

Oliver Gresch: Nichtviraler Gentransfer in humane Leukämie- und B-Lymphomzellen zur Vorbereitung einer klinischen ex vivo Vakzinierungsstudie . 2001

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung einer nichtviralen Gentransfermethode zur effektiven ex vivo Transfektion primärer B-Lymphomzellen als Grundlage für die Durchführung einer klinischen Vakzinierungsstudie. Da primäre B-Lymphomzellen mit Hilfe herkömmlicher nichtviraler Methoden bislang nicht effizient transfiziert werden konnten, wurden der ballistische Gentransfer und die Nukleofektion eingesetzt. Der ballistische Gentransfer beruht auf dem durch Heliumdruck ausgelösten Transfer von an inerte Goldpartikel gebundener DNA in die gewünschten Zielzellen. Mit Hilfe des ballistischen Gentransfers ist es gelungen die myeloische Zelllinie K562 sowie die B-Lymphomzelllinie BJA-B mit Effizienzen von über zwei Prozent und primäre B-CLL Zellen mit Effizienzen von über einem Prozent zu transfizieren. Die Nukleofektion ist eine auf der Elektroporation basierende Gentransfermethode, bei der die Zielzellen durch Applikation spezifischer elektrischer Pulse in einem speziellen Puffersystem zur Aufnahme von Fremd-DNA veranlaßt werden. Mit Hilfe der Nukleofektion konnten primäre B-CLL Zellen mit Effizienzen von über vierzig Prozent transfiziert werden. Weiterhin hat sich gezeigt, daß neben der Auswahl der Transfektionsmethode auch die Auswahl eines geeigneten Expressionsvektors entscheidend für die Effektivität des Gentransfers ist. So wurden mit dem, Elemente des Epstein-Barr Virus und des Immunglobulin Leichtketten Enhancers tragenden, Plasmid BC219 deutlich geringere Transfektionseffizienzen erzielt als mit den kleineren Expressionsvektoren pMOK und MIDGE. Zur Vorbereitung einer klinischen Vakzinierungsstudie wurden primäre B-CLL Zellen von 6 verschiedenen Patienten mit Hilfe der Nukleofektion mit den Vektoren GM-CSFMIDGE/hCD40LMIDGE kotransfiziert und die jeweilige Proteinexpression nach Gefrierkonservierung und Auftauen der Transfektanten überprüft. Die Kultivierung der Zellen wurde in serumfreien Medium durchgeführt. Die Rationale für eine klinische Vakzinierungsstudie mit transfizierten CLL Zellen ist die durch die GM-CSF Sekretion verursachte Proliferation, Reifung und Stimulation der kostimulatorischen Fähigkeiten von professionellen APCs (z.B. Dendritische Zellen) und die verstärkte Tumorzell-T-Zell Interaktion durch Aktivierung der Tumorzellen nach der Expression des CD154 Proteins auf der Zelloberfläche der CLL Zellen.

The establishment of a transfection method for efficient ex vivo gene transfer into primary B-lymphoma cells is necessary to carry out a clinical vaccination study. Most nonviral gene transfer methods such as calcium phosphate precipitation, encapsidation of DNA into liposomes and electroporation failed to transfect primary B-lymphoma cells efficiently. Therefore we used the ballistic gene transfer and the novel nucleofection method. Ballistic gene transfer uses helium pressure to accelerate DNA-coated gold particles toward target cells. With this method we reached transfection efficiencies of more than 2% into myeloid cell line K562 and B-lymphoma cell line BJA-B and more than 1% into primary B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. The novel nucleofection technique is based on the electroporation method and uses a combination of special electrical parameters and pulsing solutions to deliver DNA directly into the cell nucleus. After optimization we were able to transfect primary B-CLL cells with efficiencies of more than 40% using nucleofection. Additionally we compared three different DNA expression vectors with regard to their suitability for nonviral gene transfer. The Epstein-Barr virus and immunoglobulin light chain enhancer elements carrying plasmid BC219 lead to lower transfection efficiencies as the smaller expression vectors pMOK and MIDGE. With regard to a clinical vaccination study primary B-CLL cells of 6 different patients were cotransfected with GM-CSFMIDGE/hCD40LMIDGE vectors by nucleofection and the corresponding protein expression was measured after freezing and thawing of the transfectants. Cultivation of these cells were carried out in serum free media. In a clinical vaccination study GM-CSF secretion by transfected tumor cells should lead to proliferation, maturation and stimulation of costimulatory properties of professional APCs like dendritic cells. CD154 expression on the cell surface of transfected CLL cells should result in a better tumor cell/T-cell contact and upregulation of

costimulatory molecules on nontransfected CLL cells.

In this work efficient nonviral gene transfer into primary B-CLL cells was established with the prospect of a clinical ex vivo vaccination study.