

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg**

**vorgelegt von
Diplom-Biologin Marion Nonn
aus Mannheim**

Tag der mündlichen Prüfung: _____

Thema:

**Etablierung und Vergleich von Antigen-Beladungsmethoden für
dendritische Zellen als Grundlage für eine Immuntherapie
beim Zervixkarzinom**

Gutachter:

**Prof. Dr. Lutz Gissmann
Prof. Dr. Werner Buselmaier**

Erklärungen gemäß § 7 (3) b) und c) der Promotionsordnung:

- a) ich erkläre hiermit, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst verfaßt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe,

- b) ich erkläre hiermit, daß ich an keiner anderen Stelle ein Prüfungsverfahren beantragt bzw. die Dissertation in dieser oder anderen Form bereits anderweitig als Prüfungsarbeit verwendet oder einer anderen Fakultät als Dissertation vorgelegt habe.

Heidelberg, den 04.07.2002

(Marion Nonn)

Mein besonderer Dank gilt

Prof. Dr. Lutz Gissmann für seine konstruktive Unterstützung und die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Prof. Dr. Buselmaier für die Übernahme des Co-Referates.

Dr. Andreas M. Kaufmann für die Überlassung des Themas, seine Betreuung und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Prof. Dr. Dürst für viele wichtige Denkanstöße und optimistische Worte.

Den Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen des Labors „Gynäkologische Molekularbiologie“ für die freundliche Aufnahme, die angenehme Atmosphäre und die stete Hilfsbereitschaft.

Dr. Ingo Nindl und Dr. Volker Wollscheidt für zahlreiche Tips und anregende Diskussionen.

Klaus Zumbach für die freundliche Bereitstellung von HPV-Proteinen.

Peter Sehr für die Durchführung der serologischen Analysen.

Manuela Schinz für die Unterstützung bei der Isolierung und Kultivierung von TILs.

Karin Teller und Katrin Beer für die Sequenzierarbeiten und Maxi-Präparationen meiner Vektoren.

Ines Stein für die Einführung in die Methoden der Proteinchemie.

Igor Sopow für den sportlichen Ausgleich.

Dr. Uta Schurigt für Beistand mit Rat und Tat in allen Lebeslagen.

Der „AMK“-Gruppe (Angela, Manuela, Serpil, Yvonne, Alfonso, Arne und Robert) für die gute Zusammenarbeit, zahlreiche Diskussionen, praktischen Erfahrungsaustausch, nette Kaffeepausen und eine schöne Zeit in der Zellkultur sowie außerhalb des Labors.

Annette, Claudia, Kerstin, Melanie und Norbert für zahlreiche Telefonate, mentale Unterstützung auch auf Distanz und schöne Wochenenden zuhause.

Bruno V. Perillo – se non avefsi te, non sarei dove sono ora!

Und vor allem meinen Eltern Inge und Dieter Nonn sowie meinen Schwestern Annette Nonn und Elke Bauer, die mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Für unsere Patientinnen

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 HUMANE PAPILLOMVIREN (HPV)	1
1.1.1 Klassifikation und Struktur	1
1.1.2 Infektionszyklus von HPV	2
1.2 HPV-INFEKTION IN ASSOZIATION MIT DER ZERVIXKARZINOGENESE	2
1.3 T-ZELL-VERMITTELTE IMMUNITÄT	4
1.4 ZELLVERMITTELTE IMMUNANTWORT BEI HPV-INFEKTIONEN UND HPV-ASSOZIIERTEN NEOPLASIEN .	6
1.5 DENDRITISCHE ZELLEN (DZ)	7
1.5.1 DZ-Entwicklung	8
1.5.2 DZ-Ausreifung	9
1.5.3 Interaktion zwischen DZ und T-Lymphozyten	11
1.5.4 DZ als zelluläres Adjuvans in Vakzinierungstherapien	12
1.6 HPV-VAKZINE	12
1.6.1 Therapeutische HPV-Vakzine	13
1.7 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	14
2. MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 MATERIAL	16
2.1.1 Geräte	16
2.1.2 Verbrauchs- und spezielles Material	17
2.1.3 Chemikalien	17
2.1.4 Kulturmedien und Antibiotika	20
2.1.5 Zytokine	20
2.1.6 Antikörper	21
2.1.7 Peptide	22
2.1.8 Enzyme, Oligonukleotide, Kits, Transfektionsreagenzien	22
2.1.9 Plasmide	24
2.1.10 Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme	25
2.2 ARBEITEN MIT DNA	25
2.2.1 Gelelektrophorese in Agarosegelen	25
2.2.2 Restriktionsspaltung von DNA	26
2.2.3 Präzipitation von DNA	26
2.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion	26
2.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen	27
2.2.6 Ligationsreaktion	27
2.2.7 Gewinnung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab	28
2.2.8 Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab	28
2.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA	29
2.2.10 PCR für Insert-Amplifikation und zur Überprüfung der Proteine auf DNA-Kontamination	29
2.2.11 Abtrennen von Oligonukleotiden	30
2.3 ARBEITEN MIT BAKTERIEN	31
2.3.1 Herstellen kompetenter Bakterien	31

2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien	31
2.3.3 Glycerinkulturen von Bakterien	32
2.4 SYNTHESE VON IN VITRO TRANSKRIBIERTER RNA	32
2.4.1 Vorbereitung der Vektoren für die in vitro Transkription (IVT)	32
2.4.2 In vitro Transkription (IVT)	32
2.4.3 Polyadenylierung IVT-RNA	33
2.4.4 Funktionelle Analyse der IVT-EGFP-RNA	34
2.4.5 Präzipitation von RNA	36
2.4.6 Konzentrationsbestimmung von RNA	36
2.5 PROTEINEXPRESSION IN BL 21 DE3-BAKTERIEN	36
2.5.1 Expressionssystem	36
2.5.2 Proteinexpression im analytischen Maßstab	36
2.5.3 Proteinexpression im präparativen Maßstab	37
2.5.4 Aufarbeitung und Analyse der Induktionskontrollen	37
2.6 ANALYSE UND NACHWEIS VON PROTEINEN	37
2.6.1 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel	37
2.6.2 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau	38
2.6.3 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	39
2.6.4 Western-Blot	39
2.6.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	40
2.7 REINIGUNG VON PROTEINEN	41
2.7.1 Affinitätschromatographische Reinigung	41
2.7.2 Thrombin-Verdau	43
2.7.3 Reinigung durch Gelelektrophorese	44
2.7.4 Konzentrierung von Proteinen	44
2.8 ZELLKULTUR	45
2.8.1 Kultivierung permanenter Zelllinien	45
2.8.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	46
2.8.3 Zellzahlbestimmung	46
2.9 GEWINNUNG VON LYMPHOZYTEN	46
2.9.1 Isolation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut und Buffy coats	47
2.9.2 Isolation von T-Zellen aus PBL durch Schafserthrozytenrosettierung	47
2.9.3 Selektion von CD8 ⁺ -Lymphozyten aus T-Zellkulturen mit Hilfe magnetischer Dynalbeads (DB)	48
2.9.4 Generierung von B-Lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCL)	49
2.9.5 Isolierung und Expansion von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) aus Tumorgewebe	49
2.9.6 In vitro Induktion von T-Lymphozyten	50
2.10 GENERIERUNG UND REIFUNG DENDRITISCHER ZELLEN AUS PBL	51
2.11 ANTIGEN-BELADUNG VON DZ	52
2.11.1 Beladung von DZ mit Peptiden	52
2.11.2 Transfektion von DZ mit IVT-RNA	52
2.11.2 Transfektion von DZ mit Plasmid-DNA	52
2.11.4 Beladung von DZ mit Protein	53
2.12 IMMUNPHÄNOTYPISIERUNG VON ZELLEN MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE	53
2.13 IMMUNOLOGISCH FUNKTIONELLE ANALYSEN	54
2.13.1 Proliferationstest	54
2.13.2 Zytotoxizitätstest/Chrom-Freisetzungstest	55
2.13.3 ELISpot-Assay	56

3. ERGEBNISSE	58
3.1 ETABLIERUNG DER DENDRITISCHEN ZELLKULTUR	58
3.1.1 Etablierung FCS-freier Kulturbedingungen für die dendritische Zellkultur	58
3.1.2 Vergleich verschiedener Differenzierungsstimuli für DZ	59
3.1.3 Stabilität terminal differenzierter DZ	62
3.1.4 Charakterisierung DZ	63
3.2 ETABLIERUNG PEPTIDSPEZIFISCHER T-ZELLINIEN	66
3.2.1 Spezifische zytolytische Aktivität peptidspezifischer T-Zelllinien	66
3.2.2 Spezifische IFN- γ -Freisetzung peptidspezifischer T-Zelllinien	70
3.3 GENERIERUNG HPV16-E7-SPEZIFISCHER T-ZELLINIEN MIT HILFE VON HPV16-E7-RNA-BELADENEN DZ	72
3.3.1 Etablierung des RNA-Transfektionsprotokolls für DZ	73
3.3.2 Generierung HPV16-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe von HPV16-E7-RNA-transfizierten DZ	74
3.4 GENERIERUNG HPV16-E7-SPEZIFISCHER T-ZELLINIEN MIT HILFE VON HPV16-E7-DNA-BELADENEN DZ	75
3.4.1 Etablierung der DNA-Transfektion DZ	75
3.4.2 Induktion HPV16-E7-spezifischer T-Zellen mit Hilfe von HPV16-E7-DNA-transfizierten DZ	76
3.5 GENERIERUNG HPV16-E7-SPEZIFISCHER T-ZELLINIEN MIT HILFE VON HPV16-E7-PROTEIN-BELADENEN DENDRITISCHEN ZELLEN	77
3.5.1 Analyse HPV16-E7-spezifischer T-Helfer-Zellen	78
3.5.2 Analyse HPV16-E7-spezifischer CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen	80
3.6 DIREKTER VERGLEICH DER DZ-BELADUNGSMETHODEN	83
3.7 EXPRESSION, AUFREINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON HPV16-E7- UND HPV18-E7-PROTEINEN	86
3.7.1 Klonierung	86
3.7.2 Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung	87
3.8 GENERIERUNG HPV16- UND HPV18-E7-SPEZIFISCHER T-ZELLINIEN MIT HILFE VON E7-PROTEIN-BELADENEN DZ	93
3.9 GENERIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG DZ VON ZERVIXKARZINOMPATIENTINNEN	95
3.10 EX VIVO ANALYSE VON TUMOR-INFILTRIERENDEN LYMPHOZYTEN (TIL) AUS ZERVIXKARZINOMEN ..	97
3.10.1 Vergleich der Reaktivität von ex vivo TIL mit anti-CD3/28 Dynalbeads in vitro expandierten TIL	97
3.10.2 E7-Spezifität von anti-CD3/28 Dynalbeads expandierten TIL	101
3.11 HEILVERSUCHE ZUR VAKZINIERUNG MIT ANTIGEN-BELADENEN, AUTOLOGEN DZ	101
3.11.1 Bestimmung des Tumormarkers SCC	103
3.11.2 Titerbestimmung der Antikörper gegen HPV16- und HPV18-E7	104
3.11.3 In vitro Monitoring HPV16/18-E7-spezifischer T-Lymphozyten im Blut der vakzinierten Patientinnen	105
4. DISKUSSION	112
4.1 GENERIERUNG HUMANER DZ	112
4.2 ETABLIERUNG PEPTIDSPEZIFISCHER T-ZELLINIEN	114
4.3 BELADUNG VON DZ MIT HPV16-E7-ANTIGENEN	118
4.3.1 RNA-Transfektion von DZ und in vitro Induktion spezifischer T-Zellen	118

4.3.2 DNA-Transfektion von DZ und in vitro Induktion spezifischer T-Zellen	120
4.3.3 Protein-Beladung von DZ und in vitro Induktion spezifischer T-Zellen	121
4.3.4 Direkter Vergleich der DZ-Beladungsmethoden	122
4.4 VALIDIERUNG DER PROTEINBELADUNGSMETHODE	124
4.4.1 Generierung von rekombinantem HPV16-E7- und HPV18-E7-Protein in E. coli	124
4.4.2 Generierung HPV16-E7- und HPV18-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe Protein- beladener DZ in gesunden Donoren	125
4.5 DZ VON TUMORPATIENTINNEN UND EX VIVO-AKTIVIERUNG VON TUMOR-INFILTRIERENDEN LYMPHOZYTEN (TIL)	126
4.5.1 DZ von Zervixkarzinompatientinnen	126
4.5.2 Ex vivo-Aktivierung HPV-E7-spezifischer TIL	127
4.6 HEILVERSUCHE	129
4.7 AUSBLICK	136
5. ZUSAMMENFASSUNG	137
6. SUMMARY	138
7. LITERATURVERZEICHNIS	139

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AB-Plasma	Plasma von Blutspendern mit der Blutgruppe AB
APC	antigen presenting cells = antigen-präsentierende Zellen
AS	Aminosäure
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP/NBT	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-phosphat / Nitroblau Tetrazol
B-LCL	B-Lymphoblastoide Zelllinie
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CC	Cytokincocktail
CD	cluster of differentiation = Differenzierungscluster
cDNA	complementary DNA = komplementäre DNA
CEA	carcinoembryonic antigen
CIN	cervical intraepithelial neoplasia = Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CPM	counts per minute = Zerfälle pro Minute
d.h.	das heißt
Da	Dalton
dATP	desoxy-Adenosin-5`-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	desoxy-Nukleotid-5`-triphosphate
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat
DZ	Dendritische Zellen
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein Barr Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
ELISpot	enzyme linked immuno spot assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötale Kälber Serum
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
h	hour = Stunde
HA1b	Humanes Albumin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N´-(2-ethansulfonsäure)
HIV	human immunodeficiency virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPV	Humane Papillomviren
IC ₅₀	50% Inhibitorische Konzentration
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMP	Influenzamatixprotein

IPTG	Isopropylthiogalactosid
IVT	In vitro Transkription
kb	Kilobasen
LPS	Lipopolysaccharide
LZ	Langerhans Zellen
M	Molarität
mA	milliAmper
M-CSF	Makrophagen-koloniestimulierender Faktor
MHC	major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MLR	mixed lymphocyte reaction = gemischte Lymphozytenreaktion
mol	Einheit der Stoffmenge
n.ad. PBL	nicht adhärente periphere Blutlymphozyten
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
Nr.	Nummer
OD	Optische Dichte
PBA	PBS/BSA
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	polymerase chain reaction = Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
pp	Peptidpool
P/S	Penicillin/Streptomycin
Pt.	Patientin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
s./s.o.	siehe/siehe oben
SCC	squamous cell carcinoma
SDS	sodium dodecylsulfate = Natriumlaurylsulfat
TAA	tumor-assoziiertes Antigen
Tab.	Tabelle
TAP	transporter associated with antigen processing
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TGF	tumor growth factor = Tumorwachstumsfaktor
T _H 1/2	T-Helfer-Zellen Typ 1/2
TIL	tumor-infiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitanmonolaureat
U	unit (Einheit der Enzymaktivität; 1 U = 1 μmol umgesetzt Substrat pro Minute = 1,67*10 ⁻⁸ Katal)
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
ÜN	über Nacht
VEGF	vaskulärer Endothel-Wachstumsfaktor
x	fach, mal
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1 Humane Papillomviren (HPV)

1.1.1 Klassifikation und Struktur

Die Papillomviren gehören zur Familie der Papillomaviridae (van Regenmortel et al., 2000). Sie induzieren die Bildung von gutartigen Tumoren (Papillome, Warzen) und Läsionen auf Haut und Schleimhaut. Die Papillomviren zeigen eine strenge Wirts- und Gewebsspezifität. Aufgrund der hohen Wirtsspezifität wird der Wirt in die Papillomvirus-Nomenklatur miteinbezogen (z.B. HPV für humanpathogene Papillomviren). Neben dem Menschen werden auch einige Säugetiere (z.B. Hunde, Kaninchen und Rinder) sowie weitere verschiedene Vertebraten (z.B. Fische, Amphibien, Reptilien und Vögel) von Papillomviren infiziert (Sundberg, 1987). Die humanen Papillomviren unterteilen sich in bereits 80 identifizierte Typen, von denen ein Teil anogenitale Schleimhautzellen infiziert (de Villiers, 1994). Die meisten HPV-Typen sind mit benignen, warzenähnlichen Läsionen assoziiert, die häufig spontan regredieren, und werden als low-risk (LR) Typen bezeichnet (z.B. HPV 6 und 11). Sie werden den high-risk (HR) Typen (z.B. HPV 16, 18, 31, 33 und 45) gegenübergestellt, die in schwergradigen zervikalen intraepithelialen Neoplasien und dem Gebärmutterhalskrebs vorkommen (Bosch et al., 1995). Das Genom besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA von etwa 8000 bp, die von einem ikosaedrischen Kapsid ohne Lipidhülle umgeben ist. Die Genprodukte werden in Abhängigkeit vom Zeitpunkt ihrer Synthese in der produktiven Infektion als frühe (E, „early“) oder späte (L, „late“) Proteine bezeichnet. Ein nichtkodierender Bereich (NCR für „Non Coding Region“ oder URR für „Upstream Regulatory Region“) enthält Abschnitte für virale und zelluläre Regulation der Genexpression und weist Enhancer- und Promotoraktivität auf. Die frühen Gene kodieren für die Nicht-Strukturproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Die frühen Proteine E1 und E2 haben Funktionen bei der Regulation der Transkription und der DNA Replikation. Das E4-Protein stellt ein zytoplasmatisches Protein dar, über dessen Funktion noch relativ wenig bekannt ist. E4 akkumuliert bei der Viruspartikelreifung im Zytoplasma und könnte zur Auflösung des Zytokeratinnetzwerkes und zur Freisetzung der Viruspartikel führen (Doorbar et al., 1991; Roberts et al., 1993). Das E5-Protein spielt bei einigen animalen Papillomviren eine Rolle bei der Zelltransformation (Shah et al., 1990). Auch bei HPV (HPV16) wurden transformierende Eigenschaften von E5 aufgezeigt (Stöppler et al., 1996). Bei den E6- und E7-Genprodukten von HR-HPV-Typen handelt es sich um Onkoproteine, die zur malignen Progression von Tumoren beitragen. Das E6-Protein bindet, inaktiviert und fördert den Abbau des

Tumorsuppressorproteins p53, was zu einer Deregulation des Zellzykluses und zu einer genetischen Instabilität HPV-infizierter Zellen führt (Livingstone et al., 1992; Yin et al., 1992). Das E7-Protein bindet an das Tumorsuppressorprotein pRb, was zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F führt und das wiederum zur Expression von Zellproliferationsgenen. Die späten Gene L1 und L2 kodieren für die Strukturproteine des Viruskapsids.

1.1.2 Infektionszyklus von HPV

Papillomviren infizieren ausschließlich teilungsaktive Zellen des Stratum germinativum der Haut und der Schleimhäute. Morphologisch unterscheidet man beim Plattenepithel mehrere Schichten: die Basal-, Parabasalschicht, die zusammen das Stratum germinativum bilden, und die Spindelzellschicht (Stratum spinosum). Bei der Haut folgen noch granuläre Zellen (Stratum granulosum) und abgestorbene Keratinozyten (Stratum corneum). Nur einige Basalzellen teilen sich, um die Parabasalschicht mit neuen Zellen aufzufüllen. In der Parabasalschicht werden die Hautzellen gebildet, die sich differenzieren und im Laufe der Zellteilungen nach außen gelangen. Im Stratum spinosum ist die Zellteilung bereits eingestellt. Die HPV-Infektion von undifferenzierten Basalzellen erfolgt durch Verletzungen (Mikroläsionen) der Epithelschicht oder durch direkten Kontakt mit exponierten Basalzellen der Transformationszone (Zervix). Die Adsorption der Viruspartikel an die Zellen erfolgt vermutlich mit Hilfe eines $\alpha 6$ -Integrinrezeptors (Evander et al., 1997; Müller et al., 1995). Nach Freisetzung der Virus-DNA in die Zelle, gelangt die Virus-DNA in den Zellkern, wo sie in episomaler Form vorliegt und bei Vorläuferläsionen des Gebärmutterhalskrebses mehrere Jahrzehnte persistieren kann (Dürst et al., 1985). Der Lebenszyklus von HPV hängt von der Differenzierung der Keratinozyten ab. Primär infizierte Basalzellen zeigen eine geringe Basalexpression, während in den differenzierten Zellen in der oberen Schicht eine erhöhte virale Transkription beobachtet wird (Stoler et al., 1989, 1992; Dürst et al., 1992). Die Kapsidproteine L1 und L2 werden erst in den oberen Zellschichten (Stratum spinosum) exprimiert, und im darüberliegenden Stratum granulosum erfolgt die Bildung der infektiösen Viruspartikel. Die Freisetzung der Viruspartikel erfolgt vermutlich durch mechanisches Aufbrechen oder Zerfall der zur Abschilferung vorgesehenen Hautzellen.

1.2 HPV-Infektion in Assoziation mit der Zervixkarzinogenese

Das Zervixkarzinom ist neben dem Mammakarzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung der Frau mit jährlich 500.000 Neuerkrankungen weltweit. Jährlich sterben weltweit 350.000

Frauen an dieser Erkrankung (Black et al., 1997). Das Zervixkarzinom wird nach verschiedenen Kriterien wie Tumorgröße, Ausdehnung, Befall von Nachbarorganen und Metastasierung in verschiedene Stadien eingeteilt (TNM- oder FIGO-Klassifikation). Die Behandlung des Gebärmutterhalskrebses ist davon abhängig, wie weit die Tumorerkrankung fortgeschritten ist. Standardbehandlungen bei der Primärtherapie des Zervixkarzinoms sind die Operation und/oder die Bestrahlung. Zwischen 10-42% der wegen eines Zervixkarzinoms operierten Patientinnen entwickeln ein Rezidiv (Rückfall der Erkrankung mit erneutem Auftreten von bösartigem Gewebe). Das Rezidiv kann kurativ mittels Operation und Strahlentherapie oder palliativ mittels Chemotherapie behandelt werden. Dies hängt von der Primärbehandlung und dem Auftreten von Lokal- oder Fernmetastasen ab. Das Zervixkarzinom entsteht aus histologisch definierten prämaligen Läsionen, sogenannten zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN), die ihrerseits ein Kontinuum verschiedener Schweregrade darstellen (CIN I bis III). Molekularbiologische und epidemiologische Studien haben gezeigt, daß Infektionen mit HR-HPV-Typen mit der Zervixkarzinogenese korrelieren. Persistierende HPV-Infektionen stellen den Hauptfaktor für die Entwicklung eines Zervixkarzinoms dar. Dennoch entwickeln nur etwa 2% aller HPV-infizierten Frauen im Laufe ihres Lebens ein Zervixkarzinom (zur Hausen, 1991). Dies deutet darauf hin, daß weitere virale und nicht-virale Faktoren an der HPV induzierten Karzinogenese beteiligt sind. In leichtgradigen Läsionen liegt das Virusgenom in episomaler Form in der Wirtszelle vor (Dürst et al., 1985). Dabei wird die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 durch den viralen Repressor E2 reguliert. Ein möglicher initialer Schritt in der HPV-assoziierten Karzinogenese ist die Integration der viralen DNA ins Wirtsgenom (Cullen et al., 1991). Die Integration erfolgt in der Regel innerhalb der E1/E2-Region des viralen Genoms. Als Folge der Integration und Zerstörung der E1/E2-Region werden in HPV-positiven Zervixkarzinomen nur die Gene E6 und E7 exprimiert (Baker et al., 1987; Schwarz et al., 1985). Durch die Ausschaltung der Tumorsuppressorproteine p53 und pRb verursachen E6 und E7 nun die Aufhebung der DNA-Reparatur, Hemmung der Apoptose und Induktion der Proliferation (Hashida und Yasumoto, 1991). Das ermöglicht in einem mehrstufigen Prozess eine Akkumulation nicht behobener DNA-Schäden, die schließlich zur malignen Progression führen kann. Nicht-virale Kofaktoren, die bei der Zervixkarzinogenese eine Rolle spielen, sind die Verwendung oraler Kontrazeptiva, hohe Parität (> 6 Geburten), frühe Kohabitarche, Rauchen, bestimmte HLA-Konstellationen und eine supprimierte, zelluläre Immunität (Bosch et al., 1992; Petry et al., 1994; Ho et al., 1994; Duggan-Keen et al., 1996).

1.3 T-Zell-vermittelte Immunität

Das humane Immunsystem besteht aus dem angeborenen und dem erworbenen (adaptiven) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem wird vom Komplement und verschiedenen Phagozyten getragen, und bildet eine erste Abwehr gegen viele allgemein vorkommende Mikroorganismen und ist für die Bekämpfung bakterieller Infektionen von Bedeutung. Die adaptive Immunität ist eine Reaktion antigenspezifischer Lymphozyten auf ein Antigen. Es gibt zwei Hauptgruppen von Lymphozyten: die B- und die T-Lymphozyten. Die B-Lymphozyten sind durch die Ausbildung spezifischer Antikörper für die sogenannte humorale Immunantwort verantwortlich, wohingegen die T-Lymphozyten die zellvermittelte Immunantwort darstellen und intrazelluläre Infektionen von einigen Bakterien, Parasiten und Viren bekämpfen. Bei einer Virusinfektion werden die viralen Proteine endogen durch die infizierte Zelle synthetisiert, wie alle zellulären Proteine mit Ubiquitin markiert und zu Peptidfragmenten degradiert. Diese proteolytische Degradation der Proteine erfolgt in multikatalytischen Protease-Komplexen. Diese sogenannten Proteasomen bestehen aus 28 Untereinheiten, die jeweils zwischen 20 und 30 kd umfassen. Ob ein möglicher Peptidligand für MHC-I-Moleküle (s. unten) durch das Proteasom gespalten wird, hängt von der Aminosäuresequenz innerhalb des Epitops und des c-terminal flankierenden Restes ab. In Anwesenheit von IFN- γ , z.B. aufgrund eines inflammatorischen Prozesses, werden in den Zellen 3 katalytische Untereinheiten der Proteasomen, $\beta 1$, $\beta 2$ und $\beta 5$, durch ihre homologen Untereinheiten $\beta 1i$ (LMP2), $\beta 2i$ (MECL1) und $\beta 5i$ (LMP7) ersetzt und die sogenannten Immunoproteasomen gebildet (Tanaka und Kasahara, 1998). Die Effizienz dieser modifizierten Proteasomen, Proteine zu spalten, ist unverändert. Allerdings sind ihre Spaltungspräferenzen verschieden, so daß das Spektrum produzierter, antigenen Peptide variieren kann (Cardozo und Kohanski, 1998). Viele Tumorantigene werden unterschiedlich durch die beiden Proteasomen-Typen prozessiert. Immunoproteasomen sind bezüglich der Produktion MHC-I-bindender Peptide effizienter. Dies ist allerdings nicht für alle Epitope gültig. Es sind auch Epitope beschrieben (besonders Epitope, die von Selbst-Proteinen abstammen), die nicht effizient prozessiert werden (Übersicht in Van den Eynde und Morel, 2001). Dendritische Zellen (DZ), die zu den professionellen antigenpräsentierenden Zellen gehören, exprimieren Immunoproteasomen konstitutiv. Unreife DZ, die aus Blutmonozyten mit IL-4 und GM-CSF generiert werden, tragen äquivalente Mengen an Proteasomen und Immunoproteasomen, wohingegen reife DZ nur Immunoproteasomen enthalten (Macagno et al., 1999) (s. auch Abschnitt 1.5).

Nach der Degradation werden die Peptide zu den heterodimeren TAP-Molekülen („transporters associated with antigen processing“) transferiert. Die TAP-Moleküle transportieren Peptide mit einer Länge von 8-16 Aminosäuren ins Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Dort werden die Peptide auf Moleküle des MHC („major histocompatibility complex“), auch HLA („human leucocyte antigens“) genannt, geladen. MHC-I-Moleküle bestehen aus zwei Proteinketten: der α -Kette und der assoziierten β 2-Mikroglobulin-Kette. Die α -Kette bildet mit dem β 2-Mikroglobulin und dem Peptid einen stabilen, trimeren Komplex. Dieser Komplex wird über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gebracht, wo er von T-Zellen über ihren spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) erkannt wird. Die Peptidpräsentation ist allelspezifisch, d.h. ein Peptid das beispielsweise durch HLA-A2 präsentiert wird, kann nicht von HLA-A24 gebunden werden. Daher unterscheiden sich Individuen mit verschiedenen HLA-Haplotypen in ihrer Fähigkeit, auf das gleiche Antigen eine zellvermittelte Immunantwort auszulösen.

Es gibt zwei Hauptklassen an T-Lymphozyten: CD8-Korezeptor-exprimierende zytotoxische T-Zellen und CD4-Korezeptor-exprimierende T-Helfer-Zellen. CD8⁺zytotoxische T-Zellen interagieren mit MHC-I-Molekülen, wohingegen T-Helfer-Zellen Antigene erkennen, die über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. MHC-I-Moleküle werden von allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren Peptide von endogenen Proteinen. MHC-Klasse-II-Moleküle werden dagegen von antigenpräsentierenden Zellen wie Makrophagen, aktivierte B-Zellen und DZ exprimiert und präsentieren Peptide von exogenen Proteinen. Die Prozessierungswege sind aber nicht absolut getrennt, da auch exogene Proteine über MHC-I-Moleküle präsentiert werden können (Reimann et al., 1994; Ulmer et al., 1994). Exogene Proteine werden in intrazelluläre Endosomen aufgenommen. Auf dem Weg zu den Lysosomen sinkt der pH-Wert der Vesikel, was zu einer Aktivierung von Säureproteasen und zur Degradation der Proteine führt. Die MHC-II-Moleküle, die aus zwei Proteinketten, der α - und der β -Kette bestehen und in endosomalen Kompartimenten lokalisiert sind, fusionieren mit den peptidhaltigen Endosomen, so daß eine Peptidbeladung möglich ist. Die MHC-II-Peptid-Komplexe werden dann an die Zelloberfläche transportiert.

Aktivierte CD8 exprimierende T-Zellen können Zellen, die den entsprechenden MHC-Peptid-Komplex auf der Oberfläche präsentieren, lysieren. Aktivierte T-Helfer-Zellen dagegen sezernieren verschiedene Zytokine, die sowohl stimulatorische als auch suppressive Effekte auf zytotoxischen T-Zellen sowie auf andere Zellen des Immunsystems ausüben.

Naive T-Zellen erkennen den MHC-Peptid-Komplex über ihren T-Zellrezeptor. Neben diesem ersten Signal benötigen sie ein zweites kostimulatorisches Signal, um aktiviert zu

werden, klonal zu expandieren und eventuell in zytolytische Effektorzellen zu differenzieren. Zu den kostimulatorischen Molekülen gehören die Moleküle CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), die von antigenpräsentierenden Zellen exprimiert werden. Die kostimulatorischen Signale interagieren mit dem CD28-Molekül der T-Zellen, was *in vitro* die IL-2-Produktion und die Proliferation der T-Zellen erhöht (Lenschow et al., 1996). Weitere kostimulatorische Moleküle sind CD70 und sein Bindungspartner CD27 sowie CD40 und sein Ligand CD40L. In Abwesenheit eines dieser beiden Signale werden die T-Zellen entweder ignorant (Fehlen des 1. Signals) oder anerg (Fehlen des 2. Signals). Die entstehende T-Zelltoleranz ist ein Status, in dem die T-Zellen auf weitere Antigenstimulation nicht reagieren. Es wird vermutet, daß antigenpräsentierende Zellen, im besonderen DZ, diese Toleranz überwinden können (Young und Inaba, 1996).

1.4 Zellvermittelte Immunantwort bei HPV-Infektionen und HPV-assozierten Neoplasien

Die HPV-Infektion stellt den Hauptrisikofaktor für die Entstehung eines Zervixkarzinoms dar. Obwohl es über 20 onkogene HPV-Genotypen gibt, sind die HPV-Typen 16 und 18 die prävalentesten im Zervixkarzinom (zur Hausen, 2000). Die transformierenden Onkoproteine E6 und E7 dieser beiden Viren werden konstitutiv in HPV-infizierten prämaligen und malignen Läsionen der Zervix exprimiert und sind erforderlich für die Aufrechterhaltung des transformierenden Phänotyps (von Knebel Doeberitz et al., 1988, 1992). Die Proteinkomplexe E6-p53 und E7-pRb werden in den Zellen degradiert und die Peptide ins Endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort werden sie auf MHC-I-Moleküle geladen und im Komplex über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche transportiert. Zytotoxische T-Zellen können diese viralen Peptide im Komplex mit MHC-I-Molekülen erkennen. Es gibt Indizien dafür, daß das zelluläre Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Kontrolle von HPV-Infektionen und HPV-assozierten Neoplasien spielt. Dafür spricht zum einen eine erhöhte Inzidenz von HPV-Läsionen bei immunsupprimierten Personen im Vergleich zu einer gesunden Population, z.B. bei HIV-infizierten Personen (Ho et al., 1994; Petry et al., 1994) oder Personen nach Transplantation (Halpert et al., 1986). Desweiteren konnten in spontan regredierenden, HPV-assozierten Warzen infiltrierende CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen nachgewiesen werden (Coleman et al., 1994). Auch HPV-assozierte Warzen von Patientinnen, die eine immunsupprimierende Therapie durchlaufen, regredieren häufig, wenn die Therapie unterbrochen wird (Benton et al., 1992). Weiterhin haben Tierstudien gezeigt, daß Tiere, die mit viralen Nicht-Strukturproteinen immunisiert wurden, vor einer HPV-Infektion oder Entwicklung einer

Neoplasie geschützt sind. Die Immunisierung erleichtert auch die Regression existierender Läsionen (Brandsma, 1994; Selvakumar et al., 1995).

In Zervixkarzinompatientinnen wird offensichtlich keine ausreichend effiziente zytotoxische T-Zellantwort gegen HPV-Antigene durch die Tumorzelle induziert. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, daß epitheliale Tumorzellen keine kostimulatorischen Signalmoleküle exprimieren, die für die Aktivierung naiver T-Zellen notwendig sind. Dies kann zu T-Zell-Anergie führen. Desweiteren zeigen Tumorzellen oft eine verminderte MHC-Expression, wodurch die Präsentation der viralen Antigene eingeschränkt wird, und die Tumorzellen nicht von spezifischen T-Zellen erkannt werden können. Zusätzlich sezernieren Tumorzellen Zytokine (z.B. TGF- β , IL-10) in ihre Mikroumgebung, die inhibitorische Effekte auf T-Zellen ausüben können. Die Freisetzung inhibitorischer Zytokine, die verminderte MHC-Expression sowie die Präsentation viraler Antigene in Abwesenheit von Kostimuli der nicht-professionellen „antigenpräsentierenden“ Keratinozyten erklärt zumindest zum Teil die Fähigkeit von HPV, dem Immunsystem zu entkommen.

1.5 Dendritische Zellen (DZ)

Normalerweise werden T-Zellen von professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) aktiviert. Dazu zählen neben den Makrophagen und den aktivierten B-Zellen, die DZ. DZ gelten als die effizientesten antigenpräsentierenden Zellen (Steinman, 1991), die in hohem Maße MHC-I- und -II-Moleküle und kostimulatorische Signalmoleküle exprimieren. Ihre Aufgabe ist es, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und diese naiven T-Zellen zu präsentieren. DZ wurden bereits 1868 als Langerhans Zellen der Epidermis beobachtet, und wurden 1973 erstmals von Steinman und Kollegen beschrieben (Steinman und Cohn, 1973). DZ sind vom Knochenmark abstammende APC, die für die Induktion einer primären als auch sekundären T-Zellvermittelten Immunantwort erforderlich sind (Steinman, 1991; Caux et al., 1995). Als APC sind sie darauf spezialisiert, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und diese im Komplex mit MHC-I- und MHC-II-Molekülen naiven T-Zellen zu präsentieren. Sie umfassen ein System, das im nicht-lymphatischen Gewebe aller Organe mit Ausnahme des Gehirns, Teile der Augen und der Testis (Hart, 1997), im lymphatischen Gewebe, dem Blut und der afferenten Lymphe vertreten ist. Im nicht-lymphatischen Gewebe sind sie als Langerhans Zellen in den Epithelien der Haut, der Mukosa und der Lunge vertreten, im Interstitium der meisten Organe als interstitielle DZ. Im Blut repräsentieren sie die Blut-DZ, in der afferenten Lymphe die afferenten lymphatischen DZ und in den lymphatischen Geweben wie den T-Zell-reichen Arealen innerhalb der sekundären lymphatischen Organe

werden sie als interdigitierende DZ bezeichnet. Außerdem sind sie in der Medulla des Thymus vorzufinden als auch in den B-Zell-Follikeln der sekundären lymphoiden Organe, wo sie als „germinal center“ DZ bezeichnet werden. Obwohl die Beziehung zwischen den verschiedenen DZ-Populationen noch nicht vollständig verstanden ist, glaubt man, daß sie verschiedene Differenzierungsstadien repräsentieren, die mit den Zirkulationswegen verbunden sind (Steinman, 1991).

1.5.1 DZ-Entwicklung

DZ können aus myeloiden Vorläuferzellen, aus lymphoiden Vorläuferzellen und aus humanen peripheren Blutmonozyten differenzieren. Die myeloiden DZ stammen von einer kleinen Fraktion CD34⁺ hämatopoetischer Vorläuferzellen des Knochenmarks und des Blutes ab (Caux et al., 1992, 1994, 1995). *In vitro* stimulieren GM-CSF („granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“) und TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) das Wachstum und die Differenzierung dieser DZ-Progenitoren in potente DZ (Caux et al., 1992). Die myeloiden DZ umfassen zwei Subpopulationen: epidermale Langerhans Zellen (LZ) und interstitielle DZ. Die LZ zeichnen sich durch Expression von CD1a (nicht polymorphes Klasse-I Molekül assoziiert mit dem β 2-Mikroglobulin mit unbekannter Funktion), CLA („cutaneous lymphocyte associated antigen“; Homing-Molekül für die Haut), Lag-Antigen und E-Cadherinen aus. Zusätzlich enthalten sie zytoplasmatische „inclusion bodies“, die sogenannten Birbeck-Granula, und weisen keine CD14-Expression auf. Die interstitiellen DZ-Vorläufer dagegen weisen keine der oben genannten Merkmale auf. Sie exprimieren CD14 und sind bipotent, d.h. sie können sich unter Einfluß von GM-CSF und TNF- α in CD1a⁺ DZ oder unter dem Einfluß von M-CSF in CD14⁺ Makrophagen entwickeln. DZ können *in vitro* auch aus CD14⁺ humanen peripheren Blutmonozyten entstehen. Die Entwicklung unreifer DZ wird durch GM-CSF und IL-4 gefördert (Romani et al., 1994; Sallusto und Lanzavecchia, 1994). GM-CSF fördert die CD1a Expression, wohingegen IL-4 die CD14-Expression herunterreguliert, wodurch wahrscheinlich das Makrophagen-Differenzierungspotential der DZ-Progenitoren supprimiert wird (Jansen et al., 1989). Diese unreifen DZ können durch inflammatorische Stimuli wie TNF- α , IL-1 oder Lipopolysaccharide (LPS) zur terminalen Differenzierung induziert werden (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Romani et al., 1996). Die aus Monozyten entstandenen unreifen DZ exprimieren weiterhin den M-CSF-Rezeptor, den sie während der Ausreifung verlieren (Bender et al., 1996). Die Blutmonozyten repräsentieren daher wahrscheinlich eine Quelle an Vorläuferzellen, die sich in Abhängigkeit der externen Zytokine in DZ oder in Makrophagen

entwickeln können (*in vitro* durch Zugabe von IL-4 und GM-CSF bzw. M-CSF). Daher korrespondieren die peripheren Blutmonozyten wahrscheinlich mit den CD14⁺ interstitiellen DZ-Vorläuferzellen (s.oben) (Cella et al., 1997a). DZ entstehen auch aus lymphoiden Vorläuferzellen. Diese lymphoiden DZ exprimieren u.a. den Lymphozytenmarker CD8 und den Fas-Liganden, über welchen sie Apoptose in T-Zellen induzieren können (Suss und Shortman, 1996). Die sogenannten Thymus-DZ, die von lymphoiden Stammzellen abstammen, kommen in den T-Zell-Arealen und der Medulla des Thymus vor, wo sie vermutlich die klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen regulieren (Ardavin, 1997; Brocker et al., 1997).

Bisher sind keine Linien-spezifischen Marker für DZ bekannt. DZ zeichnen sich durch das Fehlen spezifischer Linienmarker wie z.B. CD3 (T-Lymphozyten), CD19/20 (B-Lymphozyten), CD14 (Monozyten) oder CD56/CD57 (NK-Zellen) aus. CD83 wurde als spezifischer Marker für einige reife DZ-Populationen beschrieben, der nicht von anderen mononukleären Zellen exprimiert wird (Zhou und Tedder, 1995).

1.5.2 DZ-Ausreifung

DZ existieren in zwei Differenzierungsstadien (Romani et al., 1989; Steinman, 1991). Unreife DZ sind im nicht-lymphoiden Gewebe lokalisiert, wo sie spezialisiert sind, Antigene aufzunehmen, wohingegen reife DZ in den sekundären lymphoiden Organen vertreten sind und eine verstärkte T-Zell-stimulatorische Kapazität aufweisen (Cella et al., 1997). DZ entstehen aus Vorläuferzellen des Knochenmarks, wandern als unreife Population über das Blut ins periphere Gewebe, wo sie effizient Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen können. Dafür können sie verschiedene Mechanismen benutzen: die Makropinozytose als unspezifischen Mechanismus (Sallusto et al., 1995), die rezeptorvermittelte Endozytose über Mannose-Rezeptoren wie DEC-205 (Jiang et al., 1995; Sallusto et al., 1995) und die rezeptorvermittelte Endozytose über den Fc-Rezeptor (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Sallusto et al., 1995). Inflammatorische Signale und mikrobielle Antigene induzieren die Reifung als auch die Migration unreifer DZ, die darauf über die afferente Lymphe in die T-Zell-Areale der lymphoiden Organe wandern. Die migratorische Kapazität wird zum einen durch chemotaktische Faktoren reguliert, die vom Zielgewebe freigesetzt werden, zum anderen durch die Modulation der Oberflächenadhäsionsmoleküle der DZ (Sozzani et al., 1998; Sallusto et al., 1998). Unreife DZ exprimieren u.a. die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5, die Rezeptoren für einige inflammatorische Chemokine wie z.B. MIP-1 α („macrophage inflammatory protein“), MIP-1 β und RANTES darstellen. Diese

Chemokinrezeptoren werden nach Induktion der Reifung herunterreguliert, so daß die DZ das Entzündungsgewebe verlassen können. Stattdessen wird der Chemokinrezeptor CCR7 exprimiert, der Chemokine erkennt, die in den lymphoiden Organen produziert werden (Übersicht in Tarte und Klein, 1999). Während der Migration erfolgt die Reifung, die mit phänotypischen und funktionellen Veränderungen einhergeht. Der unreife Status ist charakterisiert durch das hochorganisierte Zytoskelett ohne dendritische Ausläufer, die geringe Motilität, die effiziente Antigenaufnahme, die geringe Expression kostimulatorischer Moleküle, die zytoplasmatische Lokalisation der MHC-II-Kompartimente und die geringe T-Zell-stimulatorische Kapazität. Nach Induktion durch inflammatorische Signale konvertieren die DZ zu reifen DZ. Diese vergrößern ihre Oberfläche durch die Ausbildung von sogenannten „veils“ oder Lamellipoden, wodurch sie auch eine erhöhte Motilität erreichen. Sie weisen eine erhöhte Expression der MHC-I- und MHC-II-Moleküle, der kostimulatorischen Moleküle wie CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) und der Adhäsionsmoleküle CD58 (LFA-3), CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-3) auf. Außerdem wandern die zytoplasmatischen MHC-II-Kompartimente an die Zelloberfläche und die Halbwertszeit der MHC-II-Moleküle im Komplex mit Peptiden erhöht sich drastisch (von 10 auf 100 Stunden), womit eine effiziente Präsentation von Antigenen gewährleistet wird (Cella et al., 1997b). Die endozytotischen Aktivitäten dagegen nehmen deutlich ab.

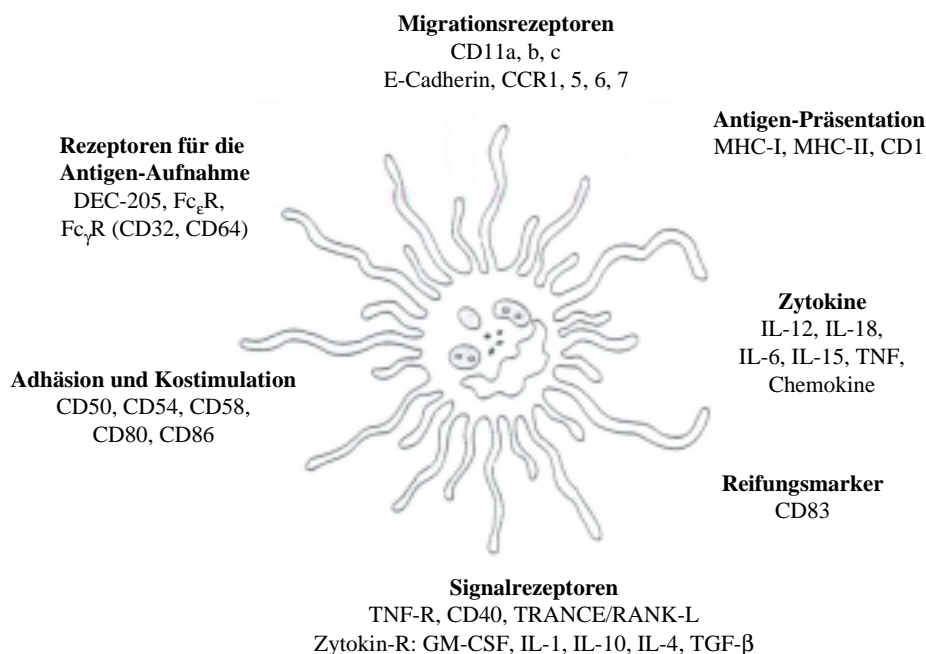


Abb. 1.1 Moleküle, die von DZ exprimiert werden. Es sind die Hauptmerkmale dargestellt, die in Kombination zur Identifizierung DZ verwendet werden. Bis heute gibt es kein einziges Molekül, das alleine die Identifizierung DZ erlauben würde. Nur die Kombination verschiedener Marker ermöglicht die Charakterisierung einer DZ-Subpopulation mit ihrem Differenzierungsstadium (Abbildung nach Palucka und Banchereau, 1999). R = Rezeptoren, L = Ligand

1.5.3 Interaktion zwischen DZ und T-Lymphozyten

DZ haben die Fähigkeit, endogene Proteine mittels MHC-I-Molekülen und exogene Proteine über MHC-II-Moleküle zu präsentieren. Dies ermöglicht sowohl eine Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen als auch von T-Helfer-Zellen. DZ besitzen außerdem einen Weg für den Export exogener Antigene von endozytotischen Kompartimenten ins Zytosol. Dieser Transportweg ist auf DZ beschränkt und spezifisch für internalisierte Proteine. Die Existenz dieses Membran-Transportweges zeigt die Möglichkeit der DZ auf, internalisierte Antigene auch über MHC-I-Moleküle zu präsentieren (Rodriguez et al., 1999), was auch als „cross-priming“ bezeichnet wird. In den Lymphknoten bilden die DZ über verschiedene Adhäsionsmoleküle, im besonderen CD54 (ICAM-1), CD50 (ICAM-3) und CD58 (LFA-3), die verstärkt von reifen DZ exprimiert werden, Aggregate mit den T-Zellen. Die Interaktion der DZ mit den T-Zellen wird durch die spezifische Bindung des T-Zellrezeptors an den MHC-Peptid-Komplex stabilisiert, welches das erste Signal für die Aktivierung der T-Zellen darstellt. Ein zweites kostimulatorisches Signal ist unbedingt erforderlich, um die Zellproliferation zu ermöglichen und T-Zellanergie zu verhindern. Dieses Signal wird durch die Interaktion von CD80 und CD86, die beide von DZ exprimiert werden, mit CD28 auf T-Zellen übermittelt.

CD4⁺T-Zellen können nach Aktivierung in 2 Typen von Effektorzellen differenzieren: T-Helfer-Zellen des Typ 1 (T_H1) oder des Typ 2 (T_H2). Durch die Freisetzung der Zytokine IL-2, IFN- γ , TNF- α und TNF- β unterstützen T_H1-Zellen die zelluläre Immunabwehr, wohingegen T_H2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 sezernieren und damit die humorale Immunantwort verstärken. Die Differenzierung naiver CD4⁺T-Zellen hängt u.a. von der Zytokinumgebung der Zellen ab, wobei IL-12 und IFN- γ die Entwicklung in T_H1-Zellen und IL-4 die Entwicklung in T_H2-Zellen fördert.

Aktivierte CD4⁺T-Zellen werden CD40L positiv und übermitteln ein Stimulierungssignal auf CD40-positive DZ. Diese CD40-40L-Interaktion als auch die Interaktion zwischen TRANCE-RANK verstärkt die Funktion der DZ, die sich in einer erhöhten Expression kostimulatorischer Moleküle, MHC- und Adhäsionsmoleküle sowie der Sekretion von IL-12 äußert (Schoenberger et al., 1998; Bennett et al., 1998). Diese DZ sind optimal in der Lage antigenspezifische CD8⁺T-Zellen zu induzieren. Zusätzlich dirigiert und unterstützt das sezernierte IL-12 die Differenzierung einer T_H1-Immunantwort. Dieses Zwei-Stufen-Modell der T-Zellaktivierung erklärt, warum eine CD4⁺T-Helferantwort für eine zytotoxische T-Zellantwort notwendig ist. IL-10 inhibiert im Gegensatz zu IL-12 eine T_H1-Immunantwort.

IL-10 inhibiert die Reifung DZ und die IL-2-Freisetzung aktivierter T-Zellen. IL-10 wird von T_H2-Klonen, B-Zellen, Makrophagen und Tumorzellen sezerniert.

1.5.4 DZ als zelluläres Adjuvans in Vakzinierungstherapien

Beim Menschen kommen reife DZ im peripheren Blut nur mit einer geringen Häufigkeit vor (unter 0.5% der kernhaltigen Zellen). Es gibt mittlerweile verschiedene Strategien, die die Generierung einer großen Anzahl DZ *ex vivo* ermöglichen. Dazu zählt die Generierung DZ entweder aus Blutmonozyten durch Kultivierung mit IL-4 und GM-CSF oder aus CD34⁺ Vorläuferzellen durch Kultivierung mit GM-CSF und TNF- α . Die Verfügbarkeit großer Mengen an DZ sowie die Identifikation vieler tumorassoziierter Antigene (TAA) in jüngster Zeit, haben neue Möglichkeiten für die Immunisierung geschaffen, besonders im Hinblick auf die Generierung einer zytotoxischen T-Zellantwort gegen Tumorantigene. In Tiermodellen wurde bereits gezeigt, daß durch TAA-beladene DZ eine Tumorphrotektion und sogar eine Regression etablierter Tumore induziert werden kann (Flamand et al., 1994; Mayordomo et al., 1995; Celluzzi et al., 1996). Die Beladung DZ mit Antigenen kann durch verschiedene Methoden erreicht werden. Es wurden synthetische Peptide, die definierte T-Zellepitope darstellen, zur Beladung erfolgreich eingesetzt (Porgador und Gilboa, 1995). DZ können auch mit rekombinanten Viren wie z.B. retroviralen Vektoren (Specht et al., 1997) oder adenoviralen Vektoren (Philip et al., 2000) transduziert werden. Desweiteren ist es möglich, DZ mit DNA oder RNA, die für spezifische Tumorantigene kodieren oder mit Gesamt-Tumor-RNA zu transfizieren, die zu einer effizienten Induktion spezifischer T-Zellen führen (Casares et al., 1997; Boczkowski et al., 1996; Ashley et al., 1997; Nair et al., 1998). Weitere Beladungsstrategien für DZ, die erfolgreich durchgeführt wurden, sind die Beladung DZ mit Tumorlysat (DeMatos et al., 1998) oder die Fusionierung DZ mit Tumorzellen (Gong et al., 2000).

1.6 HPV-Vakzine

Tierstudien zeigen, daß virus-neutralisierende Antikörper den Wirt vor Infektion schützen können. Rekombinante HPV „virus-like-particles“ (VLP) werden durch Überexpression des L1 Proteins, dem Hauptkapsidprotein von HPV, generiert, die neutralisierende Epitope tragen (Kirnbauer et al., 1992). Immunisierung von Tieren mit VLP schützt sie vor experimentellen Infektionen des homologen Tier-Papillomvirus (Breitburd et al., 1995; Kirnbauer et al., 1996). Der passive Transfer von Serum von VLP-vakzinierten Mäusen in naive Mäuse reicht aus, um einen Schutz zu generieren, was vermuten läßt, daß der schützende Effekt durch

neutralisierende Antikörper vermittelt wird (Breitburd et al., 1995; Suzich et al., 1995). Die experimentellen Daten zeigen, daß VLP eine vielversprechende prophylaktische Vakzinierung ermöglichen. Die Immunisierung mit Kapsidproteinen alleine generiert allerdings keinen signifikanten Effekt bei etablierten HPV-Infektionen, weil diese Proteine in basalen Epithelzellen benignen, prämaligen und malignen Läsionen nicht exprimiert werden. Deswegen ist für eine therapeutische Vakzine eine andere Vakzinierungsstrategie erforderlich. Es gibt Hinweise, daß die zelluläre Immunität, besonders die antigenspezifische T-Zell-vermittelte Immunität, für die Behandlung etablierter HPV-Infektionen notwendig ist (Übersicht in Wu, 1994). Daher stellen Vakzine, die die zellvermittelte Immunität für spezifische Nicht-Strukturproteine induzieren, eine vielversprechendere Möglichkeit dar, eine Regression etablierter Läsionen oder maligner Tumore zu erreichen.

1.6.1 Therapeutische HPV-Vakzine

Therapeutische Vakzine sollten eine spezifische zellvermittelte Immunität induzieren, die die Entwicklung von Läsionen verhindert und existierende Läsionen und maligne Tumore eliminiert. Da die E6- und E7-Proteine konstitutiv in den meisten Zervixkarzinomen und ihren Vorläuferläsionen (von Knebel Doeberitz et al., 1988, 1992), nicht aber in normalem Gewebe exprimiert werden, stellen diese viralen Onkoproteine hochspezifische Zielstrukturen für die Entwicklung therapeutischer Vakzine dar. Der Vorteil der viralen Proteine E6 und E7 ist, daß sie im Gegensatz zu den meisten tumorspezifischen Antigenen, die von normalen oder mutierten „Selbst“-Proteinen abstammen, komplette Fremdproteine darstellen und somit mehr antigene Epitope als mutierte zelluläre Proteine beherbergen. Es ist zudem unwahrscheinlich, daß Zervixkarzinomzellen dem Immunsystem durch Antigenverlust entkommen, weil E6 und E7 für die Induktion und Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps erforderlich sind (Crook et al., 1989). Von daher repräsentieren die E6- und E7-Proteine gute Zielstrukturen, für die Entwicklung einer antigenspezifischen Immuntherapie für das Zervixkarzinom. Verschiedene Formen von HPV-Vakzinen sind in experimentellen Systemen, die auf die E6- und E7-Proteine von HPV16 zielen, beschrieben worden: Virale Vektor-Vakzine, Peptid-Vakzine, Protein-Vakzine, DNA-Vakzine, chimäre VLP-Vakzine und zelluläre Vakzine (Übersicht in Onon und Kitchener, 1999; Ling et al., 2000). Zelluläre Vakzine können vereinfacht in zwei Kategorien eingeteilt werden: DZ-Vakzine und zytokin-transduzierte Tumorzell-Vakzine. DZ sind wie bereits erwähnt die potentesten APC, die spezialisiert sind, T-Helfer-Zellen und zytotoxische T-Zellen zu induzieren. Deswegen stellt die *ex vivo*-Präparation und Modifikation von DZ eine attraktive Vakzinierungsstrategie dar, um die T-Zell-vermittelte

Immunität gegen Tumore zu induzieren, zu reaktivieren und zu verstärken. Im Maussystem wurde bereits gezeigt, daß DZ, die mit HPV16-E7 Peptiden (Ossevoort et al., 1995), HPV16-E7 DNA (Tuting et al., 1997) oder HPV16-E7 Proteinen (De Bruijn et al., 1998) beladen wurden, *in vivo* eine spezifische zytotoxische T-Zellantwort induzieren und protektiven Schutz vermitteln.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das Zervixkarzinom stellt mit seinen charakteristischen tumorspezifischen viralen Antigenen ein ideales Modell dar, um die im Tierexperiment gewonnenen Daten für das Humansystem zu verifizieren, woraus sich neue Therapieformen für das Zervixkarzinom ableiten könnten. Das Ziel dieser Arbeit war es, verschiedene Beladungsmethoden für DZ mit HPV-Antigenen im Humansystem zu etablieren und die Effizienzen zu vergleichen. Als HPV-Antigen wurde auf HPV16-E7 fokussiert, weil mehr als 50% der Zervixkarzinome mit HPV16 assoziiert sind (zur Hausen, 2000), und E7 im Vergleich zu E6 in größeren Mengen in Tumorzellen exprimiert wird. Es sollten folgende DZ-Beladungsmethoden *in vitro* etabliert werden: Beladung DZ mit HPV16-E7-Peptiden, -RNA, -DNA und -Protein. Dafür sollte zunächst die Generierung humaner DZ aus peripheren Blut gesunder Donoren etabliert, und HPV16-E7-RNA, -DNA und -Protein für die Beladung hergestellt werden. Die Effizienz der Beladung sollte mittels *in vitro*-Induktion spezifischer T-Zellen von gesunden Donoren analysiert werden. Für den Spezifitätsnachweis der T-Zellen sollte neben dem Chrom-Freisetzungstest der IFN- γ -ELISpot als sensitive Nachweismethode eingeführt werden. Anschließend sollte die Anwendung der effizientesten Beladungsmethode auf Zervixkarzinompatientinnen übertragen werden. Dabei sollte gezeigt werden, ob autologe HPV16-E7-beladene DZ *ex vivo* spezifische tumorinfiltrierende Lymphozyten von Zervixkarzinompatientinnen aktivieren können.

Die HPV-E7-Proteinbeladungsmethode, die sich als effizienteste Beladungsmethode für DZ in diesem System erwiesen hat, kam in einem Heilversuch, der an der Frauenklinik der FSU Jena durchgeführt wurde, zum klinischen Einsatz. Für die *in vitro* Analyse der zellulären Immunantwort in den vakzinierten Zervixkarzinompatientinnen wurde die etablierte DZ-Beladungsmethode im ELISpot eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Autoklav	Münchener Medizin Mechanik GmbH (München, BRD)
BioRad Econo-System (MPLC Medium Pressure Liquid Chromatography) .. Dynalmagnet (MPC-Q Magnetic Particle Concentrator)	BioRad (München, BRD) Dynal (Oslo, Norwegen) Zeiss (Oberkochen, BRD)
ELISpot-Auslesegerät (Zeiss-Vision C)	Zeiss (Oberkochen, BRD)
Mikrotiterplatten-Erntegerät (Harvester Filtermate 196)	Canberra Packard (Dreieich, BRD)
Fluoreszenzaktivierter Zellsorter (FACS Calibur)	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)
Fluoreszenzmikroskop (Axioplan)	Carl-Zeiss (Jena, BRD)
Gelfiltrationsapparatur (Mini Prep Cell)	BioRad (München, BRD)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg, BRD)
Heizschrank	WTB-Binder Labortechnik GmbH (Tuttlingen, BRD)
Laminarwerkbank (SterilGard)	The Baker Company (Sanford, USA)
Mikroskop (Axiovert 25)	Carl Zeiss (Jena, BRD)
Mikrotiterplatten-Lesegerät (Elisa Reader MPR A4i)	Tosoh (Tokyo, Japan)
Mikrowelle	AEG GmbH (Nürnberg, BRD)
Pipettierhilfe	Desaga-Sarstedt-Gruppe (Nürnbrecht, BRD)
Schüttelwasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH (Burgwedel, BRD)
Spektralphotometer (Spectronic Genesys 2) .	Milton Roy (Rochster, USA)
Stickstofftank	Messer Griesheim GmbH (Krefeld, BRD)
Szintillationszähler (Top Count Microplate Scintillation Luminescence Counter)	Canberra Packard (Dreieich, BRD)
Thermocycler	Eppendorf (Hamburg, BRD)

Westernblot-Apparatur	Schleicher&Schuell (Dassel, BRD)
UV-Leuchttisch	Vetter GmbH (Wiesloch, BRD)
Zählkammer (Neubauer)	Brand (Melsungen, BRD)
Zellinkubator für Zellkultur (BD 2660)	Heraeus Christ GmbH (Osterode, BRD)
Zentrifugen:	
Minifuge GL & Megafuge 1.0 R	Heraeus Christ GmbH (Osterode, BRD)
Tischzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg, BRD)
Ultrazentrifuge (Optima XL-100)	Beckmann (Palo Alto, USA)

2.1.2 Verbrauchs- und spezielles Material

Für die Zellkultur wurden Einwegmaterialien der Firma Falcon[®], Becton Dickinson (Heidelberg, BRD) verwendet.

Abdeck-Klebefolien.....	Canberra Packard (Dreieich, BRD)
Cluster Tubes Individual 1,2 ml	Costar (Fernwald, BRD)
Deckgläschen	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Einfriertubes 2 ml	Greiner (Frickenhausen, BRD)
Filterplatten	Canberra Packard (Dreieich, BRD)
Leucosep-Röhrchen	Greiner (Frickenhausen, BRD)
Microcon 3 und 10	Millipore GmbH (Eschborn, BRD)
S-Monovetten Blutentnahmesystem	Sarstedt (Nümbrecht, BRD)
Nitrozellulose HA-Platten	Millipore GmbH (Eschborn, BRD)
Nylonmembran	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, BRD)
Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig, BRD)
Plastikküvetten	Brand GmbH (Wertheim, BRD)
Plastikpipetten.....	Greiner (Frickenhausen, BRD)
Schafserythrozyten	ICN Biomedicals (Eschwege, BRD)
Sterilfilter	Schleicher&Schuell (Dassel, BRD)
Whatman Filterpapier (4 mm)	Schleicher&Schuell (Dassel, BRD)

2.1.3 Chemikalien

AAS (Antibiotic-Antimycotic-Solution)	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)
AB-Plasma, humanes	Blutbanken Jena, Suhl

Acrylamidlösung 30%(w/v) (29:1 Acrylamid/Bisacrylamid)	AppliChem (Darmstadt, BRD)
Agarose	Boehringer (Mannheim, BRD)
Albumin Human 20%	Blutspendedienst DRK (Hagen, BRD)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstad, BRD)
Ammoniumperoxodisulfat	Merck (Darmstadt, BRD)
Aqua des./bidest.	Labor
Bacto-Agar	Difco (Detroit, USA)
Bacto-Trypton	Difco (Detroit, USA)
BCIP/NBT Solution	Sigma (Deisenhofen, BRD)
β_2 -Mikroglobulin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Bradford-Reagenz	BioRad (München, BRD)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt, BRD)
BSA (Bovines Serum Albumin)	Jackson Immuno Research (West Grove, USA)
CD3/28 Tcell Expander beads	Dynal (Hamburg, BRD)
Chloroform	Merck (Darmstad, BRD)
⁵¹ Chrom	NEN Life Science Products (Boston, USA)
Coomassie Brilliant Blau G250	BioRad (München, BRD)
Cyclosporin A	Sigma (Deisenhofen, BRD)
DEPC	Sigma (Deisenhofen, BRD)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	ICN Biomedicals (Aurora, BRD)
DOTAP Liposomales Transfektionsreagenz .	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, BRD)
Dynalbeads M-450 CD8	Dynal (Hamburg, BRD)
Eisessig	Merck (Darmstadt, BRD)
Ethanol 80% zum Desinfizieren.....	Otto Fischar GmbH (Saarbrücken, BRD)
Ethanol 96%	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
EDTA (Ethylendiamintetraacetat)	Merck (Darmstadt, BRD)
FACS-Flow	Becton-Dickinson (Heidelberg, BRD)
FACS-Clean	Becton-Dickinson (Heidelberg, BRD)
FACS-Rinse	Becton-Dickinson (Heidelberg, BRD)
FCS (Fötiales Kälberserum)	Sigma (Deisenhofen, BRD)

Ficoll-Paque plus	Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden)
Formaldehydlösung min 37%	Merck (Darmstadt, BRD)
Glukose	Sigma (Deiseshofen, BRD)
Glycerol	Sigma (Deiseshofen, BRD)
Guanidiniumhydrochlorid	Sigma (Deiseshofen, BRD)
Harnstoff	USB (Ohio, USA)
Hefeextrakt	Difco (Detroit, USA)
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin- 1-ethansulfonsäure	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, BRD)
Isopropanol	Merck (Darmstadt, BRD)
Kalziumchlorid	Sigma (Deiseshofen, BRD)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, BRD)
Kaliumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt, BRD)
Liquemin N	Roche Diagnostic (Mannheim, BRD)
Lysozym	BioRad (München, BRD)
Magnesiumchlorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Methanol	Sigma (Deisenhofen, BRD)
β-Mercaptoethanol	Merck (Deisenhofen, BRD)
Microscint O	Canberra Packard (Dreieich, BRD)
Microscint 40	Canberra Packard (Dreieich, BRD)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt, BRD)
Natriumazid	Merck (Darmstadt, BRD)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt, BRD)
Natriumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, BRD)
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, BRD)
Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt, BRD)
Nickel-NTA-Agarose	Quiagen GmbH (Hilden, BRD)
Nickelsulfat	Merck (Darmstadt, BRD)
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)
Phenol, puffergesättigt	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)
Proteinlängenmarker (Low Range)	BioRad (München, BRD)
P/S (Penicillin/Streptomycin Solution)	Gibco BLR (Eggenstein, BRD)
rATP	Promega (Madison, USA)
Salzsäure	Merck (Darmstadt, BRD)

Scim Milk Powder	ICN Biomedicals (Aurora, USA)
Streptavidin-alkalische Phosphatase-Komplex	Sigma (Deisenhofen, BRD)
TEMED	
(N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Thrombin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
³ Thymidin	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, BRD)
Tris	Merck (Darmstadt, BRD)
Triton X 100	Merck (Darmstadt, BRD)
Trypan blue solution (0,4%)	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)
Trypsin-EDTA Solution	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)
Tween 20	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Xylenylanol	Merck (Darmstadt, BRD)

2.1.4 Kulturmedien und Antibiotika

Für eukaryontische Zellen

RPMI-1640 mit Glutamax I oder II	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)
DMEM	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)
AIM-V	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)

Für Bakterien

Luria-Broth-Medium (LB): 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 5 g/l Natriumchlorid; pH7,4; autoklavieren

Antibiotika

Kanamycin: Stammlösung 30 mg/ml Kanamycin in Wasser, sterilfiltriert, Einsatz in einer Endkonzentration von 50 µg/ml, diente der Selektion der Plasmide pET29a und pBK-CMV

2.1.5 Zytokine

rHu IL-1β	R&D System (Wiesbaden, BRD)
rHu IL-2	Promocell (Heidelberg, BRD)
rHu IL-4 CC	PAN Biotech (Aidenbach, BRD)
rHu IL-6 CC	Promocell (Heidelberg, BRD)
rHu IL-7	Promocell (Heidelberg, BRD)

GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen

koloniestimulierender Faktor)

als Medikament Leukomax 400	Sandoz, ESSEX Pharma GmbH (München, BRD)
TNF- α (Tumornekrosefaktor α)	Promocell (Heidelberg, BRD)
PGE ₂ (Prostaglandin E ₂)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
PGE ₂ als Medikament Minprostin E ₂	Pharmacia & Upjohn GmbH (Erlangen, BRD)

2.1.6 Antikörper

Für FACS-Färbung

Liste der zur Immunphänotypisierung verwendete Antikörper gegen humane Oberflächenmoleküle.

Antikörper	Isotyp	Format	Klon	Hersteller	Verd. ^c
<u>Erstantikörper</u>					
CD3	Maus IgG1	FITC ^a	B-B11	DIACLONE (Besancon Cedex, Frankreich)	1:25
CD4	Maus IgG1	PE ^b	B-F5	DIACLONE (Besancon Cedex, Frankreich)	1:50
CD8	Maus IgG1	PE ^b	B-H7	DIACLONE (Besancon Cedex, Frankreich)	1:50
CD25	Maus IgG1	FITC ^a	Tu69	CYMBUS (HANTS, UK)	1:50
CD56	Maus IgG1		B159	PharMingen (San Diego, USA)	1:25
CD80	Maus IgM		BB-1	CYMBUS (HANTS, UK)	1:50
CD83	Maus IgG2b		HB15e	PharMingen (San Diego, USA)	1:25
CD86	Maus IgG1		BU63	CYMBUS (HANTS, UK)	1:50
HLA-A2	Maus IgG2b		HB82	im Labor hergestellt	1:1
MHC-Klasse-I	Maus IgG2a	PE ^b	W6/32-HL	CYMBUS (HANTS, UK)	1:25
MHC-Klasse-II	Maus IgG2a	PE ^b	IQU9	CYMBUS (HANTS, UK)	1:25
<u>Zweitantikörper</u>					
Maus IgG+Maus IgM	Ziege	F(ab') ₂ -FITC ^a	polyklonal	JacksonImmunoResearch (West Grove, USA)	1:100
Maus IgM	Ziege	F(ab') ₂ -FITC ^a	polyklonal	JacksonImmunoResearch (West Grove, USA)	1:100
Maus IgG+Maus IgM	Ziege	F(ab') ₂ -PE ^b	polyklonal	JacksonImmunoResearch (West Grove, USA)	1:100
Maus IgM	Ziege	F(ab') ₂ -PE ^b	polyklonal	JacksonImmunoResearch (West Grove, USA)	1:100
<u>Isotypkontrollen</u>					
	Maus IgG1	FITC ^a	X40	Becton Dickinson (Heidelberg, BRD)	1:25
	Maus IgG1	PE ^b	X39	DIACLONE (Besancon Cedex, Frankreich)	1:25
	Maus IgG2a	PE ^b	CBL 601	CYMBUS (HANTS, UK)	1:25

Tab. 2.1: Primärantikörper waren monoklonale Antikörper aus der Maus. Als Zweitantikörper dienten markierte Ziegenantikörper gegen Maus-Immunglobuline.

a) FITC = Fluoreszeinisothiocyanat, b) PE = R-Phycoerythrin, c) Verd.=Verdünnung

Für ELISpotttest

Anti-human-IFN γ , Klon 1-D1K	Hölzel Diagnostika GmbH (Köln, BRD)
Anti-human-IFN γ , Klon 7-B6-1 (biotinyliert)	Hölzel Diagnostics GmbH (Köln, BRD)

Für Wester-Blot

Maus- α -HPV16-E7	Triton Diagnostics (Alameda, USA)
Ziege- α -Maus-Alkalische Phosphatase	Dianova (Hamburg, BRD)
S-Protein	Novagen (Darmstadt, BRD)

2.1.7 Peptide

Zur Induktion und Analyse spezifischer T-Lymphozyten verwendete Peptide bzw. Peptidpools.

Peptide	Sequenz	Herkunft	Restriktion	Bezugsquelle
IMP 58-66	GILGFVFTL	Influenza	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
BMLF-1 280-288	GLCTLVAML	EBV	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
Pol 510-518	ILKEPVHGV	HIV	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
16-E7 11-20	YMLDLQPETT	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
16-E7 82-90	LLMGTTLGIV	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
16-E7 86-93	TLGIVCPI	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
16-E6 29-38	TIHDIILECV	HPV16	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
18-E7 86-94	FQQLFLNTL	HPV18	HLA-A*0201	DKFZ (Heidelberg, BRD)
Peptidpools	Sequenz	Herkunft		Bezugsquelle
16-E7-20mere	Peptidbibliothek	HPV16		PolyPeptide Laboratories (Wolfenbüttel, BRD)
18-E7-20mere	Peptidbibliothek	HPV18		PolyPeptide Laboratories (Wolfenbüttel, BRD)
16-L1-20mere	Peptidbibliothek 2,6,7,8,13,15,20,24	HPV16		PolyPeptide Laboratories (Wolfenbüttel, BRD)
18-L1-20mere	Peptidbibliothek 2,6,14,17,21,25,26,27	HPV18		PolyPeptide Laboratories (Wolfenbüttel, BRD)

Tab. 2.2.: Die HPV16-E7- und HPV18-E7-Peptidpools bestehen aus 8 Peptiden, die 20 AS lang, wovon die letzten 9 AS überlappen. Die L1-Peptidpools wurden äquivalent dazu aus 8 beliebigen 20mer-Peptiden einer L1-20mer Peptidbibliothek in gleicher Konzentration zusammengestellt.

2.1.8 Enzyme, Oligonukleotide, Kits, TransfektionsreagenzienEnzyme

AmpliTaq-Polymerase	Perkin Elmer (Überlingen, BRD)
DNase	Roche Diagnostics (Mannheim, BRD)

PolyA-Polymerase	USB (Ohio, USA)
Restriktionsenzyme	New England Biolabs (Schwalbach, BRD)
RNase (DNase frei)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
T4-Ligase	Boehringer (Mannheim, BRD)
Tfl-Polymerase	Biozym (Oldendorf, BRD)
T3-RNA-Polymerase	Boehringer (Mannheim, BRD)

Oligonukleotide

PCR-Primer für die Amplifikation von HPV16-E7 und HPV18-E7

INTERAKTIVA GmbH (Ulm, BRD)

Nukleotid Position*	HPV- Typ	Basensequenz	Orientierung
579-562	16	5`-GAAG-GAATTC-*ATGCATGGAGATACACCT-3`	sense
838-855	16	5`-ATAG-CTCGAG-*TGGTTTCTGAGAACAGAT-3`	antisense
590-607	18	5`-GAAG-GAATTC-*ATGCATGGACCTAAGGCA-3`	sense
887-904	18	5`-ATAG-CTCGAG-*CTGCTGGGATGCACACCA-3`	antisense

Die Primer wurden mit den für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen Eco RI und Xho I synthetisiert. HPV-E7-Sequenzen beginnen ab*.

Kits

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen (Hilden, BRD)
Plasmid Maxi Kit (Nucleobond AX500)	Macherey and Nagel (Düren, BRD)
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen (Hilden, BRD)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, BRD)
T3 Cap-Scribe	Boehringer (Mannheim, BRD)

Transfektionsreagenzien

FUGENE 6	Boehringer (Mannheim, BRD)
Effecten	Qiagen (Hilden, BRD)
SuperFect	Qiagen (Hilden, BRD)
DMRIE	Gibco BRL (Eggenstein, BRD)
DOTAP	Roche Diagnostics (Berlin, BRD)

2.1.9 Plasmide

pBK-CMV (Stratagene)

Für die Generierung von HPV16-E7 und EGFP-RNA wurde das Plasmid pBK-CMV verwendet. Dieses Plasmid enthält u.a. einen T3 RNA Polymerase-Promotor, der die *in vitro* Synthese von RNA ermöglicht. Die EGFP-cDNA wurde in die multiple Klonierungsstelle an den Restriktionsschnittstellen Pst I und Not I eingefügt.

Das Plasmid pBK-CMV-HPV16-E7 lag bereits kloniert und charakterisiert im Labor vor (Habilitation Dr. Ingo Nindl, Jena).

pET29a (Novagen)

Für die Expression der E7-Proteine von HPV16 und HPV18 wurde das Plasmid pET29a verwendet. Dieses Plasmid erlaubt eine induzierbare Proteinexpression mit gleichzeitig sehr geringer Basalexpression des rekombinanten Proteins. Das rekombinante Protein enthält am C-terminalen Ende ein „His-tag“, bestehend aus 6 konsekutiven Histidinen, welches eine affinitätschromatographische Reinigung ermöglicht. Zusätzlich enthält das Protein am N-terminalen Ende ein „S-tag“, das aus einem 15 AS langen Peptid besteht und als Erkennungssequenz für das S-Protein dient. Dieses S-tag ermöglicht die Detektion des rekombinanten Proteins im Western Blot mit Hilfe des S-Proteins. Eine vorhandene Thrombin-Spaltungsstelle ermöglicht die Abspaltung des S-tags mit Hilfe von Thrombin. Für die Klonierung der E7-Sequenzen in den Vektor pET29a wurden die Inserts mittels PCR amplifiziert. Als Quelle für die E7-cDNA-Synthese dienten die Vektoren pBK-HPV16-E7-7 und pBK-HPV18-E7-12, die bereits im Labor vorlagen (Habilitation Dr. Ingo Nindl, Jena).

pCR 3.1 (Invitrogen)

Für die Transfektion DZ mit HPV16-E7 DNA wurde das Plasmid pCR 3.1 verwendet, das mir freundlicherweise von Dr. Jochen Geisbill mit der bereits klonierten HPV16-E7 Sequenz zur Verfügung gestellt wurde (Dissertation Jochen Geisbill, Heidelberg).

pEGFP/pEGFP-CMV (Clontech; modifiziert)

Für die Insert-Präparation der EGFP-cDNA wurde das Plasmid pEGFP verwendet. Die EGFP-cDNA wurde anschließend in den Vektor pBK-CMV kloniert.

Das Plasmid pEGFP-CMV lag bereits kloniert im Labor vor (Prof. Dr. Dürst, Jena). Dieses Plasmid wurde als Reporter gen für die Etablierung der DNA-Transfektion von DZ eingesetzt.

2.1.10 Eukaryontische Zelllinien und Bakterienstämme

Eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	ATCC-Nr.	Pathologie	Merkmale	Referenzen
HeLa	CCL-2	Adenokarzinom	HPV18 positiv	Gey et al., 1952
T2	CRL-1992	B Lymphoblast, T-Lymphoblast, Hybrid	Tap-defizient	Salter et al., 1985
K562	CCL-243	Chronisch myeloide Leukämie	Zielzellen für <i>in vitro</i> NK-Assay	Ortaldo et al., 1977; Lozzio und Lozzio, 1979

Bakterienstämme

JM 109: recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thiΔ(lac-proAB)

BL 21 DE3: F⁻ ompT hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻) gal dcm (DE3)

Für die präparative Vermehrung von Plasmiden wurde der Stamm JM 109 verwendet.

Der Stamm BL 21 DE3 wurde für die Durchführung der Proteinexpression eingesetzt.

Dieser Stamm kodiert im Genom für die T7-Polymerase und erlaubt durch Zugabe von IPTG eine induzierbare Proteinexpression.

2.2 Arbeiten mit DNA

2.2.1 Gelelektrophorese in Agarosegelen

- 50x Elektrophoresepuffer pH7,8: 2 M Tris-HCl; 250 mM Natriumacetat; 50 mM EDTA
- 6x BPB-Ladepuffer: 20 mM Tris-HCl, pH7,5; 2 mM EDTA; 50% Sucrose; 0,2% Xylencyanol; 0,2%(w/v) Bromphenolblau
- λ-HindIII-Marker (Stratagene)
- 100 bp-Leiter-DNA (BioRad)

Agarosegele wurden eingesetzt, um DNA-Konzentrationen in Lösungen abzuschätzen, die Qualität von DNA sowie Restriktionsverdau und Ligationen zu überprüfen als auch zur Kontrolle von IVT-RNA. Die entsprechende Menge Agarose, abhängig von der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente, wurde in 1x Elektrophoresepuffer im Mikrowellenherd bis zur vollständigen Lösung der Agarose aufgeköcht. Die verdampfende Wassermenge wurde ergänzt, nach Abkühlen auf 56 C° Ethidiumbromid zugesetzt (1µg/ml Endkonzentration) und der Ansatz in die Gelkammer gegossen. Die DNA wurde mit 6x BPB versetzt und nach Erstarren des Gels in die Geltaschen geladen. Nach kurzem Einlauf der DNA bei erhöhter Spannung erfolgte die Elektrophorese bei Minigelen 1-2 Stunden bei 80 Volt. Nach dem Lauf wurden die Gele auf einer UV-Leuchtplatte (λ 254 nm) mit einer Polaroid-Kamera

fotographiert. Als Größenmarker wurden Hind III-geschnittene λ -DNA (560 bp bis 23 kb) oder eine 50-2000 bp-Leiter-DNA verwendet.

2.2.2 Restriktionsspaltung von DNA

Zur Analyse von Miniprep- und Maxiprep-DNA, zur Linearisierung von Plasmid-DNA für die IVT von RNA als auch für die Präparation von Inserts für Klonierungen wurde Plasmid-DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen gespalten. Die Pufferbedingungen wurden nach Angaben des Herstellers gewählt.

Die Spaltung erfolgte entweder für 2 Stunden bei 37°C oder über Nacht bei RT. Die Vollständigkeit der Spaltung wurde auf einem analytischen Gel überprüft und gegebenenfalls DNA-Fragmente wieder aus dem Gel eluiert.

2.2.3 Präzipitation von DNA

Ethanol-fällung

Die Präzipitation dient der Konzentrierung und Umpufferung von DNA. Die Fällung von DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat pH5. Danach wurde mit dem 2,5 fachen Volumen absolutem Ethanol aufgefüllt und 15 min bei -70°C inkubiert. Anschließend wurde durch Zentrifugation (15-30 min bei 13000 U/min, 4°C) die präzipitierte DNA pelletiert. Das Pellet wurde zur Entfernung von Salzen mit 70%(v/v) Ethanol gewaschen (5 min, 13000 U/min) und nach dem Trocknen in 1x TE-Puffer (10 mM Tris-HCL pH7,5; 1 mM EDTA) gelöst.

Isopropanol-fällung

Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit 0,6 Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und anschließend 30 min bei RT inkubiert. Die ausgefällte DNA wurde durch Zentrifugieren (30 min, 14000 U/min, 4°C) pelletiert. Nachdem das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet wurde, wurde es in H₂O aufgenommen.

2.2.4 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Phenol-Chloroform-Extraktion dient der Entfernung von Proteinen und Lipiden aus Nukleinsäuren. Die Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholmischung (Verhältnis 25:24:1) wurde zu gleichen Teilen mit der wässrigen DNA-Lösung zugegeben (minimales Volumen 100 μ l), durch 2 minütiges Vortexen gemischt und für 2 min bei 13000 U/min und RT zentrifugiert.

Die durch Phenol denaturierten Proteine lagern sich in der Interphase zwischen wässriger und organischer Phase ab. Die obere, wässrige Phase wurde abgenommen und nochmals mit dem gleichen Volumen an Phenol-Chloroform-Isoamylalkoholmischung gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen und mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) durch Vortexen gemischt und zentrifugiert, um Phenol- und Lipidreste zu entfernen. Die nun proteinfreie DNA in der oberen, wässrigen Phase wurde anschließend durch Ethanolpräzipitation gefällt.

2.2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Für die Klonierung der EGFP-cDNA in den pBK-Vektor wurden die Vektoren pEGFP und pBK-CMV mit Hilfe der Restriktionsenzyme Pst I und Not I geschnitten und auf einem präparativen Agarosegel ohne Marker aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend in einem frischen Ethidiumbromid-Bad (5 µg/ml Etbromid in Wasser) gefärbt, und die Banden des EGFP-Insert und des gespaltenen pBK-CMV-Vektors unter langwelligem UV-Licht (365 nm, zur Vermeidung von Einzelstrangbrüchen) ausgeschnitten. Die ausgeschnittenen Banden wurden entweder bei -20°C gelagert oder die DNA direkt aus der Agarose extrahiert. Die Extraktion erfolgte nach dem Protokoll für QIAgen spin columns von Qiagen. Dabei wurde das Agarosestückchen zunächst gewogen, mit 3 Volumina Puffer QG versehen und 10 min bei 50°C unter Schütteln inkubiert, um die Agarose zu lösen. Zur Erhöhung der DNA-Ausbeute wurde danach ein Volumen Isopropanol zugegeben. Die gesamte Lösung wurde auf ein Zentrifugationssäulchen mit Filter gegeben und 1 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Dabei wurde die DNA auf dem Filter gebunden, während die Agarose die Membran passieren konnte. Der Durchfluß wurde verworfen und dieser Schritt mit 0,5 µl QP-Puffer wiederholt, um restliche Agarose-Bestandteile zu entfernen. Anschließend wurde die DNA mit 0,75 ml Puffer PE gewaschen und mit 50 µl EB-Puffer (10 mM Tris-Cl pH8,4) oder H₂O eluiert. Die Extraktion wurde im Agarosegel auf Reinheit und zur Mengenbestimmung überprüft.

2.2.6 Ligationsreaktion

Für die Ligationsreaktion wurden 100 ng Vektor-DNA mit Insert-DNA in einem molaren Verhältnis von 2:1 eingesetzt. Der Ansatz wurde mit H₂O auf 9 µl aufgefüllt, 5 min bei 45°C inkubiert, um Plasmid-Dimere zu lösen und bei 0°C kurz abzentrifugiert. Von diesem Ansatz wurde 1 µl für ein Kontrollgel zurückgehalten. Dann wurde dem restlichen 8 µl Ansatz 1 µl 10x Ligationspuffer und 1 µl T4 DNA-Ligase (1U/µl) zugesetzt. Anschließend wurde der Ansatz für 4 Stunden bei 16°C oder über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle der Ligation wurde

1/10 des Ansatzes parallel zu der vor der Ligation entnommenen Probe in einem 1% Agarosegel aufgetrennt.

2.2.7 Gewinnung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab

- Resuspensionspuffer: 25 mM Tris-HCl pH8,0; 50 mM Glucose; 10 mM EDTA
- Denaturierungslösung: 0,2 M NaOH; 1%(w/v) SDS in deion. H₂O
- Renaturierungslösung: 7,5 M Ammoniumacetat

Diese auch als „Minipräparation“ bezeichnete Methode dient der schnellen Isolation von Plasmid-DNA aus kleinen Volumina einer Bakterienkultur (5 ml Übernachtskultur) z.B. nach vorheriger Transformation neuklonierter Plasmide in Bakterien. Die hier angewendete Methode basiert auf einer alkalischen Lyse der Bakterien, Denaturierung der Nucleinsäuren und Proteine und anschließender Renaturierung der Plasmide. Von einer Bakterienkultur wurden 2 ml durch 1-minütiges Zentrifugieren bei RT und 8000 U/min pelletiert und das überstehende Medium entfernt. Das Bakterienpellet wurde in 200 µl Resuspensionspuffer durch Vortexen resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 400 µl Denaturierungslösung zugegeben, durch vorsichtiges Schwenken gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl Renaturierungslösung (mehrmals vorsichtig invertieren) und 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde das entstandene weiße Präzipitat durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 U/min und 4°C vollständig sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Isopropanol gefällt (s. Abschnitt 2.2.3). Zuvor konnte durch eine Phenolisierung (s. Abschnitt 2.2.4) der DNA der Reinheitsgrad erhöht werden. Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 50 µl H₂O aufgenommen. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde zur Überprüfung der Klonierung mittels Restriktionsspaltung und zur Sequenzierung eingesetzt.

2.2.8 Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab

Für die Gewinnung von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurde der Kit „Nucleobond AX500“ verwendet. Hierfür wurde eine 200 ml Übernachtskultur durch Zentrifugieren (10 min bei 5000 U/min) pelletiert, das Medium entfernt und in 12 ml Puffer S1 aufgenommen. Durch Zugabe von 12 ml Puffer S2 und 5-minütige Inkubation bei RT erfolgte die alkalische Lyse der Bakterien und die Denaturierung der Proteine und Nucleinsäuren. Nach Zugabe von 12 ml Puffer S3 und 5-minütiger Inkubation auf Eis, wurde das entstandene Präzipitat durch Zentrifugation sedimentiert (5 min, 12000g, 4°C) und der Überstand auf die mit 5 ml Puffer

N2 äquilibrierte Säule aufgetragen. Dabei bindet die Plasmid-DNA an das Säulenmaterial, während Proteine und RNA ungehindert durchfließen. Nach zweimaligem Waschen mit je 12 ml Puffer N3 wurde die Plasmid-DNA mit 6 ml Puffer N5 eluiert. Zur Erhöhung der Ausbeute wurde dieser Elutionsschritt wiederholt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch Isopropanol gefällt, das Pellet in 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 100 µl H₂O aufgenommen. Durch eine Konzentrationsbestimmung und Auftrennung im Agarosegel wurde die Menge und Qualität der Plasmid-DNA analysiert.

2.2.9 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA wurde durch Absorptionsmessung im Spektralphotometer bestimmt. Zur Berechnung der Nukleinsäurenkonzentration (doppelsträngige DNA) gilt bei einer Wellenlänge von 260 nm folgende Beziehung:

1OD_{260 nm} entspricht 50 µg/ml DNA.

Zur Bestimmung der Reinheit kann außer der Messung bei 260 nm eine Messung bei 280 nm durchgeführt werden. Das optimale Verhältnis der OD_{260 nm} zu OD_{280 nm} liegt bei 2:1 bei reinen Nukleinsäuren.

Geringere Nukleinsäuremengen lassen sich auch durch Elektrophorese eines Aliquots abschätzen, da die Intensität der Fluoreszenz doppelsträngiger DNA mit Ethidiumbromid unter UV-Licht ihrer Menge proportional ist. Als Referenz diente DNA bekannter Konzentration.

2.2.10 PCR für Insert-Amplifikation und zur Überprüfung der Proteine auf DNA-Kontamination

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR = Polymerase Chain Reaction) dient der Amplifikation von DNA-Fragmenten. Dabei wird im ersten Schritt die Matrizen-DNA thermisch denaturiert. Im zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung (annealing) der komplementären Primer und im dritten Schritt, der Elongation, bindet die DNA-Polymerase an die Primer und synthetisiert den zwischen ihnen liegenden DNA-Abschnitt. Danach startet ein neuer Zyklus, so daß sich die Anzahl der amplifizierenden DNA-Moleküle mit jedem Zyklus verdoppelt.

Für die Umklonierung der E7-Sequenzen von HPV16 und HPV18 in den Vektor pET29a wurde eine Amplifikation dieser Sequenzen mit Hilfe einer PCR durchgeführt. Hierfür wurden Primer mit entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung gewählt. Die E7-Sequenzen wurden aus den Vektoren pBK-HPV16-E7 und pBK-HPV18-E7 amplifiziert.

Der PCR-Ansatz für 10 Reaktionen sah folgendermaßen aus:

DNA	x µl
dNTP	0,2 mM jeweils
Primer 1	2,5 pmol
Primer 2	2,5 pmol
20x Reaktionspuffer	1x
MgCl ₂	1,5 mM
TMAC/ DMSO	50 mM/1,5%
Tfl-Pol/AmpliTaq	0,4 U
H ₂ O	ad 50µl

Die Ansätze wurden nach folgendem Programm inkubiert:

A. Amplifikation

1. Denaturieren 95°C 4 min
 2. Denaturieren 95°C 1 min
 3. Annealing 54°C 30sec
 4. Elongation 72°C 2 min
 5. Elongation 72°C 4 min
- 2, 3 und 4 = 40 Zyklen

B. Nachweis von DNA-Kontaminationen

1. Denaturieren 94°C 1 min
 2. Denaturieren 94°C 15 sec
 3. Annealing 54°C 30 sec
 4. Elongation 72°C 90 sec
 5. Elongation 72°C 8,5 min
- 2, 3 und 4 = 30 Zyklen

Die PCR-Produkte wurden in einem Agarosegel (1,5% TBE) überprüft. Für den Nachweis von DNA-Kontaminationen in den rekombinanten Proteinen wurde die AmpliTaq-Polymerase in der PCR und das in B aufgeführte PCR-Programm verwendet.

2.2.11 Abtrennen von Oligonukleotiden

Für die Generierung der Vektoren pET29a-16-E7 und pET29a-18-E7 wurden die E7-DNA-Amplifikate (s. Abschnitt 2.2.10) zusammen mit dem Leervektor pET29a in einen Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Eco RI und Xho I (s. Abschnitt 2.2.2) eingesetzt. Zur Entfernung der dabei entstandenen, überschüssigen Oligonukleotiden wurde der QIAquick Nucleotide Removal Kit verwendet. Damit ist es möglich, Oligonukleotide, die < 10 Nukleotide sind, Enzyme und Salze aus enzymatischen Reaktionen zu entfernen. 10 Volumen des Puffers PN wurden zu einem Volumen des Reaktionsansatzes zugegeben, auf ein Qiaquick Säulchen transferiert und für 1 min bei 6000 U/min zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, und das Säulchen mit 750 µl Puffer PE gewaschen (Zentrifugation 1 min,

6000 U/min). Der Durchfluß wurde erneut verworfen und das Säulchen ein weiteres Mal zentrifugiert (1 min, 13000 U/min). Abschließend wurde die DNA mit 50 µl Puffer EB oder H₂O mittels Zentrifugation (1min, 13000U/min) eluiert.

2.3 Arbeiten mit Bakterien

2.3.1 Herstellen kompetenter Bakterien

- Lösung A: 100 mM MgCl₂, 5 mM Tris pH7,4
- Lösung B: 100 mM CaCl₂, 5 mM Tris pH7,4
- Lösung C: 100 mM CaCl₂, 5 mM Tris pH7,4, 14% Glycerin

Mit einer ÜN-Kultur wurde eine 200 ml Flüssigkultur im Verhältnis 1:100 angeimpft und unter permanenten Schütteln bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ~ 0,4 erreicht war (die Bakterien befinden sich noch in der exponentiellen Wachstumphase und sind in diesem Stadium besonders für die spätere Transformation geeignet). Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Lösungen und Geräte wurden vorgekühlt. Die Bakterien wurden durch Zentrifugation (5 min, 3000 U/min, 4°C) pelletiert, der Überstand verworfen und das bakterielle Pellet in 100 ml Lösung A resuspendiert. Anschließend wurde wiederum bei 4°C, 3000 U/min für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 ml Lösung B aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden erneut pelletiert (15 min, 3000 U/min, 4°C), der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml Lösung C resuspendiert, sofort in die vorgekühlten 1,5 ml Reaktionsgefäße zu je 200 µl aliquotiert und bei -70°C eingefroren. Die Lagerung sollte 6 Monate nicht überschreiten.

2.3.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation wurden die 200 µl Aliquots kompetenter Bakterien langsam auf Eis aufgetaut. Danach wurde die Plasmid-DNA (2/3 des Ligationsansatzes) zugegeben, mit der Pipettenspitze kurz gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 sec bei 42°C erhitzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 0,9 ml LB-Medium wurde der Ansatz für 1 Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden dann 150 µl auf eine Kanamycinagarplatte ausplattiert und über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle der Transformationseffizienz wurde parallel dazu eine bekannte Menge an Plasmid-DNA transformiert (50 ng), und die Transformationseffizienz bestimmt, indem die Zahl der Transformanten je 1 µg Plasmid-DNA berechnet wurde.

2.3.3 Glycerinkulturen von Bakterien

Die Lagerung von Bakterien über einen längeren Zeitraum erfolgt über Glycerinkulturen bei -80°C . Dazu wurden 500 μl einer Übernackkultur mit 370 μl Glycerin (87%(v/v) in deion. H_2O) gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.4 Synthese von *in vitro* transkribierter RNA

Alle Arbeiten, die für die *in vitro*-Synthese von RNA notwendig waren, wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Alle wässrigen Lösungen, die dafür verwendet wurden, wurden mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltem Wasser angesetzt.

2.4.1 Vorbereitung der Vektoren für die *in vitro* Transkription (IVT)

Für die IVT wurde der Vektor pBK-CMV verwendet. Dieser Vektor besitzt u.a. einen T3 RNA Polymerase-Promotor, der die *in vitro* Synthese von RNA ermöglicht. Das Plasmid pBK-CMV-HPV16-E7 lag bereits kloniert und charakterisiert im Labor vor. Die EGFP-cDNA mußte in den Vektor umkloniert werden. Dafür wurden die Vektoren pBK-CMV und pEGFP-1 zunächst einem Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen Pst I und Not I unterzogen. Anschließend wurde die DNA gefällt und das linearisierte Plasmid (pBK) und das Insert (EGFP) über ein präparatives Agarosegel aufgereinigt. Danach wurde das Plasmid und Insert ligiert und das Ligationsprodukt in JM 109 Bakterien transformiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden ÜN-Kulturen angesetzt und DNA-Mini-Präparationen durchgeführt. Es folgte ein analytischer Restriktionsverdau, eine Sequenzierung der Klone und eine DNA-Maxi-Präparation.

2.4.2 *In vitro* Transkription (IVT)

Für die Produktion von HPV16-E7-RNA bzw. EGFP-RNA wurden die Plasmide pBK-HPV16-E7 und pBK-EGFP zunächst mit Hilfe der Restriktionsenzyme Hind III bzw. Not I linearisiert, um die Ausbeute an Transkripten zu erhöhen. Die linearisierten Plasmide wurden dann als Templates für die *in vitro* Transkription eingesetzt. Bei der Auswahl der Restriktionsenzyme für die Linearisierung gilt es zu beachten, daß die Spaltung keine 3' 4-Basen-Überhänge liefern, da sonst aberrante Transkriptionsprodukte produziert werden können. Die DNA wurde durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt, und die Konzentration im Agarosegel abgeschätzt. Die Transkription wurde dann für 1 Stunde bei 37°C mit Hilfe des T3 Cap-Scribe *in vitro* Transkriptionskit durchgeführt.

Der *in vitro* Transkriptionsansatz sah folgendermaßen aus:

4 µl Cap-scribe-Puffer (5x)

0,5 µg linearisierte DNA

2 µl T3-RNA-Polymerase

ad 20 µl DEPC-H₂O

Die *in vitro* Transkription wurde durch die Zugabe von Cap-Scribe Puffer und T3 RNA-Polymerase initiiert. Der Cap-Scribe Puffer enthält optimierte Konzentrationen der Ribonukleosid-Triphosphaten und des Cap-Nukleotids [P¹-5`-(7-Methyl)-Guanosin-P³-5`-Guanosin-triphosphat, m⁷G(5`)pppG], die eine effiziente Produktion von „capped“ mRNA garantieren. Der Ansatz wurde anschließend einem DNase-Verdau unterzogen. Es wurde 1 U DNase (RNasefrei) pro µg DNA-Template eingesetzt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde darauf gefällt, mit Ethanol gewaschen und in 25 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Der komplette Ansatz wurde dann für die Polyadenylierung eingesetzt.

2.4.3 Polyadenylierung IVT-RNA

Es wurde eine 3`-Polyadenylierung der *in vitro* transkribierten RNA durchgeführt, um deren Stabilität zu erhöhen. Für die Polyadenylierung wurde folgender Ansatz gewählt (nach Protokoll des Herstellers USB der Hefe Poly(A) Polymerase):

25 µl IVT-RNA (~ 10 µg)

15 µl Poly(A) Polymerase Reaktionspuffer (5x)

7,5 µl rATP

1 µl Poly(A) Polymerase (5x10⁵ U/ml)

ad 75 µl DEPC-H₂O

Der Ansatz wurde 20 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mit Phenol-Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und in 20 µl DEPC-H₂O aufgenommen.

Die Qualität der „gecappten“, polyadenylierten RNA wurde im Agarosegel überprüft, und die Konzentration mit Hilfe des Spektrometers bestimmt.

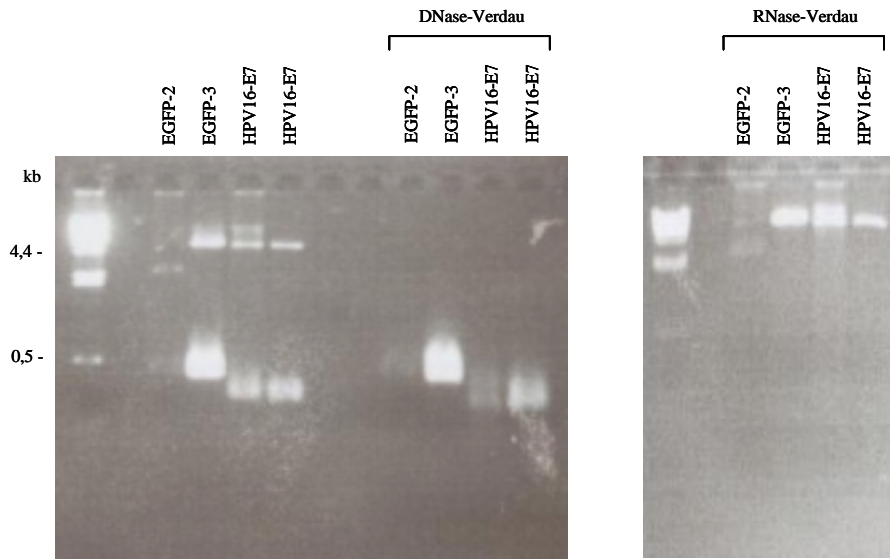


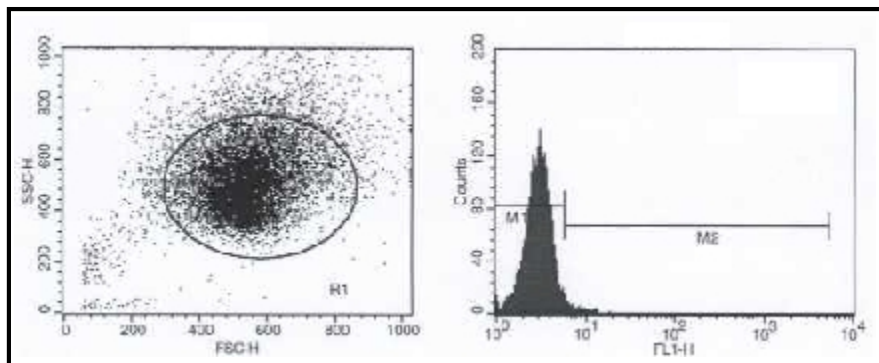
Abb. 2.1: EGFP-RNA (Klon 2 und 3) und HPV16-E7-RNA (Mini- und Maxi-Präparation) nach IVT, nach IVT und anschließendem DNase-Verdau bzw. RNase-Verdau im Agarosegel.

2.4.4 Funktionelle Analyse der IVT-EGFP-RNA

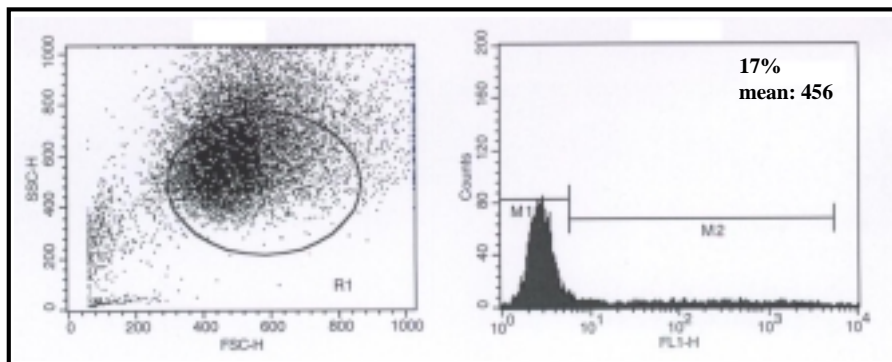
Um die Funktionalität der *in vitro* transkribierten RNA zu überprüfen, wurde EGFP-RNA als Reporter in HeLa-Zellen transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 Stunden mittels Durchflußzytometrie bestimmt. Als Transfektionskontrolle wurde parallel eine DNA-Transfektion mit dem Plasmid pEGFP-CMV durchgeführt. Für die Transfektion wurde in beiden Fällen das kationischen Lipid DOTAP verwendet.

Die Ergebnisse sind in Abb. 2.2 dargestellt. Die HeLa-Zellen zeigen im Dotplot nach Transfektion sowohl mit DNA als auch mit RNA eine Verschiebung nach oben, d.h. die Zellen weisen eine stärkere Granularität auf. Im Vergleich zur RNA-Transfektionseffizienz, die bei 47% liegt, ist die DNA-Transfektionseffizienz mit 17% wesentlich geringer. Dafür ist die Mean-Fluoreszenz der positiven Zellen der DNA-Transfektion deutlich höher im Vergleich zur RNA-Transfektion (456 im Vergleich zu 127). Das erklärt sich dadurch, daß die EGFP-DNA in den Zellen transkribiert wird, so daß mehr EGFP-RNA bzw. -Protein generiert wird. Die Ergebnisse zeigen, dass die *in vitro* transkribierte EGFP-RNA funktionell aktiv ist.

A.



B.



C.

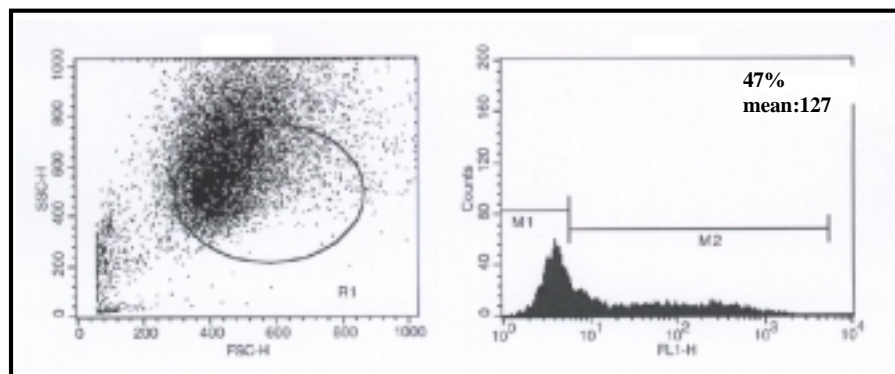


Abb. 2.2: Durchflußzytometrische Analysen von EGFP-transfizierten HeLa-Zellen. Nach Mock-Transfektion (A), nach EGFP-DNA Transfektion (B) und nach Transfektion mit IVT-EGFP-RNA (C) zur Funktionalitätsüberprüfung der *in vitro* transkribierten EGFP-RNA. Rechts sind die Dot-Blots dargestellt, die die Größe und Granularität der HeLa-Zellen aufweisen, links die Histogramme mit den Fluoreszenzintensitäten. Die Zahl positiver Zellen (%) und der Meanwert der Fluoreszenz sind für die eingegrenzte Population angegeben.

2.4.5 Präzipitation von RNA

Die RNA wurde mit 2/3 Volumen 6 M NH_4OAc und 5 Volumen Ethanol versehen und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 13000 U/min bei 10°C . Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit vorgekühltem 70% Ethanol (100 μl) gewaschen (Zentrifugation 5 min, 13000 U/min, 10°C). Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet in DEPC- H_2O aufgenommen.

2.4.6 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration wurde entweder im Agarosegel abgeschätzt oder durch Absorptionsmessung im Spektralphotometer bestimmt. Zur Berechnung der RNA-Konzentration gilt bei einer Wellenlänge von 260 nm folgende Beziehung:

1 OD_{260} entspricht 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA

2.5 Proteinexpression in BL 21 DE3-Bakterien

2.5.1 Expressionssystem

Das hier verwendete pET Expressionssystem von Novagen erlaubt eine kontrollier- und induzierbare Proteinexpression mit gleichzeitig geringer Basalexpression des rekombinanten Proteins und wurde für die Expression der Proteine HPV16-E7, HPV18-E7 und C4.8 verwendet. Der zu exprimierende offene Leserahmen des rekombinanten Proteins und das Gen für die T7 Polymerase stehen unter Kontrolle des lac-Operators, an den der im bakteriellen Chromosom und im Expressionsplasmid kodierte lac-Repressor (lac I) im nicht-induzierten Zustand bindet. Nach Induktion mit IPTG löst sich der lac-Repressor vom lac-Operator, die T7-Polymerase wird exprimiert, bindet an den T7-Promotor des Expressionsplasmids und startet die Transkription.

2.5.2 Proteinexpression im analytischen Maßstab

Die transformierten Bakterien wurden zunächst auf Proteinexpression im analytischen Maßstab untersucht. Dafür wurde eine 5 ml Übernachtskultur der zu untersuchenden, transformierten Bakterien hergestellt. 10 ml LB-Medium mit Kanamycin wurden mit 500 μl dieser ÜN-Kulturen angeimpft und in einem 50 ml-Gefäß bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert bis die optische Dichte der Expressionskultur OD_{600} : 0,6-0,9 betrug. 2 ml der Kultur wurden als Nullwert entnommen, und die restlichen 8 ml mit IPTG induziert (Endkonzentration 1 mM). Die Kultur wurde für weitere 3 Stunden inkubiert. Anschließend wurde ein 3-Stundenwert (2 ml) entnommen. Die Kontrollen dienten dem Vergleich des

Gesamt-Proteingehaltes der Bakterien vor und nach Induktion. Der Rest der Kultur wurde verworfen.

2.5.3 Proteinexpression im präparativen Maßstab

Die Expression im präparativen Maßstab dient der Anzucht einer größeren Menge an Bakterien, die genügend Protein für eine anschließende Aufreinigung synthetisieren.

Es wurde eine 10 ml Übernachtskultur von einem bereits auf Proteinexpression untersuchten Klon angelegt. Diese wurde benutzt, um vier 200 ml Flüssigkulturen im Maßstab 1:100 anzupfen. Die Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln inkubiert bis sie eine optische Dichte OD_{600} von ca. 0,6 erreicht hatten (3-4 Stunden). Nach IPTG-Induktion (Endkonzentration 1 mM) erfolgte eine weitere Inkubation für 3 Stunden. Vor und nach Induktion wurden wieder 2 ml der Kulturen als Kontrollen entnommen. Die restliche Kulturen wurden gemischt und 10 min bei 5000 U/min und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.5.4 Aufarbeitung und Analyse der Induktionskontrollen

Die von den Expressionskulturen entnommenen Kontrollen wurden durch 1-minütiges Zentrifugieren bei 8000 U/min pelletiert und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl pH8,0; 1 mM EDTA) resuspendiert. Es erfolgte unter Schütteln eine 5-minütige Inkubation bei 90°C. Danach wurden die Ansätze mit 20 µl SDS-Ladepuffer (s. Abschnitt 2.6.1) versehen, erneut für 5 min bei 90°C erhitzt und abschließend im SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

2.6 Analyse und Nachweis von Proteinen

2.6.1 Auftrennung von Proteinen im SDS-Polyacrylamidgel

- Acrylamidlösung 30%(w/v) 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid
- 4x Tris-HCl/SDS-Puffer pH6,8: 0,5 M Tris-HCl pH6,8 in H₂O, filtriert, 0,4% SDS
- 4x Tris-HCl/SDS-Puffer pH8,8: 3 M Tris-HCl pH8,8 in H₂O, filtriert, 0,4% SDS
- APS (Ammoniumpersulfat): 10%(w/v) in H₂O
- 6x SDS-Ladepuffer: 7 ml 4x Tris-HCl/SDS, 3ml Glycerin (87%), 1g SDS, 0,93g Dithiothreitol (DTT), 1,2 mg Bromphenolblau
- SDS-Gelelektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin pH8,3, 0,1% SDS in H₂O
- Bio Rad low range molecular weight standard (BioRad)

Durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wurden Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Es wurde ein diskontinuierliches

Verfahren nach Laemmli eingesetzt. Hierbei besteht das Gel aus einem Sammelgel geringerer Acrylamid-Konzentration und pH-Sprung und dem eigentlichen Trenngel, wodurch die Trennschärfe erhöht wird. Die zu exprimierenden Proteine (E7-HPV16, E7-HPV18, C4.8) besitzen ein relativ niedriges Molekulargewicht zwischen 15-30 kDa. Deswegen wurden in dieser Arbeit Gele mit einer Konzentration von 15% Acrylamid im Trenngel gewählt. Die Zusammensetzung eines solchen Geles sah folgendermaßen aus:

	Trenngel (5 ml)	Sammelgel (2 ml)
Wasser	1,2 ml	1,22 ml
4x Tris-HCl pH6,8	-	500 µl
4x Tris-HCl pH8,8	1,3 ml	-
Acrylamid-Mix	2,5 ml	260 µl
10%(w/v) APS	50 µl	20 µl
TEMED	5 µl	2 µl

Tab. 2.3: Zusammensetzung eines 15% SDS-Polyacrylamidgels

Das Trenngel wurde der Reihe nach zusammen pipettiert, kurz gemischt und in die Gelapparatur gegossen (mit ausreichend Platz nach oben für das Sammelgel und den Kamm). Nach Überschichtung mit Isopropanol polymerisierte das Gel ca. 15-20 min aus. Das Isopropanol wurde abgekippt und mit H₂O nachgespült. Anschließend wurde das Sammelgel gegossen und der Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt. Nach Auspolymerisierung des Sammelgels wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer eingesetzt, der Kamm gezogen und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Die Protein-Proben wurden mit 6x SDS-Ladepuffer versehen und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte 45-60 min bei 30-40 mA bis die Lauffront des Bromphenolblaus das Ende des Gels erreicht hatte. Danach wurde das Gel entweder gefärbt oder geblottet.

2.6.2 Färben von SDS-Polyacrylamidgelen mit Coomassie-Blau

- Coomassie-Färbelösung: 50%(v/v) Methanol, 10%(v/v) Eisessig, 0,02%(w/v) Coomassie Brilliantblau in H₂O
- Entfärbelösung: 10%(v/v) Methanol, 7%(v/v) Eisessig in deion. H₂O

Mit Hilfe des Farbstoffes Coomassie-brilliantblue G250 lassen sich Proteine (bis zu 1 µg Protein/Bande) im SDS-Polyacrylamidgel anfärben. Dafür wurden die Gele zunächst für 30 min in einem Coomassie-Färbegrad geschwenkt und anschließend in ein Entfärbegrad überführt. Die entfärbten Gele wurden zu Dokumentationszwecken eingescannt.

2.6.3 Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

- Essigsäure 10% (v/v)
- Silver Stain Plus Kit (Bio Rad)
 - Fixative Enhancer Solution (Fixierlösung)
 - Silver Komplex Solution (Färbelösung A)
 - Reduction Moderator Solution (Färbelösung B)
 - Image Development Reagent (Färbelösung C)
 - Development Accelerator Solution (Färbelösung D)

Die Nachweisgrenze der Silberfärbung beträgt 2 ng Protein je Bande. Silberionen werden durch die negativ geladenen Aminosäuren der im Gel aufgetrennten Proteine reduziert. Der eigentlichen Färbung geht die Fixierung voraus. Dazu wurde das Gel 30 min in Fixierlösung geschwenkt. In dieser Zeit bereitet man die Färbelösung bestehend aus 35 ml H₂O, je 5 ml Färbelösung A-C und 50 ml Färbelösung D vor. Diese Lösung ist innerhalb 5 min nach dem Ansetzen zu verwenden. Das Gel wurde aus der Fixierlösung entnommen und bis zum Erreichen der gewünschten Farbintensität in der Färbelösung inkubiert. Die Färbung wurde durch 15-minütige Inkubation des Gels in 10% Essigsäure abgestoppt.

2.6.4 Western-Blot

- Anodenpuffer I: 300 mM Tris; 20%(v/v) Methanol in H₂O
- Anodenpuffer II: 25 mM Tris; 20%(v/v) Methanol in H₂O
- Kathodenpuffer: 25 mM Tris; 20%(v/v) Methanol; 40 mM Amino-N-Caprinsäure in H₂O
- Milchpulverlösung: 5%(w/v) Milchpulver in PBS; Spatelspitze Na-Azid
- PBS: 130 mM NaCl; 10 mM Natriumphosphat in H₂O
- PBS/Triton: 0,5%(v/v) Triton in PBS; Spatelspitze Na-Azid
- AK-Lösungen: 0,5%(w/v) Milchpulver; 0,5%(v/v) Triton in PBS
- Natrium-Glycinlösung: 50 mM, pH9,6 in H₂O

Mit Hilfe des Western-Blots im Semi-Dry-Verfahren wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf eine Nylonmembran übertragen und mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen. Dafür wurden zunächst 6 Stücke Whatmanpapiere (WP) und die Nylonmembran in entsprechender Größe zurechtgeschnitten (für Minigele: 8,5x5,8 cm). Die Membran wurde für eine min in Methanol geschwenkt, mit H₂O benetzt und 5 min mit 1x WP in Anodenpuffer II inkubiert. Das Trenngel und 3x WP wurden in Kathodenpuffer gelegt, und 2x WP in Anodenpuffer I. Anschließend erfolgte der luftblasenfreie Blotaufbau in folgender Reihenfolge (von unten nach oben):

2x WP aus Anodenpuffer I
1x WP aus Anodenpuffer II
Membran
Trenngel
3x WP aus Kathodenpuffer

Das Blotten erfolgte 30 min bei einer Stromstärke von 140 mA.

Im Anschluß wurde die Membran ÜN in Milchpulver bei 4°C geblockt. Am nächsten Tag wurde die Membran kurz in 1x PBS gespült und 3x in PBS+Triton für jeweils 5 min gewaschen. Danach erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit dem S-Protein, an das eine alkalische Phosphatase gekoppelt war. Das S-Protein wurde 1:5000 in AK-Lösung verdünnt. Dabei bindet das S-Protein an das S-tag der rekombinanten Proteine. Die Membran wurde mit PBS gespült, 3x 5 min mit PBS+Triton gewaschen und für 30-60 min mit Na-Glycin pH9,6 äquilibriert. Nach Abgießen der Lösung wurde das Farbreagenz BCIP/NBT zugesetzt, das bei Vorhandensein der alkalischen Phosphatase umgesetzt wurde, so daß man blaue Banden erhielt. Die Farbreaktion wurde mit Wasser gestoppt. Die Membran wurde luftgetrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt bzw. eingescannt.

Für den Nachweis des E7-Proteins von HPV16 im Western-Blot wurde ein monoklonaler α -E7-Antikörper (Triton Diagnostics, Alameda, USA) verwendet, der 1:5000 eingesetzt wurde. Der Nachweis erfolgte mit Hilfe eines Zweitantikörpers Ziege- α -Maus (1:2000 verdünnt in AK-Lösung). Die Inkubationen erfolgten jeweils für 2 Stunden bei 4°C, wobei dazwischen ein weiterer Waschschrift durchgeführt wurde.

2.6.5 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

- Bradfordlösung: 1:5 in H₂O verdünnt, filtriert, Lagerung 4°C
- Lysozym: 2 mg/ml als Referenzprotein; Lagerung -20°C oder frisch ansetzen

Diese Methode ist geeignet, schnelle Bestimmungen von Proteinkonzentrationen zwischen 10 und 100 μ g/ml durchzuführen. Der Farbstoff Coomassie Blue bildet dabei mit den Proteinen einen Komplex, der innerhalb von 2 min entsteht und für mindestens eine Stunde stabil bleibt. Diese Komplexbildung verschiebt das Absorptionsmaximum von Coomassie Blue von 465 nm auf 595 nm. Der Anstieg der Absorption auf 595 nm kann photometrisch ermittelt werden. In einer 96-Lochplatte wurden in die Löcher der ersten Reihe 190 μ l H₂O vorgelegt, in alle anderen 100 μ l. 10 μ l der Eichproteinlösung bzw. der zu messenden Proben wurden in die Löcher der ersten Reihen dazupipettiert. Von den Gemischen wurden mit einer Multikanalpipette 100 μ l entnommen und in die zweite Reihe gegeben. So wurde

fortgefahren, um jeweils eine 1:2 Verdünnung zu erhalten. Nach Zugabe von 100 μ l Bradfordlösung in jedes Loch wurden die Proben nach 2 min im ELISA-Reader gemessen. Aus den gemessenen Eichwerten wurde eine Eichgerade erstellt, aus der der Proteingehalt der Proben direkt ermittelt werden konnte.

2.7 Reinigung von Proteinen

Die Isolation und Aufreinigung der exprimierten Proteine wurde in zwei Reinigungsstufen durchgeführt. Im ersten Schritt wurde das Protein mit Hilfe der carboxyterminal angefügten Hexahistidinsequenz (His-tag) über eine Nickel-Agarose-Säule affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die dabei erhaltenen Fraktionen wurden vereinigt und gegebenenfalls einem Thrombin-Verdau unterzogen, um das S-tag zu entfernen. Die Proteine wurde dann für den zweiten Reinigungsschritt, eine denaturierende Gelelektrophorese, eingesetzt.

2.7.1 Affinitätschromatographische Reinigung

Nickel-NTA-Matrix (NTA-Nitrilotriacetic acid) hat eine hohe Affinität zu Proteinen, die 6 konsekutive Histidinreste (His-tag) enthalten. Die Wechselwirkung wurde zur Reinigung der rekombinant exprimierten Proteinen genutzt. Dabei können die rekombinanten Proteine selektiv an eine Ni-NTA-Matrix binden und anschließend über einen pH-Stufengradienten eluiert werden.

Aufarbeiten der Bakterien für die Reinigung

Eine hohe Expression des rekombinanten Proteins kann in den Expressionsbakterien zur Bildung unlöslicher Aggregate führen, die in E.coli auch „inclusion bodies“ genannt werden. Um diese Aggregate zu lösen und somit eine Reinigung über die Säule zu ermöglichen, wurden die Bakterien über Nacht in einem stark denaturierenden Puffer aufgeschlossen.

Das nach Proteinexpression bei -80°C eingefrorene bakterielle Pellet einer 800 ml Expressionskultur wurde in 20 ml Puffer A (s. unten) resuspendiert, mit 10 mM β -Mercaptoethanol versehen und über Nacht unter leichtem Rühren bei 4°C aufgeschlossen. Die unlöslichen Bestandteile wurden am nächsten Tag durch Zentrifugation (Ultrazentrifuge/Rotor SW28; 14000 U/min; 30 min, 4°C) abgetrennt, und der Überstand für die Aufreinigung eingesetzt.

Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

- Puffer A: 6 M Guanidin-HCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl pH8,0
- Puffer B: 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, mit NaOH auf pH8,0
- Puffer C: 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, mit HCl auf pH6,3
- Puffer D: 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, mit HCl auf pH5,9
- Puffer E: 8 M Harnstoff, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, mit HCl auf pH4,5
- Puffer F: 6 M Guanidin-HCl, mit Essigsäure auf pH2,5
- 30% Ethanol
- H₂O

Alle Lösungen wurden sterilfiltriert und entgast (10 min Vakuumpumpe bis keine Sauerstoffbläschen mehr auftraten).

Es wurde die MPLC-(„Medium Pressure Liquid Chromatography“) Anlage „Econo System“ von BioRad für die Reinigung der rekombinanten Proteine verwendet. Diese Anlage besteht aus einem Steuergerät mit Peristaltik-Pumpe, Spektralphotometer, Fraktionssammler, Säule und einem angeschlossenen Schreiber, der permanent die optische Dichte bei 280 nm dokumentiert.

Zu Beginn wurde aus dem gesamten System die Luft entfernt, und die mit Nickel-Agarose (10 ml in 30% Ethanol) gefüllte Säule angebracht. Das Säulenmaterial wurde mit 2 Vol H₂O gespült und anschließend mit Puffer A äquilibriert bis eine Leitfähigkeit von 300 mS erreicht wurde. Nach Erreichen einer einheitlichen Basislinie wurde der Spektralphotometer gegen den Puffer abgeglichen und die Probe mit einer Flußrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Anschließend folgten Waschschrte mit Puffer B, C und D, wobei immer vor Auftrag des nächsten Puffers die Einstellung der Basislinie abgewartet wurde. Diese Waschschrte dienten dem Herunterwaschen von mit niedriger Affinität an die Säule gebundenen bakteriellen Proteinen. Danach erfolgte die Elution des rekombinanten Proteins mit Puffer E, wobei der Durchfluß in Fraktionen (ca. 500 µl) gesammelt wurde. Im Anschluß wurde die Säule noch mit Puffer F gewaschen, um noch an die Säule gebundene Proteine zu entfernen, und mit H₂O nachgespült. Zur Lagerung wurde am Ende wieder eine 30% Ethanollösung auf die Säule gegeben.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgelen und im Western Blot analysiert.

Regeneration des Ni-NTA Säulenmaterials

Für ein rekombinantes Protein wurde wiederholt dasselbe Säulenmaterial verwendet. Nach 2-3 Aufreinigungen verfärbt sich das Säulenmaterial aufgrund des Verlustes an Ni-Ionen von hellblau zu gelbbraun. In diesem Fall wurde eine Regeneration des Säulenmaterials durchgeführt. Dafür wurde das Säulenmaterial mit folgenden Lösungen in dieser Reihenfolge gewaschen (Flußrate max. 1 ml/min):

1. Waschen mit 2 Säulenvolumen Puffer A
2. Waschen mit 5 Säulenvolumen H₂O
3. Waschen mit 1 Säulenvolumen 30% EtOH
4. Waschen mit 1 Säulenvolumen 50% EtOH
5. Waschen mit 1 Säulenvolumen 75% EtOH
6. Waschen mit 5 Säulenvolumen 100% EtOH
7. Waschen mit 1 Säulenvolumen 75% EtOH
8. Waschen mit 1 Säulenvolumen 50% EtOH
9. Waschen mit 1 Säulenvolumen 30% EtOH
10. Waschen mit 1 Säulenvolumen H₂O
11. Waschen mit 5 Säulenvolumen EDTA, 100 mM pH 8,0
12. Waschen mit 5 Volumen H₂O
13. Beladen der Säule mit 2 Volumen NiSO₄, 100 mM
14. Waschen mit 2 Säulenvolumen H₂O

Zur Lagerung wurde eine 30% Ethanollösung auf die Oberfläche der Säule gegeben.

2.7.2 Thrombin-Verdau

Um eine S-peptid-spezifische Induktion von T-Lymphozyten zu verhindern, wurde auch rekombinantes Protein ohne S-tag generiert. Das rekombinante Protein enthält „downstream“ des S-tags eine Thrombinschnittstelle in der Proteinsequenz zum Entfernen des S-tags.

Die Protein-Fractionen wurden nach affinitätschromatographischer Aufreinigung zunächst mit Hilfe von Mikrokonzentratoren (s. Abschnitt 2.7.4) eingeeengt und in Thrombin-Spaltungspuffer (20 mM Tris-HCl pH8,4; 150 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) umgepuffert (s. Abschnitt 2.7.4). Anschließend wurde eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

Nach Optimierung des Thrombin-Verdaus galten folgende Bedingungen:

Das rekombinante Protein wurde mit 18 U Thrombin pro mg Protein für 16 Stunden bei 30°C inkubiert. Der Verdau wurde anschließend im SDS-Polyacrylamidgel überprüft.

2.7.3 Reinigung durch Gelelektrophorese

- Acrylamidlösung 30%(w/v) 29:1 Acrylamid:Bisacrylamid
- 4x Tris-HCl/SDS-Puffer pH6,8: 0,5 M Tris-HCl pH6,8 in deion. H₂O, filtriert, 0,4% SDS
- 4x Tris-HCl/SDS-Puffer pH8,8: 3 M Tris-HCl pH8,8 in deion. H₂O, filtriert, 0,4% SDS
- APS (Ammoniumpersulfat): 10%(w/v) in H₂O
- 6x SDS-Ladepuffer: 7 ml 4x Tris-HCl/SDS, 3ml Glycerin (87%), 1g SDS, 0,93g Dithiothreitol (DTT), 1,2 mg Bromphenolblau)
- SDS-Gelelektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 250 mM Glycin pH8,3, 0,1% w/v) SDS in H₂O

Als weitere Reinigungsstufe wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurde eine sogenannte Mini Prep Cell der Firma BioRad eingesetzt. Bei der Mini Prep Cell handelt es sich um ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Elektrophoresesystem mit kontinuierlicher Elution der Proteine am Ende des Gels. Das Gel (15% SDS-Polyacrylamidgel) befindet sich in einem Glasröhrchen im Inneren der Apparatur. Die Probe wurde mit der entsprechenden Menge 6x SDS-Gelladepuffer versetzt und auf die obere Fläche des Gels aufgetragen. Das maximale auftragbare Volumen beträgt 800 µl.

Der Gellauf dauerte in der Regel 15 Stunden bei 5 mA. Von den gesammelten Fraktionen wurden je 10 µl auf einem Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel analysiert.

Positive Fraktionen, die eine individuelle Bande im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel zeigten, wurden vereinigt, eingengt und in HEPES-Puffer mit Hilfe von Mikrokonzentratoren (s. Abschnitt 2.7.4) umgepuffert. Die Proteinlösungen wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

2.7.4 Konzentrierung von Proteinen

Die rekombinanten Proteine wurden mit Hilfe von Centricon Mikrokonzentrationseinheiten (Amicon) eingengt und umgepuffert. Dabei wurde die Probe auf eine Ultrafiltrationseinheit gegeben, die sich in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß befand. Am unteren Ende dieser Ultrafiltrationseinheit befand sich eine niedrig absorbierende Membran, welche Moleküle < 3 kDa bzw. < 10 kDa (je nach verwendeten Amicon-Röhrchen, abhängig vom Molekulargewicht der Proteine) und das Lösungsmittel passieren läßt, größere Moleküle jedoch zurückhält, was zu einer Konzentrierung der Proteine führt. Eine Filtrationseinheit wurde mit 300 µl Proteinlösung beladen und mindestens 15 min bei 11000x g und RT zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und die Prozedur so lange wiederholt bis die komplette Proteinlösung aufgetragen war. In der Regel wurden 4 Filtrationseinheiten parallel verwendet.

In der Filtrationseinheit bleibt immer ein Restvolumen zurück, so daß die Vorrichtung nicht trocken läuft. Durch Aufnahme des Restvolumens in einen anderen Puffer (Thrombin-Spaltungspuffer, HEPES-Puffer) und Wiederholung der Prozedur kann die Proteinlösung umgepuffert werden. Zum Schluß wurde die konzentrierte Proteinlösung durch Zentrifugation (3 min, 1000x g, RT) der umgedrehten Ultrafiltrationseinheit in einem neue Reaktionsgefäß zurückgewonnen. Die Proteinkonzentrierung wurde im SDS-Polyacrylamidgel überprüft und eine Konzentrationbestimmung durchgeführt.

2.8 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Für die Kultivierung wurden Plastikpipetten verwendet, um eine Aktivierung von T-Zellen durch Verunreinigungen an Glaspipetten wie beispielsweise Pyrogenen zu verhindern.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde die DZ-, T-Zell- und B-LCL-Kultur in RPMI + 10% FCS durchgeführt. Die DZ wurden nach 6 Tagen Kultur mit LPS ausdifferenziert, mit Peptiden (E7₁₁₋₂₀, IMP₅₈₋₆₆) beladen, 2x mit 30 Grey bestrahlt und zur T-Zellstimulation eingesetzt.

Nach 5 Restimulationen (ab dritter Restimulation wurden autologe B-LCL verwendet) wurden die T-Zellsublinien im Zytotoxizitätstest auf ihre peptidspezifische Zytolyse untersucht. Als Zielzellen wurden autologe B-LCL verwendet, die mit Peptid bzw. ohne Peptid eingesetzt wurden. Dabei zeigte sich neben einer peptidspezifischen Induktion auch eine spezifische Lyse gegen unbeladene B-LCL in mehreren Sublinien. Das läßt auf eine mögliche FCS- oder EBV-spezifische T-Zellinduktion schließen. Um die Spezifität in den Versuchen zu erhöhen, wurde die gesamte Zellkultur mit Ausnahme der HeLa-Zellen auf FCS-freie Kulturbedingungen umgestellt. Die Medien wurden statt FCS mit der entsprechenden Konzentration an gepoolten AB-Plasma supplementiert, um eine unspezifische T-Zellaktivierung durch FCS zu verhindern. Das FCS und das AB-Plasma wurden vor der Verwendung für die Zellkultur für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert, um das Komplementsystem auszuschalten.

2.8.1 Kultivierung permanenter Zelllinien

Die adhären wachsenden HeLa-Zellen wurden in DMEM-Medium + 10% FCS + 1% P/S (100 U/ml; 100 µg/ml) kultiviert. Zur Zellernte und für Medienwechsel wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin/EDTA (0,05%) gelöst. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen 1:3 subkultiviert (in der Regel alle 3-4 Tage).

Die Suspensionszellen K562, T2-Zellen sowie B-LCL wurden in RPMI-Medium +10% AB-Plasma +1% P/S kultiviert und alle 3-4 Tage 1:4 gesplittet. Dabei wurde Dreiviertel des Zellkulturmediums verworfen und durch frisches Medium ersetzt.

2.8.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

- 2x Einfriermedium (60% Medium, 20% Human-Albumin, 20% DMSO, 40 U/ml Liquemin)

Zum Einfrieren der Zellen wurden 10^5 bis maximal 5×10^7 Zellen (je nach Zelltyp: DZ 10^5 - 10^6 , PBL bis maximal 5×10^7 Zellen) in einem Kryoröhrchen in 1 ml Medium aufgenommen und tropfenweise 1 ml Einfriermedium zugegeben. Die Kryoröhrchen wurden zunächst 10 min auf Eis vorgekühlt, danach in einen -80°C -Tiefkühlschrank überführt und am nächsten Tag in Flüssigstickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Flüssigstickstoff schnell in einem 37°C -Wasserbad aufgetaut und mit 10 ml Medium verdünnt. Die Zellen wurden anschließend abzentrifugiert, und das Zellpellet in Kulturmedium aufgenommen.

2.8.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer.

Hierfür wurden 20 μl einer Zellsuspension mit Trypanblau 1:2 verdünnt und in eine Neubauer Zählkammer transferiert. Die lebenden Zellen wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Zellzahl zweier Quadranten wurde mit dem Faktor 10^4 multipliziert, um die Gesamtzellzahl pro ml zu bestimmen.

2.9 Gewinnung von Lymphozyten

Für die Isolation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) wurden Buffy coats und Vollblut verwendet. Buffy coats sind aufkonzentrierte, zelluläre Bestandteile des Blutes von gesunden Donoren. 90 ml entsprechen einem Äquivalent von 450 ml Vollblut einer Blutspende. Durch Zusatz von Citrat wird die Gerinnung des Blutes verhindert. Die Buffy coats wurden von den Blutbanken Jena und Suhl bezogen. Aus datenschutzrechtlichen Gründen wurde uns das Geschlecht und Alter der jeweiligen Donoren nicht mitgeteilt. Das Vollblut (50-100 ml) stammte von gesunden Labormitarbeitern als freiwillige Spende.

2.9.1 Isolation von peripheren Blutlymphozyten (PBL) aus Vollblut und Buffy coats

Das Blut wurde auf vier 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Nach Verdünnung mit PBS (1:2) wurde das Blut mit 11 ml Ficoll-Paque unterschichtet, 25 min bei 2100 U/min und RT zentrifugiert und ohne Bremse auslaufen gelassen. Dadurch werden die zellulären Blutbestandteile nach dem Prinzip der Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt. Die Erythrozyten sedimentieren vollständig. Unmittelbar über dem Pellet befinden sich die Granulozyten, welche die Ficoll-Paque-Schicht passieren können. Wegen ihrer niedrigen Dichte verbleiben die Lymphozyten zusammen mit Blutplättchen und Monozyten in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll-Paque. Der Überstand aus Plasma und PBS wurde abgesaugt und die Interphasen in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden dreimal mit 10 ml RPMI gewaschen (Zentrifugation: 12 min, 1800 U/min, RT) und entweder eingefroren oder direkt für weitere Experimente verwendet.

Zur Isolierung von PBL aus Vollblut wurden Leucosep-Röhrchen (50 ml) verwendet.

15 ml Ficoll-Paque wurden durch Zentrifugation (2 min, 2600 U/min, RT) unter den in den Röhrchen befindlichen Filter geschichtet. Dann wurden 15-30 ml Blut auf den Filter gegeben und die Röhrchen 10 min bei 2800 U/min, RT zentrifugiert. Die Erythrozyten können den Filter passieren und sedimentieren am Boden des Röhrchens. Oberhalb des Filters zwischen Ficoll-Paque und Plasma befindet sich ein Ring aus Lymphozyten, Blutplättchen und Monozyten, der gesammelt wurde. Es schloß sich eine dreimalige Waschung der PBL mit 10 ml RPMI an.

Für viele Experimente war es von Bedeutung, ob die isolierten PBL das HLA-A2-Allel exprimieren. Deshalb wurde vor der Aufreinigung ein Aliquot des Blutes in ein Cluster Tube Individual (1,2 ml) überführt und wie in Abschnitt 2.12 beschrieben, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern indirekt gegen HLA-A2 gefärbt. Nach Färbung mit dem Erstantikörper wurde bei der 2. Waschung statt PBA der ACK-Puffer (0,15 M NH_4Cl ; 1 mM KHCO_3 ; 0,1 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, pH7,2-7,4; sterilfiltriert) verwendet, um die enthaltenen Erythrozyten zu lysieren. Die gefärbten Zellen wurden anschließend im FACS auf HLA-A2-Positivität analysiert. PBL und alle daraus generierten Zellen wurden gegebenenfalls wie in Abschnitt 2.8.2 beschrieben zur längeren Lagerung kryokonserviert.

2.9.2 Isolation von T-Zellen aus PBL durch Schafserythrozytenrosettierung

Zur T-Zellisolation wurde entweder die gesamte PBL-Fraktion aus der Buffy coat-Aufarbeitung verwendet, oder die Monozyten wurden zuvor durch Adhäsion auf Plastik abgetrennt und nur die nicht-adhärenenten PBL genutzt (s. Abschnitt 2.10).

2 ml Schafserythrozyten wurden zunächst dreimal vorsichtig in 10 ml RPMI gewaschen (Zentrifugation: 10 min bei 1500 U/min, 4 °C) und anschließend in 40 ml RPMI aufgenommen, so daß sich eine Erythrozytenkonzentration von 5%(w/v) ergab.

Währenddessen wurden die PBL in 20 ml RPMI + 1% AB-Plasma resuspendiert und 30 µl der Erythrozytensuspension pro 1×10^6 PBL zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Zellen 5 min bei 600 U/min zentrifugiert und danach 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieser Zeit adhäreren die Schafserythrozyten an den CD2-Rezeptor der T-Zellen und bilden „Rosetten“. Danach wurde der Überstand auf 15 ml abgesaugt, die Zellen vorsichtig durch Schwenken resuspendiert und mit 11 ml Ficoll unterschichtet. Der Ansatz wurde 25 min bei 2100 U/min zentrifugiert und ohne Bremse auslaufen gelassen. Die Erythrozyten sedimentieren mit den gebundenen T-Zellen (ER⁺Fraktion), während sich die B-Zellen, Monozyten und Makrophagen (ER⁻Fraktion) in der Interphase zwischen Ficoll-Paque und Medium sammeln. Der Überstand wurde verworfen und die Interphase für die Generierung von B-LCL geerntet. Die Erythrozyten wurden im Restmedium resuspendiert und durch Zugabe von 2 ml ACK-Puffer lysiert. Dies erfolgte unter ständigem Schütteln des Röhrchens bis die trübe, hellrote Farbe der Suspension in ein klares Rubinrot umschlug (ca. 1-2 min). Die freigesetzten T-Zellen wurden dreimal mit 10 ml RPMI gewaschen (Zentrifugation: 5 min bei jeweils 1400, 1200, 1000 U/min, RT) und entweder eingefroren oder direkt für immunologische Experimente verwendet.

Die Reinheit der CD3⁺-Zellen lag nach FACS-Analyse > 95%.

2.9.3 Selektion von CD8⁺-Lymphozyten aus T-Zellkulturen mit Hilfe magnetischer „Dyna-beads“ (DB)

- Dynalbeads M-450 CD8
- Waschpuffer: RPMI-Medium + 2% FCS

Die CD4⁺- und CD8⁺T-Zellen der *in vitro* induzierten T-Zelllinien wurden getrennt voneinander auf ihre Spezifität untersucht. Aus diesem Grund wurde eine CD8⁺T-Zellselektion der Gesamt-T-Zellpopulation durchgeführt. Dafür wurden magnetische „Dyna-beads“ (DB) verwendet, an die ein monoklonaler Antikörper gegen das humane CD8-Molekül gekoppelt ist. Nach Inkubation der T-Zellen mit den DB ist es mit Hilfe einer Magnetvorrichtung möglich, die CD8⁺T-Zellen aus der Gesamtpopulation zu isolieren. Für die Selektion ist es notwendig, die Anzahl CD8⁺T-Zellen in der Population zu bestimmen, um die entsprechende Konzentration an DB (4 x DB pro Zielzelle) zu errechnen. Dies erfolgte mit Hilfe einer vorherigen FACS-Färbung und Analyse. Das entsprechende Volumen an DB

wurde zunächst zweimal in 1 ml Waschpuffer mit Hilfe eines Magneten gewaschen und anschließend in Waschpuffer entsprechend dem Ausgangsvolumen aufgenommen. In der Zwischenzeit wurden die T-Zellen in Waschpuffer aufgenommen ($500 \mu\text{l}$ bei 5×10^6 CD8^+ T-Zellen) und auf Eis vorgekühlt. Dann wurden die DB zu den Zellen gegeben, gut gemischt und für 30 min auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Isolierung der CD8^+ T-Zellen erfolgte mit Hilfe einer Magnetvorrichtung. Der Überstand mit den CD4^+ T-Zellen wurde entnommen, und nach Entfernen des Magneten wurden die DB in $500 \mu\text{l}$ Waschpuffer resuspendiert und erneut isoliert. Der Waschprozeß wurde 4 mal wiederholt. Die getrennten T-Zellpopulationen wurden am Ende gewaschen und in 50% konditioniertes Medium und 50% RPMI-Medium + 10% AB-Plasma aufgenommen und in eine 96-Lochplatte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die CD8^+ T-Zellen eingesammelt, die DB mit Hilfe des Magneten entfernt und erneut ausgesät. Die Zellen wurden innerhalb der nächsten 2-4 Tage analysiert. Die Reinheit dieser Selektion wurde mittels FACS-Analyse überprüft und lag bei 97%.

2.9.4 Generierung von B-Lymphoblastoiden Zelllinien (B-LCL)

- EBV-Überstand: Überstand der im Labor vorhandenen Zelllinie B95/8, sterilfiltriert
- Cyclosporin A in EtOH

Durch Infektion mit dem EBV-Virus können B-Zellen normaler Donoren immortalisiert werden. Diese B-lymphoblastoiden Zelllinien können als Stimulatoren in immunologischen Experimenten eingesetzt werden.

5×10^6 PBL oder B-Zellen wurden in 1 ml RPMI+ 10% AB-Plasma in einer Vertiefung einer 12-Loch-Platte ausgesät und mit 1 ml EBV-Überstand vermischt. Zur Unterdrückung des T-Zell-Wachstums wurde $500 \mu\text{g/ml}$ Cyclosporin A zugesetzt. Die Zellen wurden so lange kultiviert, bis sich Proliferationsherde EBV-infizierter B-Lymphozyten gebildet hatten. Verbrauchtes Medium wurde bei Bedarf durch frisches ersetzt und so lange Cyclosporin A zugesetzt, bis alle T-Zellen sicher abgestorben waren (mindestens 10 Tage). Die ausgewachsenen B-LCL wurden dann subpassagiert und in Zellkulturflaschen überführt. Die Zellen wurden expandiert und als permanente Zelllinie kultiviert.

2.9.5 Isolierung und Expansion von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) aus

Tumorgewebe

Die klinische Forschergruppe erhält für Forschungszwecke Tumorgewebe und Biopsien von Zervixkarzinompatientinnen. Für die Isolation von TIL wurde das Tumorgewebe zunächst in RPMI + anti-Biotic/Mycotic (200 U/ml) 3-5 x 5 min in einer Petrischale auf einem Schüttler

gewaschen. Anschließend wurde das Tumorgewebe mit einer sterilen Schere klein geschnitten (<2 mm Kantenlänge). Wenn das Material für einen Verdau nicht ausgereicht hatte, wurden die Gewebestückchen direkt in Kultur genommen (s. unten). Andernfalls folgte ein Enzymverdau des Gewebes. Dafür wurde das zerkleinerte Tumorgewebe in 10 ml RPMI + Hepes (10 mM) aufgenommen und folgende Enzyme zugesetzt: DNase I (50 µg/ml), Collagenase IV (1500 µg/ml), Hyaluronidase (30 µg/ml). Der Ansatz wurde in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt und für 4 Stunden auf einem Überkopf-Schüttler im 37°C-Raum langsam rotiert. Die unverdauten Gewebestücke wurden mit einem sterilen Sieb herausgefiltert und die übrige Zellsuspension über einen Ficoll-Dichtegradienten aufgereinigt (s. Abschnitt 2.9.1). Die Interphase mit der Tumor- und TIL-Suspension wurde geerntet und 2x gewaschen. Die Anzahl an Lymphozyten wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Eine Hälfte der Zellen wurde als unstimulierte TIL-Population direkt kryokonserviert. Die andere Hälfte wurde in AIM-V-Medium mit IL-2 und IL-7 (100 U/ml) in Kultur genommen.

Für eine Expansion der TIL wurden der Kultur anti-CD3/28-Dynalbeads (0,625 µl/ml Medium) zugegeben. Durch agonistische Antikörper auf den Dynalbeads erhalten die T-Zellen über den mit dem T-Zell-Rezeptor assoziierten CD3-Komplex und den Rezeptor für kostimulatorische Moleküle, CD28, unabhängig von der Spezifität ihres T-Zell-Rezeptors, ein Aktivierungssignal. Somit können alle in einer T-Zell-Kultur enthaltenen Spezifitäten in gleichem Maße expandiert werden. Medienwechsel und Zugabe frischer Interleukine erfolgte wöchentlich. Zwei Wochen vor der Analyse der TIL wurden die anti-CD3/28-Dynalbeads mit Hilfe eines Magneten entfernt.

2.9.6 *In vitro* Induktion von T-Lymphozyten

Zur Herstellung von spezifischen T-Zelllinien wurden immer Zellen von HLA-A2 positiven Donoren verwendet. Es wurden $1-2 \times 10^7$ ($1-2 \times 10^5$ /Vertiefung) T-Zellen in RPMI + 10% AB-Plasma in eine 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät. Die Stimulation erfolgte in der Regel mit 10^5-10^6 DZ, die mit HPV16-E7 Antigenen oder Kontrollantigenen (in Form von Peptiden, RNA, DNA oder Protein) zuvor beladen worden waren (s. Abschnitt 2.11). Die DZ wurden vor Zugabe zu den T-Zellen 2x mit 30 Grey bestrahlt, gewaschen und in 10 ml Medium aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 100 µl/Vertiefung für die Kokultur eingesetzt. Zusätzlich wurde die T-Zellkultur zu Beginn der Stimulation mit IL-2 und IL-7 (jeweils 1 U/ml) supplementiert. Die Kulturen wurden wöchentlich restimuliert. Dabei wurden 100 µl aus jeder Vertiefung abgesaugt und beladene DZ in einem Volumen von 100

μ l frischem Medium + IL-2 und IL-7 zugegeben. Ab der 2. Restimulation wurden die Interleukinkonzentrationen auf 10 U/ml erhöht. Es wurden 3-4 Restimulationen durchgeführt. Eine Woche vor der Analyse wurden die T-Zellkulturen nur mit frischem Medium und IL2 und IL-7 versehen. In den meisten Fällen wurde eine CD8⁺-Selektion mit Hilfe von magnetischen Dynalbeads durchgeführt, um die CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen getrennt voneinander auf ihre Spezifität untersuchen zu können. Die Spezifität der CD4⁺T-Zellen wurde im Proliferationstest, die Spezifität der CD8⁺T-Zellen im IFN- γ -ELISpot getestet.

2.10 Generierung und Reifung dendritischer Zellen aus PBL

Die DZ wurden aus Monozyten des Blutes nach einem modifizierten Protokoll von Romani et al. (1996) generiert. Dabei wird die Plastikadhäsion dendritischer Vorläuferzellen (Monozyten) ausgenutzt. 5×10^7 PBL wurden in 20 cm^2 Zellkulturschalen in 5 ml RPMI + 1% AB-Plasma ausgesät und für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 2-stündiger Plastikadhäsion wurden die nicht adhärenen Zellen durch vorsichtiges Schwenken gelöst und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 4-5 ml Medium an den Rand und erneutes vorsichtiges Schwenken 2 mal gewaschen. Die nicht adhärenen Zellen wurden entweder eingefroren oder für die T-Zellisolierung eingesetzt. Die adhärenen Zellen, bestehend aus dendritischen Vorläuferzellen, welche sich innerhalb von 24 Stunden wieder von der Plastikunterlage ablösen, und dauerhaft adhärenen Makrophagen sowie einem Rest von T-Zellen, B-Zellen und Blutplättchen, wurden mit 5 ml RPMI +1% AB-Plasma in Kultur genommen und mit IL-4 (1000 U/ml) und GM-CSF (1000 U/ml) supplementiert. GM-CSF unterstützt die Differenzierung der Monozyten in DZ, während IL-4 die Makrophagen-Entwicklung unterdrückt. Nach 3-4 Tagen erfolgte eine Zugabe von 2 ml frischen Medium und Interleukinen. Nach 6 Tagen wurden die unreifen DZ von den Platten gesammelt (mehrmaliges Abspülen der Platte mit Medium), gezählt und entweder kryokonserviert oder als Stimulatoren eingesetzt, d.h. gegebenenfalls mit Antigen beladen (s. Abschnitt 2.11) und terminal ausdifferenziert. Für die Ausdifferenzierung wurden 10^5 - 10^6 DZ in 1-2 ml RPMI + 1% AB-Plasma + IL-4 und GM-CSF aufgenommen, in ein 15 ml-Gefäß überführt und ein definierter Zytokincocktail bestehend aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF- α (10 ng/ml), PGE₂ (1 μ g/ml) nach Jonuleit et al. (1997) zugesetzt. Die Zellen wurden über Nacht ausdifferenziert, am nächsten Tag mit 60 Grey bestrahlt, 3 mal mit Medium gewaschen und für immunologische Experimente eingesetzt.

2.11 Antigen-Beladung von DZ

2.11.1 Beladung von DZ mit Peptiden

Für die Generierung von peptidspezifischen T-Zelllinien und als Stimulatoren für die Analyse wurden DZ mit HLA-A*0201 restringierten Peptiden oder den Peptidpools beladen. Dafür wurden die DZ über Nacht mit Hilfe des Zytokincocktails ausdifferenziert und parallel mit 10-20 µg /ml Peptid (abhängig von dem verwendeten Peptid) inkubiert. Anschließend wurde das überschüssige Peptid und der Zytokincocktail durch 3maliges Waschen der Zellen entfernt, die DZ bestrahlt und für die Versuche eingesetzt.

2.11.2 Transfektion von DZ mit IVT-RNA

Die RNA-Transfektion wurde nach dem Protokoll von Nair et al. (1998) etabliert. Dabei wurde die RNA entweder mit Liposomen (DMRIE) präkomplexiert und anschließend transfiziert oder die RNA wurde nackt den DZ zugegeben. Für die Transfektion mit Liposomen wurde das Lipofektamin „DMRIE“ zusammen mit 300 µl serumfreien RPMI-Medium für 30 min bei RT vorinkubiert. Anschließend wurde IVT-RNA zu der Lipidverdünnung gegeben und für weitere 15 min inkubiert. Das Verhältnis RNA zu Lipid betrug dabei 1 zu 4. Währenddessen wurden die DZ ($1-5 \times 10^5$) in serumfreiem Medium gewaschen. Die DZ wurden dann in dem Lipid-RNA-Komplex resuspendiert und für 4 Stunden bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die DZ gewaschen, in frischen, serumhaltigen Medium aufgenommen und über Nacht ausdifferenziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 mal gewaschen, mit 60 Grey bestrahlt und als Stimulatoren verwendet. Alternativ zur Transfektion mit Lipiden wurde die RNA „nackt“ zu den DZ in 300 µl serumfreies Medium gegeben und analog zu oben weiterbehandelt.

2.11.3 Transfektion von DZ mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion DZ mit Plasmid-DNA wurden verschiedene kommerzielle kationische Lipide verwendet: Fugene, Effecten, Superfect, DMRIE und DOTAP. Die DZ wurden nach den entsprechenden Protokollen der jeweiligen Hersteller mit einem 1 µg Plasmid-DNA transfiziert. Nach Abschluß der Transfektion wurden die DZ über Nacht ausdifferenziert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3 mal gewaschen, mit 60 Grey bestrahlt und für die Versuche eingesetzt.

2.11.4 Beladung von DZ mit Protein

Die Beladung DZ mit rekombinantem Protein erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Santin et al. (1999), wobei die Beladung der Proteine im Komplex mit Lipiden durchgeführt wird. DZ per se sind in der Lage, Makromoleküle aus der Umgebung über Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufzunehmen. Dabei werden externe Proteine über den MHC-II-Weg prozessiert und präsentiert. Bei der Beladung DZ mit dem Protein-Lipid-Komplex soll erreicht werden, daß ein Teil des Proteins über Membranfusion ins Zytosol gelangt, von wo aus es vorwiegend über den MHC-I-Weg prozessiert und präsentiert wird. Somit könnten Protein-beladenen DZ als Stimulatoren sowohl eine CD8⁺ als auch CD4⁺T-Zellantwort induzieren. Für die Beladung wurden 20 µg Protein mit 25 µg des kationischen Lipids DOTAP für 20 min in 125 µl RPMI präkomplexiert. Währenddessen wurden die DZ (10⁵-10⁶) einmal in serumfreien Medium gewaschen und in 500 µl serumfreien RPMI-Medium resuspendiert. Anschließend wurde der Protein-Lipid-Komplex mit den Zellen gemischt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die DZ wurden im Anschluß 2 mal gewaschen und über Nacht ausdifferenziert. Nach Entfernen des Zytokincocktails durch dreimaliges Waschen und nach Bestrahlung mit 60 Grey wurden die DZ als Stimulatoren verwendet.

2.12 Immunphänotypisierung von Zellen mittels Durchflußzytometrie

- Blockinglösung: 20% FCS, 20% Human-Plasma in PBA
- PBA: 5% hitzeinaktiviertes FCS oder 1% BSA in PBS, 0,1% Na-Azid pH7,2
- PBS pH7,2: 8g NaCl; 0,2g KCl, 0,2g KH₂PO₄; 1,15g Na₂HPO₄ auf 1 l H₂O, autoklaviert
- Fixierlösung: 3,7%(v/v) Formaldehyd in PBS

Zur Charakterisierung von DZ und Lymphozyten wurden Differenzierungsmarker mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern nachgewiesen.

Je 10⁴-5x10⁵ Zellen wurden in 1,2 ml-Röhrchen (Cluster Tubes) gegeben und die Zellen bei 700 U/min für 5 min bei RT zentrifugiert (Megafuge 1.0; Rotor 2704). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet resuspendiert, und unspezifische Bindungsstellen während einer 30-minütigen Inkubation auf Eis mit 50 µl Blocking-Lösung abgesättigt. Danach wurde der Erstantikörper bzw. der direktmarkierte Antikörper zugegeben, durch Vortexen gemischt und 30 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Im Anschluß wurde nicht gebundener Antikörper durch zweimaliges Waschen mit 500 µl PBA entfernt. Bei einer indirekten Färbung wurden 50 µl verdünnter Zweitantikörper zugegeben und nach gründlichem Mischen 30 min auf Eis inkubiert. Zum Schluß wurden die Zellen einmal mit PBA und einmal mit PBS gewaschen

und mit 100 µl Fixierlösung (1:2 in PBS verdünnt) versetzt. Die fixierten Zellen können bis zur Analyse 4 Wochen bei 4°C im Dunkeln gelagert werden.

Die Messung und Analyse der Zellen erfolgte am Durchflußzytometer FACS Calibur und der dazugehörigen CellQuest Software. Dabei wurde die zu untersuchende Zellpopulation aufgrund ihrer charakteristischen Größe und Granularität eingegrenzt und der prozentuale Anteil der positiven Zellen bestimmt. Die Fluoreszenzwerte der Negativkontrollen wurden dabei so eingestellt, daß der Anteil positiver Zellen höchstens 2% betrug.

2.13 Immunologisch funktionelle Analysen

2.13.1 Proliferationstest

- [methyl-³H]-Thymidin
- Filterplatten + Abdeckklebefolien
- MicroscintTM O

Die spezifische Proliferation von Lymphozyten in Gegenwart von Stimulatoren wurde durch den Einbau von tritiummarkiertem Thymidin in die DNA bestimmt. Dazu wurden jeweils 10⁵ Zellen in einer Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte mit 5x10³-10⁴ Stimulator-Zellen in insgesamt 200 µl RPMI + 10% AB-Plasma für 3-5 Tage kultiviert. Die Stimulatoren wurden zuvor 2x mit 30 Grey bestrahlt, um deren Grundproliferation zu minimieren. Es wurden 25 µl Medium mit 5 µCi/ml ³H-Thymidin pro Vertiefung zugesetzt und für weitere 16 Stunden inkubiert. Während dieser Zeit bauen die proliferierenden Zellen das ³H-Thymidin in ihre DNA ein. Die Zellen wurden anschließend durch einmaliges Einfrieren bei -70°C und Auftauen bei 37°C aufgeschlossen. Für adhärenente Zellen wird dieser Vorgang mehrmals wiederholt. Die freigesetzte DNA wurde mit Hilfe eines Erntegerätes auf eine Filterplatte transferiert und das nicht gebundene ³H-Thymidin gewaschen (10 mal). Für eine optimale Trocknung der Filter wurde die Filterplatte am Ende des Erntens mit Isopropanol gewaschen. Nach dem Trocknen der Platte (mindestens 30 min bei 37°C) wurde der Boden mit einer Klebefolie versiegelt und 25 µl Szintillatorflüssigkeit (Microscint O) pro Vertiefung zugegeben. Die Oberfläche wurde mit Folie abgedeckt, und die Filterplatte in einem Szintillationszähler vermessen. Dabei wird die Energie der radioaktiven β-Strahlung durch die Szintillationsflüssigkeit absorbiert und im Szintillationszähler in sichtbare Strahlung (Lichtblitze) umgewandelt, die photoelektrisch als „counts per minute“ (CPM) registriert wird.

Es wurden folgende Kontrollen standardmäßig mitgeführt: alle Ansätze wurden jeweils in Triplikaten durchgeführt und die zu untersuchenden Zellen als auch die Stimulatoren wurden nur mit Medium getestet, um deren Grundproliferation zu bestimmen.

Abschließend wurden die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Triplikate bestimmt. Ein Ergebnis wurde dann als positives bewertet, wenn die experimentellen Werte plus Standardabweichung die Werte der Kontrolle deutlich überschritten (keine Überschneidung der Standardabweichung).

2.13.2 Zytotoxizitätstest/Chrom-Freisetzungstest

Zur Bestimmung der spezifischen zytolytischen Aktivität der *in vitro* induzierten T-Zelllinien wurden Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dabei werden Zielzellen mit $^{51}\text{Chrom}$ markiert und mit den Effektorzellen inkubiert. Bei eintretender Zytolyse wird $^{51}\text{Chrom}$ in den Überstand freigesetzt, welches vermessen werden kann.

Als Stimulatoren wurden 5×10^5 autologe B-LCL verwendet, die abzentrifugiert wurden. Der Überstand wurde durch Abkippen verworfen, und die Zellen im Resttropfen durch Klopfen mit dem Finger resuspendiert. Es wurden pro Ansatz $100 \mu\text{Ci } ^{51}\text{Chrom}$, $1 \mu\text{l HEPES}$, gegebenenfalls $10\text{-}20 \mu\text{g/ml Peptid}$ zugesetzt und für $1,5\text{-}2$ Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der $1,5\text{-}2$ -ständigen Inkubation der Zielzellen erfolgte ein 3maliges Waschen der Zellen (Zentrifugation jeweils 10 min , 1200 U/min) mit $10 \text{ ml RPMI} + 1\% \text{ FCS}$ oder AB-Plasma. Die Zellen wurden in $10 \text{ ml Medium} + 10\% \text{ FCS}$ oder AB-Plasma aufgenommen und auf 5×10^4 Zellen pro ml eingestellt. $100 \mu\text{l}$ dieser Zellsuspension (5×10^3) wurden als Zielzellen zu den Effektorzellen zugegeben. Währenddessen wurden die T-Zellen vorbereitet. Es wurden entweder Einzelwells der T-Zellkulturen getestet, wobei die Zellen ohne Zellzahlbestimmung auf die verschiedenen Ansätze verteilt wurden, oder die T-Zellen der Einzelwells wurden gepoolt und titriert (Effektor:Target-Ratio $100:1$ bis $1:1$). Die Effektoren wurden in einem Volumen von $50 \mu\text{l}$ in 96-Loch-Spitzbodenplatten überführt. Um die spezifische Lyse der T-Zellen von NK-Aktivität unterscheiden zu können, wurde eine „cold target inhibition“ (CTI) durchgeführt. Dabei wurden die T-Zellen 15 Minuten vor Zugabe der Targetzellen bei 37°C mit 10^5 K562-Zellen pro Lochvertiefung (20 facher Überschuß bezüglich der Targetzellen) inkubiert. Die K562 Zellen besitzen keine HLA-Moleküle auf der Oberfläche und werden deswegen von den NK-Zellen angegriffen, womit die NK-Aktivität abreagiert wird. Als Kontrollen wurden zum einen Zielzellen mit K562 als CTI und $100 \mu\text{l Medium}$ inkubiert (low-release-Kontrolle, die der spontanen Chromfreisetzung der Zielzellen entspricht) und zum anderen Zielzellen mit $100 \mu\text{l NP-40-Detergenz}$ (10% ; v/v) (high-release-Kontrolle, die

der maximalen Chromfreisetzung der Zielzellen entspricht) versetzt. Um zu kontrollieren, ob die NK-Aktivität vollständig geblockt wurde, wurden außerdem Effektoren mit markierten K562 +/- CTI inkubiert. Die Ansätze wurden 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kulturplatte 10 min bei 900 U/min zentrifugiert, um die Zellen zu sedimentieren. Aus jeder Vertiefung wurden 100 µl Überstand entnommen und in eine Optiplate-Szintillationszählplatte transferiert. Nach Zugabe von 200 µl Szintillator MS40 pro Lochvertiefung wurde die Platte mit Abdeckfolie versehen und im Szintillationszähler gemessen. Anhand der experimentellen Werte wurde dann die spezifische Lyse nach folgender Formel berechnet:

$$\text{spezifische Lyse} = (\text{Ergebnis} - \text{low release}) \times (\text{high release} - \text{low release})^{-1} \times 100\%$$

Bei der Auswertung wurde die spezifische Lyse der Einzelwells dann als positiv gewertet, wenn nach Addition von 10% der spezifische Lyse zur Kontrolllyse die Differenz der spezifischer Lyse zur Kontrolllyse $\geq 10\%$ war.

2.13.3 ELISpot-Assay

- RPMI + 0,4% (v/v) Human-Albumin
- PBS pH7,2-7,4: 8g NaCl; 0,2g KCl, 0,2g KH₂PO₄; 1,15gNa₂HPO₄ auf 1 H₂O,autoklaviert
- PBS/0,5% BSA (w/v)
- PBS/0,05% Tween 20 (v/v)

Wenn CD8⁺T-Lymphozyten stimuliert werden, sezernieren sie u.a. INF-γ. Diese Eigenschaft macht man sich im INF-γ-„Enzyme Linked Immuno Spot Assay“ (ELISpot-Assay) zunutze, um die Spezifität von CD8⁺T-Zellen zu bestimmen. Das Prinzip des ELISpot-Assays entspricht dem eines Sandwich-ELISA`s. Auf einem mit anti-IFN-γ beschichteten Nitrozellulose-Filter werden CD8⁺T-Zellen, T-Zellen oder PBL mit entsprechenden Stimulatoren kultiviert. Bei spezifischer Stimulation setzen die CD8⁺T-Zellen IFN-γ frei, das an den anti-IFN-γ-Antikörper auf dem Filter bindet. Die Zellen werden durch Waschen entfernt, und der Filter mit einem zweiten, biotinylierten anti-IFN-γ-Antikörper inkubiert. Das Biotin wird nach Zugabe von Streptavidin gebunden, an das eine Alkalische Phosphatase gekoppelt ist. Die Detektion erfolgt über die Alkalische Phosphatase, die ein wasserlösliches, gelbes Farbreagenz (BCIP/NTB) zu einem wasserunlöslichen, blauen Reagenz umsetzt, so daß am Ende ein blauer „Spot“ an der Stelle entsteht, wo sich anfangs eine spezifische Zelle

befunden hat. Anhand der Spots und der ausgesäten Zellzahl kann man auf die Frequenz der spezifischen T-Zellen zurückschließen.

Eine Nitrozellulose HA-Platte wurde über Nacht bei 4°C mit dem monoklonalen Antikörper 1-D1k anti human IFN- γ (10 $\mu\text{g/ml}$ in PBS; 60 μl /Vertiefung) beschichtet. Am nächsten Tag wurden die CD8⁺T-Zellen (10^4 - 10^5 /Vertiefung) zusammen mit den Stimulatoren (5×10^3 - 5×10^4 /Vertiefung) in eine 96-Loch-Rundbodenplatte ausgesät und für 4 Stunden inkubiert. In dieser Zeit wurde die Nitrozellulose-Platte 3 mal mit 150 μl /Vertiefung PBS gewaschen und mindestens 1 Stunde bei 37°C mit RPMI/1%Human-Albumin geblockt. Nach Entfernen des Blockingmediums wurden die Ansätze der Rundbodenplatte auf die Filterplatte übertragen und 20 Stunden (+/- 2) im Brutschrank inkubiert. Danach wurde die Filterplatte 6 mal 2 min mit PBS/Tween 20 gewaschen und mit dem Antikörper Ab-7-B6-1-biotin (2 $\mu\text{g/ml}$ in PBS/BSA 0,5%) für 2 Stunden bei 37°C oder ÜN bei 4°C inkubiert. Im Anschluß wurde die Filterplatte erneut 6 mal 2 min gewaschen, um überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Es erfolgte eine Zugabe von Streptavidin-Alkalische Phosphatase-Komplex (50 ng/ml in PBS). Nach 2 stündiger Inkubation bei RT wurde die Filterplatte 3 mal 2 min mit PBS/Tween 20 und 3 mal 2 min mit PBS gewaschen. Es wurden dann 100 μl BCIP/NBT-Substrat zugesetzt und weitere 2 Stunden bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit Wasser abgestoppt und die Platte über Nacht bei RT getrocknet. Die Auszählung der Spots erfolgte am ELISpot-Auslese-System der Firma Zeiss (Zeiss-Vision C). Die Ansätze wurden in Duplikaten oder Triplikaten durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Ein Ergebnis wurde dann als spezifisch bezeichnet, wenn sich die Standardabweichungen des Ergebnisses und der entsprechenden Kontrolle nicht überschneiden.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung der dendritischen Zellkultur

3.1.1 Etablierung FCS-freier Kulturbedingungen für die dendritische Zellkultur

Es sollte ein FCS-freies System für die Kultur dendritischer Zellen (DZ) gefunden werden, da Proteine des FCS zu einer unspezifischen Induktion von T-Zellen führen können (eigene Beobachtung s. Abschnitt 2.8; Jonuleit et al., 2000). Außerdem ist die Verwendung von FCS als xenogenes Serum ungeeignet für spätere Applikationen am Menschen.

Deswegen wurde die Generierung DZ in den Kulturmedien RPMI und X-Vivo 20 (Romani et al., 1996) mit AB-Plasma oder Human-Albumin als Zusatz analysiert.

DZ wurden in folgenden Kulturmedien generiert: RPMI + 1% AB-Plasma (Bender et al., 1996), RPMI + 1% Human-Albumin, X-Vivo 20 und X-Vivo 20 + 1% Human-Albumin. Parallel dazu wurden DZ in RPMI + 10% FCS als Vergleich kultiviert.

Nach 6-tägiger Kultur wurde die Hälfte der Zellen über Nacht mit 40 ng/ml TNF- α (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Sallusto et al., 1995) zu reifen dendritischen Zellen stimuliert. Beide Populationen wurden mit Hilfe der FACS-Analyse auf ihre CD83-Expression untersucht.

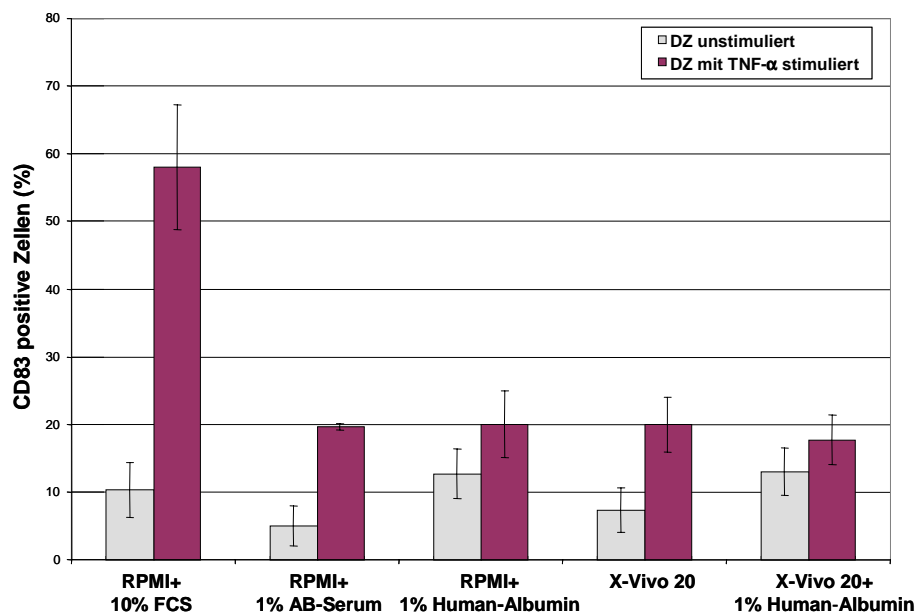


Abb. 3.1: Phänotypische Charakterisierung unstimulierter und stimulierter DZ, die unter verschiedenen Kulturbedingungen generiert wurden. Die DZ wurden mit Hilfe der Durchflußzytometrie auf ihre CD83-Expression untersucht. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte und die Standardabweichung von 3 untersuchten Donoren.

CD83 ist ein selektiver Marker für reife DZ, die aus Blutmonozyten gewonnen werden (Zhou et al., 1992; Zhou und Tedder, 1995). Im unreifen Stadium weisen DZ keine CD83-Expression auf und sind im Vergleich zu reifen DZ optimal in der Lage Antigene aufzunehmen. Reife DZ dagegen sind effizienter in der Antigenpräsentation aufgrund der Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen und immunstimulatorischen Funktionen. Das Ziel war es, DZ *in vitro* mit Antigenen zu beladen, zu stimulieren und die reifen DZ für die T-Zellstimulation einzusetzen. Deswegen sollten Kulturbedingungen gefunden werden, die eine geringe CD83-Expression im unreifen Stadium, aber eine starke CD83-Expression nach Stimulation im reifen Stadium erlauben, um somit eine effiziente Antigenaufnahme und -präsentation zu gewährleisten.

Die höchste CD83-Expression mit 58% zeigten die reifen DZ, die in RPMI + 10% FCS kultiviert worden sind. Dagegen zeigen die FCS-freien Ansätze eine wesentlich geringere CD83-Expression der reifen DZ, die zwischen 18-20% liegt und untereinander vergleichbar ist. Im unstimulierten Zustand weisen die DZ, die in RPMI + 1% AB-Plasma generiert wurden, die geringste CD83-Expression mit 5% auf.

Die Anzahl generierter unreifer DZ, die mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt wurde, war mit $4,6-6,3 \times 10^5$ unter den FCS-freien Ansätzen vergleichbar. In RPMI + 10% FCS dagegen war die Anzahl DZ im unreifen Stadium 2x so hoch ($1,1 \times 10^6$).

Da es keine Unterschiede bezüglich der Zellzahl unreifer DZ und der CD83-Expression der reifen DZ in den FCS-freien Ansätzen gab, aber die CD83-Expression der unreifen DZ in RPMI + 1% AB-Plasma am geringsten war, wurden diese Kulturbedingungen für die weitere Generierung der DZ eingesetzt.

3.1.2 Vergleich verschiedener Differenzierungsstimuli für dendritische Zellen

In der Literatur werden verschiedene Differenzierungsstimuli für DZ beschrieben. Neben TNF- α (Sallusto and Lanzavecchia, 1994) wird u. a. auch LPS (Sallusto et al., 1995), TNF- α + PGE₂ (Rieser et al., 1997), Monozyten-konditioniertes Medium (Romani et al., 1996) sowie ein definierter Zytokincocktail (Jonuleit et al., 1997) verwendet. TNF- α zeigt sich nur als guter Differenzierungsstimulus in Kombination mit FCS (s. Abschnitt 3.1.1), nicht aber im FCS-freien System. Die Qualität von konditioniertem Medium kann variieren und ist schwierig zu standardisieren, und LPS gilt auch als unspezifischer Stimulus für PBL (Schoell et al., 1999). Deswegen wurde nur der definierte Zytokincocktail bestehend aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ im Vergleich zu TNF- α alleine bzw. TNF- α + PGE₂ ausgetestet.

Es wurden DZ in RPMI + 1% AB-Plasma generiert und über Nacht mit den verschiedenen Stimuli parallel ausdifferenziert. Die Ausdifferenzierung der DZ wurde phänotypisch anhand ihrer charakteristischen Oberflächenmarker CD83, CD86 und MHC-II überprüft, die mit Stimulation der terminalen Differenzierung hochreguliert werden.

Phänotypische Charakterisierung

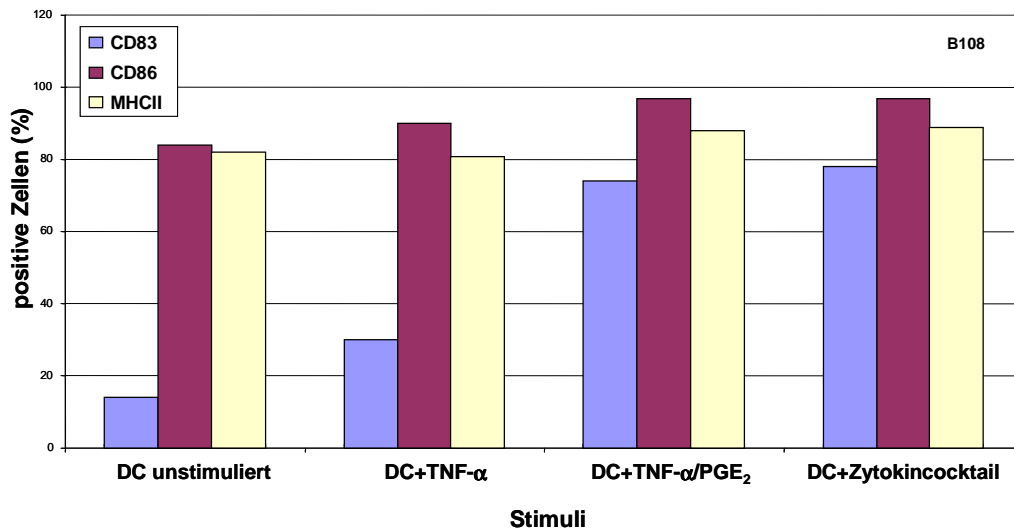


Abb. 3.2: Analyse von DZ-Differenzierungsmarkern (CD83, CD86 und MHC-II) mittels Durchflußzytometrie nach unterschiedlicher Stimulation. Die Ergebnisse eines repräsentativen Donors von 2 untersuchten Donoren sind dargestellt.

Die unstimulierten DZ zeigen eine geringe CD83-Expression (13%) und eine hohe Expression der Moleküle CD86 und MHC-II. Die mit den verschiedenen Stimuli ausdifferenzierten DZ zeigen im Vergleich zu den unstimulierten DZ eine leichte Zunahme der CD86- und MHC-II-Expression und eine deutlich höhere CD83-Expression. Die CD83-Expression nach Stimulation mit TNF- α ist im Vergleich zu den DZ, die mit TNF- α + PGE₂ bzw. dem Zytokincocktail ausdifferenziert wurden, mit 31% zu 72% bzw. 78% relativ gering. Dies wiederum zeigt, daß TNF- α alleine im FCS-freien System kein effizienter Stimulus für DZ ist. Die Ergebnisse der DZ, die mit TNF- α + PGE₂ bzw. mit dem Zytokincocktail ausdifferenziert wurden, sind vergleichbar.

Funktionelle Charakterisierung

Desweiteren wurde auch die stimulatorische Kapazität der Zellen im Proliferationstest überprüft (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR). Dafür wurden die stimulierten DZ mit allogenen T-Zellen kokultiviert und die Zunahme der T-Zellproliferation gemessen.

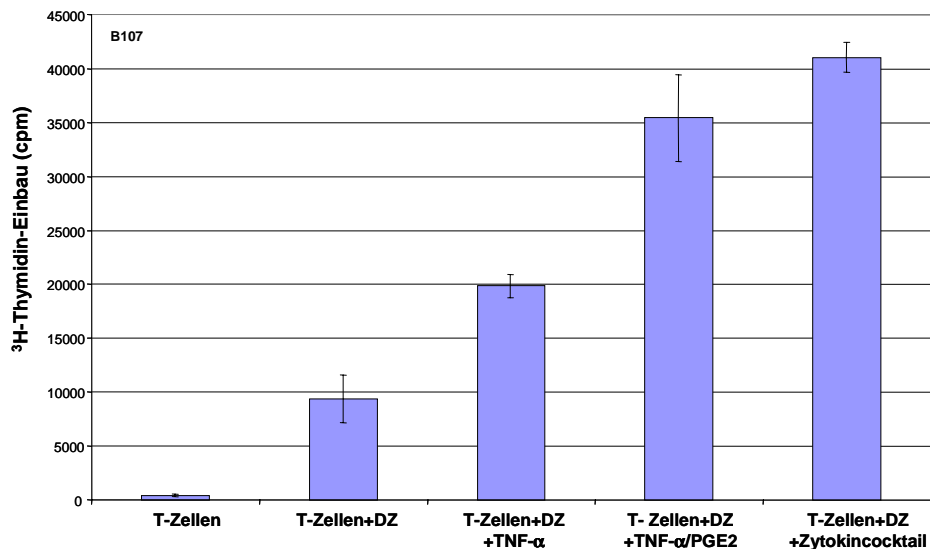


Abb. 3.3: Analyse der stimulatorischen Kapazität von DZ nach unterschiedlicher Stimulation. DZ (10^4 /Loch, bestrahlt) wurden mit allogenen T-Zellen (10^5 /Loch) für 3 Tage kokultiviert und anschließend für 16 Stunden mit ^3H -Thymidin inkubiert. Der ^3H -Thymidin-Einbau in die DNA der T-Zellen wurde als Maß für die Proliferation gemessen. Die Ergebnisse eines repräsentativen Donors von 2 untersuchten Donoren sind dargestellt.

Die unreifen DZ induzieren eine geringe Proliferation in der T-Zellpopulation. Nach Ausdifferenzierung mit den verschiedenen Stimuli nimmt die stimulatorische Kapazität der DZ deutlich zu (2-4fach), wobei die mit dem Zytokincocktail und $\text{TNF-}\alpha$ + PGE_2 ausdifferenziertem DZ die beste stimulatorische Kapazität im Proliferationstest aufweisen, die untereinander vergleichbar ist.

Sowohl $\text{TNF-}\alpha$ + PGE_2 als auch der Zytokincocktail lieferten als Stimulus für DZ phänotypisch und funktionell vergleichbare Resultate. Der Einfluß des Zytokincocktails auf die Differenzierung DZ wurde eingehend von Jonuleit et al. (1997) bezüglich des Phänotyps, der Stabilität, der stimulatorischen Kapazität, der migratorischen Fähigkeit und der Zytokinproduktion untersucht. Dies wurde in diesem Maße bisher nicht für $\text{TNF-}\alpha$ + PGE_2 als Stimulus analysiert. Aus diesem Grund und aufgrund der Tatsache, daß der Zytokincocktail neben $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 auch $\text{TNF-}\alpha$ und PGE_2 enthält, wurde der Zytokincocktail für die weiteren Versuche zur Ausdifferenzierung DZ verwendet.

3.1.3 Stabilität terminal differenzierter dendritischer Zellen

Für therapeutische Ansätze ist es wichtig, daß ausdifferenzierte DZ nach Entfernen der Zytokine (sowohl des Zytokincocktails als auch der Zytokine IL-4 und GM-CSF) nicht wieder zu Monozyten revertieren und somit ihre T-Zell-stimulatorische Funktion verlieren. Um die Stabilität der T-Zell-stimulatorischen Funktion terminal ausdifferenzierter dendritischer Zellen zu überprüfen, wurden ausdifferenzierte DZ in einem sogenannten „Wash-out-Test“ nach Entfernen des Zytokincocktails und der Zytokine unmittelbar bzw. 24h und 48h später auf ihre stimulatorische Kapazität im Proliferationstest überprüft.

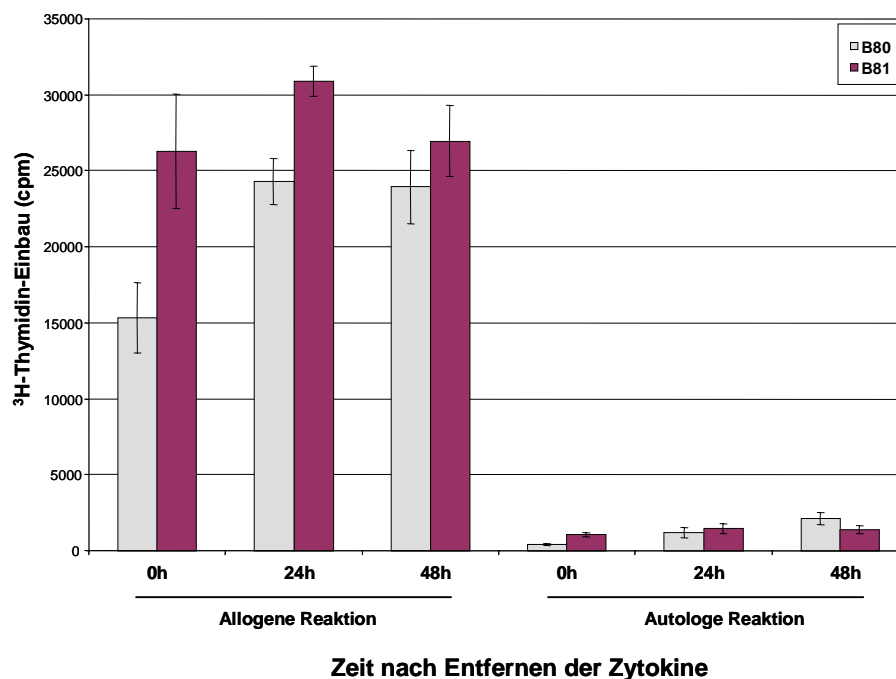


Abb. 3.4: Stabilität der stimulatorischen Funktion terminal differenzierter DZ nach Entfernen der Zytokine und des Zytokincocktails. DZ (10^4 /Loch) wurden mit autologen bzw. allogenen T-Zellen (10^5 /Loch) für 3 Tage kokultiviert und anschließend für 16 Stunden mit ³H-Thymidin inkubiert. Der ³H-Thymidin-Einbau in die DNA der T-Zellen wurde als Maß für die Proliferation gemessen. Die Ergebnisse von zwei unterschiedlichen Donoren sind abgebildet.

Die DZ zeigen eine deutliche T-Zell-stimulatorische Kapazität im allogenen System im Vergleich zum autologen System. Diese T-Zell-stimulatorische Funktion der ausdifferenzierten DZ bleibt nach Entfernen des Zytokincocktails und der Zytokine für 48 Stunden stabil.

3.1.4 Charakterisierung DZ

Es wurden DZ nach den etablierten Kulturbedingungen generiert, d.h. adhärenente Blutmonozyten wurden in RPMI + 1% AB-Plasma + IL-4 und GM-CSF (1000U/ml) kultiviert und nach 3-4 Tagen mit frischem Medium und Interleukinen gefüttert. Nach 6-7 Tage wurden die unreifen DZ mit Hilfe des Zytokincocktails über Nacht ausdifferenziert. Anschließend wurde eine phänotypische und funktionelle Charakterisierung der unstimulierten und stimulierten DZ im Vergleich durchgeführt.

Phänotypische Charakterisierung

Die Charakterisierung wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie durchgeführt. Es wurde der Marker für reife DZ, CD83, die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 sowie die MHC-I- und MHC-II-Moleküle analysiert.

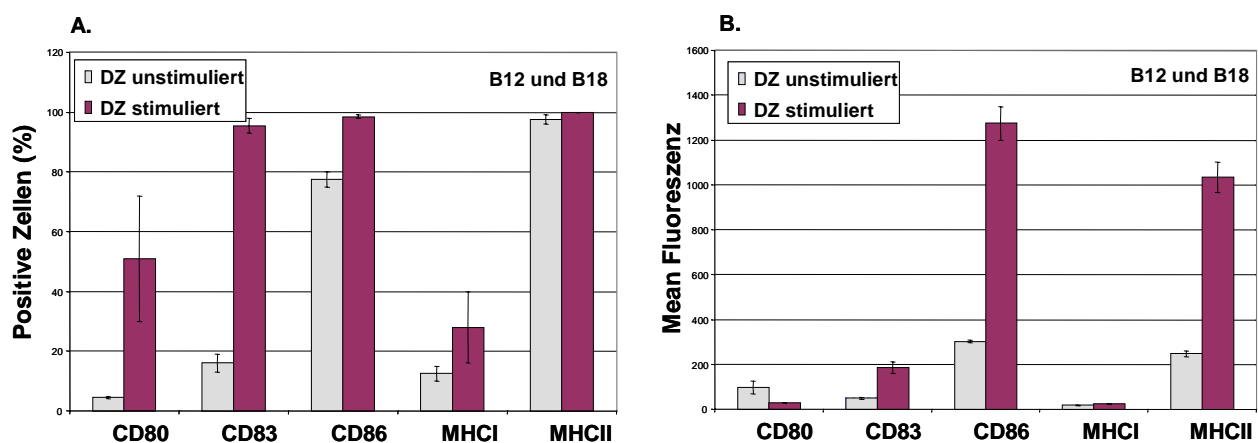


Abb. 3.5: Phänotypische Charakterisierung DZ nach Kultivierung in RPMI + 1% AB-Plasma und Ausdifferenzierung mittels Zytokincocktails. Es ist die Anzahl positiver Zellen in % (A) und die Mean-Fluoreszenz (B) angegeben. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte mit Standardabweichungen von 2 untersuchten Donoren.

Die unreifen DZ zeigen eine geringe CD83, CD80 und MHC-I-Expression sowie eine mittlere CD86- und MHC-II-Expression.

Die Ausdifferenzierung führt zu einer Zunahme des DZ-Markers CD83 (Faktor 6) sowie des Kostimulatormoleküls CD80 (Faktor 10) und des MHC-I-Moleküls (Faktor 2). Bei Betrachtung der durchschnittlichen Expression pro Zelle (Mean-Fluoreszenz) kann man auch eine deutliche Zunahme der CD86- (Faktor 4) und der MHC-II-Expression (Faktor 4) erkennen.

Funktionelle Charakterisierung der DZ

Die stimulatorische Kapazität der DZ, die in RPMI + 1% AB-Plasma generiert und mit Zytokincocktail ausdifferenziert worden sind, wurde im Proliferationstest mit allogenen T-Zellen überprüft.

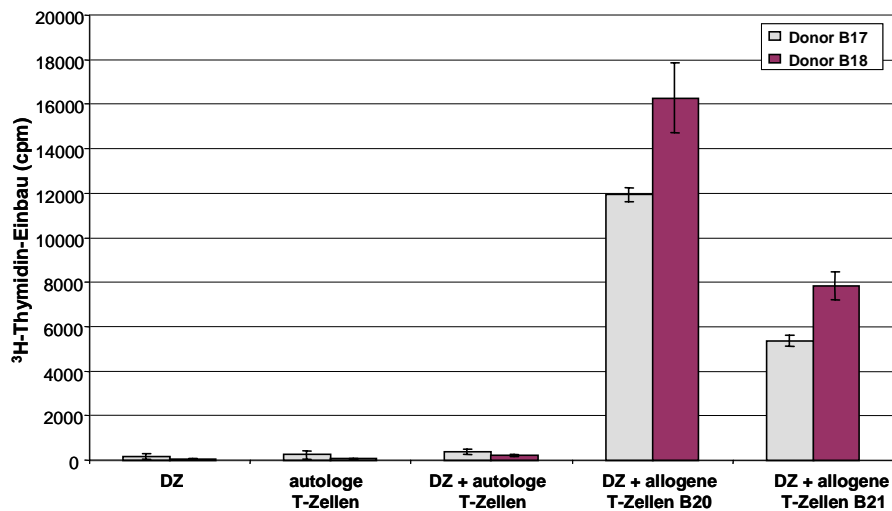


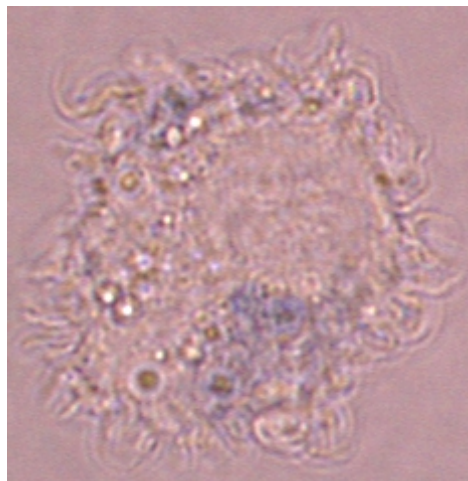
Abb. 3.6: Funktionelle Charakterisierung von DZ im Proliferationstest. DZ (10^4 /Loch) wurden mit autologen bzw. allogenen T-Zellen (10^5 /Loch) von 2 unterschiedlichen Donoren (B20 + B21) für 3 Tage kokultiviert und anschließend für 16 Stunden mit ^3H -Thymidin inkubiert. Der ^3H -Thymidin-Einbau in die DNA der T-Zellen wurde als Maß für die Proliferation gemessen. Die Ergebnisse von zwei unterschiedlichen Donoren (B17 + B18) sind abgebildet.

Die ausdifferenzierten DZ induzieren keine autologe T-Zellproliferation, d.h. sie induzieren keine Autoreaktivität, was bezüglich einer potentiellen Applikation am Menschen sehr wichtig ist. Dagegen wurden die allogenen T-Zellen (B20 + B21) zur einer deutlichen Proliferation durch die ausdifferenzierten DZ angeregt. Man kann in Abb. 3.6 erkennen, daß die Proliferation der T-Zellen des Donors B20 deutlich stärker ist als die des Donors B21. Das zeigt die unterschiedlich starke Allogenität der beiden Donoren, die durch die unterschiedlichen HLA-Haplotypen bedingt ist.

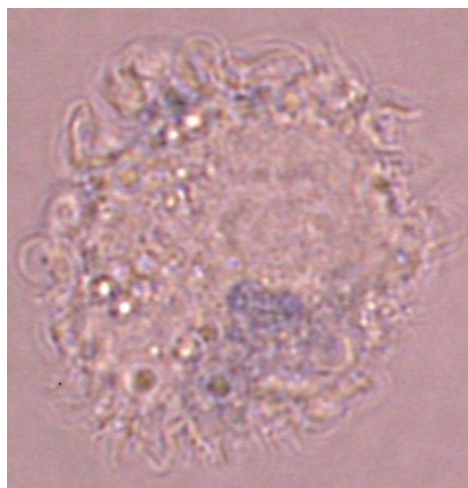
Morphologische Charakterisierung

Die morphologische Beurteilung der DZ wurde mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops durchgeführt. Während unreife DZ eher eine runde, glatte Zellform und eine geringe Granularität aufweisen, zeichnen sich reife DZ durch eine starke Granularität und durch die Ausbildung von zytoplasmatischen Fortsätzen, sogenannten „veils“, aus.

A.



B.



C.

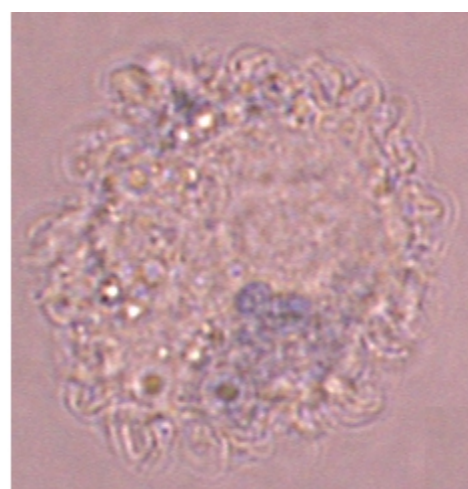


Abb. 3.7: Morphologie einer reifen DZ. Eine reife DZ wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten (nach 0 Sekunden [A], nach 30 Sekunden [B] und nach 60 Sekunden [C]) mittels Phasenkontrastmikroskops, Vergrößerung 640 x, photographisch festgehalten. Man kann im zeitlichen Verlauf (A-C) die Bewegung der „veils“ erkennen.

3.2 Etablierung peptidspezifischer T-Zelllinien

Zur Etablierung des Stimulationsprotokolls und der Spezifitäts-Nachweismethoden (Chrom-Freisetzungstest und ELISpot) wurden zunächst *in vitro* peptidspezifische T-Zelllinien induziert.

3.2.1 Spezifische zytolytische Aktivität peptidspezifischer T-Zelllinien

Generierung IMP₅₈₋₆₆-spezifischer T-Zelllinien

Für die Generierung der peptidspezifischen T-Zelllinien wurde zunächst das HLA-A*0201 restringierte Peptid IMP₅₈₋₆₆ (Bednarek et al., 1991) als positives Kontrollpeptid verwendet. Periphere Blutlymphozyten (PBL) wurden aus Buffy Coats gesunder Spender isoliert und für die DZ-Generierung eingesetzt. Die nicht adhärente PBL-Fraktion wurde zur T-Zellisolation mittels Schafserythrozytenrosettierung verwendet. Die DZ wurden mit Peptid beladen, ausdifferenziert, bestrahlt und zur T-Zellstimulation eingesetzt. Darauf folgte eine wöchentliche Restimulation mit Peptid-beladenen DZ. Nach 4-5 Restimulationen wurden die T-Zellen auf ihre peptidspezifische zytolytische Aktivität untersucht. Dafür wurden die T-Zellsublinien von der Kulturplatte gepoolt und im Chrom-Freisetzungstest eingesetzt. Es wurde eine „cold target inhibition“ mit K562 Zellen durchgeführt, um mögliche NK-Aktivität abzublocken. Als Zielzellen wurden autologe B-LCL verwendet, die zum einen mit dem Peptid IMP₅₈₋₆₆, zum anderen mit einem Kontrollpeptid (HPV16-E7₁₁₋₂₀) gepulst wurden. Es wurden auch unbeladene B-LCL verwendet. Zusätzlich wurden K562-Zellen eingesetzt, um vorhandene NK-Aktivität ausschließen zu können. Die T-Zellen wurden titriert, um unterschiedliche Effektor:Target-Verhältnisse zu analysieren.

Die Zelllinie B27 zeigte im Standard-Chrom-Freisetzungstest bei einem Effektor:Target-Verhältnis von 100:1 eine spezifische Lyse von 27% gegenüber IMP₅₈₋₆₆-gepulsten B-LCL. Im Vergleich dazu lag die spezifische Lyse gegenüber den Kontrollen (unbeladene B-LCL bzw. mit E7₁₁₋₂₀-beladenen B-LCL) bei 8% bzw. 4%. Bei der Verwendung von K562 als Zielzellen zeigte sich eine spezifische Lyse von 10%, die auf NK-Aktivität schließen läßt. Das Ergebnis zeigt, daß mit Hilfe von IMP₅₈₋₆₆-beladenen DZ in dieser T-Zelllinie IMP₅₈₋₆₆-spezifische T-Zellen induziert wurden. Es wurden weitere IMP₅₈₋₆₆-spezifische T-Zelllinien angelegt, deren Ergebnisse aus dem Standard-Chrom-Freisetzungstest in Tabelle 3.1 zusammengefaßt sind.

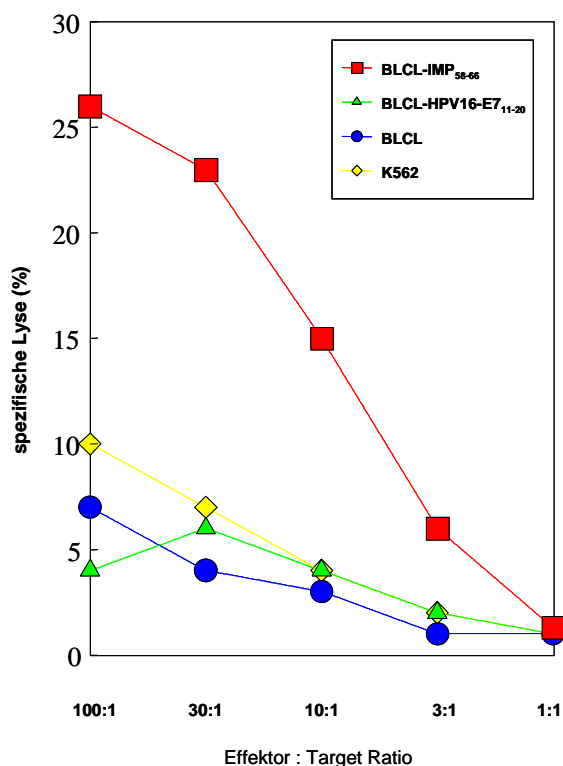


Abb. 3.8: Standard-Chrom-Freisetzungstest zur Bestimmung der spezifische Lyse einer IMP₅₈₋₆₆-spezifischen T-Zelllinie (B27). Autologe B-LCL wurden entweder unbeladen oder mit dem Peptid IMP₅₈₋₆₆ bzw. HPV16-E7₁₁₋₂₀ beladen als Zielzellen eingesetzt. Zusätzlich wurden K562-Zellen zur Bestimmung der vorhandenen NK-Aktivität als Zielzellen verwendet.

Donor	AK	AK	BR	BR	B20	B22	B25	B27	B28
Zelllinien	T-Zellen	PBL	T-Zellen	PBL	PBL	PBL	T-Zellen	T-Zellen	T-Zellen
Spezifische Lyse (Effektor:Target-Ratio)	22 % (100:1)	22 % (100:1)	9 % (15:1)	12 % (15:1)	18 % (30:1)	10 % (10:1)	15 % (100:1)	27 % (100:1)	18 % (100:1)
Prozentualer Anteil CD8 ⁺ -T-Zellen in den Zelllinien	44	57	30	13	20	16	n.d.	17	16

Tab. 3.1: Maximale spezifische Lyse der IMP₅₈₋₆₆-T-Zelllinien verschiedener gesunder Donoren. Aus PBL bzw. T-Zellen wurden durch Stimulation mit IMP₅₈₋₆₆-beladenen DZ T-Zelllinien generiert. Die spezifische Lyse gegenüber autologen, IMP₅₈₋₆₆-beladenen B-LCL bei entsprechendem Effektor:Target-Verhältnis ist aufgeführt sowie der prozentualer Anteil CD8⁺T-Lymphozyten in den induzierten Linien.

Man geht davon aus, daß jeder Mensch im Laufe seines Lebens mindestens einmal eine Influenza-Infektion durchlaufen hat und somit IMP-spezifische Gedächtnis-T-Zellen im Blut besitzt. Deswegen würde man bei einer *in vitro* Stimulation IMP₅₈₋₆₆-spezifischer T-Zellen eine starke Aktivierung erwarten, da es sich um keine *de novo* Induktion handelt, sondern bereits vorhandene Gedächtnis-T-Zellen reaktiviert werden. Das Peptid IMP₅₈₋₆₆ gilt daher auch als sogenanntes „Recall-Antigen“.

Es wurden insgesamt 9 IMP₅₈₋₆₆-spezifische Zelllinien generiert und auf ihre peptidspezifische, zytolytische Aktivität überprüft. Insgesamt zeigten die Zelllinien eine spezifische Lyse zwischen 9 – 27 %, die allerdings im Vergleich zur Literatur (> 40%) gering ist (Jochmus et al., 1997). Es wird keine Korrelation zwischen spezifischer Lyse und dem prozentualen Anteil CD8⁺T-Zellen in der stimulierten Population beobachtet.

Es besteht die Möglichkeit, daß sich IMP-spezifische Vorläufer-Zellen bzw. Gedächtnis-T-Zellen nicht in jeder Sublinie der Kulturplatte befunden haben. Durch das Poolen der Einzelpopulationen kann es zu einer Verdünnung der spezifischen T-Zellen gekommen sein, wodurch die geringe spezifische Lyse zu erklären wäre. Die Möglichkeit, daß die untersuchten Donoren nur wenige oder keine IMP-spezifischen Gedächtniszellen im Blut besitzen, ist bei einer Anzahl von 7 verschiedenen Donoren eher unwahrscheinlich. Zudem hätte nach 5-6 Restimulationen eine *de novo* Induktion stattfinden müssen.

Generierung HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifischer T-Zelllinien

Es wurden von zwei weiteren gesunden Donoren peptidspezifische T-Zelllinien mit dem charakterisierten HLA-A*0201 restringierten HPV16-E7₁₁₋₂₀-Peptid (Kast et al., 1994; Rensing et al., 1995) generiert. Die T-Zellsublinien der Zellkulturplatte wurden aufgrund der Vorversuche mit dem IMP-Peptid nicht gepoolt, sondern einzeln auf ihre spezifische zytolytische Aktivität im Chrom-Freisetzungstest analysiert. Als Zielzellen wurden autologe B-LCL verwendet, die entweder mit dem E7₁₁₋₂₀-Peptid oder unbeladen als Kontrolle eingesetzt wurden. Aufgrund der geringen Anzahl an Effektorzellen wurde auf die Kontrolle B-LCL mit Kontrollpeptid verzichtet, da in den vorherigen Versuchen beobachtet werden konnte, daß unbeladene bzw. mit Kontrollpeptid-beladene B-LCL den gleichen Hintergrundwert verursachen.

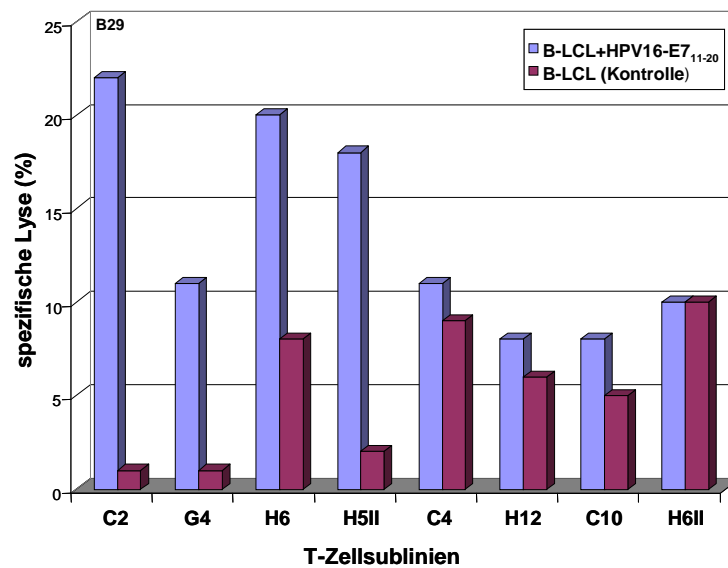


Abb. 3.9: Spezifische Lyse von E7₁₁₋₂₀-peptidspezifischen T-Zelllinien. Es wurden 200 Sublinien eines Donors getestet, von denen 4 eine spezifische Lyse gegenüber dem Peptid HPV16-E7₁₁₋₂₀ zeigten. Die spezifische Lyse von den 4 positiven sowie von 4 negativen Sublinien sind dargestellt. Als Zielzellen wurden autologe B-LCL verwendet, die entweder mit dem E7₁₁₋₂₀-Peptid oder unbeladen als Kontrolle eingesetzt wurden.

Bei der Auswertung wurde die spezifische Lyse der Subpopulationen dann als positiv gewertet, wenn nach Addition von 10% der spezifische Lyse zur Kontrolllyse die Differenz der spezifischer Lyse zur Kontrolllyse $\geq 10\%$ war. Von 200 Sublinien des einen Donors (B29) zeigten 4 eine peptidspezifische zytolytische Aktivität im Chrom-Freisetzungstest, die im Bereich von 10 – 23 % lag. 100 Sublinien eines weiteren Donors (B31) wurden analysiert, die keine peptidspezifische Lyse aufwiesen. Das zeigt, daß HPV-E7₁₁₋₂₀-spezifische T-Zellen mit Hilfe des verwendeten Stimulationsprotokolls in gesunden Donoren prinzipiell induziert werden können. Allerdings ist die Frequenz der E7-spezifischen Vorläufer-Zellen relativ gering ($\sim 1/10^7$ T-Zellen bei Donor B29 bzw. keine T-Zellen bei Donor B31), wenn man von einer spezifischen T-Zelle pro Sublinie ausgeht. Bei Donor B31 konnten keine HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifischen T-Zelllinien generiert werden, was vermuten läßt, daß sich im Pool der eingesetzten 10^7 T-Zellen keine spezifischen Vorläuferzellen befunden haben. Aufgrund der scheinbar niedrigen Frequenz von HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifischen Vorläuferzellen scheint der Chrom-Freisetzungstest als Nachweissystem nicht sensitiv genug zu sein. Aus diesem Grund wurde der IFN- γ -ELISpot etabliert. Mit dieser sensitiveren Methode ist es möglich, spezifische T-Zellen aufgrund ihrer spezifischen IFN- γ -Freisetzung auf Einzelzellniveau detektieren zu können und ihre Frequenz genau zu bestimmen.

3.2.2 Spezifische IFN- γ -Freisetzung peptidspezifischer T-Zelllinien

Zur Etablierung des ELISpotttests wurden erneut peptidspezifische T-Zelllinien generiert. Aufgrund der geringen spezifischen Lysen, die mit Hilfe des IMP₅₈₋₆₆-Peptids erreicht wurden, wurde hier ein anderes Recall-Antigen verwendet, BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈, welches aus dem frühen lytischen Protein des Epstein Barr Virus stammt (Steven et al., 1997). Es wurden T-Zellen von zwei gesunden Donoren mit BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈-beladene DZ stimuliert und wöchentlich restimuliert. Nach 3 Restimulationen wurden die CD8⁺T-Zellen aus der Gesamtpopulation isoliert und im IFN- γ -ELISpotttest auf ihre Spezifität überprüft. Im Vergleich zu den peptidspezifischen Linien wurden auch naive CD8⁺T-Zellen der jeweiligen Donoren getestet. Dabei sollte gezeigt werden, ob Gedächtnis-T-Zellen direkt *ex vivo* aktiviert werden können, und ob es bei den stimulierten CD8⁺T-Zellen zu einer Anreicherung gekommen ist.

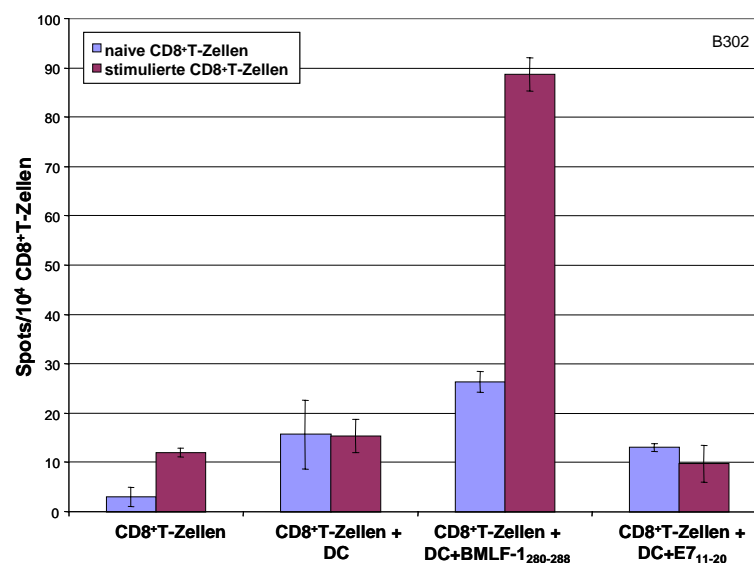


Abb. 3.10: IFN- γ -Freisetzung naiver und BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈ *in vitro* restimulierter CD8⁺T-Zellen desselben Donors. Als Stimulatoren wurden autologe DZ eingesetzt, die entweder unbeladen oder mit dem Peptid BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈ bzw. HPV16-E7₁₁₋₂₀ als Kontrollpeptid beladen wurden. Die Daten sind repräsentativ für zwei getestete Donoren.

Die naiven CD8⁺T-Zellen zeigen im Vergleich zu den Kontrollen eine erhöhte IFN- γ -Freisetzung bei Stimulation mit BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈-beladenen DZ. Daraus kann man schließen, daß schon vor der *in vitro* Stimulation BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈-spezifische CD8⁺T-Zellen vorlagen. Die Methode ist demnach geeignet, um spezifische Gedächtnis-T-Zellen direkt aus dem Blut *ex*

in vivo nachweisen zu können. Nach *in vitro* Stimulation der T-Zellen kann man eine deutliche Zunahme (Faktor 3) der BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen CD8⁺T-Zellen erkennen.

Der ELISpot als Nachweismethode spezifischer CD8⁺T-Zellen ist geeigneter als der Chrom-Freisetzungstest, weil hier spezifische Zellen auf Einzelzellniveau detektiert werden können.

Dabei muß berücksichtigt werden, daß die spezifischen CD8⁺T-Zellen im ELISpot über ihre spezifische IFN- γ -Freisetzung, im Chrom-Freisetzungstest dagegen über ihre spezifische zytolytische Aktivität charakterisiert werden. Es ist allerdings gezeigt, daß CD8⁺T-Zellen, die im IFN- γ -ELISpot spezifisch reagieren, auch zytolytisch im Chrom-Freisetzungstest agieren (Scheibenbogen et al., 1997; Kaufmann et al., 2001; persönliche Mitteilung von A. Kather, FSU, Jena).

Desweiteren wurden 2 HPV16-E7-Peptid-spezifische T-Zelllinien generiert. Dafür wurden 3 Peptide aus dem HPV16-E7-Bereich verwendet (11-20, 82-90, 86-93), die als HLA-A*0201 restringierte Peptide charakterisiert sind (Kast et al., 1994; Rensing et al., 1995). Die Peptide wurden gepoolt, auf DZ geladen und eingesetzt, um T-Zellen zu stimulieren. Nach 4-5 Restimulationen wurden die CD8⁺T-Zellen selektioniert und ihre Spezifität im ELISpot analysiert.

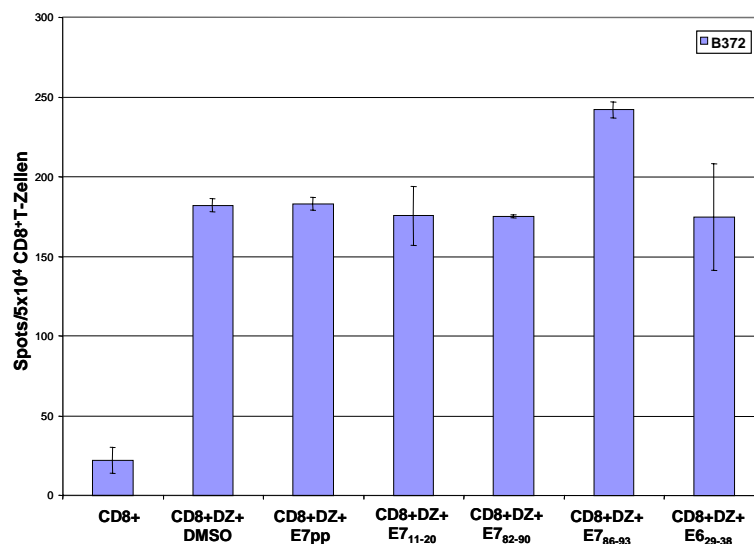


Abb. 3.11: IFN- γ -ELISpottest einer HPV16-E7-Peptid-spezifischen CD8⁺T-Zelllinie. Als Stimulatoren wurden im ELISpot DZ eingesetzt, die mit dem Peptidpool (HPV16-E7₁₁₋₂₀, -E7₈₂₋₉₀, -E7₈₆₋₉₃) bzw. mit den Einzelpeptiden beladen wurden. Als Kontrolle wurden DZ mit dem Peptid HPV16-E6₂₉₋₃₈ beladen bzw. ohne Peptid eingesetzt. E7pp = Peptidpool aus HPV16-E7₁₁₋₂₀, -E7₈₂₋₉₀, -E7₈₆₋₉₃

Die CD8⁺T-Zellen (B372) zeigen ohne Stimulatoren eine geringe spontane IFN- γ -Freisetzung, die mit Stimulation durch autologe, unbeladene DZ deutlich zunimmt. Diese Zunahme kommt möglicherweise durch die Präsentation von Antigenen aus dem AB-Plasma durch die DZ zustande, und wird daher als unspezifische Reaktion der T-Zellen angesehen. Eine etwa gleichhohe IFN- γ -Freisetzung bzw. Spotanzahl zeigt sich bei Stimulation mit dem HPV16-E7-Peptidpool als auch bei Stimulation mit den Einzelpeptiden HPV16-E7₁₁₋₂₀, -E7₈₂₋₉₀ und dem Kontrollpeptid HPV16-E6₂₉₋₃₈. Eine erhöhte Reaktion der CD8⁺T-Zellen kann man bei Stimulation mit dem HPV16-E7₈₆₋₉₃-Peptid erkennen. Die Tatsache, daß mit dem gesamten Peptidpool keine, mit dem Einzelpeptid HPV16-E7₈₆₋₉₃ jedoch eine Antwort induziert wurde, läßt sich möglicherweise auf die Peptidkonzentrationen zurückführen. In beiden Fällen wurden die DZ mit einer Peptidkonzentration von 10 μ g/ml beladen. Möglicherweise ist die Konzentration des HPV16-E7₈₆₋₉₃ im Peptidpool zu gering, um eine Antwort im ELISpot zu erzielen, da im Peptidpool nur ein Drittel der Konzentration des Peptids E7₈₆₋₉₃ vorliegt. Eine weitere mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte die Bindungsaffinität der einzelnen Peptide sein. Die HPV16-E7-Peptide 86-93 und 82-90 weisen eine fast gleichstarke Bindungsaffinität gegenüber dem HLA-A*0201-Allel auf (IC₅₀: 82-90 = 8 nM; 86-93 = 7 nM; 11-20 = 46 nM) (Ressing et al., 1995). Möglicherweise kommt es bei der Beladung mit dem Peptidpool zu einer Konkurrenz zwischen den beiden Peptiden, die zu einer geringeren Präsentation des Peptids 86-93 im Vergleich zur Beladung mit dem Einzelpeptid führt.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß in Donor B272 127 HPV16-E7₈₆₋₉₃-spezifische CD8⁺T-Zellen in 10⁵ CD8⁺T-Zellen mit Hilfe des ELISpotttest detektiert werden konnten. Der zweite Donor (B273) zeigte keine HPV16-E7-Peptid-spezifischen CD8⁺T-Zellen.

3.3 Generierung HPV16-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe von HPV16-E7-RNA-beladenen DZ

Das Ziel war es, DZ mit HPV16-E7-Antigenen in Form von RNA zu beladen und diese zur T-Zellstimulation einzusetzen. Für die Kontrolle der *in vitro* Transkription (IVT) als auch für die Etablierung des RNA-Transfektionsprotokolls wurde parallel zur HPV16-E7-RNA auch EGFP-RNA (Enhanced Green Fluorescent Protein-RNA) synthetisiert.

Die Vorbereitung der Vektoren, die *in vitro*-Transkription (IVT) und die funktionelle Analyse der IVT-EGFP-RNA ist im Material und Methoden-Teil, Abschnitt 2.4, aufgeführt.

3.3.1 Etablierung des RNA-Transfektionsprotokolls für DZ

Die RNA-Transfektion wurde nach dem Protokoll von Nair et al. (1998) etabliert. Dabei wird die RNA entweder mit Liposomen (DMRIE) präkomplexiert und anschließend transfiziert, um sie vor möglichen Degradationen zu schützen und die RNA-Aufnahme zu erhöhen, oder die „nackte“ RNA wird direkt zu den DZ gegeben. Es wird vermutet, daß DZ große Mengen antigenreicher Lösungen internalisieren können, da sie im unreifen Stadium konstitutiv Makropinozytose durchführen und Mannose-Rezeptoren aufweisen. Es wurden DZ eines gesunden Donors generiert und mit 1 µg IVT-EGFP-RNA folgendermaßen transfiziert: nicht polyadenylierte und polyadenylierte RNA wurde entweder mit oder ohne das kationischen Lipid DMRIE transfiziert (analog zu Nair et al., 1998). Die Analyse erfolgte 24 h nach Transfektion mit Hilfe der Durchflußzytometrie. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.2 zusammengefaßt. Die beste Transfektionseffizienz zeigte sich mit polyadenylierter IVT-EGFP-RNA, die ohne Liposomen transfiziert wurde. Es wurden DZ weiterer Donoren mit polyadenylierter IVT-EGFP-RNA ohne kationisches Lipid transfiziert. Die Transfektionseffizienzen lagen im Bereich von 3,3 – 16%.

DZ-Transfektion	Transfektionseffizienz
Kontrolle	1,8 %
nicht-polyadenylierte EGFP-RNA	1 %
nicht polyadenylierte EGFP-RNA + DMRIE	3,5 %
polyadenylierte EGFP-RNA	16 %
polyadenylierte EGFP-RNA + DMRIE	3,3 %

Tab. 3.2: Durchflußzytometrische Analysen von EGFP-RNA-transfizierten DZ. DZ eines gesunden Donors wurden mit nicht polyadenylierter oder polyadenylierter EGFP-RNA transfiziert. Die Transfektion wurde jeweils mit oder ohne kationisches Lipofektionsreagenz DMRIE durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte DZ vermessen. Der prozentuale Anteil grün fluoreszierender DZ 24 Stunden nach Transfektion ist als Transfektionseffizienz angegeben.

3.3.2 Generierung HPV16-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe von HPV16-E7-RNA-transfizierten DZ

Es wurden T-Zelllinien von zwei gesunden Donoren angesetzt. Autologe DZ wurden jeweils mit 1 µg *in vitro* transkribierter HPV16-E7-RNA transfiziert und über Nacht ausdifferenziert. Die RNA-transfizierten DZ wurden dann für die T-Zellstimulation eingesetzt (Verhältnis DZ: T-Zellen 1:30-90). Die T-Zellen ($2,5 \times 10^7$) wurden 4x mit HPV16-E7-RNA-beladenen DZ stimuliert und anschließend eine Woche nur mit frischem Medium und Interleukinen kultiviert. Die T-Zellen wurden zunächst phänotypisch mittels Durchflußzytometrie charakterisiert. Anschließend wurde eine CD8⁺T-Zellselektion durchgeführt, und die CD8⁺T-Zellen im ELISpot auf ihre HPV16-E7-Spezifität getestet.

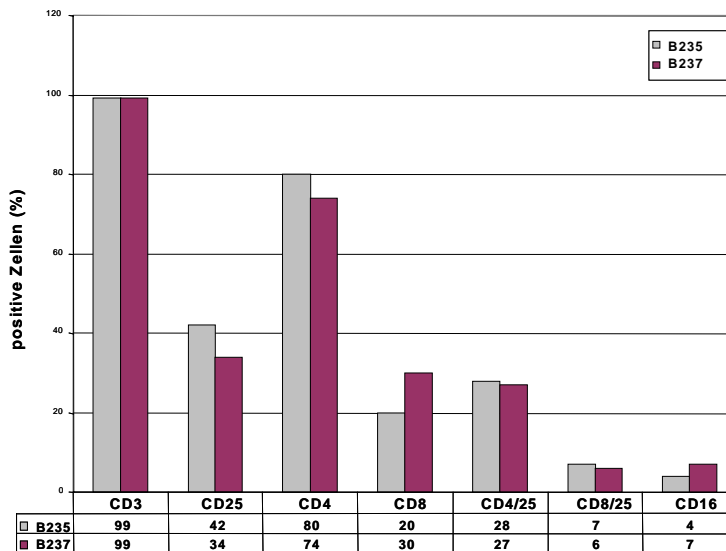


Abb. 3.12: Phänotypische Charakterisierung der T-Zelllinien, die mit IVT-HPV16-E7-RNA-beladenen DZ 4x stimuliert wurden.

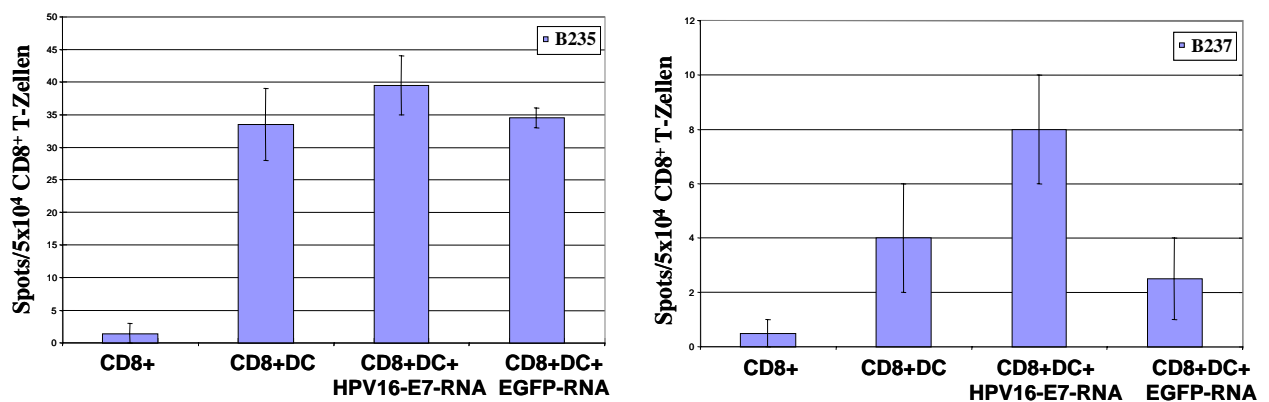


Abb. 3.13: Reaktivität der HPV16-E7-RNA-spezifischen T-Zelllinien B235 und B237 im IFN-γ-ELISpottest. Die CD8⁺T-Zellen beider Linien wurden im ELISpottest mit autologen unbeladenen DZ, mit IVT-HPV16-E7-RNA-transfizierten DZ und mit IVT-EGFP-RNA-transfizierten DZ (Kontrolle) stimuliert.

Man geht davon aus, daß bei der RNA-Beladung von DZ die RNA ins Zytoplasma gelangt, wo sie transkribiert und auch prozessiert wird. Die im Zytoplasma entstehenden Peptide würden dann vorwiegend über den MHC-I-Weg präsentiert werden. Deswegen würde man bei der Stimulation von T-Zellen mit RNA-transfizierten DZ vorwiegend eine Induktion von CD8⁺T-Zellen erwarten. Dies spiegelt sich allerdings nicht in der phänotypischen Charakterisierung wieder, die nur einen prozentualen Anteil von CD8⁺T-Zellen von 20% bzw. 30% aufweist. Das deutet eher auf das ursprüngliche CD4⁺:CD8⁺T-Zellverhältnis hin, das man normalerweise im Blut vorfindet. Auch der Aktivierungsmarker CD25 wird nur zu einem Drittel bzw. Viertel von den CD8⁺T-Zellen exprimiert, was auf keine oder nur eine geringe Aktivierung schließen läßt.

Die CD8⁺T-Zellen des Donors B237 zeigen im ELISpotttest eine höhere IFN- γ -Freisetzung bei Stimulation mit HPV16-E7-RNA-beladenen DZ im Vergleich zu nicht beladenen DZ bzw. mit EGFP-RNA-transfizierten DZ. Aufgrund der geringen Spotanzahl kann man allerdings nicht von einer signifikanten Reaktion sprechen.

Donor B235 zeigt keine HPV16-E7-spezifischen Reaktion im ELISpotttest, sondern eine gleichbleibende IFN- γ -Freisetzung unabhängig von den eingesetzten DZ. Die unbeladenen, autologen DZ induzieren bei diesem Donor bereits einen relativ hohen Hintergrund, der vermutlich durch Präsentation von Antigenen aus dem allogenen AB-Plasma zustande kommt. Von den getesteten Donoren zeigte nur einer „tendenziell“ eine spezifische Reaktion. Da insgesamt nur 2 Donoren getestet wurden, kann über die Effizienz dieser Beladungsmethode für DZ keine Aussage getroffen werden. Parallel zur RNA-Beladungsmethode wurde die Proteinbeladungsmethode etabliert, die vielversprechendere Ergebnisse geliefert hat, so daß die RNA-Beladungsmethoden nicht weiter verfolgt wurde.

3.4 Generierung HPV16-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe von HPV16-E7-DNA.-beladenen DZ

Als weitere Antigenbeladungsmethode wurden DZ mit HPV16-E7-DNA beladen und für die T-Zellstimulation eingesetzt, um die Effizienz dieser Methode zu bestimmen.

3.4.1 Etablierung der DNA-Transfektion DZ

Zur Etablierung des DNA-Transfektionsprotokolls wurden DZ zunächst mit 1 μ g EGFP-cDNA als Reportergen transfiziert. Dafür wurde der Vektor pEGFP-CMV verwendet, der bereits im Labor vorlag. Für die Transfektion wurden verschiedene kommerzielle kationische Lipide verwendet und miteinander verglichen: Fugene, Effecten, Superfect, DMRIE und

DOTAP. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie nach 24 und 48 Stunden bestimmt. Es wurden DZ von zwei gesunden Donoren getestet. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.3 zusammengefaßt. Als Kontrolle wurde für jedes Transfektionsreagenz eine „Mock-Transfektion“ durchgeführt, d.h. eine Transfektion mit dem entsprechenden kationischen Lipid ohne DNA. Die Transfektionseffizienzen lagen abzüglich der Kontrolle (Mock-Transfektion) in einem Bereich von 0-5,4%. Ähnlich geringe Transfektionseffizienzen werden in der Literatur beschrieben, die dennoch ausreichen, um spezifische T-Zellen zu aktivieren (Alijagic et al., 1995).

Da das Transfektionsreagenz „Superfect“ bei einem Donor nach 48 Stunden die höchste Transfektionseffizienz mit 5,4% zeigte, wurde die DNA-Transfektionen für die weiteren Versuche mit Superfect durchgeführt.

B303	DZ co	DZ Fugene	DC Effecten	DZ Superfect	DZ DMRIE	DZ DOTAP
Co 24 h	1,5	1,9	1,2	0,5	1	0,2*
Trafo 24 h	-	2	1,4	1,1	0,8	0,2*
Co 48 h	0,9	1	0,4	0,1	2	1*
Trafo 48 h	-	0,5	2,7	5,5	1,4	0,5*
B304	DZ co	DZ Fugene	DC Effecten	DZ Superfect	DZ DMRIE	DZ DOTAP
Co 24 h	2	1,2	0,7	1	0,8	2*
Trafo 24 h	-	0,3	1,2	1,3	0,3	2,8*
Co 48h	0,2	0,1	0,02	0,3	0,2	1,5*
Trafo 48h	-	0,1	0,04	0,3	0,1	3,7*

Tab. 3.3: DNA-Transfektionseffizienzen dendritischer Zellen der Donoren B303 und B304. Die Transfektion wurde mit dem Vektor pEGFP-CMV und unterschiedlichen kationischen Lipiden durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde durchflußzytometrisch nach 24 und 48 Stunden bestimmt. DZ co = unbehandelte dendritische Zellen als Kontrolle; Co 24h/48h = DZ 24/48 Stunden nach Mocktransfektion; Trafo 24h/48h = DZ 24/48 Stunden nach Transfektion; * M1: bei 10^2 (erhöhte Eigenfluoreszenz der DZ in der FACS-Analyse).

3.4.2 Induktion HPV16-E7-spezifischer T-Zellen mit Hilfe von HPV16-E7-DNA-transfizierten DZ

Dendritische Zellen von zwei gesunden Donoren wurden mit Hilfe des kationischen Lipids Superfect mit 1 µg HPV16-E7-DNA transfiziert, über Nacht ausdifferenziert und für die T-Zellstimulation eingesetzt. Für die Transfektion wurde der Vektor pCR3.1-HPV16-E7 verwendet, der bereits im Labor vorlag. Die T-Zellen wurden insgesamt 4x mit HPV16-E7-DNA-transfizierten DZ restimuliert (Ratio DZ:T-Zellen 1:10-20). Anschließend wurden die

T-Zellen mittels Durchflußzytometrie phänotypisch charakterisiert. Eine Woche später erfolgte eine CD8⁺T-Zell-Selektion. Die CD8⁺T-Zellen wurden im IFN- γ -ELISpot auf ihre HPV16-E7-Spezifität untersucht. Die phänotypische Charakterisierung der beiden T-Zelllinien wies ein CD4⁺:CD8⁺-Verhältnis von 70:30 auf, welches dem Verhältnis naiver T-Zellen entspricht. Auch die CD25-Expression (Aktivierungsmarker) der gesamten T-Zellpopulation war mit 30% relativ gering. Das läßt auf eine geringe T-Zellinduktion schließen. Die CD8⁺T-Zellen wurden im ELISpottest getestet. Als Stimulatoren wurden autologe DZ verwendet, die entweder mock transfiziert oder mit HPV16-E7-DNA transfiziert wurden. Für beide Donoren konnte im ELISpottest keine spezifische IFN- γ -Freisetzung mit Stimulation HPV16-E7-DNA-beladene DZ beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Dies impliziert, daß in der T-Zellkultur keine HPV16-E7-spezifischen T-Zellen induziert worden sind oder keine HPV16-E7-spezifische Vorläuferzellen vorlagen.

3.5 Generierung HPV16-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe von HPV16-E7-Protein-beladenen dendritischen Zellen

Neben der RNA- und DNA-Transfektion stellt die Zugabe von HPV16-E7-Antigenen in Form von Proteinen eine weitere Antigenbeladungsmethode für DZ dar. Die dafür benötigten rekombinant exprimierten HPV-E7-Proteine (HPV16 und HPV18) wurden uns zu Beginn freundlicherweise von Klaus Zumbach (ATV, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Für weiterführende Versuche wurde eigenständig rekombinant exprimiertes Protein produziert und aufgereinigt.

Die Beladung DZ mit den E7-Proteinen erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Santin et al. (1999). Dabei wird das Protein im Komplex mit einem kationischen Lipid (DOTAP) auf DZ geladen. DZ sind in der Lage, Makromoleküle aus der Umgebung über Makropinozytose oder rezeptorvermittelte Endozytose aufzunehmen. Dabei werden exogene Proteine über den MHC-II-Weg prozessiert und präsentiert. Zusätzlich können DZ auch internalisierte Antigene über den MHC-I-Weg prozessieren und präsentieren („Cross-priming“). Bei der Beladung DZ mit dem Protein-Lipid-Komplex soll erreicht werden, daß ein Teil des Proteins über Membranfusion ins Zytosol gelangt, von wo es über den MHC-I-Weg verarbeitet wird. Somit könnten Protein-beladene DZ als Stimulatoren sowohl eine CD8⁺- als auch CD4⁺T-Zellantwort induzieren.

3.5.1 Analyse HPV16-E7-spezifischer T-Helfer-Zellen

Um zu prüfen, ob die Proteinbeladung von DZ prinzipiell funktioniert, wurden T-Zellen eines gesunden Donors mit autologen, HPV16-E7-Protein-beladenen DZ stimuliert. Als Kontrollpopulation wurden T-Zellen desselben Donors mit autologen, unbeladenen DZ stimuliert. Nach 2 Restimulationen wurden beide T-Zelllinien charakterisiert und miteinander verglichen. Es erfolgte eine phänotypische Charakterisierung mittels Durchflußzytometrie, die Berechnung des Expansionsindex und eine Analyse der HPV16-E7-Spezifität im Proliferationstest.

Beide T-Zelllinien zeigen das gleiche $CD4^+ : CD8^+$ T-Zell-Verhältnis von 70:30. Die HPV16-E7-induzierte T-Zelllinie weist allerdings eine deutlich stärkere Aktivierung im Vergleich zur Kontroll-T-Zelllinie auf, die sich in einer 2-fach höheren CD25-Expression ausdrückt. Die CD19-Expression ist in beiden T-Zelllinien gering, was auf eine minimale Kontamination mit B-Zellen hinweist. Der Expansionsindex der HPV16-E7-induzierten T-Zelllinie liegt bei 1,6 im Vergleich zum Expansionsindex der Kontrollpopulation von 0,3, der zeigt, daß es zu einer Abnahme der T-Zellen gekommen ist. Beide Merkmale, sowohl die CD25 Expression als auch der Expansionsindex, weisen auf eine T-Zellaktivierung der HPV16-E7-induzierten T-Zelllinie, nicht aber der Kontrollpopulation, hin.

Um zu überprüfen, ob eine HPV16-E7-spezifische T-Zellaktivierung stattgefunden hat, wurde ein Proliferationstest durchgeführt. Dafür wurden autologe, unbeladene und mit HPV16-E7-Protein-beladene B-LCL verwendet. In Abbildung 3.15 kann man erkennen, daß nur die HPV16-E7-induzierte, nicht aber die Kontroll-T-Zelllinie eine HPV16-E7-spezifische Proliferation zeigt.

Es wurden zwei weitere T-Zelllinien angesetzt, die nur mit HPV16-E7-Protein-beladenen DZ stimuliert wurden. Beide Linien wurden im Proliferationstest auf HPV16-E7-Spezifität überprüft. Dafür wurden entweder DZ mit und ohne HPV16-E7-Protein als Stimulatoren eingesetzt oder es wurden autologe B-LCL verwendet, die entweder mit HPV16-E7- oder HPV18-E7 Protein (als Kontrolle) beladen wurden. Beide T-Zelllinien zeigten eine HPV16-E7-spezifische Proliferation (Daten nicht gezeigt). Daraus kann man schließen, daß die HPV16-E7-Protein-beladene DZ in diesen Donoren eine HPV16-E7-spezifische T-Helfer-Antwort induziert haben und die Proteinbeladung funktioniert hat.

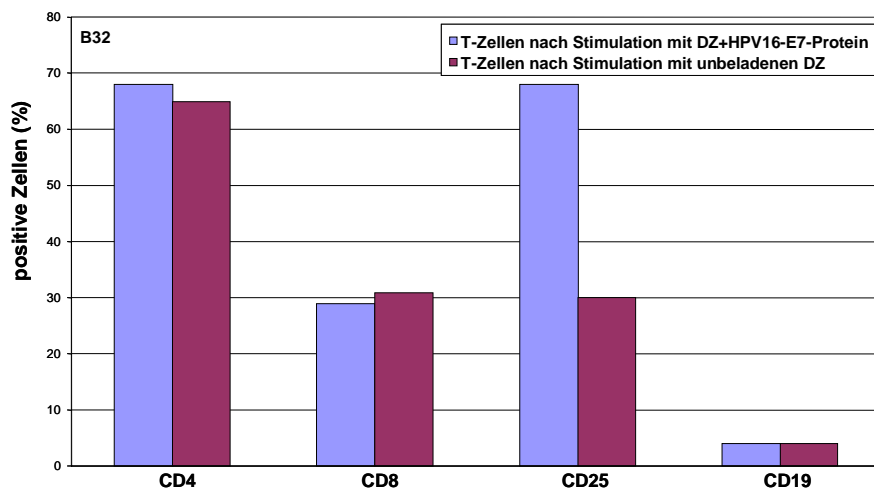


Abb. 3.14: Phänotypische Charakterisierung von T-Zelllinien, die entweder mit HPV16-E7-Protein-beladenen oder mit unbeladenen DZ stimuliert wurden. Die Charakterisierung erfolgte mittels FACS-Analyse. Es wurde der Marker für T-Helfer-Zellen (CD4), für zytotoxische T-Zellen (CD8) und der Aktivierungsmarker (CD25 → α -Kette des IL-2-Rezeptors) analysiert. Die Anzahl positiver Zellen ist in % angegeben.

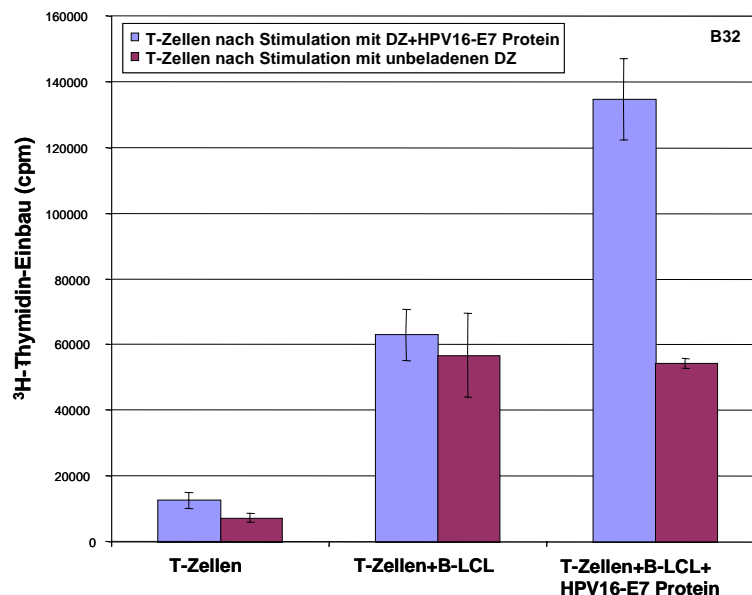


Abb. 3.15: Proliferationstest der T-Zelllinien, die entweder mit HPV16-E7-Protein-beladenen oder mit unbeladenen DZ stimuliert worden sind. 10^4 /Loch autologe mit HPV16-E7-Protein-beladene bzw. unbeladene B-LCL wurden mit den T-Zelllinien für 3 Tage kokultiviert und anschließend für 16 Stunden mit ^3H -Thymidin inkubiert. Der ^3H -Thymidin-Einbau in die DNA der T-Zellen wurde als Maß für die Proliferation gemessen.

3.5.2 Analyse HPV16-E7-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen

Es wurden weitere HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien mit Hilfe von Protein-beladenen DZ angesetzt, um diese sowohl auf eine E7-spezifische T-Helfer-Antwort als auch auf eine E7-spezifische CD8⁺T-Zellantwort untersuchen zu können.

Insgesamt wurden 7 T-Zelllinien angesetzt, die 4-6 mal restimuliert wurden. Das DZ:T-Zell-Verhältnis bei den Restimulationen betrug 1:5 bis 1:25, abhängig von der Verfügbarkeit autologer DZ. Die T-Zelllinien wurden zunächst phänotypisch mittels Durchflußzytometrie charakterisiert und ihr Expansionsindex bestimmt. Anschließend wurde eine CD8⁺T-Zellselektion durchgeführt. Die CD8⁺T-Zellen wurden daraufhin im INF- γ -ELISpot, die CD4⁺T-Zellen im Proliferationstest auf ihre E7-Spezifität untersucht.

DONOR	CD 3	CD 4	CD 8	CD 25
B 49	99	45	42	43
B 58	99	78	16	35
B 59	100	73	20	35
B 60	99	73	20	n.d.
B 63	99	60	28	53
B 64	99	70	26	52
B 67	99	60	37	22

Tab. 3.4: Durchflußzytometrische Analysen der T-Zelllinien, die mit HPV16-E7-Protein-beladenen DZ stimuliert wurden. Die Anzahl positiver Zellen ist in % angegeben.

Donor	Anzahl Restimulationen	Expansionsindex
B49	6	0,32
B58	6	1,2
B59	6	0,8
B60	6	1,4
B63	5	0,7
B64	4	0,1
B67	3	0,2

Tab. 3.5: Anzahl der Restimulationen und Expansionsindex der T-Zelllinien, die mit HPV16-E7-Protein-beladenen DZ stimuliert wurden.

Die verschiedenen T-Zelllinien zeigen ein ursprüngliches $CD4^+ : CD8^+$ T-Zell-Verhältnis von 70:30 mit Ausnahme von Donor B49 und B67, die eine höhere CD8-Expression aufweisen. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 variiert und liegt in einem Bereich von 22-53 %, was die unterschiedliche Aktivierbarkeit der T-Zelllinien aufzeigt.

Der Expansionsindex läßt erkennen, daß nur bei Donor B58 und B60 eine Expansion der ursprünglich ausgesäten T-Zellen stattgefunden hat. Alle anderen Donoren weisen einen Index unter 1 auf, was eine Abnahme der T-Zellanzahl bedeutet. Eventuell sind aber unspezifische T-Zellen abgestorben und spezifische haben sich vermehrt.

Von den insgesamt 7 T-Zelllinien konnten die $CD4^+$ T-Zellen von 5 Donoren (B49, B58, B59, B60, B63) im Proliferationstest auf ihre HPV16-E7-Spezifität getestet werden. Dafür wurden autologe B-LCL verwendet, die entweder unbeladen oder mit HPV16-E7-Protein bzw. HPV18-E7-Protein als Kontrolle beladen wurden. Vier von den fünf getesteten Donoren zeigten eine HPV16-E7-spezifische Proliferation (Donor B58 zeigte keine spezifische Proliferation). Die Ergebnisse eines repräsentativen Donors sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

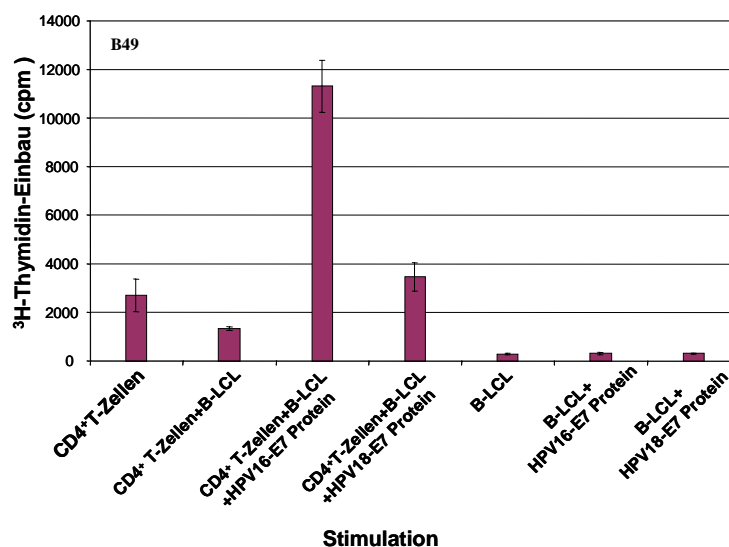


Abb. 3.16: HPV16-E7-spezifische Proliferation der $CD4^+$ T-Zellen des Donors B49. Autologe B-LCL (10^4 /Loch) wurden entweder unbeladen oder beladen mit HPV16-E7-Protein bzw. HPV18-E7-Protein (Kontrolle) mit $CD4^+$ T-Zellen (10^5 /Loch) für 3 Tage kokultiviert und anschließend für 16 Stunden mit 3H -Thymidin inkubiert. Der 3H -Thymidin-Einbau wurde als Maß für die Proliferation gemessen. Die Ergebnisse sind repräsentativ für 4 von 5 getesteten Donoren.

Die CD8⁺Zellen der 7 T-Zelllinien wurden im IFN- γ -ELISpot auf ihre HPV16-E7-Spezifität überprüft. Vier der insgesamt 7 getesteten T-Zelllinien zeigten eine HPV16-E7-spezifische IFN- γ -Freisetzung, deren Ergebnisse in Abbildung 3.17 zusammengefaßt sind. Interessanterweise zeigten diese 4 Donoren (B58, B59, B60, B63) die höchsten Expansionsindizes.

Die CD8⁺T-Zellen des Donors B63 wurden zusätzlich auf Spezifität gegenüber den HLA-A*0201 restringierten HPV16-E7-Peptiden E7₁₁₋₂₀, E7₈₆₋₉₃ und E7₈₂₋₉₀ im ELISpot getestet.

Da die Donoren alle HLA-A2 positiv waren, besteht die Möglichkeit, daß T-Zellen gegen diese Peptide aktiviert worden sind. Das würde zeigen, daß DZ nach der E7-Proteinaufnahme in der Lage sind, diese HPV16-E7-Peptide zu prozessieren und zu präsentieren. Als Stimulatoren wurden T2-Zellen verwendet, weil von Donor B63 keine autologen DZ mehr zur Verfügung standen. T2-Zellen sind HLA-A*0201 positiv und zeichnen sich durch eine TAP-Defizienz aus, d.h. Peptide können nicht mehr ins Endoplasmatische Retikulum transportiert und somit nicht auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Die MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche der Zellen haben schwach affine Signalpeptide gebunden, die durch exogene Zugabe stark affiner Peptide verdrängt werden können. Die T2-Zellen wurden unbeladen und mit den 3 HPV16-Peptiden E7₁₁₋₂₀, E7₈₆₋₉₃ und E7₈₂₋₉₀ beladen als Stimulatoren im ELISpot eingesetzt. Die CD8⁺T-Zellen zeigten gegen alle 3 HPV16-E7-Peptide eine deutlich spezifische IFN- γ -Freisetzung im Vergleich zu den unbeladenen T2-Zellen. Die CD8⁺T-Zellen der anderen Donoren konnten aufgrund der geringen Zellzahl nicht auf die HPV16-E7-Peptide getestet werden.

Von den 7 Donoren wurden insgesamt 5 sowohl im Proliferationstest als auch im ELISpot getestet. Drei von 5 Donoren zeigten in beiden Versuchsansätzen eine HPV16-E7-Spezifität, 1 von 5 nur im Proliferationstest und ebenfalls 1 von 5 nur im ELISpot. Daraus kann man schließen, daß HPV16-E7-Protein-beladene DZ in der Lage sind, sowohl HPV16-E7-spezifische T-Helfer-Zellen als auch HPV16-E7-spezifische CD8⁺T-Zellen in gesunden Donoren zu induzieren. Da nicht bekannt ist, ob die Buffy Coat Spender eine HPV-Infektion aufweisen, kann man eine Aktivierung möglicher Gedächtniszellen in diesem Falle nicht ausschließen.

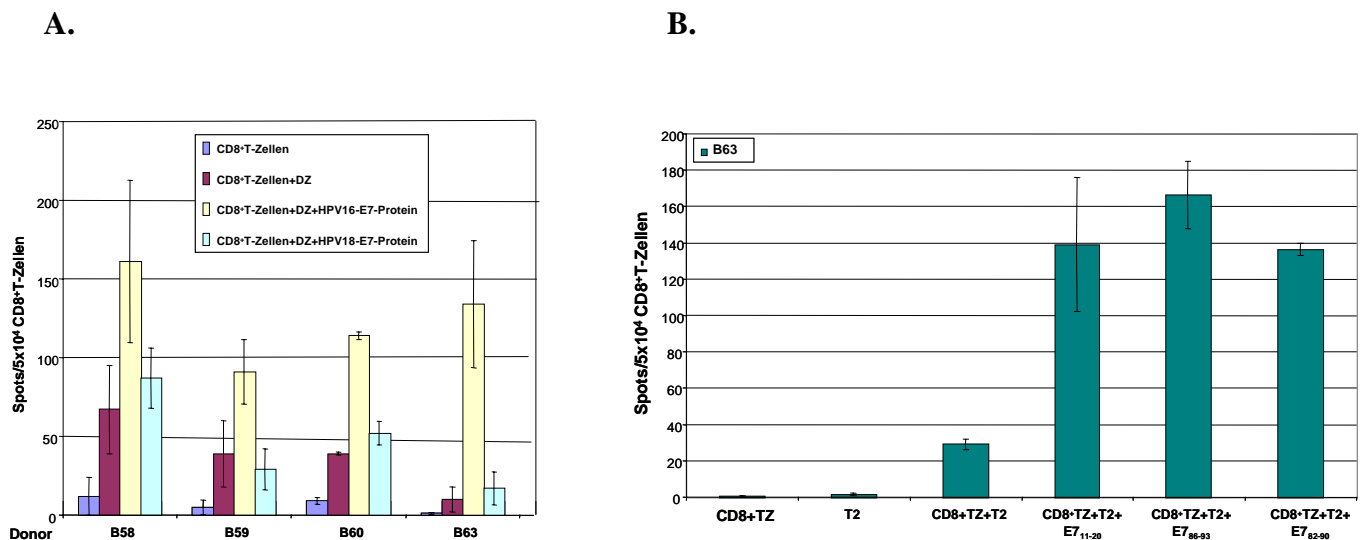


Abb. 3.17: A. IFN- γ -Freisetzung der selektionierten CD8⁺Zellen der T-Zelllinien, die mit HPV16-E7-Protein beladenen DZ stimuliert wurden. Als Stimulatoren wurden autologe DZ verwendet, die entweder nicht oder mit HPV16-E7-Protein bzw. mit HPV18-E7-Protein (Kontrolle) beladen wurden. Die Ergebnisse der 4 reaktiven Donoren sind dargestellt. B. IFN- γ -Freisetzung der CD8⁺T-Zellen der HPV16-E7-spezifischen T-Zelllinie des Donors B63. Als Stimulatoren wurden T2-Zellen verwendet, die mit den HLA-A*0201 restringierten HPV16-E7-Peptiden (E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀, E7₈₆₋₉₃) beladen wurden. Als Kontrolle wurden unbeladene T2-Zellen eingesetzt.

3.6 Direkter Vergleich der DZ-Beladungsmethoden

Es wurden drei Antigenbeladungsmethoden für DZ etabliert: die RNA-Transfektion, die DNA-Transfektion und die Proteinbeladung. Die Effizienz der Antigenbeladung und Antigenpräsentation wurde anhand der Induktion spezifischer T-Zellen gemessen.

Für die Etablierung und Analyse der Beladungsmethoden wurden jeweils Zellen von verschiedenen Donoren verwendet, die unterschiedliche Parameter bezüglich der Anzahl und der funktionellen Aktivität ihrer Zellen (DZ, T-Zellen) und der spezifischen Vorläuferzellen u.a. aufweisen. Für die Analyse einer Vakzinierungsstrategie ist es von Bedeutung, verschiedene Donoren zu testen, um diese Variabilität berücksichtigen zu können. Für einen direkten Methodenvergleich ist es jedoch von Vorteil, diese variablen Parameter der Donoren ausschließen zu können. Deswegen wurden HPV16-E7-spezifische T-Zellen generiert und mit den unterschiedlich beladenen DZ eines Donors parallel analysiert. Für die Generierung der HPV16-E7-spezifischen T-Zelllinien wurden DZ für die Stimulation verwendet, die mit einer HPV16-E7-Peptidbibliothek beladen worden waren. Diese Peptidbibliothek besteht aus 8 Peptiden, die 20 AS lang sind und die letzten 9 AS jeweils überlappen, um alle MHC-I-Epitope (Nonamere) des E7-Proteins von HPV16 abzudecken.

Die T-Zellen wurden 3-4 x mit DZ, die zuvor mit der HPV16-E7-Peptidbibliothek gepulst wurden, restimuliert. Es erfolgte eine Separation der T-Zellpopulationen (CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen) und Analyse der HPV16-E7-Spezifität im Proliferationstest und im ELISpot. Für die Analyse wurden autologe DZ verwendet, die mit den unterschiedlichen Methoden mit HPV16-E7-Antigen beladen wurden.

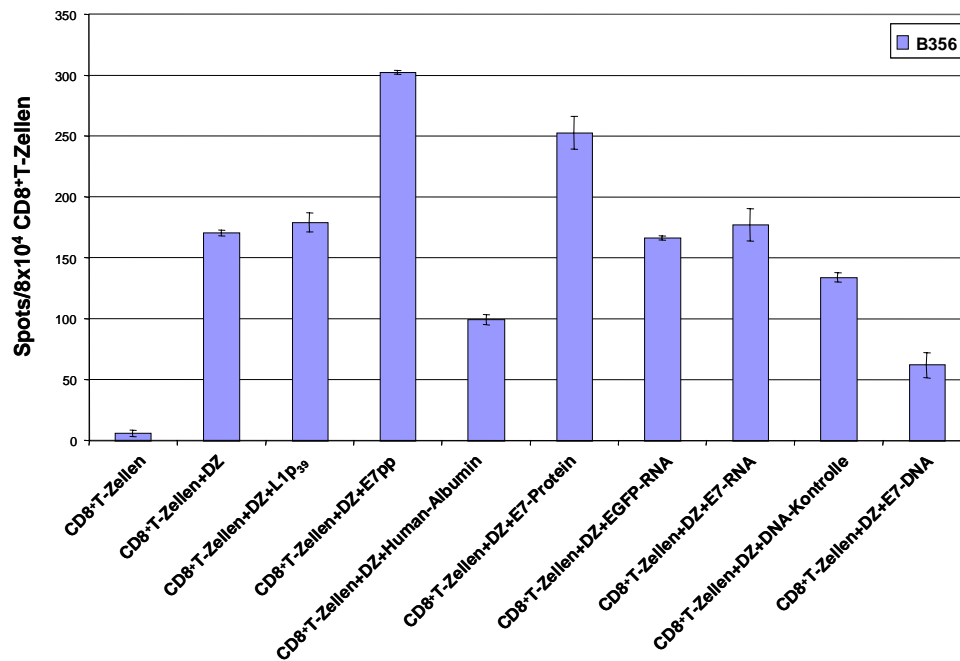
HPV16-E7 Beladung	E7-Peptidbibliothek	E7-RNA	Transfektion mit E7-DNA	E7-Protein
Kontrolle	L1-Peptid ₃₉ HPV18	EGFP-RNA	mock-Transfektion	Human-Albumin

Tab. 3.6: Verschiedene Beladungsmethoden und entsprechende Kontrollen für die DZ, die als Stimulatoren im ELISpot und Proliferationstest verwendet wurden.

Es wurde die RNA-, die DNA- und die Proteinbeladung miteinander verglichen. Für jede Beladungsmethode wurde eine entsprechende Kontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich unbeladene autologe DZ verwendet. Als Positivkontrolle wurden die DZ mit der HPV16-E7-Peptidbibliothek beladen. Insgesamt wurden T-Zelllinien von 4 Donoren angelegt, von denen 2 evaluierbar waren, weil nur zwei Donoren sowohl im ELISpot als auch im Proliferationstest eine deutliche Reaktion gegenüber der Positivkontrolle (HPV16-E7-Peptidbibliothek) zeigten und deswegen als HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien angesehen wurden. Diese Donoren zeigten auch eine spezifische Proliferation bei Stimulation mit HPV16-E7-Protein-beladenen DZ, nicht aber mit E7-RNA- oder E7-DNA-beladenen DZ. Einer der beiden Donoren wies auch eine spezifische IFN- γ -Freisetzung bei Stimulation der CD8⁺T-Zellen mit HPV16-E7-Protein-beladenen DZ auf.

Aufgrund dieser Ergebnisse und der Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen wurde die Proteinbeladungsmethode als die effizienteste Methode in diesem System angesehen, um HPV16-E7-spezifische T-Zellen in gesunden Donoren induzieren zu können. Die RNA- und DNA-Beladungsmethode wurde deshalb nicht weiter verfolgt.

A.



B.

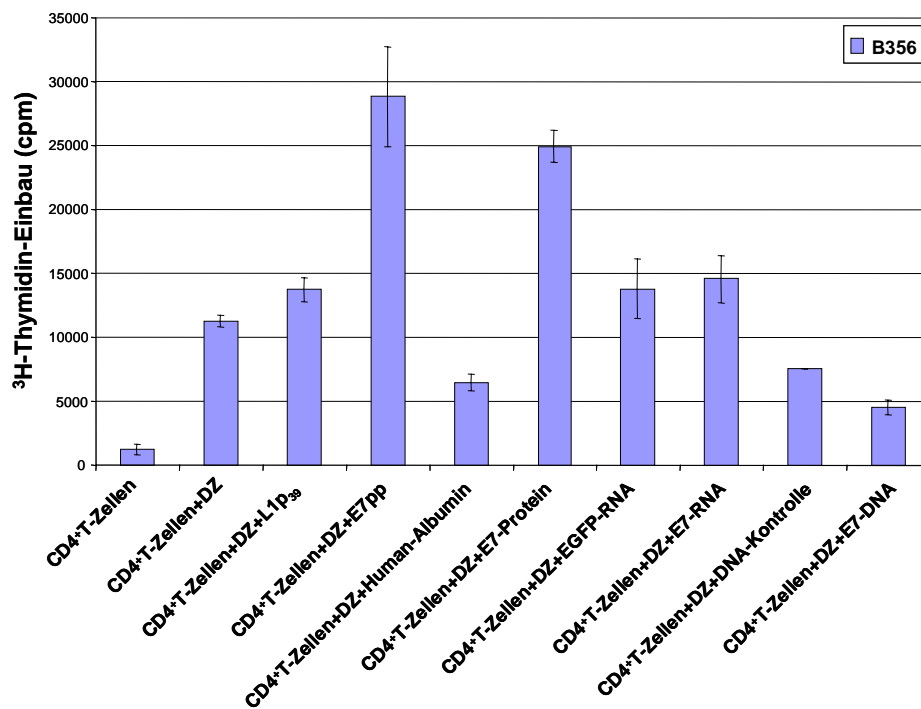


Abb. 3.18: Vergleich unterschiedlicher Beladungsmethoden für DZ im IFN- γ -ELISpot (A) und Proliferationstest (B). Es wurden HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien generiert, eine CD8⁺-Selektion durchgeführt und die separierten Populationen auf ihre Spezifität überprüft. Dafür wurden autologe DZ verwendet, die unterschiedlich mit HPV16-E7-Antigen beladen wurden. Die T-Zelllinien wurden dann als HPV16-E7-spezifisch bezeichnet, wenn sie eine deutliche Reaktion gegenüber DZ zeigten, die mit der Peptidbibliothek (pp = Peptidpool) gepulst wurden. Die Ergebnisse von einem der zwei HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien sind dargestellt.

3.7 Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von HPV16-E7- und HPV18-E7-Proteinen

Die Proteinbeladungsmethode hat sich in unserem System als die effizienteste Methode erwiesen. Um weiterführende Versuche in diese Richtung durchführen zu können, wurde zunächst rekombinantes HPV16-E7- und HPV18-E7-Protein in unserem Labor synthetisiert. Dafür wurden die cDNA-Sequenzen von HPV16-E7 und HPV18-E7 in einen Expressionsvektor kloniert, die Proteine rekombinant exprimiert und aufgereinigt. Da für HPV16-E7, HPV18-E7 und C4.8, das teilweise als Kontrollprotein verwendet wurde, die gleichen Arbeitsschritte vorgenommen wurden, beschränkt sich die Dokumentation im Wesentlichen auf die Vorgehensweise der Expression und Aufreinigung von HPV16-E7-Protein. Wenn es im Text nicht anders vermerkt ist, erfolgte die Vorgehensweise der beiden anderen Proteine analog.

3.7.1 Klonierung

Die E7-Sequenzen von HPV16 und HPV18 mußten zunächst in den bakteriellen Expressionsvektor pET29a umkloniert werden. Dafür wurden die E7-Sequenzen beider HPV-Typen aus den vorliegenden pBK-Vektoren (pBK-HPV16-E7, pBK-HPV18-E7) mittels PCR amplifiziert. Die Primer wurden mit den entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die Umklonierung gewählt. Der Vektor pET29a-C4.8 lag bereits im Labor vor (Ines Stein, Jena).

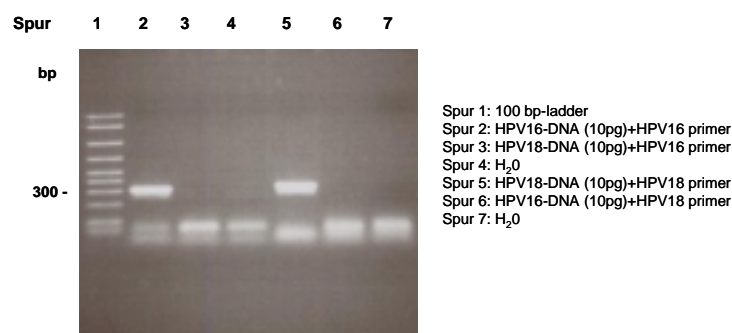


Abb. 3.19: Agarosegel mit den PCR-Amplifikaten von HPV16- und HPV18-E7. Als Kontrolle wurde H₂O bzw. der jeweilige andere HPV-Typ in die PCR eingesetzt. Die Inserts sind auf einer Höhe von 300 bp zu erkennen, was ca. der Größe der E7-Sequenzen entspricht (E7-HPV16: 297 bp; E7-HPV18: 314 bp).

Die amplifizierten Inserts wurden aus dem Agarosegel aufgereinigt und zusammen mit dem Vektor pET29a mit den Restriktionendonukleasen EcoRI und XhoI verdaut. Die Abtrennung der Oligonukleotide erfolgte mittels "QIAquick Nucleotide Removal Kit". Darauf folgte die

Ligation und Transformation von JM 109 Bakterien für die Analyse. Von Übernachtskulturen wurden DNA-Mini-Präparationen der Klone mit anschließendem analytischen Verdau durchgeführt. Abbildung 3.20 zeigt, daß ein Insert mit einer Größe von ca. 300 bp aus allen Klonen mit Ausnahme von Klon pET29a-18-E7-8 herausgeschnitten werden kann. Die Klone wurde anschließend in unserem Labor von Katrin Beer sequenziert.

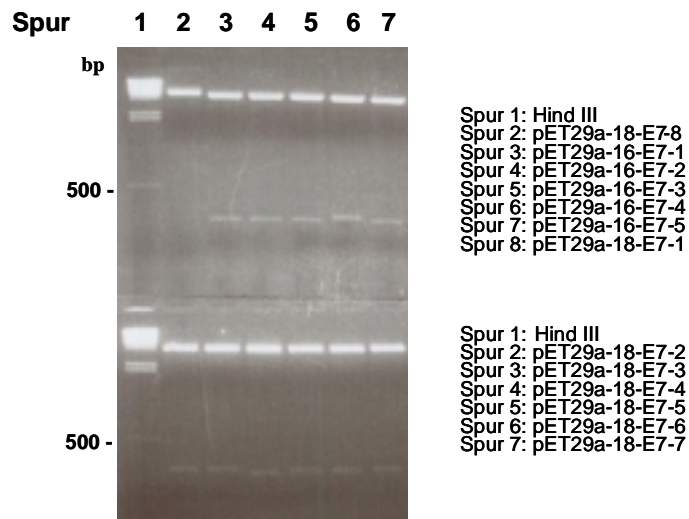


Abb.3.20: Analytischer Verdau verschiedener HPV16/18-E7-Klone im Agarosegel. Für den Restriktionsverdau wurden die Enzyme EcoRI und XhoI verwendet. Aus allen Klonen bis auf Klon pET29a-18-E7-8 konnte ein Insert der Größe von ~ 300 bp herausgeschnitten werden.

3.7.2 Expression und affinitätschromatographische Aufreinigung

Die Vektoren pET29a-HPV16-E7, pET29a-HPV18-E7 und pET29a-C4.8 wurden in die Expressionsbakterien BL21DE3 transformiert und zunächst im analytischen Maßstab auf ihre Proteinexpression getestet. Dafür wurden Übernachtskulturen für 3 Stunden mit IPTG induziert. Es wurde jeweils vor und nach Induktion eine Probe entnommen, um den Gesamtproteingehalt der Bakterien zu vergleichen. Die Proben wurden aufgearbeitet und im SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Nach Induktion kann man im Coomassie-gefärbten Polyacrylamidgel (Abb. 3.21) deutlich eine zusätzliche Bande in der Höhe von ~ 25 kDa erkennen, die vom Molekulargewicht dem HPV16-E7-Protein entspricht. HPV16-E7 selbst hat ein Molekulargewicht von 11 kDa, zeigt aber im SDS-Polyacrylamidgel ein Laufverhalten von 18 kDa (Armstrong und Roman, 1993). Die Größe von 25 kDa erklärt sich durch das hinzukommende Molekulargewicht des S-tags, des His-tags und der Thrombinspaltungsstelle, die in dem Fusionsprotein enthalten sind.

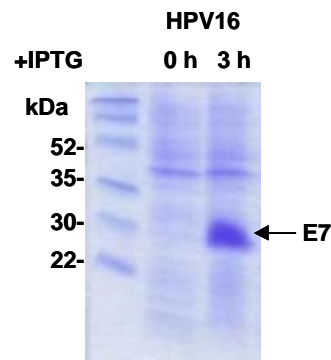


Abb. 3.21: Gesamtproteininhalt der pET29a-HPV16-E7 transformierten Expressionsbakterien vor und nach IPTG-Induktion im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel.

Für die Proteinexpression im präparativen Maßstab wurden 4 x 200 ml Großkulturen angelegt und durch Zugabe von IPTG für 3 Stunden induziert. Anschließend wurden die Kulturen pelletiert, vereinigt und über Nacht aufgeschlossen. Für die affinitätschromatographische Reinigung wurde das exprimierte, rekombinante Protein auf eine vorbereitete Nickel-NTA-Agarose-Säule aufgetragen und mit einem pH-Stufengradienten eluiert. Während der Reinigung wurde permanent die optische Dichte bei 280 nm dokumentiert. Ein solches Schreiberprofil ist in Abbildung 3.22 zu sehen. Aliquots der gesammelten Fraktionen wurden im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins untersucht. Für die Identifizierung des rekombinanten Proteins wurde zusätzlich ein Western-Blot durchgeführt. Für die Detektion von HPV16-E7 im Western-Blot wurde ein monoklonaler Maus- α -HPV16-E7-Antikörper verwendet. Für den Nachweis von HPV18-E7 bzw C4.8 wurde das S-Protein, das spezifisch an das S-tag bindet, im Western-Blot eingesetzt.

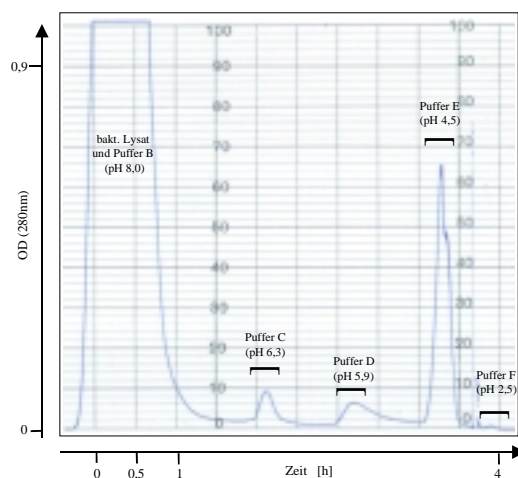


Abb. 3.22: Elutionsprofil der affinitätschromatographischen Reinigung des rekombinanten HPV16-E7-Proteins. Zu sehen ist die Aufzeichnung der Messung der Extinktion bei 280 nm während der Aufreinigung. Während der Elution des rekombinanten Proteins mit Puffer E (pH 4,5) wurden Fraktionen zu je 500 μ l gesammelt.

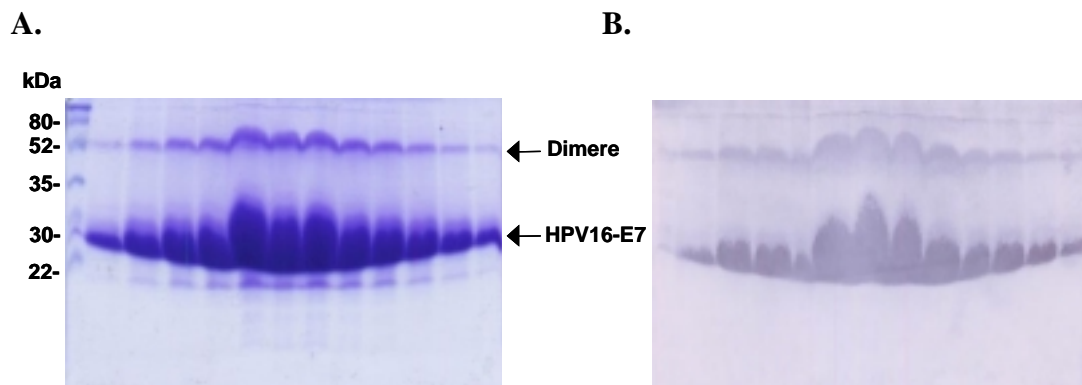


Abb. 3.23: Analyse der eluierten Fraktionen der Affinitätschromatographischen Reinigung von HPV16-E7-Protein im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (A) und im Western-Blot (B). Die Pfeile deuten das HPV16-E7-Protein und dessen Dimere an.

Die positiven Fraktionen wurden nach der Affinitätschromatographischen Aufreinigung vereinigt. Für die *in vitro*-Analysen wurde sowohl E7-Protein mit als auch ohne S-tag verwendet. Für *in vivo* Applikationen sollte das Protein so wenig Fremdantigene wie möglich enthalten. Deswegen wurde eine Thrombinspaltung durchgeführt, um das S-tag zu entfernen. Dafür wurden die vereinigten Fraktionen in "Spaltungspuffer" umgepuffert und für 16 Stunden bei 30°C mit Thrombin verdaut. Die Effizienz der Spaltung wurde im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel überprüft (Abb. 3.24). Neben der Bande des gespaltenen Proteins kann man zusätzlich eine ca. 80 kDa Bande erkennen, die das eingesetzte Thrombin darstellt. Das abgespaltene S-tag ist auf dem abgebildeten SDS-Polyacrylamidgel nicht mehr zu sehen, da das Gel zu weit gelaufen ist.

Die Proteine wurden in einem weiteren Schritt mit Hilfe der "PrepCell" aufgereinigt, um das abgespaltene S-tag, das Thrombin und mögliche bakterielle Kontaminationen zu entfernen. Dafür wurden die Proben eingeeengt und auf die PrepCell aufgetragen. Während der Auftrennung der Proteine im Gel der PrepCell wurden die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine am Ende des Gels kontinuierlich eluiert. Das Eluat wurde in 30 Fraktionen zu je 300 µl gesammelt. Diese wurden im Anschluß an den PrepCell-Lauf durch Analyse in einem SDS-Polyacrylamidgel auf das Vorhandensein des rekombinanten Proteins untersucht. Abbildung 3.25 zeigt exemplarisch die Analyse einiger Fraktionen, die während der Gelelektrophorese gesammelt wurden. Die durch die PrepCell erfolgte Größentrennung ist deutlich sichtbar. Zuerst wurden Proteine niedrigeren Molekulargewichts eluiert wie bakterielle Kontaminationen als auch das S-tag nach durchgeführter Thrombinspaltung. Anschließend folgte der Übergang zu den rekombinanten Proteinen.

Die Fraktionen, die nur eine singuläre Bande mit entsprechender Größe zeigten, wurden vereinigt, eingengt und in einen physiologischen Puffer umgepuffert. Die Konzentration wurde nach Bradford ermittelt.

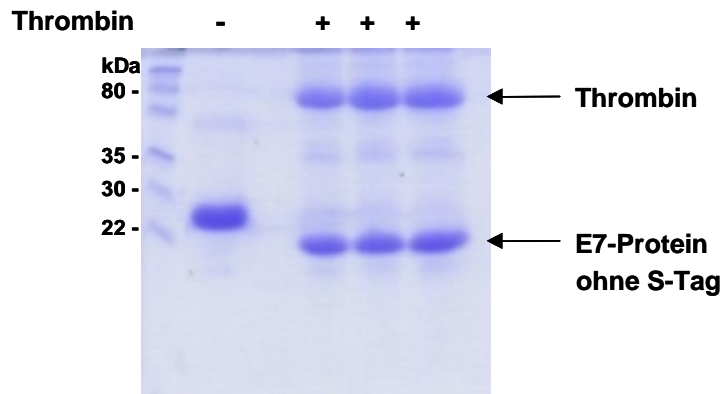


Abb. 3.24: Thrombinspaltung des rekombinaten Proteins zur Entfernung des S-tags.

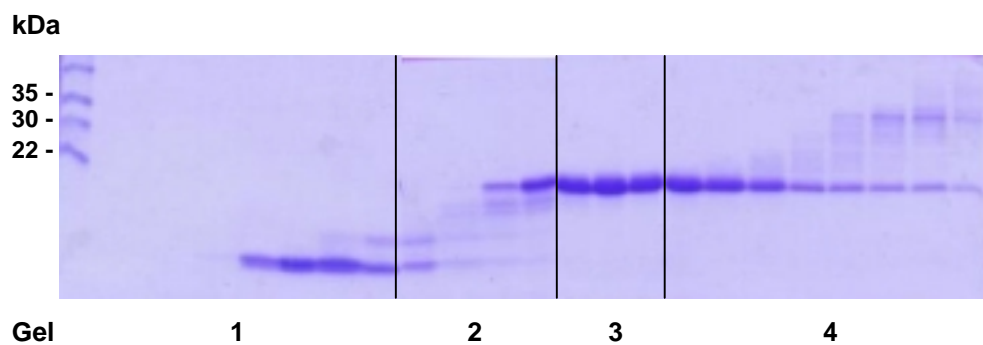


Abb. 3.25: Analyse eluierter Fraktionen nach Reinigung durch Gelelektrophorese mittels "PrepCell". Die Fraktionen wurden auf mehreren SDS-Polyacrylamidgelen analysiert, die in dieser Abbildung zusammengeschnitten wurden, um die Größentrennung zu verdeutlichen. Zwischen Gel 2+3 und 3+4 sind nicht alle vorhandenen Fraktionen gezeigt.

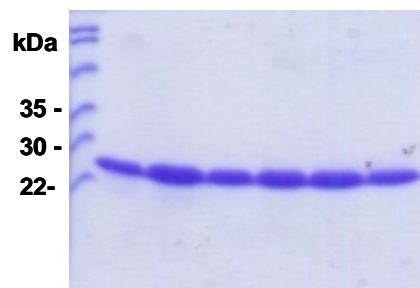


Abb. 3.26: Durch Gelelektrophorese aufgereinigte Fraktionen, die nur eine singuläre Bande mit HPV16-E7-S-tag Protein aufweisen. Coomassie-gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel.

Die Proteine wurden im Anschluß auf Toxizität und DNA-Kontaminationen überprüft. Zum Austesten der Toxizität wurden DZ oder B-LCL mit Protein im Komplex mit DOTAP beladen und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin mittels Zellzählung und Trypan-Blaufärbung in der Neubauer-Zählkammer auf ihre Vitalität überprüft.

Weiterhin wurden die Proteine auf ihre Reinheit mit Hilfe einer Silberfärbung überprüft.

Die Silberfärbung ist gegenüber der Coomassie-Färbung deutlich sensitiver. Die Nachweisgrenze der Silberfärbung beträgt 2 ng Protein je Bande. Es wurden 500, 50 und 5 ng HPV16-E7-Protein in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Hilfe einer Silberfärbung sichtbar gemacht. In Abb. 3.27 ist zu sehen, daß 5 ng HPV16-E7-Protein mittels Silberfärbung nicht mehr detektierbar sind. Bei einer Konzentration von 50 bzw. 500 ng Protein ist neben der Proteinbande von HPV16-E7 keine zusätzliche Bande erkennbar. Da 50 ng Protein noch deutlich sichtbar sind, und man bei 500 ng keine zusätzliche Bande erkennen kann, ist davon auszugehen, daß das Protein keine Kontaminationen $\geq 10\%$ enthält.

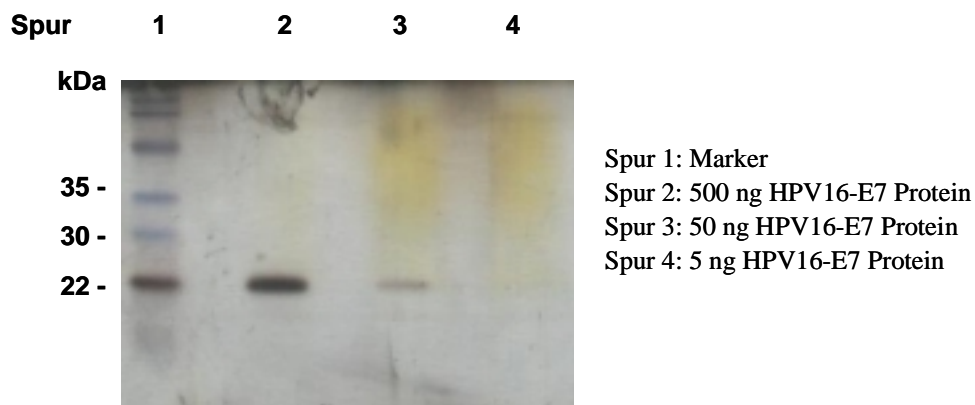


Abb. 3.27: 15% SDS-Polyacrylamidgel, Silber-Färbung

Desweiteren wurden die Proteine auf Plasmid-DNA-Kontaminationen analysiert. Dafür wurden in einem Ansatz 20 µg Protein, die auch für die Beladung von DZ eingesetzt wurden, mittels PCR auf DNA-Kontaminationen untersucht. Zur Bestimmung der Nachweisgrenze und als Kontrolle wurde das Protein zusätzlich mit 1 pg, 100 pg und 1 ng pET29a-16-E7-DNA versetzt und in die PCR eingesetzt. Dabei konnte die zugesetzte Plasmid-DNA nicht nachgewiesen werden. Bei Durchführung der PCR mit H₂O statt Protein lag die Nachweisgrenze im fg-Bereich. Wahrscheinlich konnten im Proteinansatz die eingesetzten Primer aus sterischen Gründen nicht an die Plasmid-DNA binden. Deswegen wurde vor

Durchführung der PCR ein Proteinase K Verdau durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mittels "QIAamp DNA Mini Kit" aufgereinigt und dann erst mittels PCR analysiert. Als Positivkontrolle wurde der gleiche Ansatz statt mit Protein mit H₂O durchgeführt.

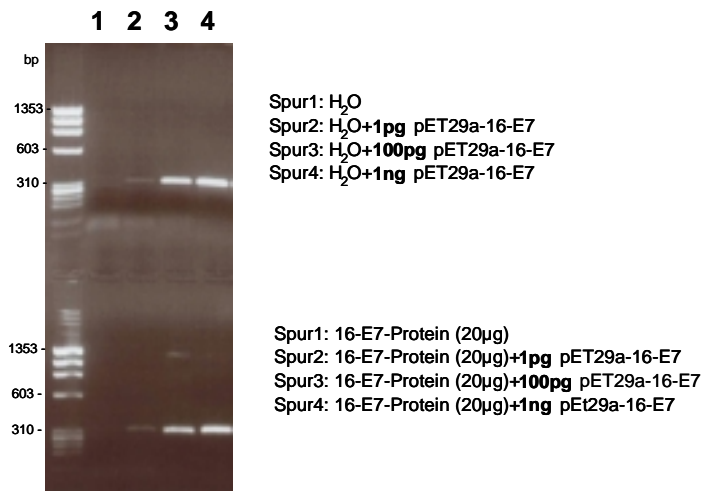


Abb. 3.28: Proteinanalyse auf DNA-Kontaminationen. PCR-Produkte im Agarosegel.

Sowohl im Ansatz mit H₂O als auch im Proteinansatz kann 1 pg zugesetzte Plasmid-DNA nach Proteinase K Verdau und DNA-Aufreinigung nachgewiesen werden. Da der Ansatz mit dem Protein alleine keine Bande aufweist, kann man davon ausgehen, daß das Protein keine DNA-Kontamination ≥ 1 pg enthält. 1 pg enthält trotzdem noch ca. $1,4 \times 10^5$ Kopien des Plasmids (bei 0,007 fg/Vektor). Durch die Aufreinigungsschritte geht möglicherweise Plasmid-DNA verloren, so daß sich die Nachweisgrenze im Vergleich zur PCR ohne vorherigen Proteinase K Verdau und DNA-Aufreinigung verringert.

Man muß beachten, daß das Protein mit der DNA-Kontamination bei einer potentiellen Vakzinierung nicht direkt in den Menschen appliziert wird, sondern für die Beladung von DZ *ex vivo* für 3 Stunden eingesetzt wird. Diese Zellen werden im Anschluß an die Beladung als auch nach Ausdifferenzierung mehrmals gewaschen, so daß mögliche Plasmid-DNA-Kontaminationen ≥ 1 pg erheblich reduziert werden.

Beide HPV16-E7-Proteine (in E.coli bzw. in Hefe (Heidelberg) exprimiert) wurden auf DZ geladen und zur Generierung HPV16-E7-spezifischer T-Zelllinien eingesetzt. Anhand dieser T-Zelllinien wurden die HPV16-E7-Proteine aus den unterschiedlichen Quellen gegeneinander getestet und als äquivalent gefunden.

3.8 Generierung HPV16- und HPV18-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe von E7-Protein beladenen DZ

Nach Etablierung der methodischen Vorgehensweise wurde die Induktion von spezifischen T-Zellen an einer größeren Anzahl von gesunden Blutspendern analysiert. Zusätzlich wurden neben HPV16- auch HPV18-E7-spezifische T-Zelllinien generiert. Es wurden T-Zelllinien mit Hilfe autologer HPV16-E7- oder HPV18-E7-Protein-beladenen DZ angelegt und wöchentlich restimuliert. Nach 3-5 Restimulationen wurde eine CD8⁺-Selektion durchgeführt. Die getrennten T-Zellpopulationen wurden dann auf HPV-E7-Spezifität untersucht. Die CD8⁺T-Zellen wurden im IFN- γ -ELISpot analysiert. Als Stimulatoren wurden immer autologe DZ verwendet, die mit dem entsprechenden HPV-E7-Protein beladen wurden. Als Kontrolle wurden DZ mit dem E7-Protein des jeweils anderen HPV-Typs, mit C4.8 und nur mit DOTAP beladen. Wenn ausreichend CD8⁺T-Zellen zur Verfügung standen, wurden zusätzlich die HLA-A*0201 restringierten E7-Peptide von HPV16 getestet, die auf T2-Zellen geladen wurden. Die CD4⁺T-Zellen wurden im Proliferationstest analysiert. Als Stimulatoren wurden dafür autologe B-LCL verwendet, die entsprechend der Stimulatoren im ELISpot mit Protein beladen wurden. Es wurden insgesamt T-Zelllinien von 18 unterschiedlichen Donoren angesetzt. Davon konnten 12 Donoren sowohl auf spezifische zytotoxische T-Zellen als auch auf spezifische T-Helfer-Zellen untersucht werden. 4 Donoren konnten nur im ELISpot und 2 Donoren nur im Proliferationstest analysiert werden. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Die T-Zelllinien wurden dann als E7-spezifisch gewertet, wenn sie eine deutlich spezifische Reaktion gegenüber dem entsprechenden E7-Protein und/oder den HPV16-E7-Peptiden bei den HPV16⁺ Donoren zeigten. In 8 Fällen der insgesamt 19 positiven Reaktionen (im ELISpot und Proliferationstest) konnten "Kreuzreaktionen" zwischen den E7-Proteinen von HPV16 und HPV18 beobachtet werden, d.h. HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien zeigten nicht nur eine Reaktion gegenüber HPV16-E7-Protein-beladenen Stimulatoren, sondern auch gegenüber Stimulatoren, die mit HPV18-E7-Protein beladen wurden (und umgekehrt). Da die T-Zellen dabei aber keine Reaktion gegen DZ/B-LCL zeigten, die nur mit DOTAP oder C4.8 beladen worden waren, kann man eine unspezifische Reaktion gegenüber DOTAP, dem S-tag oder bakterielle Kontaminationen ausschließen. Die beobachteten Reaktionen der HPV16-E7-spezifischen T-Zelllinien gegenüber HPV18-E7-Protein-beladenen Stimulatoren bzw. umgekehrt, könnten für eine eventuelle Kreuzreaktivität in diese Donoren sprechen, die aber nicht systematisch untersucht worden ist. Bei der Beladung DZ mit E7-Protein können prozessierte Epitope prinzipiell über alle HLA-Moleküle (MHC-I und-II) des entsprechenden

Donors präsentiert werden. Da die Aminosäuresequenzen der E7-Proteine von HPV16 und HPV18 eine Homologie von 42 % aufweisen, besteht zumindest die Möglichkeit, daß sequenz- oder strukturähnliche Peptide bezüglich eines bestimmten HLA-Moleküls eine Kreuzreaktion auslösen.

Donor	HPV-Antigen	ELISpot 16-E7	ELISpot 18-E7	Proliferation 16-E7	Proliferation 18-E7
B92	16-E7	+	+	-	-
B104	16-E7	-	-	+	+
B116	16-E7	+	-	-	-
B117	16-E7	-	-	+	+
B169	16-E7	+	-	n.d.	n.d.
B187	16-E7	n.d.	n.d.	+	+
B215	16-E7	+	+	+	-
B217	16-E7	+	-	n.d.	n.d.
B218	16-E7	+	-	+	-
B126	16-E7	+	-	+	-
B128	16-E7	-	-	+	-
Σ E7⁺	16-E7	7/10	2/10	7/9	3/9
B92	18-E7	-	-	-	+
B104	18-E7	+	+	-	-
B116	18-E7	+	+	n.d.	n.d.
B117	18-E7	n.d.	n.d.	+	+
B127	18-E7	-	-	-	-
B167	18-E7	-	+	n.d.	n.d.
B178	18-E7	-	-	-	-
Σ E7⁺	18-E7	2/6	3/6	1/5	2/5

Tab. 3.7: Anzahl HPV16-E7- und HPV18-E7-spezifischer T-Zelllinien. Die Ergebnisse aller 18 generierten T-Zelllinien sind zusammengefaßt dargestellt. Die Spalte HPV-Antigen zeigt an, welches HPV-E7-Protein für die Generierung der T-Zelllinie verwendet wurde. Die Ergebnisse des ELISpots repräsentieren die HPV-E7-spezifische IFN- γ -Freisetzung der CD8⁺T-Zellen. Dagegen repräsentieren die Ergebnisse des Proliferationstests die HPV-E7-spezifische Proliferation der CD4⁺T-Zellen. Zusätzlich enthält die Tabelle die Ergebnisse der T-Zelllinien gegenüber des jeweiligen anderen HPV-Typs im ELISpot bzw. im Proliferationstest.

Insgesamt konnten 12 T-Zelllinien sowohl im ELISpot als auch im Proliferationstest analysiert werden. Dabei zeigten 3/12 T-Zelllinien sowohl HPV-E7-spezifische CD4⁺ als auch CD8⁺T-Zellen, 3/12 zeigten nur HPV-E7-spezifische CD8⁺T-Zellen, 4/12 nur HPV-E7-spezifische CD4⁺T-Zellen und 2/12 keine HPV-E7-spezifischen T-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, daß autologe, mit E7-Protein-beladene DZ, spezifische T-Zellen in mehr als 80% der gesunden Donoren aktivieren könnten. Es besteht allerdings die Möglichkeit, daß neben einer *de novo* Induktion E7-spezifischer T-Zellen auch vorhandene Gedächtniszellen aktiviert worden sind,

da die Buffy Coat Spender nicht auf HPV-Infektionen untersucht wurden. Möglicherweise waren die negativen Donoren bisher noch nie HPV exponiert, und es konnte aufgrund fehlender E7-spezifischer Vorläuferzellen keine E7-spezifische T-Zellantwort induziert bzw. aktiviert werden.

Die Auftrennung der Ergebnisse nach HPV-Typen zeigt, daß in mehr Donoren eine HPV16-E7- als eine HPV18-E7-spezifische T-Zellantwort aktiviert wurde. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die höhere Durchseuchungsrate mit HPV16 im Vergleich zu HPV18 in der Bevölkerung sein.

3.9 Generierung und Charakterisierung DZ von Zervixkarzinompatientinnen

Es konnte gezeigt werden, daß HPV16- bzw. HPV18-E7 Protein-beladene DZ E7-spezifische T-Zellen in > 80 % der untersuchten gesunden Donoren induzieren bzw. aktivieren konnten. Um diese Methode als potentielle Vakzinierungsstrategie weiterzuverfolgen, wurden im nächsten Schritt DZ von Zervixkarzinompatientinnen auf Phänotyp und Funktionalität untersucht. Hierfür wurden PBL aus Blut von Zervixkarzinompatientinnen isoliert und für die DZ-Generierung eingesetzt. Die DZ wurden dann phänotypisch mittels Durchflußzytometrie und funktionell mit Hilfe eines allogenen Proliferationstest (Mixed Lymphocyte Reaction, MLR) charakterisiert. Die DZ der Pt. A zeigen eine hohe Expressionsdichte von CD83 und MHC-II- Molekülen (> 90%), sowie einen mittleren Expressionslevel der kostimulatorischen Moleküle CD80 (27%) und CD86 (78%). Die DZ der Pt. B dagegen zeigen eine geringere CD83- (80%) und MHC-II-Expression (64%) sowie eine minimale Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 (< 10%). Bei beiden Patientinnen liegen fast keine Kontamination mit T-, B-Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen vor, was die geringe Expression von CD3, CD19 und CD14 zeigt. Die Analyse der stimulatorischen Kapazität läßt erkennen, daß 2×10^4 DZ der Pt. A in der Lage sind, eine allogene Proliferation hervorzurufen, die einer Proliferation durch Stimulation mit anti-CD3/28 Dynalbeads (Positivkontrolle) vergleichbar ist. Bei Pt. B wird im Vergleich zur Positivkontrolle eine geringere Proliferation mit 2×10^4 DZ induziert. Mit Titration der DZ im Proliferationstest nimmt die Proliferation der allogenen PBL gleichmäßig ab. Selbst mit 2×10^2 DZ ist noch eine allogen-spezifische Proliferation erkennbar, wobei die Proliferation, die durch die DZ von Pt. B induziert wurde, deutlich unter der Proliferation liegt, die durch die DZ von Pt. A herrührt. Dies kann möglicherweise auf die minimale Expression der kostimulatorischen Moleküle der DZ von Pt. B zurückzuführen sein.

Die reifen DZ der untersuchten Zervixkarzinompatientinnen zeigen deutlich individuelle Unterschiede auf. Die DZ von Pt. A gleichen in Phänotyp und stimulatorischer Kapazität den DZ von gesunden Donoren. Die DZ von Pt. B dagegen weisen im Vergleich zu gesunden Donoren eine deutlich geringere Expression der kostimulatorischen Molekülen auf, was mit einer schlechteren stimulatorischen Kapazität einhergeht. Es kann keine allgemeine Aussage über die Qualität DZ von Zervixkarzinompatientinnen getroffen werden, da aufgrund des limitierten Materials nur DZ von 2 Patientinnen untersucht wurden. Deutlich werden hierbei allerdings die individuellen Unterschiede der DZ zwischen den Patientinnen.

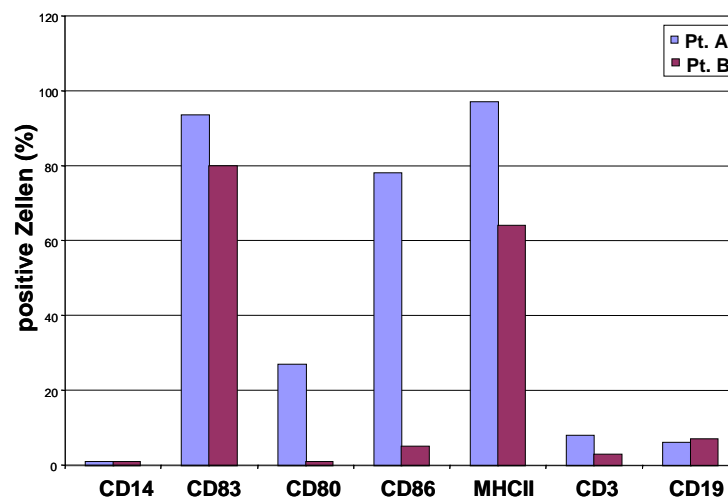


Abb. 3.29: Phänotypische Charakterisierung DZ von Zervixkarzinompatientinnen. Die Anzahl positiver Zellen ist in % angegeben. Die Ergebnisse von 2 untersuchten Patientinnen sind dargestellt.

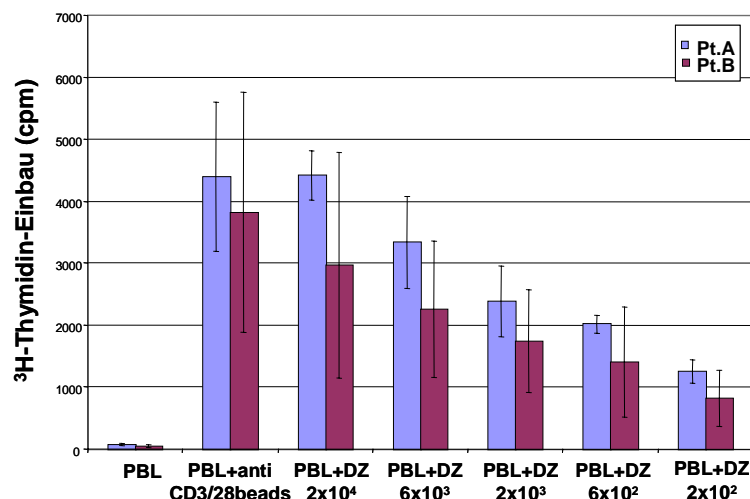


Abb. 3.30: Stimulatorische Kapazität der DZ von Pt. A und B. Die DZ wurden in unterschiedlicher Anzahl mit allogenen nicht-adhärenenten PBL für 3 Tage kokultiviert und anschließend für 16 Stunden mit ³H-Thymidin inkubiert. Der ³H-Thymidin-Einbau wurde als Maß für die Proliferation gemessen. Die Ergebnisse der untersuchten Patientinnen sind dargestellt.

3.10 *Ex vivo* Analyse von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL) aus Zervixkarzinomen

3.10.1 Vergleich der Reaktivität von *ex vivo* TIL mit anti-CD3/28 Dynalbeads *in vitro* expandierten TIL

Um die Effizienz HPV-E7-Protein-beladener DZ als potentielle Tumorstoffe weiter zu definieren, wurde untersucht, ob autologe E7-Protein-beladene DZ in Zervixkarzinompatientinnen eine spezifische T-Zellantwort *ex vivo* aktivieren können. In der Literatur wird beschrieben, daß Zervixkarzinompatientinnen HPV16-E7-spezifische T-Lymphozyten im Tumor besitzen (Evans et al., 1997), die aber aufgrund verschiedener Faktoren (wie z.B. die Zytokinfreisetzung der Tumorzellen in die Mikroumgebung des Tumors) inhibiert vorliegen. Es wird vermutet, daß DZ als potenteste antigenpräsentierende Zellen diese T-Zelltoleranz/-inhibition/-anergie brechen können (Schreurs et al., 2000). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob autologe, mit E7-Protein beladene DZ in der Lage sind, E7-spezifische TIL zu aktivieren. Dafür wurden TIL aus Tumorbiopsien isoliert und *ex vivo* auf ihre HPV-E7-spezifische IFN- γ -Freisetzung nach Stimulation mit autologen, E7-Protein-beladenen DZ im ELISpot überprüft. Die TIL wurden nach Isolierung aus dem Tumormaterial entweder direkt für die Analyse eingefroren oder mit IL-2 und IL-7 kurzzeitig kultiviert (Patientin 21, 48, 58). Zusätzlich wurden die TIL unspezifisch und antigenunabhängig mit anti-CD3/28 Dynalbeads expandiert. Dabei werden die T-Zellen über die Bindung des CD3-Antikörpers an das CD3-Molekül, welches mit dem T-Zellrezeptor assoziiert ist, und dem Kostimulus über anti-CD28 zur Expansion stimuliert. Laut Hersteller soll die Spezifität der T-Zellen bei diesem Prozess nicht verloren gehen. Die expandierten TIL sollten mit den direkt isolierten TIL hinsichtlich ihrer Spezifität verglichen werden. Bei Aufrechterhaltung der Spezifität der TIL nach Expansion hätte man eine Methode, um TIL, die nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen, linear zu expandieren und anschließend zu analysieren. Die Expansion mit den anti-CD3/28 Dynalbeads erfolgte für 3 Wochen. Anschließend wurden die anti-CD3/28 Dynalbeads entfernt, und die TIL eine weitere Woche nur mit Interleukinen (IL-2, IL-7) in Kultur gehalten. Nach 4 Wochen wurden die direkt isolierten und die mit anti-CD3/28 Dynalbeads expandierten TILs im IFN- γ -ELISpot auf das Vorhandensein von E7-spezifischen T-Lymphozyten untersucht. Zusätzlich wurden die PBL der Patientinnen mitgetestet.

Als Stimulatoren wurden autologe DZ verwendet, die mit dem E7-Protein des vorliegenden HPV-Typs (HPV16 oder HPV18), mit Human-Albumin als Kontrolle und in 9/12 Fällen mit C4.8-Protein als zusätzliche Kontrolle beladen wurden. Aufgrund der beobachteten

Kreuzreaktivitäten (Abschnitt 3.8) wurde auf eine Kontrolle mit dem E7-Protein des korrespondierenden HPV-Typs verzichtet.

Insgesamt wurden TIL sowie PBL von 12 Zervixkarzinompatientinnen getestet.

Der Expansionsindex (Abb. 3.31), der sich aus der Anzahl der nach Expansion mit anti-CD3/28 Dynalbeads geernteten TIL dividiert durch die Anzahl der ausgesäten TIL berechnet, zeigt, daß nur in 6 von 12 Fällen eine Expansion stattgefunden hat (Expansionsindex >1). Die TIL-Kulturen der anderen 6 Patientinnen zeigen eine Abnahme der TIL-Anzahl nach Kultivierung mit anti-CD3/28 Dynalbeads. Eine mögliche Ursache dafür könnte sein, daß für die Analyse der TIL teilweise auf bereits lange eingefrorenes Material zurückgegriffen wurde. Die TIL-Populationen von 5 Patientinnen wurden zusätzlich mittels Durchflußzytometrie charakterisiert. Dabei wurde das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺T-Zellen vor und nach Expansion der TIL analysiert. Man kann in Abb. 3.31 erkennen, daß in 4/5 Fällen eine deutliche Zunahme der CD8⁺T-Zellpopulation stattgefunden hat. Einzige Ausnahme bilden hier die TIL von Pat. 89, die vor und nach Expansion dasselbe Verhältnis aufweisen. Die TIL dieser Patientin zeigen eine deutliche Expansion, wenn man den Expansionsindex berücksichtigt. Pat. 21 und 59 zeigen allerdings auch eine deutliche Expansion mit einer Zunahme der CD8⁺T-Zellpopulation. Daraus kann man schließen, daß durch die unspezifische Stimulation mit anti-CD3/28 Dynalbeads vorwiegend eine Expansion der CD8⁺T-Zellen stattgefunden hat, wobei Pat. 89 hier eine mögliche Ausnahme bildet.

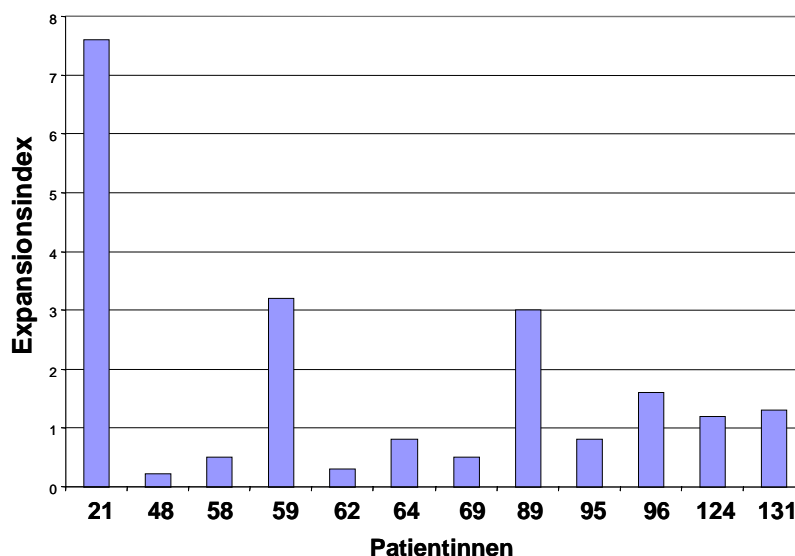


Abb. 3.31: Expansionsindex (Anzahl der nach anti-CD3/28 Dynalbeads Expansion geernteten TIL dividiert durch die Anzahl ausgesäter TIL) der 12 analysierten Patientinnen.

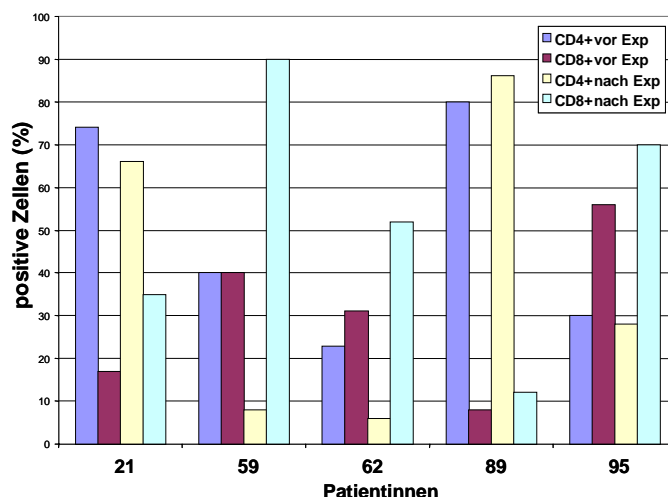


Abb. 3.32: Phänotypische Charakterisierung von TIL-Populationen vor und nach Expansion mit anti-CD3/28 Dynalbeads. Es wurde durchflußzytometrisch das Verhältnis $CD4^+$ zu $CD8^+$ T-Zellen untersucht. Die Ergebnisse von 5 Patientinnen sind dargestellt. Exp. = Expansion mit anti-CD3/28 Dynalbeads.

Die nicht expandierten TIL-Populationen von 2 der 12 Patientinnen zeigten eine spezifische $IFN-\gamma$ -Freisetzung bei Stimulation mit HPV-E7-Protein-beladenen DZ im ELISpot. Dieselben TIL-Populationen und die TIL-Population einer weiteren Patientin wiesen eine E7-spezifische $IFN-\gamma$ -Freisetzung nach Expansion mit anti-CD3/28 Dynalbeads auf. Die TIL der übrigen Patientinnen als auch die PBL aller Patientinnen zeigten keine spezifische Reaktion im ELISpot.

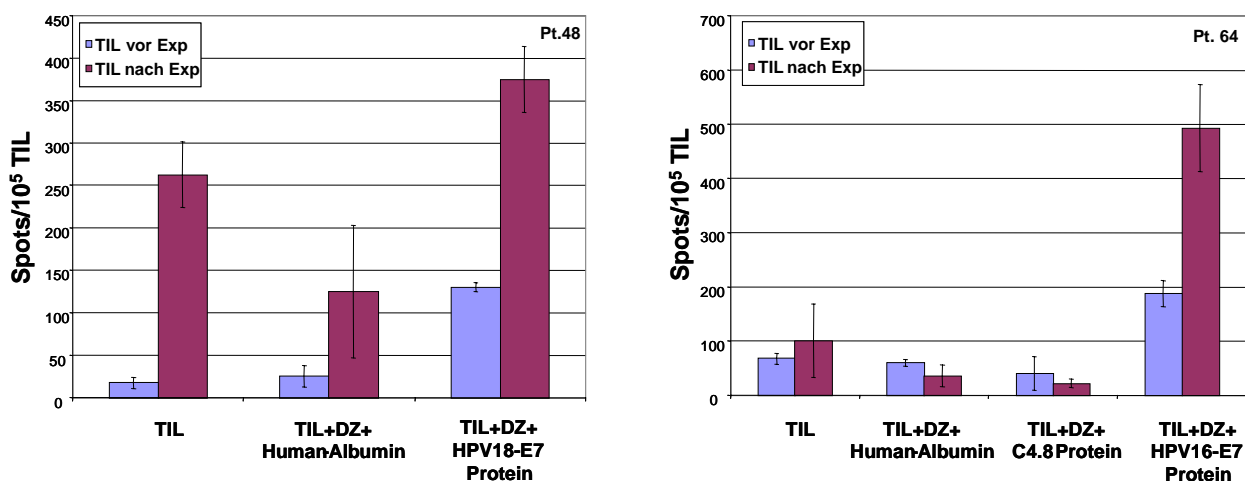


Abb. 3.33: Spezifische $IFN-\gamma$ -Freisetzung von TIL vor und nach Expansion mit anti-CD3/28 Dynalbeads im ELISpot. Als Stimulatoren wurden autologe DZ verwendet, die mit dem E7-Protein des vorliegenden HPV-Typs, mit Human-Albumin und bei Pat. 64 auch mit C4.8-Protein als Kontrolle beladen wurden. Die Ergebnisse der Patientinnen sind dargestellt, deren TIL E7-spezifisch reagierten (Pt. 48 und Pt. 64).

Die TIL von 2/12 Patientinnen zeigten sowohl nach direkter Isolierung aus dem Tumormaterial als auch nach unspezifischer Expansion mit anti-CD3/28 Dynalbeads eine E7-spezifische IFN- γ -Freisetzung im ELISpot. Dabei kann keine Korrelation der reaktiven TIL mit dem Expansionsindex oder der eingesetzten DZ-Anzahl als Stimulatoren, da unterschiedliche DZ:T-Zell-Verhältnisse (1-10:1) unter den Patientinnen eingesetzt wurden, beobachtet werden. Leider konnte von den TIL der Pt. 64 und 48 keine phänotypische Charakterisierung vorgenommen werden. Man kann erkennen, daß es nach Expansion der TIL von Pt. 64 zu einer Zunahme der spezifischen T-Lymphozyten um Faktor 2 (abzüglich der Grundaktivität der TIL) in der Kultur gekommen ist. Dies könnte eventuell mit der spezifischen CD8⁺T-Zellexpansion durch die anti-CD3/28 Dynalbeads zu erklären sein, kann aber aufgrund der fehlend FACS-Analyse nicht vollständig geklärt werden. Pt.48 zeigt abzüglich der Grundaktivität der TIL die gleiche HPV18-E7-Spezifität vor und nach Expansion mit den anti-CD3/28 Dynalbeads. Daraus kann man schließen, daß kein Verlust der Spezifität durch die Expansion der TIL stattgefunden hat. Pat.124 zeigt erst nach Expansion mit anti-CD3/28 Dynalbeads eine HPV16-E7-spezifische Reaktion. Möglicherweise war die Anzahl der E7-spezifischen T-Zellen vor Expansion nicht ausreichend, um im ELISpot eine positive Reaktion zu erzielen. Die PBL aller Patientinnen zeigten keine E7-spezifische Reaktionen, was darauf schließen läßt, daß im peripheren Blut der untersuchten Zervixkarzinompatientinnen die Frequenz E7-spezifischer T-Zellen zu gering oder nicht vorhanden war, um sie direkt im ELISpot zu detektieren.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß E7-Protein-beladene DZ von Zervixkarzinompatientinnen prinzipiell in der Lage sind, E7-spezifische TIL direkt zu aktivieren. Das Nichtreagieren der übrigen 10 bzw. 9 Patientinnen kann verschiedene Ursachen haben. Ein Grund könnte das Fehlen von E7-spezifischen TIL im Tumor sein. Die TIL könnten auch immunsupprimiert sein, d.h. die DZ waren nicht in der Lage diese Inaktivierung durch einmalige Stimulation zu durchbrechen. Eine weitere Möglichkeit könnte darin bestehen, daß die TIL aufgrund der z.T. langen Einfrierphase von schlechter Qualität waren und deswegen nicht mehr aktiviert werden konnten. Leider konnte in diesem Versuchsansatz keine Positivkontrolle aufgrund der eingeschränkten Zellzahl mitgeführt werden, um die Aktivierbarkeit der TIL zu überprüfen.

Eine weitere wichtige Rolle könnte hierbei sicherlich auch die Funktionalität der autologen DZ der Patientinnen spielen, die nicht überprüft werden konnte.

3.10.2 E7-Spezifität von anti-CD3/28 Dynalbeads expandierten TIL

Der Vergleich von direkt isolierten und mit anti-CD3/28 Dynalbeads expandierten TIL hat gezeigt, daß die Spezifität durch die Expansion nicht verloren geht. Deswegen wurden weitere TIL-Populationen untersucht, die nur unter optimierten Bedingungen (IL-2, IL-7 und anti-CD3/28 Dynalbeads) expandiert vorlagen. Es wurde eine CD8⁺T-Zell-Selektion von 3 expandierten TIL-Populationen durchgeführt. Das Ziel war es, die getrennten T-Zellpopulationen (CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen) unabhängig voneinander auf HPV-E7-Spezifität zu untersuchen. Die CD8⁺T-Zellen wurden im IFN- γ -ELISpot getestet. Hierfür wurden autologe DZ verwendet, die entweder unbeladen oder mit HPV-E7-Protein oder Human-Albumin beladen als Stimulatoren eingesetzt wurden. Die CD4⁺T-Zellen wurden im Proliferationstest auf ihre E7-Spezifität untersucht. Als Stimulatoren wurden hierfür autologe B-LCL verwendet, die entsprechend den Stimulatoren im ELISpot eingesetzt wurden.

2/3 getesteten CD8⁺TIL und 3/3 getesteten CD4⁺TIL zeigten eine E7-spezifische Reaktion (Daten nicht gezeigt). Daraus kann man schließen, daß im Tumor dieser Patientinnen E7-spezifische T-Zellen vorlagen, die nach anti-CD3/28 Dynalbeads-Expansion mit autologen DZ aktiviert und im IFN- γ -ELISpot detektiert werden konnten.

3.11 Heilversuche zur Vakzinierung mit Antigen beladenen, autologen DZ

In der Frauenklinik der FSU Jena wurden Heilversuche an terminalen Zervixkarzinompatientinnen durchgeführt, bei denen alle bisher etablierten Therapieoptionen ausgeschöpft waren. Für die Heilversuche wurde eine Vakzine hergestellt, die aus autologen, mit HPV16- bzw. HPV18-E7-Protein-beladenen DZ bestand. Das Ziel dieser Heilversuche war es, ein klinisches Ansprechen im Sinne einer Tumorregression oder Vermeidung einer Progression und damit eine Verlängerung der Überlebenszeit der Patientinnen zu erreichen. Zusätzlich sollte die Durchführbarkeit der Impfung und die Verträglichkeit der Vakzine bestimmt werden. Die Patientinnen mußten dafür bestimmte Einschlusskriterien erfüllen:

- Ausgeschöpfte bisher etablierte Therapieoptionen
- Fortgeschrittenes Tumorstadium (lokal fortgeschritten und /oder Metastasierung)
- voraussichtliche Überlebenszeit > 3 Monate
- HPV16- oder HPV18-Positivität
- Zustimmung nach Aufklärungsgespräch

Für die Herstellung der Vakzine wurde den Patientinnen pro Impfung 50-100 ml peripheres Blut entnommen. Daraus wurden PBL isoliert und zur DZ-Generierung eingesetzt. Die DZ wurden mit HPV16-E7- bzw. HPV18-E7-Protein-beladen und für 2 Tage mit proinflammatorischen Zytokinen (Zytokincocktail) zu terminal differenzierten DZ ausgereift. Die Kultivierung, Beladung und Ausreifung der DZ wurde analog zu dem etablierten Protokoll dieser Arbeit durchgeführt. Die DZ wurden am Ende der Ausdifferenzierung mit 60 Grey bestrahlt, 3x gewaschen, in Ringer's Lösung resuspendiert und den Patientinnen ohne Adjuvans subkutan injiziert. Für die Applikation an Patientinnen wurde die Kultur der DZ von einem ärztlichen Mitarbeiter (Dr. Ferrara, Jena) entsprechend den Richtlinien für Heilversuche unter "GMP-like"-Bedingungen mit GMP zugelassenen Reagenzien durchgeführt. Die Impfung wurde individuell durchgeführt. Das Ziel war eine dreimalige Impfung im 14 Tage Rhythmus, was aufgrund der physischen Verfassung und Verfügbarkeit der Patientinnen nicht immer möglich war. In der Regel wurde vor jeder Impfung erneut Blut für die Generierung der nächsten Vakzine abgenommen. Es wurden klinische Parameter wie Tumorregression und Nebenreaktionen im Rahmen der normalen Evaluation verfolgt. In den meisten Fällen wurde der Tumormarker SCC bestimmt.

Bei jeder Blutentnahme wurde vor der PBL-Isolierung das Serum gewonnen und eingefroren. Desweiteren wurden die nicht-adhärenenten PBL, die bei jeder DZ-Generierung anfielen und für die Vakzine nicht benötigt wurden, gesammelt und asserviert. Das Serum sowie die nicht-adhärenenten PBL wurden nach Absprache und Zustimmung der Patientinnen für den Nachweis einer möglichen Immunantwort verwendet. Die Serologie wurde in Kooperation von Peter Sehr (ATV, Heidelberg) durchgeführt. Dabei wurden die Antikörpertiter von HPV16-E6 und -E7 sowie von HPV18-E6 und -E7 mittels ELISA im Serum bestimmt. Für den Nachweis einer möglichen E7-spezifischen zellulären Immunantwort wurden die nicht-adhärenenten PBL im IFN- γ -ELISpot und im Proliferationstest auf E7-spezifische T-Zellen untersucht.

Insgesamt wurden 15 austerapierte Zervixkarzinompatientinnen in diesem Heilversuch mit autologen, HPV-E7-Protein-beladenen DZ vakziniert. Die klinischen Daten der Patientinnen sind in Tabelle 3.8 zusammengefaßt.

Pt.-Nr.	Alter	HPV-Typ	Tumorstadium (Primärtumor)	Histologie	Therapie	Rezidiv/ Persistenz
1	64	16	pT1b G2 pN0 pM0	Plattenepithelkarzinom	C-Ch-R	Rezidiv pT4 pN0 pMx L1 V1 R0
2	44	18	pT2b G2 pN1 pM1	Adenokarzinom	C-Ch-R	Rezidiv pM1
3	43	16	pT2b G3 pN1p Mx L1 V1 R0	Verhornendes Plattenepithelkarzinom	C-R	Persistenz pM1
4	32	18	IIB	Kleinzelliges Karzinom (G3)	Ch-R	Rezidiv IVA
7	42	16	pT1b G2 pN1 pMx	Gering verhornendes Plattenepithelkarzinom	C-Ch-R	Rezidiv pM1
11	42	16	pT1a	fortgeschrittenes Zervixkarzinom	C-Ch	Persistenz IVA
12	38	16	IIIB	Plattenepithelkarzinom	Ch-R	Persistenz pM1
13	61	16	pT1b G1 pN0 pM0	Plattenepithelkarzinom	C-Ch-R	Persistenz pM1
14	58	16	pT2b G2 N1 pMx L1 V0 Rx	Plattenepithelkarzinom	C-R	Rezidiv pT4 pN1
15	63	18	pT2b G3 pN0 pMx	Plattenepithelkarzinom	C-R	Rezidiv IIIB
16	38	16	IIIB	Kleinzelliges Plattenepithelkarzinom (G2)	Ch-R	Persistenz IIIB
17	51	16	pT1b G2 pN0 pM0	Adenokarzinom	C-Ch-R	Persistenz pT4
18	49	16	pT1b G3 pN1 G3 pMx	Plattenepithelkarzinom	C-Ch-R	Persistenz pT4 Nx G3 pM1
19	56	16	IVA	Plattenepithelkarzinom (G1-2)	Ch-R	Persistenz IVB
20	37	16	pT1a2 G2	Plattenepithelkarzinom	C-Ch-R	Rezidiv IVB

Tab. 3.8: Klinische Daten der Zervixkarzinompatientinnen, die am Heilversuch teilgenommen haben.

Pt.-Nr. = Patienten-Rekrutierungsnummer, Auswahl der Patientinnen, die geimpft wurden; Tumorstadium = FIGO-Klassifikation (präoperativ), TNM-Klassifikation (postchirurgisch); Histologie: G1-3 = Tumorgading = abnehmende Differenzierung; Therapie: C = Chirurgie, R = Radiotherapie; Ch = Chemotherapie

3.11.1 Bestimmung des Tumormarkers SCC

Das tumorassoziierte Antigen des Plattenepithelkarzinoms, squamous cell carcinoma (SCC), ist als Tumormarker im Serum nachweisbar und ist eng mit der Prognose des Zervixkarzinoms assoziiert: erhöhte Serumspiegel korrelieren mit Tumolvolumen, Tiefeninvasion, Ausweitung ins Parametrium und FIGO-Stadium. Der SCC-Tumormarker spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Verlaufs von Therapiebehandlungen bei Zervixkarzinompatientinnen. Die SCC-Bestimmung erfolgte während des Zeitraumes der Impfung bei jeder Blutabnahme für die DZ-Generierung. Die Bestimmung des Serumspiegels wurde im Institut für Klinische Chemie der FSU Jena mittels ELISA („Enzyme-Linked-Immunsorbent Assay“) durchgeführt. Der Referenzbereich liegt bei 1,5 µg/ml im Serum.

Bei 2/15 Patientinnen wurde kein Tumormarker bestimmt. 3 Patientinnen wurden nur einmal geimpft, und es konnte kein Verlauf des Tumormarkers bestimmt werden.

1/10 Patientinnen zeigte keinen SCC-Spiegel im Serum. 4/10 Patientinnen zeigten eine Zunahme des SCC-Wert im Verlauf der Impfung. 5/10 Patientinnen zeigten eine Zunahme des SCC-Wertes, der im Verlauf der Impfung transient abnahm. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.10 nochmals aufgeführt.

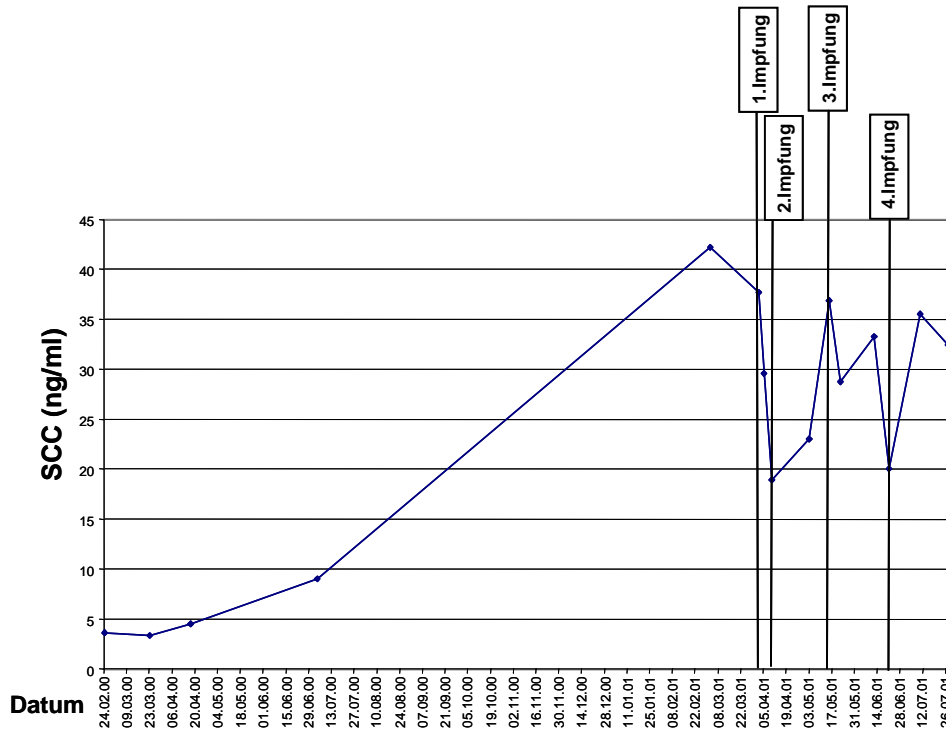


Abb.3.34: SCC-Konzentration im Serum vor und während der Impfphase von Pt.7.

3.11.2. Titerbestimmung der Antikörper gegen HPV16-E7 und HPV18-E7

Das Serum jeder Blutentnahme der vakzinierten Patientinnen wurden auf IgG-Antikörper gegen E6 und E7 von HPV16 und HPV18 untersucht. Die Titerbestimmung wurde von Peter Sehr (ATV, Heidelberg) mit Hilfe eines Sandwich-ELISA („Enzyme-Linked-Immunosorbent Assay“) durchgeführt (Meschede et al., 1998; Zumbach et al., 2000). Zur Ermittlung eines cut-off-Wertes wurden Seren von gesunden Donoren mitgeführt. Die Messung erfolgte in Duplikaten oder Quadruplikaten. Die Hintergrundreaktion der einzelnen Seren wurde in Kontrollansätzen ohne Antigen bestimmt und vom ermittelten Wert subtrahiert.

Drei von 15 Patientinnen zeigten keine Antikörper im Serum gegen HPV-E6 und -E7 des jeweiligen HPV-Typs. Alle übrigen Patientinnen wiesen einen deutlichen Titer gegen HPV-E6 auf (OD > 1000). 8/12 Patientinnen zeigten auch einen anti-E7-Titer, der im Vergleich zum anti-E6-Titer relativ niedrig war (mit 2 Ausnahmen). Von einer Patientin existierte aufgrund einer einmaligen Impfung nur ein einzelner Wert. Von den restlichen 7 Patientinnen zeigten 2 Patientinnen konstante Werte im Verlauf, 1 Patientin eine leichte Abnahme des anti-

E7-Titers und 4 Patientinnen zeigten eine Zunahme des anti-E7-Titers im Verlauf der Impfung. Drei dieser 4 Patientinnen zeigten auch eine Zunahme des anti-E7-Titers des jeweils anderen HPV-Typs, was auf eine unspezifische Zunahme hindeutet. Bei einer Patientin (HPV16 positiv) konnte nur eine Zunahme des anti-HPV16-E7-Titers, nicht aber des anti-HPV18-E7-Titers beobachtet werden. Dies läßt auf eine spezifische Reaktion schließen. Die Absorptionswerte dieser Patientin sind in Abb. 3.35 dargestellt.

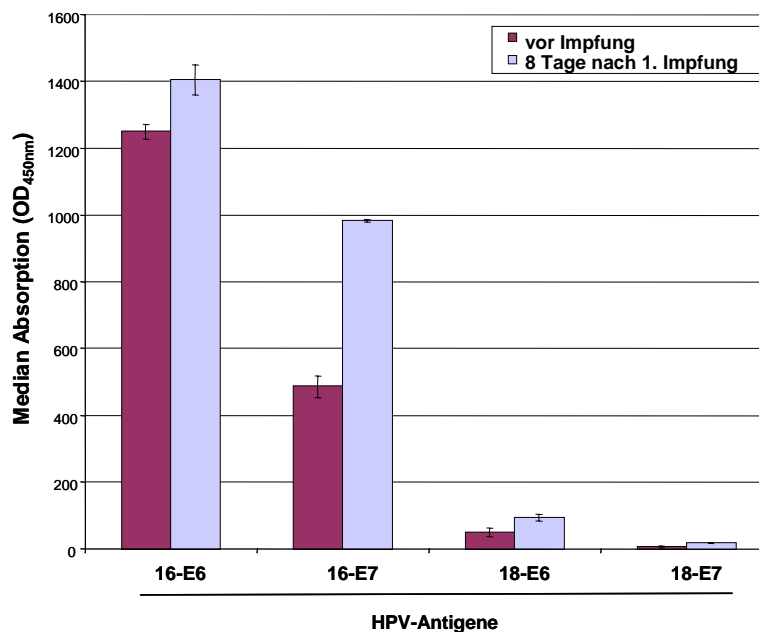


Abb. 3.35: HPV16- und HPV18-E6 und -E7 Antikörpertiter der Pt.19 (HPV16 positiv) vor und 8 Tage nach der ersten Impfung.

3.12.3 *In vitro* Monitoring HPV16/18-E7-spezifischer T-Lymphozyten im Blut der vakzinierten Patientinnen

Bei jeder Herstellung der DZ-Vakzine blieben nicht-adhärenente PBL übrig, die für die Vakzine keine Verwendung fanden. Diese nicht-adhärenenten Zellen wurden asserviert und standen für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung. Damit konnte analysiert werden, ob die Patientinnen HPV16/18-E7-spezifische T-Lymphozyten im Blut aufweisen, und ob es nach Impfung zu einer Induktion oder Anreicherung dieser T-Zellen gekommen ist. Dafür wurden die nicht-adhärenenten PBL aufgetaut und einmalig mit E7-Peptidpool bestehend aus den 20meren stimuliert, um die Anzahl vorhandenen E7-spezifischer T-Zellen zu erhöhen und nachweisen zu können. Andere Impfstudien haben gezeigt, daß für einen direkten Nachweis induzierter spezifischer T-Zellen die Anzahl zu gering ist. Durch einmalige *in vitro*

Restimulation kann diese erhöht werden (Übersicht in Offringa et al., 2000; Jonuleit et al., 2001). Mehrmaliges Restimulieren könnte zu einer *in vitro*-Induktion führen, die man vermeiden möchte. Für die Stimulation und Analyse wurde als Antigen vorwiegend der E7-Peptidpool (bestehend aus den 20meren) und nicht das E7-Protein verwendet, weil von 50% der Patientinnen keine DZ für wissenschaftliche Untersuchungen zur Verfügung standen und deswegen nicht-adhärenente PBL vom Zeitpunkt vor der Impfung als Stimulatoren eingesetzt werden mußten. Auch diese nicht-adhärenenten PBL standen nur begrenzt zur Verfügung. Da PBL wesentlich ineffizienter im Vergleich zu DZ Antigene aus ihrer Umgebung aufnehmen, und DOTAP sich toxisch auf die Zellen auswirken kann, erschien eine Beladung mit E7-Peptidpool ohne DOTAP als vorteilhafter. Zudem können E7-spezifische T-Zellen sowohl mit Hilfe von E7-Protein-beladenen DZ als auch mit Hilfe von E7-Peptidpool-beladenen DZ gleichermaßen aktiviert werden (persönliche Mitteilung von Dr. Ferrara, Jena). In den Proliferationstests, in denen autologe B-LCL als Stimulatoren eingesetzt wurden, wurde der E7-Peptidpool und das E7-Protein als Antigen verwendet.

Nach der einmaligen Stimulation wurden die Zellen eine weitere Woche nur mit IL-2 und IL-7 (1U/ml) in Kultur gehalten und dann im IFN- γ -ELISpot und im Proliferationstest auf E7-spezifische T-Zellen analysiert.

Analyse mittels ELISpot

Für die Analyse im IFN- γ -ELISpot wurden entweder autolge DZ oder autolge nicht-adhärenente PBL (vom Zeitpunkt vor der 1. Impfung) als Stimulatoren eingesetzt. Die Stimulatoren wurden mit HPV-E7-Peptidpool bzw. mit einem Kontrollpeptidpool beladen. Der Kontrollpeptidpool bestand aus der gleichen Anzahl und Konzentration an Peptiden (wie der E7-Peptidpool) aus dem L1-Bereich des jeweils anderen HPV-Typs. Bei HLA-A*0201 positiven Patientinnen wurden zusätzlich DZ bzw. T2-Zellen mit den HLA-A*0201 restringierten Peptiden E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀ und E7₈₆₋₉₃ (für HPV16 positive Patientinnen) oder mit E7₈₆₋₉₄ (für HPV18 positive Patientinnen) als Stimulatoren eingesetzt. Als Kontrolle wurde das HIV-Peptid Pol₅₁₀₋₅₁₈ verwendet. Zusätzlich wurde für jeden Zeitpunkt der Patientinnen eine Positivkontrolle in Form von anti-CD3/28 Dynalbeads mitgeführt, um die generelle Aktivierbarkeit der T-Zellen in der PBL-Population zu überprüfen. Es wurden $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ nicht-adhärenente PBL und $7 \times 10^3 - 10^5$ DZ/PBL pro Ansatz eingesetzt.

Insgesamt wurden die nicht-adhärenenten PBL von 11 Patientinnen analysiert. Dabei wurden die PBL vor der Impfung mit den PBL der letzten Impfung verglichen. Patientin 13 konnte nicht ausgewertet werden, da die PBL mit anti-CD3/28 Dynalbeads nicht aktivierbar waren.

7/10 Patientinnen zeigten keine E7-spezifischen T-Zellen im IFN- γ -ELISpot. Eine Patientin (Pt.11) zeigte eine Induktion HPV16-E7₈₆₋₉₃-spezifischer T-Zellen 4 Wochen nach der ersten Impfung. Eine weitere Patientin (Pt.14) zeigte HPV16-E7-spezifische PBL 7 Tage nach der 4. Impfung im Vergleich zu den PBL vor der Impfung. Man kann in Abb. 3.35 erkennen, daß die PBL des Zeitpunktes vor der Impfung unspezifisch IFN- γ bei Stimulation mit autologen DZ freisetzen, die entweder unbeladen oder mit L1-Peptidpool (HPV18) bzw. mit E7-Peptidpool (HPV16) beladen wurden. Die Analyse der PBL nach 4 Impfungen zeigt eine IFN- γ -Freisetzung bei Stimulation mit HPV16-E7-Peptidpool beladenen DZ, nicht aber mit unbeladenen oder Kontrollpeptidpool beladenen DZ. Daraus kann man schließen, daß es sich hierbei um eine spezifische Reaktion handelt, und es zu einer Induktion HPV16-E7-spezifischer T-Zellen in der Patientin gekommen ist. Ähnliche Ergebnisse wurden für eine weitere Patientin (Pt.3) erhalten, die nach der ersten und zweiten Impfung HPV16-E7-spezifische PBL zeigte.

Patientin	HPV-Typ	HLA-A2+	Stimulatoren	IFN γ -ELISpot-Ergebnis
3	16	+	PBL/T2	E7-spezifische T-Zellen
7	16	+	DZ	-
11	16	+	T2 (nur mit Peptiden beladen)	Zunahme E7 ₈₆₋₉₃ spezifischer T-Zellen
12	16	+	PBL/T2	-
13	16	-	DZ	n.a.
14	16	-	DZ	E7-spezifische T-Zellen
15	18	+	DZ	-
16	16	-	DZ	-
17	16	+	PBL/T2	-
19	16	+	DZ	-
20	16	-	PBL	-

Tab. 3.9: IFN- γ -ELISpot-Ergebnisse der vakzinieren Patientinnen in Zusammenhang mit HPV-Typ, HLA-A2-Positivität und eingesetzten Stimulatoren. n.a. = nicht auswertbar (Positivkontrolle negativ)

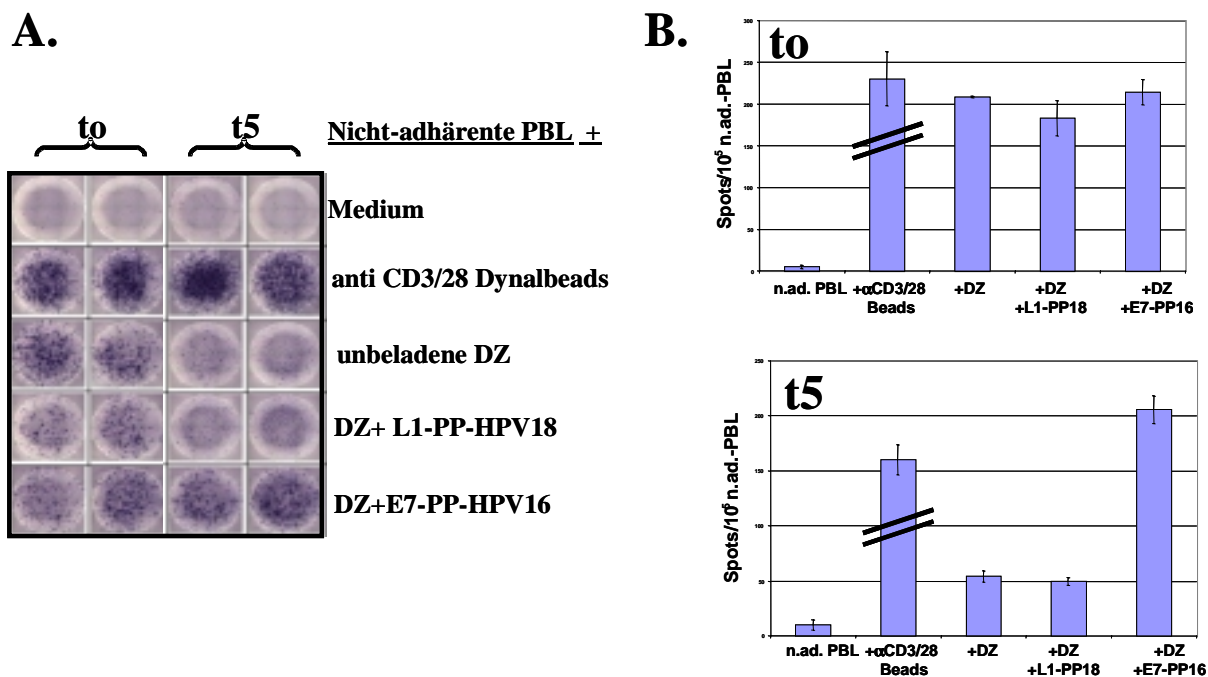


Abb. 3.36: *In vitro*-Analyse der n.ad. PBL von Pt.14 vor und nach 4 DZ-Vakzinierungen im IFN- γ -ELISpot.

In A sind die einzelnen Nitrozellulosefilter mit den entwickelten Spots zu sehen. In B sind die mit dem ELISpot-Reader ausgemessenen Spotanzahlen graphisch dargestellt.

t0 = Zeitpunkt vor der Vakzinierung; t5 = Zeitpunkt nach 4 Impfungen;

PP = Peptidpool aus 20meren; n.ad. PBL = nicht adhärenzte periphere Blutlymphozyten

Analyse mittels Proliferationstest

Die n.ad. PBL der vakzinieren Patientinnen wurden außerdem im Proliferationstest auf HPV-E7-spezifische T-Zellen untersucht. Pro Ansatz wurden $3 \times 10^4 - 10^5$ n.ad. PBL eingesetzt. Als Stimulatoren wurden autologe B-LCL verwendet, die mit HPV-E7-Peptidpool, Kontrollpeptidpool, E7-Protein und C4.8 als Kontrollprotein beladen wurden. Die n.ad. PBL der Patientinnen zeigten in der Regel eine gleichstarke Proliferation nach Stimulation mit E7-Peptidpool und mit Kontrollpeptidpool beladenen B-LCL, so daß man hier von einer unspezifischen Reaktion ausgehen muß. Die Proliferation der n.ad. PBL nach Kokultur mit E7-Protein und C4.8 beladenen B-LCL war in der Regel niedriger als mit Peptidpool beladenen B-LCL. Dies könnte möglicherweise auf die unterschiedliche Beladungsmethode zurückzuführen sein. Die Proteine wurden im Komplex mit DOTAP verabreicht, wobei DOTAP die Vitalität der Zellen negativ beeinflussen kann und damit möglicherweise die allgemeine stimulatorische Kapazität der Zellen verringert. Die Peptidpools wurden dagegen direkt auf die B-LCL geladen.

Zwei der 10 getesteten Patientinnen zeigten eine E7-spezifische Proliferation gegenüber E7-Protein beladenen B-LCL. Die Ergebnisse dieser Patientinnen sind in Abb. 3.37 und Abb. 3.38 dargestellt. Die nicht-adhärenen PBL der Patientin 17 vom Zeitwert t2 (8 Tage nach erster Impfung) zeigen im Vergleich zu den PBL vor der Impfung (t0 und t1) eine spezifische Proliferation nach Kokultur mit HPV16-E7 Protein beladenen B-LCL.

Die n.ad. PBL der Pt.14 zeigen nach 4 Impfungen eine Proliferation nach Stimulation mit 16-E7pp beladenen B-LCL, die sich nur minimal von der Proliferation mit 18-L1pp beladenen B-LCL unterscheidet und somit nicht als spezifisch gewertet werden kann. Die PBL von Zeitwert t3 und t5 zeigen eine spezifische Proliferation nach Kokultur mit HPV16-E7 Protein beladenen B-LCL, nicht aber gegen C4.8-Protein-beladene B-LCL, was auf eine E7-spezifische Reaktion hindeutet, obwohl die PBL der unterschiedlichen Zeitpunkte nach Stimulation mit anti-CD3/28 Dynalbeads unterschiedliche maximale Aktivierbarkeiten zeigen, die zum Zeitwert t3 zunimmt und zum Zeitwert t5 am höchsten ist.

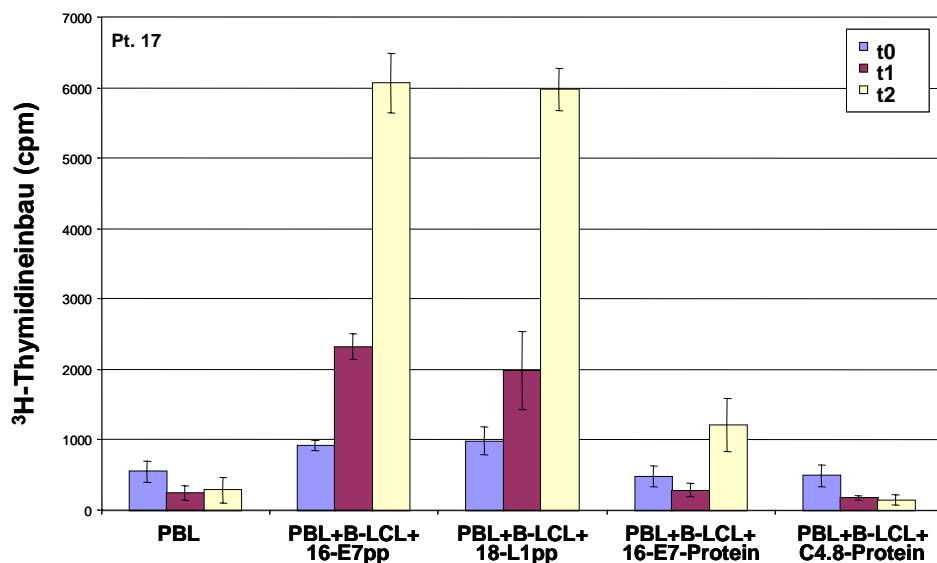


Abb. 3.37: HPV16-E7-spezifische Proliferation der nicht-adhärenen PBL von Pt.17 unterschiedlicher Zeitwerte. Es wurden die n.ad. PBL vom Zeitpunkt vor der Impfung (t0), vom Zeitpunkt der ersten Impfung (t1) und vom Zeitpunkt der zweiten Impfung bzw. 8 Tage nach der ersten Impfung (t2) im Proliferationstest analysiert.

n.ad. PBL = nicht adhärenente periphere Blutlymphozyten

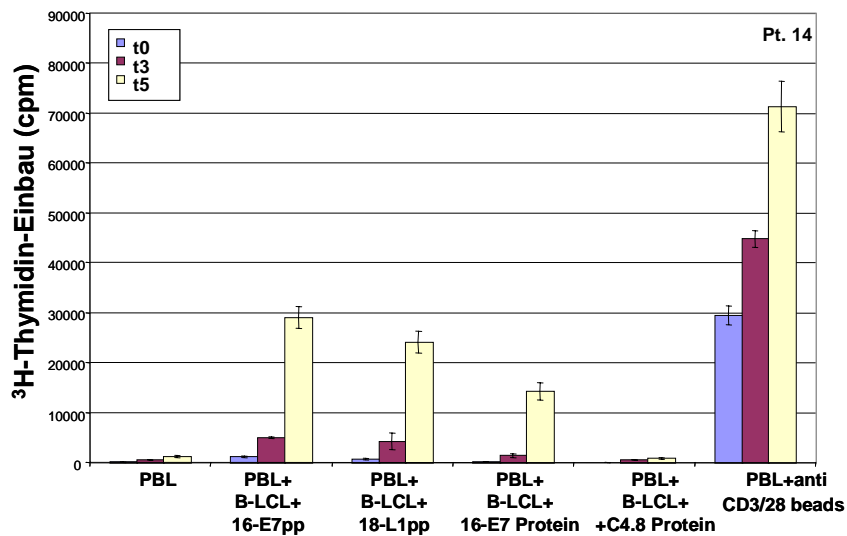


Abb. 3.38: HPV16-E7-spezifische Proliferation der nicht-adhärenen PBL von Pt.14 unterschiedlicher Zeitwerte. Es wurden die n.ad. PBL vor der Impfung (t0), nach 2 Impfungen (t3) und nach 4 Impfungen (t5) im Proliferationstest analysiert. n.ad. PBL = nicht adhärenente periphere Blutlymphozyten

Zusammenfassung der *in vitro*-Analysen zu den Heilversuche

Insgesamt wurden 15 Patientinnen im Heilversuch mit autologen HPV16/18-E7 Protein beladenen DZ vakziniert. Die Anzahl der Vakzinierungen lag zwischen 1-4 Impfungen (im Durchschnitt 2,7). Fünf Patientinnen zeigten im Verlauf der Impfung eine transiente Abnahme des SCC-Wertes. Bei einer Patientin konnte im Verlauf der Impfung eine Zunahme des anti-HPV16-E7-Titers im Serum beobachtet werden. Desweiteren konnte in 4 Patientinnen eine Aktivierung HPV16-E7-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten 10/15 Patientinnen eine positive Reaktion in einem der untersuchten Parameter. Die Ergebnisse der *in vitro*-Analysen sind in Tab. 3.10 nochmals zusammengefaßt. Die DZ-Vakzine *per se* führte bei den Patientinnen zu keinen generellen Nebenreaktion. Bei einer Patientin trat bei einer Impfung leichtes Fieber auf, bei einer anderen traten Kopfschmerzen auf, die nur kurzfristig (für 1-2 Tage nach der Impfung) anhielten. Die Patientinnen zeigten kein objektives klinisches Ansprechen auf die DZ-Vakzinierungen.

Pt.-Nr	HPV-Typ	Anzahl an Impfungen	DZ-Anzahl im Ø pro Vakzine/(Range)	SCC-Werte	Serologie (anti-E7-Titer)	Zelluläre Immunantwort	
						ELISpot	Proliferationstest
1	16	1	1,2x10 ⁶	n.d.	hoher Titer >1000	n.d.	n.d.
2	18	1	9x10 ⁵	n.d.	negativ	n.d.	n.d.
3	16	4	7,5x10 ⁵ (5x10 ⁵ -1x10 ⁶)	n.d.	negativ	Induktion HPV16-E7-spezif. T-Zellen	negativ
4	18	1	7x10 ⁴	n.d.	negativ	n.d.	n.d.
7	16	4	3,2x10 ⁵ (2x10 ⁴ -6x10 ⁵)	transiente Abnahme	keine Zunahme	negativ	negativ
11	16	3	1,5x10 ⁶ (1-2x10 ⁶)	n.d.	unspezifische Zunahme	Induktion HPV16-E7 ₈₆₋₉₃ -spezif. T-Zellen	n.d.
12	16	3	2x10 ⁵ (1,5-3x10 ⁵)	transiente Abnahme	unspezifische Zunahme	negativ	negativ
13	16	4	3,7x10 ⁵ (3x10 ⁴ -7x10 ⁵)	transiente Abnahme	negativ	n.a.	negativ
14	16	4	3x10 ⁵ (1,2-4x10 ⁵)	Zunahme	negativ	Induktion HPV16-E7-spezif. T-Zellen	Induktion HPV16-E7-spezif. T-Zellen
15	18	3	3x10 ⁵ (1,5-4,5x10 ⁵)	Zunahme	unspezifische Abnahme	negativ	negativ
16	16	3	3x10 ⁵ (1-8x10 ⁵)	transiente Abnahme	unspezifische Zunahme	negativ	negativ
17	16	3	3,5x10 ⁵ (2,5-5,2x10 ⁵)	negativ	keine Zunahme	negativ	Induktion HPV16-E7-spezif. T-Zellen
18	16	2	4,5x10 ⁵ (3,5-5,5x10 ⁵)	transiente Abnahme	negativ	n.d.	n.d.
19	16	2	4x10 ⁵ (2,5-5,5x10 ⁵)	Zunahme	spezifische Zunahme	negativ	negativ
20	16	3	3,5x10 ⁵ (2-5x10 ⁵)	Zunahme	negativ	negativ	negativ

Tab. 3.10: Übersicht der Ergebnisse der *in vitro*-Analysen der DZ-vakzinierten Patientinnen im individuellen Heilversuch. Pt.-Nr.: Patienten-Rekrutierungsnummer, Auswahl der Patientinnen, die geimpft wurden; n.d. = nicht durchgeführt; n.a. = nicht auswertbar; anti-E7-Titer: keine Zunahme = relativ konstante Werte im Verlauf; unspezifische Zunahme = auch anti-E7-Titer des jeweils anderen HPV-Typs; spezifische Zunahme = nur E7-Titer-Zunahme des entsprechenden HPV-Typs; Felder mit positiven Reaktionen sind grau unterlegt

4. Diskussion

4.1 Generierung humaner DZ

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, humane DZ zu generieren und deren effiziente Beladung mit HPV-Antigenen zu etablieren, um sie als potentiell Adjuvans in Immuntherapien einsetzen zu können. Für die Generierung von DZ im Humansystem können verschiedene Ausgangszellen verwendet werden. DZ können direkt aus dem Blut isoliert werden. Die Frequenz der DZ im Blut ist allerdings sehr gering (<0,5%) und schränkt die Benutzung dieser DZ für Vakzinierungsprotokolle aufgrund der geringen Zellzahl ein. Desweiteren können CD34⁺-Vorläuferzellen, die aus Blut, Knochenmark oder Nabelschnurblut isoliert werden, *in vitro* innerhalb von 14 Tagen in Anwesenheit von GM-CSF und TNF- α in reife DZ differenziert werden (Caux et al., 1992). Ein Nachteil dieser Methode ist, daß die Trennung der Reifestadien (unreif, reif) erschwert ist, da zu Beginn der Kultur TNF- α verwendet wird, was nicht nur die Generierung, sondern auch die Ausdifferenzierung der DZ fördert. Zudem ist die Ausdifferenzierung dieser generierten DZ noch nicht vollständig geklärt (Übersicht in Dhodapkar und Bhardwaj, 2000).

Eine weitere Strategie, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, benutzt adhärente, mononukleäre Zellen für die Generierung von DZ (Romani et al., 1994). Dafür wird die Plastikadhärenz peripherer Blutmonozyten aus Blut oder Buffy Coats ausgenutzt. Die adhärennten Monozyten, die sich nach 24 h wieder von der Oberfläche ablösen, werden für 6-7 Tage in Medium und in Anwesenheit von IL-4 und GM-CSF kultiviert. Dabei entstehen unreife DZ aus den nicht-proliferierenden CD14⁺-Monozyten, die sich durch eine geringe CD83-Expression und eine mittlere Expression der MHC-I-, MHC-II- und der kostimulatorischen Moleküle (CD40, CD80, CD86) auszeichnen. Anschließend können die unreifen DZ mit Hilfe verschiedener Stimuli ausdifferenziert werden. Diese Zwei-Stufen-Generierung erlaubt die Generierung unreifer DZ, und ermöglicht somit eine effiziente Beladung der DZ mit Antigenen mit anschließender Ausdifferenzierung. Zudem konnte gezeigt werden, daß nach dieser Strategie generierte DZ *in vivo* Immunität in Menschen induzieren können (Turner et al., 1999; Dhodapkar et al., 1999, 2000). Es wurden zunächst verschiedene Medien (RPMI 1640, X-Vivo-20) und Zusätze (AB-Plasma, Human-Albumin) ausgetestet, um die optimalen Kulturbedingungen für DZ zu finden. Obwohl bei der Verwendung von FCS als Mediensupplement im Vergleich zu humanem AB-Plasma oder Human-Albumin doppelt so viele DZ generiert werden können (eigene Ergebnisse, Bender et al., 1996; Romani et al., 1996), sollte die Verwendung von FCS vermieden werden, da

Proteine aus dem FCS zur Induktion FCS-spezifischer T-Zellen führen können (eigene Beobachtung; Jonuleit et al. 2000). Zudem ist die Verwendung von xenogenen Seren für eine mögliche Applikation am Menschen ungeeignet. Als Medienzusatz wurde nur 1% AB-Plasma und 1% Human-Albumin in RPMI und X-Vivo 20 verglichen, weil in der Literatur beschrieben ist, daß bei der Verwendung von 10% Humanplasma/-serum die DZ-Vorläuferzellen adhärenz bleiben und nur wenige nicht-adhärenz DZ entstehen (Bender et al., 1996). Die DZ, die in RPMI 1640 + 1% AB-Plasma generiert wurden, zeigten die geringste CD83-Expression, was auf einen unreifen Status der meisten DZ und damit auf eine effiziente Antigenaufnahme schließen läßt. Da die DZ zum Vergleich verschiedener Beladungsmethoden generiert werden sollten, wurden diese Kulturbedingungen beibehalten. Es sollte weiterhin eine optimale Ausdifferenzierung der DZ unter diesen Kulturbedingungen gefunden werden, weil beschrieben ist, daß nur reife DZ in der Lage sind, CD8⁺T-Zellen zu induzieren, zu differenzieren und zu expandieren (Schuler und Steinmann, 1997; Labeur et al., 1999; Jonuleit 2000). Zur Ausdifferenzierung der unreifen DZ können verschiedene Stimuli verwendet werden: u.a. LPS (Sallusto et al., 1995), TNF- α (Sallusto und Lanzavecchia, 1994), TNF- α und Prostaglandin E₂ (PGE₂) (Rieser et al., 1997), Monozyten-konditioniertes Medium (Romani et al., 1996; Bender et al., 1996) sowie ein definierter Zytokincocktail aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6, TNF- α und Prostaglandin E₂ (Jonuleit et al., 1997). TNF- α zeigt sich nur als guter Differenzierungsstimulus in Kombination mit FCS (eigene Beobachtung, Reddy et al., 1997), aber nicht mit humanem Serum oder Plasma. Vermutlich enthält FCS zusätzliche Kofaktoren für die Ausdifferenzierung der DZ, die im Humanserum/-plasma nicht enthalten sind. LPS gilt als unspezifischer Stimulus für PBL (Schoell et al., 1999), und die Qualität von Monozyten-konditioniertem Medium kann variieren und ist schwierig zu standardisieren. Deswegen kamen für klinische Anwendungen nur TNF- α und der Zytokincocktail in Frage und wurden miteinander verglichen. Sowohl vom Phänotyp der reifen DZ als auch bezüglich ihrer stimulatorischen Kapazität wurden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Der Zytokincocktail wurde eingehend von Jonuleit et al. (1997) bezüglich des Phänotyps, der stimulatorischen Kapazität, der migratorischen Kapazität und der Zytokinproduktion DZ untersucht. Zudem hat Feuerstein et al. (2000) gezeigt, daß der 4-Komponenten-Cocktail im Vergleich zu anderen Stimuli (u.a. TNF- α , TNF- α + PGE₂, CD40L) die größte Anzahl reifer DZ liefert, und diese auch die höchste Überlebensrate zeigen. Da der Zytokincocktail neben IL-1 β und IL-6 auch die Komponenten TNF- α und PGE₂ enthält, wurde er für die Ausdifferenzierung der DZ eingesetzt. Im Hinblick auf eine potentielle zelluläre Immuntherapie mit DZ als

Adjuvans ist zu erwähnen, daß alle Ingredienzen auch in GMP-Qualität erhältlich sind, so daß nach diesem Protokoll eine Generierung von DZ für den klinischen Gebrauch möglich wäre. Weiterhin konnte in einem sogenannten „Wash-out-Test“ gezeigt werden, daß die so ausdifferenzierten DZ in Kultur ohne Zytokine für mindestens 48 Stunden bezüglich ihrer stimulatorischen Kapazität stabil bleiben. Das legt nahe, wie auch in der Literatur beschrieben ist, daß die DZ nicht wieder in Monozyten revertieren (Jonuleit et al., 1997). Diese Ergebnisse sprechen für eine terminale Ausdifferenzierung der DZ, was im Hinblick der Verwendung der DZ als potentielle Vakzine *in vitro* als auch *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt.

4.2 Etablierung peptidspezifischer T-Zelllinien

Die Effizienz der Beladung von DZ mit HPV-Antigen wurde analysiert, um eine geeignete Methode zu identifizieren. Dafür wurden die unterschiedlich mit HPV-Antigen beladenen DZ *in vitro* zur Induktion von HPV-spezifischen T-Zellen eingesetzt, und anschließend die HPV-Spezifität der T-Zellen bestimmt. Zur Etablierung des T-Zellstimulationsprotokolls und der Spezifitäts-Nachweismethoden wurden zunächst *in vitro* peptidspezifische T-Zelllinien induziert. Für die Generierung peptidspezifischer T-Zelllinien wurde zu Beginn das HLA-A*0201 restringierte Peptid des Influenza-Matrixproteins IMP₅₈₋₆₆ als positives Kontrollpeptid verwendet (Bednarek et al., 1991). Das Peptid IMP₅₈₋₆₆ gilt als sogenanntes Recall-Antigen, weil man davon ausgeht, daß jeder erwachsene Mensch mindestens einmal eine Influenza-Infektion in seinem Leben durchlaufen hat und aufgrunddessen wahrscheinlich IMP-spezifische Gedächtniszellen im Blut besitzt. Bei einer *in vitro*-Stimulation IMP-spezifischer T-Zellen würde man daher eine Reaktivierung vorhandener Gedächtniszellen und keine *de novo*-Induktion spezifischer T-Zellen erwarten. Es wurden *in vitro* insgesamt 9 T-Zelllinien von insgesamt 7 gesunden Donoren mit Hilfe IMP₅₈₋₆₆-beladener, autologer DZ generiert. Diese Linien zeigten im Chrom-Freisetzungstest eine spezifische Lyse von 9-27 % bei unterschiedlichen Effektor-Target-Verhältnissen. Diese Ergebnisse zeigen, daß IMP-spezifische T-Zellen mit Hilfe Peptid-beladener, autologer DZ aktiviert werden können. Die spezifische Lyse dieser Zelllinien ist allerdings im Vergleich zur Literatur (> 40 %, Jochmus et al., 1997) relativ gering. Im Gegensatz zu Jochmus et al. (1997) wurden nicht die einzelnen Sublinien im Chrom-Freisetzungstest eingesetzt, sondern diese gepoolt und analysiert. Möglicherweise haben sich spezifische Gedächtnis- oder Vorläuferzellen nur in einzelnen Sublinien befunden, so daß es durch das Poolen zu einer Verdünnung der spezifischen T-Zellen gekommen ist, was die geringe spezifische Lyse erklären würde. Die Möglichkeit, daß sich in den untersuchten PBL/T-Zellen der Donoren keine IMP₅₈₋₆₆-spezifische Gedächtnis-

oder Vorläuferzellen befunden haben, ist bei einer Anzahl von 7 verschiedenen untersuchten Donoren eher unwahrscheinlich.

Für die Generierung HPV-Peptid-spezifischer T-Zelllinien wurde das HLA-A*0201 restringierte HPV16-E7₁₁₋₂₀-Peptid verwendet (Kast et al., 1994; Rensing et al., 1995), welches *in vitro* spezifische, zytotoxische T-Zellen in gesunden Donoren nach Langzeitkultur induzieren kann (Rensing et al., 1995, 1996). Bei der Analyse der Spezifität der generierten T-Zelllinien im Chrom-Freisetzungstest wurde aufgrund der Vorversuche auf ein Poolen der Sublinien verzichtet. Bei einem von zwei analysierten Donoren konnten HPV16-E7₁₁₋₂₀-peptid-spezifische T-Zellsublinien über ihre zytolytische Aktivität im Chrom-Freisetzungstest detektiert werden. Dabei zeigten von 200 untersuchten Sublinien 4 eine peptidspezifische Zytolyse. Dieses Verhältnis zeigt eine geringe Vorläuferfrequenz der HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifischen T-Zellen in diesem Donor. Evans et al. (1997) konnte mit Hilfe autologer, HPV16-E7₁₁₋₂₀-Peptid beladener DZ in 4/4 gesunden Donoren HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifische zytotoxische T-Zellen induzieren, wohingegen Jochmus et al. (1997) in einem untersuchten gesunden Donor keine, und Schoell et al. (1999) in 4 von 7 gesunden Donoren eine HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifische zytotoxische T-Zellantwort induzieren konnte. Diese Ergebnisse zeigen, daß nicht in allen gesunden Donoren eine HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifische Antwort gegen dieses Peptid induziert werden kann. Eine mögliche Ursachen dafür könnte die geringe Anzahl oder das Fehlen von spezifischen Vorläuferzellen in diesen Donoren sein.

Im Hinblick auf die Ergebnisse, die hier und im weiteren Verlauf dieser Arbeit mit Peptid-beladenen DZ erzielt wurden, ist zu erwähnen, daß der HLA-A2-Antikörper, der für die Bestimmung der HLA-A2-Positivität der gesunden Donoren verwendet wurde, nicht zwischen den Allelen HLA-A*0201 und HLA-A*0205 differenzieren kann. HLA-A*0201 ist prädominant in der kaukasischen Bevölkerung mit 95% der HLA-A2 positiven Donoren (Imanishi et al., 1991), wohingegen das Allel HLA-A*0205 häufiger bei der dunkelhäutigen Bevölkerung auftritt (Browning und Krausa, 1996). Für das HPV16-E7₁₁₋₂₀-Peptid wurde eine reduzierte Bindungsaffinität für das Allel HLA-A*0205 aufgezeigt (Rensing et al., 1999), was unter Umständen zu einer verringerten oder zu keiner zytotoxischen T-Zellantwort führen kann. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifische T-Zellen mit Hilfe des verwendeten Stimulationsprotokolls in gesunden Donoren induziert werden können. Die spezifische Lyse lag dabei abzüglich der Kontrolle zwischen 10-23%. Die durchgeführte Langzeitkultur (4-6 Restimulationen) und die geringe spezifische Lyse läßt auf eine *de novo* Induktion der T-Zellen schließen, was bei gesunden Donoren zu erwarten ist. Allerdings konnten die Buffy Coat-Spender nicht auf HPV-Infektionen untersucht werden. Die Frequenz

HPV16-E7₁₁₋₂₀-spezifischer zytotoxischer T-Zellen ist bei dem positiv reagierenden, untersuchten Donor mit $\sim 1/10^7$ T-Zellen relativ gering, wenn man von einer spezifischen T-Zelle pro Sublinie ausgeht. Aufgrund solcher geringen Frequenzen scheint der Chrom-Freisetzungstest als Nachweismethode nicht sensitiv genug zu sein. Außerdem können mit Hilfe des Chrom-Freisetzungstests keine genauen Rückschlüsse auf die Frequenzen spezifischer T-Zellen geschlossen werden. Eine alternative Methode zum Chrom-Freisetzungstest stellt der IFN- γ -ELISpot dar. Der ELISpot wurde für die Detektion spezifischer Immunzellen auf Einzelzellniveau beschrieben (Czerkinsky et al., 1988). Diese Methode wurde für die direkte *ex vivo* Quantifizierung peptidreaktiver T-Lymphozyten aus PBL modifiziert (Herr et al., 1996). Der Vorteil dieser Methode ist die Detektion von T-Zellen auf Einzelzellniveau ohne Langzeit-*in vitro*-Kultur, so daß die gemessene Antwort die *in vivo*-Frequenz eines Individuums widerspiegelt, was zunehmend Verwendung für das Monitoring einer zellulären Immunantwort in klinischen Studien findet. Die Sensitivität des ELISpots liegt bei 1 reagierenden Zelle in 10^5 PBL (Hickling, 1998; Asai et al., 2000; Whiteside, 2000). Neben der hohen Sensitivität konnte auch die Reproduzierbarkeit von T-Zellfrequenz-Analysen aufgezeigt werden (Schmittel et al., 1997). Im Gegensatz zum TNF- α -ELISpot werden beim IFN- γ -ELISpot CD8⁺T-Zellen über ihre spezifische IFN- γ -Sekretion nachgewiesen (Scheibenbogen et al., 1997; Herr et al., 1998), wobei keine Aussage über die zytolytische Fähigkeit der spezifischen T-Zellen getroffen werden kann. Mittlerweile konnte allerdings in verschiedenen Systemen gezeigt werden, daß spezifische IFN- γ -sezernierende T-Zellen auch zytotoxisch im Chrom-Freisetzungstest reagieren (Scheibenbogen et al., 1997; Kaufmann et al., 2001; persönliche Mitteilung von A. Kather, Jena).

Zur Etablierung des ELISpots wurden zunächst T-Zelllinien gegen das Recall-Antigen BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈ (Steven et al., 1997), welches aus dem frühen lytischen Protein des Epstein-Barr Virus stammt, generiert. Obwohl die Durchseuchungsrate mit EBV im Vergleich zu Influenza in der Bevölkerung geringer ist, wurde dieses Peptid aufgrund der Schwierigkeiten in den Vorversuchen mit IMP₅₈₋₆₆ gewählt. Dabei konnte gezeigt werden, daß, wie in der Literatur beschrieben, spezifische Gedächtnis-T-Zellen direkt *ex vivo* aus dem Blut nachgewiesen werden können. Desweiteren konnte nach *in vitro* Stimulation der T-Zellen eine Zunahme der BMLF-1₂₈₀₋₂₈₈-spezifischen CD8⁺ T-Zellen um Faktor 3 beobachtet werden.

Anschließend wurden erneut HPV16-E7-Peptid-spezifische T-Zelllinien generiert, um diese im ELISpot zu testen. Dafür wurden 3 HLA-A*0201 restringierte Peptide, E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀ und E7₈₆₋₉₃ (Kast et al., 1994; Rensing et al., 1995) gemischt und zum Beladen von DZ eingesetzt. Die gleichzeitige Beladung mit 3 unterschiedlichen Peptiden sollte die Möglichkeit erhöhen,

spezifische Vorläufer-T-Zellen zu induzieren. Im Maussystem konnte mit einem Peptidgemisch aus dem HPV16-E7-Bereich durch eine *in vivo*-Immunisierung eine zytotoxische T-Zellantwort gegen jedes einzelne Peptid induziert werden (Ressing et al., 1995). Ein Donor zeigte keine HPV16-E7-Peptid-spezifischen T-Zellen. Die T-Zelllinie eines weiteren Donors zeigte im IFN- γ -ELISpot nur eine spezifische Reaktion gegenüber DZ, die mit dem Peptid HPV16-E7₈₆₋₉₃ beladen waren, nicht aber gegen die anderen Peptide oder dem Peptidgemisch. Daraus kann man zunächst ableiten, daß bei diesem Donor vermutlich keine oder nur wenige Vorläuferzellen in den untersuchten T-Zellen gegen die nicht reagierenden Peptide vorlagen. Die Tatsache, daß mit dem Peptidpool keine, aber mit dem HPV16-E7₈₆₋₉₂ - Peptid eine spezifische IFN- γ -Freisetzung im ELISpot detektiert werden konnte, läßt sich möglicherweise durch die Peptidkonzentration erklären. In beiden Fällen wurden 10 μ g/ml Peptid für die Beladung eingesetzt. Vielleicht ist die Peptidkonzentration des HPV16-E7₈₆₋₉₃ Peptids im Peptidpool zu gering, um eine Antwort im ELISpot zu erzielen, da im Peptidpool nur ein Drittel der Konzentration des HPV16-E7₈₆₋₉₃ vorliegt. Eine weitere mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte die Bindungsaffinität der einzelnen Peptide sein. Die HPV16-E7-Peptide 86-93 und 82-90 weisen eine fast gleichstarke Bindungsaffinität gegenüber dem HLA-A*0201-Allel auf (IC₅₀: 82-90 = 8 nM; 86-93 = 7 nM; 11-20 = 46 nM) (Ressing et al., 1995). Möglicherweise kommt es bei Beladung mit dem Peptidpool zu einer Konkurrenz zwischen den beiden Peptiden, die zu einer geringeren Präsentation des Peptids 86-93 im Vergleich zur Beladung mit dem Einzelpeptid führt.

Die Ergebnisse zeigen, daß mit Hilfe des ELISpots in der generierten T-Zelllinie dieses Donors 127 HPV16-E7₈₆₋₉₃-spezifische CD8⁺T-Zellen in 10⁵ CD8⁺T-Zellen detektiert werden konnten.

Der IFN- γ -ELISpot ermöglicht die Detektion von spezifischen T-Zellen, sowohl *ex vivo* aus dem Blut als auch nach *in vitro*-Langzeitkulturen auf Einzelzellniveau. Dadurch ist eine genaue Frequenzberechnung spezifischer T-Zellen möglich. Außerdem ist die Methode im Vergleich zum Chrom-Freisetzungstest nicht radioaktiv. Da zudem gezeigt wurde, daß spezifische IFN- γ -sezernierende T-Zellen sich auch als zytotoxisch im Chrom-Freisetzungstest erweisen, wurde der IFN- γ -ELISpot als Nachweismethode für spezifische T-Zellen dem Chrom-Freisetzungstest vorgezogen und für die weiteren Versuche eingesetzt.

4.3 Beladung von DZ mit HPV16-E7-Antigenen

Die Identifizierung und Charakterisierung von HLA-restringierten Epitopen von HPV16-E6 und -E7 hat die Entwicklung antigen-gerichteter Vakzine ermöglicht. DZ, die mit E7-spezifischen T-Zell-Epitopen gepulst wurden, konnten im Maussystem eine protektive E7-spezifische, T-zellvermittelte Immunität generieren (Ossevoort et al., 1995). Desweiteren zeigte die Behandlung von Tumoren mit Peptid-gepulsten DZ eine Tumorrogression in verschiedenen Tumormodellen (Übersicht in Mayordomo et al., 1995). Neben den charakterisierten HLA-A2-restringierten HPV16-E6 und E7-Peptiden sind mittlerweile auch Peptide für weitere HPV-Typen sowie Epitope für MHC-II-Moleküle beschrieben worden (Yoon et al., 1998; van der Burg et al., 2001; Castellanos et al., 2001). Als Vakzine ist die Applikation von Peptid-gepulsten DZ auf Patientinnen begrenzt, die den entsprechenden HLA-Haplotyp exprimieren. In dieser Arbeit wurden DZ mit HPV16-E7-Antigenen in Form von RNA, DNA und Protein im Vergleich beladen. Der Vorteil dieser Beladungsmethoden als Vakzinierungsstrategie gegenüber der Peptidbeladungsmethode ist, daß diese Methoden unabhängig vom HLA-Haplotyp der Patientinnen sind. Bei diesen Beladungsmethoden können verschiedene Epitope von HPV16-E7 intrazellulär generiert und über die individuell vorliegenden HLA-Haplotypen präsentiert werden. Die Präsentation von multiplen Epitopen könnte zudem zu einer verstärkten Aktivierung HPV16-E7-spezifischer T-Zellen führen und die Selektion von Tumorzellen nach Verlust einzelner Zielantigene verhindern. Außerdem ist der selektive Verlust eines HLA-Restriktionselements in zervikalen Tumorzellen häufiger als ein totaler Verlust der HLA-Expression (Connor und Stern, 1990; Honma et al., 1994), womit möglicherweise eine Vakzinierung, die multiple Epitope über multiple HLA-I-Restriktionselemente präsentiert, flexibler und effizienter ist.

4.3.1 RNA-Transfektion von DZ und *in vitro* Induktion spezifischer T-Zellen

Es wurde zunächst *in vitro* transkribierte HPV16-E7-RNA synthetisiert. Zur Überprüfung der *in vitro* Transkription (IVT) und zur Etablierung der RNA-Transfektion der DZ wurde zusätzlich IVT-EGFP-RNA generiert und in HeLa-Zellen transfiziert. Dabei konnten nach 24 Stunden grün fluoreszierende Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt und gezeigt werden, daß die IVT-EGFP-RNA von den Zellen aufgenommen und translatiert wird. Desweiteren wurde zur Etablierung des Transfektionsprotokolls die „Reporter-RNA“ in DZ transfiziert. Dafür wurde polyadenylierte und nicht polyadenylierte EGFP-RNA entweder direkt oder mit dem kationischen Liposom DMRIE analog zu Nair et al. (1997) transfiziert. Es ist beschrieben, daß DZ antigenreiche Lösungen internalisieren können, da sie im unreifen

Stadium konstitutiv Makropinozytose durchführen, was für eine mögliche Beladung DZ mit RNA ohne Hilfsmittel spricht. Die Komplexierung der RNA mit kationischen Liposomen sollte die RNA vor Degradationen schützen und deren Aufnahme erhöhen. Es zeigte sich aber, daß die Transfektion DZ mit polyadenylierter RNA ohne kationische Liposomen die besten Ergebnisse erbrachte. Nair et al. (1997) konnte ebenfalls zeigen, daß die Transfektionseffizienz mit polyadenylierter RNA im Vergleich zu nicht-polyadenylierter RNA effizienter ist, vermutlich weil die Stabilität der RNA durch die Polyadenylierung erhöht wird. Weitere Transfektionen von DZ gesunder Donoren mit IVT-EGFP-RNA ohne kationische Liposomen erzielten Transfektionseffizienzen von 3,3% bis 16%, die den Transfektionseffizienzen von Nair et al. (1997) entsprechen.

Das Transfektionsprotokoll wurde für die Transfektion von DZ mit HPV16-E7-RNA übernommen. Es wurden damit T-Zelllinien gesunder Donoren angesetzt. Die CD8⁺T-Zellen wurden im ELISpot analysiert, zeigten aber keine HPV16-E7-spezifische Reaktion. Boczkowski et al. (1996) konnte im Mausmodell zeigen, daß RNA-transfizierte DZ *in vitro* eine primäre zytotoxische T-Zellantwort induzieren und nach *in vivo*-Immunisierung eine potente Antitumorantwort auslösen können. Das zeigt, daß die DZ die aufgenommene RNA translatieren, die Proteine prozessieren und über MHC-Moleküle präsentieren. Nair et al. (1997) konnte zeigen, daß DZ von gesunden Donoren, die mit IVT-CEA-RNA transfiziert wurden, eine potente zytotoxische T-Zellantwort *in vitro* nach nur 2 Stimulationszyklen induzieren. Nair et al. (1997) konnte auch eine Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen nach Stimulation mit HPV16-E6-RNA und GFP-RNA transfizierten DZ nachweisen, womit die Allgemeingültigkeit dieser Methode aufgezeigt werden sollte. In unserem System wurden 2 Donoren getestet, bei denen mit dieser Methode keine HPV16-E7-spezifischen T-Zellen nach 4 Stimulationszyklen induziert werden konnten. Eine Ursache für die Diskrepanz dieser Ergebnisse mit der Literatur könnte möglicherweise die RNA-Konzentration sein. In den Versuchen wurde in der Regel 1 µg RNA zur Beladung von DZ eingesetzt, da eine Verdopplung der Konzentration keine Erhöhung der Transfektionseffizienz mit EGFP-RNA zeigte. Die Arbeitsgruppe von Nair benutzte 1-5 µg RNA für die Beladung mit Liposomen und 1-20 µg RNA für die „nackte“ Transfektion (Mitchell und Nair, 2000). Möglicherweise kann eine deutliche Erhöhung der RNA-Konzentration zu einer effektiven T-Zellinduktion führen. Die Möglichkeit, daß sich keine E7-spezifischen Vorläuferzellen im analysierten Blut der Donoren befunden haben, ist nicht auszuschließen, obwohl theoretisch alle möglichen Epitope von HPV16-E7 von den DZ präsentiert und somit eine Vielzahl an verschiedenen T-Zellen induziert werden könnten.

Da insgesamt nur 2 T-Zelllinien getestet wurden, kann über die Effizienz dieser Beladungsmethode keine Aussage getroffen werden. Parallel zur RNA-Beladungsmethode wurde die Proteinbeladungsmethode etabliert, die vielversprechendere Ergebnisse geliefert hat, so daß die RNA-Beladungsmethode nicht weiter optimiert und verfolgt wurde.

4.3.2 DNA-Transfektion von DZ und *in vitro* Induktion spezifischer T-Zellen

Zur Etablierung eines DNA-Transfektionsprotokolls wurden DZ von gesunden Donoren zunächst mit EGFP-cDNA als Reportergen transfiziert. Für die Transfektion wurden verschiedene kationische Lipide verwendet und miteinander verglichen. Dabei zeigten sich Transfektionseffizienzen von 0-5,4%. Die beste Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe des kationischen Lipids Superfect erzielt, welches deswegen auch für die Transfektion von DZ mit HPV16-E7-DNA eingesetzt wurde. Es wurden 2 T-Zelllinien mit HPV16-E7-DNA-transfizierten DZ angelegt. Für beide Donoren konnte im ELISpot keine spezifische IFN- γ -Freisetzung mit Stimulation HPV16-E7-DNA-beladener DZ beobachtet werden, was impliziert, daß in den T-Zellkulturen keine HPV16-E7-spezifische T-Zellen induziert worden sind oder vorlagen.

Arthur et al. (1997) hat verschiedene DNA-Transfektionsmethoden für DZ verglichen. Neben Elektroporation und der CaPO₄-Präzipitation wurden auch verschiedene kommerziell erhältliche kationische Lipide getestet. Auch er fand mit Hilfe der Lipofektion Transfektionseffizienzen, die geringfügig über dem „Background“ lagen. Alijagic et al. (1995) transfizierte DZ ebenfalls mit DNA (Tyrosinase-DNA) mit Hilfe von Lipofektion. Es konnte die entsprechende mRNA sowie ein relativ geringer Proteinlevel in den Zellen detektiert werden. Der geringe Proteinlevel wird damit begründet, daß die DNA-beladenen DZ vermutlich intrazellulär Proteine relativ schnell degradieren und prozessieren. Die Tyrosinase-DNA beladenen DZ konnten in einem spezifischen zytotoxischen T-Zellklon (IVSB) eine TNF- α -Abgabe induzieren, was zeigt, daß die DNA transkribiert, die RNA translatiert, das Protein prozessiert und die Epitope präsentiert werden. Daraus wurde geschlossen, daß selbst minimale DNA-Transfektionseffizienzen ausreichen, um eine zytotoxische T-Zellantwort zu induzieren. Dies wurde bis dato in der Literatur bezüglich des Humansystems mit Hilfe der Lipofektion jedoch nicht bestätigt. Im Maussystem konnte gezeigt werden, daß DZ, die durch physikalischen Methoden (Gene Gun und Elektroporation) mit HPV16-E7-DNA beladenen wurden, eine spezifische T-Zellantwort *in vivo* induzieren können (Tuting et al., 1997; Wang et al., 2000).

Die DNA-Transfektion humaner DZ mit Hilfe der Lipofektion als Beladungsmethode war in unserem System, nicht effizient genug, um spezifische T-Zellen zu induzieren.

4.3.3 Protein-Beladung von DZ und *in vitro* Induktion spezifischer T-Zellen

Die Zugabe von HPV16-E7-Antigenen in Form von Proteinen stellt eine weitere Antigen-Beladungsmethode für DZ dar. Im Maussystem können HPV16-E7-Protein-beladene DZ *in vivo* eine tumorprotektive zytotoxische T-Zellantwort induzieren (De Bruijn et al., 1998). Für die Beladung von DZ wurden in Hefen rekombinant exprimierte E7-Proteine von HPV16 und HPV18 verwendet, die uns von K. Zumbach (ATV, Heidelberg) zu Verfügung gestellt wurden. Die Beladung der DZ erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Santin et al. (1999). Dabei wurden die Proteine im Komplex mit einem kationischen Lipid (DOTAP) auf DZ geladen. DZ können exogene Makromoleküle über Makropinozytose oder rezeptor-vermittelte Endozytose aufnehmen, wobei exogene Proteine vorwiegend über den MHC-II-Weg prozessiert und präsentiert werden und nur zu einem geringen Anteil über den MHC-I-Weg („Cross-Priming“). Bei der Beladung von DZ mit dem Protein-Lipid-Komplex soll zum Teil eine zytoplasmatische Inkorporation des Proteins erreicht werden. Dies verstärkt die Präsentation der exogenen Proteine über MHC-I-Moleküle (Santin et al. 1999). Protein-beladene DZ können somit sowohl eine CD8⁺ als auch eine CD4⁺T-Zellantwort induzieren (Santin et al. 1999). Es wurden zunächst 3 T-Zelllinien gesunder Donoren mit Hilfe von HPV16-E7-Protein-beladenen DZ generiert, die alle eine Induktion HPV16-E7-spezifischer CD4⁺T-Zellen im Proliferationstest zeigten. Es wurden weiterhin 7 T-Zelllinien angelegt, um neben der T-Helfer-Antwort auch eine Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zellen zu analysieren. Von den insgesamt 7 Donoren konnten 5 Donoren auf eine spezifische CD4⁺- und eine CD8⁺T-Zellinduktion überprüft werden. Bei 3/5 Donoren konnte sowohl eine spezifische CD4⁺- als auch eine CD8⁺T-Zellantwort beobachtet werden, 1/5 zeigte nur eine T-Helferantwort und 1/5 nur eine zytotoxische T-Zellantwort. Es konnte keine Korrelation mit dem CD4/CD8-T-Zellverhältnis in den T-Zellpopulationen und dem Expansionsindex gefunden werden. Nur 3 der 5 bzw. 7 Donoren zeigten eine Zunahme der gesamten T-Zellpopulation. Es ist zu erwarten, daß in diesen T-Zellkulturen die unspezifischen T-Zellen abgestorben sind und die spezifischen T-Zellen sich vermehrt haben, was die Abnahme der T-Zellanzahl erklärt. Bei einer HPV16-E7-spezifischen T-Zelllinie wurden die T-Zellen auch auf die HLA-A2-restringierten, HPV16-E7-Peptide (E7₁₁₋₂₀, E7₈₂₋₉₀, E7₈₆₋₉₃) getestet. Dieser Donor zeigte spezifische T-Zellen gegen alle 3 Peptide im ELISpot. Dies bestätigt die Proteinaufnahme, Prozessierung und Präsentation der HPV16-E7 Proteine durch die DZ.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die dafür verantwortlich sein könnten, daß nicht in allen gesunden Donoren sowohl eine CD8⁺ als auch eine CD4⁺T-Zellantwort induziert wurde. Zum einen kann die Funktionalität der DZ der unterschiedlichen Donoren einen Einfluß auf die T-Zellstimulation ausüben (abhängig von der Expression der MHC-Moleküle, der Adhäsionsmoleküle und der kostimulatorischen Signale). Desweiteren kann das Maß der Komplexierung mit dem kationischen Lipid einen Einfluß auf die Beladung und somit auf die Präsentation über MHC-I- und MHC-II-Moleküle nehmen. Zudem besitzt jeder Donor ein individuelles T-Zellrepertoire. Das bedeutet, daß die Frequenz der spezifischen T-Vorläuferzellen im Blut der Donoren variiert. Zuletzt ist eine Aktivierung vorhandener Gedächtniszellen nicht völlig auszuschließen, da unbekannt ist, ob die Buffy Coat-Spender jemals eine HPV-Infektion hatten.

Mit Hilfe HPV16-E7 Protein beladenen DZ kann in gesunden Donoren eine HPV16-E7-spezifische zytotoxische und/oder T-Helfer-Antwort aktiviert werden. Neben HPV16-E7 wurde dies auch für HPV18-E7 an 2 gesunden Donoren gezeigt (Santin et al., 2001).

Zudem konnte mit HPV16-E7/HPV18-E7 beladenen DZ auch in 3/3 Zervixkarzinompatientinnen sowohl eine zytotoxische als auch eine T-Helferantwort *in vitro* induziert werden (Santin et al., 1999).

4.3.4 Direkter Vergleich der DZ-Beladungsmethoden

Es wurden in dieser Arbeit drei Antigenbeladungsmethoden für DZ untersucht: die RNA-Transfektion, die DNA-Transfektion und die Proteinbeladung. Die Effizienz der Antigenbeladung und Antigenpräsentation wurde anhand der Aktivierung spezifischer T-Zellen gemessen. Dabei konnte eine Aktivierung spezifischer T-Zellen von gesunden Donoren mit Hilfe Protein-beladener DZ gezeigt werden, nicht aber mit RNA- oder DNA-transfizierten DZ. Für die Etablierung und die Analyse der Beladungsmethoden wurden allerdings Zellen von unterschiedlichen Donoren verwendet, die natürlicherweise unterschiedliche Parameter bezüglich der Anzahl und der Funktionalität der Zellen sowie unterschiedliche Anzahlen an spezifischen Vorläufer-T-Zellen und eventuell Gedächtniszellen aufweisen. Für die Analyse einer potentiellen Vakzinierungsstrategie ist es von Bedeutung, verschiedene Donoren zu testen, um die Variabilität unter den Donoren berücksichtigen zu können. Für einen direkten Methodenvergleich müssen die variablen Parameter ausgeschlossen werden. Deswegen wurden HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien generiert und mit den unterschiedlich beladenen DZ eines Donors parallel analysiert. Für die Generierung der HPV16-E7-spezifischen T-Zelllinien wurden DZ eingesetzt, die mit einer HPV16-E7

Peptidbibliothek beladen worden waren. Diese Peptidbibliothek besteht aus 8 Peptiden, die 20 AS lang sind, wovon die letzten 9 AS jeweils überlappen, um alle MHC-I-Epitope des E7-Proteins von HPV16 abzudecken. Da die Peptide 20 AS lang sind, können theoretisch auch Epitope über MHC-II-Moleküle präsentiert werden. Insgesamt wurden 4 T-Zelllinien angelegt, von denen zwei HPV16-E7-spezifisch und somit evaluierbar waren.

Diese zwei T-Zelllinien zeigten eine spezifische Proliferation der CD4⁺T-Zellen bei Stimulation mit HPV16-E7-Protein-beladenen DZ, nicht aber mit E7-RNA- oder E7-DNA-transfizierten DZ. Dies zeigt die Präsentation von HPV16-E7-Epitopen über MHC-II-Moleküle nach Proteinbeladung der DZ. Die Ergebnisse der RNA- und DNA-transfizierten DZ erklärt sich durch die Tatsache, daß die RNA- und DNA-Beladung vorwiegend zu einer Prozessierung und Präsentation über den MHC-I-Weg erfolgt. Bei Analyse der CD8⁺T-Zellen konnte nur bei einer T-Zelllinie mit Hilfe von HPV16-E7-Protein-beladenen DZ eine spezifische Aktivierung beobachtet werden, nicht aber mit RNA- oder DNA-transfizierten DZ. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Ergebnisse aus den vorher beschriebenen Versuchen scheint die Proteinbeladungsmethode in diesem System im Vergleich zu den RNA- und DNA-Beladungsmethoden die effizienteste Methode zu sein, um HPV16-E7-spezifische CD8⁺T-Zellen in gesunden Donoren zu induzieren. Ein Vorteil der Proteinbeladungsmethode im Vergleich zur RNA- und DNA-Beladungsmethode in diesem System ist die mögliche, zusätzliche Induktion einer T-Helfer-Antwort, die in vielen Fällen für die Initiation und Aufrechterhaltung einer effektiven zytotoxischen T-Zellantwort erforderlich ist (Stuhler et al., 1998; Ossendorp et al., 1998).

Eine Möglichkeit neben einer CD8⁺T-Zellantwort auch eine CD4⁺T-Zellantwort mit RNA- bzw. DNA-beladenen DZ zu erreichen, ist durch das Anfügen der Sequenz des lysosomalen Sortierungssignals des Humanproteins LAMP-1 (Lysosomen-assoziiertes Membran Protein 1) an die cDNA möglich. Mit Hilfe der chimären cDNA bzw. RNA ist ein Redirigieren von endogen exprimierten Antigenen in den MHC-II-Weg möglich, was *in vitro* zu einer zusätzlichen Aktivierung spezifischer T-Helferzellen und *in vivo* zu einem verstärkten Antitumoreffekt führt (Nair et al., 1997; Ji et al., 1999).

Im Hinblick auf das onkogene Potential von HPV16-E7, birgt das Antigen in Form von Protein eine geringere Gefahr im Vergleich zur DNA, die ins Wirtsgenom integrieren könnte. Zudem ist das Protein sowie die DNA in der praktischen Handhabung im Vergleich zur RNA stabiler, was zusätzlich für die Proteinbeladungsmethode spricht.

4.4 Validierung der Proteinbeladungsmethode

4.4.1 Generierung von rekombinantem HPV16-E7- und HPV18-E7-Protein in *E. coli*

Die Proteinbeladung von DZ hat sich in unserem System als die effizienteste Methode erwiesen, um HPV16-E7-spezifische T-Zellen zu induzieren. Um weiterführende Versuche in diese Richtung durchführen zu können, wurde zunächst rekombinantes HPV16-E7- und HPV18-E7-Protein in unserem Labor synthetisiert.

Für die Proteinexpression von HPV16-E7, HPV18-E7 und C4.8 (Nees et al., 1998) als Kontrollprotein wurde ein bakterielles Expressionssystem ausgewählt, welches eine Synthese großer Proteinmengen ermöglicht und in unserem Labor bereits etabliert war. Als prokaryotischer Expressionsvektor wurde pET29a von Novagen verwendet. Bei der Expression entsteht das gewünschte Protein mit einem S-tag am Aminoterminal und einem His-tag am Carboxyterminus. Das His-tag besteht aus sechs konsekutiven Histidinen und ermöglicht die Aufreinigung von Vollängentranskripten des rekombinanten Proteins mit Hilfe der Affinitätschromatographie. Das S-tag besteht aus 15 AS, hat ein Molekulargewicht von ca. 2 kD und kann zur Detektion des rekombinanten Proteins herangezogen werden. Das S-tag stellt eine trunkierte Form des S-Peptids dar, das eine sehr starke Affinität zu dem S-Protein aufweist und mit diesem den RNase S-Komplex bildet. Das S-Peptid ist neben dem S-Protein ein enzymatisch inaktives Produkt, das nach Spaltung der bovinen Ribonuklease A des Pankreas mit Subtilisin entsteht. Zwischen dem S-tag und dem rekombinanten Protein befindet sich noch eine Thrombinspaltungsstelle, um das S-tag zu entfernen. Die zusätzlichen AS-Sequenzen des S-tags, His-tags und der Thrombinspaltungsstelle können unter Umständen zu einer Immunogenität führen, wobei für das His-tag keine Immunogenität beobachtet werden konnte (Triccas et al., 1998). Um eine Induktion von T-Zellen gegenüber diesen Sequenzen ausschließen zu können, wurden Kontrollproteine nach dem gleichen Protokoll generiert (C4.8). Die Proteine wurden in *E. coli* exprimiert, das S-tag gegebenenfalls abgespalten und die rekombinanten Proteine in zwei unabhängigen Schritten aufgereinigt. Die Proteine zeigten singuläre Banden im Coomassie-gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Die Spezifität der Proteine konnte im Westernblot mit Hilfe eines monoklonalen HPV16-E7-Antikörpers bzw. mit Hilfe des S-Proteins dargestellt werden. Nach Silberfärbung der Proteine im SDS-Polyacrylamidgel konnten keine Kontaminationen $\geq 10\%$ beobachtet werden. Es konnten weiterhin keine DNA-Kontaminationen ≥ 1 pg Plasmid-DNA in 20 μ g Protein nachgewiesen werden. Obwohl 1 pg DNA noch ca. $1,4 \times 10^5$ Kopien Plasmid-DNA enthält, muß berücksichtigt werden, daß das rekombinante Protein bei einer potentiellen Vakzinierung nicht direkt in den Menschen appliziert wird, sondern für die Beladung autologer DZ *ex vivo* eingesetzt wird. Die DZ

werden nach Proteinbeladung und nach terminaler Differenzierung mehrmals gewaschen, so daß mögliche vorhandene DNA-Kontaminationen erheblich reduziert werden. Dasselbe gilt auch für die Hilfsmittel wie DOTAP, den Zytokincocktail sowie für die Zytokine IL-4 und GM-CSF.

Das rekombinante HPV16-E7-Protein aus E.coli wurde im Vergleich zu dem rekombinanten HPV16-E7-Protein aus Hefe (Klaus Zumbach, ATV, Heidelberg) anhand HPV16-E7-spezifischer T-Zelllinien getestet. Dafür wurden HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien mit DZ angelegt, die jeweils mit den Proteinpräparationen beladen worden waren. Die Proteine aus den unterschiedlichen Quellen wurden gegenseitig ausgetestet und als äquivalent befunden. Daraus kann man schließen, daß DZ sowohl in Prokaryoten als auch in Eukaryoten exprimiertes HPV16-E7-Protein aufnehmen, prozessieren und präsentieren, und die induzierten HPV16-E7-spezifischen T-Zelllinien Antigene aus beiden Quellen erkennen.

4.4.2 Generierung HPV16-E7- und HPV18-E7-spezifischer T-Zelllinien mit Hilfe Protein-beladener DZ in gesunden Donoren

Nach der Etablierung der methodischen Vorgehensweise wurde die Induktion von spezifischen T-Zellen mit Hilfe Protein-beladener DZ an weiteren gesunden Donoren mit dem rekombinant exprimierten HPV16-E7-Protein aus E. coli validiert. Zusätzlich sollte die Methode auf HPV18-E7 übertragen und überprüft werden, da in Zervixkarzinomen neben HPV16 (zu 50%) HPV18 der zweithäufigste HPV-Typ (zu 25 %) darstellt (zur Hausen, 2000). Es wurden insgesamt 12 generierte T-Zelllinien auf eine HPV-E7-spezifische CD4⁺ und CD8⁺T-Zellantwort getestet. 3/12 zeigten eine Aktivierung von spezifischen CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen, 3/12 nur eine spezifische CD8⁺T-Zellaktivierung, 4/12 nur eine spezifische CD4⁺T-Zellaktivierung und 2/12 zeigten keine spezifische T-Zellaktivierung. In einigen Fällen konnten „Kreuzreaktionen“ beobachtet werden, d.h. HPV16-E7-spezifische T-Zelllinien zeigten nicht nur eine Reaktion gegenüber HPV16-E7-Protein-beladenen Stimulatoren, sondern auch gegenüber Stimulatoren, die mit HPV18-E7 Protein als Kontrolle beladen wurden (und umgekehrt). Da die T-Zellen dabei aber keine Reaktion gegenüber DZ/B-LCL zeigten, die nur mit DOTAP oder C4.8 beladen worden waren, kann man eine unspezifische Reaktion gegenüber DOTAP, dem S-tag oder bakteriellen Kontaminationen nahezu ausschließen. Die beobachteten Reaktionen der HPV16-E7-spezifischen T-Zelllinien gegenüber HPV18-E7-Protein-beladenen Stimulatoren bzw. umgekehrt, könnten für eventuelle Kreuzreaktionen in diesen Donoren sprechen, die aber nicht systematisch untersucht worden sind. Bei der Beladung DZ mit E7-Protein können prinzipiell prozessierte

Epitope über alle vorhandenen HLA-Moleküle (MHC-I- und MHC-II) des entsprechenden Donors präsentiert werden. Da die E7-Proteine von HPV16 und HPV18 zu 42% homologe Aminosäuresequenzen aufweisen, besteht zumindest die Möglichkeit, dass sequenz- oder strukturähnliche Peptide bezüglich eines bestimmten HLA-Moleküls eine Kreuzreaktion auslösen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß mit autologen, HPV-E7-Protein-beladenen DZ spezifische CD4⁺ und/oder CD8⁺ T-Zellen in mehr als 80% der gesunden Donoren induziert werden konnten. Da der HPV-Status der Buffy Coat-Spender nicht bekannt war, ist nicht auszuschließen, daß neben einer *de novo* Induktion E7-spezifischer T-Zellen auch vorhandene Gedächtniszellen aktiviert worden sind. Möglicherweise waren die negativen Donoren bisher noch nie HPV exponiert, und es konnte aufgrund fehlender spezifischer Vorläuferzellen keine E7-spezifische T-Zellantwort induziert oder aktiviert werden. Weitere Ursachen könnten die nicht einkalkulierbaren Variablen unter den Donoren sein wie das T-Zellrepertoire, die Qualität und die Funktionalität der Zellen.

Die Auftrennung der Ergebnisse nach HPV16 und 18 zeigt, daß in mehr Donoren eine HPV16-E7- als HPV18-E7-spezifische T-Zellantwort aktiviert wurde. Dies könnte möglicherweise mit einer höheren Durchseuchungsrate von HPV16 im Vergleich zu HPV18 in der Bevölkerung zu erklären sein.

4.5 DZ von Tumorpatientinnen und *ex vivo*-Aktivierung von tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TIL)

4.5.1 DZ von Zervixkarzinompatientinnen

DZ können mit HPV-E7-Protein beladen *in vitro* eine spezifische T-Zellantwort in gesunden Donoren aktivieren. Als potentielle Vakzinierungsstrategie sollten die DZ von Zervixkarzinompatientinnen qualitativ den DZ von gesunden Donoren entsprechen.

Bei der *in vitro*-Generierung von DZ aus Blutmonozyten von CIN-Patientinnen konnten keine Unterschiede zu DZ von gesunden Donoren festgestellt werden (Hubert et al., 1998). Um zu überprüfen, ob Blutmonozyten von Zervixkarzinompatientinnen das gleiche Potential besitzen, in DZ zu differenzieren wie die Blutmonozyten gesunder Donoren, wurden DZ von zwei Zervixkarzinompatientinnen generiert und bezüglich ihres Phänotyps und ihrer allogenen, stimulatorischen Kapazität untersucht. Die DZ einer Patientin waren vergleichbar mit DZ von gesunden Donoren. Die DZ der zweiten Patientin zeigten eine geringere Expression der CD83- und MHC-II-Moleküle sowie eine stark verminderte Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, die mit einer geringeren allogenen,

stimulatorische Kapazität verbunden war. Dies verdeutlicht die individuellen Unterschiede der DZ zwischen den Zervixkarzinompatientinnen. Aus Blutmonozyten generierte DZ von verschiedenen Tumorpatienten nach Chemotherapie zeigen im Vergleich zu DZ gesunder Donoren eine geringere CD86 und MHC-II-Expression auf (Hasebe et al., 2000). Die geringe Expression dieser Moleküle ist wahrscheinlich für die verminderte allogene T-Zellstimulation dieser DZ verantwortlich (Hasebe et al., 2000). Im Gegensatz dazu konnten DZ aus Blutmonozyten von Mammakarzinompatientinnen und Nierenzellkarzinompatienten generiert werden, die vom Phänotyp den DZ gesunder Donoren vergleichbar waren (Radmayr et al., 1995; Gabilovich et al., 1997). Dies zeigt, daß die Fähigkeit der DZ-Vorläuferzellen, in DZ zu differenzieren, sich in den Tumorpatienten unterscheidet. Möglicherweise hängt diese Fähigkeit vom klinischen Status der Patienten, dem Tumortyp und der vorhergehenden Therapie ab. Der Mechanismus, der für diese verminderte Entwicklungskapazität der DZ aus Monozyten verantwortlich ist, ist unklar. Vielleicht verhindern in Tumorpatienten Tumorproduzierte Zytokine wie TGF- β , IL-6, IL-10 und VEGF die Kapazität von Monozyten sich in reife DZ zu entwickeln. Auch die vorangegangenen Therapien, wie z.B. immunsuppressive Chemotherapien, könnten einen Einfluß darauf haben.

4.5.2 Ex vivo-Aktivierung HPV-E7-spezifischer TIL

In Zervixkarzinompatientinnen konnte mit Hilfe von LDA („limiting dilution analysis“) *ex vivo* eine höhere Frequenz von HPV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen im Tumor und den abführenden Lymphknoten als in den peripheren Blutlymphozyten nachgewiesen werden (Evans et al., 1997). Das läßt vermuten, daß spezifische zytotoxische T-Zellen fähig sind, zu den HPV-transfomierten Zellen der Zervix zu wandern oder dort zu expandieren. Die Anwesenheit von HPV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen im Tumor und den Lymphknoten reflektiert aber keine effektive Antitumorantwort. Möglicherweise verhindern lokale Faktoren die Zerstörung von Tumorzellen, wie z.B. i) MHC-I-Down-Regulation, ii) Induktion von T-Zelltoleranz durch Tumorzellen, die keine kostimulatorischen Signale übermitteln oder iii) die Sekretion von verschiedenen immunsuppressiven Zytokinen einschließlich IL-10, TGF1- β und VEGF. Als potentielle Vakzine sollten DZ in der Lage sein, spezifische T-Zellen in Zervixkarzinom-Patientinnen zu aktivieren. Im Tiermodell können DZ die Toleranz bei schwach immunogenen Peptiden im Vergleich zu anderen Adjuvanzen brechen (Schreuers et al., 2000). Desweiteren konnten TIL aus Nierenzellkarzinomen und Leberzellkarzinomen mittels Antigen-beladener DZ aktiviert und deren zytolytische Aktivität verstärkt werden (Mulders et al., 1999; Friedl et al., 2000). Das Tumorwachstum wird wahrscheinlich

hauptsächlich durch den lokalen Immunstatus reguliert, und die TIL reflektieren mit ihrer fehlenden Immunreaktivität die Tumor-Wirt-Interaktion akkurater als PBL. Daher wurde nicht das PBL-Kultur-System, sondern das TIL-Kultur-System benutzt, um zu testen, ob HPV-E7-Protein-beladene, autologe DZ direkt HPV-E7-spezifische T-Zellen aktivieren können. Dafür wurden TIL aus Zervixkarzinombiopsien isoliert und unmittelbar ohne Selektion im ELISpot mit Hilfe autologer, E7-Protein-beladener DZ auf ihre IFN- γ -Freisetzung getestet.

In 2/12 TIL-Kulturen von Zervixkarzinompatientinnen konnte *ex vivo* eine spezifische IFN- γ -Freisetzung nachgewiesen werden. Dieselben TIL-Populationen sowie die TIL-Population einer weiteren Patientin wiesen eine E7-spezifische IFN- γ -Freisetzung nach unspezifischer Expansion der TIL-Kulturen mit anti-CD3/28 Dynalbeads auf. Die TIL-Populationen der übrigen Patientinnen als auch die direkt analysierten PBL aller Patientinnen zeigten keine spezifische Reaktion im ELISpot. Möglicherweise befanden sich nicht in allen TIL-Kulturen HPV-E7-spezifische T-Zellen oder die einmalige Stimulation mit DZ konnte die Toleranz oder Inhibition/Anergie der spezifischen T-Zellen in diesen Patientinnen nicht aufheben. Die Frequenz der HPV-E7-spezifischen T-Zellen im Blut ist vermutlich zu gering, um direkt ohne vorherige *in vitro*-Stimulation detektiert werden zu können. Während der unspezifischen Expansion mit den anti-CD3/28 Dynalbeads konnte die HPV-E7-Spezifität der TIL-Kulturen erhalten bleiben, wobei eine Patientin (Pt.64) eine mindestens doppelte so hohe Frequenz an spezifischen T-Zellen nach Expansion zeigte. Dies wurde auch für andere Tumore gezeigt (Hellström et al., 2001). Bei einer weiteren Patientin konnte erst nach unspezifischer Expansion eine HPV-E7-spezifische T-Zellantwort detektiert werden. Möglicherweise war die Frequenz der spezifischen T-Zellen zu gering, um direkt *ex vivo* detektiert werden zu können. Der Expansionsindex zeigt, daß nur in 6 der 12 TIL-Kulturen eine Expansion stattgefunden hat. Dies läßt sich möglicherweise dadurch erklären, daß für die Analyse der TIL auf lange eingefrorenes Material zurückgegriffen wurde. Da die HPV-E7-spezifischen TIL-Kulturen zur Gruppe ohne Expansion gehörten, läßt der Expansionsindex keine Rückschlüsse auf die Spezifität zu. Phänotypische Charakterisierungen der TIL-Kulturen vor und nach der Expansion haben in 4/5 untersuchten Kulturen eine deutliche Zunahme der CD8⁺T-Zellpopulation im Vergleich zur CD4⁺T-Zellpopulation gezeigt. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, daß während der unspezifischen Expansion die TIL durch kontaminierende Tumorzellen in der *in vitro*-Kultur antigen-spezifisch restimuliert wurden. Bei drei zusätzlich expandierten TIL-Populationen wurde eine CD4⁺ und CD8⁺T-Zellseparation durchgeführt und beide T-Zellpopulationen getrennt voneinander auf HPV-E7-

Spezifität untersucht, wobei 3/3 spezifische CD4⁺T-Zellen und 2/3 spezifische CD8⁺T-Zellen zeigten.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse, daß mit autologen DZ, die aus Blutmonozyten generiert wurden, *ex vivo* HPV-spezifische TIL direkt stimuliert werden können. Diese spezifischen TIL können mit Hilfe von anti-CD3/28 Dynalbeads expandiert werden, wobei die Spezifität erhalten bleibt. Dies ermöglicht nun aus kleinen Tumorproben, TIL zu isolieren, zu expandieren und deren Spezifität für verschiedene Fragestellungen zu charakterisieren.

4.6 Heilversuche

Tumorassoziierte-Antigen- (TAA) beladene DZ wurden erfolgreich als zelluläre Vakzine eingesetzt, um eine protektive und therapeutische Immunantwort in verschiedenen Tiermodellssystemen zu induzieren (Mayordomo et al., 1995, 1996; Porgador et al., 1996; Boczkowski et al., 1996). Desweiteren konnte gezeigt werden, daß *in vitro* TAA-beladene DZ auch TAA-spezifische zytotoxische T-Zellen im peripheren Blut von gesunden Donoren und von Tumorpatienten induzieren können (Nair et al., 1998; Santin et al., 1999; Schoell et al., 1999). Auf der Basis dieser Ergebnisse wurden verschiedene klinische Studien mit Tumorantigen-beladenen DZ an Tumorpatienten initiiert. Die ersten klinischen Studien mit DZ wurden an Melanompatienten durchgeführt, bei denen DZ mit Peptiden oder Tumorlysat benutzt wurden. Diese Studien zeigten, daß solche Vakzine keine signifikante akute Toxizität in Bezug zur DZ-Injektion aufweisen und *in vivo* eine zytotoxische T-Zellantwort in einigen Patienten induzieren können. In einer Subpopulation dieser vakzinierten Patienten konnten klinische Remissionen wie komplette oder partielle Tumorregression und Regression individueller Metastasen beobachtet werden (Hsu et al., 1996; Nestle et al., 1998; Thurner et al., 1999). Diese Studien zeigen potentielle therapeutische Effekte der DZ-Vakzinierung auf.

Aufgrund der erzielten und ermutigenden Resultate in verschiedenen klinischen Studien an anderen Tumorentitäten und der in dieser Arbeit erzielten präklinischen Daten wurde an der Frauenklinik der FSU Jena eine Serie von individuellen Heilversuchen mit *ex vivo* generierten, HPV16-E7- oder HPV18-E7-Protein-beladenen, autologen DZ an terminalen Zervixkarzinompatientinnen durchgeführt, bei denen alle bisher etablierten Therapieoptionen (Operation, Chemotherapie, Bestrahlung) ausgeschöpft waren. Das Ziel dieser Heilversuche war es, ein klinisches Ansprechen im Sinne einer Tumorregression oder Vermeidung einer Progression und damit eine Verlängerung der Überlebenszeit zu erreichen. Zusätzlich sollte die Durchführbarkeit der Vakzinierung und die Verträglichkeit der Vakzine bestimmt werden. Für die Generierung der Vakzine wurde den Patientinnen jeweils 50-100 ml peripheres Blut

entnommen. Die isolierten PBL aus dem Blut wurden für die DZ-Generierung eingesetzt. Die DZ wurden mit HPV16- oder HPV18-E7-Protein (je nach vorliegender HPV-Infektion der Patientin) beladen und für 2 Tage mit proinflammatorischen Zytokinen terminal ausdifferenziert. Die DZ wurden am Ende der Ausdifferenzierung mit 60 Grey bestrahlt, 3x gewaschen, in Ringer's Lösung resuspendiert und den Patientinnen subkutan injiziert. Eine geplante dreimalige Impfung im 14 Tage Rhythmus war aufgrund der physischen Verfassung und der Verfügbarkeit der Patientinnen nicht immer möglich, so daß die Impfung in der Regel individuell durchgeführt wurde. Es wurden klinische Parameter wie Tumorregression und Nebenreaktionen im Rahmen der normalen klinischen Evaluation verfolgt und in den meisten Fällen der Serum-Tumormarker SCC („squamous cell carcinoma“) ermittelt. Zusätzlich wurde nach Absprache mit den Patientinnen das bei jeder Blutentnahme anfallende Serum sowie die nicht-adhärenenten PBL für den Nachweis einer möglichen Immunantwort verwendet. Insgesamt wurden 15 austherapierte Zervixkarzinompatientinnen in diesem Heilversuch vakziniert. Die DZ-Vakzinierung führte insgesamt bei den Patientinnen zu keinen systemischen oder lokalen Nebenwirkungen.

Der SCC-Tumormarker spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Verlaufs von Therapiebehandlungen bei Zervixkarzinompatientinnen, wenn dieser bei der Primärdiagnose erhöht vorliegt (Avall-Lundqvist et al., 1989; Kornafel und Wawrzkievicz, 1989). Dabei dient ein erhöhter SCC-Spiegel im Serum als unabhängiger Prognosefaktor, der mit der Rezidivhäufigkeit korreliert. Der Tumormarker SCC wurde während der Vakzinierungsphase bei jeder Blutentnahme der Patientinnen bestimmt. 3/15 Patientinnen wurden nur einmal geimpft, so daß eine Analyse des SCC-Wertes im Verlauf nicht möglich war. Bei 2/12 Patientinnen wurde kein Tumormarker bestimmt. Bei den übrigen 10 evaluierbaren Patientinnen zeigte eine Patientin keinen erhöhten SCC-Spiegel im Serum, 4 Patientinnen zeigten eine Zunahme des SCC-Wertes im Verlauf der Impfung und 5 Patientinnen zeigten eine Zunahme des SCC-Wertes, der im Verlauf der Impfung transient abnahm. Die transiente Abnahme des SCC-Wertes in 5/10 Patientinnen könnte im Zusammenhang mit der Impfung stehen. Um einen wirklichen Zusammenhang zwischen den transienten Abnahmen des SCC-Wertes und der Impfung herstellen zu können, wäre ein Vergleich des SCC-Verlaufs von nicht-vakzinierten terminalen Zervixkarzinompatientinnen notwendig, um zu überprüfen, ob auch im „normalen“ Verlauf transiente Abnahmen des SCC-Wertes auftreten. Allerdings werden bei nicht vakzinierten Patientinnen nicht so viele SCC-Werte gemessen.

Es wurde beschrieben, daß eine tumorspezifische IgG-Antwort in einer Reihe von Anti-tumorantworten in murinen und klinischen Studien involviert war (Übersicht in Offringa et al., 2001). HPV-E7 Protein beladene DZ sind in der Lage, über MHC-II-Moleküle HPV-spezifische Epitope zu präsentieren und T-Helfer-Zellen zu aktivieren. T-Helfer-Zellen können abhängig von Zytokinen in ihrer lokalen Umgebung in T_{H1} - oder T_{H2} -Zellen differenzieren. Eine T_{H1} -Antwort ist assoziiert mit der zellvermittelten Immunität und einem Zytokinprofil von IL-2, TNF- α und IFN- γ . Eine T_{H2} -Antwort ist dagegen assoziiert mit der humoralen Immunität und einem Zytokinprofil von IL-4, IL-6 und IL-10. Eine Induktion einer humoralen Immunantwort wäre theoretisch durch HPV-Antigen-beladene DZ möglich. Aus diesem Grund wurden die Seren der geimpften Patientinnen auf IgG-Antikörper gegen die HPV16/HPV18-E6 und -E7 Proteine untersucht. Diese Untersuchung wurden von Peter Sehr (ATV, Heidelberg) durchgeführt, der uns die Ergebnisse mitgeteilt hat. Dabei zeigten 3/15 Patientinnen keine Antikörper im Serum gegen E6 und E7 des vorliegenden HPV-Typs. Alle übrigen Patientinnen wiesen einen deutlich hohen Titer gegen E6 auf. 8/12 Patientinnen zeigten auch einen anti-E7-Titer, der im Vergleich zum anti-E6-Titer relativ niedrig war. Von diesen 8 Patientinnen zeigten 2 Patientinnen konstante Werte, 1 Patientin eine leichte Abnahme, 5 Patientinnen eine unspezifische Zunahme aller gemessener Ak-Titer und eine Patientin eine Zunahme des anti-E7-Titers im Verlauf der Impfung.

Verschiedene Studien haben eine Assoziation zwischen Serum-Antikörper gegen HPV16-Proteinen und dem Zervixkarzinom mit einer signifikant höheren Seropositivität in Patientinnen im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation gezeigt (Meschede et al., 1998; Zumbach et al., 2000). Es wurde berichtet, daß Seropositivität gegen HPV16-E7 mit dem Grad und dem Stadium des Zervixkarzinoms korreliert und mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Baay et al., 1999). Die schlechtere Prognose bei der Entwicklung einer humoralen Immunantwort gegen HPV legt nahe, daß sich Antikörper eher als Resultat einer verlängerten Exposition der Antigene und einem verstärkten Virusload und nicht als Mechanismus für eine Tumorregression entwickeln. Unter dieser Annahme wäre die ausschließliche Induktion einer humoralen Immunantwort ohne zellvermittelte Immunantwort als Resultat einer Vakzinierung möglicherweise nicht effektiv. Ob die beobachtete Zunahme des HPV16-E7-Titers einer Patientin mit der Vakzinierung in Verbindung steht, kann nicht eindeutig geklärt werden.

Desweiteren erfolgte ein *in vitro*-Monitoring der zellulären Immunantwort. Dabei sollte überprüft werden, ob die Patientinnen HPV16/18-E7-spezifischen T-Zellen im Blut aufweisen

und ob es nach Impfung zu einer Induktion oder Anreicherung dieser T-Zellen gekommen ist. Verschiedene Impfstudien haben gezeigt, daß für einen direkten Nachweis induzierter spezifischer T-Zellen die Anzahl in PBL oftmals zu gering ist, um mittels IFN- γ -ELISpot detektiert zu werden und durch einmalige *in vitro*-Restimulation erhöht werden kann (Übersicht in Offringa et al., 2000; Jonuleit et al., 2001). Mehrmaliges Restimulieren könnte aber zu einer *in vitro*-Induktion führen, die man vermeiden möchte. Deswegen wurden die nicht-adhärenenten PBL der verschiedenen Zeitwerte einmalig mit dem E7-Peptidpool bestehend aus den 20meren *in vitro* restimuliert, um die Anzahl möglicher vorhandener E7-spezifischer T-Zellen zu erhöhen und nachweisen zu können. Die nicht-adhärenenten PBL wurden aufgrund ihrer geringen Anzahl unselektioniert im IFN- γ -ELISpottest und im Proliferationstest analysiert. Zusätzlich wurden die nicht-adhärenenten PBL mit anti-CD3/28 Dynalbeads getestet, um ihre prinzipielle Aktivierbarkeit zu überprüfen, da die Möglichkeit besteht, daß aufgrund vorangegangener Therapien die Zellen insgesamt supprimiert sein könnten. Im ELISpot wurden die Stimulatoren mit E7-Peptidpool und als Kontrolle mit L1-Peptidpool des jeweils anderen HPV-Typs (HPV16 bzw. HPV18) beladen, da gezeigt werden konnte, daß E7-spezifische T-Zellen sowohl mit E7-Protein-beladenen als auch mit E7-Peptidpool-beladenen DZ gleichermaßen im ELISpot aktiviert werden können (persönliche Mitteilung Dr. Ferrara, Jena). Insgesamt wurden 11 Patientinnen in die ELISpotanalyse eingeschlossen. 1/11 zeigte keine Aktivierbarkeit der nicht-adhärenenten PBL mit den anti-CD3/28 Dynalbeads. 3/10 Patientinnen zeigten eine HPV16-E7-spezifische IFN- γ -Freisetzung nach der Impfung im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Impfung. Davon zeigte eine Patientin (Pt. 11), die nur gegen die HLA-A*0201-restringierten HPV16-E7-Peptide getestet wurde, eine Induktion HPV16-E7₈₆₋₉₃-spezifischer T-Zellen 4 Wochen nach der ersten Impfung. Pt. 3 zeigte nach der ersten und zweiten Impfung und Pt. 14 7 Tage nach der 4. Impfung HPV16-E7-spezifische PBL im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Impfung. Dabei zeigten die PBL des Zeitpunktes vor der Impfung eine gleichmäßig starke unspezifische IFN- γ -Freisetzung bei Stimulation mit autologen DZ/PBL, die entweder unbeladen oder mit L1-Peptidpool (HPV18) bzw. mit E7-Peptidpool (HPV16) beladen wurden. Die Analyse der PBL nach Impfung zeigte eine deutliche erhöhte Frequenz von IFN- γ -freisetzenden T-Zellen bei Stimulation mit HPV16-E7-Peptidpool beladenen DZ, weniger aber mit unbeladenen oder mit Kontrollpeptidpool beladenen DZ/PBL. Daraus kann man schließen, daß es sich hierbei um eine HPV-E7-spezifische Reaktion handelt, die auf eine Aktivierung und Expansion E7-spezifischer T-Zellen in den Patientinnen zurückzuführen ist.

Zusätzlich wurden die nicht-adhärenenten PBL im Proliferationstest auf HPV-E7-Spezifität getestet. Die Stimulatoren (autologe B-LCL), die ausreichend zur Verfügung standen, wurden mit E7-Peptidpool und mit E7-Protein beladen. Es konnte bei allen Patientinnen beobachtet werden, daß der E7-Peptidpool als auch der Kontrollpeptidpool zu einer unspezifischen Proliferation führt. Dies macht deutlich, daß der Peptidpool mit entsprechender Kontrolle im Proliferationstest nicht geeignet ist, um eine spezifische Proliferation zu detektieren. Die Proliferation der n.a. PBL nach Kokultur mit Protein-beladenen Stimulatoren war in der Regel niedriger als mit Peptid-beladenen Stimulatoren. Dies könnte möglicherweise auf die unterschiedlichen Beladungsmethoden zurückzuführen sein. Die Proteine wurden im Komplex mit DOTAP verabreicht, wobei DOTAP die Vitalität der Zellen negativ beeinflussen kann und damit die allgemeine stimulatorische Kapazität der Zellen verringert. Die Peptidpools wurden dagegen direkt auf die Stimulatoren geladen. In 2 von 10 evaluierbaren Patientinnen (Pt. 14 und Pt. 17) konnte mit Hilfe Protein-beladener Stimulatoren eine Proliferation spezifischer T-Zellen nach Vakzinierung nachgewiesen werden.

Insgesamt konnte in 4 Patientinnen eine Aktivierung HPV16-E7-spezifischer T-Zellen nach Vakzinierung entweder mittels Proliferationstest oder ELISpot detektiert werden, wobei eine Patientin (Pt. 14) in beiden Analysen eine spezifische Reaktion zeigte. Da vor der Analyse aufgrund der begrenzten Zellzahl keine Selektion der CD4⁺ oder CD8⁺T-Zellen durchgeführt werden konnte, kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob es bei diesen Patientinnen zu einer Aktivierung von T-Helfer-Zellen oder zytotoxischen T-Zellen gekommen ist (da auch CD4⁺T-Zellen IFN- γ sezernieren können). Es wäre zu erwarten gewesen, daß die spezifischen T-Zellen in beiden Analysen detektiert werden können, was allerdings nur der Fall bei Pt. 14 war. Die immunologischen Reaktionen korrelierten nicht mit den beobachteten transienten Abnahmen des SCC-Wertes in 5 Patientinnen.

Ob diese Ergebnisse wirklich in Zusammenhang mit der Impfung stehen, kann nicht geklärt werden. Um diese Aussage bekräftigen zu können, wäre es von Vorteil, für sämtliche *in vitro*-Analysen (Tumormarker, zelluläre und humorale Immunantwort) eine Kontrollpopulation gesunder Donoren oder eine Placebo-Gruppe mitzuführen. Damit könnte der Background der verschiedenen Analysen ermittelt werden und ein kausaler Zusammenhang der Ergebnisse zur Vakzinierung hergestellt werden. Da in diesem Heilversuch keine Kontrollgruppe eingeschlossen werden konnte, können die erzielten Ergebnisse des *in vitro*-Monitorings nur einen deskriptiven Charakter haben. Die rechtliche Lage verbietet beim individuellen Heilversuch die Objektivierung der Ergebnisse mittels der Untersuchung von

Kontrollgruppen. Ansonsten wäre es eine „klinische Studie“ für die andere Standards wie GMP-Impfstoff, Studienprotokolle, Ethikvotum, etc. gefordert werden.

Insgesamt zeigten die Patientinnen kein objektives klinisches Ansprechen auf die DZ-Vakzinierung. In anderen HPV-Vakzinierungsstudien konnte eine vakzin-induzierte Immunität gegen die Antigene E6 und E7 in einigen Patientinnen beobachtet werden, aber ebenfalls ohne ein signifikantes klinisches Ansprechen (Übersicht in Offringa et al., 2001; Adams et al., 2001). Dafür kann es verschiedene Ursachen geben, die, soweit bekannt, bereits diskutiert werden, aber noch nicht zufriedenstellend beantwortet werden können. Eine Ursache für das fehlende klinische Ansprechen in den Heilversuchen könnte die Anzahl der applizierten DZ sein. In verschiedenen klinischen Studien, die zum Teil ein klinisches Ansprechen in Tumorpatienten zeigten, wurden 4-40 Millionen DZ pro Applikation benutzt. Das sind 10-100 mal mehr DZ als in den Heilversuchen eingesetzt werden konnten. Es ist allerdings bisher nicht gezeigt, ob die Anzahl applizierter DZ eine Rolle bei der Auslösung einer effektiven Immunantwort spielt.

Die Applikationsroute könnte möglicherweise die Migration in die Lymphknoten und die Immunoreaktivität der DZ beeinflussen. Die vorliegenden Daten dazu sind bisher sehr begrenzt. DZ wurden in verschiedenen Studien intradermal, subkutan, intravenös oder intranodal appliziert (Übersicht in Brossart et al., 2001). Ein direkter Vergleich der verschiedenen Applikationsrouten wurde bisher noch nicht durchgeführt. Vergleiche im Maussystem haben gezeigt, daß intravenöse Applikationen von DZ weniger immunogen sind als subkutane Verabreichung (Lappin et al., 1999). Fong et al. (2001) konnte eine vergleichbare antigenspezifische T-Zellantwort nach Immunisierung beobachten, unabhängig von der Applikationsroute (intravenös, intradermal und intranodal). Morse et al. (1999) konnte zeigen, daß eine intradermale, aber nicht intravenöse Applikation zur nodalen Lokalisation injizierter DZ im Humansystem führt. Studien in Schimpansen haben gezeigt, daß nach subkutaner Impfung die DZ in die Lymphknoten wandern (Barratt-Boyes et al., 2000). Ob die Applikationsroute wirklich relevant für die Auslösung einer Immunantwort ist, und welchen Einfluß die Applikationsroute auf die *in vivo* Wanderung der DZ hat, ist im Augenblick noch nicht genau zu beantworten.

Eine weitere Rolle könnten die Ausgangszellen, die für die DZ-Generierung eingesetzt werden, sowie die Kulturbedingungen als auch die Differenzierung der DZ bei der Induktion einer Immunantwort spielen. Diese Parameter sind allerdings bei der Verwendung von DZ als Vakzine noch nicht unmittelbar miteinander verglichen worden.

Ein weiterer wichtiger Aspekt im Hinblick auf das Zervixkarzinom ist die Tatsache, daß die meisten Zervixkarzinome eine Herunterregulierung der MHC-I-Moleküle zeigen (Keating et al., 1995), die auch in CIN-Läsionen beobachtet werden konnte. Der Verlust beispielsweise der Expression von HLA-B7 und HLA-B44 korreliert signifikant mit einem schlechteren klinischen Verlauf für Zervixkarzinompatientinnen und einer Streuung von Metastasen (Keating et al., 1995, Ellis et al., 1995; Bontkes et al., 1998). Die MHC-I-Moleküle sind wichtig für die Präsentation viraler Antigene an die spezifischen T-Zellen. Dieser Verlust hat kritische Folgen für die Immunerkennung, da keine oder eine verminderte Anzahl an Peptiden auf der Oberfläche von Tumorzellen präsentiert werden und diese somit von zytotoxischen T-Zellen nicht erkannt werden können. Aus diesem Grund ist es notwendig, zunächst die HLA-Expression der Tumorzellen der Zervixkarzinompatientinnen zu überprüfen, um mit Hilfe einer DZ-Vakzinierung eine effektive zytotoxische T-Zellantwort unter diesem Gesichtspunkt gewährleisten zu können. Dies konnte nur zum Teil bei den Zervixkarzinompatientinnen, die an dem Heilversuch teilgenommen haben, durchgeführt werden.

Weiterhin wurde beschrieben, daß T-Lymphozyten von Zervixkarzinompatientinnen Abnormalitäten des Signaltransduktions-Apparates im T-Zellrezeptor aufweisen (Kono et al., 1996). Dies könnte die Fähigkeit spezifischer T-Zellen eine zytotoxische Lyse von Tumorzellen auszulösen, verschlechtern.

Aufgrund der funktionellen Unterschiede zwischen Immunoproteasomen der DZ und der „konstitutiven“ Proteasomen der Tumorzellen, präsentieren DZ möglicherweise bestimmte Epitope nicht, die auf Tumorzellen exprimiert werden (Morel et al., 2000). Dies könnte zu einer Induktion tumorspezifischer T-Zellen führen, die die Tumorantigene auf Tumorzellen nicht erkennen. Immunoproteasomen sind bezüglich der Produktion MHC-I-bindender Peptide effizienter. Dies ist allerdings nicht für alle Epitope gültig. Manche Epitope werden nicht effizient von Zellen mit Immunoproteasomen prozessiert und folglich nicht effizient präsentiert (Übersicht in Van den Eynde und Morel, 2001). Dies könnte zu einer ineffizienten T-Zellaktivierung führen.

Eine weitere Ursache für ein fehlendes klinisches Ansprechen nach der DZ-Vakzinierung könnte auch die Expression anti-apoptotischer Moleküle in Tumorzellen sein, die sie resistent gegen die Lyse durch zytotoxischen T-Zellen machen. Neben verschiedenen anderen Tumorentitäten wurde für einige Zervixkarzinomzelllinien und Primärtumore die Expression des anti-apoptotischen Moleküls PI-9 (Protease-Inhibitor) beschrieben, welches die Tumorzellen gegen die Lyse durch den Perforin/Granzym B-Weg der zytotoxischen T-Zellen

schützt (Medema et al., 2001). Dieses Phänomen tritt aber nicht in allen Tumoren auf, und ist also kein generelles Merkmal von Tumorzellen.

4.7 Ausblick

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zur Entwicklung und ersten Anwendung einer DZ-Vakzine für Zervixkarzinompatientinnen bieten eine Basis für weitergehende Arbeiten.

Die Ergebnisse des *in vitro*-Monitorings der durchgeführten Heilversuche sind nur deskriptiv zu bewerten. Die Durchführung einer klinische Studie ist notwendig, die einen Vergleich mit einer Kontrollpopulation und standardisierten Bedingungen einschließt.

Fortführende Forschungen in unserem Labor haben gezeigt, daß DZ, die mit dem E7-Peptidpool (bestehend aus den 20meren) beladen wurden, *in vitro* eine HPV-E7-spezifische T-Zellantwort in gesunden Donoren induzieren können, die der Induktion durch Protein beladene DZ äquivalent ist. Die Verwendung von synthetischen Peptiden für die Beladung von DZ würde im Gegensatz zur Verwendung von rekombinanten Proteinen und Hilfsstoffen (DOTAP) eine Anwendung unter GMP-Bedingungen in einer klinischen Studie erleichtern. Desweiteren wäre es notwendig, nur Zervixkarzinompatientinnen einzuschließen, die noch eine ausreichende MHC-I-Expression der Tumorzellen zeigen. Denkbar wäre auch die zusätzliche Verabreichung von Adjuvanzen, die eine Immunantwort verstärken können wie z. B. die direkte Verabreichung von Zytokinen wie GM-CSF, IL-2, IL-12 oder IFN- α , die eine zytotoxische und T_H1-Antwort unterstützen (Jäger et al., 1996). Die Zugabe von IL-2 in Kombination mit einer DZ-Vakzinierung könnte zu einer verstärkten zytotoxischen T-Zell-Aktivierung führen sowie zu einer Aktivierung von anderen Zellen wie NK-Zellen, die Apoptose in HLA-negativen Zellen induzieren können (Übersicht in Hadzantonis und O'Neill, 1999). Santin et al. (2002) konnte in einer HPV18 positiven Zervixkarzinompatientin nach Vakzinierung autologer, HPV18-E7-Protein-beladener DZ in Kombination mit einem adoptiven Transfer autologer, HPV18-E7-spezifischer T-Zellen und zusätzlicher Applikation von IL-2 eine Regression von Lungenmetastasen für einen Zeitraum von 20 Monaten beobachten.

Allgemein bedarf es weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen bezüglich der DZ-Ausgangszellen, der DZ-Dosis, der Applikationsroute, der *in vivo* Wanderung von DZ, kombinierter Therapien u.a., um die *in vivo* Mechanismen einer DZ-Vakzinierung aufzuklären und therapeutische Erfolge zu erzielen.

5. Zusammenfassung

Humane Papillomviren (HPV) sind mit der Zervixkarzinogenese assoziiert. Die HPV-Typen 16 und 18 sind die prävalentesten HPV-Genotypen im Zervixkarzinom. Die Onkoproteine E6 und E7 dieser Viren werden konstitutiv in infizierten zervikalen Tumorzellen exprimiert und werden deswegen als tumorassoziierte Antigene angesehen. HPV-infizierte Keratinozyten induzieren keine ausreichende zelluläre Immunantwort in Zervixkarzinompatientinnen. Eine mögliche Ursache dafür könnte die fehlende Expression von kostimulatorischen Signalmolekülen der Tumorzellen sein, die für eine Aktivierung naiver T-Zellen notwendig ist. Autologe dendritische Zellen (DZ), die potentesten antigenpräsentierenden Zellen, sollten als Adjuvans für eine zelluläre Immuntherapie an Zervixkarzinompatientinnen effizient mit HPV-E7-Antigenen beladen werden. Nach Etablierung der Kultur- und Differenzierungsbedingungen für DZ, wurde die Beladung mit HPV-E7-Antigenen in Form von *in vitro* transkribierter RNA, Expressionsplasmid bzw. rekombinant exprimiertem Protein mittels Induktion spezifischer T-Zellen ausgetestet und verglichen. Die RNA- und DNA-Beladung waren ineffizient. Dagegen konnten Protein-beladene DZ in > 80% der untersuchten gesunden Donoren eine HPV16-E7- bzw. HPV18-E7-spezifische CD4⁺ und/oder CD8⁺T-Zellantwort *in vitro* induzieren. Die Anwendung Protein-beladener DZ wurde auf Patientinnen übertragen. DZ konnten auch aus Zervixkarzinompatientinnen generiert und mit HPV-E7-Protein beladen werden. Tumorerfiltrierende Lymphozyten aus Zervixkarzinomen wurden *ex vivo* mit Protein-beladenen DZ stimuliert. Es wurde gezeigt, daß bei 2/12 Zervixkarzinompatientinnen HPV-E7-spezifische T-Zellen aktiviert werden konnten.

In einer Serie von individuellen Heilversuchen an terminalen HPV16 bzw. 18 positiven Zervixkarzinompatientinnen wurde die Verträglichkeit der DZ-Vakzine, sowie klinisches und immunologisches Ansprechen untersucht. Bei 15/15 Versuchspersonen wurden keine systemischen oder lokalen Nebenreaktionen beobachtet. Trotz transienten Abfalls des Tumormarkers SCC bei 5/10 Patientinnen wurde kein objektives klinisches Ansprechen im Sinne von progressionsfreiem Überleben festgestellt. Das Immunomonitoring zeigte die Induktion einer spezifischen serologischen Reaktion bei 1/12 evaluierbaren Patientinnen. Die Induktion von HPV-E7-spezifischen T-Zellen wurde nach Vakzinierung bei 4/10 Patientinnen gefunden. Diese Ergebnisse zeigen, daß DZ von Zervixkarzinompatientinnen generiert, mit rekombinantem HPV16-E7- bzw. HPV18-E7-Protein beladen und gefahrlos appliziert werden können. Die positive immunologische Reaktion in einigen Patientinnen bietet die Grundlage für eine klinische Studie unter optimierten und standardisierten Bedingungen.

6. Summary

Human papillomavirus (HPV) infection is associated with the development of cervical cancer. HPV types 16 and 18 are the most prevalent HPV genotypes in cervical cancers. The oncoproteins E6 and E7 of these viruses are constitutively expressed in infected cervical tumor cells and thus are considered to be tumor associated antigens. HPV infected keratinocytes fail to induce an efficient cellular immune response in cervical carcinoma patients probably due to the absence of costimulatory molecules crucial for naive T cell priming. Autologous dendritic cells (DC), the most potent antigen presenting cells, had to be loaded efficiently with HPV-E7 antigen and used as adjuvant for cellular immune therapy in cervical carcinoma patients. The culture and differentiation conditions for DC were established. The loading of DC with HPV-E7 antigen by *in vitro* transcribed RNA, DNA-vector for eucaryotic expression and recombinantly expressed protein was analysed and compared by specific T cell induction. Loading by RNA and DNA was not efficient. In contrast, DC pulsed with protein induced a HPV16-E7 or HPV18-E7 specific CD4⁺ and/or CD8⁺ T cell response in > 80% healthy donors. Therefore, we used protein pulsed DC for analysing T cell response in patients. DC of cervical carcinoma patients could be generated and loaded with HPV-E7 protein. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) of cervical carcinoma biopsies were stimulated *ex vivo* with protein loaded DC. In 2/12 patients HPV-E7 specific TIL could be directly activated.

In a series of individual compassionate therapies in terminal HPV16 and 18 positive patients the tolerance and the clinical and immunological response of the DC based vaccine were analysed. No systemic or local side effects were observed in 15/15 vaccinated patients. Although 5/10 patients showed a transient decline of the tumor marker SCC, no objective clinical response, as defined by survival without progression, was detected. The immunomonitoring showed the induction of one specific serological response in 12 patients evaluated. Induction of HPV-E7 specific T cells was found in 4/10 patients after vaccination. These data demonstrate that generation, HPV16 or HPV18-E7 protein loading and safe application of DC in cervical carcinoma patients is feasible. The positive immunological reaction in some patients presents a basis for a clinical study under optimized and standardized conditions.

7. Literaturverzeichnis

1. Adams M, Borysiewicz L, Fiander A, Man S, Jasani B, Navabi H, Evans AS, Mason M. (2001) Clinical studies of human papilloma vaccines in cervical cancer. *Adv Exp Med Biol.* 495: 419-27.
2. Alijagic S, Moller P, Artuc M, Jurgovsky K, Czarnetzki BM, Schadendorf D. (1995) Dendritic cells generated from peripheral blood transfected with human tyrosinase induce specific T cell activation. *Eur J Immunol.* 25: 3100-7.
3. Ardavin C. (1997) Thymic dendritic cells. *Immunol Today.* 18: 350-61.
4. Armstrong DJ, Roman A. (1993) The anomalous electrophoretic behavior of the human papillomavirus type 16 E7 protein is due to the high content of acidic amino acid residues. *Biochem Biophys Res Commun.* 192: 1380-7.
5. Arthur JF, Butterfield LH, Roth MD, Bui LA, Kiertscher SM, Lau R, Dubinett S, Glaspy J, McBride WH, Economou JS. (1997) A comparison of gene transfer methods in human dendritic cells. *Cancer Gene Ther.* 4: 17-25.
6. Asai T, Storkus WJ, Whiteside TL. (2000) Evaluation of the modified ELISPOT assay for gamma interferon production in cancer patients receiving antitumor vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7: 145-54.
7. Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD, Gilboa E. (1997) Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med.* 186: 1177-82.
8. Avall Lundqvist E, Nordstrom L, Sjoval K, Eneroth P. (1989) Evaluation of seven different tumour markers for the establishment of tumour marker panels in gynecologic malignancies. *Eur J Gynaecol Oncol.* 10: 395-405.
9. Baay MF, Duk JM, Burger MP, de Bruijn HW, Stolz E, Herbrink P. (1999) Humoral immune response against proteins E6 and E7 in cervical carcinoma patients positive for human papilloma virus type 16 during treatment and follow-up. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 18: 126-32.
10. Baker CC, Phelps WC, Lindgren V, Braun MJ, Gonda MA, Howley PM. (1987) Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines. *J Virol.* 61: 962-71.
11. Barratt-Boyes SM, Zimmer MI, Harshyne LA, Meyer EM, Watkins SC, Capuano S 3rd, Murphey-Corb M, Falo LD Jr, Donnenberg AD. (2000) Maturation and trafficking of monocyte-derived dendritic cells in monkeys: implications for dendritic cell-based vaccines. *J Immunol.* 164: 2487-95.
12. Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, Porter G, Tamhankar S, Williamson AR, Zweerink HJ. (1991) The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol.* 147: 4047-53.
13. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. (1996) Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods.* 27; 196: 121-35.
14. Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR. (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature.* 393: 478-80.
15. Benton C, Shahidullah H, Hunter JAA. (!992) Human papillomavirus in the immunosuppressed. *Papillomavirus Rep.* 3: 23-26.
16. Black RJ, Bray F, Ferlay J, Parkin DM. (1997) Cancer incidence and mortality in the European Union: cancer registry data and estimates of national incidence for 1990. *Eur. J. Cancer* 33: 1075-1107.
17. Boczkowski D, Nair SK, Snyder D, Gilboa E. (1996) Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 184: 465-72.

18. Bontkes HJ, van Duin M, de Gruijl TD, Duggan-Keen MF, Walboomers JM, Stukart MJ, Verheijen RH, Helmerhorst TJ, Meijer CJ, Scheper RJ, Stevens FR, Dyer PA, Sinnott P, Stern PL. (1998) HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer*. 78: 166-71.
19. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV. (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 87: 796-802.
20. Bosch FX, Munoz N, de Sanjose S, Izarzugaza I, Gili M, Viladiu P, Tormo MJ, Moreo P, Ascunce N, Gonzalez LC, et al. (1992) Risk factors for cervical cancer in Colombia and Spain. *Int J Cancer*. 52: 750-8.
21. Brandsma JL. (1994) Animal models of human-papillomavirus-associated oncogenesis. *Intervirology*. 37: 189-200.
22. Breitburd F, Kirnbauer R, Hubbert NL, Nonnenmacher B, Trin-Dinh-Desmarquet C, Orth G, Schiller JT, Lowy DR. (1995) Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J Virol*. 69: 3959-63.
23. Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. (1997) Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J Exp Med*. 185: 541-50.
24. Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. (2001) Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol*. 29: 1247-55.
25. Browning M, Krausa P. (1996) Genetic diversity of HLA-A2: evolutionary and functional significance. *Immunol Today*. 17: 165-70.
26. Cardozo C, Kohanski RA. (1998) Altered properties of the branched chain amino acid-preferring activity contribute to increased cleavages after branched chain residues by the "immunoproteasome". *J Biol Chem*. 273: 16764-70.
27. Casares S, Inaba K, Brumeanu TD, Steinman RM, Bona CA. (1997) Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med*. 186: 1481-6.
28. Castellanos MR, Hayes RL, Maiman MA. (2001) Synthetic peptides induce a cytotoxic response against human papillomavirus type-18. *Gynecol Oncol*. 82: 77-83.
29. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. (1992) GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*. 360: 258-61.
30. Caux C, Massacrier C, Dezutter-Dambuyant C, Vanbervliet B, Jacquet C, Schmitt D, Banchereau J. (1995) Human dendritic Langerhans cells generated in vitro from CD34⁺ progenitors can prime naive CD4⁺ T cells and process soluble antigen. *J Immunol*. 155: 5427-35.
31. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Van Kooten C, Durand I, Banchereau J. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *J Exp Med*. 180:1263-72.
32. Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A. (1997b) Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*. 388: 782-7.
33. Cella M, Sallusto F, Lanzavecchia A. (1997a) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*. 9: 10-6.
34. Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT, Falo LD Jr. (1996) Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med*. 183: 283-7.
35. Coleman N, Birley HD, Renton AM, Hanna NF, Ryait BK, Byrne M, Taylor-Robinson D, Stanley MA. (1994) Immunological events in regressing genital warts. *Am J Clin Pathol*. 102: 768-74.

36. Connor ME, Stern PL. (1990) Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer*. 46: 1029-34.
37. Crook T, Morgenstern JP, Crawford L, Banks L. (1989) Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells co-transformed by HPV-16 plus EJ-ras. *EMBO J*. 8: 513-9.
38. Cullen AP, Reid R, Campion M, Lorincz AT. (1991) Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol*. 65: 606-12.
39. Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. (1988) Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods*. 110: 29-36.
40. De Bruijn ML, Schuurhuis DH, Vierboom MP, Vermeulen H, de Cock KA, Ooms ME, Rensing ME, Toebes M, Franken KL, Drijfhout JW, Ottenhoff TH, Offringa R, Melief CJ. (1998) Immunization with human papillomavirus type 16 (HPV16) oncoprotein-loaded dendritic cells as well as protein in adjuvant induces MHC class I-restricted protection to HPV16-induced tumor cells. *Cancer Res*. 58: 724-31.
41. de Villiers EM. (1994) Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol*. 186: 1-12.
42. DeMatos P, Abdel-Wahab Z, Vervaert C, Hester D, Seigler H. (1998) Pulsing of dendritic cells with cell lysates from either B16 melanoma or MCA-106 fibrosarcoma yields equally effective vaccines against B16 tumors in mice. *J Surg Oncol*. 68: 79-91.
43. Dhodapkar MV, Bhardwaj N. (2000) Active immunization of humans with dendritic cells. *J Clin Immunol*. 20: 167-74.
44. Dhodapkar MV, Krasovsky J, Steinman RM, Bhardwaj N. (2000) Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest*. 105: R9-R14.
45. Dhodapkar MV, Steinman RM, Sapp M, Desai H, Fossella C, Krasovsky J, Donahoe SM, Dunbar PR, Cerundolo V, Nixon DF, Bhardwaj N. (1999) Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J Clin Invest*. 104: 173-80.
46. Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L. (1991) Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*. 352: 824-7.
47. Duggan-Keen MF, Keating PJ, Stevens FR, Sinnott P, Snijders PJ, Walboomers JM, Davidson S, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. (1996) Immunogenetic factors in HPV-associated cervical cancer: influence on disease progression. *Eur J Immunogenet*. 23: 275-84.
48. Dürst M, Glitz D, Schneider A, zur Hausen H. (1992) Human papillomavirus type 16 (HPV 16) gene expression and DNA replication in cervical neoplasia: analysis by in situ hybridization. *Virology*. 189: 132-40
49. Dürst M, Kleinheinz A, Hotz M, Gissman L. (1985) The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol*. 66: 1515-22.
50. Ellis JR, Keating PJ, Baird J, Hounsell EF, Renouf DV, Rowe M, Hopkins D, Duggan-Keen MF, Bartholomew JS, Young LS, et al. (1995) The association of an HPV16 oncogene variant with HLA-B7 has implications for vaccine design in cervical cancer. *Nat Med*. 1: 464-70.
51. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. (1997) Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol*. 71: 2449-56.
52. Evans EM, Man S, Evans AS, Borysiewicz LK. (1997) Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res*. 57: 2943-50.

53. Feuerstein B, Berger TG, Maczek C, Roder C, Schreiner D, Hirsch U, Haendle I, Leisgang W, Glaser A, Kuss O, Diepgen TL, Schuler G, Schuler-Thurner B. (2000) A method for the production of cryopreserved aliquots of antigen-preloaded, mature dendritic cells ready for clinical use. *J Immunol Methods*. 245: 15-29.
54. Fong L, Brockstedt D, Benike C, Breen JK, Strang G, Ruegg CL, Engleman EG. (2001) Dendritic cell-based xenoantigen vaccination for prostate cancer immunotherapy. *J Immunol*. 167: 7150-6.
55. Friedl J, Stift A, Paolini P, Roth E, Steger GG, Mader R, Jakesz R, Gnant MF. (2000) Tumor antigen pulsed dendritic cells enhance the cytolytic activity of tumor infiltrating lymphocytes in human hepatocellular cancer. *Cancer Biother Radiopharm*. 15: 477-86.
56. Gabrilovich DI, Corak J, Ciernik IF, Kavanaugh D, Carbone DP. (1997) Decreased antigen presentation by dendritic cells in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 3: 483-90.
57. Gey GO, Coffman WD, Kubicek MT. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research*. 12: 264-265.
58. Gong J, Apostolopoulos V, Chen D, Chen H, Koido S, Gendler SJ, McKenzie IF, Kufe D. (2000) Selection and characterization of MUC1-specific CD8⁺ T cells from MUC1 transgenic mice immunized with dendritic-carcinoma fusion cells. *Immunology*. 101: 316-24.
59. Hadzantonis M, O'Neill H. (1999) Review: dendritic cell immunotherapy for melanoma. *Cancer Biother Radiopharm*. 14: 11-22.
60. Halpert R, Fruchter RG, Sedlis A, Butt K, Boyce JG, Sillman FH. (1986) Human papillomavirus and lower genital neoplasia in renal transplant patients. *Obstet Gynecol*. 68: 251-8.
61. Hart DN. (1997) Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood*. 90: 3245-87.
62. Hasebe H, Nagayama H, Sato K, Enomoto M, Takeda Y, Takahashi TA, Hasumi K, Eriguchi M. (2000) Dysfunctional regulation of the development of monocyte-derived dendritic cells in cancer patients. *Biomed Pharmacother*. 54: 291-8.
63. Hashida T, Yasumoto S. (1991) Induction of chromosome abnormalities in mouse and human epidermal keratinocytes by the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Gen Virol*. 72: 1569-77
64. Hellström I, Ledbetter JA, Scholler N, Yang Y, Ye Z, Goodman G, Pullman J, Hayden-Ledbetter M, Hellström KE. (2001) CD3-mediated activation of tumor-reactive lymphocytes from patients with advanced cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 6783-8.
65. Herr W, Protzer U, Lohse AW, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH, Wolfel T. (1998) Quantification of CD8⁺ T lymphocytes responsive to human immunodeficiency virus (HIV) peptide antigens in HIV-infected patients and seronegative persons at high risk for recent HIV exposure. *J Infect Dis*. 178: 260-5.
66. Herr W, Schneider J, Lohse AW, Meyer zum Buschenfelde KH, Wolfel T. (1996) Detection and quantification of blood-derived CD8⁺ T lymphocytes secreting tumor necrosis factor alpha in response to HLA-A2.1-binding melanoma and viral peptide antigens. *J Immunol Methods*. 191: 131-42.
67. Hickling J. (1998) Measuring T-lymphocytes function. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, <http://www-ermm.cbcu.cam.-ac.uk>.
68. Ho GY, Burk RD, Fleming I, Klein RS. (1994) Risk of genital human papillomavirus infection in women with human immunodeficiency virus-induced immunosuppression. *Int J Cancer*. 56: 788-92.
69. Honma S, Tsukada S, Honda S, Nakamura M, Takakuwa K, Maruhashi T, Kodama S, Kanazawa K, Takahashi T, Tanaka K. (1994) Biological-clinical significance of selective loss of HLA-class-I allelic product expression in squamous-cell carcinoma of the uterine cervix. *Int J Cancer*. 57: 650-5.

70. Hsu FJ, Benike C, Fagnoni F, Liles TM, Czerwinski D, Taidi B, Engleman EG, Levy R. (1996) Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 2: 52-8.
71. Hubert P, Greimers R, Franzen-Detrooz E, Doyen J, Delanaye P, Boniver J, Delvenne P. (1998) In vitro propagated dendritic cells from patients with human-papilloma virus-associated preneoplastic lesions of the uterine cervix: use of Flt3 ligand. *Cancer Immunol Immunother.* 47: 81-9.
72. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunaga K, Gojobori T. (1992) Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnics groups. In: *Tsuji K, Aizawa M, Sasazuki T (Eds.), HLA 1991. Oxford Univ. Press, New York.*
73. Jäger E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jager D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A. (1996) Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer.* 67: 54-62.
74. Ji H, Wang TL, Chen CH, Pai SI, Hung CF, Lin KY, Kurman RJ, Pardoll DM, Wu TC. (1999) Targeting human papillomavirus type 16 E7 to the endosomal/lysosomal compartment enhances the antitumor immunity of DNA vaccines against murine human papillomavirus type 16 E7-expressing tumors. *Hum Gene Ther.* 10: 2727-40.
75. Jiang W, Swiggard WJ, Heufler C, Peng M, Mirza A, Steinman RM, Nussenzweig MC. (1995) The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* 375: 151-5.
76. Jochmus I, Osen W, Altmann A, Buck G, Hofmann B, Schneider A, Gissmann L, Rammensee HG. (1997) Specificity of human cytotoxic T lymphocytes induced by a human papillomavirus type 16 E7-derived peptide. *J Gen Virol.* 78: 1689-95.
77. Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. (2001) A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer.* 93: 243-51.
78. Jonuleit H, Kuhn U, Muller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 27: 3135-42.
79. Kast WM, Brandt RM, Sidney J, Drijfhout JW, Kubo RT, Grey HM, Melief CJ, Sette A. (1994) Role of HLA-A motifs in identification of potential CTL epitopes in human papillomavirus type 16 E6 and E7 proteins. *J Immunol.* 152: 3904-12.
80. Kaufmann AM, Nieland J, Schinz M, Nonn M, Gabelsberger J, Meissner H, Muller RT, Jochmus I, Gissmann L, Schneider A, Dürst M. (2001) HPV16 L1E7 chimeric virus-like particles induce specific HLA-restricted T cells in humans after in vitro vaccination. *Int J Cancer.* 92: 285-93.
81. Keating PJ, Cromme FV, Duggan-Keen M, Snijders PJ, Walboomers JM, Hunter RD, Dyer PA, Stern PL. (1995) Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer.* 72: 405-11.
82. Kirnbauer R, Booy F, Cheng N, Lowy DR, Schiller JT. (1992) Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89: 12180-4.
83. Kirnbauer R, Chandrachud LM, O'Neil BW, Wagner ER, Grindlay GJ, Armstrong A, McGarvie GM, Schiller JT, Lowy DR, Campo MS. (1996) Virus-like particles of bovine papillomavirus type 4 in prophylactic and therapeutic immunization. *Virology.* 219: 37-44.
84. Kono K, Rensing ME, Brandt RM, Melief CJ, Potkul RK, Andersson B, Petersson M, Kast WM, Kiessling R. (1996) Decreased expression of signal-transducing zeta chain in peripheral T cells and natural killer cells in patients with cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2: 1825-8.
85. Kornafel J, Wawrzekiewicz M. (1989) Evaluation of diagnostic usefulness of CEA, hCG and SCC antigens in cervical cancer patients. *Eur J Gynaecol Oncol.* 10: 319-22.

86. Labeur MS, Roters B, Pers B, Mehling A, Luger TA, Schwarz T, Grabbe S. (1999) Generation of tumor immunity by bone marrow-derived dendritic cells correlates with dendritic cell maturation stage. *J Immunol.* 162: 168-75.
87. Lappin MB, Weiss JM, Delattre V, Mai B, Dittmar H, Maier C, Manke K, Grabbe S, Martin S, Simon JC. (1999) Analysis of mouse dendritic cell migration in vivo upon subcutaneous and intravenous injection. *Immunology.* 98: 181-8.
88. Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. (1996) CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 14: 233-58.
89. Ling M, Kanayama M, Roden R, Wu TC. (2000) Preventive and therapeutic vaccines for human papillomavirus-associated cervical cancers. *J Biomed Sci.* 7: 341-56.
90. Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty, T.D. (1992) Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70: 923-935
91. Lozzio BB and Lozzio CB. (1979) Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leuk. Res.* 3: 363-370.
92. Macagno A, Gilliet M, Sallusto F, Lanzavecchia A, Nestle FO, Groettrup M. (1999) Dendritic cells up-regulate immunoproteasomes and the proteasome regulator PA28 during maturation. *Eur J Immunol.* 29: 4037-42.
93. Mayordomo JI, Loftus DJ, Sakamoto H, De Cesare CM, Appasamy PM, Lotze MT, Storkus WJ, Appella E, DeLeo AB. (1996) Therapy of murine tumors with p53 wild-type and mutant sequence peptide-based vaccines. *J Exp Med.* 183: 1357-65.
94. Mayordomo JI, Zorina T, Storkus WJ, Zitvogel L, Celluzzi C, Falo LD, Melief CJ, Ildstad ST, Kast WM, Deleo AB, et al. (1995) Bone marrow-derived dendritic cells pulsed with synthetic tumour peptides elicit protective and therapeutic antitumour immunity. *Nat Med.* 1: 1297-302.
95. Medema JP, de Jong J, Peltenburg LT, Verdegaal EM, Gorter A, Bres SA, Franken KL, Hahne M, Albar JP, Melief CJ, Offringa R. (2001) Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 11515-20.
96. Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, Luande J, Gissmann L, Pawlita M. (1998) Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol.* 36: 475-80.
97. Mitchell DA, Nair SK. (2000) RNA transfected dendritic cells as cancer vaccines. *Curr Opin Mol Ther.* 2: 176-81.
98. Morel S, Levy F, Bulet-Schiltz O, Brasseur F, Probst-Kepper M, Peitrequin AL, Monsarrat B, Van Velthoven R, Cerottini JC, Boon T, Gairin JE, Van den Eynde BJ. (2000) Processing of some antigens by the standard proteasome but not by the immunoproteasome results in poor presentation by dendritic cells. *Immunity.* 12: 107-17.
99. Morse MA, Coleman RE, Akabani G, Niehaus N, Coleman D, Lysterly HK. (1999) Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. *Cancer Res.* 59: 56-8.
100. Mulders P, Tso CL, Gitlitz B, Kaboo R, Hinkel A, Frand S, Kiertscher S, Roth MD, deKernion J, Figlin R, Beldegrun A. (1999) Presentation of renal tumor antigens by human dendritic cells activates tumor-infiltrating lymphocytes against autologous tumor: implications for live kidney cancer vaccines. *Clin Cancer Res.* 5: 445-54.
101. Muller M, Gissmann L, Cristiano RJ, Sun XY, Frazer IH, Jenson AB, Alonso A, Zentgraf H, Zhou J. (1995) Papillomavirus capsid binding and uptake by cells from different tissues and species. *J Virol.* 69: 948-54.

102. Nair SK, Boczkowski D, Morse M, Cumming RI, Lyerly HK, Gilboa E. (1998) Induction of primary carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T lymphocytes in vitro using human dendritic cells transfected with RNA. *Nat Biotechnol.* 16: 364-9.
103. Nees M, van Wijngaarden E, Bakos E, Schneider A, Dürst M. (1998) Identification of novel molecular markers which correlate with HPV-induced tumor progression. *Oncogene.* 16: 2447-58.
104. Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. (1998) Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 4: 328-32.
105. Offringa R, van der Burg SH, Ossendorp F, Toes RE, Melief CJ. (2000) Design and evaluation of antigen-specific vaccination strategies against cancer. *Curr Opin Immunol.* 12: 576-82.
106. Onon TS, Kitchener HC. (1999) The use of vaccines in treating cervical cancer: present status and future prospects. *Int J Gynecol Cancer.* 9: 265-278.
107. Ortaldo JR, Oldham RK, Cannon GC, Herberman RB. (1977) Specificity of natural cytotoxic reactivity of normal human lymphocytes against a myeloid leukemia cell line. *J Natl Cancer Inst.* 59: 77-82.
108. Ossendorp F, Mengede E, Camps M, Filius R, Melief CJ. (1998) Specific T helper cell requirement for optimal induction of cytotoxic T lymphocytes against major histocompatibility complex class II negative tumors. *J Exp Med.* 187: 693-702.
109. Ossevoort MA, Feltkamp MC, van Veen KJ, Melief CJ, Kast WM. (1995) Dendritic cells as carriers for a cytotoxic T-lymphocyte epitope-based peptide vaccine in protection against a human papillomavirus type 16-induced tumor. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 18: 86-94.
110. Palucka K, Banchereau J. (1999) Linking innate and adaptive immunity. *Nat Med.* 5: 868-70.
111. Petry KU, Scheffel D, Bode U, Gabrysiak T, Kochel H, Kupsch E, Glaubitz M, Niesert S, Kuhnle H, Schedel I. (1994) Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer.* 57: 836-40.
112. Philip R, Alters SE, Brunette E, Ashton J, Gadea J, Yau J, Lebkowski J, Philip M. (2000) Dendritic cells loaded with MART-1 peptide or infected with adenoviral construct are functionally equivalent in the induction of tumor-specific cytotoxic T lymphocyte responses in patients with melanoma. *J Immunother.* 23: 168-76.
113. Porgador A, Gilboa E. (1995) Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med.* 182: 255-60.
114. Porgador A, Snyder D, Gilboa E. (1996) Induction of antitumor immunity using bone marrow-generated dendritic cells. *J Immunol.* 156: 2918-26.
115. Radmayr C, Bock G, Hobisch A, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M. (1995) Dendritic antigen-presenting cells from the peripheral blood of renal-cell-carcinoma patients. *Int J Cancer.* 63: 627-32.
116. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. (1997) A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood.* 90: 3640-6.
117. Reimann J, Bohm W, Schirmbeck R. (1994) Alternative processing pathways for MHC class I-restricted epitope presentation to CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Biol Chem Hoppe Seyler.* 375: 731-6.
118. Rensing ME, de Jong JH, Brandt RM, Drijfhout JW, Benckhuijsen WE, Schreuder GM, Offringa R, Kast WM, Melief CJ. (1999) Differential binding of viral peptides to HLA-A2 alleles. Implications for human papillomavirus type 16 E7 peptide-based vaccination against cervical carcinoma. *Eur J Immunol.* 29: 1292-303.
119. Rensing ME, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, Oseroff C, Grey HM, Melief CJ, Kast WM. (1995) Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified

- through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol.* 154: 5934-43.
120. Rensing ME, van Driel WJ, Celis E, Sette A, Brandt MP, Hartman M, Anholts JD, Schreuder GM, ter Harnsel WB, Fleuren GJ, Trimbos BJ, Kast WM, Melief CJ. (1996) Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A *0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res.* 56: 582-8.
121. Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M. (1997) Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of interleukin 12 production. *J Exp Med.* 186: 1603-8.
122. Roberts S, Ashmole I, Johnson GD, Kreider JW, Gallimore PH. (1993) Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology.* 197: 176-87.
123. Rodriguez A, Regnault A, Kleijmeer M, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S. (1999) Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol.* 1: 362-8.
124. Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med.* 180: 83-93.
125. Romani N, Lenz A, Glassel H, Stossel H, Stanzl U, Majdic O, Fritsch P, Schuler G. (1989) Cultured human Langerhans cells resemble lymphoid dendritic cells in phenotype and function. *J Invest Dermatol.* 93: 600-9.
126. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods.* 196: 137-51.
127. Sallusto F, Cella M, Danieli C, Lanzavecchia A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med.* 182: 389-400.
128. Sallusto F, Lanzavecchia A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med.* 179: 1109-18.
129. Sallusto F, Schaerli P, Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A. (1998) Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol.* 28: 2760-9.
130. Salter RD, Howell DN, Cresswell P. (1985) Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics.* 21: 235-46.
131. Santin AD, Bellone S, Gokden M, Cannon MJ, Parham GP. (2002) Vaccination with HPV-18 E7-pulsed dendritic cells in a patient with metastatic cervical cancer. *N Engl J Med.* 346: 1752-3.
132. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Bellone S, Roman JJ, Jayaprabhu S, Pecorelli S, Parham GP, Cannon MJ. (2001) Expression of CD56 by human papillomavirus E7-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes correlates with increased intracellular perforin expression and enhanced cytotoxicity against HLA-A2-matched cervical tumor cells. *Clin Cancer Res.* 7: 804s-810s.
133. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Chiriva-Internati M, Zhan D, Pecorelli S, Parham GP, Cannon MJ. (1999) Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J Virol.* 73: 5402-10.
134. Scheibenbogen C, Lee KH, Stevanovic S, Witzens M, Willhauck M, Waldmann V, Naeher H, Rammensee HG, Keilholz U. (1997) Analysis of the T cell response to tumor and viral peptide antigens by an IFN-gamma-ELISPOT assay. *Int J Cancer.* 71: 932-6.

135. Schmittel A, Keilholz U, Scheibenbogen C. (1997) Evaluation of the interferon-gamma ELISPOT-assay for quantification of peptide specific T lymphocytes from peripheral blood. *J Immunol Methods*. 210: 167-74.
136. Schoell WM, Mirhashemi R, Liu B, Janicek MF, Podack ER, Penalver MA, Averette HE. (1999) Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by stimulation with HPV type 16 E7 peptide-pulsed dendritic cells: an approach to immunotherapy of cervical cancer. *Gynecol Oncol*. 74: 448-55.
137. Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. (1998) T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 393: 480-3.
138. Schreurs MW, Eggert AA, de Boer AJ, Vissers JL, van Hall T, Offringa R, Figdor CG, Adema GJ. (2000) Dendritic cells break tolerance and induce protective immunity against a melanocyte differentiation antigen in an autologous melanoma model. *Cancer Res*. 60: 6995-7001.
139. Schuler G, Steinman RM. (1997) Dendritic cells as adjuvants for immune-mediated resistance to tumors. *J Exp Med*. 186: 1183-7.
140. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, zur Hausen H. (1985) Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 314: 111-4
141. Selvakumar R, Borenstein LA, Lin YL, Ahmed R, Wettstein FO. (1995) Immunization with nonstructural proteins E1 and E2 of cottontail rabbit papillomavirus stimulates regression of virus-induced papillomas. *J Virol*. 69: 602-5.
142. Shah KV, Howley PM. (1990) Papillomaviruses. *Virology sec. ed*. 1651-1670.
143. Sozzani S, Allavena P, D'Amico G, Luini W, Bianchi G, Kataura M, Imai T, Yoshie O, Bonocchi R, Mantovani A. (1998) Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol*. 161: 1083-6.
144. Specht JM, Wang G, Do MT, Lam JS, Royal RE, Reeves ME, Rosenberg SA, Hwu P. (1997) Dendritic cells retrovirally transduced with a model antigen gene are therapeutically effective against established pulmonary metastases. *J Exp Med*. 186:1213-21.
145. Steinman RM, Cohn ZA. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*. 137: 1142-62.
146. Steinman RM. (1991) The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*. 9: 271-96.
147. Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, Rickinson AB. (1997) Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med*. 185: 1605-17.
148. Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, Wolinsky SM, Chow LT, Broker TR. (1992) Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol*. 23: 117-28.
149. Stoler MH, Wolinsky SM, Whitbeck A, Broker TR, Chow LT. (1989) Differentiation-linked human papillomavirus types 6 and 11 transcription in genital condylomata revealed by in situ hybridization with message-specific RNA probes. *Virology*. 172: 331-40
150. Stoppler MC, Straight SW, Tsao G, Schlegel R, McCance DJ. (1996) The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. *Virology*. 223: 251-4
151. Stuhler G, Trefzer U, Walden P. (1998) Hybrid cell vaccination in cancer immunotherapy. Recruitment and activation of T cell help for induction of anti tumour cytotoxic T cells. *Adv Exp Med Biol*. 451:277-82.
152. Sundberg, JP. (1987) Papillomavirus infection in animals. In: Syrjanen, K., Gissmann, L. and Koss, L.G. (Eds.) Papillomaviruses: particles, genome organization and proteins. pp. 40-104. Berlin: Springer-Verlag Germany

153. Suss G, Shortman K. (1996) A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J Exp Med.* 183: 1789-96.
154. Suzich JA, Ghim SJ, Palmer-Hill FJ, White WI, Tamura JK, Bell JA, Newsome JA, Jenson AB, Schlegel R. (1995) Systemic immunization with papillomavirus L1 protein completely prevents the development of viral mucosal papillomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92: 11553-7.
155. Tanaka K, Kasahara M. (1998) The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev.* 163: 161-76.
156. Tarte K, Klein B. (1999) Dendritic cell-based vaccine: a promising approach for cancer immunotherapy. *Leukemia.* 13: 653-63.
157. Thurner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. (1999) Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med.* 190: 1669-78.
158. Triccas JA, Parish T, Britton WJ, Gicquel B. (1998) An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 167: 151-6.
159. Tuting T, DeLeo AB, Lotze MT, Storkus WJ. (1997) Genetically modified bone marrow-derived dendritic cells expressing tumor-associated viral or "self" antigens induce antitumor immunity in vivo. *Eur J Immunol.* 27: 2702-7.
160. Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. (1994) Presentation of an exogenous antigen by major histocompatibility complex class I molecules. *Eur J Immunol.* 24: 1590-6.
161. Van den Eynde BJ, Morel S. (2001) Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol.* 13: 147-53.
162. van der Burg SH, Rensing ME, Kwappenberg KM, de Jong A, Straathof K, de Jong J, Geluk A, van Meijgaarden KE, Franken KL, Ottenhoff TH, Fleuren GJ, Kenter G, Melief CJ, Offringa R. (2001) Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer.* 91:612-8.
163. van Regenmortel MH, Mayo MA, Fauquet CM, Maniloff J. (2000) Virus nomenclature: consensus versus chaos. *Arch Virol.* 145: 2227-32.
164. von Knebel Doeberitz M, Oltersdorf T, Schwarz E, Gissmann L. (1988) Correlation of modified human papilloma virus early gene expression with altered growth properties in C4-1 cervical carcinoma cells. *Cancer Res.* 48: 3780-6.
165. von Knebel Doeberitz M, Rittmuller C, zur Hausen H, Dürst M. (1992) Inhibition of tumorigenicity of cervical cancer cells in nude mice by HPV E6-E7 anti-sense RNA. *Int J Cancer.* 51: 831-4.
166. Wang TL, Ling M, Shih IM, Pham T, Pai SI, Lu Z, Kurman RJ, Pardoll DM, Wu TC. (2000) Intramuscular administration of E7-transfected dendritic cells generates the most potent E7-specific anti-tumor immunity. *Gene Ther.* 7: 726-33.
167. Whiteside TL. (2000) Monitoring of antigen-specific cytolytic T lymphocytes in cancer patients receiving immunotherapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 7: 327-32.
168. Wu TC. (1994) Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. *Curr Opin Immunol.* 6: 746-54.
169. Yin Y, Tainsky MA, Boschoff FZ, Strong LC, Wahl GM. (1992) Wild-type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles. *Cell* 70: 937-948.

-
170. Yoon H, Chung MK, Min SS, Lee HG, Yoo WD, Chung KT, Jung NP, Park SN. (1998) Synthetic peptides of human papillomavirus type 18 E6 harboring HLA-A2.1 motif can induce peptide-specific cytotoxic T-cells from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors. *Virus Res.* 54: 23-9.
171. Young JW, Inaba K. (1996) Dendritic cells as adjuvants for class I major histocompatibility complex-restricted antitumor immunity. *J Exp Med.* 183: 7-11.
172. Zehbe I, Wilander E, Delius H, Tommasino M. (1998) Human papillomavirus 16 E6 variants are more prevalent in invasive cervical carcinoma than the prototype. *Cancer Res.* 58: 829-33.
173. Zhou LJ, Schwarting R, Smith HM, Tedder TF. (1992) A novel cell-surface molecule expressed by human interdigitating reticulum cells, Langerhans cells, and activated lymphocytes is a new member of the Ig superfamily. *J Immunol.* 149: 735-42.
174. Zhou LJ, Tedder TF. (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 154: 3821-35.
175. Zumbach K, Kissel'jov F, Sacharova O, Shaichaev G, Semjonova L, Pavlova L, Pawlita M. (2000) Antibodies against oncoproteins E6 and E7 of human papillomavirus types 16 and 18 in cervical-carcinoma patients from Russia. *Int J Cancer.* 85: 313-8.
176. zur Hausen H. (2000) Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 92: 690-8.
177. zur Hausen, H. (1991) Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer. *Virology* 184: 9-13.