

Untersuchung der relativen Expressionsänderung von Tyrosinkinasen bei der
Ausreifung Dendritischer Zellen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Simon Christian Lehnard
aus Bendorf / Mayen-Koblenz

2008

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. I. Schmidt-Wolf
2. Gutachter: Prof. Dr. med. W. Kuhn

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.02.2008

Aus: Medizinische Klinik und Poliklinik I, Universitätsklinikum Bonn

Direktor: Professor Dr. T. Sauerbruch

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Ich widme diese Arbeit meinem Großvater Herrn Georg Konrad Lehnard.

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Das Immunsystem	10
1.2 Professionelle Antigen-präsentierende Zellen	11
1.3 Immunologische Effektorzellen	12
1.4 Dendritische Zellen	14
1.5 Anti-Tumor-Immuntherapien	18
1.6 Das Pankreaskarzinom	19
1.7 Gentransfer	20
1.8 Tyrosinkinasen	22
1.9 Zielsetzung / Fragestellung	24
2. Materialien und Methoden	25
2.1 Material	25
2.1.1 Lösungen, Puffer, Reagentien und Medien	26
2.1.2 Zytokine	26
2.1.3 Antikörper	27
2.1.4 Zelllinien	27
2.2 Methoden	28
2.2.1 Zellkultur	28
2.2.2 Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes	28
2.2.3 Kultur der Tumorzelllinie	29
2.2.4 RNA-Isolierung aus DAN-G Zellen	29
2.2.5 Elektroporation	31
2.2.6 Durchflusszytometrie	32
2.2.7 Analyse der Effizienz der Elektroporation	34
2.2.8 RNA Isolierung aus Dendritischen Zellen	34
2.2.9 Die Genexpressionsbestimmung	35
2.2.10 Agarosegel-Elektrophorese	35
2.2.11 Reverse Transkription	36

2.2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion	37
2.2.13 Quantitative Real-Time PCR	40
2.2.14 Auswertung der Real-Time PCR	42
3. Ergebnisse	46
3.1 Kultivierung und mikroskopische Beurteilung Dendritischer Zellen	46
3.2 Aktivierung Dendritischer Zellen	46
3.3 Transfektionseffizienz Dendritischer Zellen	47
3.4 RNA-Nachweis mittels Gelelektrophorese	48
3.5 Normalisierung der RTQ-PCR Daten	49
3.6 Relative Genexpressionsuntersuchung von Tyrosinkinasen	50
4. Diskussion	52
4.1 Generierung von Dendritischen Zellen aus Blutzellen und deren Aktivierung	52
4.2 Ergebnisse der PCR	53
4.3 Die Tyrosinkinasen ALK, EPHB6, FGFR1, JAK3, ROR2 und ihre Funktion bei der Immuntherapie	54
4.3.1 ALK	54
4.3.2 EPHB6	55
4.3.3 FGFR1	55
4.3.4 JAK3	56
4.3.5 ROR2	56
4.4 Ausblick	58
5. Zusammenfassung	59
6. Anhang	60
7. Literaturverzeichnis	63
8. Danksagung	69
9. Lebenslauf	70

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ALK	engl. anaplastic lymphoma kinase
APCs	professionelle Antigen-präsentierende Zellen
aq dest	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	engl. Cluster of Differentiation
cDNA	engl. complementary DNA
CLA	konjugierte Linolsäuren (engl. linoleic acids)
CP	engl. Crossing Point
Ct	engl. threshold cycle
CTL	zytotoxische T-Zellen
CTLA	engl. cytotoxic T-lymphocyte antigen
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
DSMZ	Deutsche Sammlung für Zellkultur
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eGFP	verstärkt grün fluoreszierende Protein (engl. enhanced green fluorescent protein)
EGFR	engl. Epidermal-Growth-Factor-Receptor
EP	Elektroporation
EPHB6	EPH Rezeptor B6
FACS	engl. Fluorescence activated cell sorting (allgemein auch als Durchflusszytometrie bezeichnet)
Fas	Oberflächenprotein auf Zellen
FCS	fötales Kälberserum (engl. Fetal Calf Serum)
FGFR1	engl. fibroblast growth factor receptor 1

FITC	Fluoreszein-Isothiocyant
FS	Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
gr.	Griechisch
HKG	Housekeeping Gene
HL-Antigene, HLA	Humane Leukozytenantigene
HPRT1	hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
IDC	interdigitierende Dendritische Zelle
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IgG1	Immunglobulin G Subtyp 1
IL	Interleukin
JAK3	Janus Kinase 3
kb	Kilo-Basenpaare
LBP	Lipopolysaccharid-Bindungsprotein
LPS	Lipopolysaccharide
MHC	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex (engl. major histocompatibility complex)
mRNA	Boten-RNA (engl. messenger-RNA)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	Extinktion (optische Dichte, Absorption)
PBS	engl. phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. Polymerase Chain Reaction)
PE	R-Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure (engl. ribonucleic acid)
ROR2	engl. receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
RPMI	Zellkulturmedium
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosinkinase

rt-PCR	engl. Real-Time PCR
RTQ-PCR	engl. Quantitative Real-Time PCR
SS	Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter)
Stat3	engl. signal transducer and activator of transcription 3
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	Transformierender Wachstumsfaktor (engl. Transforming Growth Factor)
TK	Tyrosinkinase, -n
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
U	engl. unit
UBC	Ubiquitin C
VEGF	engl. Vascular Endothelial Growth Factor

Diese Arbeit ist ein gemeinsames Projekt mit der Doktorarbeit von Frau Jennifer Khristi, die sich mit dem Thema der Zellkultur und FACS Analyse Dendritischer Zellen beschäftigt hat. Sie enthält Teile und Experimente, die gemeinsam erarbeitet wurden. Selbstständig erarbeitet und ausgewertet wurden die Schritte zur Genexpressionsbestimmung der Dendritischen Zellen (2.2.9 - 2.2.14; vgl. auch 2.2).

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Die Aufgabe des Immunsystems ist die effektive Abwehr potentiell infektiöser Mikroben (Bakterien, Viren, Pilze, Parasiten), welchen der menschliche Körper täglich ausgesetzt ist. Es lässt sich ein angeborenes, bezüglich des Erregers unspezifisches Immunsystem sowie eine erworbene spezifische Immunität unterscheiden. Trotz dieser formellen Aufteilung besteht eine enge Verknüpfung beider Abwehrsysteme.

Für das Erkennen von Zellen, Bakterien oder Viren durch das Immunsystem ist das Vorhandensein von Antigenen nötig. Als Antigene können sowohl Kohlenhydrate, Proteine, Lipide als auch Komplexe aus diesen Molekülklassen wirken. Antikörper können sich spezifisch an solche Antigene auf Zelloberflächen binden.

Das angeborene Immunsystem ist für die Bekämpfung des Großteils der Infektionserreger verantwortlich. Im Gegensatz zur erworbenen (adaptiven) Immunität ist eine vorherige Aktivierung durch früheren Kontakt des Organismus mit dem Erreger nicht nötig. Neben den Granulozyten, Monozyten / Makrophagen, Epithelzellen und natürlichen Killerzellen gehört auch das Komplementsystem zu den zentralen Komponenten einer unspezifischen Immunantwort. Ihre wichtigsten Funktionen bestehen in der Bekämpfung des Erregers durch die Freisetzung von Botenstoffen und der Lyse oder Phagozytose des Erregers.

Das adaptive Immunsystem zeichnet sich hingegen durch sehr spezifische Abwehrmechanismen aus. Neben der humoralen Immunantwort, welche in einer Sezernierung von spezifischen Antikörpern durch Plasmazellen besteht, unterscheidet man eine zelluläre Immunantwort. Diese ist auch für die im weiteren betrachtete Abtötung von Tumorzellen

verantwortlich und besteht aus den verschiedenen Subtypen der T-Lymphozyten (T-Helferzellen, T-Suppressorzellen, zytotoxische T-Zellen). Die primäre Aktivierung entsteht durch den Kontakt Antigen-präsentierender Zellen (Dendritische Zellen, B-Zellen oder Makrophagen) mit naiven T-Zellen. Während CD-4+ T-Helferzellen die Immunantwort durch Zytokine modulieren, töten CD-8+ zytotoxische T-Killerzellen die Zielzelle direkt oder durch Einleitung des programmierten Zelltodes, der Apoptose.

1.2 Professionelle Antigen-präsentierende Zellen

Allgemein zählen die Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems (alte Bezeichnung RES, retikulo-endotheliales System), B-Zellen und Dendritische Zellen (DCs) zu den Antigen-präsentierenden Zellen.

Diese Zellen präsentieren Bruchstücke (Peptide) von Erregern auf Molekülen des Hauptgewebeverträglichkeitskomplexes (MHC) auf ihrer Außenmembran. Hierdurch können CD4- und CD8-T-Zellen mit entsprechend selektiven Rezeptoren für die MHC-Peptid-Komplexe aktiviert werden, was deren Differenzierung zu Effektorzellen bewirkt.

Der MHC Komplex kommt in unterschiedlicher Ausprägung auf den Membranen von Zellen vor. Man unterscheidet Klasse-I und Klasse-II-Moleküle. Während MHC-II nur von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) exprimiert werden, kommen MHC-I-Moleküle auf nahezu allen Körperzellen vor. Sie präsentieren Peptide von intrazellulär synthetisierten Antigenen auf MHC-I und können mitunter mit CD8+ T-Zellen interagieren (Abb. 1).

MHC-I-Moleküle spielen des weiteren eine Rolle bei der Transplantatabstoßung. Grund für die mögliche Abstoßungsreaktion nach einer Transplantation ist der Polymorphismus der MHC-Proteine, wodurch eine körperfremde Zelle sofort als solche identifiziert wird.

MHC-II-Moleküle präsentieren Peptide von exogen, phagozytiertem Antigen gegenüber CD4+ T-Zellen.

Die MHC-Moleküle des Menschen werden auch als HL-Antigene („human-leukocyte-associated antigens“) bezeichnet. [Janeway, 2002; Roitt et al., 1995]

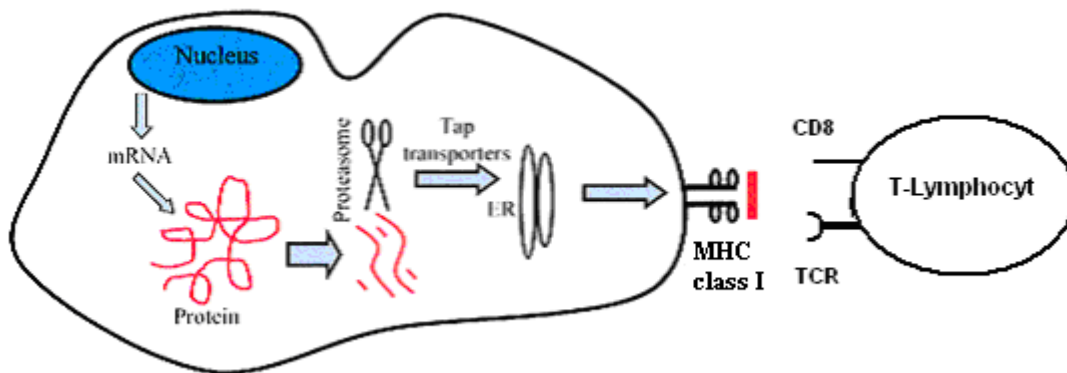


Abb. 1 Intrazellulär synthetisierte Antigene werden auf MHC-Klasse-I Molekülen gegenüber CD8+ T-Zellen präsentiert [modifiziert nach Ribas et al., 2000].

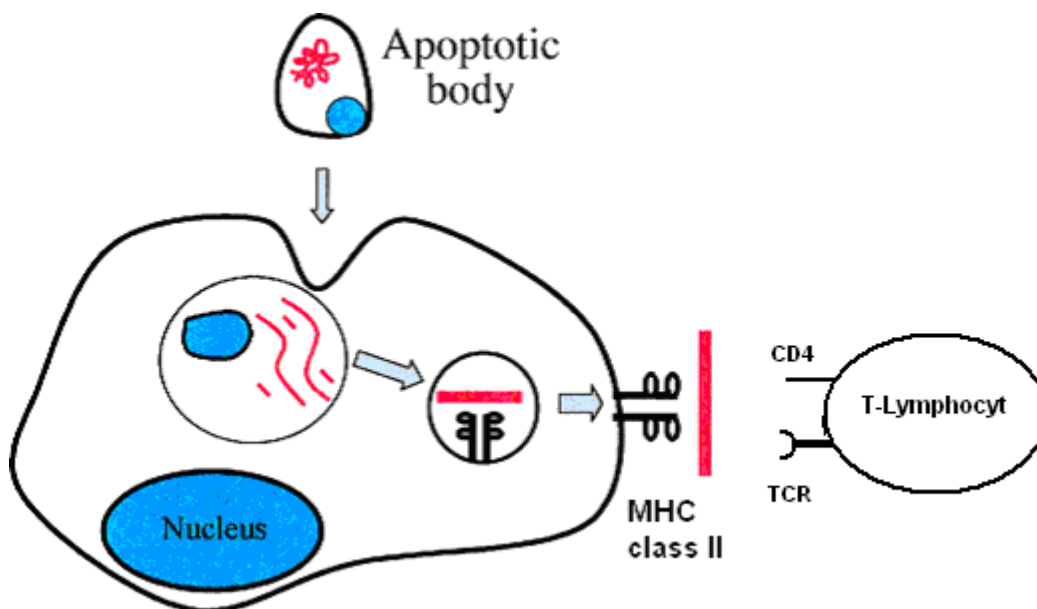


Abb. 2 Exogene Antigene werden auf MHC-Klasse-II Molekülen gegenüber CD4+ T- Zellen präsentiert (TCR: T-Zell-Rezeptor) [modifiziert nach Ribas et al., 2000].

1.3 Immunologische Effektorzellen

Zu den immunologischen Effektorzellen bei einer zellulären Anti-Tumorthherapie zählen CD8+ zytotoxische T-Zellen (CTL), CD4+ T-Helfer Zellen, CD56+ natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und NK-T-Lymphozyten.

Die Differenzierung nativer CD4+ und CD8+ T-Zellen zu Effektorzellen wird durch für TCR (T-Zell-Rezeptor) spezifische MCH-II /Peptid- bzw. MCH-I /Peptid- Komplexe initiiert. Daneben sind auch kostimulierende Moleküle für die Aktivierung der T-Zellen essentiell. Diese werden

nur von APCs und insbesondere von DCs exprimiert (vgl. auch Tab. 2). Ohne kostimulierende Moleküle werden T-Zellen tolerant (Anergie). Solche anerge T-Zellen zeichnen sich durch eine fehlende Reaktion auf ein Antigen aus und können nicht wieder aktiviert werden.

Neben der beschriebenen direkten Aktivierung von CD8+ T-Zellen ist selbige auch indirekt durch das Mitwirken von T-Helferzellen möglich. Dies trifft für den Fall zu, dass eine Antigen-präsentierende Zelle nur schwach kostimulierende Moleküle exprimiert. Eine CD4+ Zelle, welche Antigen auf der APC erkennt, kann diese zu einer höheren kostimulierenden Aktivität anregen [Janeway, 2002].

Nach Aktivierung der CD8+ Zellen differenzieren diese zu CTL, die nach erneutem MHC-I/Antigen-Kontakt auf der Zielzelle diese durch Ausschüttung von lytischen Enzymen (Perforin, Granzyme) direkt zerstören oder durch Induktion der Apoptose.

Native CD4+ Zellen differenzieren sich zu T_H1- oder T_H2-Effektorzellen. T_H1-Zellen aktivieren wiederum durch Zytokinfreisetzung (IFN- μ , TNF- α u.a.) Makrophagen, während T_H2-Zellen durch Zytokin Sezernierung (IL-4, IL-5) B-Zellen zur Sezernierung von Immunglobulinen stimulieren können (humorale Immunantwort) (Tab. 1).

	<u>CD8-T-Zellen</u>	<u>CD4-T-Zellen</u>	
	<u>Zytotoxische T-Zellen</u>	<u>T_H1- Zellen</u>	<u>T_H2-Zellen</u>
Effektormoleküle und deren Wirkung	Perforin, Granzyme, Fas-Ligand; Zytotoxische Wirkung	IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , CD40-Ligand, Fas-Ligand	IL-4, IL-5, CD40-Ligand
Andere sezernierte Faktoren	IFN- γ , TNF- β , TNF- α	IL-3, TNF- β , (IL-2)	IL-3, GM-CSF, IL-10, TNF- β

Tab. 1 Übersicht der drei verschiedenen T-Effektorzellen und der sezernierten Effektormoleküle
 Zytotoxische T-Zellen können Zielzellen direkt mittels lytischer Enzyme (Perforin, Granzyme) töten oder durch Binden des Fas-Liganden die Apoptose der Zielzelle initiieren.
 T_H1-Zellen sind auf die Aktivierung von Makrophagen spezialisiert, welche Pathogene aufgenommen haben.
 T_H2-Zellen regen B-Zellen zur Differenzierung an, so dass diese antigenspezifische Antikörper sezernieren. Der membranständige CD40-Ligand bindet an CD40 auf der B-Zelle, wodurch diese zur Proliferation angeregt wird. [nach Janeway, 2002]

NK-Zellen können ohne vorherige Sensibilisierung zytotoxisch wirksam werden, indem sie gezielt Zellen mit einer erniedrigten Expression der MHC-I- Moleküle abtöten.

Dieses Herunterregulieren von Oberflächenmarkern stellt einen typischen Escape-Mechanismus vieler Tumoren gegen adaptive Immunantworten dar.

NK-T-Lymphozyten verdanken ihre Benennung der Eigenschaft außer einem T-Zell-Rezeptor auch Oberflächenmoleküle wie NK-Zellen zu besitzen. Sie können dank einer hohen Expression von CD1 auf ihrer Oberfläche auch von DCs aktiviert werden. CD1 ist ein MHC ähnliches Molekül, welches allerdings nur eine begrenzte Vielfalt an Antigenen binden kann. [Janeway, 2002]

1.4 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) stellen eine heterogene Zellgruppe dar, deren Bezeichnung auf ihrer Eigenschaft Membranausläufer zu bilden, beruht ((gr.) dendron – Baum). Diese typische verzweigte Morphologie findet sich insbesondere bei den gereiften DCs, welche sich in den T-Zell-Bereichen der lymphatischen Gewebe befinden. DCs gehören zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) und sind neben der Initiierung der T-Zellimmunantwort für die Entwicklung der immunologischen Toleranz verantwortlich. [Banchereau und Steinman, 1998; Janeway, 2002; Roitt et al., 1995]

DCs können aus peripheren mononuklearen Zellen durch Zytokingabe generiert werden. Die Identität dieser Zellen mit natürlich vorkommenden DCs wurde nachgewiesen. In *vivo* stammen DCs und Blutzellen von gemeinsamen, sich im Knochenmark befindlichen CD34+ Vorläuferzellen ab (Abb. 3). [Banchereau und Steinman, 1998; Romani et al., 1994]

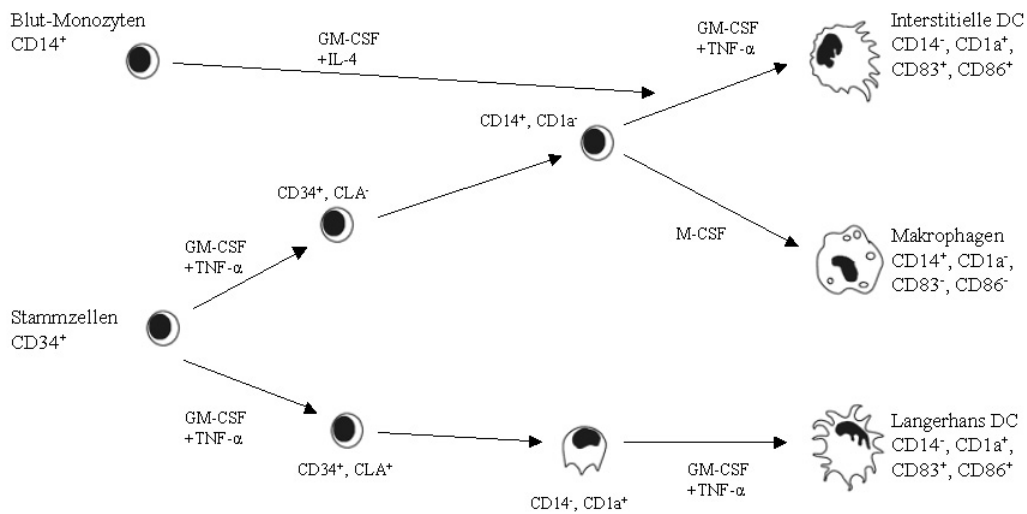


Abb. 3 Entwicklung Dendritischer Zellen aus CD34+ Stammzellen und aus CD14+ Monozyten Entscheidend für eine entsprechende Entwicklung ist die Stimulation mit Zytokinen. [modifiziert nach Alijagic, 2003]

Eine Vielzahl von Untergruppen konnte identifiziert werden, z.B. Langerhanszellen (in der Haut), interstitielle DC (in Herz, Nieren, Darm, Lunge), interdigitierende DC, folliculäre DC, lymphatische DC und „Schleierzellen“ („veiled cells“) in Blut und Lymphknoten. Unreife Dendritische Zellen befinden sich im peripheren Gewebe. In diesem Zustand sind sie aufgrund einer geringen Expression von MHC-Proteinen sowie kostimulatorischen Proteinen nicht fähig naive T-Zellen zu stimulieren. Dies wird erst nach einem Ausreifungsprozess möglich, welcher mit der Aufnahme von Antigenen durch Phagozytose und Makropinozytose beginnt. Die dendritischen Zellausläufer der DCs bilden sich zurück und die Zellen wandern zu den lymphatischen Geweben, wo sie nach vollständiger Ausreifung einen anderen Phänotyp aufweisen (Abb. 4).

Durch die Ausreifung der DCs wird die Phagozytoserate vermindert und damit deren Fähigkeit weitere Antigene aufzunehmen. Demgegenüber erhöht sich die Zahl an MHC-I und MHC-II Molekülen sowie die Expression kostimulatorischer und T-Zell-interagierender Oberflächenmoleküle wie CD40, CD80, CD86, CD58 (LFA-3) und CD54 (ICAM-1). Charakteristisch für die eingesetzte Reifung ist außerdem die erhöhte Produktion des Reifungsmarkers CD83. Die Fähigkeit des Anlockens naiver T-Zellen und der Regulation der Immunantwort wird durch die Produktion bestimmter Chemokine (z.B. IL-8) und Zytokine (z.B. IL-12) ermöglicht. In den Lymphgeweben kommt es dann zur Präsentation des in der Peripherie

aufgenommenen Antigenen. Mit der Aktivierung naiver T-Zellen ist die adaptive Immunantwort in Gang gesetzt. [Banchereau et al., 2000; Banchereau und Steinman, 1998]

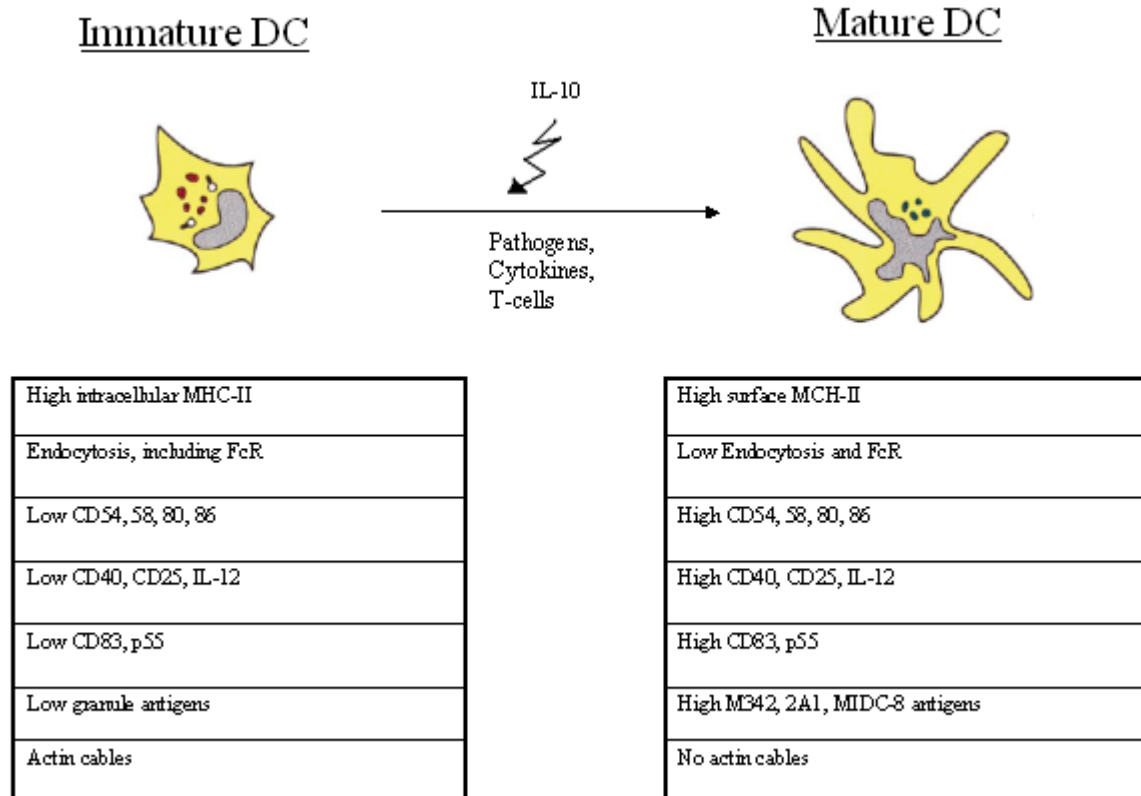


Abb. 4 Veränderung der Eigenschaften und des Phänotyps durch den Ausreifungsprozess von DC

Die ausgereifte Dendritische Zelle ist kaum noch fähig Antigene aufzunehmen. Neben ihrer hohen Dichte an MHC-Molekülen ist die Expression von T-Zell-stimulierenden Molekülen (CD40, CD80, CD86), Reifungsmarkern (CD83) und einer vermehrten Produktion von IL-12 zu beachten. Interleukin 10 (IL-10) kann die Ausreifung hemmen. [modifiziert nach Banchereau und Steinman, 1998]

Die besondere Effizienz der Präsentation von Antigenen für T-Zellen ist folglich nicht nur in der schon beschriebenen hohen Expression an MHC-Molekülen begründet, sondern insbesondere auch in ihrer Fähigkeit, T-Zellen anzulocken und zu stimulieren (vgl. auch Tab. 2). Folglich wird angenommen, „dass die IDC (interdigitierende Dendritische Zellen) die wichtigsten Antigen-präsentierenden Zellen bei der primären Immunantwort sind“ [Roitt et al., 1995].

Aufgrund der genannten Eigenschaften spielen DCs heute eine wichtige Rolle bei der Erforschung neuer immunologischer Tumorthérapien [Brooks und Moore, 1988; Inaba et al., 1998; Laupeze et al., 1999].

Im direkten Vergleich zu Makrophagen sind DCs zwar in ihrer Fähigkeit der Antigenpräsentation überlegen, ihre Phagozytoseaktivität ist jedoch verhältnismäßig gering [Vogt et al., 2000].

	<u>Dendritische Zellen</u>	<u>Makrophagen</u>	<u>B-Zellen</u>
Antigenaufnahme	+++ dendritische Gewebezellen: Makropinocytose und Phagocytose	+++ Phagozytose	+++ Antigenspezifischer Rezeptor (Ig)
MHC-Expression	DCs im Gewebe: + DCs im Lymphgewebe:+++	- bis +++ induzierbar	+++ bis ++++ Zunahme bei Aktivierung
Aussendung kostimulierender Signale	++++ durch reife lymphatische DCs	- bis +++ induzierbar	- bis +++ induzierbar
präsentierte Antigene	Peptide, virale Antigene, Allergene	partikuläre Antigene, intra- und extrazelluläre Pathogene	lösliche Antigene, Toxine, Viren
Lokalisation	lymphatisches Gewebe, Bindegewebe, Epithelien	lymphatisches Gewebe, Bindegewebe, Körperhöhlen	lymphatisches Gewebe, Blut in der Peripherie

Tab. 2 Eigenschaften verschiedener Antigen-präsentierender Zellen

Gegenüberstellung einiger Eigenschaften der wichtigsten Zelltypen, die als erste naiven T-Zellen Antigene präsentieren. Neben den dargestellten Unterschieden findet man auch unterschiedliche Adhäsionsmoleküle auf den jeweiligen Zelloberflächen. [nach Janeway, 2002]

1.5 Anti-Tumor-Immuntherapien

Das Ziel von Immuntherapien bei malignen Tumorerkrankungen besteht darin, dass körpereigene Immunsystem gegenüber den Krebszellen zu sensibilisieren und somit die Abwehr des Körpers zu steigern. Einige Formen der Immuntherapien bestehen in der Verabreichung sogenannter Immunmodulatoren (Zytokine), mit welchen die Zellen des Immunsystems sich natürlicherweise koordinieren (z.B. aktivieren). Eine aktive Art der Immuntherapien, vergleichbar mit Impfungen gegen Bakterien oder Viren, besteht im Anbieten von Tumorantigenen, wodurch das Immunsystem gegen die Tumorzellen sensibilisiert werden soll (sog. Vakzinierungstherapie). Bei dieser Art der aktiv-spezifischen Therapie müssen zunächst Tumormaterial und DCs gewonnen werden, um daraus den Impfstoff herzustellen. DCs können sowohl mit Tumorprotein oder Tumorpeptid beladen als auch mit Tumorantigen-DNA bzw. -RNA transfiziert werden. Die mit Tumorantigen beladenen DCs des Patienten können nach der Impfung CD4+ oder CD8+ T-Zellen aktivieren.

In *vivo* zeigen sich viele Tumore jedoch resistent gegenüber einer T-Zell induzierten Immunantwort. Gründe dafür können die Abwesenheit von funktionsfähigen DCs in vielen Tumoren oder aber sogenannte Escape-Mechanismen der Tumoren selbst sein.

So zeigten Studien, dass DCs in Dickdarm- und in Basalzell-Tumoren der Haut kostimulatorische Oberflächenmoleküle fehlen (CD 80 und CD86) und dadurch nur eine reduzierte stimulierende Wirkung auf T-Zellen haben (nach [Chaux et al., 1996] in [Banchereau und Steinman, 1998]).

In *vitro* konnte eine spezifische Lyse von Tumor-Zellen durch zytotoxische T-Zellen induziert werden, wenn diese zuvor mit Antigen-präsentierenden DCs kokultiviert wurden. Dadurch wurde nachgewiesen, dass es möglich ist, über DCs Tumorantigene präsentieren zu lassen und nach Aktivierung von T-Zellen eine Immunantwort auch auf Tumoren zu induzieren, die sich gegenüber immunologischen Effektorzellen in vorherigen Studien als resistent erwiesen hatten. [Marten et al., 2000; Ziske et al., 2001]

Die intratumorale Injektion von funktionsfähigen Antigen-präsentierenden DCs wiederum bewirkte in einer anderen Studie im Mausmodell eine effektivere Immunantwort als bei subkutaner oder intravenöser Injektion [Schmidt et al., 2003]. Dies bestätigt die Bedeutung der Anwesenheit von funktionsfähigen Antigen-präsentierenden DCs in Tumoren.

Die Injektion von Tumorantigen-präsentierenden, ausgereiften DCs hat im Tiermodell zu einer gewissen Tumormunität geführt und teilweise auch einer Reduktion der Größe etablierter Tumore [Schmidt et al., 2003; Schuler und Steinman, 1997]. Neuere klinische Studien an

Melanompatienten zeigen ebenfalls einen Anti-Tumor-Effekt durch die Behandlung mit autologen, mit Tumorpeptiden oder Tumorlysat gepulsten DCs, wenn auch die Effektivität und Tumor-Spezifität der Methode verbessert und Tumor-Escape-Mechanismen noch weiter erforscht werden müssen [Nakai et al., 2006].

Ein weiterer Mechanismus, wie sich Tumoren vor einer gegen sie gerichteten Immunantwort schützen, ist die direkte Hemmung der DC-Ausreifung und somit ihrer Funktion durch die Sekretion von Faktoren wie IL-10, TGF- β oder „vascular endothelial growth factor“ [Banchereau und Steinman, 1998; Roitt et al., 1995].

1.6 Das Pankreaskarzinom

Tumoren des Pankreas sind statistisch gesehen vorwiegend exokrinen Ursprungs (95%), wobei wiederum 80% dieser Pankreaskarzinome duktales Ursprungs sind. Das Pankreaskarzinom zeichnet sich durch eine schlechte Prognose mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von unter 5% aus. Mit einer Inzidenz von ca. 10/100.000 handelt es sich um das fünfthäufigste Malignom der westlichen Länder. Der Häufigkeitsgipfel liegt in der 7. Lebensdekade. Die genaue Ätiologie des Tumors ist bislang unbekannt. Als Risikofaktoren gelten aber Rauchen sowie fleisch- und fetthaltige Ernährung. Auch regelmäßiger Kaffeekonsum wird als prädisponierender Faktor diskutiert.

Vielfach treten fast keine Frühsymptome auf. Erst bei fortschreitender Erkrankung beklagt der Patient deutliche Beschwerden in Form von diffusen Oberbauchbeschwerden, Gewichtsverlust, Appetitlosigkeit, Anämie, schmerzloser, progredienter Ikterus, palpable Gallenblase und auch seltener Pankreasinsuffizienz. Aufgrund dessen wird das Pankreaskarzinom oftmals (80%) erst im fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert und die Prognose entsprechend schlechter. Zur Therapie stehen eine vollständige chirurgische Resektion oder adjuvante Therapieansätze wie Strahlen- oder Chemotherapie zur Auswahl. Aufgrund unbefriedigender Ergebnisse werden neue, beispielsweise immuntherapeutische Ansätze erforscht. [Kraft, 2002; Pschyrembel, 2002]

1.7 Gentransfer

Es gibt verschiedene Möglichkeiten Tumorantigen in DCs einzubringen, so dass dieses von DCs präsentiert wird (Abb. 5).

Zell-Fusionen von Tumorzellen mit DCs werden durchgeführt, um Tumorzell-DC-Hybride zu erschaffen, welche Charakteristika beider Zelltypen aufweisen und somit Tumorantigene dem Immunsystem präsentieren können.

Mittels Makropinozytose oder Endozytose können DCs Antigene von apoptotischen Zellen oder Proteinen aus Tumorlysat aufnehmen, prozessieren und schließlich an ihrer Oberfläche präsentieren.

Das Pulsen von DCs mit Antigen-Peptiden erfolgt lediglich durch Inkubation. Hierbei muss jedoch darauf geachtet werden, dass reife DCs mit hoher MHC-Expression verwendet werden.

Die Methoden zur künstlichen Einschleusung von genetischem Material in eine Zielzelle werden unter dem Begriff der Gentransfera zusammengefasst. Zu diesen zählen unter anderen die Methode der Mikroinjektion, bei welcher die DNA mit einer Mikropipette in die Zelle injiziert wird, die Transduktion mit Viren, die Lipofektion sowie die Elektroporation.

Bei der Transduktion werden nicht vermehrungsfähige Viren zum Einbringen von genetischem Material in die Zelle verwendet. Nachteil dieser Methode kann sein, dass DCs neben den translatierten Tumor-Proteinsequenzen auch Virusproteine auf ihrer Oberfläche präsentieren, wodurch die Zelle *in vivo* als erkrankt erkannt und folglich eliminiert werden kann noch bevor sie einen immunstimulatorischen Effekt gegen den Tumor bewirken kann.

Bei der Lipofektion werden positiv geladene Liposomen verwendet, um genetisches Material (DNA, RNA) in die Zelle einzubringen. Die positive Ladung der Liposomen ist hilfreich, um eine mögliche Abstoßungsreaktion zwischen Zellmembran und DNA zu verhindern. Allgemein ist die Effizienz des Gentransfers abhängig von dem verwendeten Lipid Vehikel, dem Quotienten aus Nukleinsäure zu Lipidanteil, der Zellart sowie der Konzentration und der damit verbundenen Toxizität des Komplexes [Banchereau und Steinman, 1998; Mitchell und Nair, 2000; Ribas et al., 2000].

Die Methode der Elektroporation beruht auf der Erzeugung mikroskopisch kleiner Löcher in der Zellmembran durch Stromstöße. Sind in der Umgebungsflüssigkeit freie Nukleinsäuren enthalten, so können diese durch die Löcher intrazellulär aufgenommen werden.

Die Benutzung von mRNA gegenüber DNA aus Tumorzellen für die Elektroporation hat mehrere Vorteile. Im Gegensatz zur DNA muss die RNA nur das Zytoplasma der Zielzelle erreichen, um in Proteine translatiert werden zu können. Die DNA muss demgegenüber den Zellkern erreichen, wo sie noch in mRNA transkribiert werden muss. In Bezug auf die geringere Halbwertszeit der RNA (24 Stunden in Säugerzellen) ist dies auch ein Sicherheitsvorteil, da die Tumor-DNA über Monate persistieren und funktionieren könnte. Dieser Punkt ist insbesondere dann bedenkenswert, wenn die DNA für Proteine kodiert, die direkt für das Entarten von Zellen verantwortlich sind. [Mitchell und Nair, 2000]

In Studien wurde die Effizienz der mRNA-Elektroporation auch in Bezug auf die spätere Fähigkeit zur Präsentation bei DCs nachgewiesen [Bonehill et al., 2004; Van Tendeloo et al., 2001].

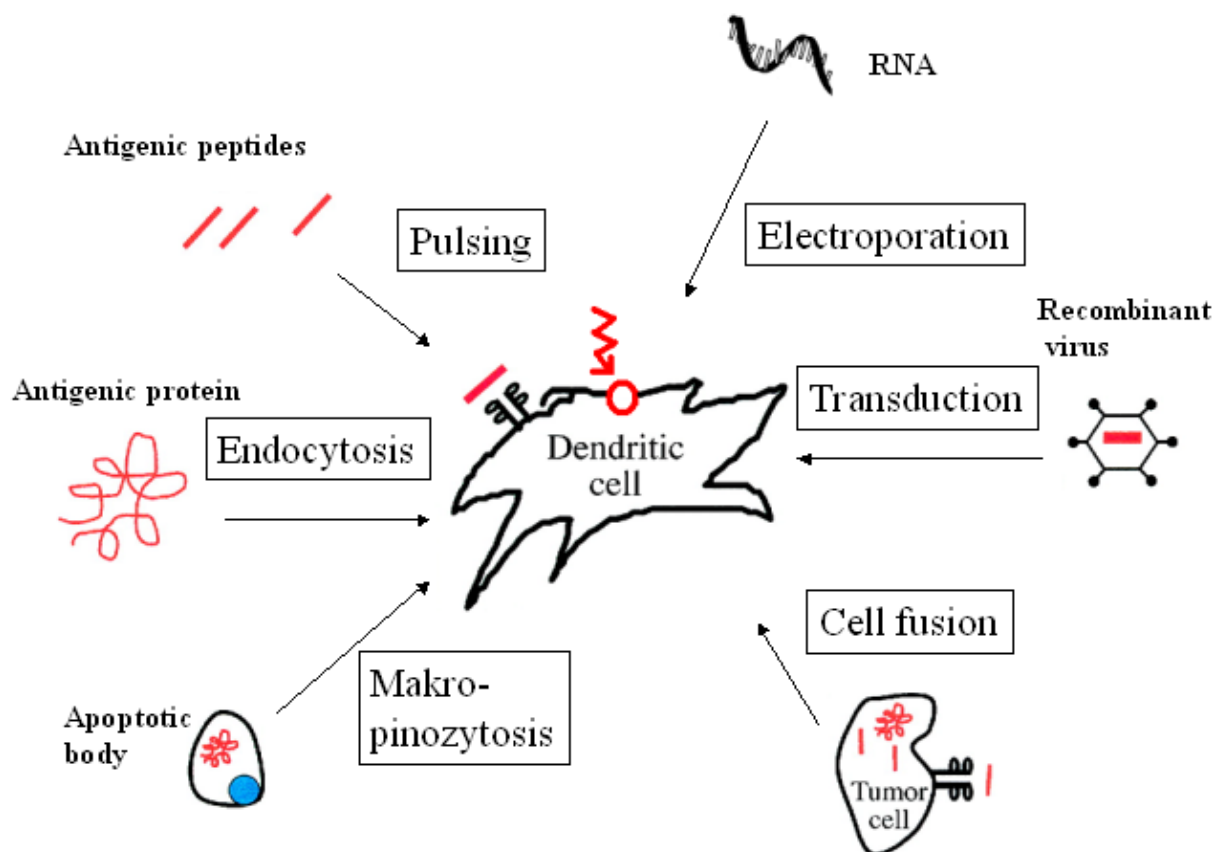


Abb. 5 Allgemeiner Überblick über verschiedene Methoden DCs mit Tumorantigenen zu beladen. Repräsentativ für die Methoden der Gentransfers sind hier die Methoden der Transduktion mit Viren und die Elektroporation schematisch dargestellt. [modifiziert nach Ribas et al., 2000]

1.8 Tyrosinkinasen

Die Tyrosinkinasen (TK) gehören zur Enzymgruppe der Kinasen, welche Phosphatreste von ATP auf andere Substrate übertragen können. Tyrosinkinasen spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Signalwegen der Zelle. Die meisten grundlegenden zellulären Prozesse wie der Zellzyklus, das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung, der Metabolismus, die Adhäsion, die Beweglichkeit der Zelle und das Überleben werden über Signalwege mit Tyrosinkinasen gesteuert. Neben intrazellulären TK exprimieren Zellen auf ihrer Zelloberfläche sogenannte Rezeptor-Tyrosinkinasen (RTK). Über diese Rezeptoren kann der Organismus Einfluss auf verschiedene Signalwege der Zelle nehmen.

RTK bestehen aus einem extrazellulären Anteil mit Ligandenbindungsdomäne, einer Transmembran- α -Helix und einem katalytisch wirksamen intrazellulären Anteil mit Tyrosinkinasendomäne mit C-terminalem Ende. Die Bindung eines Liganden induziert eine Rezeptordimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung bestimmter Tyrosinreste. Dies führt je nach Rezeptor zur Rekrutierung verschiedener Signalproteine (Abb. 6). (nach [Yarden und Ullrich, 1988] in [Hassel, 2003]; [Blume-Jensen und Hunter, 2001; Robinson et al., 2000; Schlessinger, 2000])

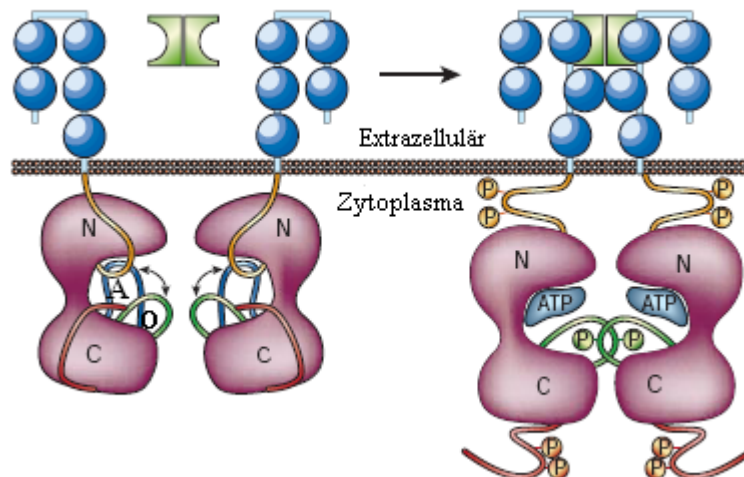


Abb. 6 Modell der Aktivierung einer Rezeptor-Tyrosinkinase (z.B. EGFR, VEGFR)

Links: Es besteht ein Gleichgewicht zwischen der Substrat-ausschließenden- (A) und der für Substratanlagerung offenen Konformation (O).

Rechts: Durch Substratanlagerung kommt es zur Dimerisierung und anschließender Autophosphorylierung. Die Dimerisation wird durch zusätzliche Rezeptor-Rezeptor Interaktionen stabilisiert. [modifiziert nach Blume-Jensen und Hunter, 2001]

Als Folge der Aktivierung von RTK werden Signalproteine auf unterschiedliche Art und Weise aktiviert. Man unterscheidet drei grundlegende Möglichkeiten der Aktivierung von Signalproteinen: Die Aktivierung durch Membrantranslokation, durch eine Konformationsänderung oder durch Phosphorylierung. Die aktivierten Signalproteine sind in die Signalwege der Zelle eingebunden. [Schlessinger, 2000]

Die Sequenzierung des Humanen Genoms ermöglichte erstmals die Erstellung einer nicht redundanten Zusammenstellung aller Tyrosinkinase. Die heute bekannten 90 TK bestehen aus 58 RTK, untergliedert in 20 Unterfamilien und 32 „Non-Rezeptor“ TK, bestehend aus zehn Unterfamilien (vgl. auch Tabelle 1 im Anhang). Wichtig für die weitere Erforschung der TK ist, dass fast zu allen homologe murine TK gefunden werden konnten [Robinson et al., 2000].

Tyrosinkinase spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen wie Diabetes und Krebs, ebenso wie bei einer Reihe von kongenitalen Syndromen (nach [Robertson et al., 2000] in [Robinson et al., 2000]).

In Bezug auf eine maligne Entartung konnten gesteigerte Aktivität und Expression von TK in bestimmten Tumoren beobachtet werden [Blume-Jensen und Hunter, 2001; Muller-Tidow et al., 2004]. Dies prädestiniert sie zu möglichen Ansatzpunkten für Tumorthérapien, insbesondere mit Inhibitoren wie dem TK-Inhibitor „Imatinib“ [Baselga und Arribas, 2004; Vlahovic und Crawford, 2003].

1.9 Zielsetzung / Fragestellung

DCs sind hochpotente Antigen-präsentierende Zellen und spielen eine wichtige Rolle bei Anti-Tumor-Immuntherapien. Ziel der durchgeführten Untersuchungen ist es, eine relative Expressionsveränderung der Tyrosinkinasen während des Ausreifungsprozesses der DCs zu beobachten. Dazu werden unterschiedlich stimulierte DCs mittels einer Real-Time PCR quantitativ in Bezug auf ihre TK-Expression miteinander verglichen.

Dabei sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

Welche der benutzten Stimulationsarten ist für einen beobachteten Unterschied in der Expression verantwortlich? Um welchen Faktor werden diese Tyrosinkinasen während des Ausreifungsprozess hochreguliert bzw. herunterreguliert und wie kann dieses interpretiert werden? Kann man durch die Beobachtung der Expressionsänderung von TK mit bekannten Signalwegen Rückschlüsse auf das Vorgehen in der Zelle ziehen?

Aufbauend auf den durchgeführten Versuchen könnten neue Zusammenhänge zwischen einzelnen Signalwegen verifiziert werden und damit allgemein das Wissen über die Zusammenhänge der intrazellulären Signaltransduktionen vermehrt werden. [vgl. auch Schlessinger, 2000].

In Zukunft könnten, gleichzeitig mit dem Wissen über die Funktion einzelner TK bei der Ausreifung und Aktivierung von DCs, diese direkt mit Agonisten aktiviert werden. Dies würde insbesondere für Rezeptor-Tyrosinkinasen gelten. Allgemein könnten die Methoden der Anti-Tumor-Immuntherapie durch eine Verbesserung der Mobilität oder Ausreifung von DCs verbessert werden [vgl. auch Banchereau und Steinman, 1998].

2. Materialien und Methoden

2.1 Material

Für die Zellkultur und die im Abschnitt 2.2 beschriebenen Methoden wurden folgende Materialien und Apparaturen verwendet:

Zellkultur	Einwegmaterialien der Firma Falcon (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
Elektroporation	Elektroporationsküvetten der Größe 4 mm (PEQLAB, Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland), Elektroporationsmaschine Easy Ject (Equi Bio, Kent, Großbritannien)
Photometrische Quantifizierung von RNA	Photometer (UV Mini 1240, UV-Vis Spektrometer, Shimadzu, Duisburg, Deutschland)
FACS-Analyse	Durchflusszytometer (Coulter Epics XL; Beckmann Coulter, GmbH Krefeld, Deutschland)
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	384-well-Platten (Abgene, Hamburg, Deutschland), eine Biometra PCR Maschine (Göttingen, Deutschland) und eine Real-Time PCR Maschine (TaqMan-Low-Density Array-System 7900HT; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit dazugehörigen MicroFluid Cards (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)

Zur Auswertung der FACS-Ergebnisse wurde das Programm WinMDI (Version 2.8 von Josef Trotter) verwendet.

Die Analyse der Real-Time PCR Daten erfolgte mit den Programmen SDS 2.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) sowie „qbase“ (von Jo Vandesompele) und „geNorm“ [Vandesompele et al., 2002].

2.1.1 Lösungen, Puffer, Reagentien und Medien

- BSA (Bovine Serum Albumin), PBS (Phosphate Buffered Saline) und Lymphoprep (PAA Laboratories GmbH Cölbe, Deutschland)
- FCS (Fetal Calf Serum), Opti-Mem (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- PBS mit 1% BSA (PBS/BSA)
- Erythrozytenlysepuffer: Ammoniumchlorid 8,29 g/l, Kaliumhydrogencarbonat 1,0 g/l, EDTA 0,0371 g/l in Aqua bidest, durch 0,2 µm-Filter steril filtriert
- Versene (EDTA; Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- DNase I, RNase Inhibitor (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- LPS (Sigma, Aldrich, Deutschland)
- eGFP-RNA in pSP64-Vektor (SP64 Vektor, Promega, Mannheim, Deutschland)
- 10 x TBE-Puffer: 108g Tris, 55g Borsäure, 40ml 0,5 M EDTA (ph 8,0), ddH₂O (doppeltdestilliertes Wasser) ad 1 l
- 6 x Agarosegel-Ladepuffer: 12,5 mg Bromphenolblau, 12,5 mg Xylencyanol, 7,5 g Ficoll (Typ 400), ddH₂O ad 50 ml
- RNA-Größenmarker (0,24-9,5 kB, 1 µg/µl; Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Random Nonamere als Primer (Operon Biotechnologies, Inc., Huntsville, USA)
- RNase Inhibitor, Primer (GAPDH), PCR-MasterMix (alle von Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- Omniscript - Kit und RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)
- RPMI-Medium: RPMI 1640, fetales Kälberserum FCS 10% (30 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und Hepes Puffersubstanz 2,5 % (PAA Labortories GmbH, Cölbe, Deutschland)
- DC-Medium: RPMI 1640, autologes Serum 10% (40 min bei 56°C hitzeinaktiviert), 100 U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin und Hepes Puffersubstanz 2,5 % (PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland)

2.1.2 Zytokine

GM-CSF (Leukine Immunex Coporation, Seattle, USA)

IL-4 (Immuno Tools, Friesoythe, Deutschland)

2.1.3 Antikörper

Die verwendeten Antikörper (Isotypenkontrolle, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR) waren entweder R-Phycoerythrin (PE)- oder Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC)-konjugiert.

<u>Hersteller</u>	<u>Antikörper</u>
Beckmann Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland	Isotypkontrolle IgG1-PE/FITC Anti CD14 FITC Anti CD40 PE Anti CD80 FITC
BD Bioscience Pharmingen, Heidelberg, Deutschland	Anti CD83 PE Anti CD86 PE Anti-HLA-DR

2.1.4 Zelllinien

Die humane Pankreaskarzinomzelllinie DAN-G stammt aus der DSMZ (Deutsche Sammlung für Zellkultur, Braunschweig, Germany).

Die autologen DCs stammen von Buffy Coats gesunder Spender.

2.2 Methoden

Die im folgenden beschriebenen Methoden der Zellkultur, Elektroporation, FACS Analyse und RNA-Isolierung (2.2.1-2.2.8) sind Bestandteil der Doktorarbeit von Frau Jennifer Khristi. Die angewendeten Methoden und diesbezüglichen Ergebnisse (3.1-3.3) werden hier zum Zwecke der Vollständigkeit und Transparenz zusätzlich mit aufgeführt.

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert (Heraeus, ThermoElectron GmbH, Dreieich).

Die Zellzahlbestimmung erfolgte durch Färbung mit Trypanblau. 20µl Zellsuspension wurden mit 180µl Trypanblau 0,5% 1:10 verdünnt. Bei Bedarf wurde eine weitere Verdünnung mit PBS durchgeführt. In einer Neubauer-Zählkammer erfolgte dann lichtmikroskopisch die Auszählung der vitalen Zellen in vier Quadranten. Ein Quadrant enthält 0,1µl Zellsuspension.

Die Zellzahl errechnet sich nach der Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl in 4 Quadranten}}{4} \times \text{Verdünnung} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

Die Arbeiten erfolgten mit Ausnahme der Zellzählung unter einer sterilen Werkbank (Herasafe 12, Heraeus, Hanau und antair BSK, Bioflow, Meckenheim, Deutschland).

2.2.2 Generierung von Dendritischen Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes

Monozyten wurden durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut isoliert. Dazu wurde dem Blut zunächst PBS/BSA 1% (im Verhältnis 1:1) hinzugefügt. Diese Mischung wurde im Verhältnis 1:3, d.h. ein Teil Lymphoprep mit zwei Teilen Blut-PBS/BSA, überschichtet und für 30 Minuten bei 1000g (Erdbeschleunigung), ohne Bremse zentrifugiert (Varifuge 3.0, Sa. Heraeus Sepateh, Hanau, Deutschland). Das Blut stammte aus heparinisierten Buffy Coats von freiwilligen Blutspendern des Blutspendedienstes des Universitätsklinikums Bonn.

Nach Zellzählung der lebenden Zellen in Trypanblaufärbung wurden die mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut in einer Konzentration von 5-6 x 10⁶ /ml RPMI-Medium (Herstellung s. 2.1.1) in Zellkulturflaschen ausgesät. Allgemein ergaben sich bei dieser ersten Zählung insgesamt Zellzahlen zwischen 2 x 10⁸ und 7 x 10⁸ Zellen / Buffy Coat. Nach einer

Stunde Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank wurden die nicht adhärenen Zellen durch vollständiges Abpipettieren des Mediums entfernt. Die Anreicherung der Monozyten beruhte dabei auf der Nutzung ihrer Adhärenz auf Plastikoberflächen.

Die Kultur von Monozyten zur Gewinnung Dendritischer Zellen basierte auf einer Standardmethode [Nagaraj et al., 2004; Romani et al., 1994; Ziske et al., 2001]. Die verbliebenen adhärenen Monozyten wurden mit 20ml DC-Medium/Zellkulturflasche unter Zugabe von 750U/ml Interleukin-4 (IL-4) und 500U/ml Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (GM-CSF) kultiviert um reife Dendritische Zellen zu generieren. Das Kulturmedium sowie die Zytokine wurden nach drei Tagen erneuert. Im Verlauf der Kultur wurden die Zellen mindestens jeden zweiten Tag in Bezug auf ihre Zellmorphologie mit dem Lichtmikroskop kontrolliert. Zusätzlich wurde am fünften Tag eine Charakterisierung der Zellen durch Analyse ihrer exprimierten Oberflächenmarker mittels Durchflusszytometrie vorgenommen.

2.2.3 Kultur der Tumorzelllinie

Die humane Pankreaskarzinomzelllinie DAN-G, wurde in RPMI-Medium in Zellkulturflaschen (75 cm², Falcon, Becton Dickson) im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei Bedarf wurde das Kulturmedium erneuert. Ein bis zweimal pro Woche wurden die adhärenen Zellen bei ausreichender Bedeckung des Bodens der Kulturflaschen mit Versene (Gibco) geerntet. Anschließend wurden die Zellen entweder als Zellpellet zu je 5 x 10⁶ Zellen bei -25°C eingefroren oder nach Teilung im Verhältnis 1:4 wieder neu in Kulturflaschen zur weiteren Kultur überführt.

2.2.4 RNA-Isolierung aus DAN-G Zellen

Die RNA-Isolierung aus den zuvor eingefrorenen Zellpellets wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Valencia, USA) und der vom Hersteller beigefügten Anleitung durchgeführt. Dabei wurde auf einen DNase-Verdau verzichtet. Nach dem Resuspendieren der RNA in RNase-freiem, sterilen Wasser wurde die RNA-Menge mit einem Photometer (UV Mini 1240, UV-Vis Spektrometer, Shimadzu, Duisburg, Deutschland) bestimmt. Da der RNA-Gehalt der Probe mit der Absorption bei einer Wellenlänge von 260nm (OD₂₆₀) korreliert, konnte anhand folgender Formel die RNA-Konzentration in der Probe gemessen werden:

$$\text{RNA - Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \text{OD}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnung}$$

Durch Multiplikation mit dem Volumen der Probe errechnete sich die isolierte RNA-Menge:

$$\text{RNA Menge } [\mu\text{g}] = \text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] \times \text{Volumen der Probe [ml]}$$

Die Absorption der Probe bei 280nm (OD_{280}) ist ein Maß für dessen Proteingehalt und somit konnte die Reinheit der Probe durch den Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ ausgedrückt werden. Dieser Wert variierte typischerweise zwischen 1,8 und 2,1.

Die Proben wurden anschließend nach Zugabe von 1 μ l RNase-Inhibitor / Ansatz (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bei -25°C eingefroren.

2.2.5 Elektroporation

Zur intrazellulären Aufnahme der zuvor isolierten Pankreas-Tumor-RNA wurden die DCs am vierten Tag transfiziert. Dabei bediente man sich der Methode der Elektroporation, bei welcher die Zellmembran durch ein elektrisches Feld kurzzeitig permeabel wird. Bei Anwesenheit der Fremd-RNA konnte diese intrazellulär aufgenommen werden.

Zunächst wurden die DCs mit cell-scrapern (Zellschabern) geerntet und zweifach gewaschen, zunächst mit RPMI 1640 (PAA) und anschließend mit Serum-freiem Opti-Mem (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland). Für die Elektroporation wurden 4 mm Elektroporations-Küvetten (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) und ein Elektroporationsgerät benutzt (Easy Ject device; EquiBio, Kent, UK). Jeweils 1×10^6 Zellen wurden in 200 μ l Medium in Anwesenheit von 20 μ g DAN-G Zell-RNA oder eGFP-RNA für durchschnittlich 11 msec gepulst. Die angelegte Spannung betrug 300V und die elektrische Kapazität 150F. Direkt im Anschluss wurden die Küvetten mit frischem DC Medium ausgewaschen und die DCs in 6-Loch-Platten mit insgesamt 2 ml Medium pro well (mit Zytokinen) weiter im Brutschrank kultiviert.

Sechs Stunden nach der Elektroporation wurden die DCs durch Gabe von Lipopolysacchariden (LPS) aus dem Bakterium *Helicobacter pylori* zur weiteren Ausreifung stimuliert. Frühere Studien haben gezeigt, dass LPS ein effektives Stimulans zur Ausreifung der DCs darstellt. Dieser Differenzierungsprozess kann außer durch das eigentliche Bakterium auch durch dessen antigene Komponenten induziert werden. [Kranzer et al., 2004]

Am Ende des vierten Tages wurde jede DC-Zellkultur in vier Unteransätze aufgeteilt (Tab. 3).

<u>Abkürzung des Ansatzes</u>	<u>LPS Gabe</u>	<u>Elektroporation</u>	<u>Elektroporation mit DAN-G RNA</u>
DC ^{-LPS}	-	-	-
DC ^{+LPS}	+	-	-
DC ^{EP}	+	+	-
DC ^{EP+RNA}	+	+	+

Tab. 3 Aufteilung der Dendritischen Zellen in vier unterschiedlich stimulierte Ansätze (EP – Elektroporation)

2.2.6 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder FACS (Fluorescence activated cell sorting) beschreibt ein optisches Messverfahren für einzeln fokussierte Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Mittels Pressluft werden die Zellen durch eine dünne Kapillare in die Probenkammer gepresst, wo eine laminare Strömung dafür sorgt, dass die Zellen hintereinander perlschnurartig aufgereiht werden. Das Prinzip der Messung beruht auf der Strahlenemission der Zelle selbst oder an ihr haftender Fluorochrom-markierter Antikörper nach Abtastung mit einem Laserstrahl. Ein optisches Detektionssystem aus Photodioden und Photomultiplier (Elektronenvervielfacher) erfasst die Signale und wandelt sie in elektrische Impulse um.

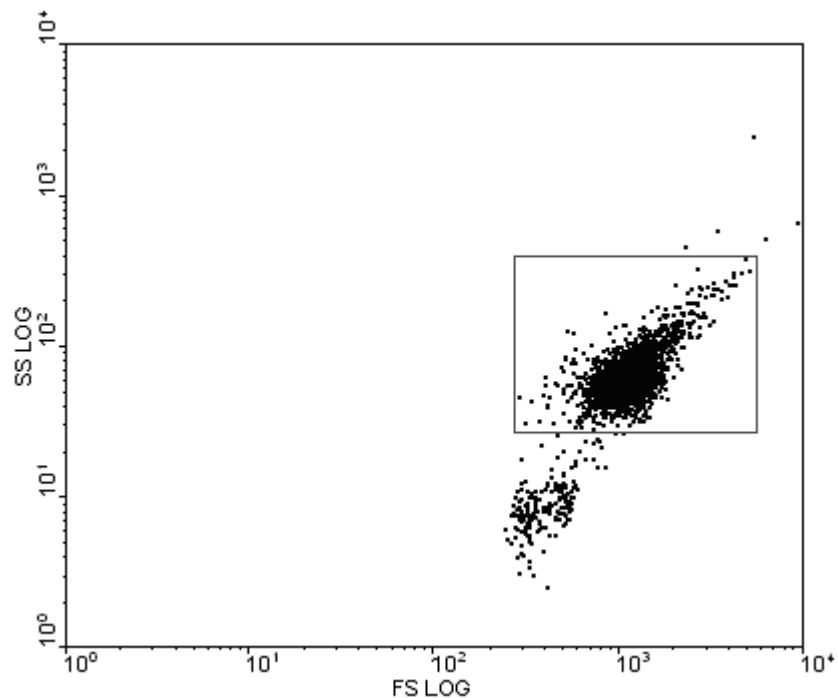


Abb. 7 Doppellogarithmische Darstellung eines Dotplots bei der FACS-Analyse

Jeder einzelne Punkt repräsentiert eine Zelle mit ihrem eigenen Side Scatter (SS) und Forward Scatter (FS). Durch Setzen eines sogenannten Gates (hier in Form eines Rechtecks) ist es möglich, eine Subpopulation isoliert zu betrachten.

Man unterscheidet zwei verschiedene Arten des Streulichtes, welche Rückschlüsse auf Eigenschaften der angestrahlten Zelle zulassen. Mit Hilfe des Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FS) lässt sich die Zellgröße erkennen, da große Zellen ein größeres FS beim Durchleuchten verursachen. Das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SS) hingegen gibt Auskunft über die Granularität einer Zelle. Des weiteren ist es mit einem 3-Farben-Durchflusszytometer

möglich, drei verschiedene Fluoreszenzsignale, fluoreszierender, anhaftender Antikörper, zu unterscheiden. Durch Einsatz dieser Immunphänotypisierung mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Zelloberflächenantigene ist es möglich, prozentuale Anteile von Subpopulationen zu bestimmen.

Durch die isolierte Analyse der Subpopulation mit dem charakteristischen Streulichtprofil der DCs war es möglich, deren Expression von Oberflächenmolekülen getrennt zu betrachten (Abb. 7).

Oberflächenmoleküle	Zelltyp	Funktion
CD 14	Monozyten	Rezeptor für Lipopolysaccharid-Komplex und Lipopolysaccharid-Bindungsprotein (LBP)
CD 40	B-Zellen, Makrophagen, Dendritische Zellen, Basale Epithelzellen	Bindet CD154 (CD40L); Rezeptor für kostimulatorisches Signal für B-Zellen, Anregung von Wachstum, Differenzierung, Isotypenwechsel von B-Zellen, und Zytokin-Produktion durch Makrophagen und DC
CD 80	Dendritische Zellen, aktivierte B-Zellen, Makrophagen, B-Zell-Subpopulationen	Kostimulator für T-Zell-Aktivierung, Ligand für CD28 und CTLA-4 (CD152)
CD 83	Dendritische Zellen, B-Zellen, Langerhans Zellen	Funktion unbekannt, Aktivierung?
CD 86	Monozyten, Aktivierte B-Zellen, Dendritische Zellen	Ligand für CD28 und CTLA4 (CD152), Kostimulation (T-Zell Aktivierung), Immunregulation
HLA-DR	Monozyten	Teil des MHC-II, Dichte ist Maß der Immunkompetenz

Tab. 4 Untersuchte Oberflächenmoleküle bei der Durchflusszytometrie sowie deren Vorkommen und Funktion

Neben den fünf CD-Molekülen (Cluster of Differentiation) wurde die Oberflächenexpression von HLA-DR (Human Leucocyte Antigen), einem Bestandteil des menschlichen MHC-II Komplexes, untersucht.

Quelle: ImmunDefektCentrum der Charité, 2006: Die CD Nomenklatur. <http://www.immundefekt.de/cd.shtml> (Zugriffsdatum: 12.09.2006)

Zur Vorbereitung auf die FACS-Analyse wurden die stimulierten DCs am fünften Tag, wie zuvor beschrieben, geerntet und mit PBS/BSA 1% (PAA) gewaschen. Zur Immunophänotypisierung wurden mit FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat) oder PE (Phycoerythrin) konjugierte Antikörper gegen folgende Oberflächenmarker verwendet: CD14, CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR (Tab. 4). Zur Kompensation der unspezifischen Fluoreszenz wurden Isotyp-Kontrollen eingesetzt.

Je 1×10^6 DCs in 80 μ l Zellsuspension wurden 5 μ l PE konjugierte Antikörper und 10 μ l FITC konjugierte Antikörper pipettiert. Die Zellen wurden mit den Antikörpern für 10-15 Minuten abgedunkelt im Kühlschrank inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS/BSA 1% wurde die FACS-Analyse mit einem Coulter Epics XL Cytometer (Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und der Software System II, Version 3.0 durchgeführt. Je Probe wurden 10.000 Zellen analysiert und eine Subpopulation mit dem charakteristischen Streuungsprofil von DCs durch Definieren eines Gates isoliert betrachtet. Die weitere Auswertung erfolgte mit dem Softwareprogramm WinMDI. Die übrigen geernteten DCs wurden bis zur RNA-Isolierung als trockene Zellpellets bei -25°C eingefroren.

2.2.7 Analyse der Effizienz der Elektroporation

Um die Effizienz der Elektroporation zu überprüfen, wurden DCs mit eGFP (enhanced green fluorescent protein) –RNA elektroporiert. (Die eGFP-RNA wurde von der AG Schmidt-Wolf zur Verfügung gestellt). Dieses grün fluoreszierende Protein kommt natürlicherweise bei einigen Tieren vor wie der Quallenart *Aequorea victoria*.

Im folgenden wurden diese Zellen entsprechend den anderen transfizierten Zellen mit DC-Medium im Brutschrank für 24 Stunden kultiviert.

Bei einer FACS-Analyse konnte im FITC Kanal der prozentuelle Anteil der DCs gemessen werden, welche die eGFP-RNA in das Protein translatiert hatten. Um die Analyse möglichst nur auf DCs zu beschränken, wurden auch hier durch gaten nur Zellen mit großem Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ausgewählt.

2.2.8 RNA Isolierung aus Dendritischen Zellen

Die RNA- Isolierung aus den DCs erfolgte entsprechend selbiger aus Pankreastumorzellen (2.2.4) mit dem RNEasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, USA) und nach den Angaben des Herstellers.

Es wurde darauf geachtet, nicht mehr als 5×10^6 DCs auf jede RNEasy Mini Säule zu pipettieren, um eine Verstopfung selbiger zu verhindern. Zusätzlich wurde ein DNase-Verdau mit DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt, um eine Kontamination der Proben mit DNA zu verhindern.

Anschließend wurde die eluierte RNA von fünf verschiedenen DC Kulturen unter Berücksichtigung der vier Unteransätze gepoolt. Der DC-RNA wurde im Gegensatz zur DAN-G RNA kein RNase Inhibitor hinzugefügt. Statt dessen wurde sie bis zur Umschreibung in cDNA bei -80°C eingefroren, um eine Zersetzung zu minimieren.

2.2.9 Die Genexpressionsbestimmung

Für die Untersuchung der Genexpression wurde DC-RNA von fünf verschiedenen Zellkulturen verwendet.

Die **Polymerase Kettenreaktion** (englisch: polymerase chain reaction; PCR) stellt ein enzymatisches *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäure-Bereichen definierter Länge und Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäuremolekülen dar. Diese Methode ermöglicht die Amplifikation sehr geringer Nukleinsäuremengen aus den unterschiedlichsten Ausgangsmaterialien. Nach der RNA – Isolierung aus den DCs (siehe 2.2.8) wurde diese in cDNA (komplementäre DNA) umgeschrieben (Reverse Transkription) und zur PCR weiter verwendet.

Prinzipiell wurde dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit verwendet, um die Genexpression von Tyrosinkinasen in unterschiedlich stimulierten DCs zu bestimmen.

Da die Schritte der Umschreibung und der PCR in getrennten Reaktionen durchgeführt wurden, handelte es sich um eine sogenannte „Zwei-Schritt-PCR“.

2.2.10 Agarosegel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung negativ geladener DNA- oder RNA-Fragmente unterschiedlicher Größe. Diese wandern unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes, abhängig von ihrer Ladung und Größe unterschiedlich schnell durch eine Agarosematrix. Eine „Anfärbung“ der Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid, welches zwischen zwei benachbarten Basenpaaren interkaliert, bewirkt eine Fluoreszenz der Nukleinsäuren in UV-Licht.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Verfahren zur Kontrolle der RNA auf Degradierung vor der Umschreibung in cDNA eingesetzt.

Zur Herstellung eines 1%igen analytischen Agarosegels wurde 5g Agarose in 500ml 1xTBE-Puffer in der Siedehitze gelöst (Mikrowelle) und mit 75µl Ethidiumbromid (1%) versetzt. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten gegossen, in den ein Probenkamm eingesetzt wurde. Nach dem Polymerisieren des Gels wurde der Kamm entfernt, das Gel in die horizontale Elektrophoresapparatur eingesetzt und mit 1xTBE-Puffer übergossen. 125ng RNA wurden mit aq dest auf 10µl Probenvolumen verdünnt und mit 2µl 6x Agarosegel-Ladepuffer versetzt. Davon wurden 10µl in die Geltaschen geladen, eine weitere Tasche wurde mit 10µl RNA-Größenmarker (Gibco) beladen und die Elektrophorese für eine Dauer von 35 Minuten bei einer Spannung von 85V durchgeführt. Der verwendete Ladepuffer diente der Beschwerung und Anfärbung der Proben. Die Banden im Gel konnten unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Kamera fotografiert und dokumentiert werden.

2.2.11 Reverse Transkription

Da bei der in Abschnitt 2.3.4 beschriebenen Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) spezifische DNA-Polymerasen, welche DNA-abhängig sind, zur Vervielfältigung der Nukleinsäuresequenzen verwendet werden, ist zunächst eine Umschreibung der RNA in cDNA nötig. Für diese Umschreibung werden Varianten der Reversen Transkriptasen eingesetzt, wie sie natürlicherweise in Retro-Viren vorkommen. Analog zur PCR werden auch bei dieser Methode Primer benötigt, um die DNA Synthese zu initiieren.

Die isolierte DC-RNA wurde enzymatisch mit dem Omniscript™ Reverse Transcriptase Kit von Qiagen und Random Nonamere-Primern der Firma Operon in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Herstellerangaben.

Nach Stahlberg et. al. ist die Reverse Transkription (RT) für Variationen bei der nachfolgenden quantitativen Real-Time PCR verantwortlich [Stahlberg et al., 2004]. Um diese Variationen zu minimieren, wurden die Ansätze der RT dupliziert.

Jede der vier Proben wurde halbiert und anschließend in insgesamt acht Ansätzen mit jeweils 2µg RNA separat umgeschrieben. Vor dem eigentlichen Umschreibeprozess bei 37°C und einer Dauer von 60 Minuten in einer Biometra PCR Maschine (Goettingen, Deutschland) wurde ein RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt.

Bis zur weiteren Verwendung wurden die cDNA-Proben bei -20°C gelagert.

2.2.12 Polymerase-Ketten-Reaktion

Bei einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) werden mittels einer Polymerase und durch Auswahl spezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, gezielt bestimmte DNA-Sequenzbereiche amplifiziert. Diese Primer flankieren durch ihren zu bestimmten DNA Sequenzen komplementären Aufbau die zu amplifizierende DNA Sequenz. Durch selektive Anlagerung dienen sie somit als Start- und Endpunkte für das Enzym Polymerase.

Die PCR kann sowohl zur qualitativen als auch zur quantitativen Analyse eingesetzt werden. Mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen können DNA-Einzelstränge zu komplementären Doppelsträngen ergänzt werden. Im Einzelnen gliedert sich die Methode in folgende Schritte:

Die PCR beginnt mit einer längeren initialen Denaturierungsphase um sowohl Sekundärstrukturen als auch gebildete Primerdimere durch Hitze aufzuschmelzen und die Polymerase zu aktivieren (5-10min bei 95°C, *Hot Start*). Die darauf folgenden 30-40 Zyklen beinhalten grundsätzlich drei Reaktionsschritte (Abb. 8): Zunächst wird der zu amplifizierende Doppelstrang der DNA in Einzelstränge durch 30-60 Sekunden Erhitzen auf 94°C aufgetrennt. Im zweiten Schritt lagern sich bei 50-65°C die Primer als Startermoleküle an („*Annealing*“). Vom 3'-Ende der DNA Vorlage beginnend, findet im dritten sogenannten Elongationschritt (häufig bei 72°C) die Synthese mit Hilfe einer DNA-Polymerase statt. Die Dauer dieses Schrittes ist abhängig von der verwendeten Polymerase und der Länge der zu amplifizierenden Sequenzen.

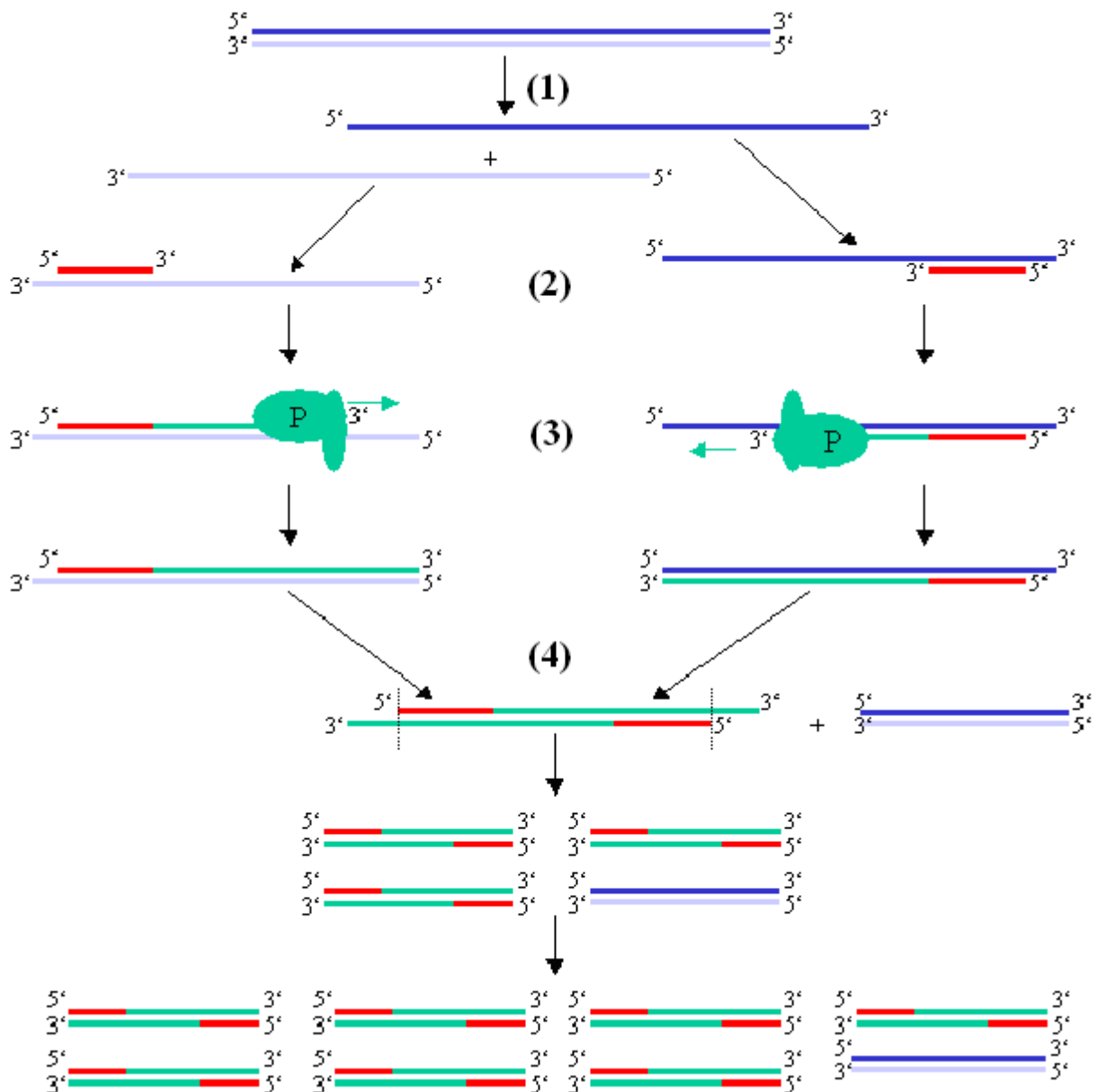


Abb. 8 Schematische Darstellung einer PCR

Quelle: Wikipedia – Die freie Enzyklopädie, 2006: Polymerase-Kettenreaktion.

<http://de.wikipedia.org/wiki/Polymerase-Kettenreaktion> (Zugriffsdatum: 02.03.2006)

1. Denaturierung der DNA Stränge bei 95°C
2. Anlagerung der spezifischen Primer, typischerweise bei 50-65°C
3. Verlängerung bzw. Synthese eines komplementären DNA-Stranges durch die Polymerase (P) bei 72°C
4. Ende des 1. PCR Zyklus. Wiederholung der Schritte 1-3 für 30-40 Zyklen.

Für die nachfolgend beschriebene PCR benutzen wir eine Taq-Polymerase (Taq-Pol), eine DNA-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*. Da diese natürlicherweise in heißen Geysiren vorkommt, ist die Taq-Pol sehr hitzebeständig.

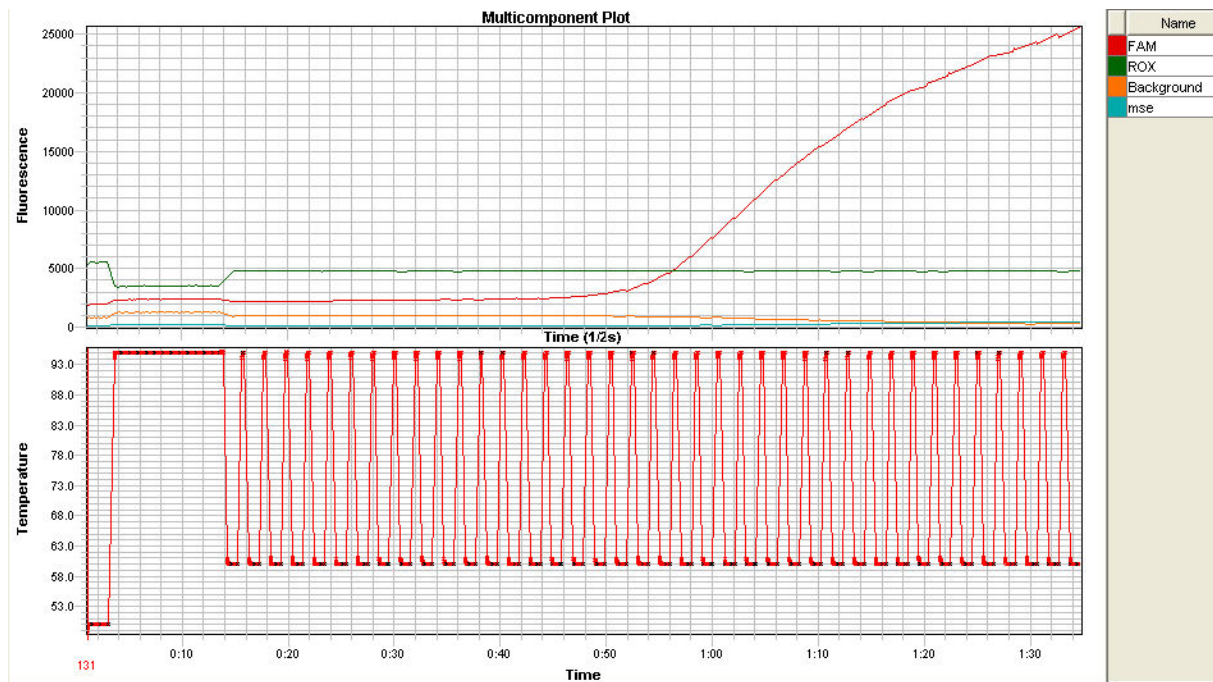


Abb. 9 Temperaturverlauf einer PCR mit einer Taq-Polymerase aufgetragen gegen das messbare Fluoreszenz Signal

Der Temperaturverlauf im Einzelnen:

- Startsequenz: 50°C für 2min, 94,5°C für 10min
- PCR-Zyklen: 59,7°C für 1min, 97°C für 30s

Die Grafik wurde erstellt mit SDS2.2 (Applied Biosystems).

Zur Kontrolle der RT wurde eine Test PCR durchgeführt. Für jeden der acht umgeschriebenen Ansätze wurden 10µl Reaktionsvolumen auf eine 384-well-Platte pipettiert. Das Reaktionsvolumen bestand im einzelnen aus 0,5 µl Primer (GAPDH), 5 µl PCR-MasterMix (beide Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland), 4,5 µl cDNA und RNase-freiem Wasser (RNeasy Mini Kit; Qiagen, Valencia, USA). Die PCR wurde mit einem TaqMan-Low-Density Array-System (7900HT; Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Anhand des Vergleiches der Schwellenwertzyklen (Ct-Werte) konnte die erfolgreiche Umschreibung kontrolliert sowie ein einheitlicher cDNA Gehalt in allen Ansätzen gewährleistet werden. Die vor der RT halbierten Proben wurden im Falle einer Abweichung von maximal einem Ct-Wert wieder gepoolt und für die weitere Analyse verwendet.

2.2.13 Quantitative Real-Time PCR

Die Quantitative Real-Time PCR (RTQ-PCR) bezeichnet ein PCR Verfahren, bei welchem die Menge der entstandenen Produkte in Form von Fluoreszenzsignalen in Echtzeit (Real-Time) gemessen wird. Da die emittierte Fluoreszenz mit der Produkt Menge proportional zunimmt, wird eine Quantifizierung möglich.

Für die Entstehung des Fluoreszenzsignals ist die TaqMan Sonde von Bedeutung, an deren Enden ein Quencher und ein Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein) gebunden sind. Der sogenannten Quencher („Löschsubstanz“) ist in der Lage, elektrische Anregungsenergie von benachbarten Molekülen zu übernehmen. Ein gequenchtetes Molekül geht dadurch in den elektrischen Ausgangszustand über und wird an einer Fluoreszenz gehindert.

Durch die Exonuclease-Aktivität der Taq-Polymerase werden Fluorescein und Quencher im Verlauf der PCR voneinander getrennt. Der Quencher ist nicht mehr in räumlicher Nähe des Fluoresceins und eine erhöhte Fluoreszenz kann gemessen werden (Abb. 10).

Als Maß für die Quantifizierung der Startmenge wird der sogenannte threshold cycle (Ct-Wert) oder Crossing Point (CP) herangezogen. Dieser entspricht der Anzahl an PCR Zyklen, die notwendig sind, um ein konstant definiertes Fluoreszenzsignal zu erreichen (siehe Abb. 11). Am CP befindet sich in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge DNA.

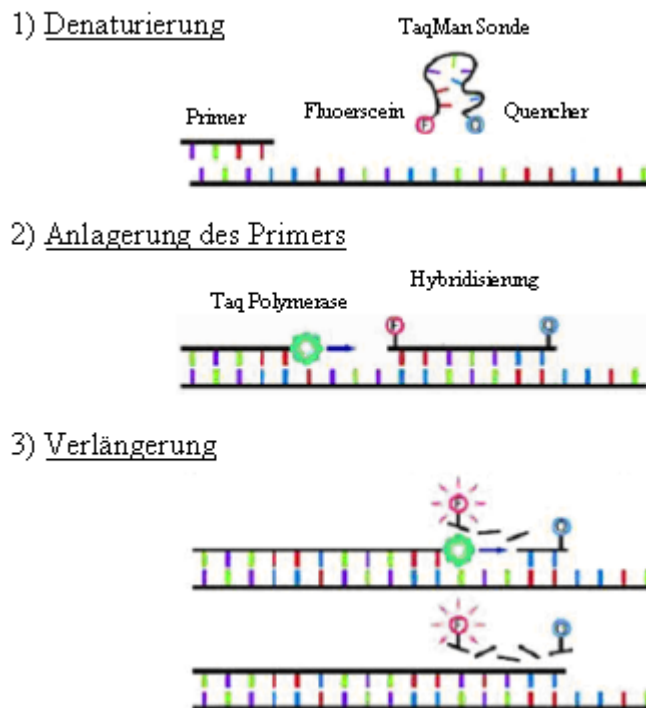


Abb. 10 Entstehung des Fluoreszenzsignals im Verlauf der Real-Time PCR

1. Bei intakter TaqMan Sonde wird das Fluoreszenzsignal durch den Quencher unterdrückt.
2. Die Sonde hybridisiert mit dem DNA Strang, es entsteht jedoch noch kein Fluoreszenzsignal.
3. Die Taq Polymerase baut die Sonde ab, der Reporter (F) wird abgespalten und leuchtet, da er nicht mehr vom Quencher (Q) daran gehindert werden kann.

Da sich bei jedem PCR Zyklus die Anzahl der Kopien theoretisch genau verdoppelt, können so Rückschlüsse auf die ursprüngliche Anzahl an Kopien des amplifizierten Abschnittes gezogen werden.

Eine absolute Quantifizierung ist möglich mit einer Kalibrierungskurve, basierend auf einer Verdünnungsreihe. Bei der durchgeführten relativen Quantifizierung wird die Genexpression eines Zielgens auf ein weiteres, nicht reguliertes, sogenanntes „Housekeeping Gene“ (HKG) bzw. einen HKG-Index bezogen.

Zur gleichzeitigen Expressionsanalyse von 89 Tyrosinkinasen und fünf potentiellen HKG in jeder der vier cDNA Proben wurden zwei MicroFluid Cards und ein TaqMan Low-Density Array System 7900 HT der Firma Applied Biosystems verwendet (Anhang Tab.A1). Auf den Karten waren alle Primer vorgegeben, welche bereits auf ein identisches Temperaturprofil hin vom

Hersteller optimiert waren. Die zu erwartende Effizienz des Amplifizierungsprozesses wurde mit $\geq 1,9$ angegeben. Nach dem Mischen der cDNA mit dem TaqMan Universal PCR Master Mix wurde jede Probe auf vier Slots verteilt (je Slot 50 μ l Master Mix, 50 μ l cDNA+H₂O), um eine Doppelbestimmung zu erhalten. Aufgrund der Doppelbestimmung wurden für die 752 Proben zwei MicroFluid Cards benötigt (Temperaturverlauf vgl. Abb. 9).

2.2.14 Auswertung der Real-Time PCR

Die Vorteile der Normalisierung der Expression gegen ein nicht reguliertes Housekeeping Gen bzw. einen HKG-Index liegen allgemein in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse. Durch diese Maßnahme können unterschiedliche RNA-Isolierungseffizienzen, Fehler bei der Reversen Transkriptase und Gewebe- und Matrixeffekte ausgeglichen werden, da diese gleichermaßen das HKG und das Zielgen betreffen.

Zur relativen Quantifizierung wurde die sogenannte $\Delta\Delta$ Ct - Methode gewählt [Pfaffl, 2004]. Als unbehandelte Kontrollprobe diente die RNA aus den am wenigsten stimulierten DCs (DC^{-LPS}). Die relative Expression wurde jeweils für die behandelte Probe (Behandlung) und die Kontrollprobe (Kontrolle) nach folgenden Formeln bestimmt.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Zielgen} - \text{Ct HKG-Index}$$

Anschließend wurde die Differenz dieser Δ Ct-Werte gebildet:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Behandlung} - \Delta\text{Ct Kontrolle}$$

Der relative Expressionsunterschied der behandelten Probe zur Kontrollprobe errechnet sich aus der Formel:

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Diese Formel geht jedoch von dem idealisierten Fall einer Kopienverdopplung in jedem PCR-Zyklus aus. In der Realität liegt die Effizienz (E) der PCR jedoch unter optimierten Bedingungen im Bereich von 1,7 – 1,9. Daher muss die Formel der relativen Expression entsprechend modifiziert werden:

$$\text{Relative Expression} = (E_{\text{Zielgen}})^{\Delta\text{Ct Zielgen (Kontrolle} - \text{Behandlung)}}$$

Ausgehend von den Rohdaten der RTQ-PCR wurden zunächst mit der Software SDS 2.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) die Ct-Werte aller Proben ermittelt und anschließend zur weiteren Auswertung in das PCR Analyse Programm „qbase“ (Microsoft Excel-Plug-In, Jo Vandesompele, Ghent, Belgien) transferiert.

Die Analyse der fünf HKG wurde mit der Software „geNorm“ durchgeführt [Vandesompele et al., 2002]. Die Entscheidung für die Normalisierung gegen einen HKG-Index statt eines einzelnen HKG wurde aufgrund der teilweise starken Varianz der Expression einzelner HKG getroffen [Vandesompele et al., 2002; Wiedemann et al., 2004]. Die Werte der durchschnittlichen Expressionsstabilitäten (M) wurden ermittelt und schrittweise das jeweils instabilste HKG von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Aus den am stabilsten exprimierten HKG konnte der Normalisierungsfaktor berechnet werden.

Um verlässliche Ergebnisse aus den RTQ-PCR Daten zu erhalten, wurden im Folgenden Qualitätskriterien definiert. Die Ct-Werte der Doppelbestimmungen dürfen sich nicht mehr als 0,75 Ct-Werte unterscheiden und sollten vor dem 35. PCR Zyklus erreicht werden (Abb.11, 12). Für die Berechnung der relativen Expressionswerte der einzelnen Proben zueinander wurde eine Amplifikationseffizienz von 1,95 angenommen, die recht genau der getesteten Amplifikationseffizienz der verwendeten TaqMan-Assays entspricht (1,9-2,0).

Expressionsunterschiede wurden relativ zur Kontrollprobe (DC^{-LPS}) angegeben. In diesem Zusammenhang wurde eine mindestens 5-fach stärkere Expression oder eine Expressionsabnahme auf 1/5 als aussagekräftig eingestuft. Des weiteren durften sich die Standardabweichungen der verglichenen Proben nicht überschneiden, um von einem aussagekräftigen Unterschied sprechen zu können.



Abb. 11 Gute Übereinstimmung von Ct-Werten

Das Diagramm zeigt eine logarithmische Auftragung der relativen Fluoreszenzintensität gegen die Anzahl der PCR-Zyklen sowie die PCR-Messkurven von vier Doppelbestimmungen. Zusätzlich ist anhand eines Beispiels die grafische Bestimmung eines Ct-Wertes ausgehend vom Schnittpunkt des definierten Schwellenwertes (Threshold) und der PCR-Messkurve dargestellt.

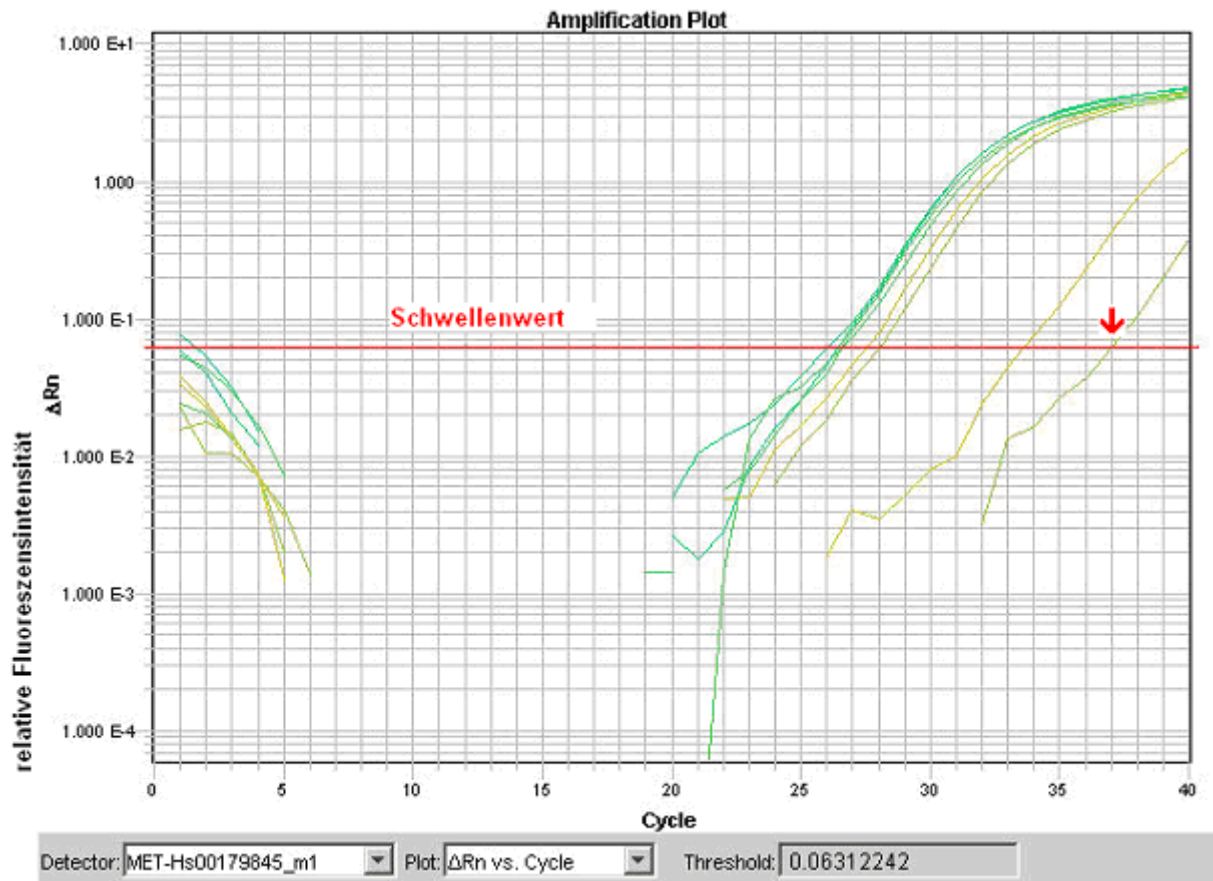


Abb. 12 Unzureichende Übereinstimmung der Ct-Werte zweier Doppelbestimmungen

Da die Ct-Werte um deutlich mehr als 0,75 von einander abweichen, wurden diese Proben von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Des weiteren hätte das Erreichen des Schwellenwertes nach dem 35. PCR-Zyklus zum Ausschluss einer der Proben geführt (Pfeil).

3. Ergebnisse

3.1 Kultivierung und mikroskopische Beurteilung Dendritischer Zellen

Die zunächst adhärenenten, oft auch typische Zellaggregate bildenden Zellen lösten sich in den folgenden Tagen der Zellkultur mit GM-CSF und IL-4 vom Boden der Kulturflaschen ab, so dass sie in Suspension weiter kultiviert wurden.

Nach fünf Tagen in Kultur konnten lichtmikroskopisch Änderungen der Zellmorphologie festgestellt werden. Durch das Auflösen der Zellaggregate konnten einzelne, klar abgegrenzte Zellen beobachtet werden, welche zum größten Teil dendritische Ausläufer gebildet hatten. Am Tag der Elektroporation (Tag 4) betrug die durchschnittliche Zellzahl $1,75 \times 10^7$ (gemessen bei $n=22$ Versuchen).

3.2 Aktivierung Dendritischer Zellen

Eine Aktivierung der Antigen-präsentierenden DCs bestand, neben der Kultivierung mit den Zytokinen IL-4 und GM-CSF, in der Transfektion mit Tumor-RNA mittels Elektroporation.

Um eine weitere Ausreifung der Dendritischen Zellen hervorzurufen, wurden drei der zuvor beschriebenen Unteransätze durch Zugabe des Lipopolysaccharids von *Helicobacter pylori* stimuliert [Kranzer et al., 2004].

Zum Nachweis der Ausreifung wurde eine durchflusszytometrische Analyse mit den Oberflächenmarkern CD14, CD40, CD80, CD83, CD86 und HLA-DR durchgeführt (Tab.4, Abb. 13). Dabei wurden fünf Tage alte DCs der Unteransätze DC^{-LPS} und DC^{+LPS} verglichen.

Nur bei den Oberflächenmarkern CD80 (50,1 +/- 10,8 % gegenüber 81,0 +/- 12,4 %) und CD83 (14,2 +/- 8,3 % vs. 40,1 +/- 9,5 %) konnten bei den unterschiedlich stimulierten Ansätzen aussagekräftige Unterschiede festgestellt werden. Die Oberflächenmarker CD40 und CD86, welche typischerweise auf der DC-Oberfläche exprimiert werden sowie HLA-DR, dessen Dichte ein Maß für die Immunkompetenz ist, wurden in beiden Unteransätzen stark exprimiert. Der Monozytenmarker CD14 hingegen wurde mit 0,3 bzw. 0,4% in beiden Ansätzen nur in geringem Umfang nachgewiesen.

Vergleich des DC Phänotyps nach Stimulation mit LPS

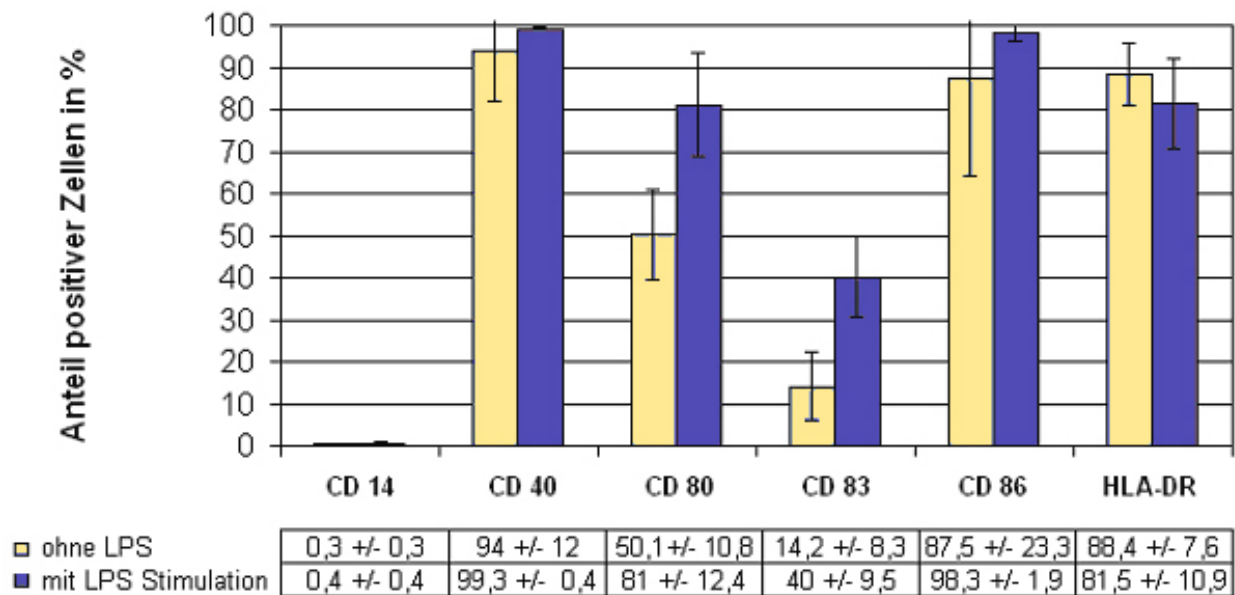


Abb. 13 Untersuchung des DC Phänotyps mittels Durchflusszytometrie ohne und mit LPS Stimulation (Prozent-Werte)

Das Diagramm beinhaltet Messwerte von DCs der im Folgenden mittels RTQ-PCR analysierten fünf Zellkulturen.

3.3 Transfektionseffizienz Dendritischer Zellen

Zum Nachweis der Transfektionseffizienz elektroporierter DCs wurden jeweils 10^6 DCs von zwei Spendern mit eGFP-RNA elektroporiert. Das exprimierte, intrazelluläre eGFP-Protein besitzt eine Fluoreszenz, die im FACS gemessen werden kann. Die FACS-Analyse 24 Stunden später ergab $70,3 \pm 12,5$ % eGFP⁺-Zellen (Abb. 14).

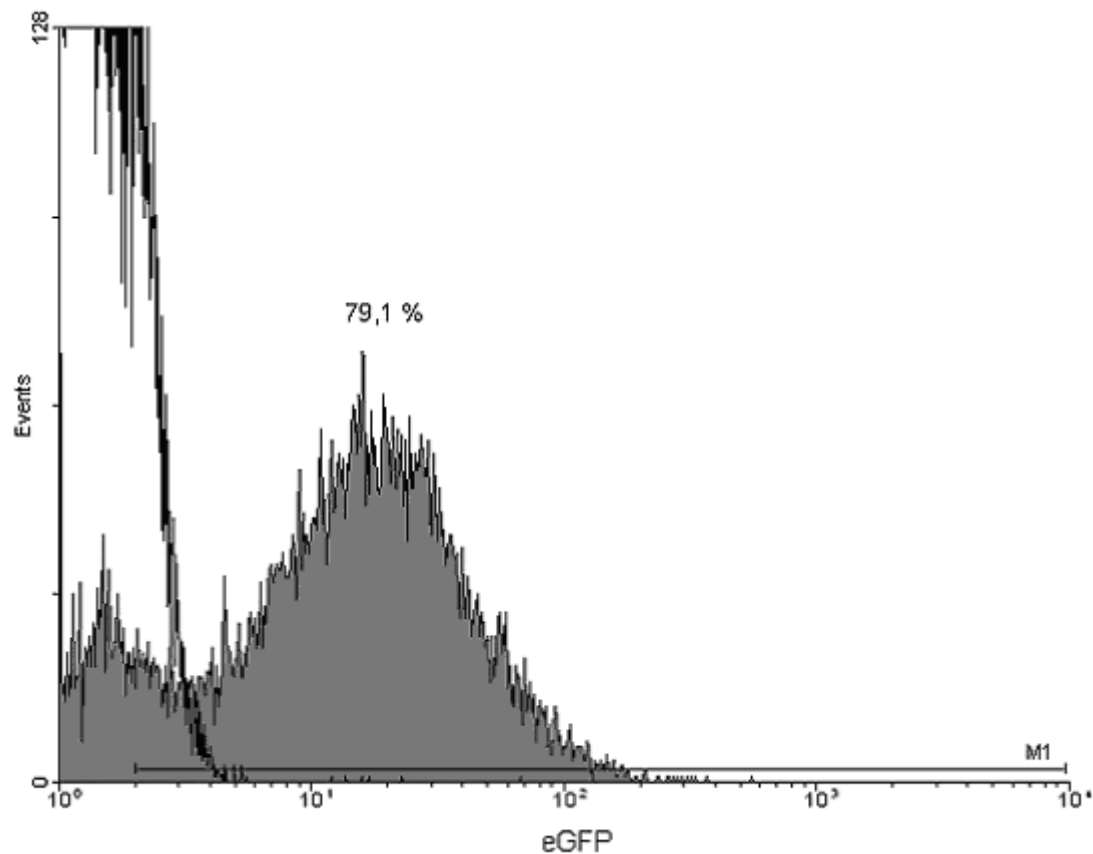


Abb. 14 Durchflusszytometrische Analyse eGFP-elektroporierter DCs

Das Diagramm zeigt eine FACS-Analyse von Zellen, die 24 Stunden vorher mit eGFP-RNA elektroporiert wurden. Eine zweifache Durchführung mit DCs von verschiedenen Spendern ergab 70,3 +/- 12,5 % eGFP⁺ Zellen. Als Leerwert wurden ungepulste DCs verwendet (ungefärbte Kurve). Das Diagramm wurde mit der Software WinMDI erstellt.

3.4 RNA-Nachweis mittels Gelelektrophorese

Da die DC-RNA nach ihrer Isolierung für einige Tage bei -80°C, jedoch ohne Zugabe eines RNase Inhibitors eingefroren war, wurde sie vor ihrer Umschreibung in cDNA mittels Gelelektrophorese überprüft, um einen Abbau auszuschließen.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Gesamt-RNA erkennt man zwei typische dickere Banden, die der 28S- und 18S-Fraktion der rRNA entsprechen (zusammen ca. 97% der Gesamt-RNA). Die mRNA wird entsprechend der Größenverteilung der verschiedenen mRNAs als dezenter Schmier in Höhe von 0,5-12 kb erkennbar (Abb. 15).

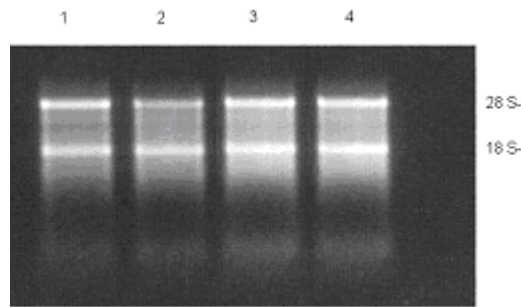


Abb. 15 Gelelektrophorese der DC RNA

Untersucht wurden alle vier vorher beschriebenen Unteransätze. Die dickeren Banden entsprechen der 28S- und 18S- rRNA.

3.5 Normalisierung der RTQ-PCR Daten

Die Expression fünf verschiedener Housekeeping-Gene wurde zusätzlich zur Expression der TK, mit der MicroFluid Card untersucht (HPRT1, UBC, G6PDH, RNA-Polymerase II, 18sRNA; vgl. Anhang Tab. A1). Mittels einer Excel-basierten Software („geNorm“, Jo Vandesompele) wurde deren Expressionsstabilität evaluiert. Die Methode basiert auf der Annahme, dass die Expressionsverhältnisse zweier idealer Kontrollgene in zwei Proben identisch sein sollten. Davon ausgehend werden paarweise Vergleiche zwischen allen Genpaaren in allen Proben angestellt und für jedes Gen ein Stabilitätsmaß M definiert, das die mittlere paarweise Variation mit allen anderen Kontrollgenen darstellt. Die Expression eines Gens wird als umso stabiler angenommen, je geringer M ausfällt.

Als die stabilsten Normalisierungsgene erwiesen sich im vorliegenden Fall 18sRNA und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase.

Die relative Expression der Target-Gene wurde mit qBase (Jo Vandesompele) errechnet. Dort erfolgte zunächst der Ausschluss aller Replikate mit einer Abweichung von $>0,75$ Ct-Werten. Die Software bestimmt für jede Probe intern einen Normalisierungsfaktor aus dem geometrischen Mittel aus 18sRNA und G6PDH, mit dem die Target-Gene normalisiert werden.

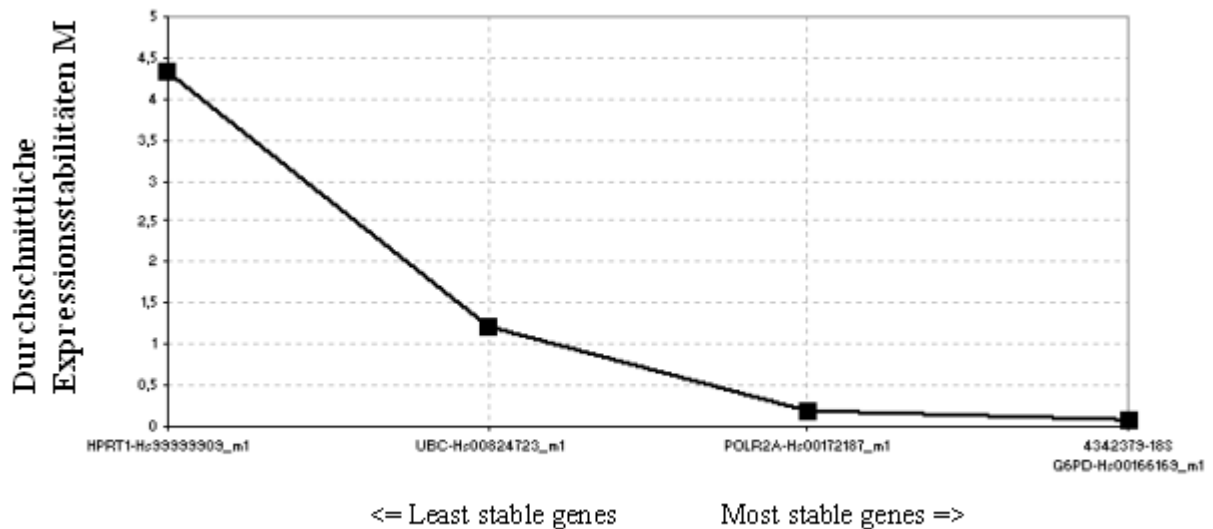


Abb. 16 Expressionsstabilitäten der Housekeeping Gene

Die durchschnittlichen Expressionsstabilitäten (M) der fünf potentiellen HKG wurde errechnet. Nach schrittweisem Ausschluss des jeweils instabilsten HKG und anschließender neuer Berechnung der M-Werte ergaben sich für 18S-rRNA und Glukose-6-Phosphate-Dehydrogenase die niedrigsten M-Werte und damit die stabilste Expression. Der Normalisierungsfaktor für die Target-Gene wurde mittels einer Software (qbase, Jo Vandesompele) aus der Expression dieser beiden Housekeeping Gene errechnet.

3.6 Relative Genexpressionsuntersuchung von Tyrosinkinasen

Die vier verschiedenen Unteransätze, bestehend aus RNA von fünf verschiedenen DC Kulturen, wurde in Bezug auf ihre Genexpression von 89 Tyrosinkinasen (TK) untersucht (Anhang Tab. A1).

Zur Bestätigung der gefundenen Expressionslevel war es essentiell, von jeder Probe eine Doppelbestimmung auszuwerten. Unterschiedliche Amplifikationseffizienzen dieser Doppelbestimmungen führten durch die Abweichung der Ct-Werte zum Ausschluss der Probe.

Nur fünf TK wiesen im Rahmen der definierten Qualitätskriterien (vgl. 2.2.14) aussagekräftige Expressionsunterschiede innerhalb der vier Ansätze auf (Abb. 17).

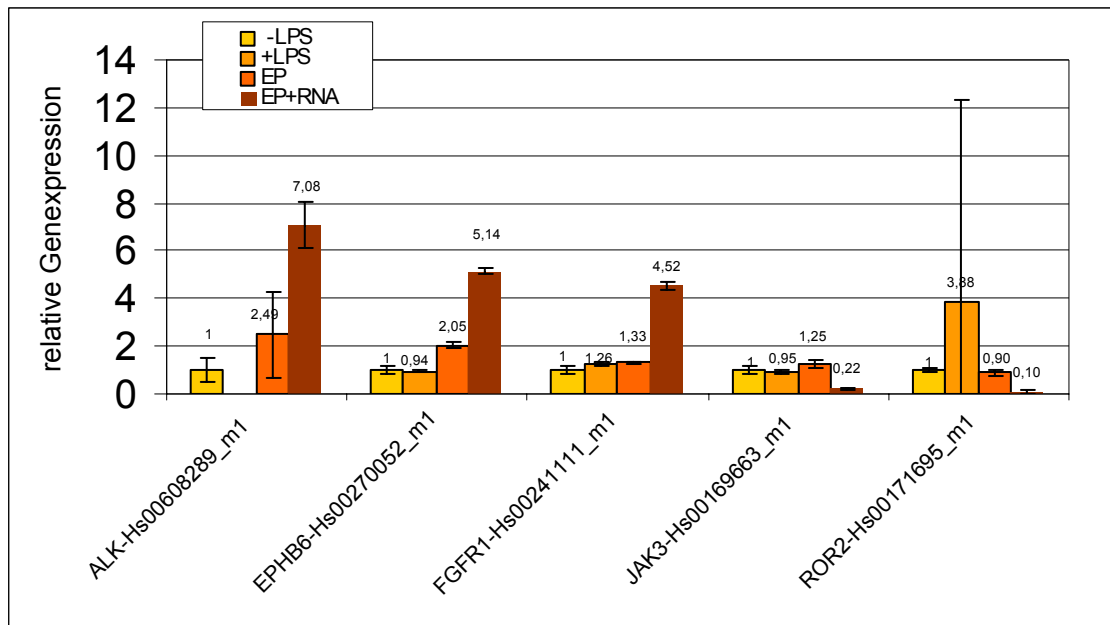


Abb. 17 Tyrosinkinasen, die aufgrund der unterschiedlichen Stimulation aussagekräftige Genexpressionsunterschiede aufweisen

Diagramm der relativen mRNA-Expression von fünf TK, die im Vergleich zur Kontrollprobe DC^{-LPS} und im Rahmen der definierten Qualitätskriterien, höhere oder geringere Expressionen in den vier Unteransätzen zeigen. Der Wert der Kontrollprobe wurde auf 1 gesetzt.

Im Vergleich zur Kontrollprobe (DC^{-LPS}) wurde die Tyrosinkinase **ALK** in der mit DAN-G RNA elektroporierten Probe (DC^{EP+RNA}) mit 7,1 +/- 1 deutlich stärker exprimiert. Da bei der DC^{+LPS} Probe auch nach 40 PCR Zyklen kein Amplifikationsprodukt nachgewiesen wurde, konnte für diesen Ansatz keine relative Expression angegeben werden. Außer einer leichten Überexpression von **EPHB6** in der DC^{EP} Probe wurde selbige verstärkt in dem DC^{EP+RNA} Ansatz nachgewiesen (5,1 +/- 0,1). Die Elektroporation mit Pankreastumor-RNA (DC^{EP+RNA}) führte bei **FGFR1** zu einer Hochregulation (4,5 +/- 0,2), während sich die Expression bei **JAK3** (0,2 +/- 0,02) und **ROR2** (0,1 +/- 0,1) verminderte.

4. Diskussion

4.1 Generierung von Dendritischen Zellen aus Blutzellen und deren Aktivierung

Analog zu anderen Veröffentlichungen ließen sich aus mononukleären Blutzellen nach fünftägiger Zellkultur mit Zytokinen DCs generieren [Banchereau und Steinman, 1998; Romani et al., 1994; Roy et al., 2004]. Der Vergleich mit zusätzlich durch LPS Gabe stimulierten Zellen (DC^{+LPS}) zeigte in der durchflusszytometrischen Analyse insgesamt nur geringe Unterschiede (vgl. Abb. 13). Die Zunahme der Expression des DC-Reifungsmarkers CD83 ließ jedoch einen Effekt der zusätzlichen Ausreifungsstimulation erkennen. In anderen Untersuchungen wurden 30-80 % CD83+ Zellen am Ende der Zellkultur bestimmt [Romani et al., 1996]. Allgemein kann aber auch bei den Zellen der -LPS Probe von DCs gesprochen werden, da diese die übrigen untersuchten CD Moleküle in typischer Weise stark oder wie im Fall von CD14 gering exprimierten.

Wie wichtig ausgereifte DCs für eine effektive T-Zell-vermittelte Immuntherapie sind, zeigten unter anderem Dhodapkar et al. (2001), da in ihren Versuchen nur ausgereifte DCs im Gegensatz zu unausgereiften T-Zellen effektiv zu einer Immunantwort stimulieren konnten [Banchereau und Steinman, 1998; Dhodapkar et al., 2001]. Daher spielen ausgereifte DCs und das Verständnis ihres Ausreifungsprozesses heute eine wichtige Rolle bei der Verbesserung immunstimulierender Anti-Tumorthérapien.

Die Ausreifung der DCs ist neben der Änderung ihres Phänotyps durch eine Veränderung ihrer Zellfunktion gekennzeichnet. So sind reife DCs prädestiniert für die Antigenpräsentation, haben ihre Fähigkeit zur Endozytose jedoch weitgehend verloren (vgl. auch Abb. 4). Um diese fehlende Fähigkeit der gereiften DCs zu kompensieren, wurde den DCs aktiv, mittels Elektroporation, Antigen in Form von Pankreas Tumor-RNA intrazellulär eingeschleust. Diese RNA wird translatiert und Fragmente des Proteins mit MHC-I Molekülen auf der Zelloberfläche der DCs präsentiert (vgl. Abb. 1). Die Effektivität der Elektroporation konnte anhand der Fluoreszenz eGFP elektroporierter DCs gezeigt werden. Die Wirksamkeit der gewählten Gentransfer-Methode wurde auch durch eine methodische Vergleichsstudie bestätigt. Van Tendeloo et al. (2001) fanden eine überlegene Effizienz der Elektroporation mit mRNA im Vergleich zu den Methoden der Lipofektion und der Elektroporation mit cDNA.

In Bezug auf den Zeitpunkt der Elektroporation im Verlauf der Zellkultur gibt es grundsätzlich die Möglichkeit dies entweder mit unausgereiften oder bereits ausgereiften DCs durchzuführen.

Durch die Verwendung unreifer Zellen wollte man den DCs ausreichend Zeit zur Umsetzung der Ribonukleinsäuren in Proteine bis zum Ende der Kultur geben. Im vorliegenden Fall wurden die DCs 24h vor Ende der Zellkultur elektroporiert, weshalb es sich bereits um relativ gereifte DCs handelte, die jedoch erst nach weiteren 24h Kultur in Nährmedium mit Zytokinen mit dem Durchflusszytometer untersucht wurden.

In Bezug auf die Elektroporationseffizienz wurden von Bonehill et al. (2004) keine Unterschiede im Vergleich der Verwendung ausgereifter oder unausgereifter DCs festgestellt. Jedoch konnten DCs, die erst im reiferen Zustand elektroporiert wurden, Antigene besser präsentieren sowie T-Zellen wirkungsvoller stimulieren.

Bei der Zellkultur wurde auf die Einhaltung des Zeitpunktes und der Intensität der DC-Stimulierung geachtet, um eine Ausreifung zu bewirken, jedoch ohne die Zellen zu starken Stimuli auszusetzen oder Zytokine zu verschwenden. Eine zu geringe Zytokin-Konzentration hingegen hätte eine Ausreifung behindern können. So führte in anderen Studien eine zu geringe GM-CSF Konzentration im Zellmedium zu unausgereiften DCs, die sich auch gegenüber einer Ausreifung mit LPS als resistent erwiesen [Lutz et al., 2000]. Das Ziel des Ausreifungsprozesses im Allgemeinen war es DCs zu generieren, welche potentiell für Immuntherapien benutzt werden könnten, um Ergebnisse dieser Arbeit auf selbige übertragen zu können.

4.2 Ergebnisse der PCR

Ziel der rt-PCR-Auswertung war eine Beobachtung der relativen Expressionsänderung von TK in den vier unterschiedlich stimulierten Unteransätzen. Nach der Isolierung der RNA aus den DCs wurden Proben von fünf verschiedenen Zellkulturen gepoolt, insbesondere um die Effekte individueller, Blutspender abhängiger Variationen zu minimieren. Dieses wäre auch mit einer mehrfachen PCR-Analyse für jede einzelne Zellkultur, mit anschließender Herausrechnung der individuellen Abweichungen möglich gewesen. Jedoch hätte dieses Vorgehen einen erheblich höheren finanziellen und labortechnischen Aufwand bedeutet. Des weiteren wurde das Problem oftmals geringer isolierter RNA-Mengen aus einzelnen Unteransätzen durch das Poolen kompensiert.

Der Vorteil der rt-PCR ist auch eine geringe Anzahl von mRNA-Kopien durch schrittweise Verdoppelung nachweisen zu können. Allerdings unterliegen die PCR-Ergebnisse bei einer hohen Anzahl von PCR-Zyklen durch Hemmungsmechanismen erfahrungsgemäß größeren

Schwankungen. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durch Ausschluss von Messergebnissen, deren Ct-Wert nicht vor dem 35. Zyklus erreicht wurde, berücksichtigt.

Aussagekräftige Expressionsunterschiede konnten in der DC^{EP+RNA}-Probe bei drei TK (ALK, EPHB6 und FGFR1) in Form einer Hochregulierung und bei zwei TK (Jak3 und ROR2) als Minderexpression beobachtet werden. Die TK ALK und EPHB6 zeigten auch einen geringen Einfluss der Methode der Elektroporation (DC^{EP}-Probe) auf ihre Expression. Jedoch erscheint die Aufnahme von Fremd-RNA mit anschließender Translation und Präsentation der Antigenfragmente der entscheidende Initiator zu einer erhöhten oder verminderten Expression dieser TK zu sein. Die beobachteten Unterschiede müssen darüber hinaus ein Resultat der Entwicklung der Zelle in den folgenden 24h nach der Elektroporation sein, da die Unteransätze bis zu diesem Zeitpunkt gemeinsam kultiviert wurden.

4.3 Die Tyrosinkinasen ALK, EPHB6, FGFR1, JAK3, ROR2 und ihre Funktion bei der Immuntherapie

Im Folgenden werden die fünf TK, welche bei der rt-PCR Untersuchung eine Expressionsänderung bei unterschiedlich stimulierten Ansätzen zeigten, im Einzelnen vorgestellt. Neben ihrer Einordnung zu bestimmten Signalübertragungswegen (sog. Pathways) wird, soweit bekannt, auf ihre spezielle Funktion in DCs und der Anti-Tumor-Immuntherapie eingegangen. Die Funktion und Einordnung in die Signaltransduktion vieler TK ist heute nicht abschließend erforscht, wodurch die Darstellung einer kausalen Verknüpfung zwischen Expressionsänderungen verschiedener TK erschwert wird.

4.3.1 ALK

Bei der Tyrosinkinase ALK (anaplastic lymphoma kinase (Ki-1)) handelt es sich um eine transmembranöse Rezeptorkinase, welche physiologisch in geringen Mengen im Nervensystem exprimiert wird. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Gehirns. Hervorgerufen durch eine Translokation des ALK-Gens kommt es zu einer vermehrten Expression und Aktivierung der TK in großzellig anaplastischen Lymphomen. [Cell Signaling Technology, 2006; Coluccia et al., 2005]

In solchen ALK-positiven Tumoren wird eine Zusammenarbeit der TK ALK und JAK3 bei der Aktivierung des Onkogens Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) vermutet. Eine Aktivierung im Sinne einer Phosphorylierung von Stat3 induziert das Zellüberleben, das Fortschreiten des Zellzyklus sowie das Wachstum des Tumors. [Lai et al., 2005]

4.3.2 EPHB6

EPHB6 (EPH Rezeptor B6) ist die zuletzt identifizierte TK der Familie der EPH Rezeptor-Tyrosinkinasen. Die Familie ist wiederum in zwei Untergruppen EPHA und EPHB unterteilt, abhängig von der Sequenz ihrer extrazellulären Domäne und der Affinität zu der Klasse der Ephrin-Liganden. Beide Untergruppen sind an dem Pathway der Axonlenkung beteiligt. [Cell Signaling Technology, 2006] Die transmembranöse Rezeptor-Tyrosinkinase EPHB6 wird primär von T-Zellen exprimiert. Obwohl ihre genaue Funktion in T-Zellen noch unbekannt ist, legen verschiedene Studien nahe, dass EPHB6 eine wichtige Rolle in der Regulation der T-Zell-Entwicklung sowie der T-Zell-Immunantwort spielt [Freywald et al., 2003; Luo et al., 2002]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass weiße Blutzellen EPHB6 insgesamt nur zu einem geringen Teil (0,57 +/- 0,07 %) exprimieren [Shimoyama et al., 2000]. Unter dieser Voraussetzung ist es von Vorteil, dass mittels der rt-PCR auch schon kleinste Mengen einer bestimmten genetischen Information nachgewiesen werden können. Der Nachweis dieser TK ist folglich nicht zwingend auf das Vorhandensein von T-Zellen in der Kultur zurückzuführen, welche primär diese Rezeptor-TK exprimieren. Zwar handelte es sich bei der Kultur um eine Mischkultur ohne vorherige oberflächenspezifische Zellseparation; eine Selektion fand jedoch durch die Eigenschaft der Adhäsion an Plastik der Monozyten zu Beginn der Kultur statt.

4.3.3 FGFR1

FGFR1 gehört zur Familie der „fibroblast growth factor“- Rezeptoren. Die vier Isoformen dieser homogenen Familie unterscheiden sich hauptsächlich in ihrer Liganden-Affinität und Verteilung im Gewebe. Durch das Andocken von Wachstumsfaktoren können über diese Rezeptor-TK verschiedene Signalwege zur Regulierung der Zellproliferation, Differenzierung, Zellwanderung, des Zellüberlebens und der Zellform angesteuert werden. [Cell Signaling Technology, 2006; Eswarakumar et al., 2005]

4.3.4 JAK3

Die Janus Kinase 3 (JAK3) hat als Non-Rezeptor-TK die grundsätzliche Aufgabe der Signaltransduktion nach ihrer Phosphorylierung durch Interleukin-Rezeptoren. Sie wird vornehmlich von Immunzellen exprimiert und übernimmt die intrazelluläre Signalweiterleitung für die Interleukine IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 und IL-21. Funktionseinschränkende Mutationen von JAK3 führen zu einer schwerwiegenden Immuninsuffizienz. [Cell Signaling Technology, 2006; Yamaoka et al., 2005]

Bezüglich ihrer Funktion in DCs wurde von Yamaoka et al. (2005) herausgefunden, dass JAK3-negative DCs länger überlebten und geringere Mengen pro-apoptotischen Proteins exprimiert wurden. Dem gegenüber zeigten sich bei der Antigenaufnahme und der verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle keine Unterschiede. Aus diesen Erkenntnissen konnte gefolgert werden, dass JAK3 nicht elementar für die DC-Entwicklung ist, jedoch als ein negativer Regulator zu agieren scheint.

Übertragen auf die Ergebnisse dieser Arbeit könnte die Verminderung der JAK3 Expression auf rund 1/5 des Ausgangswertes ein verlängertes Überleben der Antigen-präsentierenden DCs der DC^{EP+RNA}-Probe bedeuten. Ein längeres Überleben einer solchen Zelle würde sich in klinischen Immuntherapien als Vorteil erweisen, da T-Effektorzellen potentiell über einen längeren Zeitraum aktiviert werden könnten.

Des weiteren könnte JAK3 auch eine Rolle bei der CD40-induzierten Ausreifung von DCs spielen. So wurde gezeigt, dass die DC-Ausreifung nach Verwendung eines JAK3-Inhibitors verhindert werden konnte [Saemann et al., 2003].

Bekannte Signalwege, in denen JAK3 mitwirkt, sind der so genannte „Jak-STAT signaling pathway“, durch den das Zellwachstum, die Ausreifung oder die Immunität gesteuert wird sowie der „Adipocytokine signaling pathway“, über den unter anderem die Nahrungsaufnahme und Gluconeogenese reguliert wird [Cell Signaling Technology, 2006].

Die bekannte Interaktion mit der TK ALK wurde bereits beschrieben (vgl. 4.3.1).

4.3.5 ROR2

ROR2 („receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2“) ist eine Rezeptor-TK der ROR-Familie, welche vermutlich mit dem Knorpelwachstum, der Entwicklung von Wachstumsfugen und der Verzweigung von Nervenzellfortsätzen verknüpft ist. Genetische Mutationen können zu

Brachydaktylie Typ B, gekennzeichnet durch hypo- oder aplastische distale Phalangen oder zu einer Unterform des Robinow Syndroms, einer skeletalen Dysplasie, führen. Über eine immunologische Funktion der TK ist nichts bekannt, allerdings ist auch hier das Funktionsspektrum nicht abschließend erforscht. [Cell Signaling Technology, 2006; Paganoni und Ferreira, 2005]

4.4 Ausblick

Dendritische Zellen spielen bei der Anti-Tumor-Immuntherapie durch ihre Eigenschaft der effektiven Präsentation und Interaktion mit T-Effektorzellen eine zentrale Rolle. Ein Ansatz zur Verbesserung bestehender Therapien ist es, die Wirksamkeit der Ausreifungsstimuli Dendritischer Zellen zu erhöhen. Um neue Ansatzmöglichkeiten für die Regulierung der DC-Ausreifung zu finden, wurde in dieser Arbeit die Veränderung der TK-Expression anhand der intrazellulär vorhandenen spezifischen mRNA-Kopien untersucht.

Die gefundenen Expressionsänderungen sollten nach Möglichkeit mit anderen Methoden verifiziert werden. Es ist geplant, Untersuchungen durchzuführen, um die gefundenen TK und ihr Verhalten bei der DC-Ausreifung mittels Western Blot zu untersuchen.

Im Rahmen der wachsenden Kenntnis der regulatorischen Zusammenhänge der zellulären Signalwege könnten in Zukunft bestimmte Tyrosinkinasen, insbesondere die Klasse der Rezeptor-TK, durch Agonisten oder Inhibitoren direkt angesprochen werden. Dadurch wäre eine direkte Induktion des Ausreifungsprozesses denkbar.

Heute verwendet man bereits spezifische Inhibitoren, um bestimmte Pathways, welche die reguläre DC-Differenzierung behindern, außer Kraft zu setzen. Nefedova et al. (2005) zeigten in einem solchen Fall, dass es nach Anwendung eines selektiven JAK2/STAT3 Inhibitors vermehrt zur Ansammlung reifer DCs in Tumoren und nachfolgend zu einer verstärkten Immunreaktion gekommen ist.

Die vorliegende Arbeit ist als ein Screeningtest für mögliche Angriffspunkte einer zukünftigen pharmakologischen Interferenz in die Ausreifung von DCs anzusehen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war eine Untersuchung der relativen Expressionsänderung von Tyrosinkinasen (TK) bei der Ausreifung von Dendritischen Zellen (DCs). Die Expressionsänderungen wurden im Hinblick auf verschiedene Ausreifungsstimuli untersucht.

Im Rahmen einer Zellkultur wurden die DCs auf vier aufeinander aufbauende Arten zur Ausreifung stimuliert und nach einer Real-Time PCR Analyse in Relation zueinander gesetzt. Dadurch konnte der für eine Expressionsänderung verantwortliche Stimulationsschritt identifiziert werden.

Im Zusammenhang mit den von uns definierten Qualitätskriterien konnte bei fünf TK eine deutliche Expressionsänderung beobachtet werden. Die Tyrosinkinasen ALK, EPHB6 und FGFR1 wurden in der mit DAN-G RNA elektroporierten Probe (DC^{EP+RNA}) verstärkt exprimiert, während die TK JAK3 und ROR2 in selbiger im Vergleich zur Referenzprobe (DC^{-LPS}) vermindert waren.

Eine Einordnung der Ergebnisse in Zusammenhänge der bekannten Signaltransduktionswege (Pathways) der Zelle war nur eingeschränkt möglich. In der Literatur wird nur eine Zusammenarbeit der TK ALK und JAK3 in ALK-positiven Tumoren bei der Aktivierung des Onkogens Stat3 vermutet. Als interessant erwies sich ein Forschungsergebnis von Yamaoka et al. (2005), welches ein verlängertes Überleben JAK3-negativer DCs beschreibt. Demnach könnte die beschriebene Minderepression von JAK3 zu einem verlängerten Überleben der Zellen dieser Probe führen, was im Hinblick auf die Verbesserung von Anti-Tumor-Immuntherapien als positiv zu bewerten wäre.

Im Rahmen der wachsenden Kenntnis der regulatorischen Zusammenhänge der zellulären Signalwege könnten in Zukunft bestimmte Tyrosinkinasen als Angriffspunkte für die pharmakologische Intervention in den Ausreifungsprozess der DCs genutzt werden.

6. Anhang

Tyrosinkinassen Expression Assays

Non-receptor tyrosine kinases

		Gene name	Assay ID	differing gene labelling by Applied Biosystems	alternative gene name (Applied Biosystems)
1	ABL family	ABL1	Hs00245445_m1		v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
2		ARG	Hs00270858_m1	ABL2	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2 (arg, Abelson-related gene)
3	ACK family	ACK1	Hs00178648_m1		activated Cdc42-associated kinase 1
4		TNK1	Hs00177708_m1		tyrosine kinase, non-receptor, 1
5	CSK family	CSK	Hs00177843_m1		c-src tyrosine kinase
6		MATK	Hs00176738_m1		megakaryocyte-associated tyrosine kinase
7	FAK family	FAK	Hs00178587_m1	PTK2	PTK2 protein tyrosine kinase 2
8		PYK2	Hs00169444_m1	PTK2B	PTK2B protein tyrosine kinase 2 beta
9	FES family	FER	Hs00245497_m1		fer (fps/fes related) tyrosine kinase (phosphoprotein NCP94)
10		FES	Hs00171375_m1		feline sarcoma oncogene
11	FRK family	BRK/PTK6	Hs00178742_m1	PTK6	PTK6 protein tyrosine kinase 6
12		FRK	Hs00176619_m1		fyn-related kinase
13		SRMS	Hs00365564_m1		src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine and N-terminal myristylation sites
14	JAK family	JAK1	Hs00233820_m1		Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)
15		JAK2	Hs00234567_m1		Janus kinase 2 (a protein tyrosine kinase)
16		JAK3	Hs00169663_m1		Janus kinase 3 (a protein tyrosine kinase)
17		TYK2	Hs00177464_m1		tyrosine kinase 2
18	SRC-A family	FGR	Hs00178340_m1		Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr) oncogene homolog
19		FYN	Hs00176628_m1		FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
20		SRC	Hs00178494_m1		v-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
21		YES1	Hs00736972_m1		v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral oncogene homolog 1
22	SRC-B family	BLK	Hs00176441_m1		B lymphoid tyrosine kinase
23		HCK	Hs00176654_m1		hemopoietic cell kinase
24		LCK	Hs00178427_m1		lymphocyte-specific protein tyrosine kinase
25		LYN	Hs00176719_m1		v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog
26	TEC family	BMX	Hs00176455_m1		BMX non-receptor tyrosine kinase
27		BTK	Hs00163761_m1		Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
28		ITK	Hs00178571_m1		IL2-inducible T-cell kinase
29		TEC	Hs00177389_m1		tec protein tyrosine kinase
30		TXK	Hs00177433_m1		TXK tyrosine kinase

31	SYK family	SYK	Hs00177369_m1		spleen tyrosine kinase
32		ZAP70	Hs00277148_m1		zeta-chain (TCR) associated protein kinase 70kDa

Receptor tyrosine Kinases

33	ALK family	ALK	Hs00608289_m1		anaplastic lymphoma kinase (Ki-1)
34		LTK	Hs00176712_m1		leukocyte tyrosine kinase
35	AXL family	AXL	Hs00242357_m1		AXL receptor tyrosine kinase
36		MER	Hs00179024_m1	MERTK	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase
37		TYRO3	Hs00170723_m1		TYRO3 protein tyrosine kinase
38	DDR family	DDR1	Hs00233612_m1		discoidin domain receptor family, member 1
39		DDR2	Hs00178815_m1		discoidin domain receptor family, member 2
40	EGFR family	EGFR	Hs00193306_m1		epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)
41		ERBB2	Hs00170433_m1		v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
42		ERBB3	Hs00176538_m1		v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)
43		ERBB4	Hs00171783_m1		v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
44	EPH family	EPHA1	Hs00178313_m1		EPHA1
45		EPHA2	Hs00171656_m1		EPHA2
46		EPHA3	Hs00178327_m1		EPHA3
47		EPHA4	Hs00177874_m1		EPHA4
48		EPHA5	Hs00300724_m1		EPHA5
49		EPHA6	Hs00297133_m1	DKFZp434C1418	EPHA6
50		EPHA7	Hs00177891_m1		EPHA7
51		EPHA8	Hs00184126_m1		EPHA8
52		EPHB1	Hs00174725_m1		EPHB1
53		EPHB2	Hs00362096_m1		EPHB2
54		EPHB3	Hs00177903_m1		EPHB3
55		EPHB4	Hs00174752_m1		EPHB4
56	EPHB6	Hs00270052_m1		EPHB6	
57	FGFR family	FGFR1	Hs00241111_m1		fibroblast growth factor receptor 1 (fms-related tyrosine kinase 2, Pfeiffer syndrome)
58		FGFR2	Hs00256527_m1		fibroblast growth factor receptor 2 (bacteria-expressed kinase, keratinocyte growth factor receptor, craniofacial dysostosis 1, Crouzon syndrome, Pfeiffer syndrome, Jackson-Weiss syndrome)
59		FGFR3	Hs00179829_m1		fibroblast growth factor receptor 3 (achondroplasia, thanatophoric dwarfism)
60		FGFR4	Hs00242558_m1		fibroblast growth factor receptor 4
61	INSR family	IGF1R	Hs00609566_m1		insulin-like growth factor 1 receptor
62		INSR	Hs00169631_m1		insulin receptor
63		INSRR	Hs00299816_m1		insulin receptor-related receptor
64	MET family	MET	Hs00179845_m1		met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)
65		RON	Hs00234013_m1	MST1R	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)
66	MUSK family	MUSK	Hs00171797_m1		muscle, skeletal, receptor tyrosine kinase
67	PDGFR family	CSF1R	Hs00234617_m1		colony stimulating factor 1 receptor, formerly McDonough feline sarcoma viral (v-fms) oncogene homolog
68		FLT3	Hs00174690_m1		fms-related tyrosine kinase 3
69		KIT	Hs00174029_m1		v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog
70		PDGFRA	Hs00183486_m1		platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide
71		PDGFRB	Hs00182163_m1		platelet-derived growth factor receptor, beta polypeptide

72	PTK7 family	PTK7	Hs00177173_m1		PTK7 protein tyrosine kinase 7
73	RET family	RET	Hs00240887_m1		ret proto-oncogene (multiple endocrine neoplasia and medullary thyroid carcinoma 1, Hirschsprung disease)
74	ROR family	ROR1	Hs00178178_m1		receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1
75		ROR2	Hs00171695_m1		receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2
76	ROS family	ROS1	Hs00177228_m1		v-ros UR2 sarcoma virus oncogene homolog 1 (avian)
77	RYK family	RYK	Hs00243196_m1		RYK receptor-like tyrosine kinase
78	TIE family	TEK	Hs00176096_m1		TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)
79		TIE	Hs00178500_m1		tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains
80	TRK family	NTRK1	Hs00176787_m1		neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 1
81		NTRK2	Hs00178811_m1		neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2
82		NTRK3	Hs00176797_m1		neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3
83	VEGFR family	VEGFR1	Hs00176573_m1	FLT1	fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)
84		VEGFR2	Hs00176676_m1	KDR	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)
85		VEGFR3	Hs00176607_m1	FLT4	fms-related tyrosine kinase 4
86	AATYK family	AATYK	Hs00185425_m1	AATK	apoptosis-associated tyrosine kinase
87		AATYK2	Hs00208698_m1	LMTK2	lemur tyrosine kinase 2
88		AATYK3	Hs00287418_m1	LMTK3	lemur tyrosine kinase 3
89	Uncharacterized	DKFZp761P1010	Hs00218290_m1		hypothetical protein DKFZp434C1418

Housekeeper

90	Housekeeper	G6PDH	Hs00166169_m1		glucose-6-phosphate dehydrogenase
91		HRPT1	Hs99999909_m1		hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)
92		UBC	Hs00824723_m1		ubiquitin C
93		18S-rRNA	Hs99999901_s1		
94		RP2	Hs00172187_m1	POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa

Tab. A1 Tyrosinkinase und Housekeeping-Gene, die mittels der MicroFluid Card nachweisbar sind

7. Literaturverzeichnis

- Alijagic S, 2003: Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten mit Hilfe von aus peripherem Blut erzeugten dendritischen Zellen zur Therapie des malignen Melanoms.
<http://www.diss.fu-berlin.de/2003/257/index.html> (Zugriffsdatum: 21.11.2004)
- Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 767-811
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245-252
- Baselga J, Arribas J. Treating cancer's kinase 'addiction'. *Nat Med* 2004; 10: 786-787
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature* 2001; 411: 355-365
- Bonehill A, Heirman C, Tuyaeerts S, Michiels A, Breckpot K, Brasseur F, Zhang Y, Van Der Bruggen P, Thielemans K. Messenger RNA-electroporated dendritic cells presenting MAGE-A3 simultaneously in HLA class I and class II molecules. *J Immunol* 2004; 172: 6649-6657
- Brooks CF, Moore M. Differential MHC class II expression on human peripheral blood monocytes and dendritic cells. *Immunology* 1988; 63: 303-311
- Cell Signaling Technology I, 2006: The Human Tyrosine Kinases.
<http://www.cellsignal.com/reference/kinase/tk.jsp> (Zugriffsdatum: 12.09.2006)
- Chaux P, Moutet M, Faivre J, Martin F, Martin M. Inflammatory cells infiltrating human colorectal carcinomas express HLA class II but not B7-1 and B7-2 costimulatory molecules of the T-cell activation. *Lab Invest* 1996; 74: 975-983
- Coluccia AM, Gunby RH, Tartari CJ, Scapozza L, Gambacorti-Passerini C, Passoni L. Anaplastic lymphoma kinase and its signalling molecules as novel targets in lymphoma therapy. *Expert Opin Ther Targets* 2005; 9: 515-532

- Dhodapkar MV, Steinman RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193: 233-238
- Eswarakumar VP, Lax I, Schlessinger J. Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005; 16: 139-149
- Freywald A, Sharfe N, Rashotte C, Grunberger T, Roifman CM. The EphB6 receptor inhibits JNK activation in T lymphocytes and modulates T cell receptor-mediated responses. *J Biol Chem* 2003; 278: 10150-10156
- Hassel JC, 2003: Untersuchungen zur Apoptoseregulation durch die Melanom induzierende Rezeptortyrosinkinase Xmrk.
<http://opus.bibliothek.uni-wuerzburg.de/opus/volltexte/2005/1131/>
(Zugriffsdatum: 14.03.2007)
- Inaba K, Turley S, Yamaide F, Iyoda T, Mahnke K, Inaba M, Pack M, Subklewe M, Sauter B, Sheff D, Albert M, Bhardwaj N, Mellman I, Steinman RM. Efficient presentation of phagocytosed cellular fragments on the major histocompatibility complex class II products of dendritic cells. *J Exp Med* 1998; 188: 2163-2173
- Janeway CA. Immunologie. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2002
- Kraft D, 2002: Chemotherapie des fortgeschrittenen Pankreaskarzinoms mit intraarteriell appliziertem Mitomycin C in Kombination mit intraarteriell, intravenös appliziertem Gemcitabine : eine Phase-II-Studie.
<http://publikationen.ub.uni-frankfurt.de/volltexte/2003/255/> (Zugriffsdatum: 08.08.2006)
- Kranzer K, Eckhardt A, Aigner M, Knoll G, Deml L, Speth C, Lehn N, Rehli M, Schneider-Brachert W. Induction of maturation and cytokine release of human dendritic cells by *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* 2004; 72: 4416-4423
- Lai R, Rassidakis GZ, Lin Q, Atwell C, Medeiros LJ, Amin HM. Jak3 activation is significantly associated with ALK expression in anaplastic large cell lymphoma. *Hum Pathol* 2005; 36: 939-944

- Laupeze B, Fardel O, Onno M, Bertho N, Drenou B, Fauchet R, Amiot L. Differential expression of major histocompatibility complex class Ia, Ib, and II molecules on monocytes-derived dendritic and macrophagic cells. *Hum Immunol* 1999; 60: 591-597
- Luo H, Yu G, Wu Y, Wu J. EphB6 crosslinking results in costimulation of T cells. *J Clin Invest* 2002; 110: 1141-1150
- Lutz MB, Suri RM, Niimi M, Ogilvie AL, Kukutsch NA, Rossner S, Schuler G, Austyn JM. Immature dendritic cells generated with low doses of GM-CSF in the absence of IL-4 are maturation resistant and prolong allograft survival in vivo. *Eur J Immunol* 2000; 30: 1813-1822
- Marten A, Schottker B, Ziske C, Weineck S, Buttgereit P, Huhn D, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Increase of the immunostimulatory effect of dendritic cells by pulsing with CA 19-9 protein. *J Immunother* 2000; 23: 464-472
- Mitchell DA, Nair SK. RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J Clin Invest* 2000; 106: 1065-1069
- Muller-Tidow C, Schwable J, Steffen B, Tidow N, Brandt B, Becker K, Schulze-Bahr E, Halfter H, Vogt U, Metzger R, Schneider PM, Buchner T, Brandts C, Berdel WE, Serve H. High-throughput analysis of genome-wide receptor tyrosine kinase expression in human cancers identifies potential novel drug targets. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 1241-1249
- Nagaraj S, Ziske C, Schmidt-Wolf IG. Human cytokine-induced killer cells have enhanced in vitro cytolytic activity via non-viral interleukin-2 gene transfer. *Genet Vaccines Ther* 2004; 2: 12
- Nakai N, Asai J, Ueda E, Takenaka H, Katoh N, Kishimoto S. Vaccination of Japanese patients with advanced melanoma with peptide, tumor lysate or both peptide and tumor lysate-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells. *J Dermatol* 2006; 33: 462-472

- Nefedova Y, Nagaraj S, Rosenbauer A, Muro-Cacho C, Sebti SM, Gabrilovich DI. Regulation of dendritic cell differentiation and antitumor immune response in cancer by pharmacologic-selective inhibition of the janus-activated kinase 2/signal transducers and activators of transcription 3 pathway. *Cancer Res* 2005; 65: 9525-9535
- Paganoni S, Ferreira A. Neurite extension in central neurons: a novel role for the receptor tyrosine kinases Ror1 and Ror2. *J Cell Sci* 2005; 118: 433-446
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum* 2004; 1/2004: 92-95
- Pschyrembel W. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Berlin: de Gruyter, 2002
- Ribas A, Butterfield LH, Economou JS. Genetic immunotherapy for cancer. *Oncologist* 2000; 5: 87-98
- Robertson SC, Tynan J, Donoghue DJ. RTK mutations and human syndromes: when good receptors turn bad. *Trends Genet* 2000; 16: 368
- Robinson DR, Wu YM, Lin SF. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene* 2000; 19: 5548-5557
- Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Kurzes Lehrbuch der Immunologie. Stuttgart: Georg Thieme, 1995
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994; 180: 83-93
- Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196: 137-151
- Roy KC, Bandyopadhyay G, Rakshit S, Ray M, Bandyopadhyay S. IL-4 alone without the involvement of GM-CSF transforms human peripheral blood monocytes to a CD1a(dim), CD83(+) myeloid dendritic cell subset. *J Cell Sci* 2004; 117: 3435-3445

- Saemann MD, Diakos C, Kelemen P, Kriehuber E, Zeyda M, Bohmig GA, Horl WH, Baumruker T, Zlabinger GJ. Prevention of CD40-triggered dendritic cell maturation and induction of T-cell hyporeactivity by targeting of Janus kinase 3. *Am J Transplant* 2003; 3: 1341-1349
- Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000; 103: 211-225
- Schmidt T, Ziske C, Marten A, Endres S, Tiemann K, Schmitz V, Gorschluter M, Schneider C, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Intratumoral immunization with tumor RNA-pulsed dendritic cells confers antitumor immunity in a C57BL/6 pancreatic murine tumor model. *Cancer Res* 2003; 63: 8962-8967
- Schuler G, Steinman RM. Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med* 1997; 186: 1183-1187
- Shimoyama M, Matsuoka H, Tamekane A, Ito M, Iwata N, Inoue R, Chihara K, Furuya A, Hanai N, Matsui T. T-cell-specific expression of kinase-defective Eph-family receptor protein, EphB6 in normal as well as transformed hematopoietic cells. *Growth Factors* 2000; 18: 63-78
- Stahlberg A, Hakansson J, Xian X, Semb H, Kubista M. Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clin Chem* 2004; 50: 509-515
- Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 2001; 98: 49-56
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 2002; 3: research0034.1-0034.11
- Vlahovic G, Crawford J. Activation of tyrosine kinases in cancer. *Oncologist* 2003; 8: 531-538
- Vogt K, Klein P, Hahn H. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Berlin: Springer, 2000

Wiedemann C, Schulz HL, Weber BHF. Quantitative Real-Time PCR - Eine Frage der Normalisierung. *BIOspektrum* 2004; 1/04: 1-4

Yamaoka K, Min B, Zhou YJ, Paul WE, O'Shea J J. Jak3 negatively regulates dendritic-cell cytokine production and survival. *Blood* 2005; 106: 3227-3233

Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 1988; 57: 443-478

Ziske C, Marten A, Schottker B, Buttgereit P, Schakowski F, Gorschluter M, von Rucker A, Scheffold C, Chao N, Sauerbruch T, Schmidt-Wolf IG. Resistance of pancreatic carcinoma cells is reversed by coculturing NK-like T cells with dendritic cells pulsed with tumor-derived RNA and CA 19-9. *Mol Ther* 2001; 3: 54-60

8. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Immun- und Genterapeutischen Labor der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. I. Schmidt-Wolf an der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik I Bonn, Leitung Prof. Dr. T. Sauerbruch durchgeführt. In Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dr. A. von Rücker wurde die Untersuchung der Genexpression im Hämato-Pathologischen Labor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn realisiert.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Schmidt-Wolf für das anregende Thema, für das angenehme Kommunikationsklima und eine zielorientierte Betreuung.

Ebenfalls danke ich der gesamten Arbeitsgruppe Schmidt-Wolf für ihre Unterstützung, insbesondere bei der Durchführung des experimentellen Teils meiner Arbeit.

Frau Jennifer Khristi danke ich für die produktive Zusammenarbeit bei der gemeinsamen Umsetzung der Experimente zur Zellkultur. Bei Herrn Sebastian Kummer und Herrn Prof. Dr. Dr. von Rücker möchte ich mich für die weiterführende Unterstützung und Hilfestellung bei der Genexpressionsbestimmung bedanken.

Nicht zuletzt möchte ich herzlich meiner Familie für hilfreiche Anregungen und ihr Interesse danken.