 15,

318-325.

- Schmitt, M. J. (1995):** Cloning and expression of a cDNA copy of the viral K28 killer toxin gene in yeast. *Mol. Gen. Genet.* 246, 236-246.
- Schmolke, S., Drescher, P., Jahn, G. & Plachter, B. (1995):** Nuclear targeting of the tegument protein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus: an unusual bipartite nuclear localization signal functions with other portions of the protein to mediate its efficient nuclear transport. *J. Virol.* 69, 1071-1078.
- Schoen, C., Kolb-Mäurer, A., Geginat, G., Löffler, D., Bergmann, B., Stritzer, J., Szalay, A. A., Pilgrim, S. & Goebel, W. (2005):** Bacterial delivery of functional messenger RNA to mammalian cells. *Cell. Microb.* 7, 709-724.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R. & Melief, C. J. (1998):** T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 393, 480-483.
- Schreuder, M. P., Deen, C., Boersma, W. J., Pouwels, P. H. & Klis, F. M. (1996):** Yeast expressing hepatitis B virus surface antigen determinants on its surface: implications for a possible oral vaccine. *Vaccine* 14, 383-388.
- Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., Bennink, J. R. (2000):** Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-774.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. & Tsien, R. Y. (2005):** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2, 905-909.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. & Maizel, J. V. (1967):** Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamid gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820.
- Shedlock, D. J. & Weiner, D. B. (2000):** DNA vaccination: antigen presentation and the induction of immunity. *J. Leukoc. Biol.* 68, 793-806.
- Sheng, K. C., Pouniotis, D. S., Wright, M. D., Tang, C. K., Lazoura, E., Pietersz, G. A. & Apostolopoulos, V. (2006):** Mannan derivatives induce phenotypic and functional maturation of mouse dendritic cells. *Immunology* 118, 372-383.
- Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. (1962):** Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J. Cell. Comp. Physiol.* 59, 223-239.
- Shresta, S., Pham, C. T., Thomas, D. A., Graubert, T. A. & Ley, T. J. (1998):** How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? *Curr. Opin. Immunol.* 10, 581-587.
- Sin, J. I., Bagarazzi, M., Pachuk, C. & Weiner, D. B. (1999):** DNA priming-protein boosting enhances both antigen-specific antibody and Th1-type cellular immune responses in a murine herpes simplex virus-2 gD

vaccine model. *DNA Cell Biol.* 18, 771-779.

- Smith, G. A., Marquis, H., Jones, S., Johnston, N. C., Portnoy, D. A. & Goldfine, H. (1995):** The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 63, 4231-4237.
- Somers, D. G., Pearson, M. L. & Ingles, C. J. (1975):** Isolation and characterization of an alpha-amanitin-resistant rat myoblast mutant cell line possessing alpha-amanitin-resistant RNA polymerase II. *J. Biol. Chem.* 250, 4825-4831.
- Sprent, J. & Surh, C. D. (2001):** Generation and maintenance of memory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 248-254.
- Sprent, J. & Surh, C. D. (2002):** T cell memory. *Annu Rev Immunol* 20, 551-579.
- Steinman, R. M. (1991):** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 271-296.
- Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I. & Inaba, K. (2000):** The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J. Exp. Med.* 191, 411-416.
- Stenger, S., Rosat, J. P., Bloom, B. R., Krensky, A. M. & Modlin, R. L. (1999):** Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Immunol Today* 20, 390-394.
- Stout, R. & Bottomly, K. (1989):** Antigen-specific activation of effector macrophages by interferon- γ producing (T_H1) T cell clones failure of IL-4 producing (T_H2) T-cell clones to activate effector functions in macrophages. *J. Immunol.* 142, 760.
- Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S. (2009):** The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30, 180-192.
- Strugnell, R. A., Drew, D., Mercieca, J., DiNatale, S., Firez, N., Dunstan, S. J., Simmons, C. P. & Vadolas, J. (1997):** DNA vaccines against bacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* 75, 364-369.
- Stubbs, A. C. & Wilson, C. C. (2002):** Recombinant yeast as a vaccine vector for the induction of cytotoxic T-lymphocyte response. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 4, 35-40.
- Stubbs, A. C., Martin, K. S., Coeshott, C., Skaates, S. V., Kuritzkes, D. R., Bellgrau, D., Franzusoff, A., Duke, R. C. & Wilson, C. C. (2001):** Whole recombinant yeast vaccine activates dendritic cells and elicits protective cell-mediated immunity. *Nat. Med.* 7, 625-629.
- Tabe, L., Krieg, P., Strachan, R., Jackson, D., Wallis, E. & Colman, A. (1984):** Segregation of mutant ovalbumins and ovalbumin-globin fusion proteins in *Xenopus* oocytes. Identification of an ovalbumin signal sequence. *J. Mol. Biol.* 180, 645-666.

- Tabi, Z., Moutaftsi, M. & Borysiewicz, L. K. (2001):** Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J. Immunol.* 166, 5695-5703.
- Tacket, C. O., Roy, M. J., Widera, G., Swain, W. F., Broome, S. & Edelman, R. (1999):** Phase 1 safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 19, 2826-2829.
- Tada, T., Takemori, T., Okumura, K., Nonaka, M. & Tokuhsa, T. (1978):** Two distinct types of helper T cells involved in the secondary antibody response: independent and synergistic effects of Ia- and Ia+ helper T cells. *J. Exp. Med.* 147(2), 446-458.
- Tanaka, K. & Kasahara, M. (1998):** The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol. Rev.* 163, 161-176.
- Tang, D. C., DeVit, M. & Johnston, S. A. (1992):** Genetic immunization is a simple model for eliciting an immune response. *Nature* 356, 152-154.
- Toes, R. E., Nussbaum, A. K., Degermann, S., Schirle, M., Emmerich, N. P., Kraft, M., Laplace, C., Zwinderman, A., Dick, T. P., Muller, J., Schonfisch, B., Schmid, C., Fehling, H. J., Stevanovic, S., Rammensee, H. G. & Schild, H. (2001):** Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J. Exp. Med.* 194, 1-12.
- Touret, N., Paroutis, P., Terebiznik, M., Harrison, R. E., Trombetta, S., Pypaert, M., Chow, A., Jiang, A., Shaw, J., Yip, C., Moore, H. P., van der Wel, N., Houben, D., Peters, P. J., de Chastellier, C., Mellman, I. & Grinstein S. (2005):** Quantitative and dynamic assessment of the contribution of the ER to phagosome formation. *Cell* 123, 157-170.
- Toyama, R. & Okayama, H. (1990):** Human chorionic gonadotropin alpha and human cytomegalovirus promoters are extremely active in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 268, 217-221.
- Tsai, C. S., Mitton, K. P. & Johnson, B. F. (1989):** Acetate assimilation by the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem. Cell Biol.* 67, 464-467.
- Tschopp, J., Masson, D. & Stanley, K. K. (1986):** Structural/functional similarity between proteins involved in complement- and cytotoxic T-lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Nature* 322, 831-834.
- Tweten, R. D. (2005):** Cholesterol-dependent cytolysins, a family of versatile pore-forming toxins. *Infect. Immun.* 73, 6199-6209.
- Uellner, R., Zvelebil, M. J., Hopkins, J., Jones, J., MacDougall, L. K., Morgan, B. P., Podack, E., Waterfield, M. D. & Griffiths, G. M. (1997):** Perforin is activated by a proteolytic cleavage during biosynthesis which

- reveals a phospholipid-binding C2 domain. *EMBO J.* 16, 7287-7296.
- Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Phodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Deck, R. R., DeWitt, C. M., Friedman, A., Howe, L. A., Leander, K. R., Martinez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L. & Liu, M. A. (1993):** Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259, 1745-1749.
- Underhill, D. M. & Ozinsky, A. (2002):** Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 825-852.
- Underhill, D. M. & Ozinsky, A. (2002):** Toll-like receptors: key mediators of microbe detection. *Curr. Opin Immunol.* 14, 103-110.
- Underhill, D. M. (2003):** Toll-like receptors: networking for success. *Eur. J. Immunol.* 33, 1767-1775.
- van den Hoff, M. J., Labruyère, W. T., Moorman, A. F. & Lamers, W. H. (1993):** Mammalian gene expression is improved by use of a longer SV40 early polyadenylation cassette. *Nucleic Acids Res.* 21, 4987-4988.
- Van Endert, P. M. (1996):** Peptide selection for presentation by HLA class I: a role for the human transporter associated with antigen processing? *Immunol. Res.* 15, 265-279.
- van Houten, J. V. & Newlon, C. S. (1990):** Mutational analysis of the consensus sequence of a replication origin from yeast chromosome III. *Mol Cell Biol* 10, 3917-3925.
- van Loo, N. D., Fortunati, E., Ehlert, E., Rabelink, M., Grosveld, F. & Scholte, B. J. (2001):** Baculovirus infection of nondividing mammalian cells: mechanisms of entry and nuclear transport of capsids. *J. Virol.* 75, 961-970.
- Verma, I. M. & Somia, N. (1997):** Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature* 389, 239-242.
- Volkman, L. E. & Goldsmith, P. A. (1983):** In Vitro Survey of Autographa californica Nuclear Polyhedrosis Virus Interaction with Nontarget Vertebrate Host Cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1085-1093.
- Voskoboinik, I., Thia, M. C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M. J. & Trapani, J. A. (2005):** Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J. Biol. Chem.* 280, 8426-8434.
- Waggoner, S. A. & Liebhaber, S. A. (2003):** Regulation of alpha-globin mRNA stability. *Exp. Biol. Med.* 228, 387-295.
- Wang, R., Doolan, D. L., Le, T. P., Hedstrom, R. C., Coonan, K. M., Charoenvit, Y., Jones, T. R., Hobart, P., Margalith, M., Ng, J., Weiss, W. R., Sedegah, M., de Taisne, C., Norman, J.A. & Hoffman, S. L. (1998):** Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans

- by a malaria DNA vaccine. *Science* 282, 476-480.
- Ward, E. S. & Ghetie, V. (1995):** The effector functions of immunoglobulins: Implications for therapy. *Thera Immunol* 2, 77-94.
- Weiss, S. & Krusch, S. (2001):** Bacteria-mediated transfer of eukaryotic expression plasmids into mammalian host cells. *Biol. Chem.* 382, 533-541.
- Wilke, M., Fortunati, E., van den Broek, M., Hoogeveen, A. T. & Scholte, B. J. (1996):** Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity. *Gene Ther* 3, 1133-1142.
- Will, H., Cattaneo, R., Koch, H. G., Darai, G., Schaller, H., Schellekens, H., van Eerd, P. M. & Deinhardt, F. (1982):** Cloned HBV DNA causes hepatitis in chimpanzees. *Nature* 299, 740-742.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B. & Sissons, J. G. (1996):** The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J. Virol.* 70, 7569-7579.
- Wixon, J. (2002):** Featured Organism: *Schizosaccharomyces pombe*, The Fission Yeast. *Comp. Funct. Genomics* 3, 194-204.
- Wolff, J. A. & Budker, V. (1990):** The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv. Genet.* 54, 3-20.
- Wolff, J. A., Malone, R. W., Williams, P., Chong, W., Ascadi, G., Jani, A. & Felgner, P. L. (1990):** Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247, 1465-1468.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, .A, Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leathers, S., McDonald, S., McLean, J., Monney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Qqail, M. A., Rabbinowitsch, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, R. K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schäfer, M., Müller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Düsterhöft, A., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S. J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S. M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V. A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R. R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., Del Rey, F., Benito, J.,**

- Dominguez, A., Revuelta, J. L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S. L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W. R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G. V., Ussery, D., Barrell, B. G. & Nurse, P. (2002):** The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-880.
- Xu, L., Sanchez, A., Yang, Z., Zaki, S. R., Nabel, E. G., Nichol, S. T. & Nabel, G. J. (1998):** Immunization for Ebola virus infection. *Nat. Med.* 4, 37-42.
- Yewdell, J. W., Reits, E. & Neefjes, J. (2003):** Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 952-961.
- Yewdell, J. W., Schubert, U. & Bennink, J. R. (2001):** At the crossroad of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J. Cell Sci.* 114, 845-851.
- York, I. A., Goldberg, A. L., Mo, X. Y. & Rock, K. L. (1999):** Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol. Rev.* 172, 49-66.
- Yu, A. S., Cheung, R. C. & Keefe, E. B. (2004):** Hepatitis B vaccines. *Clin. Liver Dis.* 8, 283-300.
- Yu, W. H., Kashani-Sabet, M., Liggitt, D., Moore, D., Heath, T. D. & Debs, R. J. (1999):** Topical gene delivery to murine skin. *J. Invest. Dermatol.* 112, 370-375.
- Zeuzem, S. (2004):** Heterogeneous virologic response rates to interferon-based therapy in patients with chronic hepatitis C: who responds less well? *Ann. Intern. Med.* 140, 370-381.

Erklärung

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

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

Saarbrücken, Oktober, 2009

(Barbara Walch)

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. Manfred J. Schmitt für die Vergabe dieses anspruchsvollen und herausfordernden Themas und für die damit verbundene Möglichkeit in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren. Durch großes Interesse und stete Diskussionsbereitschaft Ihrerseits, zusammen mit Anregungen wie auch aufmunternden Worten unterstützten Sie mich bei der Erforschung und Bearbeitung der Inhalte dieser Arbeit. Für das mir entgegengebrachte Vertrauen bedanke ich mich ausdrücklich.

Weiterhin danke ich Prof. Sigrun Smola für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Ein besonderer Dank geht an Prof. Gernot Geginat für die Durchführung der *in vitro* Untersuchungen und Dr. Peter Aichele für erste *in vivo* Versuche. Ich danke beiden für Ihr großes Interesse an diesem Projekt und Ihr Engagement. Ebenso danke ich Dr. Jochen Stritzker für die Bereitstellung der Plasmide pSPO-pCMV-Ovalbumin und pFLO-IRES-cytova.

Danke auch an die Blutspender und Mitarbeiter der Blutspende-Zentrale der Winterbergkliniken Saarbrücken. Ohne Ihre Mitwirkung wäre diese Arbeit nicht realisierbar gewesen.

Ein herzlicher Dank geht an Dr. Tanja Breinig und Dr. Frank Breinig. Bei Frank bedanke ich mich für das mir entgegengebrachte Vertrauen, die Geduld und die Zeit, um sämtliche Fragen zu diskutieren, weiterhin für seine Begeisterung, seine Anmerkungen bei der Erstellung der Arbeit und dafür, dass er die grundlegende Idee zu diesem Thema hatte. Bei Tanja bedanke ich mich für die Unterstützung bei Experimenten, für die Beantwortung von Fragen bezüglich FACS-Auswertungen, für kritische Anmerkungen, für viele schöne Mittagspausen und für die Freude am FACS über jede einzelne stimulierte Gedächtnis-T-Zelle.

Ein besonderer Dank geht an Birgit Glombitza und Roswitha Schepp. Birgit danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit in Homburg, für die Unterstützung, die Geduld und für das Interesse an meinem Projekt. Eine bessere Einführung in die Kunst des „buffies machen“ hätte ich mir nicht wünschen können. Ebenso herzlich bedanke ich mich bei Roswitha für die tatkräftige Unterstützung bei Experimenten jeglicher Art, für das Engagement und die kritischen Worte im richtigen Moment. Ich danke Dir für viele ehrliche Gespräche und für Deine Hilfe.

Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Schmitt danke ich für die gute Zusammenarbeit und schöne gemeinsame Stunden, wie Geburtstags-Brunchs oder Betriebsausflüge. Dabei bedanke ich mich insbesondere bei Nicole Jundel für Ihre Hilfe bei verwaltungstechnischen Problemen, ihr schnelles Eingreifen, wenn es mal wieder unvorhergesehene Probleme gab und für Ihre allzeit aufmunternden Worte und herzlichen Gespräche zwischendurch. Ich möchte mich bei meinen ehemaligen

Diplomanten Laura Guida und Selina Ripplinger bedanken, die mich durch Ihre Arbeit unterstützten und mir aufgrund Ihres großen Einsatzes und Ihrer Mühe die Betreuung sehr angenehm machten. Weiterhin danke ich meiner F-Praktikantin Elisabeth Kenngott, die mir beim Testen einiger Blutspender geholfen hat. Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Breinig und Meyerhans in Homburg bedanke ich mich für die schöne Zeit, viele gemeinsame Mittagspausen und die lustigen Erlebnisse, die lange FACS-Messungen erträglicher machten.

Einen besonderen Dank möchte ich an meine Laborkolleginnen und Mädels aussprechen, Julia Dausend, Mareike Kelkel und Tina Schnöder, die mit mir die meiste Zeit meiner Doktorarbeit verbrachten. Die vielen witzigen Momente machten das Arbeiten in unserem tollen Mädels-Labor unvergesslich und somit sehr angenehm. Viele Unternehmungen außerhalb des Labors rundeten eine einmalige Zeit ab. Ich danke Euch von Herzen, dass Ihr mit mir die Zeit meiner Diplom- und Doktorarbeit erlebt und durch Eure liebenswerte Art so einzigartig gemacht habt. Eure Freundschaft hat mich nicht nur durch meinen Laboralltag begleitet, sondern auch in schwierigen Momenten aufgebaut und unterstützt. Vielen Dank.

Ein herzlicher Dank geht an meine Freunde, die es durch großes Engagement und viele lustige Unternehmungen geschafft haben einen Ausgleich zum Laboralltag zu vermitteln. Dabei danke ich besonders Maren Müller und Anke Neumann für gemeinsame sportliche Aktivitäten und für Ihre Unterstützung in jeder Lebenslage, besonders zu Beginn dieses Jahres. Weiterhin möchte ich mich bei Meike Gratz für Ihre Freundschaft, die Gabe zuzuhören und die ehrlichen Worte bedanken.

Es lässt sich nicht in Worten ausdrücken wie groß der an meine Familie gerichtete Dank ist. Ich bedanke mich herzlichst bei meinen Eltern Ingrid Brill-Walch und Dr. Wilhelm Walch. Danke für Eure stetige Unterstützung, das große Interesse an meiner Arbeit, dafür, dass Ihr fest an mich glaubt, mir immer zugehört habt und bei jeder Entscheidung hinter mir steht. Ohne Euch wäre es bedeutend schwerer gewesen. Ebenso danke ich meiner Schwester Cornelia Trenz, meinem Bruder Johannes Walch und meiner Schwägerin Eva Walch, meinen beiden Omas Maria Brill und Hilde Walch sowie meinem Opa Johann Brill für Ihren festen Glauben an mich. Von ganzem Herzen danke ich meinen Freund Carsten Rückheim. Danke für Deine Geduld und Dein Verständnis und weiterhin dafür, dass Du mir in den schwierigen Momenten viel Kraft gegeben und konsequent für erholsame Auszeiten gesorgt hast. Danke, dass Du da bist!

Und zuletzt danke ich meiner Angie für die vielen wunderbaren Momente während unserer gemeinsamen Zeit, die mir den nötigen Ausgleich bescherten und mich stark machten.

Lebenslauf

Name: **Barbara Walch**
Geburtsdatum: 30.08.1981
Geburtsort: Homburg
Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1988 bis 2001 Freie Waldorfschule Saar-Pfalz, Bexbach
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (1,9)

Studium:

2001 bis 2005 Studium der Biologie mit Schwerpunkt Human- und Molekularbiologie an der Universität des Saarlandes
Hauptfach: Molekulare Zellbiologie
Nebenfächer: Virologie und Entwicklungsbiologie
Abschluss: Diplom Biologin mit Auszeichnung (1,1)

Jan–Okt 2006 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Molekular- und Zellbiologie (Prof. Dr. M.J. Schmitt)
Thema der Diplomarbeit:
„Heterologe Expression und Sekretion des viralen AB-Toxins K28 in der Milchhefe *Kluyveromyces lactis*.“

Beruflicher Werdegang:

2007 bis 2009 Dissertation als wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Molekular- und Zellbiologie an der Universität des Saarlandes, Saarbrücken
Betreuer: Prof. Dr. M.J. Schmitt

Thema der Dissertation:
„Delivery“ funktioneller Nukleinsäuren in Antigen-präsentierende Säugerzellen mittels rekombinanter Hefen