

**Einsatz eines aus den Oberflächenproteinen des
Hepatitis B-Virus abgeleiteten Zellpermeabilitätsmotives
für den Antigentransfer und
für die Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort**

DISSERTATION

**der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften**

2004

vorgelegt von

Elke Bleifuß

Tag der mündlichen Prüfung:

27.09.2004

Dekan:

Prof. Dr. Hansgeorg Probst

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Reinhard Burger

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	3
2	Einleitung.....	3
2.1	Zellpermeable Moleküle.....	3
2.1.1	h-Region des Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktors	5
2.1.2	Antennapedia-Homeodomäne	6
2.1.3	HIV-Tat-Protein.....	7
2.1.4	TLM (PreS2-HBV).....	9
2.2	Die zelluläre Immunantwort.....	9
2.2.1	Hauptgewebeverträglichkeitskomplex	9
2.2.2	Antigenprozessierung und -präsentation	10
2.2.3	Antigenpräsentierende Zellen.....	13
2.2.4	Naive T-Zellen.....	14
2.2.5	Aktivierung von T-Zellen	14
2.2.6	CD4 ⁺ Effektorzellen	15
2.2.7	CD8 ⁺ Effektorzellen	16
2.2.8	Gedächtnis-T-Zellen.....	16
2.3	Immunantwort gegen Tumoren	17
2.4	Gezielte Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort	18
2.4.1	Beladung von antigenpräsentierenden Zellen mit exogenen Antigenen	18
2.4.2	Verwendung von zellpermeablen Antigenen als Immunmodulatoren	19
2.4.3	Modifizierte Corepartikel des Hepatitis B-Virus als Immunmodulatoren	21
2.4.3.1	Struktur der HBV-Corepartikel.....	22
2.4.3.2	Modifikation von HBV-Corepartikeln	22
2.5	Experimentelles System und Aufgabenstellung.....	24
2.5.1	eGFP als Modellantigen	24
2.5.2	Ovalbumin als Modellantigen.....	25

3	Ergebnisse	27
3.1	eGFP als Modellantigen	27
3.1.1	Herstellung und Reinigung der rekombinanten eGFP-Proteine	27
3.1.2	Stimulierung von humanen spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen nach Beladung mit rekombinanten eGFP-Proteinen	28
3.1.2.1	Generierung von humanen dendritischen Zellen aus Monozyten	29
3.1.2.2	TLM-eGFP-Fusionsproteine transduzierten in humane dendritische Zellen	30
3.1.2.3	Humane dendritische Zellen bewirkten nach Beladung mit rekombinanten eGFP-Proteinen keine Stimulierung von eGFP-spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen.....	30
3.1.3	Zusammenfassung -rekombinante eGFP-Proteine -	31
3.2	Ovalbumin als Modellantigen.....	32
3.2.1	Etablierungsarbeiten für das Modellsystem Ovalbumin.....	32
3.2.1.1	Der Antikörper 25.D1.16 erkennt spezifisch SIINFEKL-H-2K ^b -Komplexe auf der Oberfläche von Zellen.	32
3.2.1.2	Transgene CD8 ⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen werden durch SIINFEKL-Peptid aktiviert.....	33
3.2.2	Verlängerte SIINFEKL-Peptide.....	35
3.2.2.1	Design der verlängerten SIINFEKL-Peptide.....	35
3.2.2.2	Die verlängerten SIINFEKL-Peptide führten unabhängig von der Funktionalität der Transduktionsmotive zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Auftreten von H-2K ^b -Komplexen auf der Zelloberfläche.	35
3.2.2.3	Die Inkubation mit verlängerten SIINFEKL-Peptiden führte zu einer exogenen Beladung von H-2K ^b -Komplexen auf der Zelloberfläche.	37
3.2.2.4	Ein saurer Waschschrift der Zellen nach Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden konnte den exogenen Beladungseffekt und/oder endogene Prozessierung nicht auflösen.	38
3.2.2.5	Die Transduktionsmotive Antp(43-58) und TLM zeigten einen unterschiedlichen Auswascheffekt aus Zellen.....	40
3.2.2.6	Die verlängerten SIINFEKL-Peptide zeigten keine unterschiedliche Fähigkeit, spezifische CD8 ⁺ T-Zellen zu stimulieren.	41
3.2.2.7	Zusammenfassung -verlängerte SIINFEKL-Peptide-.....	42

3.2.3	Hepatitis B-Virus abgeleitete Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop	43
3.2.3.1	Herstellung von bakteriellen Expressionskonstrukten für die rekombinanten HBV-Corepartikel.....	43
3.2.3.2	Reinigungsstrategie für die rekombinanten HBV-Corepartikel	44
3.2.3.3	SIINFEKL tragende HBV-Corepartikel stimulierten transgene CD8 ⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen.....	46
3.2.3.4	Zusammenfassung -rekombinante HBV-Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop-	48
3.2.4	Rekombinante Ovalbumin-Proteine	49
3.2.4.1	Herstellung von bakteriellen Expressionskonstrukten für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine	49
3.2.4.2	Reinigungsstrategie für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine	50
3.2.4.3	Die Zellpermeabilität von TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden.	51
3.2.4.4	Nach Inkubation von OT-1 Milzzellen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen waren auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen SIINFEKL beladene H-2K ^b -Komplexe nachweisbar.	53
3.2.4.5	TLM-OVA-HA bewirkte im Vergleich zu OVA-HA <i>in vitro</i> eine verstärkte Aktivierung von transgenen CD8 ⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen.	55
3.2.4.6	Adoptives Transfermodell, um die Aktivierung von transgenen CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i> nach Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen zu untersuchen	58
3.2.4.6.1	Proliferation der transferierten CD8 ⁺ T-Zellen	58
3.2.4.6.2	IFN γ Produktion der transferierten CD8 ⁺ T-Zellen.....	60
3.2.4.6.3	Zytotoxische Aktivität der transferierten CD8 ⁺ T-Zellen	62
3.2.4.7	Untersuchung der rekombinanten Ovalbumin-Proteine auf ihre Effizienz, eine Antitumor-Antwort auszulösen	64
3.2.4.8	Zusammenfassung -rekombinante Ovalbumin-Proteine-.....	67

4	Diskussion	69
4.1	Das TLM als mögliches Vehikel zum Antigen transfer	69
4.2	Reinigung der rekombinanten Antigen spezie	70
4.3	Zell permeabilität von TLM-Fusionsproteinen	72
4.4	Stimulation von autologen T-Zellen durch humane dendritische Zellen nach Beladung mit rekombinanten eGFP-Proteinen.....	73
4.5	Einsatz von verlängerten SIINFEKL-Peptiden	75
4.5.1	Modifikation des SIINFEKL-Peptides mit dem TLM	75
4.5.2	Exogener Beladungseffekt von H-2K ^b -Komplexen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden	76
4.5.3	Charakterisierung der Assoziation der verlängerten SIINFEKL-Peptide an H-2K ^b -Komplexe.....	77
4.6	Einsatz von rekombinanten Hepatitis B-Virus abgeleiteten Corepartikeln als Träger für das SIINFEKL-Epitop	78
4.6.1	Struktureller Aufbau der rekombinanten HBV-Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop.....	79
4.6.2	Stimulation von transgenen CD8 ⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen durch die rekombinanten SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel..	80
4.7	Einsatz von rekombinanten gesamten Ovalbumin-Proteinen	82
4.7.1	Korrelation der Zellpermeabilität der rekombinanten Ovalbumin-Proteine mit ihrer MHC-Klasse I-abhängigen Prozessierung und ihrer Stimulationseffizienz <i>in vitro</i>	82
4.7.2	Immunisierungsstrategien für die <i>in vivo</i> Untersuchungen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen	84
4.7.3	Stimulation von spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen <i>in vivo</i> durch die rekombinanten Ovalbumin-Proteine	85
4.7.4	Mechanistische Betrachtungen für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine.....	88
4.7.5	Ausblick für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine	90

5	Material	91
6	Methoden	98
6.1	Zellbiologische Methoden	98
6.1.1	Kultivierung und Passagieren von eukaryotischen Zellen.....	98
6.1.2	Einfrieren und Auftauen von eukaryontischen Zellen.....	98
6.1.3	Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation	99
6.1.4	Gewinnung von hitzeinaktiviertem humanen Plasma	99
6.1.5	Generierung von humanen dendritischen Zellen aus Monozyten	99
6.1.6	Generierung von Phytohemagglutinin (PHA) -stimulierten T-Zell-Blasten	100
6.1.7	Gewinnung und Kultivierung von murinen primären Milzzellkulturen.....	100
6.1.8	Fluoreszenz Markierung von Zellen.....	101
6.1.9	Zytosolpräparation aus eukaryotischen Zellen	102
6.2	Proteinchemische Methoden.....	102
6.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	102
6.2.2	Coomassie-Färbung von Proteingelen.....	103
6.2.3	Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen	104
6.2.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	104
6.2.4.1	Proteinbestimmung nach Bradford.....	104
6.2.4.2	Proteinbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm	105
6.2.5	Western Blot.....	105
6.2.6	Induktionskulturen von <i>E. coli</i> zur Proteinproduktion	106
6.2.7	Aufschluss von Bakterien.....	107
6.2.8	Reinigung von Proteinen mittels säulenchromatographischer Methoden	107
6.2.8.1	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	108
6.2.8.2	<i>Streptag</i> -System	109
6.2.8.3	Mono Q- Ionenaustauschchromatographie.....	109
6.2.8.4	Gelfiltration	110
6.2.8.5	Affinitätschromatographische Reinigung des Antiserums gegen Ovalbumin.....	110

6.3	Molekularbiologische Methoden	112
6.3.1	Restriktionsspaltung von DNA.....	112
6.3.2	Agarosegelelektrophorese.....	112
6.3.3	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	112
6.3.4	DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen	113
6.3.5	Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen	113
6.3.6	Dephosphorylierung von linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase	113
6.3.7	DNA -Ligation	114
6.3.8	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	114
6.3.9	Sequenzierung von DNA-Molekülen	115
6.3.10	Stammhaltung und -pflege von <i>E. coli</i>	116
6.3.11	Gewinnung chemisch-kompetenter <i>E. coli</i>	116
6.3.12	Transformation von <i>E. coli</i> mit rekombinanter DNA.....	117
6.3.13	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	118
6.4	Immunologische Methoden.....	119
6.4.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	119
6.4.2	Durchflußzytometrie.....	119
6.4.2.1	Färbung von Oberflächenmarkern.....	120
6.4.2.2	Intrazelluläre Färbung von Zytokinen	121
6.4.3	Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Ovalbumin.....	122
6.4.4	Zytotoxizitätstest.....	123
6.4.4.1	Chromfreisetzungstest (<i>Chromrelease</i>).....	123
6.4.4.2	<i>in vivo</i> Zytotoxizitätstest.....	124
6.5	Funktionelle Testsysteme zur Untersuchung von zellpermeablen	
	Antigenen	125
6.5.1	Internalisierung von Proteinen/Peptiden in eukaryotische Zellen.....	125
6.5.2	Nachweis von SIINFEKL beladenen MHC-I-Komplexen auf Zellen	125
6.5.3	Stimulierung von humanen spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen nach Beladung mit rekombinanten eGFP-Proteinen	127
6.5.4	Stimulation von OT-1 Milzzellen mit SIINFEKL abgeleiteten Antigenen.....	128
6.5.5	Adoptives Transfermodell zur Untersuchung der rekombinanten OVA-Proteine	129
6.5.6	Tumormodell zur Untersuchung der rekombinanten OVA-Proteine	130

7	Literaturverzeichnis	131
8	Abkürzungsverzeichnis	144
9	Danksagung.....	147
10	Verzeichnis der akademischen Lehrer	149
11	Lebenslauf	150

1 Zusammenfassung

Professionell antigenpräsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, sind für die Induktion einer spezifischen zellulären Immunantwort verantwortlich. Obwohl antigenpräsentierende Zellen sehr effizient Antigene aufnehmen können, gestaltet sich insbesondere die gezielte Einschleusung von Antigenen für die Präsentation über den MHC-Klasse I-Weg schwierig, welche zur Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort, z.B. gegen Tumorzellen, erwünscht ist.

Zellpermeable Moleküle stellen für einen Antigentransfer attraktive Kandidaten dar; sie können die an sie fusionierten bzw. assoziierten Antigene direkt in das Zytoplasma von antigenpräsentierenden Zellen eintransportieren und somit dem MHC-I-abhängigen Präsentationsweg zugänglich machen. Eine in der PreS2-Domäne der viralen Oberflächenproteine des humanen Hepatitis B-Virus charakterisierte 12 AS lange Sequenz (TLM) weist die Eigenschaft der Zellpermeabilität auf. Das TLM gelangt in einem energie-, rezeptor- und temperaturunabhängigen Diffusionsprozess in das Zytoplasma von Zellen, ohne die Zellintegrität zu beeinflussen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Potential des TLM als Vehikel für einen Antigentransfer untersucht; verschiedene mit dem TLM modifizierte Antigenspezies wurden auf ihre Fähigkeit hin charakterisiert, in das Zytoplasma von APCs zu transduzieren und nach der Internalisierung eine spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort zu induzieren.

Eine Mutante des grün fluoreszierenden Proteins (eGFP), welches aufgrund seiner intrinsischen Fluoreszenzaktivität ein geeignetes Modellprotein darstellt, wurde für Zellpermeabilitätsuntersuchungen in antigenpräsentierende Zellen eingesetzt. Rekombinante eGFP-Proteine, das Wildtyp-Protein (eGFP) sowie das N-terminal um das TLM verlängerte Fusionsprotein (TLM-eGFP), wurden aus einem bakteriellen Expressionssystem gewonnen. Für TLM-eGFP konnte im Vergleich zu eGFP Zellpermeabilität in unreife humane dendritische Zellen mittels Durchflußzytometrie beobachtet werden.

Für die funktionellen Analysen wurde das Modellsystem Ovalbumin als Schwerpunkt im Rahmen der Arbeit eingesetzt. In der Sequenz von Ovalbumin wurde ein 8 AS langes, H-2K^b restringiertes, immundominantes MHC-Klasse I-Epitop (SIINFEKL) charakterisiert, welches für Untersuchungen des MHC-I-abhängigen Präsentationsweges vorteilhaft ist. Die OT-1 Maus stellt ein transgenes Mausmodell für den passenden spezifischen T-Zell-Rezeptor dar, welcher den SIINFEKL-H-2K^b-Komplex erkennt, und ist damit für funktionelle Studien einsetzbar. Der Einfluss des TLM auf die Induktion einer $CD8^+$ T-Zellantwort wurde für drei verschiedene, von Ovalbumin abgeleitete Antigenspezies untersucht.

Als Antigene auf Peptidbasis wurden verlängerte SIINFEKL-Peptide eingesetzt, in welchen das SIINFEKL-Epitop N-terminal über einen 4 AS langen *Spacer* mit dem TLM und zu Kontrollzwecken mit dem entsprechenden mutierten, nicht mehr funktionellen Motiv modifiziert wurde. Nach Inkubation von Zellen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden wurde ein exogener Beladungseffekt von H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche, unabhängig von der Funktionalität des zellpermeablen Motives, beobachtet.

Die Effekte, welche durch eine exogene Beladung und/oder eine endogene MHC-I-abhängige Prozessierung der verlängerten SIINFEKL-Peptide verursacht wurden, konnten nicht aufgelöst und getrennt voneinander untersucht werden. Der Einfluss der Modifikation eines CD8⁺ T-Zellepitops mit dem TLM konnte im Rahmen der Arbeit nicht geklärt werden.

Als partikuläre Antigen-träger wurden über ein bakterielles Expressionssystem SIINFEKL tragende HBV-Corepartikel bzw. Corepartikel, welche zusätzlich zum SIINFEKL-Epitop noch mit dem TLM modifiziert waren, generiert. Die beiden SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel-Spezies zeigten eine sehr starke, vergleichbare Aktivierung von transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen. Die zusätzliche Modifikation mit dem TLM übte keinen positiv verstärkenden Einfluss auf ihre Stimulationseffizienz aus.

Als Antigene auf Proteinbasis wurden rekombinante Ovalbumin-Proteine, das Wildtyp-Protein (OVA-HA) sowie das am N-Terminus um das TLM verlängerte Protein (TLM-OVA-HA), aus einem bakteriellen Expressionssystem gewonnen. Für TLM-OVA-HA konnte im Gegensatz zu OVA-HA Zellpermeabilität mittels Immunfluoreszenzfärbung beobachtet werden.

Die Inkubation von OT-1 Milzzellen mit TLM-OVA-HA führte *in vitro* zu einer besseren Stimulation von transgenen CD8⁺ T-Zellen als die Inkubation mit OVA-HA; die Zellen zeigten eine stärkere Expression des Aktivierungsmarkers CD69, eine stärkere Produktion von IFN γ und eine bessere Proliferation.

In einem adoptiven Transfermodell wiesen die transferierten CD8⁺ T-Zellen *in vivo* nach Immunisierung mit einer geringen Dosis an TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA eine stärkere Proliferation auf. Weiter konnte eine stärkere zytotoxische Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Gabe von TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA beobachtet werden. In einem Tumormodell führte die Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen nur zu einer schwachen Antitumor-Antwort. Die Insertion des TLM bewirkte ein leicht vermindertes Auswachsen von Tumoren. In OT-1 Mäusen entwickelten alle Tiere nach Immunisierung mit OVA-HA einen Tumor; im Gegensatz dazu blieben nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA fast die Hälfte der Tiere tumorfrei.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen das Potential von TLM-Fusionsproteinen auf, einen Antigen-transfer in antigen-präsentierende Zellen zu vermitteln und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine CD8⁺ T-Zellantwort auszulösen. Die Aufklärung der genauen mechanistischen Wirkungsweise der TLM-Fusionsproteine sowie die Klärung der Frage, wie diese in Bezug auf ihren strukturellen Aufbau und auf ihre wirksame Applikationsform für die Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort optimiert werden können, werden weiterführende Studien beantworten.

2 Einleitung

2.1 Zellpermeable Moleküle

In jüngster Zeit wurden Peptide und Proteine beschrieben, welche die Eigenschaft der Zellpermeabilität aufweisen. Zellpermeabilität definiert sich als interzellulärer Transport dieser Moleküle ausgehend von primär produzierenden Zellen in nicht produzierende Nachbarzellen. Dabei wird durch den interzellulären Transport die Membran- und Zellintegrität nicht zerstört.

Zellpermeable Moleküle stellen eine sehr heterogene Gruppe dar, was ihren Ursprung, ihre strukturellen Eigenschaften und ihren Transduktionsmechanismus betrifft.

Beispiele für zellpermeable Peptide/Proteine sind das Antennapedia-Homeoboxprotein (Derossi et al., 1994), die davon abgeleiteten Penetratine (Derossi et al., 1998), der Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktor (K-FGF) (Rojas et al., 1998), Transportan (Pooga et al., 1998), das aus dem humanen Immundefizienz Virus stammende Protein TAT (Vives et al., 1997), das vom Herpes Simplex Virus abgeleitete Protein VP22 (Elliott et O'Hare, 1997), sowie die PreS2-Region der Oberflächenproteine des humanen Hepatitis B-Virus (Oess und Hildt, 2000). Unter Berücksichtigung struktureller Eigenschaften von natürlich vorkommenden Molekülen wurden viele synthetische Moleküle generiert (Oehlke et al., 1998; Wender et al., 2000).

Ladung und Hydrophobizität der Moleküle haben einen wesentlichen Einfluss auf den Mechanismus der Membranpassage (Hällbrink et al., 2001). Daher können die Moleküle hinsichtlich dieser Eigenschaften in vier verschiedene Klassen eingeteilt werden (Tab. 1).

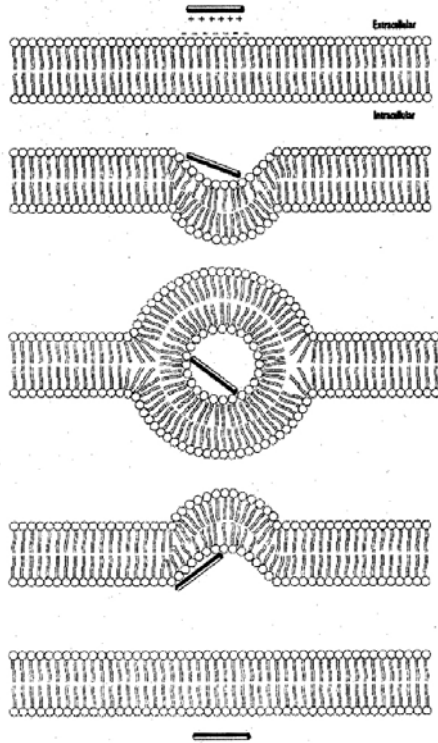
Tab. 1:
Unterteilung der zellpermeablen Moleküle in vier charakteristische Klassen unter Angabe eines repräsentativen Vertreters

Beispiel für zellpermeables Molekül	Elektrische Ladung	Hydrophobizität
TLM (PreS2-HBV)	neutral	neutral
Penetratin	kationisch	hydrophil
Transportan	kationisch	stark hydrophob
K-FGF	neutral	stark hydrophob

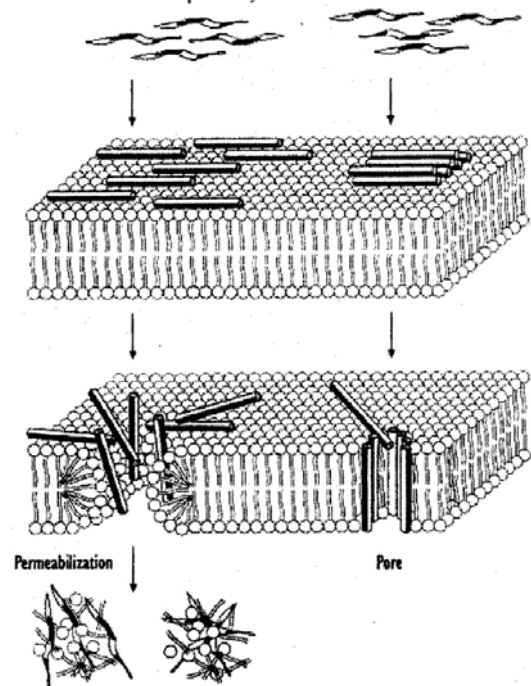
Mögliche Modelle zur Internalisierung von Molekülen sind unter anderem die Endozytose (Hällbrink et al., 2001), sowie die rezeptorvermittelte Aufnahme (Tyagi et al., 2001).

Per definitionem der zellpermeablen Moleküle erfolgt ihre Translokation aber rezeptor-, energie- und temperaturunabhängig (Thoren et al., 2000). Für die Vermittlung einer solchen Membranpassage sind folgende Modellvorstellungen denkbar (Abb.1).

A) Modell der invertierten Mizelle



B) Teppich-Modell



C) Bildung einer Pore

Abb. 1: Mögliche Modellvorstellungen für die Internalisierung von zellpermeablen Molekülen

Dargestellt sind drei mögliche Modellvorstellungen für die Translokation von zellpermeablen Molekülen in Zellen, das Modell der invertierten Mizelle (a), das Teppich-Modell (b) und die Porenbildung (c). Genaue Erläuterungen siehe Text; (Abbildungen entnommen aus Lundberg und Langel, 2003)

Das **Modell der invertierten Mizelle** (Prochiantz et al., 1996; Derossi et al., 1998; Thoren et al., 2000; Magzoub et al., 2002) stellt ein sehr akzeptiertes Modell zur Translokation dar.

Bei diesem Prozess lagern sich die Moleküle aufgrund ihrer positiven Ladung an die Oberfläche der Phospholipidmembran an. Durch diese Wechselwirkung kommt es zur Änderung in der Membranstruktur und zur Einbuchtung der Membran unter Erhalt der Lipiddoppelschicht. Die Einbuchtung vertieft sich immer weiter, bis die Moleküle vollständig von der Membran umgeben sind und sich eine invertierte Mizelle ausgebildet hat. Diese Mizelle kann sich dann in das Zellinnere öffnen und die Moleküle verlassen die Membran direkt in das Zytosol. In diesem Modell verlässt das Molekül nie seine hydrophile, wässrige Umgebung (Abb. 1 a).

Das **Teppichmodell** wurde zuerst als Modell der Translokation von einigen antimikrobiellen Peptiden beschrieben (Pouny et al., 1992; Matsuzaki et al., 1999). Es handelt sich um einen dreistufigen Prozess. Im ersten Schritt führt die Interaktion der Moleküle mit den Phospholipiden der Zellmembran zu einer Änderung in der Sekundärstruktur, so dass die basischen Reste der Moleküle sich zur Membranoberfläche ausrichten. Im zweiten Schritt findet eine Rotation der zellpermeablen Moleküle statt, so dass die hydrophoben Reste der Moleküle mit dem hydrophoben Membranbereich interagieren. Im dritten Schritt wird die Membranstruktur zerstört, was die Internalisierung der zellpermeablen Moleküle erlaubt (Abb. 1 b).

Das dritte Modell stellt die **Bildung einer Pore** dar. Dieser Mechanismus wurde ebenfalls für antimikrobielle Peptide beschrieben (Gazit et al., 1994). Die Ausbildung einer Pore resultiert durch die Einlagerung von amphiphatischen α -helikalen Molekülen, wobei die auf der Außenseite der Moleküle gelegenen hydrophoben Reste mit der Lipidmembran interagieren und die auf der Gegenseite ausgerichteten hydrophilen Reste die Pore auskleiden (Abb. 1 c). Im Gegensatz zum Mechanismus der invertierten Mizelle würden das Teppichmodell und die Porenbildung mit einer gewissen Zytotoxizität der zellpermeablen Moleküle einhergehen.

Mit Hilfe von zellpermeablen Molekülen konnten auch eine Vielzahl von biologisch wirksamen Substanzen, wie Peptide und Proteine, aber auch Polyamid Nukleotid Analoga, sowie DNA- und RNA- Fragmente in Zielzellen eingebracht werden. In manchen Fällen ist die Ladung (*Cargo*) kovalent, in anderen Fällen nicht kovalent mit dem zellpermeablen Molekül assoziiert. Die Transportmechanismen sind meist ebenfalls noch nicht genau verstanden (Übersicht Lindgren et al., 2000; Fischer et al., 2001; Lundberg und Langel, 2003).

2.1.1 h-Region des Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktors

Unter dem Begriff h-Region wird eine Familie von Zellpermeabilität vermittelnden Motiven zusammengefasst, welche sich aus der Signalsequenz des Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktors (K-FGF oder FGF-4) ableiten (Rojas et al., 1996); sie zählen zu den neutral geladenen, stark hydrophoben Molekülen, deshalb auch der Name h-Region für hydrophobe Region.

Unter physiologischen Bedingungen vermittelt die Signalsequenz von K-FGF die Sekretion von Proteinen; es konnte jedoch gezeigt werden, dass sie nach externer Zugabe auch in der Lage ist, die Zellmembran von außen nach innen zu überwinden. Der Transport erfolgt energie- und rezeptorunabhängig (Rojas et al., 1998), ist aber temperaturabhängig. Eine Porenbildung wurde nicht beobachtet. Wahrscheinlich spielt für die Membranpassage dieser Moleküle die Membranfluidität eine bedeutende Rolle. Die Permeabilität ist nicht an bestimmte Zelltypen gebunden.

Versuche zur Internalisierung wurden, wegen der schlechten Löslichkeit der Moleküle, unter physiologischen Bedingungen immer nur als Konjugate durchgeführt.

2.1.2 Antennapedia-Homeodomäne

Die Homeodomäne der Homeoboxproteine der Antennapedia-Mutante bei *Drosophila melanogaster*, bei welcher anstelle von Fühlern Beine am Kopf des Tieres ausgebildet werden, weist die Eigenschaft der Zellpermeabilität auf.

Im Bereich der Homeodomäne konnte eine 16 AS umfassende amphiphile α -Helix mit der Sequenz RQILIWFQDRRMKWKK (pAntp 43-58, Penetratin) identifiziert werden, welche die Zellpermeabilität vermittelt (Derossi et al., 1994). Penetratin gehört zu der Gruppe der kationischen, hydrophilen Moleküle.

Für die reverse, sowie die aus D-Aminosäuren aufgebaute Sequenz konnte ebenfalls Zellpermeabilität beobachtet werden. Die Zerstörung der α -helikalen Struktur der Sequenz hatte keinen Verlust der Zellpermeabilität zur Folge. Allerdings wurde für die um 2 AS in der Antennapedia-Homeodomäne versetzte Sequenz (pAntp 41-55, TERQILIWFQDRRMK) keine Zellpermeabilität mehr gefunden (Derossi et al., 1994; Derossi et al., 1996).

Penetratin konnte erfolgreich zum Transport eines *Cargo* in Zellen eingesetzt werden (Schutze-Redelmeier et al. 1996; Hildt und Oess, 1999; Pietersz et al., 2001).

Mechanistisch wurde davon ausgegangen, dass die Internalisierung von Penetratin mittels invertierter Mizellen erfolgt. Dieses Modell der Membranpassage wurde ursprünglich anhand von Penetratin entwickelt (Derossi et al., 1998). Neuere Untersuchungen deuten allerdings darauf hin, dass es sich bei der Internalisierung um einen hauptsächlich endosomalen Prozess handelt (Drin et al., 2003; Thorén et al., 2003; Fischer et al., 2004). Für die endozytotische Aufnahme von Penetratin mit assoziiertem *Cargo* wurde beschrieben, dass die Expression von Heparansulfatproteoglykanen auf der Zelloberfläche notwendig ist (Console et al., 2003).

2.1.3 HIV-Tat-Protein

Tat ist ein 86 AS umfassendes Protein des humanen Immundefizienz Virus Typ I (HIV-1), welches als Transkriptionsregulator wirkt; es verstärkt die Expression viraler Gene und somit die HIV-Replikation.

Exogenes Tat ist in der Lage, Zellmembranen zu überwinden, den Zellkern zu erreichen und das virale Genom zu aktivieren (Vivès et al., 1997). Als Zellpermeabilität vermittelndes Motiv konnte eine zehn AS umfassende basische Domäne identifiziert werden (GRKKRRQRRR). Das Motiv zählt ebenfalls wie das Antennapedia-Motiv zu der Gruppe der kationischen, hydrophilen Moleküle.

Für den Transportmechanismus wurde ein energie-, rezeptor- und temperaturunabhängiger Prozess beschrieben (Vivès et al., 1997). Tat wurde erfolgreich für die Transduktion von Peptiden, Proteinen und DNA in Zellen eingesetzt (Schwarze und Dowdy, 2000; Becker-Hapak et al., 2001).

Wie für das Antennapedia-Motiv wird die Zellpermeabilität von Tat durch neuere Literatur kritisch diskutiert. Neuere Beobachtungen zeigen für die Internalisierung von Tat ebenfalls eine rezeptorvermittelte, endozytotische Aufnahme (Mai et al., 2002; Thorén et al., 2003; Fischer et al., 2004). Wadia et al. haben kürzlich beschrieben, dass die Internalisierung von Tat-Fusionsproteinen, nach vorausgehender ionischer Wechselwirkung mit der Zellmembran, mittels *Lipid-Raft* abhängiger Makropinozytose erfolgt (Wadia et al., 2004).

Eine mögliche Erklärung für die Widersprüchlichkeit der beschriebenen Transduktions-eigenschaften von zellpermeablen Molekülen in der älteren und neueren Literatur ist die unterschiedliche experimentelle Untersuchung der Prozesse. Dabei wurden früher in der Immunfluoreszenzmikroskopie Artefakte, welche durch Färbung von fixierten Zellen entstanden sind, oder Signale in der Durchflußzytometrie, welche durch noch an der Zellmembran anhaftende Moleküle ohne vorherigen Proteaseverdau gemessen werden konnten, fälschlicherweise als Zellpermeabilität interpretiert (Richard et al., 2003).

2.1.4 TLM (PreS2-HBV)

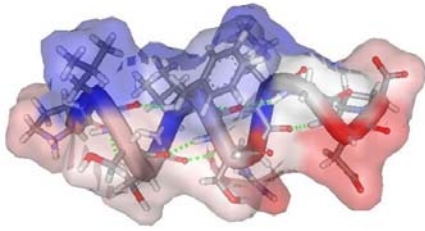
Die PreS2-Region der Oberflächenproteine des humanen Hepatitis B-Virus (HBV) weist die Eigenschaft der Zellpermeabilität auf.

Das in der PreS2-Region zwischen AS 41-52 gelegene Peptidmotiv TLM (*translocation motif*) konnte als Zellpermeabilität vermittelndes Motiv charakterisiert werden. Das TLM mit der Sequenz PLSSIFSRIGDP stellt eine amphiphile α -Helix dar, welche dimerisiert. Der Austausch von L⁴², I⁴⁵ und F⁴⁶ gegen drei Serinreste (PSSSSSRIGDP, PreS2-3S-Mutante) bewirkt eine Umlagerung in eine β -Faltblattstruktur, was zum Verlust der Zellpermeabilität führt (Oess und Hildt, 2000). Das TLM gehört bisher alleine, hinsichtlich der Ladung wie auch der Hydrophobizität, zu der Gruppe der neutralen Moleküle (Abb. 2).

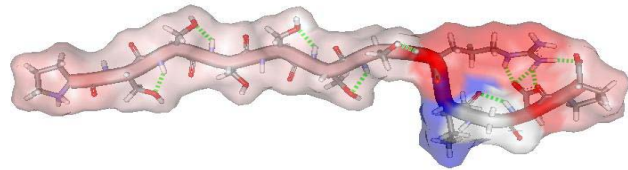
Die Eigenschaft der Zellpermeabilität für das TLM ist nicht auf Leberzellen beschränkt. Sie umfasst die Penetration permanenter Zelllinien und primärer Zellen in der Zellkultur, sowie auch Zellen pflanzlichen Ursprungs. Nahezu hundert Prozent der Zellen werden bei der Transduktion erreicht. Im Unterschied zu einigen anderen zellpermeablen Molekülen weist das TLM keine Spezifität für bestimmte subzelluläre Strukturen auf.

Der Zellpermeabilität liegt ein passiver, energie- und rezeptorunabhängiger Transport zugrunde ohne Beeinträchtigung der Zellintegrität. Der genaue Transduktionsmechanismus ist noch weitgehend unverstanden und Gegenstand aktueller Untersuchungen. Erste molekulare Simulationsrechnungen sagen eine Änderung der Sekundärstruktur beim Übergang von der wässrigen in die hydrophobe Phase voraus, welche den Transport vermitteln könnte (unveröffentlichte Ergebnisse von Roos M.).

A) TLM



B) PreS2-3S Mutante

**Abb. 2:****Strukturelle Darstellung des zellpermeablen TLM und der nicht mehr funktionellen PreS2-3S Mutante**

Zwischen AS 41 und 52 in der PreS2-Region der HBV-Oberflächenproteine wurde ein zellpermeables Peptid charakterisiert, welches als TLM (*translocation motif*) bezeichnet wird und die Sequenz PLSSIFSRIGDP besitzt. Dieses Peptid stellt eine amphiphile α -Helix dar. Der Austausch von drei Aminosäuren gegen drei Serinreste (PSSSSSRIGDP) führt zur Umlagerung in eine β -Faltblattstruktur, wobei die Zellpermeabilität verloren geht. Dargestellt sind die Strukturmodelle des TLM (a) und der PreS2-3S Mutante (b). Blau sind die hydrophoben und rot die hydrophilen Bereiche in den Molekülen dargestellt. Die Strukturmodelle wurden von Dr. Martin Roos durch *molecular modelling* errechnet und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Das TLM wurde erfolgreich eingesetzt für den Eintransport von Peptiden, Proteinen und Nukleinsäuren in Zellen.

Peptide und Proteine, die kovalent mit dem TLM assoziiert waren, wiesen Zellpermeabilität auf. Fusionsproteine bestehend aus dem TLM und z.B. aus dem grün fluoreszierenden Protein (ϵ GFP, *enhanced fluorescent protein*), der DNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors Gal4 und dem HB χ -Protein konnten unter Aufrechterhaltung ihrer Funktionalität in Zellen eingeschleust werden (Oess und Hildt, 2000; Stöckl et al., 2003; Hafner et al., 2003). Die Modifikation von HBV-Corepartikeln mit dem TLM führte zur Internalisierung der voluminösen Kapside in Zellen (Stöckl, 2002; Brandenburg et al., 2004).

Auch für nicht kovalente Komplexe mit dem TLM konnte Zellpermeabilität gezeigt werden. Für einen Komplex bestehend aus dem PreS2-Protein und einem daran bindenden Antikörper konnte Zellpermeabilität nachgewiesen werden (persönliche Information von Hildt E.). Durch Kombination des TLM mit einer Gal4-DNA-Bindungsdomäne war es möglich, komplexierte DNA in Zellen einzuschleusen und dort zur Expression zu bringen (Brandenburg, 2001).

Die Zellpermeabilität des PreS2-Proteins wurde auch *in vivo* beobachtet. Nach Applikation des Proteins in die Pfortader von Mäusen und Ratten konnte nachgewiesen werden, dass sich PreS2 nicht nur in den Endothelzellen des Pfortadersystems, sondern auch in den dem Gefäßendothel direkt angrenzenden Hepatozyten über mehrere Zellschichten weit in die Tiefe anreichert. Die PreS2-3S Mutante konnte dagegen weder in Endothelzellen noch in den angrenzenden Hepatozytenschichten nachgewiesen werden (Oess und Hildt, 2000).

2.2 Die zelluläre Immunantwort

Zur Verteidigung gegen das Eindringen schädlicher, körperfremder Organismen in den Körper hat sich in Vertebraten zusätzlich zum angeborenen das adaptive Immunsystem entwickelt.

Dabei sind Zellen entstanden, die Gefahren für den Körper (z.B. Infektionen, Pathogene, Verletzungen) erkennen und darauf entsprechende antigenspezifische Zellen aktivieren können. Auf der Oberfläche aller Zellen werden MHC-Moleküle (MHC, *major histocompatibility complex*) gezeigt, welche die Abbauprodukte des kompletten zellulären Proteinkatabolismus in Form von Peptiden präsentieren. Professionell antigenpräsentierende Zellen (APCs, *antigen presenting cells*), dazu zählen dendritische Zellen, B-Zellen und Makrophagen, werden durch Gefahrensignale aktiviert. Sie präsentieren gleichzeitig mit einem Kostimulus Peptide, die von naiven T-Zellen erkannt werden, welche nach Selektion im Thymus keine körpereigenen Peptide mehr erkennen sollten. Durch diese Interaktion werden die T-Zellen aktiviert und entwickeln sich zu Effektorzellen. Man unterscheidet zwischen $CD4^+$ T-Helferzellen und $CD8^+$ zytotoxischen T-Zellen (CTLs, *cytotoxic T-lymphocytes*). T-Helferzellen modulieren die Immunantwort durch Ausschüttung von Zytokinen; CTL töten Zellen, die Peptide präsentieren, welche zu ihrer Aktivierung geführt haben (Übersicht Janeway et al., 2002).

2.2.1 Hauptgewebeverträglichkeitskomplex

Proteine des klassischen MHC-I kommen außer auf Erythrozyten auf der Oberfläche von Zellen aller Gewebe vor. MHC-I-Moleküle sind aus einer α -Kette mit einer Transmembrandomäne und drei Immunglobulindomänen, sowie aus einer nicht kovalent assoziierten β -Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m), aufgebaut.

Auf MHC-I-Molekülen können Peptide von hauptsächlich 8 bis 10 AS Länge binden, wobei die Peptidenden in der Regel nicht über die Bindungstasche hinausragen. Da der MHC sowohl polygenisch als auch polymorph ist, gibt es in einer Population viele verschiedene MHC-I-Moleküle und somit viele verschiedene Peptidbindungstaschen, in denen jeweils unterschiedliche Peptide bevorzugt gebunden werden. Dabei hängt die Affinität eines Peptides zur Bindungstasche von seinen Aminosäureseitenketten ab, vor allem von denen, welche an bestimmten Ankerpositionen mit entsprechenden Ankergruben wechselwirken.

Moleküle des ebenfalls klassischen, also polymorphen und peptidbindenden MHC-II kommen nur auf der Oberfläche von APCs vor. MHC-II-Moleküle bestehen aus je einer α - und β -Kette, die jeweils aus einer Transmembrandomäne und zwei Immunglobulindomänen aufgebaut sind.

Peptide, die an MHC-II-Moleküle binden können, sind bis zu über 20 AS lang; die Peptide können an beiden Seiten der Bindungsfurche hinausragen. Konservierte Verankerungsreste kommen nicht vor (Übersicht Janeway et al., 2002).

2.2.2 Antigenprozessierung und -präsentation

Es existieren zwei klassische Antigenpräsentationswege; der sogenannte MHC-Klasse I-Weg ist für die Präsentation von zytosolischen Antigenen und die Stimulation von $CD8^+$ T-Zellen verantwortlich; der sogenannte MHC-Klasse II-Weg vermittelt die Präsentation von exogenen Antigenen und die Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen (Übersicht Janeway et al., 2002).

Die beiden klassischen Präsentationswege sind aber nicht exklusiv, sondern in APCs wurde auch die Präsentation von exogenen Antigenen über den MHC-I-abhängigen Weg beobachtet. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet (Bevan MJ, 1976; Übersicht Heath und Carbone, 2001 a und b) (Abb. 3).

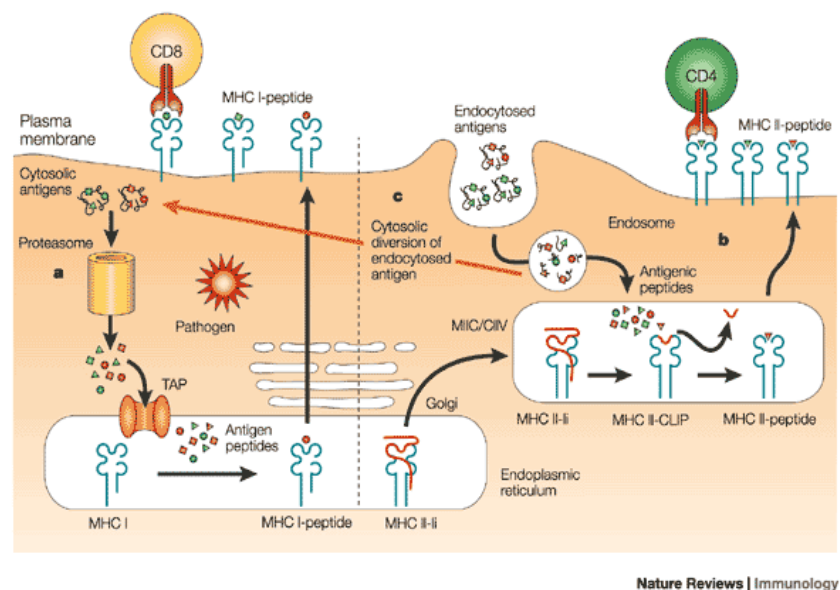


Abb. 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Antigenpräsentationswege

Dargestellt sind die verschiedenen Antigenpräsentationswege in einer antigenpräsentierenden Zelle. Ausführliche Erklärung siehe Text; (Abbildung entnommen aus Heath und Carbone, 2001 a)

Klassischer MHC-Klasse I-Präsentationsweg

Antigene Peptide, die an MHC-I-Moleküle binden können, stammen in der Regel aus zytosolischen (Selbst)proteinen, z.B. viralen Proteinen, die nach Infektion in dem Zytosol der Wirtszelle synthetisiert werden.

Zytosolische Proteine werden hauptsächlich durch das Proteasom abgebaut. Das 20 S Proteasom stellt einen multikatalytischen, zylindrischen Proteasekomplex dar, welcher drei verschiedene proteolytisch aktive β -Untereinheiten (Threoninproteasen) besitzt. Das 20 S Proteasom kann mit weiteren regulatorischen Untereinheiten assoziiert sein, die seine Aktivität modulieren. Das Proteasom spielt eine sehr wichtige Rolle für den ubiquitinabhängigen Abbauweg zytosolischer Proteine, kann aber auch nicht ubiquitinierte Proteine zu Peptidfragmenten verarbeiten.

Antigene Peptide werden häufig mittels TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das ER gebracht. TAP bildet ein Heterodimer aus TAP1 und TAP2, die wahrscheinlich 8 bzw. 7 Transmembrandomänen besitzen und ATP-Bindungskassetten beinhalten. TAP bildet eine Pore in der ER-Membran und transportiert Peptide in einem ATP-abhängigen Mechanismus aus dem Zytosol in das ER.

Teilweise werden die in das ER eingebrachten Peptide noch durch dort lokalisierte Aminopeptidasen nachprozessiert und dann auf „leere“ MHC-I-Moleküle geladen. Nach der Bindung eines Peptides und Vervollständigung seiner Faltung wird das Peptid beladene MHC-I-Molekül an die Zelloberfläche transportiert (Übersicht Grommé und Neefjes, 2002; Janeway et al., 2002).

Klassischer MHC-Klasse II-Präsentationsweg

Exogene Antigene, durch (rezeptorvermittelte) Endozytose aufgenommene Proteine oder größeres, partikelförmiges Material, welches durch Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommen wird, wird durch den MHC-Klasse II-Weg präsentiert.

Die Antigene werden in sauren Endosomen durch Proteasen proteolytisch gespalten.

Der Biosyntheseweg der MHC-II-Moleküle beginnt, wie bei anderen Glykoproteinen der Zelloberfläche, mit der Translokation in das ER. Um die vorzeitige Peptidbeladung der Moleküle zu verhindern, werden neu synthetisierte MHC-II-Moleküle mit der sogenannten MHC-II-assoziierten invarianten Kette (Ii) zusammengebaut. Diese bildet Trimere, wobei jede Untereinheit nichtkovalent an ein MHC-II- α : β -Heterodimer bindet und die Peptidbindungsfurche blockiert.

Eine zweite Funktion der invarianten Kette besteht in dem Transport von MHC-II-Molekülen aus dem ER zu dem endosomalen Kompartiment. Durch Proteasen wird die invariante Kette sukzessive proteolytisch gespalten, bis nur noch ein kurzes Ii-Stück, das sogenannte CLIP-Fragment (*class II-associated invariant-chain peptide*) in der Peptidbindungsfurche von MHC-II gebunden bleibt. Wenn das CLIP-Fragment entweder nach Abdissoziation oder nach Verdrängung durch ein Peptid ersetzt wurde, können die Peptid beladenen MHC-II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert werden.

Die Mechanismen der Beladung von MHC-II-Molekülen sind noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Wahrscheinlich findet die Ii-Spaltung und die Bindung von Peptiden an MHC-II während einer späten Phase des endosomalen Abbauweges in einem spezialisierten vesikulären Kompartiment statt, dem MHC-Klasse II-Kompartiment (MIIC) (Übersicht Villadangos und Ploegh, 2000; Villadangos, 2001; Janeway et al., 2002).

Kreuzpräsentation

Für die Präsentation von exogenen Antigenen über den MHC-Klasse I-Weg (Kreuzpräsentation) sind verschiedene Mechanismen beschrieben und vorstellbar.

Zum einen ist der direkte Transport von Antigenen aus endozytotischen Kompartimenten in das Zytosol möglich. Bestimmte Bakterien, die Toxine produzieren, welche die endosomale Membran zerstören, oder fusogene Viren z.B. können über einen solchen Mechanismus in das Zytosol gelangen. In jüngster Zeit wurden auch aktive Transportmechanismen in APCs entdeckt, endosomale Antigene oder Antigenfragmente nach teilweiser proteolytischer Prozessierung in das Zytosol zu schaffen (*endosome-to-cytosol-transport*). Die aus dem Endosom in das Zytosol gelangten Antigene können dann weiter über den klassischen konventionellen MHC-Klasse I-Weg prozessiert und präsentiert werden.

Zum anderen wird auch ein Proteasomen- und TAP- unabhängiger Präsentationsweg von exogenen Antigenen auf MHC-I-Molekülen beobachtet. Dieser Prozess ist zum einen dadurch vorstellbar, dass Peptide, welche in endosomalen Kompartimenten durch proteolytischen Abbau generiert wurden, wieder in die extrazelluläre Umgebung freigegeben werden. Diese Peptide können dann auf der Zelloberfläche (leere) MHC-I-Moleküle exogen beladen. Weiter ist denkbar, dass Antigene direkt extrazellulär, z.B. durch membranständige Proteasen, degradiert werden und die so entstandenen antigenen Peptidfragmente ebenfalls direkt auf MHC-I-Moleküle auf der Zelloberfläche geladen werden.

Alternativ wird die Beladung von MHC-I-Molekülen in endosomalen Kompartimenten beschrieben. Einerseits können neu synthetisierte MHC-I-Moleküle durch direkt gerichtete Transportmechanismen aus dem ER in Endosomen gebracht werden. Andererseits finden sich MHC-I-Moleküle nach Internalisierung von der Zelloberfläche in endosomalen Kompartimenten. Durch den sauren pH-Wert in Endosomen können die Peptide, mit welchen die internalisierten MHC-I-Moleküle beladenen sind, eluiert und durch andere in den Endosomen vorliegende Peptide ausgetauscht werden. Nach diesem Peptidaustausch werden die MHC-I-Moleküle wieder an die Zelloberfläche rückgeführt.

Neben den vorgestellten Mechanismen existieren wahrscheinlich noch weitere unbekannte Transportmechanismen und beteiligte proteolytische Abbauege für die Kreuzpräsentation. Kürzlich wurden in dendritischen Zellen spezielle Kompartimente (*ER-phagosome mix compartments*) charakterisiert, welche speziell für Kreuzpräsentation von exogenen Antigenen genutzt werden (Guermontprez et al., 2003). Die Fähigkeit, exogene Antigene auch über den MHC-Klasse I-Weg zu präsentieren, ist wahrscheinlich eine spezielle Eigenschaft professioneller APCs, welche auch vom Aktivierungs- und Reifungszustand der Zellen abhängt.

Für verschiedenste Antigene, z.B. lösliche Proteine, partikuläre Antigene, Virus ähnliche Partikel (VLP, *virus like particle*), apoptotische und nekrotische Zellen (Zelltrümmer), Exosomen, an Chaperone gebundene Peptide und Hitzeschockproteine, wurde eine Prozessierung über Kreuzpräsentation beschrieben. Strukturelle Eigenschaften der Antigene

scheinen dabei für die Prozessierung eine wichtige Rolle zu spielen. Der Mechanismus der Kreuzpräsentation bietet eine gute Möglichkeit, z.B. gegen bestimmte Viren und Tumorzellen, welche der MHC-I-abhängigen Präsentation entgehen könnten, eine zytotoxische Immunantwort zu entwickeln.

(Übersicht siehe Reimann und Schirmbeck, 1999; Yewdell et al., 1999; Heath und Carbone, 2001a und b; Belz et al., 2002; Grommé und Neefjes, 2002; Norbury und Sigal, 2003; Rock, 2003)

2.2.3 Antigenpräsentierende Zellen

Von den professionell antigenpräsentierenden Zellen (dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen) stellen die dendritischen Zellen (DCs, *dendritic cells*) die besten Stimulatoren dar.

DCs sind APCs heterogenen Ursprungs, die auf Grund ihrer Morphologie, lange zytoplasmatische Ausläufer auszubilden, als Gruppe zusammengefasst werden. Unreife DCs kommen in den Epithelien aller Gewebe vor (z.B. Langerhans'sche Zellen in der Haut). Im unreifen Stadium tragen sie wenig MHC-Moleküle und keine kostimulatorischen Moleküle auf der Oberfläche. Sie überwachen ihre Umgebung durch Makropinozytose, Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose. Rezeptoren, welche Endozytose auslösen können, sind unter anderem Fc-Rezeptoren, der Mannoserezeptor und das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS) erkennende CD14.

Bei einer Infektion, Entzündung o.ä. können unreife DCs nach Antigenaufnahme zusätzlich durch sogenannte Gefahrensignale aktiviert werden. Nach Bindung von LPS z.B. an Rezeptoren auf DCs werden assoziierte Toll-verwandte Rezeptoren (TLRs, *toll-like receptors*) aktiviert, welche transaktivierend wirken. Weiter kann nach intrazellulärem Abbau von aufgenommenen Bakterien durch unmethylierte CpG-Dinukleotidmotive aus bakterieller DNA TLR-9 aktiviert werden. Unreife DCs können weiter durch nekrotische oder apoptotische Zellbruchstücke aus beschädigten Zellen aktiviert werden, die z.B. bei einem Eintritt von Fremdorganismen oder mechanischer Belastung entstehen (Matzinger, 2002).

Nach der Aktivierung wandern die Zellen zum drainierenden Lymphknoten, wobei sie zu reifen DCs differenzieren. Die Reifung verändert die Morphologie der Zellen; die Dendriten verschwinden und sie verlieren ihre Fähigkeit für die Antigenaufnahme. Stattdessen exprimieren sie in großen Mengen langlebige MHC-I- und MHC-II-Moleküle und Adhäsionsmoleküle; sie exprimieren eine Reihe kostimulatorischer Moleküle (z.B. Mitglieder der B7-Familie CD80 und CD86), an welche Liganden auf T-Zellen (z.B. CD28) binden können. Die simultane Bindung von Peptid-MHC-Komplex an den T-Zell-Rezeptor (TCR) und von B7 an CD28 löst die Aktivierung einer naiven T-Zelle aus (Übersicht Lenschow et al., 1996; Banchereau et al., 2000; Janeway et al., 2002)

2.2.4 Naive T-Zellen

Klassische T-Zellen sind nach ihrer Ausbildung und Selektion im Thymus für die Erkennung von körperfremden Peptiden geschult.

Sie tragen einen spezifischen T-Zell-Rezeptor, der aus zwei über eine Disulfidbrücke verbundenen Polypeptidketten besteht (α - und β -Kette bei $\alpha\beta$ -T-Zellen); aufgrund der Expression von Kofaktoren können T-Zellen in die Gruppe der $CD4^+$ sowie $CD8^+$ T-Zellen eingeteilt werden. Über den TCR können sie restringiert ein bestimmtes, mit einem spezifischen Peptid beladenes MHC-Molekül erkennen; $CD4^+$ T-Zellen können über ihren TCR an MHC-II:Peptid-Komplexe, $CD8^+$ T-Zellen an MHC-I:Peptid-Komplexe binden.

Naive T-Zellen zirkulieren im Körper durch das Blut und wandern in den sogenannten postkapillären Venolen mit hohem Endothel in die Lymphknoten aus, in welchen sie mit APCs in Kontakt treten. Über die efferenten Lymphbahnen werden sie wieder zurück in den Blutkreislauf geschleust. Bei ihrem permanenten Pendeln zwischen Lymphorganen und Blutkreislauf können sie auf der Oberfläche von APCs viele MHC:Peptid-Komplexe durchmustern. Die Dauer einer kompletten Zirkulation wird auf 12 bis 18 h geschätzt (Sprent, 1973).

Naive T-Zellen sind durch die Expression von verschiedenen Oberflächenmarkern charakterisiert; sie exprimieren eine Reihe von Molekülen, welche für das Lymphknoten *Homing* verantwortlich sind, z.B. L-Selektin (CD62L) und den CC-Chemokinrezeptor 7 (CCR-7). Sie zeigen keinerlei Aktivierungsmarker, wie z.B. CD69 (ein Lektin, *very early activation antigen*), CD25 (α -Kette des IL-2-Rezeptors) und CD95L (Fas-Ligand), sowie keine Wanderungsmarker, wie z.B. CD44 (ein Zelladhäsionsmolekül) (Übersicht Janeway et al., 2002). Ebenso exprimieren sie CD28 (Glykoprotein der Immunglobulin-Superfamilie), welches für die Kostimulation bei der Aktivierung durch APCs notwendig ist (Hara et al., 1985).

2.2.5 Aktivierung von T-Zellen

Die gleichzeitige Bindung des T-Zell-Rezeptors einer T-Zelle an den passenden MHC:Peptid-Komplex und von CD28 an B7-Moleküle lösen die Aktivierung einer naiven T-Zelle aus. Diese koordinierte Wechselwirkung ist bereits nach wenigen Stunden ausreichend, um die Proliferation und Programmierung zu einer Effektorzelle auszulösen (Übersicht Lenschow et al., 1996; Janeway et al., 2002).

Die Dichte des TCR auf der Zelloberfläche wird reduziert, indem mehr TCR intrazellulär zurückgehalten wird (Liu et al., 2000). Die T-Zelle tritt in die G_1 -Phase des Zellzyklus ein und gleichzeitig wird die Synthese von IL-2, sowie der α -Kette des IL-2-Rezeptors induziert. IL-2 wirkt autokrin und löst zwei bis drei Zellteilungen pro Tag über eine Dauer von mehreren Tagen aus. Ruhende T-Zellen besitzen einen nur aus β - und γ -Kette bestehenden, nieder affinen IL-2-Rezeptor. Durch zusätzliche Verbindung mit der neu synthetisierten α -Kette bildet sich ein hoch affiner IL-2-Rezeptor, wodurch die Zellen auf sehr geringe IL-2 Konzentrationen ansprechen können (Cerdan et al., 1995). Die Zellteilungen sind wichtig für

die Generierung von vielen Tochterzellen mit einem identischen TCR und die weitere Differenzierung zu Effektorzellen.

4-5 Tage nach Aktivierung differenzieren sich die Nachkommen der aktivierten T-Zelle zu Effektorzellen. Sie zeigen dabei veränderte Expression von Oberflächenmolekülen. Sie exprimieren nun CTLA-4 (*CTL activation associated protein 4*), verwandt zu CD28. CTLA-4 bindet ebenfalls an B7-Moleküle, besitzt allerdings eine etwa 20 Mal höhere Bindungsavidität als CD28. CTLA-4 liefert ein negatives Signal an zuvor aktivierte T-Zellen und begrenzt somit ihre Proliferation (Walunas et al., 1994). Des Weiteren werden viele Zelladhäsionsmoleküle differentiell reguliert und die Glykosylierung vieler Oberflächenproteine ändert sich. Damit wird erreicht, dass die Zellen aufhören, durch die Lymphknoten zu wandern, sondern zu Entzündungsherden gelangen (Zusammenstellung Janeway et al., 2002).

Bei einem Zusammentreffen mit ihrem spezifischen Antigen ist bei Effektorzellen keine Kostimulation mehr erforderlich; verglichen mit naiven T-Zellen reicht ein wesentlich geringerer Schwellenwert bezüglich der Antigendichte und -menge aus, die Zellen zu aktivieren.

2.2.6 CD4⁺ Effektorzellen

Aktiviert CD4⁺ T-Zellen (T-Helferzellen) können durch die von ihnen sekretierten Zytokine entweder eine zellvermittelte (T_H1) oder eine humorale (T_H2) Immunantwort einleiten. Die Entscheidung für die Differenzierung in einen der beiden Zelltypen ist abhängig vom Zytokinprofil, das zum Zeitpunkt der Aktivierung vorhanden ist. Ein weiterer Faktor, welcher die Differenzierung in die verschiedenen Subtypen beeinflusst, ist die Menge und genaue Sequenz des antigenen Peptides, welches die Reaktion auslöst, sowie die Stärke der Wechselwirkung zwischen TCR und MHC:Peptid-Komplex. Die von den Subtypen selbst sekretierten Zytokine hemmen zusätzlich die Differenzierung des jeweils anderen Subtyps (Übersicht Janeway et al., 2002).

Von Makrophagen und DCs produziertes IL-12, sowie von natürlichen Killerzellen (NK Zellen) und CTLs sekretiertes IFN γ führen zu einer **T_H1-Antwort**. T_H1-Zellen sekretieren IFN γ , Tumornekrosefaktor β (TNF- β) und IL-2. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Makrophagenaktivierung (Übersicht Janeway et al., 2002).

Wenn bei der Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen IL-4, eventuell unterstützt von IL-6, vorhanden ist, entsteht **eine T_H2-Antwort**, bei welcher die Helferzellen vor allem IL-4, IL-5 und IL-13 produzieren. Eine T_H2-Antwort bewirkt hauptsächlich eine Aktivierung von B-Zellen und die damit verbundene Antikörperproduktion sowie die Steuerung des Isotypenwechsels der gebildeten Antikörper.

2.2.7 CD8⁺ Effektorzellen

CD8⁺ T-Zellen teilen sich nach der Aktivierung mindestens fünf bis neun Mal.

Sie synthetisieren zytotoxische Effektorproteine (z.B. Perforine und Granzyme), die in lytischer Granula in der Zelle gespeichert werden. Bei Bindung an eine Antigen präsentierende Zelle, z.B. eine virusbefallene Zelle, schüttet die Effektorzelle nach Reorganisation des Zytoskelettes zielgerichtet diese Proteine aus. Perforine bilden Löcher in die Membran der Zielzelle. Granzyme gelangen durch diese Poren in die Zielzelle und lösen über Caspase-Aktivierung Apoptose aus.

CTLs können noch durch einen weiteren Mechanismus zytolytische Aktivität zeigen. Über die Bindung des Fas-Liganden (CD95L), der auf aktivierten CTLs und auch auf T_H1-Zellen exprimiert ist, an Fas (CD95) auf Zielzellen kommt es ebenfalls zur Caspase- Aktivierung und Auslösung von Apoptose in den Zielzellen.

Auch über die Freisetzung von Zytokinen, z.B. IFN γ , TNF- α und TNF- β , können CTLs Effektorfunktion ausüben. IFN γ hemmt direkt die virale Replikation und führt zu einer gesteigerten Expression von Molekülen, welche an der Peptidbeladung von MHC-I-Molekülen von virusinfizierten Zellen beteiligt sind. Außerdem führt IFN γ zur Makrophagenaktivierung. TNF- α und TNF- β können mit IFN γ die Makrophagenaktivierung unterstützen und durch die Wechselwirkung mit TNF-RI bei der Tötung einiger Zielzellen zusammenwirken.

Des Weiteren sind CD8⁺ T-Zellen auch in der Lage, die Immunantwort durch die Sekretion von Zytokinen zu steuern. CD8⁺ T-Effektorzellen können Zytokine ausschütten, die entweder für T_H1- oder T_H2-Zellen typisch sind und somit die Induktion von T_H1- bzw. T_H2-Zellen bewirken (Übersicht Janeway et al., 2002).

2.2.8 Gedächtnis-T-Zellen

Nach Elimination des Pathogens sterben ca. 95% der spezifischen T-Zellen in einem Prozess, der aktivierungsinduzierter Zelltod (AICD, *activation induced cell death*) genannt wird. Der Zellabbau findet dabei größtenteils in der Leber und auch in der Milz statt (Baumann et al., 2002; Green et al., 2003).

Der überlebende Teil der spezifischen Zellen, welcher das sogenannte T-Zellgedächtnis bildet, zirkuliert nun vor allem durch die peripheren Organe; ein kleiner Teil ist weiterhin in den lymphatischen Organen zu finden. Nach abgeklungener Infektion bleiben die CD8⁺ Gedächtniszellen recht konstant (Murali-Krishna et al., 1998), wohingegen die CD4⁺ Gedächtniszellen ständig leicht abnehmen (Homann et al., 2001).

Gedächtniszellen unterscheiden sich in einer ganzen Reihe von Oberflächenmarkern von naiven T-Zellen, haben aber viele Oberflächenmarker mit Effektorzellen gemeinsam.

Durch die Ausbildung von Gedächtniszellen, bei der noch längst nicht alle Mechanismen genau verstanden sind, kann der Organismus auf einen erneuten Befall eines bekannten Erregers sehr schnell reagieren. Im Gegensatz zu naiven Zellen sind sie sofort nach Antigenkontakt fähig, Effektormoleküle zu sekretieren.

2.3 Immunantwort gegen Tumoren

Eine Krebszelle entsteht nach den gegenwärtigen Vorstellungen dadurch, dass sie Mutationen anhäuft, die ihr einen Selektions- und Wachstumsvorteil verschaffen. Das zunehmende Ungleichgewicht zwischen wachstumshemmenden und -stimulierenden Signalen führt zu einem Wachstumsvorteil der neoplastischen Zellen gegenüber der nicht-neoplastischen Zellen (Fearon et al., 1997).

Die Fähigkeit des Immunsystems, Tumorzellen aufzuspüren und zu zerstören, wird als Immunüberwachung (*immune surveillance*) bezeichnet. Die Abstoßung von Tumoren beruht auf der Erkennung sogenannter spezifischer Tumorantigene, welche sich in sechs verschiedene Gruppen einteilen lassen:

(1) streng tumorspezifische Antigene, (2) Proteine, deren Gene nur in männlichen Keimzellen exprimiert werden, (3) gewebe- und entwicklungsspezifische Selbstantigene, (4) in Tumoren überexprimierte Selbstantigene, (5) Proteine mit anormalen posttranslationalen Modifikationen und (6) virale Antigene (Übersicht Fong und Engleman, 2000; Adam et al., 2003).

Tumorantigene, die im Kontext von MHC-Klasse I-Molekülen auf Tumorzellen selbst oder auf APCs mit ausreichender Kostimulation in den sekundären Lymphorganen präsentiert werden, können zur Induktion von tumorspezifischen CD8⁺ T-Zellen führen; für die Initiation und Aufrechterhaltung von CTL-Antworten gegen Tumorzellen ist häufig auch die unterstützende Wirkung von spezifischen CD4⁺ T-Helferzellen nötig.

Bei der Immunantwort gegen Tumoren spielen zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (TILs, *tumour-infiltrating lymphocytes*) wahrscheinlich die wichtigste Rolle, welche in den Tumor einwandern und die Tumorzellen durch Zellyse zerstören können. Die Ausbildung spezifischer Antikörper gegen einige Tumorzellen wurde auch beobachtet; ihre Relevanz für die Abwehr gegen Tumorzellen ist allerdings noch nicht genau geklärt (Übersicht Foss, 2002; Ochsenbein, 2002).

Die Immunüberwachung scheint allerdings bevorzugt für die Kontrolle virusassoziierter Tumoren von Bedeutung zu sein, während spontan entstandene Tumoren oft keine effektive Immunantwort auslösen und Toleranz zeigen aufgrund mangelnder Expression von genügend Tumorantigenen oder von kostimulatorischen Signalen. Um der Immunantwort zu entgehen, können Tumorzellen noch weitere Abwehrmechanismen ausbilden, wie z.B. das Abschalten bzw. die Verringerung der Expression von MHC-I-Molekülen, den Verlust und die Modulation von Tumorantigenen, die Sekretion von immunsuppressiven Zytokinen, sowie die Hinderung von CTLs, in den Tumor einzuwandern (Übersicht Ochsenbein, 2002; Adam et al., 2003).

Vielfältige therapeutische Ansätze zielen darauf ab, die Antigenität von Tumorzellen zu erhöhen, um dadurch eine Immunantwort gegen Tumoren zu erreichen; zur Immunisierung werden unter anderem, auch zusätzlich mit Adjuvantien, parentale Tumorzellen oder genetisch modifizierte Tumorzellen appliziert, welche immunmodulatorische Moleküle exprimieren (z.B. kostimulatorische Moleküle oder Zytokine). Weiter werden

Vakzinierungen, auch in Kombination mit Adjuvantien, direkt mit tumorabgeleiteten Antigenen oder mit dendritischen Zellen durchgeführt, welche vorher *in vitro* mit Tumorantigenen beladen wurden. Die Verabreichung von tumorspezifischen Antikörpern, welche mit Toxinen gekoppelt sind, können nach Aufnahme in Tumorzellen ihre Abtötung bewirken. Die mangelnde Kenntnis von spezifischen und selektiven Tumorantigenen, sowie ihre zu wenig effektive Applikationsform allerdings führen häufig nicht zum gewünschten Erfolg (Übersicht Fong und Englemann, 2000; Reid, 2001; Ochsenbein, 2002; Adam et al., 2003).

2.4 Gezielte Induktion einer zytotoxischen Immunantwort

2.4.1 Beladung von antigenpräsentierenden Zellen mit exogenen Antigenen

Professionell antigenpräsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, sind für die Auslösung einer spezifischen zellulären Immunantwort verantwortlich.

Die Entwicklung von Protokollen, verschiedene Subtypen von DCs zu isolieren oder *in vitro* zu generieren, erlaubt die Gewinnung der Zellen auch in größeren Mengen und ihre gezielte Manipulation zur Induktion einer gewünschten Immunantwort.

In folgender Auflistung sind einige der vielfältigen Antigenformen zusammengestellt, welche für eine Beladung von DCs *in vitro* und *in vivo* mit unterschiedlicher Effizienz zum Einsatz kommen:

- synthetische Peptide
- lösliche (rekombinante) Proteine
- rekombinante Bakterien
- Transfektion mit DNA und RNA (z.B. aus Tumorzellen)
- rekombinante Viren
- (modifizierte) virale Kapside
- Gesamtzelllysate von (Tumor)zellen
- apoptotische und nekrotische Zellen / Zellbruchstücke
- Exosomen
- Fusion mit Hybridzellen

(Übersicht Fong und Engelman, 2000; Brossart et al., 2001; Rea et al., 2001; Reid, 2001; Whiteside und Odoux, 2004)

Obwohl DCs sehr effizient Antigene aufnehmen können, gestaltet sich insbesondere die gezielte Einschleusung von Antigenen für die Präsentation über den MHC-Klasse I-Weg schwierig, welche zur Induktion einer zytotoxischen Immunantwort, z.B. gegen Tumorzellen, erwünscht ist.

Die Transfektionseffizienz von DCs mit DNA/RNA, z.B. mittels Elektroporation oder Lipofektion, ist oft sehr gering. Virale Vektoren erreichen häufig gute Transduktionsraten, können aber die Gefahr unerwünschter genomischer Rekombinationen in sich bergen.

Für die direkte Einbringung von exogenen Antigenen in das Zytosol von APCs und in den MHC-I-abhängigen Präsentationsweg konnten z.B. die osmotische Lyse von Pinosomen (Moore et al., 1988) und die Elektroporation (Chen et al., 1993) eingesetzt werden. Sogenannte ISCOMs (*immune stimulatory complexes*) stellen Lipidmicellen dar, welche aus als Adjuvans wirkenden Trägerlipiden (Lipidmatrix Quil A) und darin eingebetteten Antigenen bestehen. ISCOMs können mit der Lipidmembran verschmelzen und somit die Antigene in das Zytosol von APCs freisetzen. (Heeg et al., 1991). Weiter können die Verwendung von verschiedenen Liposomenformeln (Nakanishi et al., 2000; Mandal und Lee, 2002), von Fusionsmolekülen mit Hitzeschockproteinen (Arnold-Schild et al., 1999), mit spezifischen Antikörpern (Regnault et al., 1999) oder mit bakteriellen Toxinen (Haicheur et al., 2003) mit unterschiedlicher Effizienz zum Einsatz kommen.

2.4.2 Verwendung von zellpermeablen Antigenen als Immunmodulatoren

Um eine MHC-I-abhängige Präsentation von exogenen Antigenen in APCs zu erzielen, konnte auch die Verwendung von zellpermeablen Antigenen erfolgreich eingesetzt werden.

Zur Vermittlung eines Antigentransfers konnten als zellpermeable Motive unter anderem die gesamte Domäne bzw. die Zellpermeabilität vermittelnde 16 AS lange Sequenz der Antennapedia-Homeodomäne, das vom humanen Immundefizienz Virus Typ 1 abgeleitete TAT-Motiv, die h-Region des Kaposi-Fibroblasten-Wachstumsfaktors sowie verschiedene synthetische Peptide dienen.

Die Assoziation der zellpermeablen Motive mit dem jeweiligen *Cargo* erfolgte z.B. über direkte Verknüpfung in der Peptidsynthese, durch Kopplung über heterobifunktionelle *Linker* sowie in vielen Fällen über rekombinante Herstellung der Fusionsmoleküle in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen. Als *Cargo* wurden Peptide und auch funktionale Proteine (mit einer Größe bis zu 120 kDa) mittels der zellpermeablen Motive in Zellen transportiert.

Durch die zellpermeablen Antigene konnten *in vitro* und *in vivo* durch die direkte Applikation der Antigene bzw. durch DCs, welche mit den zellpermeablen Antigenen beladen waren, zytotoxische und auch antitumorale Immunantworten erreicht werden (Tab. 2).

Tab. 2: Einsatz von zellpermeablen Antigenen zur Induktion einer zytotoxischen und /oder antitumoralen Immunantwort

Zellpermeables Molekül	Fracht / Kupplung	Funktioneller Effekt	Literatur
komplette Antennapedia-Homeoboxdomäne (ca. 60 AS)	CTL-Epitop aus HLA-Cw3 (HLA-Cw3 ₁₇₀₋₁₇₉) rekombinant; bakteriell	<u>in vivo (Mausmodell)</u> Induktion von CTLs nach Immunisierung mit Antigen (i.p. / SDS als Adjuvans)	Schutze Redelmeier et al., 1996
Motiv aus der Antennapedia-Homeoboxdomäne (16 AS lang)	CTL-Epitop aus Ovalbumin (OVA ₂₅₇₋₂₆₄) Kupplung über Peptidsynthese	<u>in vitro</u> Induktion von CTL-Hybridomen <u>in vivo (Mausmodell)</u> Antitumor-Antwort nach Immunisierung mit Antigen (i.p. / ohne Adjuvans)	Pietersz et al., 2001
Motiv aus der Antennapedia-Homeoboxdomäne (16 AS lang)	CTL-Epitop aus Ovalbumin (OVA ₂₅₇₋₂₆₄) Kupplung über Peptidsynthese	<u>in vivo (Mausmodell)</u> Antitumor-Antwort nach Immunisierung mit Antigen (epicutan / CpG-ODN 1668 als Adjuvans)	Schutze Redelmeier et al., 2004
Motiv aus dem HIV TAT-Protein (11 AS lang)	Ovalbumin (42 kDa) chemisch kovalente Kupplung über heterobifunktionellen <i>Linker</i>	<u>in vitro</u> Induktion von CTL-Hybridomen <u>in vivo (Mausmodell)</u> Induktion von CTLs nach Immunisierung mit Antigen beladenen DCs (i.p. / kein Adjuvans)	Kim et al., 1997
Motiv aus dem HIV TAT-Protein (11 AS lang)	Ovalbumin (42 kDa) rekombinant; bakteriell	<u>in vivo (Mausmodell)</u> Induktion von CTLs und Antitumor-Antwort nach Immunisierung mit Antigen beladenen DCs (s.c. / kein Adjuvans)	Shibagaki und Udey, 2002
basische und α -helikale synthetische Peptide	Ovalbumin (42 kDa) chemisch kovalente Kupplung über heterobifunktionellen <i>Linker</i>	<u>in vivo (Mausmodell)</u> Induktion von CTLs nach Immunisierung mit Antigen beladenen DCs (i.p. / kein Adjuvans)	Laus et al., 2000
Motiv aus der h-Region von K-FGF (12 AS lang)	CTL-Epitop aus TRP2 (<i>tyrosinase-related protein 2</i>) Kupplung über Peptidsynthese	<u>in vitro</u> verlängerte Antigenpräsentation durch DCs nach Antigenbeladung <u>in vivo (Mausmodell)</u> Antitumor-Antwort nach Immunisierung mit Antigen beladenen DCs (i.v. / ohne Adjuvans)	Wang und Wang, 2002

2.4.3 Modifizierte Corepartikel des Hepatitis B-Virus als Immunmodulatoren

Sogenannte virale Kapside (Virus ähnliche Partikel (VLPs), *virus like particles*) können sich häufig *in vitro* aus den isolierten monomeren Komponenten ohne viralen Kontext assemblieren (Übersicht Ulrich et al., 1998). Durch die Modifikation der Kapsid aufbauenden Monomere mit zusätzlichen Sequenzen ist es möglich, nach Assemblierung Partikel mit neuartigen Eigenschaften zu konstruieren. Da auf der Kapsidoberfläche in sehr großer Dichte Antigene präsentiert werden können, ist die Verwendung der viralen Kapside als partikuläre Antigen-träger zur Induktion einer Immunantwort ein intensives Forschungsfeld.

Virale Kapside vom Hepatitis B-Virus abgeleitet (HBV-Corepartikel) zählen aufgrund ihrer Flexibilität für die Einbringung von Fremdsequenzen, sowie ihrer effizienten rekombinanten Herstellung in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen zu den best geeigneten Systemen.

2.4.3.1 Struktur der HBV-Corepartikel

Die ikosaedrischen Kapside bilden sich durch die Assemblierung des HBcAg (HBV-Core-Monomerproteins), welches aus 183 bis 185 AS (je nach Subtyp) besteht, eine Größe von 21 kDa besitzt und im C-terminalen Bereich sehr viele Argininreste aufweist (Abb. 4).

Zwei verschiedene Spezies von HBV-Corepartikeln können auftreten; durch die Assemblierung von 180 Core-Monomerproteinen können Kapside mit einer Triangulationszahl $T=3$ und einem Durchmesser von 30 nm entstehen; weiter können sich durch die Zusammenlagerung von 240 Core-Monomerproteinen Kapside bilden, welche eine $T=4$ Symmetrie und einen Durchmesser von 34 nm besitzen. Das Gleichgewicht der zwei Partikel-Spezies kann durch Deletionen am C-Terminus zugunsten der $T=3$ Partikel verschoben werden (Crowther et al., 1994; Zlotnick et al., 1996) (Abb. 5).

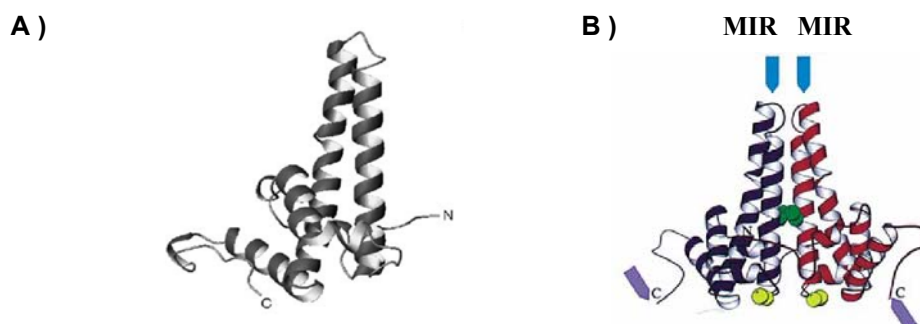


Abb. 4: Schematische Darstellung des HBV-Core-Monomerproteins und seine Dimerisierung

Die helikale Struktur des HBV-Core-Monomerproteins ist schematisch dargestellt (a). Der N-Terminus des Core-Monomerproteins wird im Gegensatz zum C-Terminus im assemblierten Kapsid auf der Oberfläche exponiert. Der Bereich zwischen AS 78-83, der auch als sogenannter *spike tip* bezeichnet wird, ist ebenfalls ein sehr exponierter Bereich auf der Kapsid-Oberfläche. Zwei Core-Monomerproteine lagern sich spontan zu der charakteristischen Dimer-Formation zusammen, von welcher ausgehend die weitere Assemblierung erfolgt (b). Mit MIR (*major immune dominant region*) ist der immundominante Bereich der HBV-Corepartikel auf den *spike tips* bezeichnet.

(Abbildung entnommen aus Pumpens und Grens, 2001)

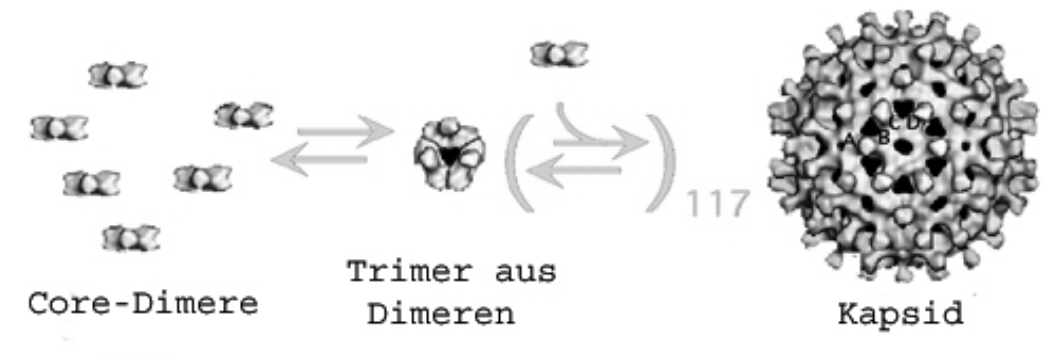


Abb. 5: Assemblierung der HBV-Corepartikel

HBV-Core-Monomerproteine lagern sich spontan zu Dimeren zusammen. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Assemblierung ist die Bildung eines Trimers aus Dimeren. Die Anlagerung von weiteren Dimeren an diesen Komplex erfolgt danach sehr rasch.

(Abbildung modifiziert aus Zlotnik et al., 1999)

2.4.3.2 Modifikation von HBV-Corepartikeln

Insertionen von zusätzlichen Sequenzen in die Core-Monomerprotein-Sequenz wurden vor allem für den N-Terminus, für den C-Terminus und für den *spike tip* beschrieben. Diese Positionen eignen sich deshalb so gut, weil sie nicht mit intra- und intermolekularen Wechselwirkungen im Corepartikel interferieren.

Der **N-Terminus** ist in der Regel auf der Partikeloberfläche exponiert und prädestiniert für die Induktion einer Antikörperantwort. Am N-Terminus konnten bis zu ca. 50 AS lange Sequenzen eingeführt werden, welche dann wieder selbst für eine Antikörpererkennung zugänglich waren.

N-terminal angehängte Sequenzen können allerdings in den einzelnen Untereinheiten des Corepartikels unterschiedliche Orientierung aufweisen; das Einbringen einer *Linker* Sequenz, z.B. von Sequenzen der *Precore*-Region, hat sich deshalb als vorteilhaft erwiesen, um die Exposition des N-Terminus auf der Corepartikel-Oberfläche sicherzustellen (Übersicht Ulrich et al., 1998; Murray und Shiao, 1999; Pumpens und Grens, 2001).

Für **interne Insertionen** in das Core-Monomerprotein ist der Bereich der *spike tips* sehr gut geeignet. Gegen eingeführte Fremdsequenzen konnten starke B-Zell- und T-Helferzell-vermittelte Immunantworten beobachtet werden; die Auslösung einer CTL-Antwort allerdings war nicht erfolgreich (Übersicht Ulrich et al., 1998; Pumpens und Grens, 2001).

Trotz interner Lokalisation besitzt der Bereich des *spike tip* eine sehr hohe Kapazität zur Einführung von Fremdsequenzen. So konnte z.B. die gesamte Sequenz für das grün fluoreszierende Protein mit einer Länge von 238 AS korrekt gefaltet, unter Beibehaltung der fluoreszierenden Eigenschaft insertiert werden (Kratz et al., 1999). In den *spike tip* wurden auch weitere funktionelle Proteindomänen eingeführt, wie z.B. Rezeptoren bzw. Rezeptor-Bindungsstellen, spezifische Domänen für das *Targeting* der Corepartikel in der Zelle, DNA/RNA Bindungsstellen und Verpackungssignale, sowie Immunglobuline (Übersicht Ulrich et al., 1998; Pumpens und Grens, 2001).

Für die Gewinnung von HBV-Corepartikeln mit **Insertionen am C-Terminus** werden zwei Formen des Core-Monomerproteins genutzt, zum einen das Protein mit voller Länge und zum anderen C-terminal verkürzte Proteine. Die aus C-terminal verkürzten Core-Monomerproteinen assemblierten HBV-Corepartikel sind in der Regel instabiler als die aus gesamten Proteinen aufgebauten Kapside. Allerdings zeigten Deletionen am C-Terminus bei der rekombinanten Herstellung der Corepartikel bessere Ausbeuten unter Beibehaltung der korrekten Assemblierung.

Gegen Antigene, welche am C-Terminus eingeführt wurden, wurden teilweise recht schwache B-Zellantworten ausgelöst; zytotoxische T-Zellantworten gegen am C-Terminus insertierte Antigene wurden beobachtet (Übersicht Schödel et al., 1996a; Schödel et al., 1996b; Ulrich et al., 1998; Murray und Shiau, 1999; Pumpens und Grens, 2001).

Ein 9 AS langes, aus dem murinen Zytomegalovirus (MuCMV) stammendes CTL-Epitop z.B. wurde an Position AS 179 im Core-Monomerprotein angehängt. Die Immunisierung mit die modifizierten HBV-Corepartikel produzierenden Vacciniaviren führte zur Induktion einer protektiven CTL-Antwort bei Mäusen nach lethaler Infektion mit MuCMV (Del Val et al., 1991).

Ebenfalls ein 9 AS langes CTL-Epitop, abgeleitet vom lymphozytischen Choriomeningitis Virus (LCMV), wurde über einen *Linker* aus drei Leucinresten direkt an den natürlichen C-Terminus des Core-Monomerproteins (AS 183) fusioniert. Nach intradermaler Immunisierung von Mäusen mit den bakteriell produzierten Corepartikeln in Kombination mit CpG-ODN bzw. mit anti CD40 Antikörpern konnte eine teilweise protektive CTL-Antwort gegen LCMV erreicht werden (Storni et al., 2002). Für die Prozessierung und Präsentation von HBV-Corepartikeln als exogene Antigene über den MHC-Klasse I-Weg konnte der Mechanismus der Kreuzpräsentation in DCs und weniger effizient in Makrophagen gezeigt werden (Ruedl et al., 2002).

Modifikation von HBV-Corepartikeln mit Zellpermeabilität vermittelnden Sequenzen

Strategien, HBV-Corepartikel über den Mechanismus der Zellpermeabilität direkt in das Zytosol von Zellen einzuschleusen, sind durch Arbeiten der Gruppe von Eberhard Hildt beschrieben. Bakteriell produzierte HBV-Corepartikel, welche aus C-terminal verkürzten und N-terminal um das TLM verlängerten Core-Monomerproteinen assembliert waren, wiesen im Gegensatz zu den Corepartikeln ohne TLM Zellpermeabilität in Hepatomzelllinien auf (Stöckl, 2002). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Modifikation von HBV-Core-Monomerproteinen am N-Terminus mit dem TLM in einer Tandemformation eine sehr effiziente Internalisierung der Corepartikel in Zelllinien bewirken konnte (unveröffentlichte Ergebnisse von Brandenburg B. und Roos M.).

Zellpermeable Antigen tragende HBV-Corepartikel könnten für die Induktion von CTL-Antworten attraktive Kandidaten darstellen.

2.5 Experimentelles System und Aufgabenstellung

Die in der PreS2-Domäne der viralen Oberflächenproteine des humanen Hepatitis B-Virus charakterisierte 12 AS lange Sequenz TLM weist die Eigenschaft der Zellpermeabilität auf. Das TLM gelangt in einem energie-, rezeptor- und temperaturunabhängigen Diffusionsprozess in das Zytoplasma von Zellen, ohne die Zellintegrität zu beeinflussen.

Über die Möglichkeit, das TLM als Transport-Vehikel für exogene Antigene in das Zytosol von APCs einzusetzen, ist in der Literatur bislang nichts bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit sollten deshalb verschiedene, mit dem TLM modifizierte Antigenespezies auf ihre Fähigkeit hin charakterisiert werden, in das Zytoplasma von APCs zu transduzieren und nach der Internalisierung eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren.

2.5.1 eGFP als Modellantigen

Zur Charakterisierung der Zellpermeabilität von Fusionsproteinen zwischen dem TLM und funktionellen Proteinen wurde in früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe Hildt als Funktionsdomäne eine Mutante des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP) eingesetzt. GFP ist ein 27 kDa großes Protein, bestehend aus 238 AS, das aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* isoliert wurde. Das Protein zeigt nach Anregung mit UV- oder blauem Licht eine grüne Fluoreszenz. In den Experimenten wurde eine Mutante von GFP verwendet (als eGFP bezeichnet), die sich durch eine Rotverschiebung des Anregungsspektrums von 395 nm zu 488 nm auszeichnet, wodurch die Detektion (Mikroskopie, Durchflußzytometrie) mittels herkömmlicher FITC-Filter erleichtert wird. Nach N-terminaler Verlängerung mit dem TLM wies eGFP Zellpermeabilität auf im Gegensatz zu dem unmodifizierten Protein (Oess und Hildt, 2000). Aufgrund seiner intrinsischen Fluoreszenzaktivität stellte zellpermeables eGFP ein geeignetes Modellprotein für die Zellpermeabilitätsuntersuchungen in APCs dar.

Für die rekombinanten eGFP-Proteine, zum einen das Wildtyp-Protein (eGFP) sowie das am N-Terminus um das TLM verlängerte Protein (TLM-eGFP), sollte nach bakterieller Produktion eine effiziente native Reinigungsstrategie etabliert werden.

Die Zellpermeabilität der rekombinanten eGFP-Proteine sollte in APCs charakterisiert werden.

In einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Jörg Steinmann, Institut für Immunologie am Universitätsklinikum Kiel, die sich im Rahmen ihrer Forschungsarbeiten ebenfalls mit der Einschleusung und Prozessierung von zellpermeablen eGFP-Proteinen in APCs beschäftigte, sollte die funktionelle Charakterisierung der rekombinanten eGFP-Proteine erfolgen. In einem auf humanen dendritischen Zellen basierenden *in vitro* T-Zell-Stimulationsprotokoll sollten die rekombinanten eGFP-Proteine auf ihre Fähigkeit hin analysiert werden, eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren.

2.5.2 Ovalbumin als Modellantigen

Da sich eGFP als Modellantigen für die funktionellen Analysen als nur bedingt geeignet erwiesen hatte, fiel die Wahl für die weitere Bearbeitung des Projektes auf den Einsatz von Ovalbumin als Modellsystem, welches als Schwerpunkt der Arbeit eingesetzt werden sollte.

Ovalbumin ist ein 42 kDa großes Protein aus Hühnereiweiß und gehört zu der Gruppe der Serpine (**Ser**inproteaseinhibitoren) (Nisbet et al., 1981). In der Sequenz von Ovalbumin wurde von Position AS 257 bis 264 ein 8 AS langes immundominantes MHC-Klasse I-Epitop charakterisiert, welches H-2K^b restringiert ist; seine Sequenz lautet SIINFEKL (Röttschke et al., 1991). Die Identifizierung eines solchen Epitops macht Ovalbumin zu einem geeigneten Modellantigen für die Untersuchung der Präsentation über den MHC-Klasse I-Weg sowie für die Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort. Da Ovalbumin häufig als Modellantigen für immunologische Fragestellungen eingesetzt wurde und wird, existieren für dieses System viele hilfreiche Werkzeuge.

Der Antikörper 25.D1.16 erkennt spezifisch SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche und ist für Untersuchungen der Antigenpräsentation über den MHC-Klasse I-Weg einsetzbar (Porgador et al., 1997). Die sogenannte OT-1 Maus stellt ein transgenes Mausmodell für den passenden spezifischen T-Zell-Rezeptor dar, welcher den SIINFEKL-H-2K^b-Komplex erkennt. Der TCR besitzt die V α 2 und V β 5 variablen Regionen. Die Mäuse stellen eine große Anzahl an spezifischen CD8⁺ T-Zellen für Stimulations- und adoptive Transferexperimente bereit (Hogquist et al., 1994).

Für die Untersuchung einer CD4⁺ T-Zellantwort wird Ovalbumin ebenfalls häufig eingesetzt. Von Position AS 323 bis 339 wurde in der Ovalbumin-Sequenz ein CD4⁺ T-Zell-Epitop identifiziert, welches I-A^d restringiert ist (Sette et al., 1987). Analog zur OT-1 Maus wurde das Mausmodell der OT-2 Maus generiert, die transgen ist für den passenden spezifischen TCR, welcher den OVA₃₂₃₋₃₃₉-MHC-Klasse II-Komplex erkennt (Barnden et al., 1998).

Des Weiteren stehen Tumorzelllinien zur Verfügung, welche Ovalbumin exprimieren, z.B. EG7.OVA (Moore et al., 1988). Die Zelllinien sind zur (Re)stimulation von spezifischen T-Zellen geeignet. Außerdem können sie als Zielzellen im Zytotoxizitätstest und zum Einsatz in Tumormodellen dienen.

Im Modellsystem Ovalbumin sollten exemplarisch drei verschiedene Antigenspezies untersucht werden. Als Beispiel für ein definiertes CD8⁺ T-Zell-Epitop wurde das SIINFEKL-Peptid eingesetzt; als partikuläre Antigene wurden Hepatitis B-Virus abgeleitete Corepartikel als Epitopträger für das SIINFEKL-Peptid verwendet; gesamtes Ovalbumin wurde als Vertreter für Proteinantigene untersucht. Der Einfluss des TLM in den jeweiligen Antigenen auf ihre MHC-I-abhängige Prozessierung und Effektivität, eine CD8⁺ T-Zellantwort zu induzieren, sollte charakterisiert werden.

Herstellung der verschiedenen Antigenespezies im Modellsystem Ovalbumin

Die verlängerten SIINFEKL-Peptide sollten so synthetisiert werden, dass an das SIINFEKL-Peptid N-terminal über einen 4 AS langen *Spacer* das TLM bzw. zu Vergleichszwecken das Zellpermeabilitätsmotiv aus dem Antennapedia-Homeoboxprotein angefügt sind; als Kontrollen sollten die jeweiligen mutierten Motive angehängt werden.

Für die Gewinnung der Hepatitis B-Virus abgeleiteten Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop, ohne und mit zusätzlicher Modifikation mit dem TLM, sollten prokaryotische Expressionskonstrukte hergestellt werden; für die verschiedenen Corepartikel-Spezies sollte eine native Reinigungsstrategie etabliert werden.

Für die Gewinnung der rekombinanten Ovalbumin-Proteine, zum einen das Wildtyp-Protein (OVA-HA) sowie das am N-Terminus um das TLM verlängerte Protein (TLM-OVA-HA), sollten ebenfalls bakterielle Expressionskonstrukte kloniert und ein effizientes natives Reinigungsprotokoll erstellt werden.

Funktionelle Charakterisierung der verschiedenen Antigenespezies im Modellsystem Ovalbumin

Die Zellpermeabilität der verschiedenen Antigenespezies in Zelllinien und APCs sollte untersucht werden.

Die Präsentation der verschiedenen Antigenespezies über den MHC-I-abhängigen Weg sollte mit dem Auftreten von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche von APCs und Zelllinien korreliert werden (Färbung mit dem Antikörper 25.D1.16).

Die Effizienz der verschiedenen Antigenespezies, eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort auszulösen, sollte *in vitro* in OT-1 Milzzellkulturen analysiert werden, wobei die Expression von Aktivierungsmarkern, die IFN γ Produktion und die Proliferation der transgenen CD8⁺ T-Zellen gemessen werden sollte.

Die rekombinanten Ovalbumin-Proteine sollten zusätzlich zu den *in vitro* Untersuchungen in OT-1 Milzzellkulturen auch *in vivo* auf ihre Stimulationseffizienz einer CD8⁺ T-Zellantwort hin charakterisiert werden.

In einem adoptiven Transfermodell von OT-1 Milzzellen in C57BL/6 Mäuse sollte die Aktivierung, Proliferation und zytotoxische Aktivität der transferierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen vergleichend gemessen werden.

In einem Tumormodell sollte nach Immunisierung von Mäusen (C57BL/6 und OT-1 Mäusen) mit den verschiedenen Ovalbumin-Proteinen und nach Applikation von Ovalbumin exprimierenden Tumorzellen (EG7.OVA) das Auswachsen von Tumoren im Vergleich beobachtet werden.

3 Ergebnisse

3.1 eGFP als Modellantigen

3.1.1 Herstellung und Reinigung der rekombinanten eGFP-Proteine

In der Arbeitsgruppe standen prokaryotische Expressionskonstrukte basierend auf dem pQe8-Vektor (Qiagen, Hilden) zur Verfügung, welche die Produktion von TLM-eGFP (N-terminale Verlängerung des Proteins mit dem TLM) bzw. eGFP (Wildtyp-Form) erlauben. Die Proteine sind zusätzlich am N-Terminus mit einem (His)₆-tag modifiziert, welcher eine affinitätschromatographische Reinigung über Ni²⁺-NTA-Chromatographie ermöglicht (Oess, 2000; Abb. 6).



Abb. 6: Schematische Darstellung der rekombinanten eGFP-Proteine

Die Reinigung der rekombinanten eGFP-Proteine wurde bislang unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt, welche eine anschließende Renaturierung der Proteine erforderte. Um die Gewinnung der Proteine ohne den zusätzlichen Schritt der Rückfaltung in guten Ausbeuten und hoher Reinheit zu gewährleisten, wurde eine modifizierte Reinigungsstrategie über Ni²⁺-NTA-Säulen unter nativen Bedingungen etabliert (Inouye et al., 1999).

Aus 1 l Bakterien-Induktionskultur konnten ca. 3 mg reines eGFP und 1 mg reines TLM-eGFP gewonnen werden (Abb. 7).

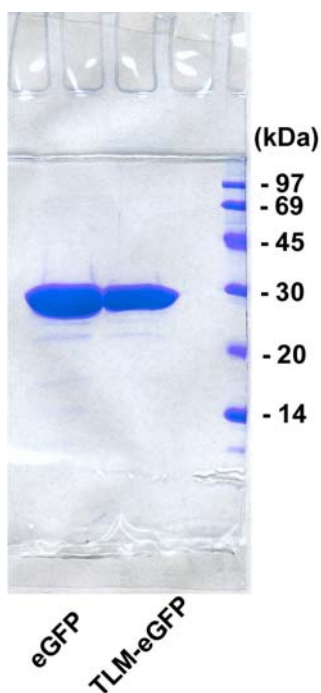


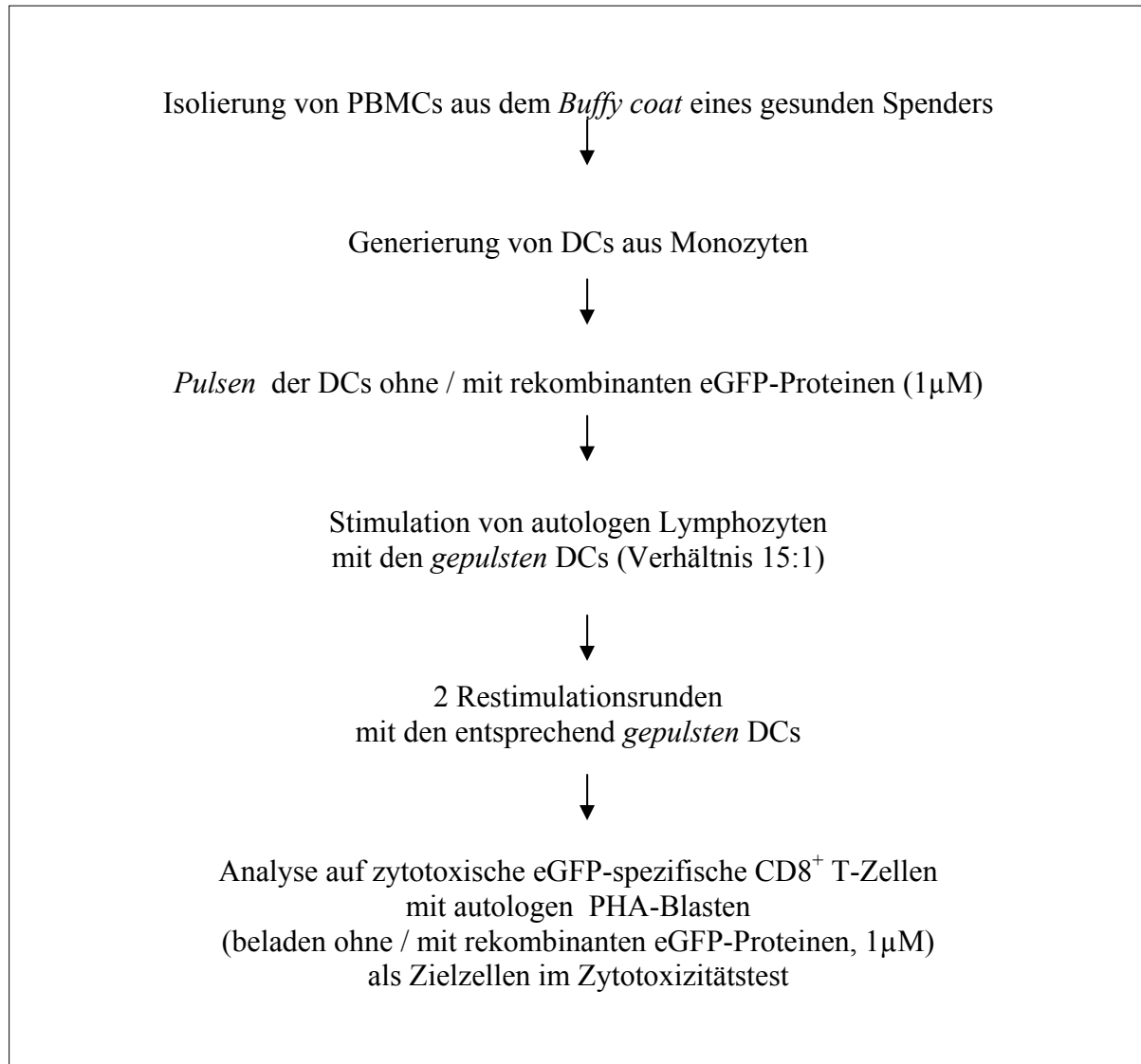
Abb. 7:

Affinitätschromatographische Reinigung der rekombinanten eGFP-Proteine unter nativen Bedingungen

Nach nativer Reinigung über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (siehe 6.2.8) wurden die Protein enthaltenden Hauptfraktionen vereinigt und gegen 50 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, pH 7,5 dialysiert. Die Reinheit der Proteine wurde nach Auftrennung über SDS-Page (15% Gel) mittels Coomassie-Färbung analysiert. Die rekombinanten eGFP-Proteine konnten in guter Reinheit und hoher Ausbeute gewonnen werden.

3.1.2 Stimulierung von humanen spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen nach Beladung mit den rekombinanten eGFP-Proteinen

Das auf humanen dendritischen Zellen basierende T-Zell-Stimulationsprotokoll, um *in vitro* die rekombinanten eGFP-Proteine auf ihre Fähigkeit hin zu untersuchen, eine spezifische zytotoxische Immunantwort auszulösen, ist im folgenden Fließschema dargestellt (experimentelle Durchführung siehe 6.5.3).



3.1.2.1 Generierung von humanen dendritischen Zellen aus Monozyten

Monozyten des peripheren Blutes wurden über einen Adhärenzschritt auf Plastik von den übrigen mononukleären Zellen (PBMCs) isoliert und mit den Zytokinen rhIL-4 und rhGM-CSF differenziert. Die so erhaltenen unreifen dendritischen Zellen zeigten am Tag 6 eine charakteristische Morphologie. Die Zellen waren nicht mehr adhärent; es bildeten sich wie erwartet die für unreife dendritische Zellen typischen zytoplasmatischen Ausläufer auf nur einer Seite aus (Abb. 8).

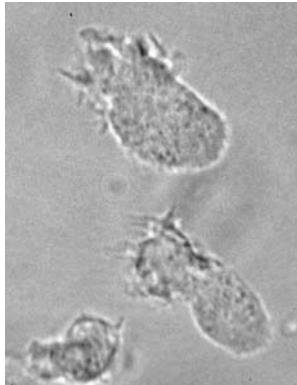


Abb. 8:

Aus humanen Monozyten generierte dendritische Zellen zeigten eine charakteristische Morphologie im unreifen Stadium.

Durch Plastikadhärenz isolierte humane $CD14^+$ Monozyten wurden mit rhIL-4 und rhGM-CSF bis Tag 6 zu dendritischen Zellen differenziert. Sie zeigten im unreifen Stadium eine typische birnensche Morphologie mit zytoplasmatischen Ausläufern auf nur einer Seite.

Die Aufnahme erfolgte in einer Flüssigkultur durch ein Phasenkontrastmikroskop (Vergrößerung 1000 fach).

Die generierten dendritischen Zellen wurden zusätzlich durch Analyse von Oberflächenmarkern charakterisiert. Die Zellen exprimierten die kostimulatorischen Moleküle CD80 wenig und CD86 stärker. Die Expression von CD83 war schwach ausgeprägt, da sich die Zellen in einem unreifen Stadium befanden. Sowohl CD40 als auch CD11c wurden von den Zellen exprimiert. Der Monozyten-Marker CD14 war nicht mehr auf den Zellen nachweisbar (Abb. 9).

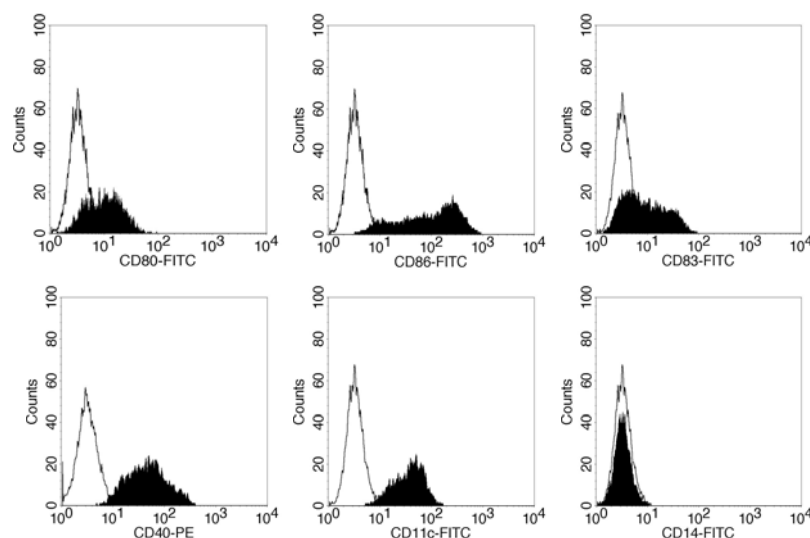


Abb. 9: Phänotypische Charakterisierung von aus Monozyten generierten unreifen dendritischen Zellen

Unreife dendritische Zellen wurden aus humanen Monozyten durch Kultivierung in rhIL-4 und rhGM-CSF über 6 Tage differenziert. Die Zellen wurden auf charakteristische Oberflächenmarker in der Durchflußzytometrie analysiert. Die Histogramme zeigen eine Analyse der Oberflächenmoleküle CD80, CD86, CD83, CD40, CD11c und CD14. Die offenen Kurven zeigen die Färbung mit dem Isotyp und die schwarzen Kurven die Expression der angezeigten Moleküle.

3.1.2.2 TLM-eGFP-Fusionsproteine transduzierten in humane dendritische Zellen.

Das Transduktionsvermögen der rekombinanten eGFP-Proteine in unreife aus Monozyten generierte dendritische Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie vergleichend analysiert.

Während in den Zellen inkubiert mit eGFP im Vergleich zur Isotypkontrolle (nicht dargestellt) keine Färbung zu beobachten war, zeigten die Zellen nach Inkubation mit TLM-eGFP zwar nur eine sehr geringfügige, aber doch sichtbare Rechtsverschiebung der Kurve im Histogramm. Die leicht stärkere Färbung wurde auf die Transduktion von TLM-eGFP-Fusionsproteinen gleichmäßig in alle Zellen zurückgeführt (Abb. 10).

Ein Effekt durch außen an der Zellmembran anhaftende Proteine sollte in beiden Inkubationsansätzen, sowohl bei eGFP als auch bei TLM-eGFP, gleichermaßen gegeben sein.

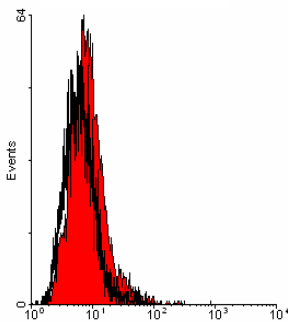


Abb. 10:

TLM-eGFP wies Zellpermeabilität in unreife humane dendritische Zellen im Vergleich zu eGFP auf.

Unreife aus Monozyten generierte dendritische Zellen wurden mit 2µM eGFP bzw. TLM-eGFP 1 h bei 37 °C inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit PBS in der Durchflußzytometrie auf Färbung im FITC-Kanal analysiert. Die schwarze Kurve zeigt die Färbung der Zellen inkubiert mit eGFP, die rote Kurve die Färbung der Zellen inkubiert mit TLM-eGFP. Nach Inkubation mit TLM-eGFP zeigten die Zellen eine leicht stärkere Fluoreszenz als nach Inkubation mit eGFP.

3.1.2.3 Humane dendritische Zellen bewirkten nach Beladung mit den rekombinanten eGFP-Proteinen keine Stimulierung von eGFP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

Die Fragestellung, ob die Zellpermeabilität von TLM-eGFP in humane DCs auch mit einer gesteigerten Fähigkeit einhergeht, spezifische CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren, sollte in einem *in vitro* T-Zell-Stimulationsprotokoll untersucht werden (Fließschema siehe Kapitelanfang; experimentelle Durchführung siehe 6.5.3). In diesem funktionellen Testsystem konnten in drei unabhängigen Experimenten keine eGFP-spezifischen CD8⁺ Effektorzellen generiert werden, weder in den Stimulationsansätzen mit TLM-eGFP *gepulsten* DCs noch mit eGFP *gepulsten* DCs (Daten nicht gezeigt).

Für die Experimente wurden *Buffy Coats* untypisierter Spender eingesetzt; das variable MHC-Repertoire der Spender sowie auch die wahrscheinlich in diesem Testsystem unter der Nachweisgrenze liegende Vorläuferfrequenz an eGFP-spezifischen T-Zellen im Spendermaterial könnten den negativen Ausgang der Stimulationsversuche bedingt haben. Durch das eingesetzte Testsystem konnte für die rekombinanten eGFP-Proteine keine abschließende Korrelation aufgestellt werden zwischen ihrer Zellpermeabilität und ihrer Effizienz, eine CD8⁺ T-Zellantwort *in vitro* auszulösen.

Eine vorausgehende Immunisierung von Spendern mit den rekombinanten eGFP-Proteinen, um die Vorläuferfrequenz der eGFP-spezifischen T-Zellen zu erhöhen, ist nicht möglich. Für die Etablierung eines murinen Testsystems stehen für das eGFP-Protein wenig gute Hilfsmittel (z.B. transgene Mäuse, Zelllinien) und Kontrollmöglichkeiten zur Verfügung. Für die funktionellen Analysen wurde deshalb das eGFP-System zugunsten von Ovalbumin als Modellsystem aufgegeben (siehe 2.5.2).

3.1.3 Zusammenfassung rekombinante eGFP-Proteine

Rekombinante eGFP-Proteine (eGFP-Wildtyp-Proteine sowie N-terminal um das TLM verlängerte TLM-eGFP-Fusionsproteine) wurden nach Produktion in einem bakteriellen Expressionssystem unter nativen Bedingungen gereinigt; die Proteine konnten in sehr guter Ausbeute und Reinheit gewonnen werden.

TLM-eGFP zeigte im Vergleich zu eGFP Transduktionsvermögen in unreife aus humanen Monozyten generierte dendritische Zellen (analysiert mittels Durchflußzytometrie).

Aus humanen Monozyten generierte dendritische Zellen führten nach Beladung mit den rekombinanten eGFP-Proteinen *in vitro* zu keiner Stimulation von eGFP-spezifischen CD8⁺ T-Zellen.

3.2 Ovalbumin als Modellantigen

3.2.1 Etablierungsarbeiten für das Modellsystem Ovalbumin

3.2.1.1 Der Antikörper 25.D1.16 erkennt spezifisch SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf der Oberfläche von Zellen.

Für den monoklonalen Antikörper 25.D1.16 wurde die Eigenschaft beschrieben, spezifisch mit SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe erkennen zu können (Porgador et al., 1997), was ihn als geeignetes Werkzeug für Präsentationsstudien über den MHC-Klasse I-Weg auszeichnet.

In den Experimenten wurde zum einen ein 25.D1.16 Hybridomüberstand in Kombination mit einem Farbstoff-konjugierten spezifischen Sekundärantikörper eingesetzt. Außerdem wurde der Antikörper aus dem Hybridomüberstand gereinigt, mit Digoxigenin konjugiert und mit einem Farbstoff-gekoppelten anti Digoxigenin Antikörper für Färbungen eingesetzt.

Als Kontrollexperiment, ob der für die Experimente eingesetzte Antikörper 25.D1.16. tatsächlich spezifisch SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche erkannte, wurden EL-4 Zellen in einer Konzentrationsreihe mit SIINFEKL-Peptid inkubiert und nach Färbung mit 25.D1.16 in der Durchflußzytometrie analysiert. In einer parallelen Versuchsreihe wurde zusätzlich zum SIINFEKL-Peptid 10 µM RGYVYQGL zugegeben; das Peptid RGYVYQGL leitet sich aus dem Nukleoprotein des *vesicular stomatitis virus* ab und bindet ebenfalls sehr gut an H-2K^b-Komplexe. Der Antikörper 25.D1.16 erkannte spezifisch SIINFEKL beladene und nicht mit RGYVYQGL beladene H-2K^b-Komplexe (Abb. 11 a und b).

Zum Nachweis, ob auch endogen prozessierte SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe erkannt werden, wurden EG7.OVA Zellen gefärbt, welche Ovalbumin endogen produzieren. Auf der Oberfläche von EG7.OVA Zellen konnten SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe detektiert werden (Abb. 11 c).

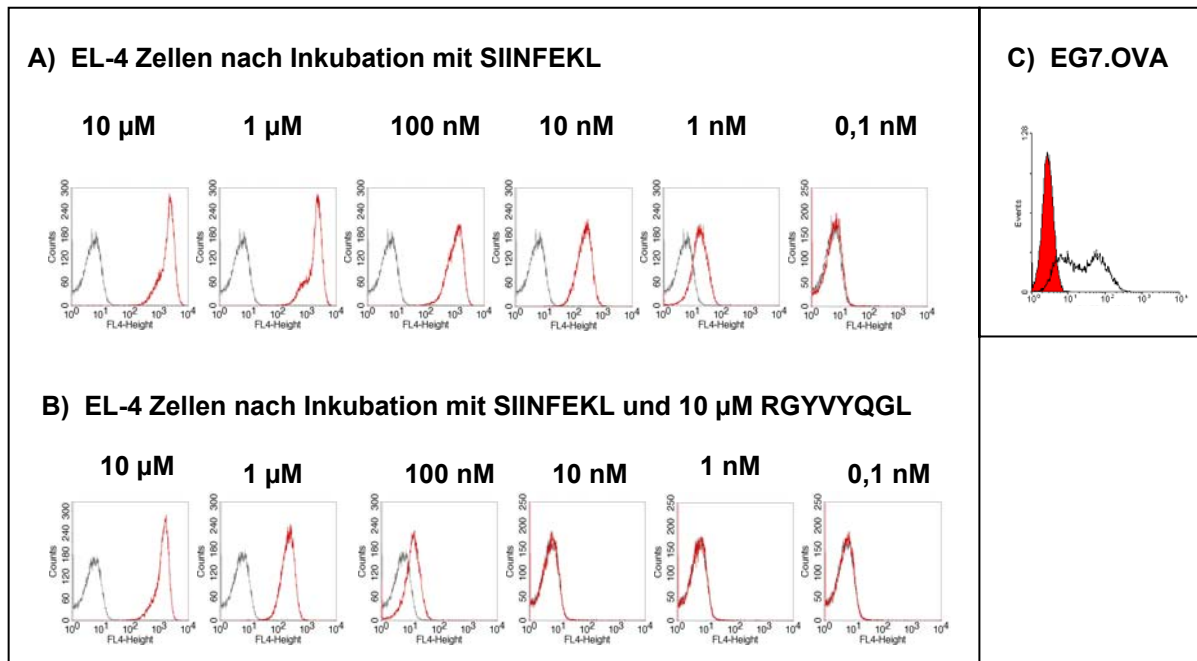


Abb. 11: Der Antikörper 25.D1.16. erkannte spezifisch SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche, sowohl nach exogener als auch nach endogener Beladung.

EL-4 Zellen wurden konzentrationsabhängig mit SIINFEKL (a) bzw. unter zusätzlicher Zugabe von 10 µM RGYVYQGL (b) für 3,5 h in serumfreiem Medium inkubiert. Nach zwei Waschschrritten wurden die Zellen anschließend mit Digoxigenin-gekoppeltem 25.D1.16 und einem Cy5-markiertem anti Digoxigenin Antikörper gefärbt und in der Durchflußzytometrie analysiert. Die schwarzen Kurven stellen Zellen ohne Peptidinkubation dar, die roten Kurven Zellen nach jeweiliger Peptidinkubation. 25.D1.16 erkannte SIINFEKL beladene und nicht mit dem Kompetitionspeptid beladene H-2K^b-Komplexe.

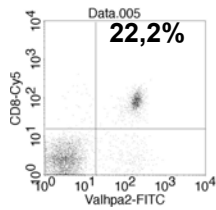
EG7.OVA Zellen wurden mit 25.D1.16 Hybridomüberstand und FITC-konjugiertem Pferd anti Maus IgG (Verdünnung 1:100) gefärbt und in der Durchflußzytometrie analysiert (c). Die rote geschlossene Kurve stellt EL-4 Zellen ohne Peptidinkubation und die schwarze Kurve EG7.OVA Zellen dar. Auf der Oberfläche von EG7.OVA Zellen wurden SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe nachgewiesen.

3.2.1.2 Transgene CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen werden durch SIINFEKL-Peptid aktiviert.

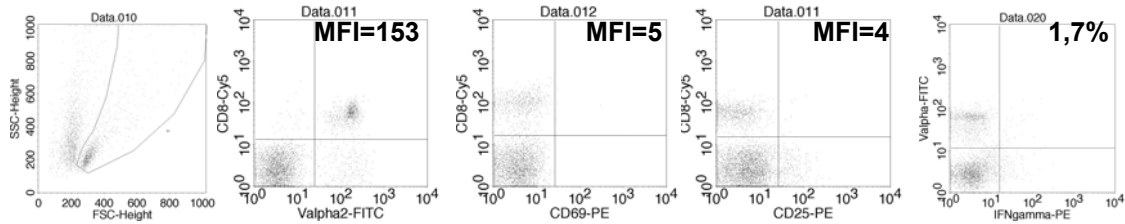
In OT-1 Mäusen tragen 80-90% aller CD8⁺ T-Zellen den transgenen TCR, welcher den SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplex erkennt (Hogquist et al., 1994). OT-1 Milzzellen sind z.B. für Stimulations- und adoptive Transferexperimente geeignet einsetzbar.

Die Stimulationsbedingungen und die Kultivierung von Milzzellen aus der OT-1 Maus wurden im Labor etabliert. Für die Stimulation wurde eine optimale Konzentration von 25 nM SIINFEKL-Peptid in der Milzzellkultur ausgetitriert. Nach Aktivierung wurden die transgenen CD8⁺ T-Zellen größer und regulierten die Expression ihres spezifischen TCR herunter. Außerdem exprimierten sie stark das frühe Aktivierungsantigen CD69 und die α -Kette des IL-2-Rezeptors (CD25); weiter zeigten sie eine starke Produktion von IFN γ . Die unstimulierten Zellen zeigten keine Aktivierung. 5 Tage nach Kultivierung mit 25 nM SIINFEKL-Peptid enthielt die Kultur 80-90% spezifische CD8⁺ Effektorzellen (Abb. 12).

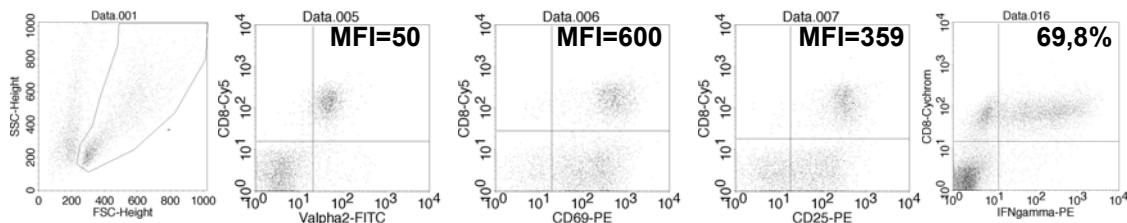
A) OT-1 Milzzellkultur, Tag 0



B) OT-1 Milzzellkultur, Tag 1, ohne Stimulation



C) OT-1 Milzzellkultur, Tag 1, Stimulation mit 25 nM SIINFEKL



D) OT-1 Milzzellkultur, Tag 5, Stimulation mit 25 nM SIINFEKL

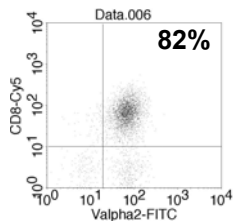


Abb. 12: Stimulation von transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen mit SIINFEKL-Peptid

Der Anteil an transgenen CD8⁺ T-Zellen in frisch isolierten OT-1 Milzzellen wurde mittels Durchflußzytometrie analysiert (Färbung auf V α 2 und CD8). Ungefähr 20% der Milzzellen stellten transgene CD8⁺ T-Zellen dar (a).

OT-1 Milzzellen wurden über Nacht ohne Zugabe von Peptid (b) bzw. mit Zugabe von 25 nM SIINFEKL-Peptid (c) kultiviert. An Tag 1 nach Stimulationsbeginn wurden die Milzzellen in der Durchflußzytometrie auf morphologische Eigenschaften (FSC/SSC), auf die Expression des spezifischen TCR (V α 2) und von Aktivierungsmarkern (CD69 und CD25) sowie auf Zytokin-Produktion (IFN γ) untersucht. Für die Expression der Moleküle wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben und für die IFN γ Sekretion der Anteil der spezifischen IFN γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen. Milzzellen ohne Peptidzugabe zeigten keine Stimulation (b). Zugabe von 25 nM SIINFEKL-Peptid führte zu einer Aktivierung der Zellen (c).

Der Anteil der spezifischen CD8⁺ Effektorzellen wurde 5 Tage nach Kultivierung mit 25 nM SIINFEKL-Peptid in der Durchflußzytometrie analysiert (Färbung auf V α 2 und CD8) und betrug mehr als 80% (d).

3.2.2 Verlängerte SIINFEKL-Peptide

3.2.2.1 Design der verlängerten SIINFEKL-Peptide

Als Vertreter für Antigene auf Peptidbasis wurden modifizierte SIINFEKL-Peptide eingesetzt.

Der Aufbau der Peptide wurde so gewählt, dass das zu untersuchende Zellpermeabilitätsmotiv (rot unterlegt) N-terminal über einen vier AS langen *Spacer* (blau unterlegt) mit der am C-Terminus nicht weiter modifizierten SIINFEKL-Sequenz verknüpft wurde. Der *Spacer* MARL sollte eine gute proteosmale Prozessierung und Freisetzung des SIINFEKL-Epitops gewährleisten (persönliche Information von Chisari F.). Als Kontrolle wurden analoge Peptide mit mutierten und somit nicht mehr funktionalen Transduktionsdomänen (grün unterlegt) eingesetzt. Das aus der Antennapedia-Homeodomäne stammende Transduktionsmotiv (Antp(43-58)) ist gut charakterisiert und in Anwendungen beschrieben, so dass es zu Vergleichszwecken untersucht werden sollte.

TLM-SIINFEKL

PLSSIFSRIGDPMARLSIINFEKL

Tripels-SIINFEKL

PSSSSSRIGDPMARLSIINFEKL

Antp(43-58)-SIINFEKL

RQIKIWFQNRMRKWKMARLSIINFEKL

Antp(41-55)-SIINFEKL

TERQIKIWFQNRMRKMARLSIINFEKL

3.2.2.2 Die verlängerten SIINFEKL-Peptide führten unabhängig von der Funktionalität der Transduktionsmotive zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Auftreten von H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche.

Für die Untersuchung der Prozessierung und Präsentation der verlängerten SIINFEKL-Peptide wurden EL-4 Zellen konzentrations- und zeitabhängig mit den verschiedenen SIINFEKL-Peptiden inkubiert und anschließend auf Anwesenheit von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometrie analysiert.

EL-4 Zellen sind T-Thymomzellen und stellen keine eigentlichen APCs dar. Sie werden aber häufig zur Beladung mit Antigenen verwendet und dienen danach z.B. als Zielzellen im Zytotoxizitätstest oder zur (Re)stimulation von Effektorzellen. Da diese Zellen eine korrekte Prozessierung und Präsentation der Antigene gewährleisten sollten und einfacher als z.B. DCs zu handhaben sind, wurden sie für die Experimente eingesetzt.

Die Inkubation von EL-4 Zellen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden führte zu einem zeit- und konzentrationsabhängigen Auftreten von H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche. Die Anwesenheit von SIINFEKL-H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche war nach Inkubation mit Antp(43-58)-SIINFEKL und Antp(41-55)-SIINFEKL stärker als nach Inkubation mit TLM-SIINFEKL und Tripels-SIINFEKL. Die Funktionalität der Transduktionsmotive hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der Beladung, sondern war innerhalb der jeweiligen Peptidpaare ähnlich (Abb. 13).

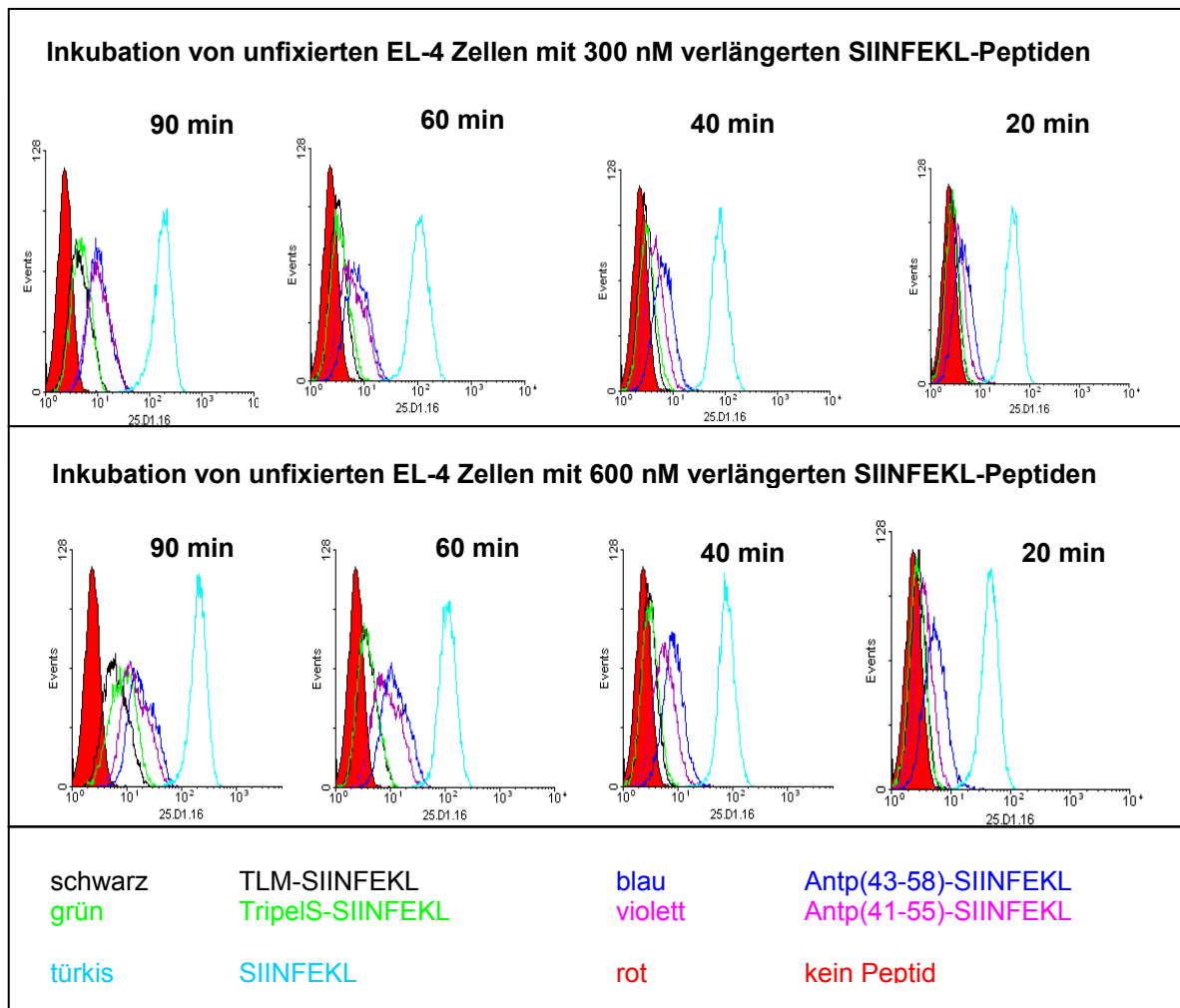


Abb. 13:

Die verlängerten SIINFEKL-Peptide führten zu einem konzentrations- und zeitabhängigen Auftreten von H-2K^b-Komplexen auf der Oberfläche von unfixierten EL-4 Zellen, unabhängig von der Funktionalität der Transduktionsmotive.

EL-4 Zellen wurden konzentrations- und zeitabhängig mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden in serumfreiem Medium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 25.D1.16 Hybridomüberstand in Kombination mit einem FITC-konjugierten Pferd anti Maus IgG (Verdünnung 1:100) gefärbt und in der Durchflußzytometrie auf das Vorhandensein von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche analysiert. Die Inkubation von EL-4 Zellen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden führte zu einem zeit- und konzentrationsabhängigen Auftreten von H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche und war unabhängig von der Funktionalität der Transduktionsmotive.

3.2.2.3 Die Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden führte zu einer exogenen Beladung von H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche.

Nach der Arbeitshypothese sollten die nicht funktionellen Motive nicht zellpermeabel sein und somit die damit verlängerten SIINFEKL-Peptide nicht in Zellen penetrieren können; ihre endogene Prozessierung und Präsentation über MHC-I-Moleküle sollte demnach zumindest schwächer ausfallen oder nicht gegeben sein im Gegensatz zu den Peptiden mit funktionellen Motiven. Das beobachtete Auftreten von SIINFEKL-H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche unabhängig von der Funktionalität der Transduktionsmotive (Abb. 13) legte eine exogene Beladung von H-2K^b-Komplexen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden auf der Zelloberfläche nahe und wurde deshalb genauer untersucht.

EL-4 Zellen wurden vor Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden mit Glutaraldehyd fixiert. Fixierte Zellen können zwar noch von außen mit Peptiden beladen werden und z.B. als Zielzellen dienen, sind aber zu keiner endogenen Prozessierung von Antigenen mehr fähig (Hosken et al., 1989). Bei kürzerer Inkubationsdauer (< 1 h) wurden keine SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche detektiert. Bei längerer Inkubationsdauer wurde konzentrationsabhängig eine Beladung der MHC-I-Moleküle beobachtet, ebenfalls unabhängig von der Funktionalität der eingesetzten Transduktionsmotive (Abb. 14).

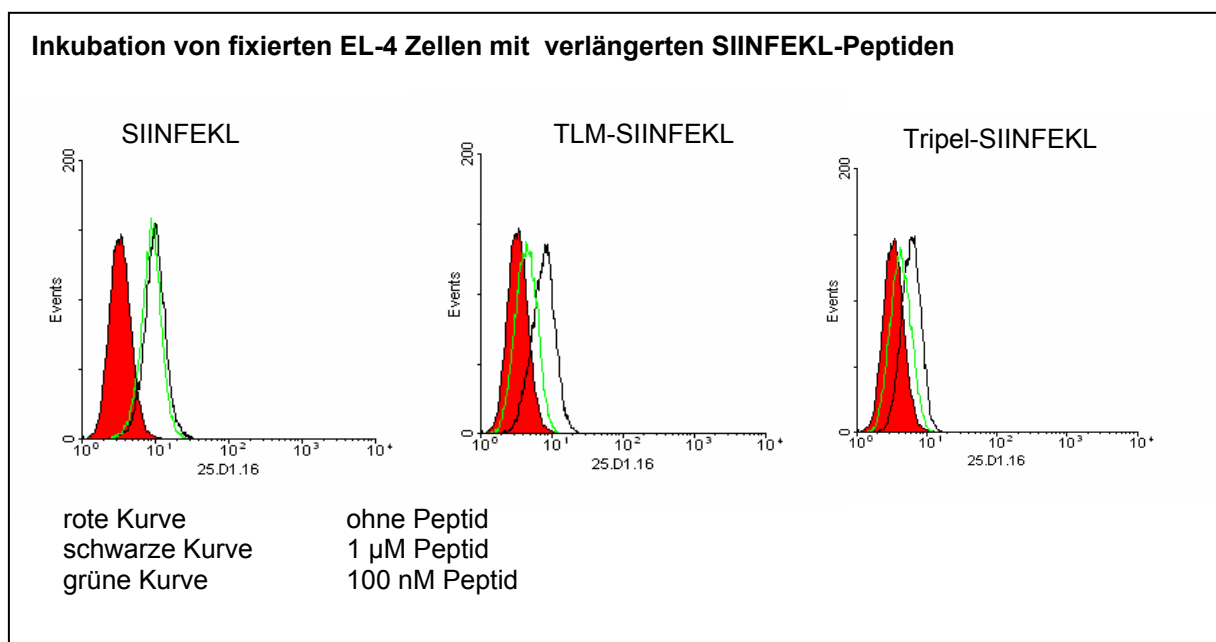


Abb. 14:

Die Inkubation von fixierten EL-4 Zellen mit verlängerten SIINFEKL-Peptiden führte zu einer exogenen Beladung von H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche.

EL-4 Zellen wurden mit Glutaraldehyd fixiert und anschließend konzentrationsabhängig für 3,5 h mit verlängerten SIINFEKL-Peptiden in serumfreiem Medium inkubiert. Nach Färbung mit 25.D1.16. Hybridomüberstand in Kombination mit FITC-konjugiertem Pferd anti Maus IgG (Verdünnung 1:100) wurden die Zellen auf SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche mittels Durchflußzytometrie analysiert. Fixierte EL-4 Zellen zeigten beladene SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche nach Inkubation mit dem SIINFEKL-Peptid direkt und mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden (exemplarisch für das Peptidpaar TLM-SIINFEKL und TripelS-SIINFEKL dargestellt).

3.2.2.4 Ein saurer Waschschrift der Zellen nach Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden konnte den exogenen Beladungseffekt und/oder endogene Prozessierung nicht auflösen.

Versuchsreihen, EL-4 Zellen für einen kürzeren Zeitraum ($< 1/2$ h) mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden zu inkubieren, anschließend die Peptide im Überstand gründlich wegzuwaschen und für weitere 2-4 h zu kultivieren, zeigten eine ähnliche Dichte von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche, unabhängig von der Funktionalität der Transduktionsmotive (Daten nicht gezeigt).

Die Effekte, welche durch eine exogene Beladung und / oder eine endogene Prozessierung der verlängerten SIINFEKL-Peptide über den MHC-Klasse I-Weg ausgelöst wurden, konnten unter den bisherigen experimentellen Bedingungen nicht getrennt voneinander analysiert werden.

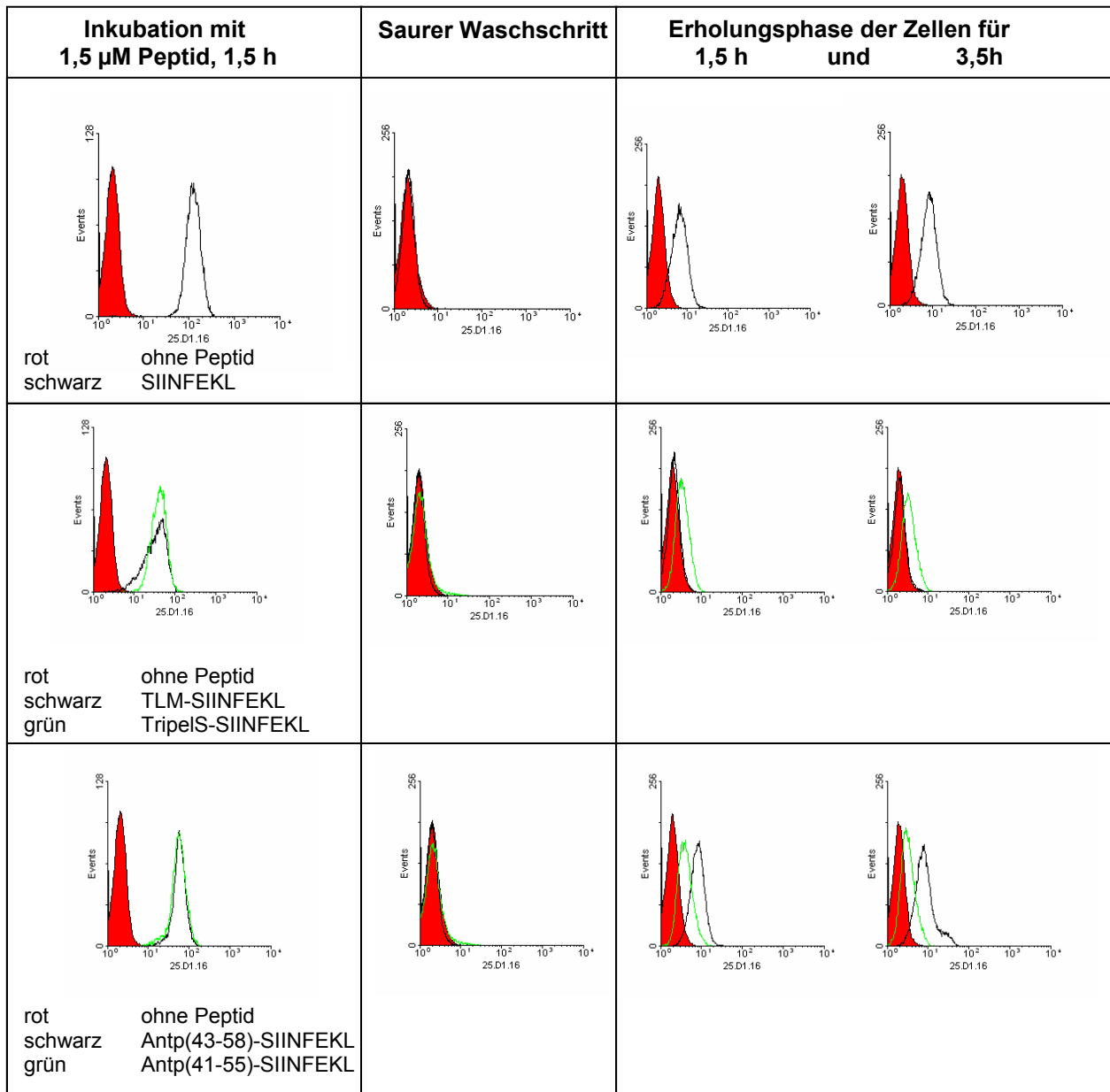
Um diese beiden Effekte möglicherweise separat voneinander untersuchen zu können, wurden die Zellen nach Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden einem sauren Waschschrift unterzogen. Ein saurer Waschschrift sollte alle Peptid beladenen MHC-I-Komplexe auf der Zelloberfläche zerstören. Nach einer Erholungsphase der Zellen (2-4 h) könnte dann auf der Zelloberfläche der Neuaufbau des Peptid beladenen MHC-I-Repertoires von innen heraus analysiert werden (Storkus et al., 1993).

EL-4 Zellen wurden nach Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden einem sauren Waschschrift unterzogen. Nach diesem Waschschrift waren keine SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche mit dem Antikörper 25.D1.16. mehr nachweisbar.

Nach einer Erholungsphase konnten im Zellansatz, welcher mit dem SIINFEKL-Peptid inkubiert worden war, wieder deutlich SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe detektiert werden. Auf den mit TLM-SIINFEKL inkubierten Zellen konnten keine SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexe nachgewiesen werden, während auf den mit Antp(43-58)-SIINFEKL inkubierten Zellen deutlich Komplexe gemessen werden konnten. Die Zellen, welche mit den jeweiligen Peptiden mit nicht funktioneller Transduktionsdomäne inkubiert waren, zeigten ein ähnlich starkes Vorhandensein von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Oberfläche (Abb. 15).

Die Ergebnisse, besonders der Kontrollansatz mit SIINFEKL-Peptid, machten deutlich, dass die Durchführung eines sauren Waschschriftes nicht geeignet war, die Effekte der endogenen Prozessierung und exogenen Beladung der verlängerten SIINFEKL-Peptide getrennt voneinander zu untersuchen.

Die Detektion von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen nach der Erholungsphase der Zellen wurde wahrscheinlich durch aus toten Zellen freigesetzte Peptide, durch *Recycling* von bereits internalisierten beladenen SIINFEKL-H-2K^b-Komplexen und durch die unterschiedliche Assoziation der Peptide an/in Zellen verfälscht. Während der Inkubation der Zellen mit den (verlängerten) SIINFEKL-Peptiden in der hohen Konzentration vor dem Waschschrift ist auch eine pinozytische Aufnahme der Peptide denkbar, welche dann mit in die Ergebnisse eingeflossen sein könnte.

**Abb. 15:**

Ein saurer Waschschrift konnte den exogenen Beladungseffekt und die endogene Prozessierung der verlängerten SIINFEKL-Peptide nicht auflösen.

EL-4 Zellen wurden nach Inkubation mit verlängerten SIINFEKL-Peptiden (1,5 μ M, 1,5 h, serumfreies Medium) einem Waschschrift mit saurem Zitratpuffer pH 3,2 unterzogen (6.5.2). Danach wurde ein Aliquot der Zellen nach Färbung mit 25.D1.16. Hybridomüberstand in Kombination mit FITC-konjugiertem Pferd anti Maus IgG (Verdünnung 1:100) in der Durchflußzytometrie analysiert. Nach dem sauren Waschschrift waren keine SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche nachweisbar.

Die übrigen Zellen wurden für weitere 1,5 h bzw. 3,5 h in serumhaltigem Medium bei 37 °C inkubiert, danach analog gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Auf den Zellen konnten beladene H-2K^b-Komplexe auf der Oberfläche detektiert werden, bis auf den Zellansatz, welcher mit TLM-SIINFEKL inkubiert worden war.

3.2.2.5 Die Transduktionsmotive Antp(43-58) und TLM zeigten einen unterschiedlichen Auswascheffekt aus Zellen.

Die Assoziation der verlängerten SIINFEKL-Peptide an / in Zellen und das Auswaschen der Peptide aus den Zellen sollte in weiteren Experimenten charakterisiert werden.

Da für die verlängerten SIINFEKL-Peptide keine Detektionsmöglichkeit (z.B. Antikörper oder Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff) zur Verfügung stand, wurden die Versuche direkt mit den beiden Zellpermeabilitätsmotiven TLM und Antp(43-58) durchgeführt, welche N-terminal kovalent mit FITC konjugiert waren. Zellen wurden mit den fluoreszenten Zellpermeabilitätsmotiven inkubiert, anschließend sehr gründlich gewaschen und in der Durchflußzytometrie auf Färbung im FITC-Kanal analysiert. Auf einen Trypsinverdau wurde aufgrund des reversiblen Diffusionsprozesses des TLM (siehe unten) nach der Peptidinkubation verzichtet. Die erhaltenen Signale spiegelten somit Effekte von sowohl in der Zelle vorhandenen als auch an der Zellmembran anhaftenden Peptiden wider.

Die Inkubation mit einem irrelevanten FITC-konjugierten humanen MHC-I-Epitop zeigte nur Hintergrundfärbung der Zellen. Die Inkubation mit dem fluoreszenten TLM führte zu einem der Hintergrundfärbung vergleichbaren Signal, während die Inkubation mit dem fluoreszenten Antp(43-58) eine sehr starke Färbung der Zellen bewirkte (Abb. 16).

Dieses Ergebnis zeigte den unterschiedlichen Auswascheffekt und Assoziation der verschiedenen Zellpermeabilitätsmotive an / in Zellen deutlich auf. Antp(43-58) besitzt durch seine positive Ladung starke Assoziation an Zellmembranen und gelangt nach neueren Befunden wahrscheinlich bevorzugt endozytotisch in Zellen. Die Zellpermeabilität des TLM stellt einen schnellen reversiblen Diffusionsprozess in und auch wieder aus Zellen bei Änderung des Konzentrationsverhältnisses dar. Durch diesen reversiblen Transportmechanismus ist der Verlust des TLM nach Waschschrinen aus den Zellen denkbar, während Antp(43-58) durch seine stärkere Wechselwirkung an / in Zellen für die Zellen verfügbar bleiben kann.

Dieser Befund, welcher sich wahrscheinlich in gewissem Maße auch auf die entsprechenden verlängerten SIINFEKL-Peptide übertragen lässt, erschwerte zusätzlich zu der exogenen Beladung die Etablierung eines geeigneten Systems, die endogene MHC-I-abhängige Prozessierung der verlängerten SIINFEKL-Peptide zu messen.

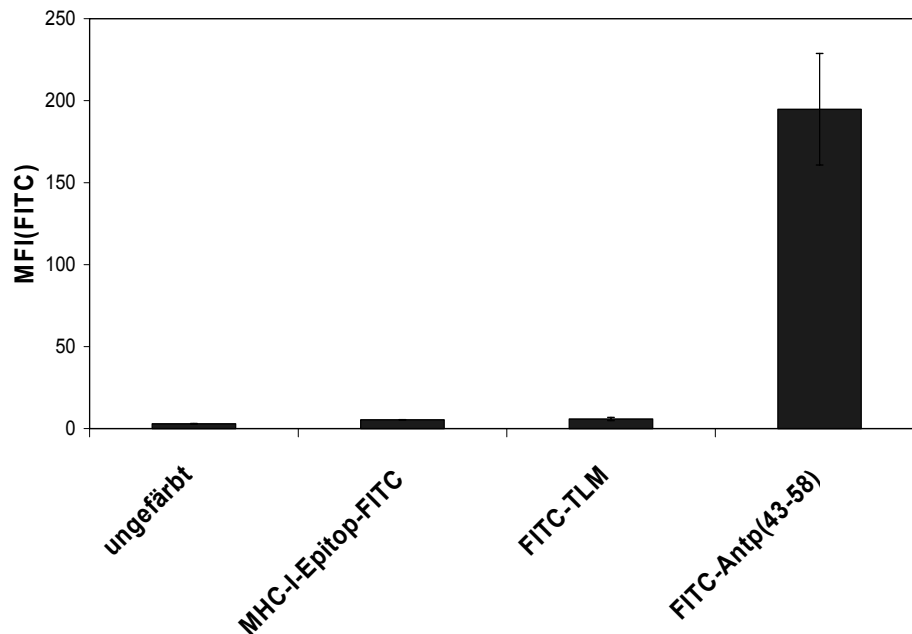


Abb. 16:

Die Zellpermeabilitätsmotive TLM und Antp(43-58) zeigten einen unterschiedlichen Auswascheffekt aus Zellen.

EL-4 Zellen wurden mit 3 μ M TLM, Antp(43-58) sowie einem irrelevantem Kontrollpeptid (humanes MHC-I-Epitop, abgeleitet aus dem bcr-abl Protein) (alle Moleküle FITC-konjugiert) für 1,5 h in serumfreiem Medium inkubiert. Die Zellen wurden danach dreimal gründlich gewaschen und im FITC-Kanal in der Durchflußzytometrie analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) für den FITC-Kanal als Mittelwert zweier unabhängiger Ansätze. Die Inkubationen ohne Peptid bzw. mit dem irrelevanten Kontrollpeptid zeigten Hintergrundfärbung der Zellen. Die Inkubation mit dem TLM Peptid zeigte eine dem Hintergrund ähnliche Färbung. Die Inkubation mit dem Antp(43-58) Peptid führte zu einer starken Färbung der Zellen.

3.2.2.6 Die verlängerten SIINFEKL-Peptide zeigten keine unterschiedliche Fähigkeit, spezifische CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren.

In weiteren Experimenten sollten mögliche funktionelle Unterschiede der verlängerten SIINFEKL-Peptide, spezifische CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren, analysiert werden.

OT-1 Milzzellen wurden konzentrationsabhängig mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden kultiviert. An Tag 1 nach Stimulationsbeginn wurde die Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen analysiert, indem die Expression des spezifischen TCR ($V\alpha 2$) und von CD69 sowie die IFN γ -Produktion gemessen wurden.

Die verlängerten SIINFEKL-Peptide führten alle zu einer ähnlich starken Stimulation der transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen. Die Modifikation mit einer funktionellen Transduktionsdomäne zeigte keinen verstärkenden Einfluss (Tab. 3).

Tab. 3:

Die verlängerten SIINFEKL-Peptide zeigten keine unterschiedliche Fähigkeit, spezifische transgene CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen zu stimulieren.

	IFN γ -Produktion (%)			Expression von CD69 (MFI)	Expression von V α 2 (MFI)
	der spezifischen CD8 ⁺ T-Zellen in einer OT-1 Milzzellkultur, Tag 1 nach Stimulation				
Kein Peptid	1,00			12,5	129,3
Peptidkonzentration	20 nM	100 nM	500 nM	100 nM	100 nM
SIINFEKL	51,65	60,96	56,23	404,5	28,1
TLM-SIINFEKL	43,29	68,04	52,49	479,3	24,2
TripelS-SIINFEKL	47,25	64,64	48,59	535,6	24,3
Antp(43-58)-SIINFEKL	53,78	61,33	55,12	413,4	25,6
Antp(41-55)-SIINFEKL	51,12	58,30	47,53	325,2	26,6

3.2.2.7 Zusammenfassung verlängerte SIINFEKL-Peptide

Nach Inkubation von EL-4 Zellen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden konnten zeit- und konzentrationsabhängig SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche detektiert werden, unabhängig von der Funktionalität der zellpermeablen Motive.

Experimente unter Verwendung von fixierten Zellen sprachen für eine exogene Beladung von H-2K^b-Komplexen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden.

Die Effekte, welche durch eine exogene Beladung und/oder eine endogene MHC-I-abhängige Prozessierung der verlängerten SIINFEKL-Peptide verursacht wurden, konnten unter den gewählten experimentellen Bedingungen, (unter anderem Durchführung eines sauren Waschschrittes, Stimulation von OT-1 Milzzellen), nicht aufgelöst und getrennt voneinander untersucht werden. Welchen Einfluss die Modifikation mit dem TLM im Kontext eines CD8⁺ T-Zell-Epitops bewirkt, konnte nicht geklärt werden.

3.2.3 Hepatitis B-Virus abgeleitete Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop

3.2.3.1 Herstellung von bakteriellen Expressionskonstrukten für die rekombinanten HBV-Corepartikel

Als Vertreter für partikuläre Antigene wurden rekombinante HBV-Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop untersucht. Der Einfluss der zusätzlichen Insertion des TLM in die Epitop tragenden HBV-Corepartikel sollte charakterisiert werden.

Für die Generierung der eingesetzten HBV-Corepartikel wurden C-terminal verkürzte HBV-Core-Monomerproteine (bis einschließlich AS 149) gewählt; in früheren Arbeiten des Labors konnten damit im bakteriellen Expressionssystem bessere Ausbeuten erzielt werden als mit Core-Monomerproteinen der gesamten Länge (Stöckl, 2002).

Als Insertionsstelle für das SIINFEKL-Epitop wurde die direkte C-terminale Verlängerung des verkürzten HBV-Core-Monomerproteins gewählt. Auf die Einfügung einer *Linker*sequenz wurde verzichtet, da nach Vorhersage über das Programm *PAProC* (Universität Tübingen) nach der endogenen Sequenz eine proteosomale Prozessierung und Freisetzung des SIINFEKL-Epitops gegeben sein sollte.

Für das Konstrukt, welches zusätzlich das TLM beinhalten sollte, wurde das TLM N-terminal über einen *Linker* an das HBV-Core-Monomerprotein angefügt. Um eine bessere Exposition des TLM auf der Oberfläche zu erreichen, wurde ein 14 AS umfassender *Spacer* aus dem *Precore*-Bereich zwischen das TLM und dem HBV-Core-Monomerprotein integriert, wobei ein in diesem Bereich vorhandenes Cystein (AS -7 in Bezug auf das Core ATG) durch Tryptophan ersetzt wurde (Stöckl, 2002).

Zu Reinigungszwecken wurde N-terminal an die jeweiligen HBV-Core-Monomerproteine ein *StrepII-tag* angefügt (Abb. 17).

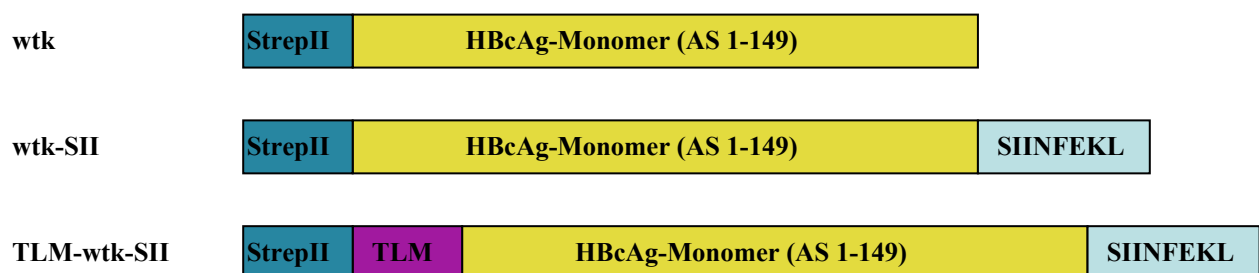


Abb. 17: Schematische Darstellung der rekombinanten HBV-Core-Monomerproteine

Wtk stellt ein rekombinantes verkürztes HBV-Core-Monomerprotein dar (AS 1 bis 149), welches N-terminal um den acht AS langen *StrepII-tag* (WSHPQFEK) und einen acht Glycinreste umfassenden *Spacer* verlängert ist. **Wtk-SII** ist ein entsprechendes rekombinantes verkürztes HBV-Core-Monomerprotein, welches zusätzlich C-terminal das SIINFEKL-Epitop beinhaltet. Bei **TLM-wtk-SII** ist N-terminal nach dem *StrepII-tag* das TLM und ein 14 AS langer *Linker* aus der *Precore*-Sequenz vor der verkürzten Sequenz des HBV-Core-Monomerproteins eingefügt. C-terminal ist dieses Protein um das SIINFEKL-Epitop verlängert.

Für die Expression des verkürzten HBV-Core-Monomerproteins (wtk) wurde freundlicherweise eine Glycerolkultur von Lars Stöckl zur Verfügung gestellt (Stöckl, 2002).

Für die Klonierung von prokaryotischen Expressionskonstrukten für die rekombinanten SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel wurde der Expressionsvektor pASK-IBA7 (IBA, Göttingen) verwendet, welcher die Reinigung der erhaltenen Proteine unter nativen Bedingungen über einen Affinitäts-tag (*StrepII-tag*) erlaubt. Ausgehend vom Plasmid pSM2, welches ein zweifaches in Tandemformation vorliegendes HBV-Genom beinhaltet, wurden die Sequenzen für wtk-SII (Verwendung der Überhangoligonukleotide f-1903BamHI und c2349+ova), sowie für TLM-wtk-SII (Verwendung der Überhangoligonukleotide f-TLM-1861-BamHI und c2349+ova) amplifiziert. Über die beiden entsprechenden Schnittstellen wurden die Amplifikate in den Vektor pASK-IBA7 inseriert. Die korrekten prokaryotischen Expressionsplasmide wurden durch Sequenzanalyse bestätigt.

3.2.3.2 Reinigungsstrategie für die rekombinanten HBV-Corepartikel

Für die rekombinanten HBV-Corepartikel wurde nach bakterieller Produktion eine native Reinigungsstrategie etabliert (siehe 6.2.8).

Mit den Bakterienlysaten wurde als erster Reinigungsschritt eine Affinitätschromatographie über Streptactin-immobilisierte Tröpfelsäulchen durchgeführt. Die Protein enthaltenden Elutionsfraktionen wurden als zweiten Reinigungsschritt über eine Gelfiltrationssäule gegeben. Die Gelfiltration gewährleistete die Abtrennung von HBV-Coremonomeren/ Dimeren und Aggregaten von den vollständig korrekt assemblierten HBV-Corepartikeln mit einer Größe von ca. 4×10^6 Da (Abb. 18 a). Als Reinheitskontrolle wurden die jeweiligen Proteinfractionen nach Auftrennung über SDS-Page mittels Silberfärbung und Western Blot analysiert (Abb. 18 b und c). Die Integrität der verschiedenen HBV-Corepartikel wurde über Elektronenmikroskopie nachgewiesen, die freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Prof. Gelderblom, Robert Koch-Institut Berlin, durchgeführt wurde (Abb. 18 d).

Da keine adäquate Standardsubstanz für eine Proteinbestimmung der HBV-Corepartikel haltigen Lösungen zur Verfügung stand, wurden die Proteinausbeuten über photometrische Messung bei 280 nm abgeschätzt (OD_{280nm} von 1 entspricht 1 mg/ml Protein). Als Ausbeute wurde für TLM-wkt-SII ca. 0,5 mg Protein sowie für wtk und wtk-SII ca. 1-2 mg Protein je 11 Bakterien-Induktionskultur mit einer Reinheit > 90% erhalten.

Die Reinigungsstrategie für die rekombinanten HBV-Corepartikel lieferte Produkte in guter Reinheit, allerdings in geringen Ausbeuten.

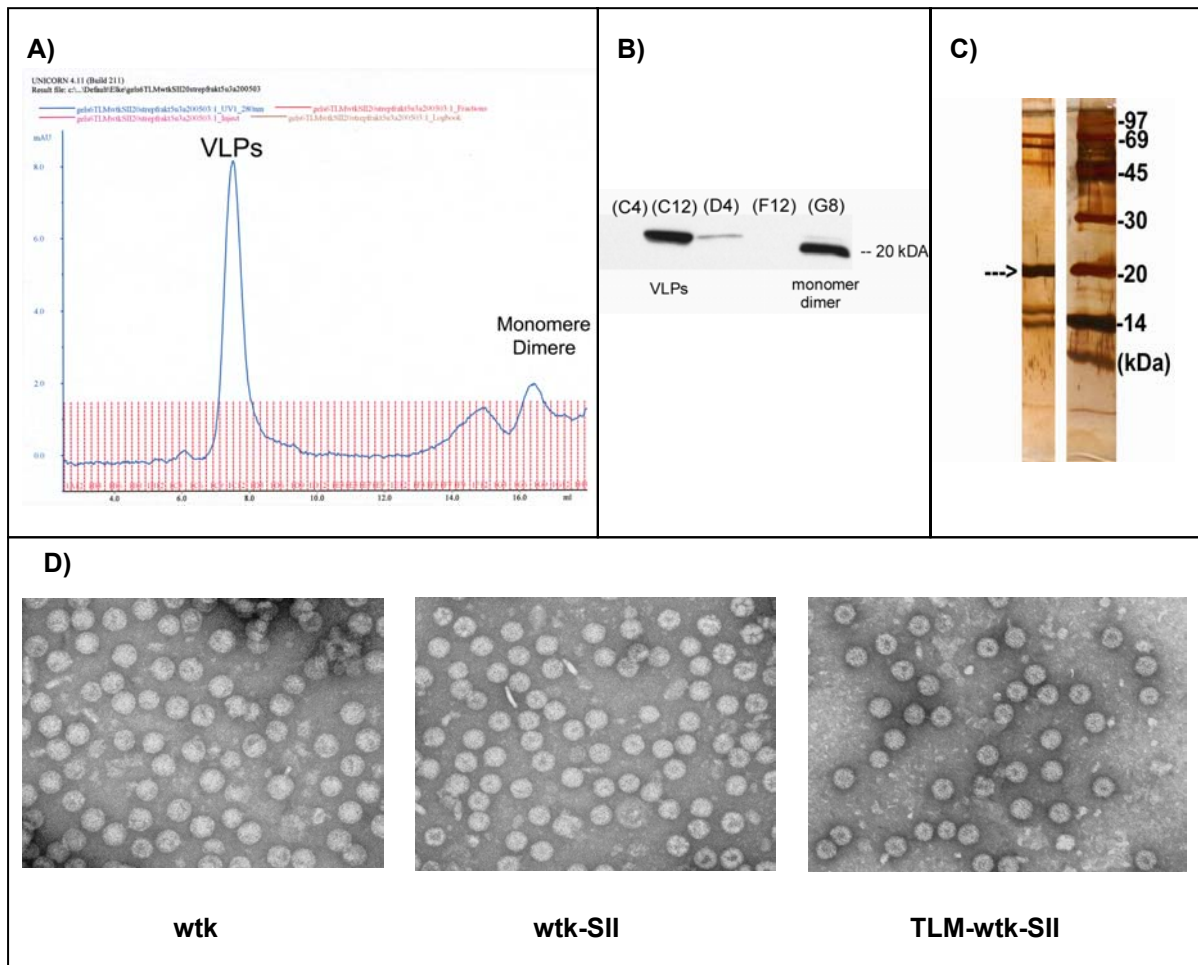


Abb. 18: Reinigung der rekombinanten HBV-Corepartikel

Bakterienpellets aus Induktionskulturen für die rekombinanten HBV-Corepartikel (4–5 h, 37 °C, 200 µg/l AHT) wurden mittels *french press* aufgeschlossen. Die Reinigung der Partikel erfolgte unter nativen Bedingungen über zwei Stufen, zuerst mittels Affinitätschromatographie über Streptactin immobilisierte Tröpfelsäulchen und anschließend über Gelfiltrationschromatographie über eine Superose 6 10/300 GL-Säule (siehe 6.2.8).

a: Dargestellt ist ein typisches Elutionsprofil der Gelfiltrationsläufe, exemplarisch für das Konstrukt TLM-wtk-SII. Auf der Ordinate ist die Absorption bei 280 nm aufgezeichnet, auf der Abszisse das Elutionsvolumen unter isokratischen Bedingungen (Fraktionen à 200 µl). Vollständig und korrekt assemblierte HBV-Corepartikel kamen bei einem Elutionsvolumen von 7,5-8 ml. Die Proteinfractionen bei einem späteren Elutionsvolumen stellten verunreinigende Proteine und HBV-Coremonomere/Dimere (ca. 17 ml) dar.

b: Die Elutionsfraktionen der Gelfiltration wurden in einem 15%igen Gel in der SDS-Page aufgetrennt und mittels Western Blot auf ihre Spezifität analysiert. Der Nachweis erfolgte über ein polyklonales anti HbcAg Kaninchenserum (Verdünnung 1:1000) und Merrettich-Peroxidase-gekoppeltes anti Kaninchen IgG (Verdünnung 1:2500) nach ECL-Entwicklung. Fraktion C12 stellte die Hauptfraktion und Fraktion D4 die auslaufende Schulter der Elution für die HBV-Corepartikel dar; Fraktion G8 eluierte HBV- Coremonomere/ Dimere (das Molekulargewicht für das HBV-Core-Monomerprotein ist 21 kDa).

c: Die Elutionsfraktionen für die HBV-Corepartikel (Hauptpeak) wurden vereinigt; die Proteinlösung wurde über einen Zentrifugalkonzentrator (Ausschlussgrenze 10 kDa) auf 1/5 – 1/10 des Ausgangsvolumens eingeeengt und für die weitere biochemische und funktionale Charakterisierung eingesetzt. Zur Reinheitskontrolle der Proteinlösung wurde ein Aliquot über SDS-Page (15%) aufgetrennt und das Gel anschließend mittels Silberfärbung analysiert.

Fortsetzung Abb. 18:

d: Die Integrität der gereinigten HBV-Corepartikel wurde über Elektronenmikroskopie analysiert. Dazu wurde ein Aliquot der nach der Gelfiltration gewonnenen Proteinlösung auf ein Kupfergitter immobilisiert und im Elektronenmikroskop EM10A (Zeiss) untersucht (Arbeitsgruppe Prof. Gelderblom, Robert Koch-Institut, Berlin). Alle rekombinanten HBV-Corepartikel zeigten eine regelmäßige und korrekte Assemblierung.

3.2.3.3 SIINFEKL tragende HBV-Corepartikel stimulierten transgene CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen.

Für die funktionelle Charakterisierung wurden die SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel auf ihre Effizienz hin untersucht, eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort *in vitro* zu induzieren. Der Einfluss des in die HBV-Corepartikel insertierten TLM auf die Stimulationsfähigkeit sollte ermittelt werden.

OT-1 Milzzellen wurden konzentrationsabhängig mit den verschiedenen rekombinanten HBV-Corepartikel-Spezies inkubiert. In einer Zeitkinetik wurde die Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen in den Kulturen analysiert, indem ihre Expression von CD69, ihre Produktion von IFN γ sowie ihre Proliferation gemessen wurden.

Die transgenen CD8⁺ T-Zellen in den Kontrollansätzen, welche mit wtk inkubiert waren, zeigten nur geringe Expression von CD69 sowie keine Produktion von IFN γ und keine Proliferation im Vergleich zu den Zellen, in welche die SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel zugegeben worden waren. In diesen Kulturen wurde bereits an Tag 1 nach Stimulationsbeginn eine sehr starke Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen beobachtet, zu erkennen an ihrer starken Expression an CD69 (Abb. 19 a). Des Weiteren zeigten die aktivierten CD8⁺ T-Zellen IFN γ -Produktion, welche von der für die Stimulation eingesetzten Proteinmenge abhängig war. An Tag 1 wurde bis zu einer Konzentration von 0,7 $\mu\text{g/ml}$ Corepartikel (ca. 0,02 nM) eine mit der Proteinmenge korrelierende Zytokinproduktion gemessen (Abb. 19 b). Bei kleineren Proteinkonzentrationen wurde zeitverzögert an Tag 2 noch eine geringe IFN γ Produktion beobachtet, welche bei Konzentrationen kleiner 0,3 $\mu\text{g/ml}$ zum Erliegen kam (Daten nicht gezeigt). Die transgenen CD8⁺ T-Zellen aus den Inkubationsansätzen mit wtk-SII und TLM-wtk-SII zeigten außerdem eine der Positivkontrolle vergleichbare Proliferation (Abb. 19 c).

Ein positiver Einfluss der zusätzlichen Insertion des TLM in die SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel konnte nicht beobachtet werden. Die TLM tragenden HBV-Corepartikel zeigten zu geringeren Proteinkonzentrationen in der Titrationsreihe hin sogar eine schlechtere Stimulationseffizienz, gemessen durch die geringere IFN γ Produktion der transgenen CD8⁺ T-Zellen (Abb. 19 b).

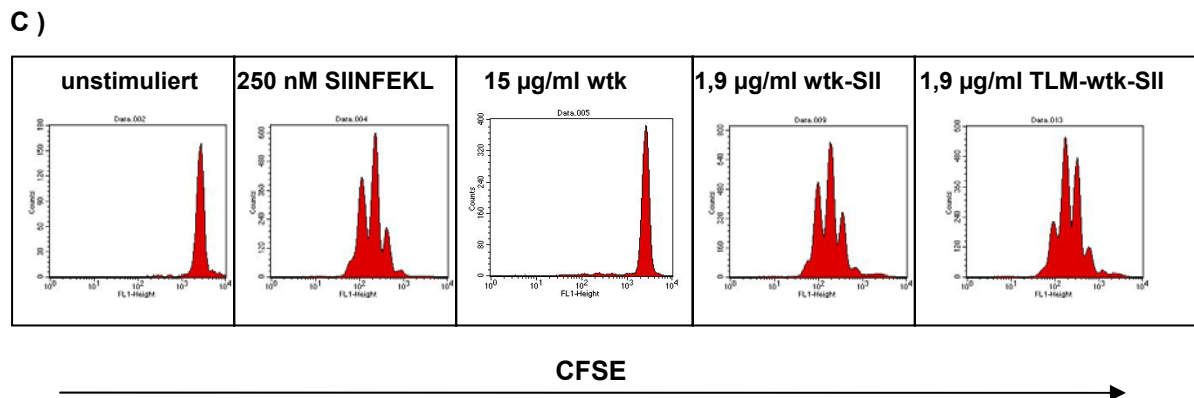
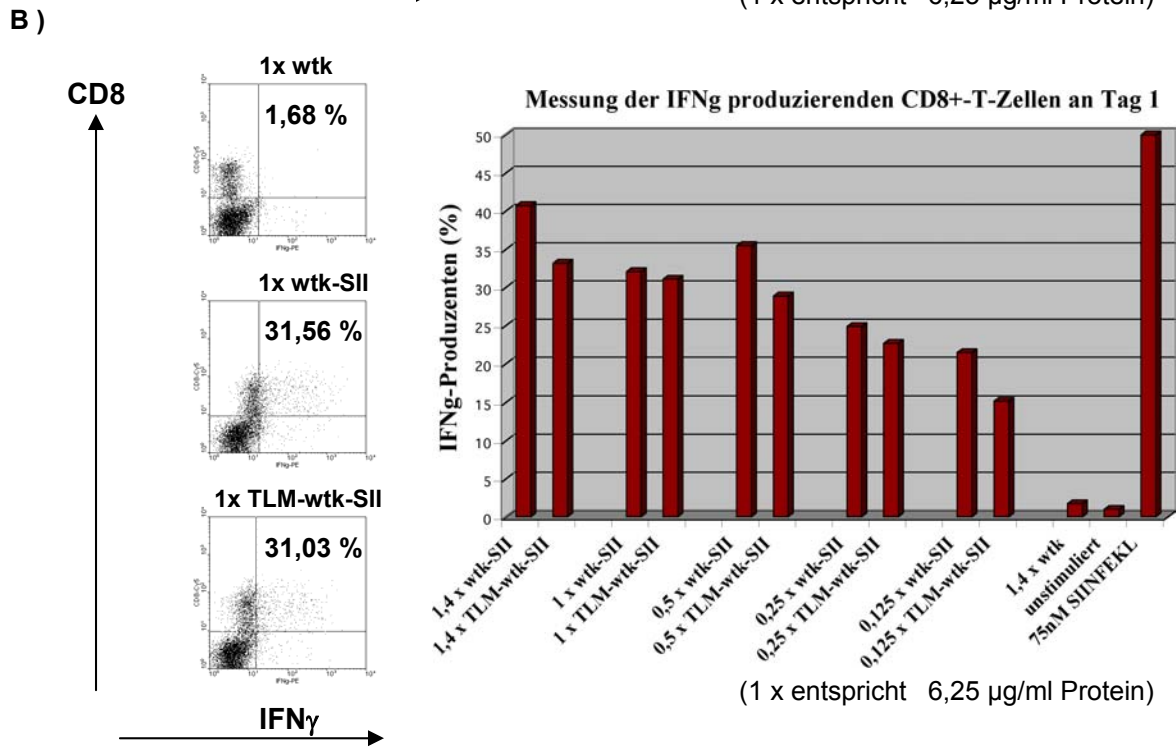
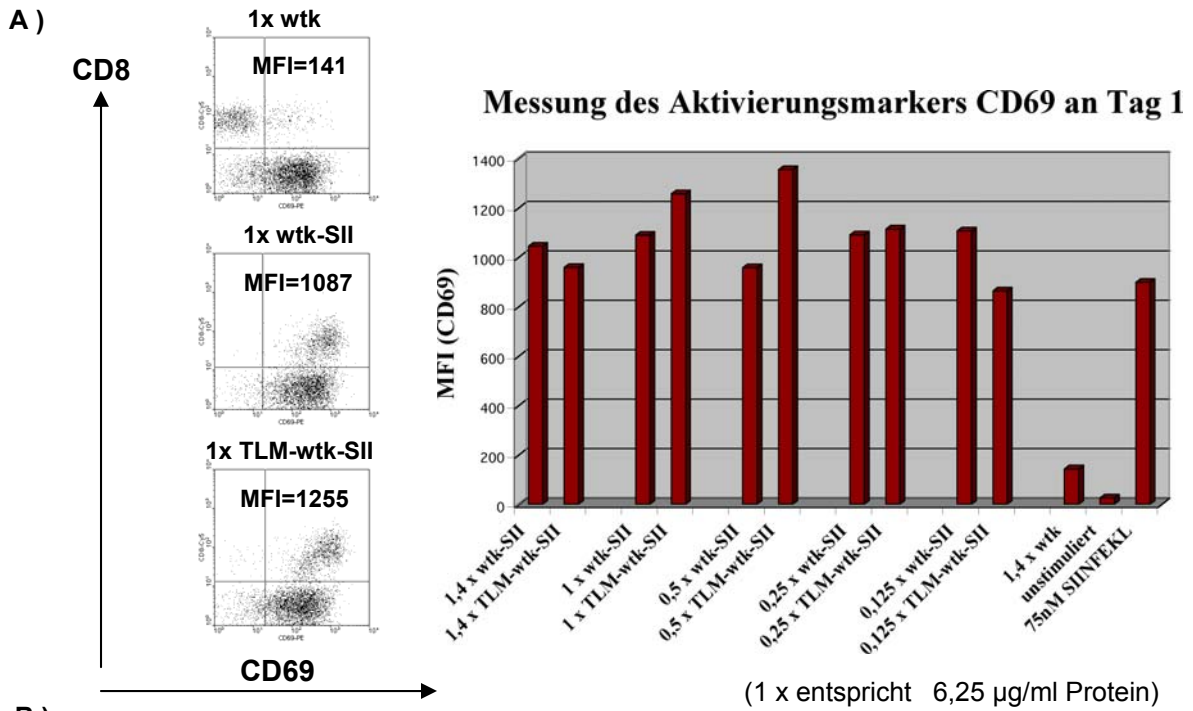


Abb. 19:**HBV-Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop aktivierten transgene CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen.****a und b:**

OT-1 Milzzellen wurden konzentrationsabhängig (0,75-17,5 µg/ml Protein) mit den verschiedenen HBV-Corepartikel-Spezies inkubiert. An Tag 1 nach Stimulationsbeginn wurden die transgenen CD8⁺ T-Zellen auf die Expression von CD69 und die Produktion von IFN_γ in der Durchflußzytometrie analysiert. Angegeben sind die mittlere Fluoreszenzintensität für die Expression von CD69 (a) sowie die spezifischen IFN_γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen in % (b). Die Konzentrationsabhängigkeit der T-Zellaktivierung von der eingesetzten Proteinmenge ist in den Balkendiagrammen zusammengefasst. Für eine mittlere Proteinmenge sind exemplarisch die Dotplot-Auftragungen dargestellt. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Transgene CD8⁺ T-Zellen aus den Ansätzen stimuliert mit wtk (HBV-Corepartikel ohne SIINFEKL-Epitop) zeigten eine geringe Expression von CD69 sowie minimale Produktion von IFN_γ. In den Kulturen, welche mit den SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikeln wtk-SII und TLM-wtk-SII inkubiert waren, wurde eine starke Expression von CD69 sowie eine von der Proteinmenge abhängige Produktion von IFN_γ bei den transgenen CD8⁺ T-Zellen an Tag 1 gemessen.

c:

OT-1 Milzzellen wurden nach Markierung mit CFSE mit den verschiedenen HBV-Corepartikel-Spezies inkubiert. An Tag 4 nach Stimulationsbeginn wurde die Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Durchflußzytometrie analysiert. Dargestellt sind im Histogramm die Muster der CFSE-Markierung der spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Transgene CD8⁺ T-Zellen aus dem Ansatz stimuliert mit 15 µg/ml wtk zeigten keine Proliferation. In den Kulturen, welche mit den SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikeln wtk-SII und TLM-wtk-SII inkubiert waren, konnte eine der Positivkontrolle (Stimulation mit 250 nM SIINFEKL-Peptid) vergleichbare Proliferation gemessen werden.

3.2.3.4 Zusammenfassung**rekombinante HBV-Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop**

Rekombinante HBV-Core-Monomerproteine, welche am verkürzten C-Terminus das SIINFEKL-Epitop trugen bzw. in welche zusätzlich zum SIINFEKL-Epitop N-terminal noch das TLM insertiert wurde, konnten in einem bakteriellen Expressionssystem produziert werden. Die daraus resultierenden Corepartikel konnten in guter Reinheit, allerdings nur in geringen Ausbeuten über eine native Reinigungsstrategie gewonnen werden. Alle Corepartikel-Spezies zeigten eine korrekte Assemblierung.

Nach Inkubation mit den SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikeln wurde eine sehr starke Aktivierung von transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen beobachtet. Die T-Zellen zeigten eine starke Expression des Aktivierungsmarkers CD69, starke Produktion von IFN_γ und gute Proliferation. Der Stimulationseffekt war abhängig von der eingesetzten Proteinmenge. Die zusätzliche Modifikation von SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikeln mit dem TLM zeigte keinen positiv verstärkenden Einfluss auf die Stimulationseffizienz.

3.2.4 Rekombinante Ovalbumin-Proteine

3.2.4.1 Herstellung von bakteriellen Expressionskonstrukten für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine

Rekombinante Ovalbumin-Proteine, welche die gesamte Ovalbumin-Sequenz umfassen, wurden als Vertreter für Proteinantigene untersucht. Der Einfluss der Insertion des TLM in die rekombinanten Ovalbumin-Proteine sollte charakterisiert werden.

Zum einen wurden Ovalbumin-Proteine produziert, welche am C-Terminus um einen HA-tag (YPYDVPDYAG) und am N-Terminus um einen (His)₆-tag verlängert waren (OVA-HA). Der HA-tag stellt ein aus dem Hemagglutininprotein von Influenza Virus stammendes Epitop dar. Gegen dieses Epitop war ein Antikörper im Labor vorhanden, so dass darüber eine Detektionsmöglichkeit der rekombinanten Proteine erfolgen konnte; zu Beginn der Experimente stand noch kein Antiserum gegen Ovalbumin direkt zur Verfügung. Der (His)₆-tag sollte eine affinitätschromatographische Reinigung der rekombinanten Proteine erlauben. Um den Einfluss des TLM zu charakterisieren, wurde für das zweite Konstrukt der rekombinanten Ovalbumin-Proteine nach dem (His)₆-tag das TLM insertiert (TLM-OVA-HA) (Abb. 20).



Abb. 20: Schematische Darstellung der rekombinanten Ovalbumin-Proteine

OVA-HA stellt das gesamte Ovalbumin-Protein dar, welches am N-Terminus um einen (His)₆-tag und am C-Terminus um den HA-tag verlängert ist. TLM-OVA-HA ist ein entsprechendes rekombinantes Ovalbumin-Protein, welches zusätzlich am N-Terminus durch die Insertion des TLM nach dem (His)₆-tag modifiziert ist.

Für die Herstellung der rekombinanten Ovalbumin-Proteine in *E.coli* wurde der Expressionsvektor peT15b (Novagen, USA) verwendet, der am N-Terminus einen (His)₆-tag an die Proteine anfügt. Ausgehend vom Plasmid pAC-neo-OVAI, welches die komplette kodierende Region für das Ovalbumin-Protein beinhaltet, wurden die Sequenzen für die beiden Ovalbumin-Proteine OVA-HA (Verwendung der Überhangoligonukleotide ovfw-NdeI und OVHAre-BamHI) sowie TLM-OVA-HA (Verwendung der Überhangoligonukleotide OVTLM-NdeI und OVHAre-BamHI) amplifiziert. Über die beiden entsprechenden Schnittstellen wurden die Amplifikate in den Vektor peT15b eingefügt. Die korrekten prokaryotischen Expressionsplasmide wurden durch Sequenzanalyse bestätigt.

3.2.4.2 Reinigungsstrategie für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine

Für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine wurde nach bakterieller Produktion eine native Reinigungsstrategie etabliert (siehe 6.2.8).

Als erster Reinigungsschritt wurde mit den Bakterienlysaten eine Affinitätschromatographie über Ni^{2+} -NTA-Säulchen durchgeführt. Dieser Schritte brachte eine sehr gute Anreicherung der rekombinanten Ovalbumin-Proteine, welche allerdings noch mit weiteren unspezifischen Proteinen verunreinigt waren. Deshalb wurden die das jeweilige gesuchte Protein enthaltenden Fraktionen für einen zweiten Reinigungsschritt über eine Anionenaustauschersäule (Takahashi et.al., 1995) gegeben. Dadurch konnten unspezifische Proteinverunreinigungen nahezu vollständig entfernt werden. Als Reinheitskontrolle wurden die jeweiligen Proteinfractionen nach Auftrennung über SDS-Page mittels Coomassie-Färbung analysiert.

Die erhaltenen Proteinmengen wurden über photometrische Messung bei 280 nm abgeschätzt. Als Ausbeuten wurden für OVA-HA ca. 3-5 mg und für TLM-OVA-HA ca. 2-3 mg je 11 Bakterien-Induktionskultur erhalten (Abb. 21).

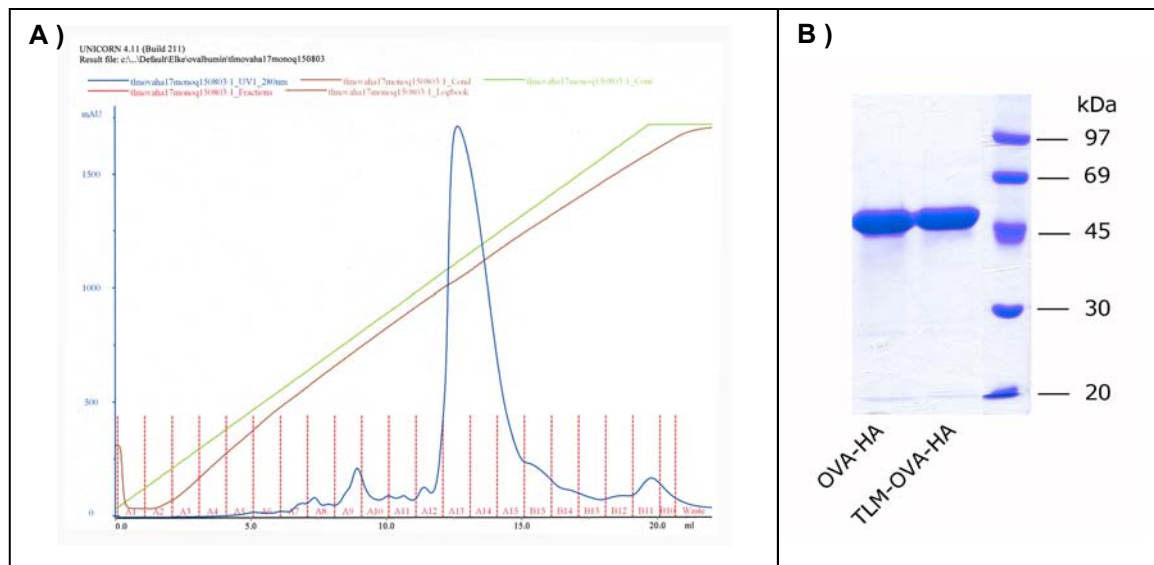


Abb. 21: Native Reinigungsstrategie der rekombinanten Ovalbumin-Proteine

Bakterienpellets aus Induktionskulturen für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine (37 °C, 1mM IPTG, 16 h) wurden mittels *french press* aufgeschlossen. Die Reinigung der Proteine erfolgte unter nativen Bedingungen über zwei Stufen, zuerst mittels Affinitätschromatographie über Ni^{2+} -NTA-Säulen und anschließend über Anionenaustauschchromatographie über eine MonoQ-Säule (siehe 6.2.8).

a: Dargestellt ist ein typisches Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie der rekombinanten Ovalbumin-Proteine, exemplarisch für das Protein TLM-OVA-HA. Auf der Ordinate ist die Absorption bei 280 nm (blau), der lineare Gradient von 10 mM bis 150 mM Natriumphosphatpuffer über 15 SV (grün) und die Änderung der Leitfähigkeit (braun) aufgezeichnet; auf der Abzisse sind die Elutionsfraktionen (je 1 ml) angegeben.

b: Die das jeweilige Protein enthaltenden Hauptfraktionen wurden vereinigt, gegen PBS dialysiert und nach Auftrennung über SDS-Page (12% Gel) mittels Coomassie-Färbung analysiert. Dargestellt ist exemplarisch die Analyse einer Proteincharge für OVA-HA bzw. TLM-OVA-HA, welche für die weiteren Versuche eingesetzt wurden.

3.2.4.3 Die Zellpermeabilität von TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der Frage, ob die Insertion des TLM in die rekombinanten Ovalbumin-Proteine ihnen Zellpermeabilität verleiht, wurden Zelllinien (EL-4, Hela, HepG2) zeit- und konzentrationsabhängig mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen inkubiert. Anschließend wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung bzw. nach Isolierung von Zytosol über Western Blot Analyse untersucht, ob die Proteine im Zytosol der Zellen nachweisbar sind (siehe 6.5.1).

Nach Inkubation von EL-4 Zellen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (16 h, 2 μ M Protein) und anschließender Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti HA-tag spezifischen Antikörper wurde bei Zellen, die mit OVA-HA inkubiert worden waren, eine deutliche membranassoziierte Färbung der Zellen detektiert. Der Zellkörper sowie der Zellkern zeigten keine spezifische Färbung. Bei Zellen, die mit TLM-OVA-HA inkubiert worden waren, konnte eine stärkere spezifische zytosolische Färbung beobachtet werden, wobei der Zellkern ausgespart blieb (Abb. 22). Dieser Befund zeigte, dass TLM-OVA-HA die Fähigkeit besitzt, in das Zytosol von EL-4 Zellen zu gelangen im Gegensatz zu OVA-HA.

Auf den unbehandelten Zellen zeigten die verschiedenen ausgetesteten HA-tag spezifischen Antikörper sehr viel Hintergrund in den Konzentrationen, welche für die Färbungen eingesetzt werden mussten, um die geringe, nach der Transduktion der zellpermeablen Ovalbumin-Proteine in den Zellen vorhandene, spezifische Proteinmenge noch detektieren zu können. Ein selbst generiertes polyklonales Antiserum gegen Ovalbumin (siehe 6.4.3 und 6.2.8.5) war zwar für Western Blot Analysen, allerdings nicht für die Immunfluoreszenzfärbung einsetzbar.

Nach Inkubation von Zelllinien mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen und anschließender Analyse der Proteine im Zytosol der Zellen mittels Western Blot konnten keine nachweisbaren Mengen im Zytosol detektiert werden, weder bei Verwendung von anti HA-tag spezifischen Antikörpern noch des polyklonalen Antiserums gegen Ovalbumin. Das Antiserum konnte in der eingesetzten Verdünnung (1:2000) in der Positivkontrolle (EL-4 Zelllysate, zu welchem rekombinantes OVA-HA zugesetzt worden war) noch 1-3 ng rekombinantes Ovalbumin in der Western Blot Analyse detektieren.

Die Immunfluoreszenzfärbung stellte für die Zellpermeabilitätsuntersuchungen eine sensitivere Methode dar als die Detektion der Proteine nach Zytosolbereitung mittels Western Blot Analyse. Die Immunfluoreszenzdaten (Abb. 22) zeigten allerdings deutlich, dass nach Transduktion der zellpermeablen Ovalbumin-Proteine nur sehr geringe Proteinmengen in den Zellen zu erwarten sind. Eine genaue Quantifizierung der transduzierten Proteinmenge ist nicht gelungen.

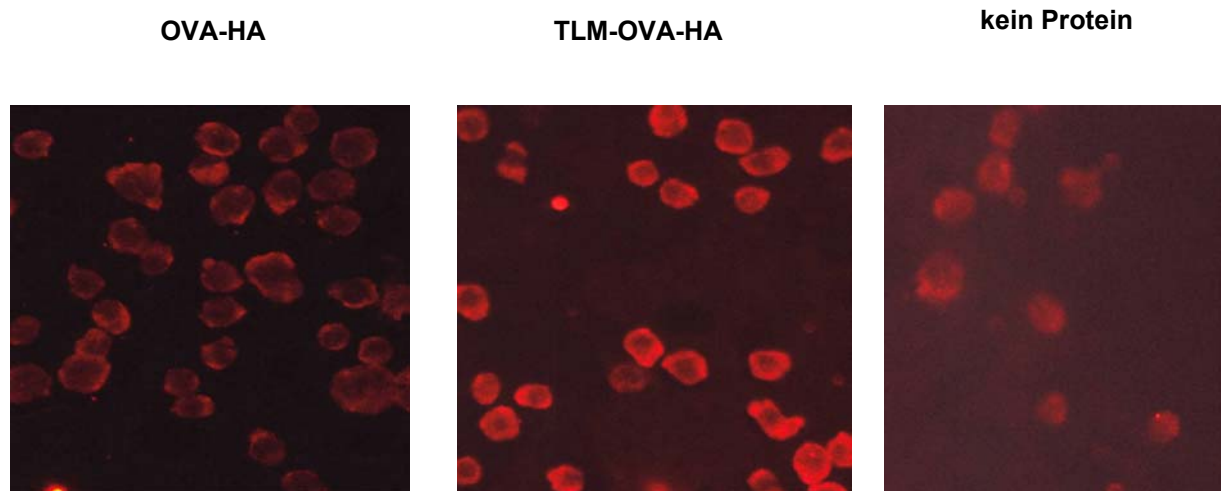


Abb. 22: TLM-OVA-HA zeigte Zellpermeabilität in EL-4 Zellen im Gegensatz zu OVA-HA.

EL-4 Zellen wurden mit 2 μM rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (OVA-HA und TLM-OVA-HA) bzw. ohne Protein inkubiert (16 h, 37 °C, serumarmes Medium). Nach dreimaligem Waschen mit PBS und nach Fixierung der Zellen mit 4% Formaldehydlösung in PBS (20 min, RT) wurden sie in der Immunfluoreszenzfärbung auf die rekombinanten Ovalbumin-Proteine analysiert. Als primärer Antikörper diente ein anti HA-tag spezifischer Antikörper (Roche, Mannheim), (Verdünnung 1:75, 2 h, RT). Als Zweitantikörper wurde Cy3-gekoppeltes Ziege anti Maus IgG eingesetzt, (Verdünnung 1:800, 1 h, lichtgeschützt, RT). Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop mit Photographiereinheit unter Verwendung der entsprechenden Filter ausgewertet (Vergrößerung 400 fach).

Nach Inkubation mit OVA-HA zeigten die EL-4 Zellen eine bevorzugte membranassoziierte Färbung. Bei EL-4 Zellen, die mit TLM-OVA-HA inkubiert worden waren, wurde eine zytosolische Färbung mit ausgespartem Zellkern nahezu aller Zellen beobachtet. Die unbehandelten Zellen zeigten in diesem Färbeprotokoll eine starke Hintergrundfärbung.

3.2.4.4 Nach Inkubation von OT-1 Milzzellen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen waren auf der Zelloberfläche von dendritischen Zellen SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe nachweisbar.

Um die Fragestellung zu untersuchen, ob die rekombinanten Ovalbumin-Proteine (mit und ohne TLM) unterschiedlich über den MHC-Klasse I-Weg präsentiert werden, wurden EL-4 und ANA-I Zellen konzentrations- und zeitabhängig mit den Proteinen inkubiert. Die Anwesenheit von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche wurde anschließend nach Färbung mit dem Antikörper 25.D1.16 in der Durchflußzytometrie analysiert. Nach Inkubation mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen konnten keine spezifischen Komplexe auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Eine Vorbehandlung der Zellen mit rm-IFN γ führte zum gleichen Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

Da nach Zugabe der rekombinanten Ovalbumin-Proteine in OT-1 Milzzellkulturen eine vom jeweiligen Protein abhängige Stimulation von transgenen CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden konnte (siehe Abb. 24), wurden die möglichen APCs in der Kultur (DCs, B-Zellen, Makrophagen) auf das Vorhandensein von SIINFEKL-H-2K^b-Komplexen auf ihrer Zelloberfläche nach Inkubation mit den verschiedenen Ovalbumin-Proteinen analysiert.

Alle APCs in OT-1 Milzzellkulturen, die für 24 bzw. 48 h mit SIINFEKL-Peptid (Positivkontrolle) inkubiert worden waren, zeigten konzentrationsabhängig SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe auf ihrer Zelloberfläche, wie es für eine exogene Beladung der MHC-I-Moleküle zu erwarten war. Nach Kultivierung von OT-1 Milzzellen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (1,25 μ M, 48 h) konnten auf der Zelloberfläche einer kleinen Population von DCs SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe nachgewiesen werden; B-Zellen und Makrophagen in diesen Kulturen zeigten keine messbaren Unterschiede zu Zellen aus unbehandelten Kulturen (Abb. 23).

Mit dem Antikörper 25.D1.16 konnte keine unterschiedliche Präsentation von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche von APCs in OT-1 Milzzellkulturen nach Inkubation mit den verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteinen nachgewiesen werden. Die Insertion des TLM in die Ovalbumin-Proteine zeigte keinen Einfluss.

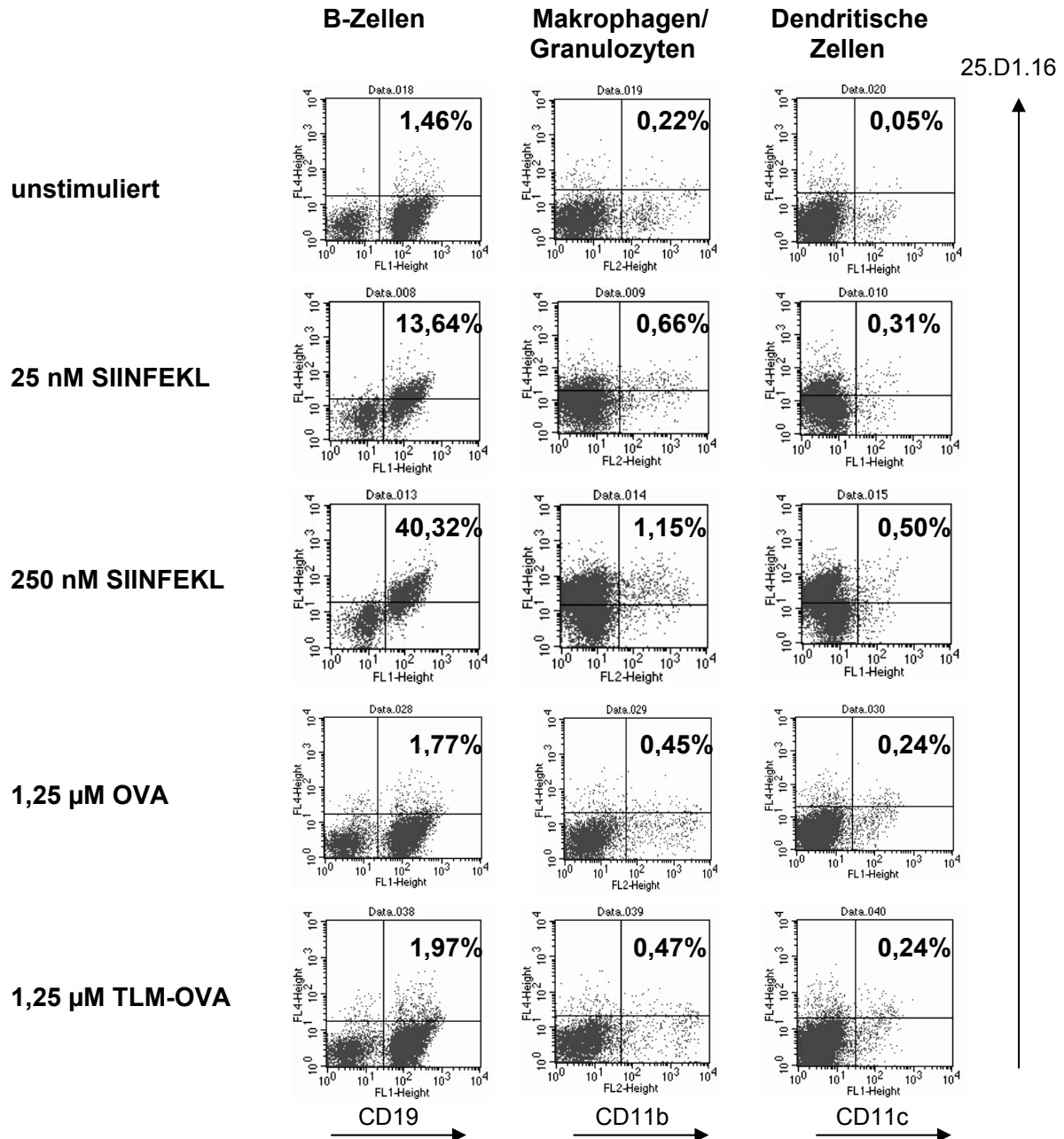


Abb. 23:

Nach Inkubation von OT-1 Milzzellen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen waren auf der Oberfläche von DCs SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe mit dem Antikörper 25.D1.16 nachweisbar.

OT-1 Milzzellen wurden mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (1,25 µM), mit SIINFEKL-Peptid (25 nM und 250 nM) bzw. unbehandelt kultiviert. Nach 48 h wurden die APCs in den Milzzellkulturen auf die Anwesenheit von SIINFEKL-H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche in der Durchflußzytometrie analysiert. Für die Charakterisierung der APCs wurden die Zellen auf zelltypische Markerproteine gefärbt (Färbung auf CD19 für B-Zellen, CD11b für Makrophagen/Granulozyten und CD11c für DCs). Zum Nachweis der SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe wurden die Zellen mit dem Digoxigenin-gekoppelten Antikörper 25.D1.16 und einem Cy5-konjugierten anti Digoxigenin Antikörper gefärbt. In der Dotplot Auftragung ist in der FL4 die Färbung für 25.D1.16 dargestellt und in der FL1 bzw. 2 die zelltypspezifische Charakterisierung. Der prozentuale Anteil aller Zellen im rechten oberen Quadranten ist angegeben.

Nach Inkubation mit SIINFEKL-Peptid zeigte sich bei allen APCs ein konzentrationsabhängiges Auftreten von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche. Bei den Zellen, die mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen inkubiert worden waren, konnten auf einer ähnlich großen Population der DCs spezifische Komplexe mit dem Antikörper 25.D1.16 nachgewiesen werden.

3.2.4.5 TLM-OVA-HA bewirkte im Vergleich zu OVA-HA *in vitro* eine verstärkte Aktivierung von transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen.

Für ihre funktionelle Charakterisierung sollten die rekombinanten Ovalbumin-Proteine auf ihre Effizienz hin untersucht werden, eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort *in vitro* zu induzieren; der Einfluss der Insertion des TLM in die rekombinanten Proteine auf ihre Stimulationsfähigkeit sollte ermittelt werden.

OT-1 Milzzellen wurden konzentrationsabhängig mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen inkubiert. In einer Zeitkinetik wurde die Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen in den Kulturen verglichen, indem ihre Expression des Aktivierungsmarkers CD69, ihre Produktion von IFN γ , sowie ihre Proliferation gemessen wurden.

Transgene CD8⁺ T-Zellen aus Kulturen, die unbehandelt belassen worden waren (Negativkontrolle), wiesen nur eine äußerst geringe Expression von CD69 und Produktion von IFN γ auf. Die Zellen zeigten über den gesamten Kultivierungszeitraum keine Proliferation (Abb. 24).

Transgene CD8⁺ T-Zellen aus Kulturen, die mit SIINFEKL-Peptid (25 nM bis 250 nM) stimuliert worden waren (Positivkontrolle), wiesen bereits nach 24 h eine sehr starke Expression von CD69 auf. Ein großer Anteil der Zellen produzierte bereits IFN γ . Das Maximum der Aktivierung und IFN γ Produktion war an Tag 3 nach Stimulationsbeginn erreicht; danach ging die Expression von CD69 und die IFN γ Produktion wieder zurück. An Tag 3 waren alle spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Kultur proliferiert (Abb. 24).

Im Vergleich zur Stimulation mit SIINFEKL-Peptid setzte die Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen in den mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen stimulierten Milzzellkulturen zeitverzögert erst an Tag 2 bis 3 ein. Nach Inkubation mit TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA zeigte sich eine verstärkte Expression von CD69 und eine bessere Produktion von IFN γ der transgenen CD8⁺ T-Zellen (Tag 2 und 3). Außerdem war ein größerer Anteil der spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Kulturen proliferiert (Tag 4). Der optimale Konzentrationsbereich, um die Effizienzen der verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteine vergleichend untersuchen zu können, lag in einem engen Intervall zwischen 0,3 – 1,5 μ M. Proteinkonzentrationen größer 2-3 μ M konnten die unterschiedlichen Effekte nicht mehr auflösen; Proteinkonzentrationen kleiner 0,3 μ M führten nur noch zu einer sehr schwachen Stimulation der transgenen CD8⁺ T-Zellen, unabhängig vom eingesetzten Protein (Abb. 24).

Um zu kontrollieren, dass das TLM *per se* nicht zu einer antigenunspezifischen Stimulation der transgenen CD8⁺ T-Zellen führte, wurde als Kontrollprotein TLM-eGFP eingesetzt. Nach Zugabe in OT-1 Milzzellkulturen in den Konzentrationen 0,5 μ M und 1 μ M führte TLM-eGFP weder zu einer Aktivierung noch zu einer Proliferation der transgenen CD8⁺ T-Zellen (Abb. 24 d.; Proliferation nicht gezeigt).

Als weitere Kontrolle, dass keine antigenunspezifische Stimulation der transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen auftrat, wurde zusätzlich ein Kultivierungsansatz mit einem irrelevanten H-2K^b bindenden Peptid (RGYVYQGL) inkubiert. In diesem Ansatz wurde ebenfalls keine Aktivierung und Proliferation der transgenen CD8⁺ T-Zellen beobachtet (Abb. 24 a und b; Proliferation nicht gezeigt).

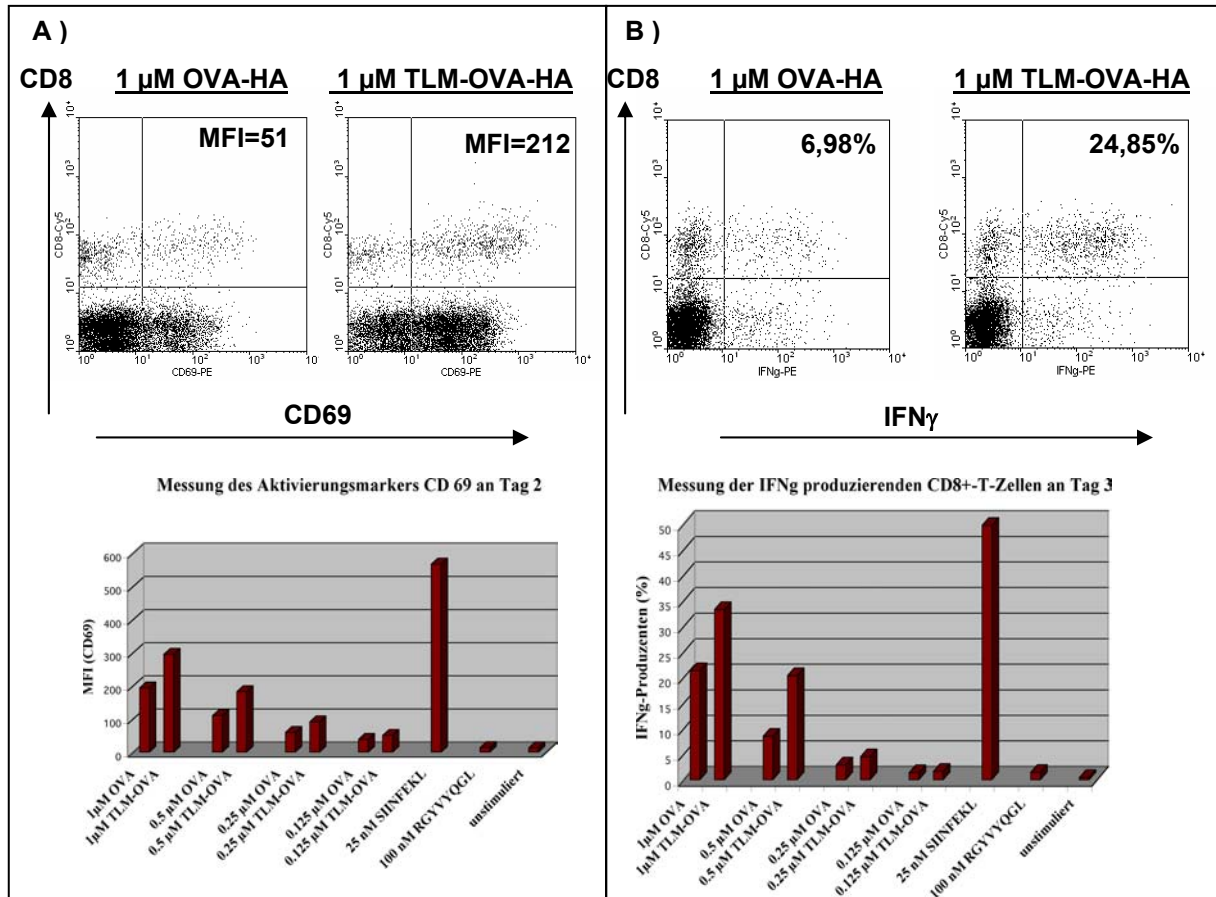
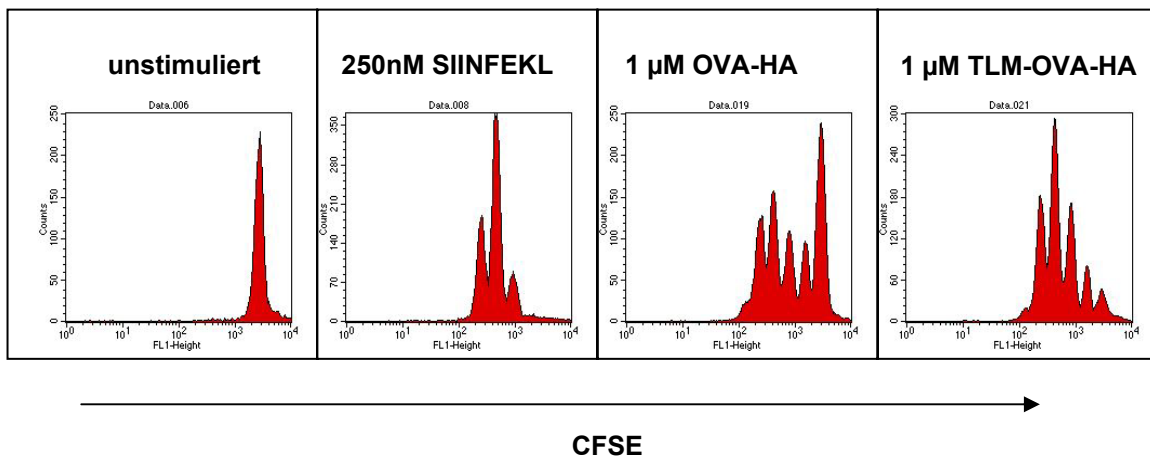


Abb. 24: TLM-OVA-HA bewirkte im Vergleich zu OVA-HA *in vitro* eine verstärkte Aktivierung von transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen.

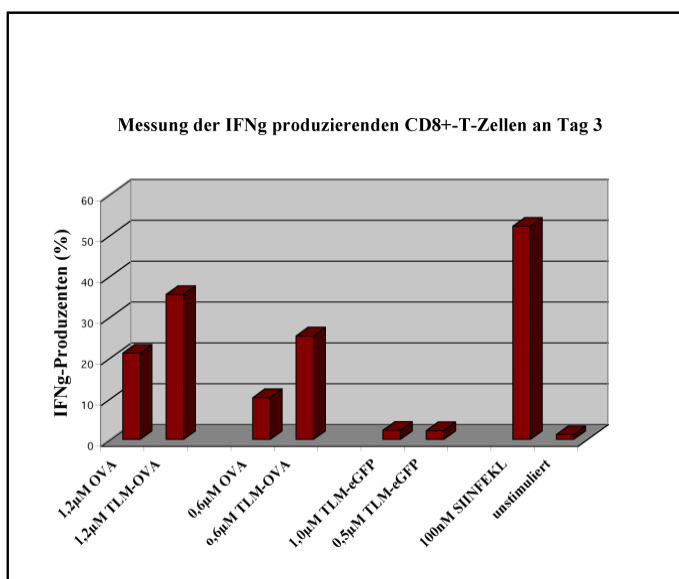
a und b: OT-1 Milzzellen wurden konzentrationsabhängig (0,125 – 1,25 μM) mit den verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, mit 25 nM SIINFEKL, mit 100 nM RGYVYQGL bzw. unbehandelt inkubiert. An Tag 2 bzw. 3 nach Stimulationsbeginn wurden die Expression des Aktivierungsmarkers CD69 (a) und die IFN_γ Produktion (b) der spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Durchflußzytometrie analysiert. In der Dotplot Auftragung sind die Färbung für CD8 und CD69 (a, oben) bzw. die Färbung für CD8 und IFN_γ (b, oben) dargestellt. Der gesamte Versuch ist in den Balkendiagrammen gezeigt. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten für die Expression von CD69 der transgenen CD8⁺ T-Zellen (a) und die spezifischen IFN_γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen in % (b) wurden ausgewertet. Zwei repräsentative Experimente (Originaldaten bzw. Zusammenstellung in den Balkendiagrammen) von 6 unabhängigen Experimenten sind dargestellt.

Fortsetzung Abb. 24:

Transgene CD8⁺ T-Zellen aus den unbehandelten Kulturen bzw. inkubiert mit 100 nM RGYVYQGL zeigten eine geringe Expression von CD69 sowie minimale Produktion von IFN γ . In den Kulturen, die mit 25 nM SIINFEKL-Peptid inkubiert worden waren, wurde eine starke Expression von CD69 sowie starke Produktion von IFN γ der transgenen CD8⁺ T-Zellen beobachtet. In den Kulturen, in welche die rekombinanten Ovalbumin-Proteine zugegeben worden waren, wurde eine von der eingesetzten Proteinmenge abhängige Expression von CD69 und IFN γ Produktion der transgenen CD8⁺ T-Zellen gemessen. TLM-OVA-HA führte zu einer stärkeren Stimulation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu OVA-HA.

C)

c: OT-1 Milzzellen wurden nach Markierung mit CFSE mit den verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (1 μM), mit 250 nM SIINFEKL bzw. unbehandelt inkubiert. An Tag 4 nach Stimulationsbeginn wurde die Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Durchflußzytometrie analysiert. In den Histogrammen sind die Muster der CFSE-Markierung der spezifischen CD8⁺ T-Zellen dargestellt. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Transgene CD8⁺ T-Zellen aus dem unbehandelten Kulturansatz zeigten keine Proliferation. In den Kulturen, die mit 250 nM SIINFEKL-Peptid stimuliert worden waren, proliferierten alle spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Nach Inkubation mit TLM-OVA-HA zeigte ein größerer Anteil der spezifischen CD8⁺ T-Zellen Proliferation im Vergleich nach Inkubation mit OVA-HA.

D)

d: OT-1 Milzzellen wurden mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (0,6 und 1,2 μM), mit rekombinantem TLM-eGFP (0,5 und 1 μM) sowie mit 100 nM SIINFEKL bzw. unbehandelt inkubiert. An Tag 3 nach Stimulationsbeginn wurde die IFN γ Produktion der transgenen CD8⁺ T-Zellen analysiert mittels Durchflußzytometrie. Die spezifischen IFN γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen in % wurden ausgewertet. Ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten ist dargestellt. Nach Inkubation mit TLM-eGFP zeigten die transgenen CD8⁺ T-Zellen an Tag 3 minimale Produktion von IFN γ .

3.2.4.6 Adoptives Transfermodell, um die Aktivierung von transgenen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* nach Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen zu untersuchen

Für die Fragestellung, wie effektiv die rekombinanten Ovalbumin-Proteine spezifische CD8⁺ T-Zellen *in vivo* stimulieren können, wurde ein adoptives Transfermodell eingesetzt. Der Einfluss der Insertion des TLM in die Ovalbumin-Proteine auf ihre Stimulationseffizienz sollte charakterisiert werden.

OT-1 Milzzellen wurden adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert (5×10^6 bis 1×10^7 transgene CD8⁺ T-Zellen je Maus, abhängig vom weiteren Versuchsaufbau). Für Proliferationsmessungen wurden die OT-1 Milzzellen vor dem adoptiven Transfer mit CFSE fluoreszent markiert. 18 h nach dem Zelltransfer wurden die Tiere mit den löslichen rekombinanten Ovalbumin-Proteinen konzentrationsabhängig, ohne Adjuvans, intraperitoneal immunisiert. In einer Zeitkinetik wurde die Aktivierung der transferierten transgenen CD8⁺ T-Zellen in der Milz analysiert, indem ihre Proliferation, ihre IFN γ Produktion und ihre zytotoxische Aktivität analysiert wurden (siehe 6.5.5).

3.2.4.6.1 Proliferation der transferierten CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell

Für die Proliferationsmessungen wurden OT-1 Milzzellen, nach Markierung mit CFSE, adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert (5×10^6 transgene CD8⁺ T-Zellen je Maus). 18 h nach Zelltransfer wurden die Tiere mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen konzentrationsabhängig (10-150 μ g), ohne Adjuvans, i.p. immunisiert.

Um den optimalen Zeitpunkt für die Proliferationsmessung in diesem *in vivo* System zu bestimmen, wurde nach 48 und 72 h die Proliferation der transferierten transgenen CD8⁺ T-Zellen in der Milz mittels Durchflußzytometrie analysiert.

48 h nach Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (150 μ g je Maus) war eine deutliche Proliferation der transferierten transgenen CD8⁺ T-Zellen zu beobachten; die proliferierende Zellpopulation war noch sehr gut von den endogenen Zellen abzugrenzen. 72 h nach Immunisierung waren die spezifischen CD8⁺ T-Zellen schon so stark proliferiert, so dass sie nicht mehr eindeutig von den endogenen Zellen zu unterscheiden waren (Daten nicht gezeigt). Für die Proliferationsanalyse im adoptiven Transfermodell wurde deshalb Tag 2 (48 - 54 h) nach Immunisierung als optimaler Zeitpunkt ausgewählt.

Transferierte transgene CD8⁺ T-Zellen zeigten in Tieren, die nicht immunisiert waren, nur eine minimale Proliferation (< 5% Anteil proliferierende Zellen) (Abb. 25 a und b). Möglicherweise lag hier eine antigenunabhängige Aktivierung der für den Transfer eingesetzten Milzzellen vor, bedingt durch die Isolierung der Zellen.

Die Proliferation der transferierten transgenen CD8⁺ T-Zellen in Tieren, welche mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen immunisiert worden waren, war abhängig von der eingesetzten Proteinmenge. Im Bereich von 50-150 µg Protein (je Maus, i.p.) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation der transferierten transgenen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit den verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (Daten nicht gezeigt). Bei Gabe von geringeren Dosen an Protein (deutlich bei 10 µg je Maus) wurde in Tieren, die mit TLM-OVA-HA immunisiert waren, ein größerer Anteil an proliferierenden spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz gemessen im Vergleich zu Tieren, die mit OVA-HA immunisiert waren; mittlere Proliferationsrate nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA 50,2% und mit OVA-HA 28,1% (Abb. 25 a und b)

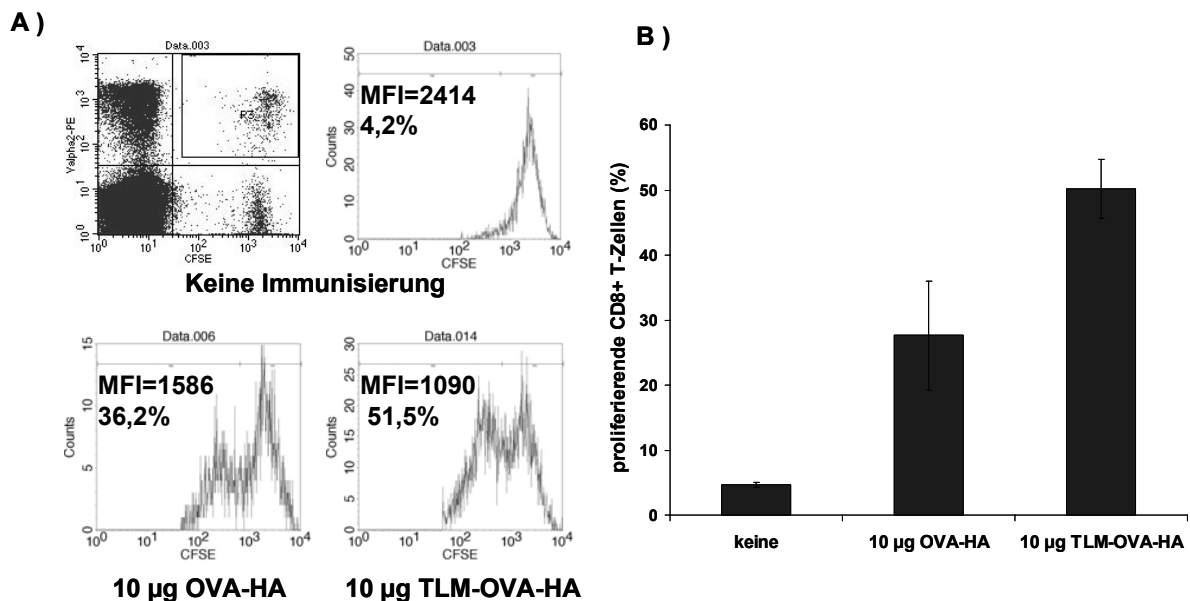


Abb. 25:

Die Immunisierung mit TLM-OVA-HA führte im Vergleich zu OVA-HA konzentrationsabhängig zu einer stärkeren Proliferation von transferierten CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell.

OT-1 Milzzellen wurden nach CFSE Markierung adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert (5×10^6 spezifische CD8⁺ T-Zellen je Maus). 18h nach Zelltransfer wurden die Tiere mit 10 µg rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, ohne Adjuvans, i.p. immunisiert. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt. 52 h nach Immunisierung wurde die Proliferation der transferierten CD8⁺ T-Zellen in der Milz mittels Durchflußzytometrie analysiert (siehe 6.5.5). (a) In der Dotplot Auftragung sind die Färbung für Vβ2 (FL2) sowie die CFSE-Markierung (FL1) der lebenden Milzzellen in den nicht immunisierten Tieren gezeigt. Die in der Region 3 gemessenen Vβ2⁺ und CFSE⁺ Zellen stellten die transferierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen dar. In den Histogramm Auswertungen sind für jeweils ein repräsentatives Tier die Muster der CFSE-Markierung für die Zellen in Region 3 ausgewertet. Der gesamte Versuchsausgang ist im Balkendiagramm zusammengefasst (b). Angegeben sind die mittlere Fluoreszenzintensität der CFSE-Markierung sowie der Anteil der proliferierenden spezifischen CD8⁺ T-Zellen in %. Ein repräsentatives Experiment von drei unabhängigen Experimenten ist gezeigt. Anzahl der immunisierten Tiere je Gruppe betrug in diesem Experiment n=6, in den beiden anderen Experimenten n=2. In der nicht immunisierten Kontrollgruppe wurden in jedem Experiment jeweils zwei Mäuse analysiert.

Transferierte CD8⁺ T-Zellen aus nicht immunisierten Tieren zeigten eine minimale Proliferation. In Tieren, die mit 10 µg TLM-OVA-HA im Vergleich zu 10 µg OVA-HA immunisiert worden waren, wurde eine stärkere Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen gemessen.

3.2.4.6.2 IFN γ Produktion der transferierten CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell

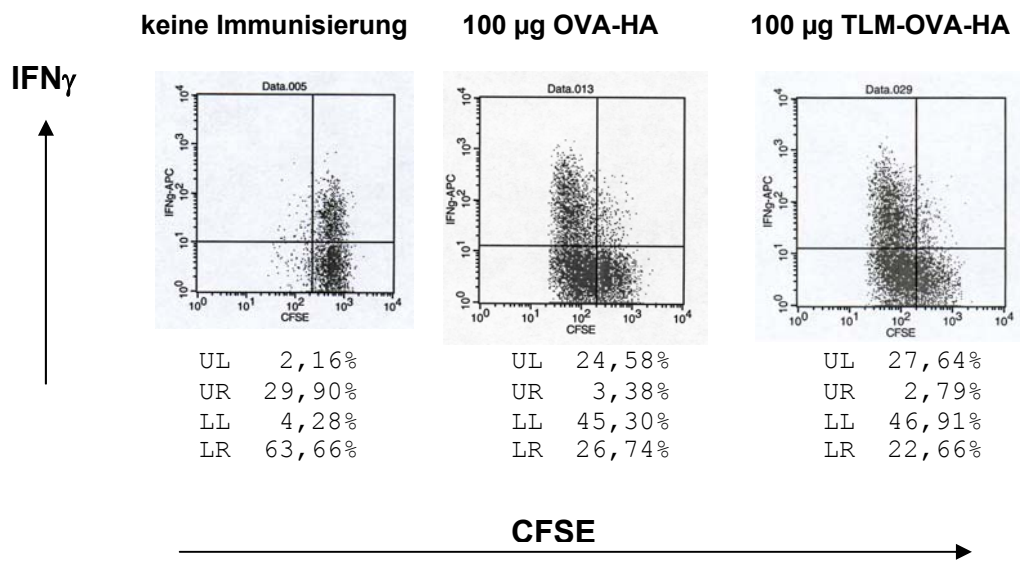
Zusätzlich zur Proliferation sollte die Funktionalität der aktivierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell charakterisiert werden. Dazu wurde als ein Parameter ihre IFN γ Produktion gemessen.

OT-1 Milzzellen wurden, nach Markierung mit CFSE, adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert (1×10^7 transgene CD8⁺ T-Zellen je Maus). Die Tiere wurden 18 h nach Zelltransfer konzentrationsabhängig (20 bis 100 μ g) mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, ohne Adjuvans, i.p. immunisiert. 50 h nach Immunisierung wurden die Milzzellen aus den Tieren isoliert und die IFN γ Produktion der spezifischen CD8⁺ T-Zellen analysiert (siehe 6.5.5).

Die spezifischen CD8⁺ T-Zellen, direkt aus den Milzen isoliert und ohne vorherige Peptidstimulation *in vitro*, zeigten erwartungsgemäß keine IFN γ Produktion (Daten nicht gezeigt).

Nach Inkubation der Milzzellen für 8 h *in vitro* mit 100 nM SIINFEKL-Peptid konnte eine IFN γ Produktion der proliferierenden spezifischen CD8⁺ T-Zellen beobachtet werden, die aus immunisierten Tieren gewonnen worden waren (Abb. 26). Die verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteine (mit und ohne TLM) zeigten in diesem experimentellen Ansatz keinen unterschiedlichen Effekt auf die IFN γ Produktion. Der Ansatz konnte nur qualitativ zeigen, dass die spezifischen CD8⁺ T-Zellen zusätzlich zur Proliferation auch IFN γ produzierten. Eine Restimulation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen *in vitro*, z.B. 9 bis 12 Tage nach *in vivo* Stimulation, hätte quantitative Aussagen über die IFN γ Produktion der nach der Aktivierung entstandenen Gedächtniszellen zugelassen; solche Versuche konnten im Rahmen der Arbeit nicht durchgeführt werden, da die notwendigen transgenen Mausmodelle und Antikörper zur Wiederfindung der transferierten CD8⁺ T-Zellen nicht zur Verfügung standen.

Transferierte CD8⁺ T-Zellen aus Tieren, die nicht immunisiert worden waren, zeigten nur geringe Proliferation (5-10%; siehe auch Proliferationsmessungen 3.2.4.6.1). Die Inkubation mit 100 nM SIINFEKL-Peptid *in vitro* für 8 h war ausreichend, die spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milzzellkultur zu stimulieren, so dass ca. 30% der Zellen danach IFN γ Produktion aufwiesen (Abb. 26). Dieser Befund zeigte den schnellen Aktivierungsprozess der transgenen CD8⁺ T-Zellen durch die Stimulation mit SIINFEKL-Peptid auf (siehe auch 3.2.1.2).

**Abb. 26:**

Spezifische CD8⁺ T-Zellen zeigten zusätzlich zur Proliferation Produktion von IFN γ nach Aktivierung mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen im adoptiven Transfermodell.

OT-1 Milzzellen wurden nach Markierung mit CFSE adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert (1×10^7 transgene CD8⁺ T-Zellen je Maus). 18 h nach Zelltransfer wurden die Tiere konzentrationsabhängig (20 – 100 μ g) mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, ohne Adjuvans, i.p. immunisiert; die Kontrolltiere blieben unbehandelt. 50 h nach Immunisierung wurden die Milzzellen aus den Tieren isoliert. Die Milzzellen wurden *in vitro* mit 100 nM SIINFEKL-Peptid für 2,5 h und dann für weitere 5 h unter zusätzlicher Zugabe von Brefeldin A kultiviert. Die Zellen wurden anschließend auf ihre IFN γ Produktion mittels Durchflußzytometrie analysiert. In der Dotplot Auftragung sind die CFSE-Färbung (FL1) und die IFN γ Produktion (FL4) der spezifischen CD8⁺ T-Zellen dargestellt (siehe auch Abb. 25). Angegeben ist die prozentuale Verteilung der Zellen in den jeweiligen Quadranten. Exemplarisch ist jeweils eine Messung nach Immunisierung mit 100 μ g rekombinanten Ovalbumin-Proteinen gezeigt. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment von zwei unabhängigen Experimenten.

Die proliferierenden spezifischen CD8⁺ T-Zellen aus Tieren, die mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen immunisiert worden waren, zeigten IFN γ Produktion. Zellen, die stärker proliferiert waren, zeigten stärkere IFN γ Produktion. Transferierte CD8⁺ T-Zellen aus nicht immunisierten Kontrolltieren zeigten nur minimale Proliferation. Die Inkubation mit SIINFEKL-Peptid *in vitro* für 8 h war ausreichend für ihre Aktivierung, so dass ca. 30% der Zellen IFN γ Produktion zeigte.

3.2.4.6.3 Zytotoxische Aktivität der transferierten CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell

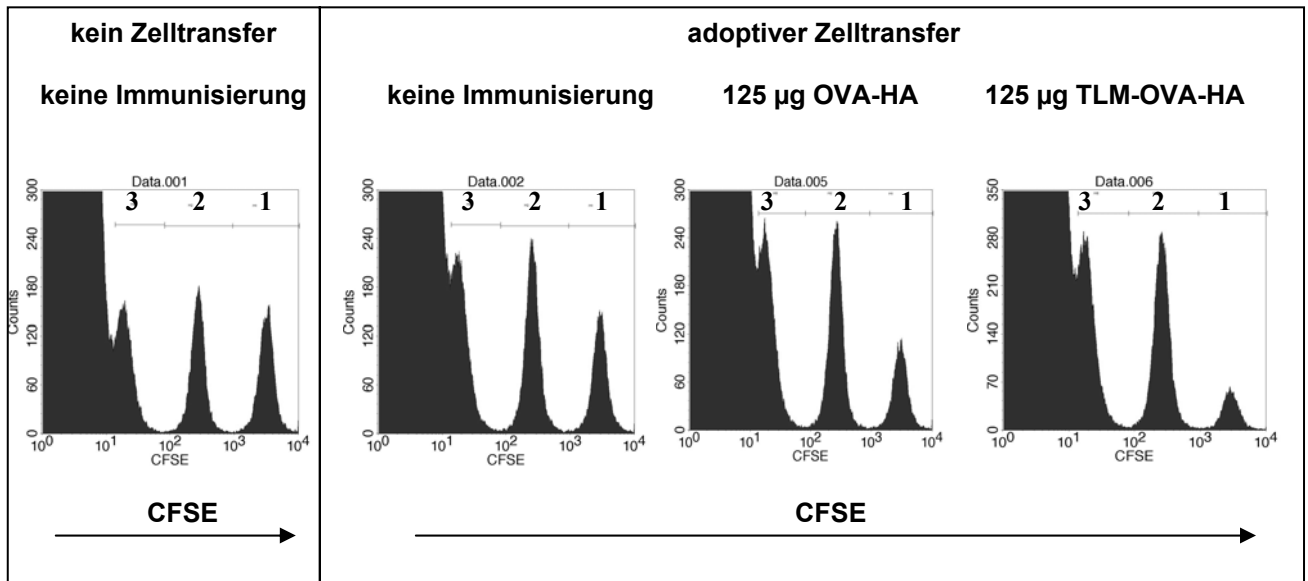
Als weiterer funktioneller Parameter sollte die zytotoxische Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell nach Aktivierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen analysiert werden.

OT-1 Milzzellen wurden adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert (5×10^6 transgene CD8⁺ T-Zellen je Maus). Die Tiere wurden 18 h nach dem Zelltransfer mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, 125 µg, ohne Adjuvans, i.p. immunisiert. Zur Messung der zytotoxischen Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen in den Mäusen wurde 7 Tage nach Immunisierung ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt (siehe 6.4.4.2).

In gänzlich unbehandelten Kontrolltieren, kein adoptiver Transfer von OT-1 Milzzellen sowie keine Immunisierung, wurde keine Lyse der spezifischen Zielzellen beobachtet. In Kontrolltieren, adoptiver Transfer von OT-1 Milzzellen aber keine Immunisierung, wurde eine spezifische Lyse der Zielzellen gemessen. Wodurch diese zytotoxische Aktivität in den Kontrolltieren bedingt war, konnte noch nicht genau geklärt werden.

In den Tieren, die mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen immunisiert worden waren, wurden höhere spezifische Lysen der Zielzellen als in den Kontrolltieren beobachtet. Die Immunisierung führte eindeutig zur Generierung von zytotoxischen spezifischen CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell. In Abb. 27 ist ein Experiment von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. In diesem Experiment wurde nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA eine stärkere zytolytische Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen gemessen (76,7% zu 50,4%; siehe Abb. 27). In den beiden anderen nicht dargestellten Experimenten wurde ebenfalls eine stärkere Lyse der Zielzellen in Mäusen nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA im Vergleich zur Immunisierung mit OVA-HA beobachtet. Allerdings fielen die absoluten Werte der zytotoxischen Aktivitäten, auch für die Kontrolltiere, in diesen Experimenten schwächer aus.

Als präliminäres Ergebnis lässt sich eine bessere Generierung von zytotoxischen spezifischen CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA im Vergleich zur Immunisierung mit OVA-HA festhalten. In Folgeexperimenten sollte die experimentelle Messung der zytotoxischen Aktivität optimiert werden; die Abhängigkeit der zytolytischen Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen von der für die Immunisierung eingesetzten Proteinmenge sollte ermittelt werden.



- 1 Zielzellen, markiert mit 5 μM CFSE, *gepulst* mit 10 μM SIINFEKL
- 2 Zielzellen, markiert mit 0,5 μM CFSE, *gepulst* mit 10 μM RGYVYQGL
- 3 Zielzellen, markiert mit 0,05 μM CFSE, *ungepulst*

Abb. 27: Spezifische CD8⁺ T-Zellen im adoptiven Transfermodell zeigten zytotoxische Aktivität nach Immunisierung mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen.

OT-1 Milzzellen wurden adoptiv in C57BL/6 Mäuse transferiert (5×10^6 transgene CD8⁺ T-Zellen je Maus). 18 h nach Zelltransfer wurden die Tiere mit 125 μg rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, ohne Adjuvans, i.p. immunisiert; die Kontrolltiere blieben unbehandelt. 7 Tage nach Immunisierung wurde zur Untersuchung der zytotoxischen Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen ein *in vivo* Zytotoxizitätstest (siehe 6.4.4.2) durchgeführt. Dazu wurden drei Populationen an Milzzellen vorbereitet; Population 1 wurde mit 5 μM CFSE markiert und mit 10 μM SIINFEKL *gepulst*, Population 2 wurde mit 0,5 μM CFSE markiert und mit 10 μM RGYVYQGL (irrelevantes H-2K^b-bindendes Kontrollpeptid) *gepulst*, Population 3 wurde mit 0,05 μM CFSE markiert und blieb unbehandelt. 1×10^7 Zellen je Population (d.h. 3×10^7 Gesamtzellen) wurden je Maus adoptiv transferiert. 16 h nach dem Zelltransfer wurden die Milzzellen aus den Mäusen isoliert und auf Wiederfindung der fluoreszent markierten transferierten Zellpopulationen in der Durchflußzytometrie analysiert. Im Histogramm sind die Muster der CFSE-Markierung der isolierten Milzzellen dargestellt. Gezeigt ist ein Experiment von drei unabhängigen Experimenten. In diesem Experiment wurden je immunisierte Tiergruppe 2 Mäuse, in den beiden anderen Experimenten 3 bzw. 4 Mäuse analysiert. Für die Kontrollgruppen wurden je 2 Tiere untersucht.

Im Kontrolltier, ohne adoptiven Transfer von OT-1 Milzzellen und ohne Immunisierung, wurde keine Lyse der spezifischen Zielzellen (Population 1) beobachtet. In den Kontrolltieren, in die OT-1 Milzzellen adoptiv transferiert und die nicht immunisiert worden waren, wurde eine spezifische Lyse der Zielzellen von 35,5% beobachtet. Nach Immunisierung mit OVA-HA wurde eine spezifische Lyse von 50,4% gemessen, nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA von 76,7%.

3.2.4.7 Untersuchung der rekombinanten Ovalbumin-Proteine auf ihre Effizienz, eine Antitumor-Antwort auszulösen

Für die weitere Charakterisierung, wie effizient die rekombinanten Ovalbumin-Proteine eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort *in vivo* auslösen können, wurde ein Tumormodell in der Maus eingesetzt. Der Einfluss der Insertion des TLM in die Ovalbumin-Proteine sollte analysiert werden.

Für die Untersuchungen im Tumormodell wurden C57BL/6 und OT-1 Mäuse einmalig mit 100 µg rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, mit CpG-ODN als Adjuvans, subcutan in die rechte Flanke immunisiert. Tiere der Kontrollgruppen blieben unbehandelt bzw. wurden nur mit dem Adjuvans immunisiert. Zwei Wochen nach Immunisierung wurden den Tieren 5x10⁵ EG7.OVA Zellen (Ovalbumin exprimierende T-Thymomzellen) subcutan in die gegenüberliegende Flanke appliziert. Das Auswachsen von Tumoren wurde über die folgenden 60 Tage beobachtet. Die Tumorgöße wurde durch Ausmessen der Länge, Breite und Höhe des Tumors ermittelt. Tiere, die einen Tumor größer 15mm x 15mm x 15mm entwickelt hatten, wurden abgetötet (siehe 6.5.6). Die Experimente im Tumormodell wurden freundlicherweise in Kooperation mit Dr. Thomas Kammertöns am Max Delbrück-Zentrum, Berlin durchgeführt.

In den Versuchsreihen, welche in C57BL/6 Mäusen durchgeführt wurden, wuchsen in der nicht immunisierten Kontrollgruppe bei allen Tieren bis auf ein Tier Tumoren aus (1 von 15 Tieren tumorfrei; kumulatives Ergebnis aus drei Versuchsreihen); worin das Ausbleiben des Tumorstwachstums in diesem Tier begründet lag, konnte nicht geklärt werden. In der Gruppe, welche nur mit CpG-ODN Adjuvans immunisiert worden war, entwickelten alle Tiere Tumoren (0 von 4 Tieren tumorfrei). Die Verabreichung von Adjuvans alleine bewirkte im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine leichte Verzögerung beim Auswachsen der Tumoren.

In den Tieren, welche mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen immunisiert worden waren, setzte das Tumorstwachstums vergleichbar mit den Tieren aus der Kontrollgruppe ein, welche nur mit Adjuvans behandelt worden war. Die einmalige Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen zeigte insgesamt nur eine geringe Antitumor-Wirkung. Nach Immunisierung mit OVA-HA blieben 2 von 14 Tieren und nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA 4 von 14 Tieren 60 Tage tumorfrei; eine leichte Wachstumsverzögerung der Tumoren wurde in den Tieren nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA beobachtet (kumulatives Ergebnis aus drei Versuchsreihen; siehe Tab. 4 a und Abb. 28 a).

In den Versuchsreihen, in welchen OT-1 Mäuse eingesetzt wurden, entwickelten alle Tiere in der nicht immunisierten Kontrollgruppe Tumoren (0 von 8 Tieren tumorfrei); im Vergleich dazu setzte das Tumorauswachsen in der Kontrollgruppe, welche nur mit Adjuvans immunisiert worden war, nicht zeitverzögert ein. In dieser Kontrollgruppe entwickelte 1 von 3 Tieren keinen Tumor; worin dieser Adjuvansseffekt in den transgenen Mäusen begründet lag,

konnte noch nicht genau geklärt werden. Die Auswertung dieser Kontrollgruppe ist aufgrund der kleinen Tierzahl (n=3) nur bedingt möglich und muss in Folgeexperimenten in größeren Tiergruppen wiederholt werden.

In den OT-1 Mäusen, welche mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen immunisiert worden waren, setzte das Tumorwachstum im Vergleich zu den Kontrollgruppen mit einer leichten Zeitverzögerung ein. Die Immunisierung mit OVA-HA bewirkte in diesen Mäusen keinen Antitumor-Effekt (0 von 8 Tieren tumorfrei). Im Gegensatz dazu führte die Behandlung mit TLM-OVA-HA zu einer zeitlichen Verzögerung im Auswachsen der Tumoren und zu einer Antitumor-Antwort (4 von 9 Tieren tumorfrei) (kumulatives Ergebnis aus 2 Versuchsreihen; siehe Tab. 4 b und Abb. 28 b).

Die Ergebnisse von maximal drei unabhängigen Experimenten sind in Tab. 4 kumulativ zusammengestellt. Für ein Experiment wurde das Tumorwachstum exemplarisch in der Darstellung der Überlebensrate der Tiere gegen die Zeit nach Applikation der Tumorzellen ausgewertet (Abb. 28).

Tab 4: Auswachsen von Tumoren nach einmaliger Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen im Tumormodell

A) C57BL/6 Mäuse

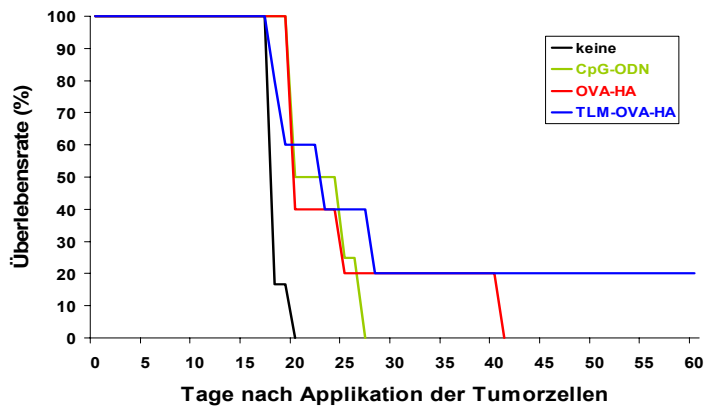
Immunisierung	Tumorfreie Tiere nach Applikation von EG7.OVA Zellen	
	an Tag 21	an Tag 60
keine	1 (15) ³	1 (15) ³
CpG-ODN	0 (4) ¹	0 (4) ¹
OVA-HA	4 (14) ³	2 (14) ³
TLM-OVA-HA	7 (14) ³	4 (14) ³

B) OT-1 Mäuse

Immunisierung	Tumorfreie Tiere nach Applikation von EG7.OVA Zellen	
	an Tag 21	an Tag 60
keine	0 (8) ¹	0 (8) ¹
CpG-ODN	1 (3) ¹	1 (3) ¹
OVA-HA	2 (8) ²	0 (8) ²
TLM-OVA-HA	6 (9) ²	4 (9) ²

(Die Exponenten geben die Anzahl der Experimente an, aus denen die Ergebnisse erhoben wurden.)

A) C57BL/6 Mäuse



B) OT-1 Mäuse

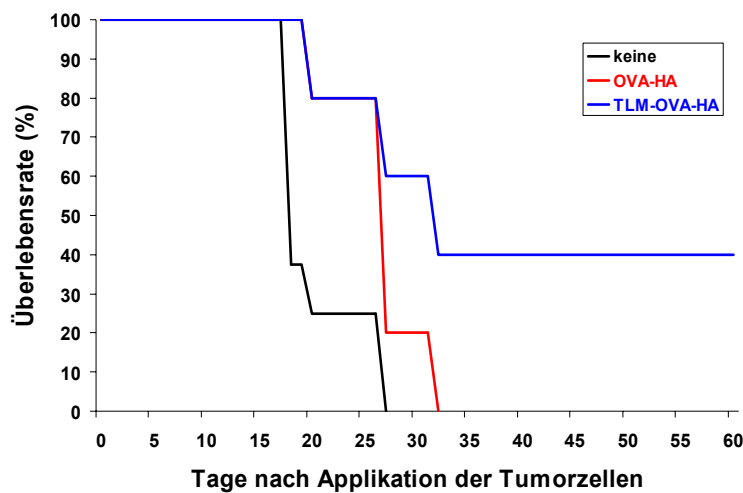


Abb. 28:

Auswachsen von Tumoren nach Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen im Tumormodell

Für die Untersuchungen im Tumormodell wurden C56BL/6 und OT-1 Mäuse einmalig mit jeweils 100 µg rekombinantem Ovalbumin-Protein, plus CpG-ODN als Adjuvans, subcutan in die rechte Flanke immunisiert. Die Kontrolltiere blieben unbehandelt bzw. wurden nur mit dem Adjuvans immunisiert. Zwei Wochen nach Immunisierung wurden den Tieren 5×10^5 EG7.OVA Zellen in 200 µl PBS je Maus, subcutan in die linke Flanke appliziert. Das Auswachsen von Tumoren in den Tieren wurde über 60 Tage verfolgt, wobei die Tumorgröße durch Ausmessen der Länge, Breite und Höhe des Tumors ermittelt wurde. Tiere, welche einen Tumor größer 15mmx15mmx15mm entwickelt hatten, wurden getötet (siehe 6.5.6). Für jeweils eine Versuchsreihe in C57BL/6 Mäusen (a) sowie in OT-1 Mäusen (b) sind die Überlebensraten der Tiere in % gegen die Zeit nach Applikation der Tumorzellen aufgetragen (Tierzahl in den immunisierten Gruppen n=5).

Die Immunisierung mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen zeigte in C57BL/6 Mäusen eine geringe Antitumor-Wirkung (a). In OT-1 Mäusen setzte das Tumorwachstum nach Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen etwas zeitverzögert zu der Kontrollgruppe ein. Die Behandlung mit OVA-HA zeigte keinen Antitumor-Effekt, TLM-OVA-HA bewirkte in fast der Hälfte der Tiere eine Antitumor-Antwort (b).

3.2.4.8 Zusammenfassung rekombinante Ovalbumin-Proteine

Prokaryotische Expressionskonstrukte für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine wurden generiert, zum einen für das gesamte Ovalbumin-Protein mit C-terminaler Verlängerung um den HA-tag (OVA-HA) bzw. das entsprechende Protein mit zusätzlicher N-terminaler Insertion des TLM (TLM-OVA-HA). Die rekombinanten Ovalbumin-Proteine konnten aus einem bakteriellen Expressionssystem in sehr guter Reinheit und Ausbeute gewonnen werden.

Die Zellpermeabilität von TLM-OVA-HA in Zelllinien im Gegensatz zu OVA-HA konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung beobachtet werden.

Transgene CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen zeigten nach Inkubation mit TLM-OVA-HA eine verbesserte Aktivierung im Vergleich zur Inkubation mit OVA-HA; die spezifischen CD8⁺ T-Zellen zeigten eine stärkere Expression des Aktivierungsmarkers CD69, eine stärkere Produktion von IFN γ und eine bessere Proliferation.

Transferierte transgene CD8⁺ T-Zellen wiesen in einem adoptiven Transfermodell eine stärkere Proliferation auf nach Immunisierung mit einer geringen Dosis an TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA. Die proliferierenden spezifischen CD8⁺ T-Zellen produzierten IFN γ . Des Weiteren zeigten die spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA eine stärkere zytolytische Aktivität von spezifischen Zielzellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest (präliminäres Ergebnis).

In einem Tumormodell führte die einmalige Immunisierung von C57BL/6 Mäusen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (mit CpG-ODN als Adjuvans) insgesamt zu einem schwachen Antitumor-Effekt. Die Insertion des TLM bewirkte ein leicht vermindertes Auswachsen von Tumoren. In OT-1 Mäusen entwickelten alle Tiere nach Immunisierung mit OVA-HA einen Tumor; nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA blieben fast die Hälfte der Tiere tumorfrei.

4 Diskussion

4.1 Das TLM als mögliches Vehikel zum Antigentransfer

Professionell antigenpräsentierende Zellen, z.B. dendritische Zellen, sind für die Induktion einer spezifischen zellulären Immunantwort verantwortlich. Obwohl DCs sehr effizient Antigene aufnehmen können, gestaltet sich insbesondere die gezielte Einschleusung von Antigenen für die Präsentation über den MHC-Klasse I-Weg schwierig, welche zur Induktion einer zytotoxischen Immunantwort, z.B. gegen Tumorzellen, erwünscht ist.

Die Transfektionseffizienz von DCs mit DNA/RNA, z.B. mittels Elektroporation oder Lipofektion, ist oft sehr gering. Virale Vektoren können gute Transduktionsraten erreichen, aber auch die Gefahr unerwünschter genomischer Rekombinationen in sich bergen.

Für die direkte Einbringung von Antigenen in das Zytosol von APCs kommen unter anderem die osmotische Lyse von Pinosomen (Moore et al., 1988), die Elektroporation (Chen et al., 1993), die Verwendung von ISCOMs (Heeg et al., 1991), von Virosomen (Bungener et al., 2002) und von verschiedenen Liposomenformeln (Nakanishi et al., 2000; Mandal und Lee, 2002) zum Einsatz. Des Weiteren werden Fusionsmoleküle mit Hitzeschockproteinen (Arnold-Schild et al., 1999), mit spezifischen Antikörpern (Regnault et al., 1999) oder mit bakteriellen Toxinen (Haicheur et al., 2003) verwendet. Methoden, wie Elektroporation, osmotische Lyse von Pinosomen und Verwendung von bakteriellen Toxinen können die Gefahr der Zellschädigung mit sich bringen. Die Herstellung von ISCOMs und von in Liposomenformeln verpackten Antigenen kann langwierig und in der Herstellung schlecht reproduzierbar sein.

Zellpermeable Moleküle stellen für einen Antigentransfer attraktive Kandidaten dar; sie können die an sie fusionierten bzw. assoziierten Antigene direkt in das Zytoplasma von APCs einschleusen und somit dem MHC-I-abhängigen Präsentationsweg zugänglich machen. Eine direkte Applikation von zellpermeablen Antigenen sowie der Einsatz von dendritischen Zellen, welche mit den Antigenen beladen waren, konnten *in vitro* und *in vivo* CD8⁺ T-Zellantworten erreichen (siehe 2.4.2).

Die in der PreS2-Domäne der viralen Oberflächenproteine des humanen Hepatitis B-Virus charakterisierte 12 AS lange, amphiphatische α -helikale Sequenz TLM weist die Eigenschaft der Zellpermeabilität auf (siehe 2.1.4). Das TLM gelangt in einem energie-, rezeptor- und temperaturunabhängigen Diffusionsprozess in das Zytoplasma von Zellen, ohne die Zellintegrität zu beeinflussen. Für Fusionspeptide und -proteine mit dem TLM konnte ebenfalls Zellpermeabilität gezeigt werden, wobei für das TLM bislang keine Größenbeschränkung des fusionierten *Cargo* für den Eintransport in Zellen gefunden wurde. Die Fusionsmoleküle zeigten keine bevorzugte subzelluläre Lokalisation. Ihre Funktionalität blieb nach dem Internalisierungsprozess in die Zellen vollständig erhalten. Nach Transduktion der zellpermeablen Moleküle wurde bislang keine zytotoxische Schädigung der Zellen beobachtet. Seine kleine Größe (12 AS mit ca. 1,29 kDa) und das Fehlen einer intrinsischen

Aktivatorfunktion stellen weitere Vorteile des TLM zum Einsatz für den Eintransport von Molekülen in Zellen und Geweben dar.

Das TLM leitet sich aus den Oberflächenproteinen des Hepatitis B-Virus ab und es handelt sich um eine potentiell immunogene Substanz. Bislang wurde allerdings keine Immunogenität des TLM beobachtet. Inwieweit das TLM Immunogenität besitzt und diese eine therapeutische Anwendung einschränken würde, ist noch nicht bekannt. Der bei einigen TLM-Fusionsmolekülen beobachtete schnelle Eintransport von Molekülen in das Zytoplasma von Zellen stellt einen großen Vorteil dar; die Umkehr des Transportprozesses, bei Änderung des Konzentrationsverhältnisses wieder aus den Zellen heraus, schränkt die Verwendung des TLM ein und muss bei der Versuchsplanung und experimentellen Durchführung berücksichtigt werden. Die bisher nicht beobachtete Spezifität des TLM für bestimmte Zelltypen bedeutet für viele Einsatzmöglichkeiten, z.B. Untersuchungen von Signaltransduktionswegen in Zelllinien, einen großen Vorteil. Allerdings könnte die fehlende Selektivität des TLM seine gezielte Applikation in bestimmte Zelltypen (z.B. APCs) und an einen bestimmten Wirkort für therapeutische Anwendungen limitieren.

Über die Möglichkeit, das TLM als Transportsystem für exogene Antigene in das Zytosol von APCs einzusetzen, auch im Vergleich zu anderen Zellpermeabilitätsmotiven, ist in der Literatur bislang nichts bekannt. In dieser Arbeit wurde das Potential des TLM für einen Antigentransfer in APCs erforscht; verschiedene mit dem TLM modifizierte Antigenespezies wurden auf ihre Fähigkeit hin charakterisiert, in das Zytoplasma von APCs zu transduzieren und nach der Internalisierung eine spezifische $CD8^+$ T-Zellantwort zu induzieren. Die Frage, ob sich die Zellpermeabilität mit einer verstärkten MHC-I-abhängigen Präsentation und gesteigerten Stimulationseffizienz der TLM-Fusionsantigene korrelieren lässt, sollte untersucht werden. Aufgrund der mangelnden Zell- und Gewebespezifität des TLM lag der Schwerpunkt letztlich nicht darauf, die Zellpermeabilität der Antigene in getrennten Zelltypen zu analysieren; vielmehr wurde untersucht, wie effizient die verschiedenen zellpermeablen Antigene die Auslösung einer spezifischen $CD8^+$ T-Zellantwort bewirken können im Zusammenspiel von verschiedenen Zellpopulationen sowohl in *in vitro* als auch in *in vivo* Systemen.

4.2 Reinigung der rekombinanten Antigenespezies

Bis auf die synthetisch hergestellten verlängerten SIINFEKL-Peptide wurden alle in der Arbeit eingesetzten Antigenespezies in bakteriellen Expressionssystemen rekombinant hergestellt und anschließend daraus gereinigt.

In der Literatur finden sich unterschiedliche Erfahrungswerte darüber, ob native bzw. denaturierte Proteine besser für die Ausübung der Zellpermeabilität geeignet sind (Schwarze und Dowdy, 2000). Aufgrund der unterschiedlichen Transduktionsmechanismen der verschiedenen Motive lassen sich die Ergebnisse allerdings nicht direkt aufeinander übertragen. Bei basischen Motiven, z.B. dem HIV-TAT-Motiv, welche nach neueren

Erkenntnissen bevorzugt durch Endozytose in die Zellen gelangen, ist eine verbesserte Assoziation mit der Zellmembran und Aufnahme in denaturierter Form, welche auch zur Aggregatbildung führen kann, durchaus vorstellbar. Für die Zellpermeabilität des TLM ist der genaue Mechanismus noch nicht geklärt. Allerdings ist die Aufrechterhaltung der amphiphatischen α -helikalen Struktur essentiell; ihre Zerstörung führt zum Verlust der Transduktionsfähigkeit in Zellen.

Unterschiedliche Beobachtungen wurden ebenfalls darüber gemacht, wie effektiv und über welche genauen Mechanismen die Prozessierung von denaturierten bzw. nativen Antigenen über den MHC-Klasse I-Weg in Zellen erfolgt (Schirmbeck et al., 1994; Michalek et al., 1996; Yewdell et al., 1999).

Für die Gewinnung der rekombinanten gesamten Proteine (eGFP- und Ovalbumin-Proteine) fiel die Entscheidung zur Etablierung von nativen Reinigungsstrategien, welche sehr reine Produkte in sehr guten Ausbeuten lieferten. Die strukturelle Integrität des TLM sollte in den Proteinen gewahrt bleiben. Bei den eGFP-Proteinen konnte durch die native Reinigung zusätzlich die intrinsische Fluoreszenzeigenschaft aufrechterhalten bleiben, welche unter denaturierenden Bedingungen in Mitleidenschaft gezogen wurde. Im Weiteren sollten für die physiologischen Untersuchungen keine denaturierenden Agenzien, auch nicht in Resten, in den Proteinpräparationen enthalten sein.

Eine native Reinigung der verschiedenen HBV-Corepartikel-Spezies war ebenfalls erstrebenswert, um die korrekt assemblierten Partikel nicht zu zerstören und beim De- und Reassemblierungsprozess keine Ausbeuteverluste hinnehmen zu müssen. Durch das gängige, in der Literatur beschriebene, dreistufige Verfahren über fraktionierende Fällung mit Ammoniumsulfat, Dialyse und Dichtegradientenzentrifugation, nach welchem die Partikel in 80-90% iger Reinheit in Ausbeuten bis zu 10 mg erhalten werden (Zlotnick et al., 1996), konnten nach Erfahrungen des Labors nur recht unreine Präparationen an HBV-Corepartikeln gewonnen werden. Stattdessen wurde eine alternative Isolierungsmethode der HBV-Corepartikel, welche mit einem *StrepII*-tag modifiziert waren, über einen Affinitäts- und Gelfiltrationschromatographieschritt eingesetzt (Stöckl, 2000). Die Reinheit der HBV-Corepartikel war sehr gut (> 90%); allerdings waren die Ausbeuten gering (0,5 – 2 mg). Nach Reinigung zeigten alle HBV-Corepartikel-Spezies in der Elektronenmikroskopie eine korrekte Assemblierung.

Bakteriell produzierte Proteine können als Verunreinigung Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin) enthalten. LPS stellt die Hauptkomponente in der äusseren Membran von gram-negativen Bakterien dar und kann verschiedene Zelltypen, z.B. APCs, stimulieren, inflammatorische Mediatoren auszuschütten (Hoshino et al., 1999). Auch T-Zellen können durch LPS stimuliert werden. Die durch LPS induzierte Antigen unabhängige T-Zellaktivierung in humanen T-Zellen ist nicht MHC restringiert und erfordert IL-12 (Mattern et al., 1998). In murinen T-Zellen konnte IL-15 die LPS induzierten Effekte ersetzen. Nur CD8⁺ CD44^{high} T-Zellen zeigten Proliferation als Antwort auf LPS (Tough et al., 1997; Zhang et al., 1998).

In Kokulturen von transgenen CD8⁺ T-Zellen aus OT-1 Mäusen mit SIINFEKL-Peptid *gepulsten* peritonealen Makrophagen führte die Zugabe von LPS zu einer gesteigerten IFN γ Produktion, allerdings zu einer schlechteren IL-2 Sekretion und Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Der Effekt von LPS wurde auch bei SIINFEKL-Konzentrationen beobachtet, welche ansonsten nicht mehr aktivierend wirkten. Die Stimulation der CD8⁺ T-Zellen war von der IL-12 Sekretion und CD14 Expression der APCs abhängig; höhere Konzentrationen an LPS konnten die IFN γ Produktion auch unabhängig von CD14 steigern (Moré et al., 2002).

Die mit dem TLM modifizierten rekombinanten Proteine und die jeweiligen Kontrollproteine wurden immer parallel gewonnen, d.h. paralleles Ansetzen der bakteriellen Induktionskulturen und Aufarbeitung der Bakterienlysate über die analogen chromatographischen Reinigungsschritte über dieselben Säulen. Eine mögliche Endotoxinverunreinigung in den Chargen der entsprechenden Proteine, mit und ohne TLM, sollte durch diese Reinigungsstrategie in ähnlichem Ausmaße gegeben sein; die dadurch vermittelten Effekte sollten bei den Untersuchungen gleichermaßen in die Ergebnisse eingegangen sein. Verschiedene Stimulationsversuche z.B. wurden mehrmals immer mit neu gereinigten Proteinchargen wiederholt, um Effekte auszuschließen, welche durch eventuelle Verunreinigungen der Proteine ausgelöst worden sein könnten. Auf die Bestimmung des Endotoxingehaltes der Proteinchargen (z.B. durch einen Limulustest) wurde deshalb verzichtet.

4.3 Zellpermeabilität von TLM-Fusionsproteinen

eGFP stellte aufgrund seiner intrinsischen Fluoreszenzaktivität ein attraktives Modellprotein für die Zellpermeabilitätsuntersuchungen dar. Für das eGFP-Fusionsprotein, welches N-terminal um einen (His)₆-tag und das TLM verlängert worden war (TLM-eGFP), konnte im Gegensatz zum eGFP-Protein, welches N-terminal nur einen (His)₆-tag trug (eGFP), Zellpermeabilität in humane Zelllinien, murine Knochenmarkzellen und Pflanzenzellen mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (Oess und Hildt, 2000). Das TLM kann somit die Eigenschaft der Zellpermeabilität auch innerhalb eines Moleküls ausüben; das direkte Anfügen an den N- bzw. C-Terminus der Fusionsmoleküle ist keine positionelle Voraussetzung für das TLM, sondern vielmehr muss seine strukturelle Integrität als amphipatische α -Helix sowie seine Zugänglichkeit und Exposition im Molekülkontext gewährleistet sein, wozu der (His)₆-tag wahrscheinlich durch seine strukturelle Eigenschaft noch unterstützend beiträgt. Für die rekombinanten Fusionsproteine zwischen dem TLM und Ovalbumin wurde ebenfalls die Insertion nach dem N-terminalen (His)₆-tag gewählt.

Diese Position hat sich auch bei Fusionsproteinen mit anderen Zellpermeabilitätsmotiven, z.B. dem TAT-Motiv, als vorteilhaft erwiesen. Dowdy et al. entwickelten Vektorsysteme, welche die Herstellung von Fusionsproteinen mit einem N-terminalen (His)₆-tag gefolgt von dem 11 AS langen TAT-Motiv mit flankierenden Glycinresten erlaubt (Nagahara et al., 1998). Über diese Vektorsysteme wurden unter anderem mit dem TAT-Motiv modifiziertes

eGFP (Caron et al., 2001), β -Galaktosidase (Schwarze et al., 1999) und Ovalbumin (Shibagaki et Udey, 2002) produziert und die Fusionsproteine erfolgreich für die Transduktion in Zellen eingesetzt.

Für die Charakterisierung der Zellpermeabilität der rekombinanten eGFP-Proteine in APCs wurden humane aus Monozyten generierte DCs eingesetzt. In der Durchflußzytometrie zeigten die lebenden DCs nach Inkubation mit TLM-eGFP im Vergleich zu eGFP zwar nur eine sehr geringfügig stärkere, aber gleichmäßige Färbung aller Zellen (siehe 3.1.2.2). Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die TLM-Fusionsproteine in einem schnellen Translokalisationsprozess (< 1h) nahezu alle Zellen erreichten. Die in dem Zytoplasma der Zellen zu erwartende Proteinmenge nach der Transduktion der zellpermeablen Proteine war allerdings sehr gering und konnte nicht genau quantifiziert werden. Ein ähnlicher Befund für die Zellpermeabilität zeigte sich auch für die Fusionsproteine aus TLM und Ovalbumin (TLM-OVA-HA), welche mittels Immunfluoreszenzfärbung in EL-4 Zellen nachgewiesen wurde (siehe 3.2.4.3).

Bei den Zellpermeabilitätsuntersuchungen wurde nach Inkubation der Zellen mit den rekombinanten Proteinen auf einen Proteaseverdau der Zellen verzichtet. Eine solche Behandlung wird zur Entfernung außen an der Zellmembran anhaftender Proteine empfohlen, um dadurch falsch positive Signale zu vermeiden. Aufgrund des reversiblen Diffusionsprozesses von TLM-Fusionsmolekülen bestand die Gefahr, die zellpermeablen Proteine durch eine nachträgliche Inkubation in einem proteolytischen Agenz wieder aus den Zellen zu verlieren. Für das TLM wurde, wahrscheinlich aufgrund seiner neutralen Ladung und neutralen Hydrophobizität, bislang keine unspezifische Wechselwirkung mit der Zellmembran beobachtet, was durch die Befunde in den Internalisierungsexperimenten mit N-terminal FITC-konjugiertem TLM in Zellen untermauert wurde (siehe 3.2.2.5). Eine Verfälschung der Ergebnisse aus den Zellpermeabilitätsversuchen sollte deshalb, auch ohne Proteaseverdau, nicht zu erwarten sein.

4.4. Stimulation von autologen T-Zellen durch humane dendritische Zellen nach Beladung mit rekombinanten eGFP-Proteinen

Der Nachweis der Translokation von TLM-eGFP im Gegensatz zu eGFP in aus humanen Monozyten generierte dendritische Zellen stellte ein wichtiges Ergebnis für den Einsatz von TLM-Fusionsproteinen für einen Antigentransfer dar. Die Frage, ob die Zellpermeabilität von TLM-eGFP in DCs auch mit einer gesteigerten Fähigkeit einhergeht, spezifische CD8⁺ T-Zellen zu stimulieren, wurde in Kooperation mit der Kieler Arbeitsgruppe in einem *in vitro* T-Zell-Stimulationsprotokoll untersucht. In diesem Testsystem konnten keine eGFP-spezifischen Effektorzellen generiert werden, weder in den Stimulationsansätzen mit TLM-eGFP *gepulsten* DCs noch mit eGFP *gepulsten* DCs (siehe 3.1.2).

Für das humane System sind aus der Sequenz für eGFP noch keine CD8⁺ und CD4⁺ T-Zell-Epitope charakterisiert worden. Nach dem Programm *SYFPEITHI* (Universität Tübingen), welches für eine Zielsequenz Vorhersagen von Epitopen für bestimmte MHC-Moleküle erlaubt, wurden mehrere mögliche Liganden aus eGFP für humane MHC-Moleküle mit hohen *Scores* gefunden; die Präsentation von eGFP über den humanen MHC-Klasse I-Weg ist somit denkbar. Die *Buffy coats*, welche aus der Blutbank Kiel für die Experimente zur Verfügung gestellt wurden, stammten von unbekanntem, nicht typisierten Spendern. Das jeweilige MHC-Repertoire dieser Spender und damit die Fähigkeit, eGFP-spezifische MHC-I-Komplexe zu präsentieren sowie auch die wahrscheinlich in diesem System unter der Nachweisgrenze liegende Vorläuferfrequenz an eGFP-spezifischen T-Zellen im Spendermaterial haben sicherlich den Ausgang der Experimente stark beeinflusst. Der negative Ausgang der Experimente könnte durchaus bedeuten, dass TLM-eGFP als zellpermeables Antigen nicht effektiv genug in DCs transduziert und/oder nicht ausreichend gut über den MHC-Klasse I-Weg präsentiert wurde, um eine Stimulation von spezifischen T-Zellen auszulösen. Allerdings könnten auch ungeeignetes Spendermaterial, der (Reifungs)zustand der DCs, sowie suboptimale Stimulations- und Wachstumsbedingungen der Zellen generell zum negativen Ergebnis geführt haben. Eine abschließende Ursache-Wirkung-Beziehung zwischen der Zellpermeabilität und der daraus resultierenden Induktion einer spezifischen CD8⁺ T-Zellantwort durch die rekombinanten eGFP-Proteine konnte letztlich durch das eingesetzte Protokoll, auch aufgrund von mangelnden Kontrollmöglichkeiten, nicht abgeleitet werden.

In dem Testsystem wurde nur mit primären Zellen gearbeitet, welche aus *Buffy coats* von unterschiedlichen Spendern stammten. Für die Verbesserung des humanen Systems wäre die Etablierung von Zelllinien, z.B. immortalisierte, eGFP exprimierende B-Zellen aus typisierten Spendern mit vorteilhaftem MHC-I Repertoire, eine mögliche Strategie gewesen; die Zelllinien hätten einen *Pool* von definierten, längerfristig und mengenmäßig besser verfügbaren Zellen bereitstellen können, welche in Kontrollansätzen für die T-Zell(re)stimulation und als Zielzellen hätten eingesetzt werden können. Die Etablierung eines murinen Systems (Balb/c Hintergrund) hätte eine Alternative zum humanen System für die Untersuchung der rekombinanten eGFP-Proteine darstellen können; ein H-2K^d-bindendes CD8⁺ T-Zellepitop aus dem eGFP-Protein wurde charakterisiert (Gambotto et al., 2000).

Kriterium für ein geeignetes funktionelles Untersuchungssystem war neben eindeutigen Negativ- bzw. Positivkontrollen ein quantifizierbarer Messbereich, um die Stärke der durch die Antigene ausgelösten CD8⁺ T-Zellantwort einordnen zu können. Die Untersuchung verschiedener Antigenespezies und die Aufstellung einer direkten Korrelation zwischen der Zellpermeabilität der Antigene und ihrer MHC-I-abhängigen Prozessierung wären wünschenswert. Bei einem positiven Ausgang der *in vitro* Experimente wäre die Übertragung in ein *in vivo* System erstrebenswert.

Der Ausbau des Modellsystems eGFP wurde letztlich nicht für geeignet erachtet, sondern aufgrund der vorhandenen, für die Fragestellung sinnvoll einsetzbaren Hilfsmittel (z.B. transgene Mäuse, der Antikörper 25.D1.16) wurde Ovalbumin als Modellsystem für die weiteren funktionellen Untersuchungen ausgewählt (siehe 2.5.2).

4.5 Einsatz von verlängerten SIINFEKL-Peptiden

Charakterisierte CD8⁺ T-Zellepitope kommen häufig bei Vakzinierungen zum Einsatz. Ein Vorteil von Peptiden ist ihre leichte Herstellung in großen Mengen und mit höchster Reinheit. Die spezifischen MHC-I-Epitope, z.B. aus viralen Proteinen oder Tumorantigenen, sind allerdings häufig nicht bekannt; ihre Identifizierung kann technisch aufwendig und langwierig sein. Durch den starken Polymorphismus der MHC-Moleküle müssen die eingesetzten Peptide außerdem für jeden Menschen individuell angepasst werden. Peptide sind in der Regel nur schwach immunogen. Um eine verbesserte Immunisierung mit Peptiden zu erreichen, ist es hilfreich, sie z.B. mit Trägerproteinen, in Liposomenformeln verpackt oder mit anderen zusätzlichen Adjuvantien zu verabreichen, was allerdings mit unerwünschten Nebenwirkungen, wie Entzündungsreaktionen, verbunden sein kann. In der Immuntherapie werden DCs *in vitro* auch mit Peptiden *gepulst* und dann in die Patienten zurückgeführt, ein schon mit Erfolg eingesetztes, aber auch aufwendiges Verfahren (Fong und Englemann, 2000; Brossart et al., 2001).

MHC-I-Epitope, welche mit zellpermeablen Molekülen fusioniert waren, konnten erfolgreich für die Auslösung einer zytotoxischen und/oder Antitumor-Antwort eingesetzt werden, was sie als attraktive Kandidaten in der Vakzinentwicklung auszeichnet (siehe 2.4.2). Die Möglichkeit, sie direkt, ohne ein notwendiges zusätzliches Adjuvans, erfolgreich applizieren zu können, würde für Immunisierungen einen sehr großen Fortschritt darstellen (Pietersz et al., 2001).

4.5.1 Modifikation des SIINFEKL-Peptids mit dem TLM

Der Einfluss des TLM auf die Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort im Kontext eines MHC-Klasse I-Epitops sollte am Beispiel des SIINFEKL-Peptids (OVA₂₅₇₋₂₆₄) charakterisiert werden. Beim strukturellen Aufbau der modifizierten SIINFEKL-Peptide spielten sowohl Überlegungen zur Gewährleistung der Zellpermeabilität der Fusionspeptide als auch zur korrekten proteolytischen Spaltung und Freisetzung der Epitope aus den Fusionspeptiden eine wichtige Rolle.

Die direkte N- bzw. C-terminale Verlängerung von Epitopen mit einem Zellpermeabilitätsmotiv ohne zusätzliche *Linker* Sequenz wurde für die Transduktion und Prozessierung von zellpermeablen Fusionspeptiden in Zellen erfolgreich eingesetzt (Pietersz et al., 2001; Wang und Wang, 2002). Für das SIINFEKL-Epitop wurde die Modifikation mit dem TLM ohne zwischengeschalteten *Spacer* nicht für sinnvoll erachtet. Die Sequenz für das TLM (PLSSIFSRIGDP) besitzt an den äußeren Positionen jeweils einen Prolinrest, nach welchem eine (proteosomale) Spaltung in der Regel nicht stattfindet (Yaron et Naider, 1993; Vanhoof et al., 1995; Analyse über das Programm *PAProC*, Universität Tübingen). Als *Linker* wurde deshalb zwischen dem N-terminalen TLM und dem C-terminalen SIINFEKL-Epitop die Sequenz MARL eingefügt. In Prozessierungsstudien viraler HBV-Epitope konnte damit eine gute Spaltbarkeit erzielt werden (persönliche Information von Chisari F.). Nach Abgleich

über das Programm *PAProC* (Universität Tübingen) sollte das SIINFEKL-Epitop gut nach dieser *Linker* Sequenz aus den verlängerten Peptiden proteosomal freigesetzt werden können.

4.5.2 Exogener Beladungseffekt von H-2K^b-Komplexen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden

Das Auftreten von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche von lebenden und insbesondere von fixierten EL-4 Zellen nach Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden, unabhängig von der Funktionalität des Zellpermeabilitätsmotives, warf die interessante Vermutung auf, dass die verlängerten Peptide zu einer exogenen Beladung der MHC-I-Komplexe geführt haben könnten, ohne vorherige endogene Prozessierung (siehe 3.2.2.2 und 3.2.2.3).

Eine Verunreinigung der verlängerten SIINFEKL-Peptide mit „freiem“ SIINFEKL wäre für das Zustandekommen der exogenen Beladung denkbar. Weiter wäre die extrazelluläre Spaltung der verlängerten Peptide (z.B. durch Serumproteasen im Medium oder durch membranständige Proteasen) vorstellbar, so dass dann extrazellulär freigesetztes SIINFEKL exogen auf H-2K^b-Komplexe hätte geladen werden können. Aufgrund der mangelnden technischen Möglichkeiten konnte der Überstand von Zellen nach Inkubation mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden nicht mittels *reversed phase*-HPLC (rp-HPLC) und Massenspektroskopie auf mögliche extrazelluläre Spaltprozesse der verlängerten SIINFEKL-Peptide analysiert werden. Die Beladung der MHC-I-Komplexe mit SIINFEKL-Peptid, welches nach extrazellulärer Spaltung aus den verlängerten Peptiden freigesetzt worden war, ist deshalb nicht auszuschließen.

Die verlängerten SIINFEKL-Peptide wurden nach der Synthese vom Hersteller über präparative rp-HPLC gereinigt und dann in der Massenspektroskopie vermessen; in den Präparationen war kein „freies“ SIINFEKL nachweisbar. Für die Inkubation von Zellen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden wurde serumfreies Medium eingesetzt, um eine extrazelluläre Spaltung der Peptide möglichst gering zu halten. Bei fixierten Zellen hätte eine Spaltung der verlängerten Peptide durch membranständige Proteasen nicht mehr stattfinden sollen. Die Befunde mit fixierten Zellen und die gewählten experimentellen Bedingungen deuteten eher auf eine exogene Beladung der H-2K^b-Komplexe direkt mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden hin.

Unklar bleibt, ob der Antikörper 25.D1.16 H-2K^b-Komplexe nach einer direkten Einlagerung der verlängerten SIINFEKL-Peptide erkennen konnte oder ob doch SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe vorgelegen haben müssen. Für den Antikörper wurde beschrieben, dass er H-2K^b-Komplexe, die mit irrelevanten H-2^b-bindenden Peptiden bzw. mit an bestimmten Aminosäurepositionen mutierten SIINFEKL-Peptiden beladen waren, nicht mehr erkennen konnte. Über die Verwendung von verlängerten SIINFEKL-Sequenzen und die damit verbundene Spezifität des Antikörpers liegen keine Informationen vor (Porgador et al., 1997).

Bei der Untersuchung von funktionellen Effekten zellpermeabler Antigene auf Peptidbasis wurden meistens als Kontrollen „freie“ Epitope oder zellpermeable irrelevante Epitope eingesetzt; die Verwendung von Epitopen, welche mit den jeweils nicht mehr funktionellen Zellpermeabilitätsmotiven versehen waren, ist meines Wissens in der Literatur nicht beschrieben. Es ist denkbar, dass Effekte, welche mit zellpermeablen Epitopen beobachtet wurden, durchaus auch eine Beteiligung von möglichen exogenen Beladungseffekten widerspiegeln könnten. Ein Kontrolleptid z.B. bei welchem das SIINFEKL-Epitop N-terminal um 16 AS aus der endogenen Ovalbumin-Sequenz verlängert war, konnte zu einer Stimulation von spezifischen T-Zellhybridomen führen, welche deutlich über der Negativkontrolle lag, allerdings schwächer als für die jeweiligen zellpermeablen Epitope ausfiel (Pieterz et al., 2001).

Die Bindung von Peptiden mit einer Länge von 8 bis 10 AS auf MHC-I-Molekülen gilt nicht mehr als striktes Dogma. Sowohl auf humanen (Frumento et al., 1993; Urban et al., 1994; Chen et al., 1994), als auch auf murinen MHC-I-Molekülen (Horig et al., 1999; Stryhn et al., 2000) wurde die Bindung von längeren Peptidliganden beobachtet. Die längeren Peptidliganden zeigten teilweise eine schlechtere Bindungsaffinität. Als Mechanismus der Assoziation wurden neben dem „Ausbauchen“ der Furche des MHC-I-Moleküls, auch das Hinausragen der Peptidenden aus der Furche beschrieben (Horig et al., 1999; Stryhn et al., 2000). In welchem Ausmaße längere Peptidliganden auf MHC-I-Molekülen unter physiologischen Bedingungen auftreten und welche funktionellen Aufgaben sie ausüben könnten, ist noch sehr wenig erforscht; denkbar wäre, dass längere Peptidliganden die Stabilität und Spezifität für die beladenen MHC-I-Moleküle und damit auch die Wechselwirkung von APCs mit T-Zellen beeinflussen könnten (Stryhn et al., 2000). Somit könnten sie unter bestimmten physiologischen Bedingungen die Induktion einer Immunantwort gezielt steuern.

4.5.3 Charakterisierung der Assoziation der verlängerten SIINFEKL-Peptide an H-2K^b-Komplexe

Zur Klärung der eigentlichen Fragestellung, welchen Einfluss das TLM auf die MHC-I-abhängige Prozessierung und die Fähigkeit der TLM-Fusionspeptide ausübt, eine spezifische CD8⁺ T-Zellantwort auszulösen, konnten die verlängerten SIINFEKL-Peptide nicht eingesetzt werden; die Entwicklung eines experimentellen Ansatzes, welcher die Analyse der endogenen MHC-I-abhängigen Prozessierung der verlängerten SIINFEKL-Peptide getrennt vom unerwünschten exogenen Beladungseffekt erlaubte, war äußerst schwierig und ist nicht gelungen (siehe 3.2.2.4. bis 3.2.2.6).

Als Ausblick wäre allerdings interessant, das Phänomen (Artefakt?) der exogenen Beladung von MHC-I-Komplexen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden weiter zu untersuchen und aufzuklären.

Redoxlabile fluoreszente Peptide könnten dafür sinnvoll zum Einsatz kommen; das fluoreszent markierte Zellpermeabilitätsmotiv müsste in den Peptiden über eine Disulfidbrücke mit dem MHC-I-Epitop verbunden sein. Könnten die fluoreszenten Peptide direkt von außen an die MHC-I-Moleküle binden, wären beladene fluoreszente Komplexe nachweisbar. Im Gegensatz dazu sollte bei einer endogenen Prozessierung aufgrund des intrazellulären reduzierenden Milieus das fluoreszent markierte Zellpermeabilitätsmotiv vom Epitop abgespalten werden und somit keine fluoreszenten Peptid-MHC-I-Komplexe auf der Zelloberfläche zu finden sein.

Die Identifizierung von Peptidliganden wäre nach Isolierung von Peptid beladenen MHC-I-Molekülen und der anschließenden Elution und Analyse der gebundenen Peptidliganden über rp-HPLC und Massenspektroskopie vorstellbar; allerdings ist diese Vorgehensweise sehr aufwendig und bedarf einer großen technischen Ausrüstung.

Für Analysen über die Struktur der Bindung, Bindungsstärke und Bindungskinetik der verlängerten Peptide könnten weitere modifizierte SIINFEKL-Peptide hilfreich sein, z.B. zusätzlich zum N-Terminus auch am C-Terminus verlängerte Peptide, des Weiteren verlängerte Peptide mit Aminosäureaustauschen im SIINFEKL-Epitop, welche die Bindung von SIINFEKL an H-2K^b-Moleküle bekanntermaßen aufheben können sowie verlängerte Peptide mit anderen H-2K^b-bindenden Epitopen, Zellpermeabilitätsmotiven und *Linkern*.

Für die Vakzinentwicklung könnten Kenntnisse darüber sehr hilfreich sein, unter welchen Bedingungen längere natürliche Peptidliganden zusätzlich zu den kürzeren an MHC-I-Moleküle binden können und welche strukturellen und vor allem funktionellen Eigenschaften sie besitzen, z.B. eine möglicherweise veränderte Modulation der Immunantwort.

4.6 Einsatz von rekombinanten Hepatitis B-Virus abgeleiteten Corepartikeln als Träger für das SIINFEKL-Epitop

Virale Kapside können sich aus den isolierten monomeren Komponenten nach Produktion in pro- und eukaryotischen Expressionssystemen auch in Abwesenheit weiterer viraler Proteine zusammenlagern. Durch die Modifikation der Kapsid aufbauenden Monomere mit antigenspezifischen Sequenzen können nach Assemblierung Kapside entstehen, welche die Antigene in großer Dichte auf der Oberfläche zeigen, was sie für die Vakzinentwicklung zu attraktiven Kandidaten macht. Das Risiko der Erzeugung von replikationskompetenten Viren durch die Abwesenheit von viraler RNA/DNA ist ausgeschlossen, wodurch sich die Sicherheit sehr erhöht. Durch ihre virale Herkunft und partikuläre Struktur sind virale Kapside häufig selbst sehr immunogen und benötigen bei der Immunisierung keine zusätzlichen Adjuvantien. Allerdings muss beachtet werden, dass die starke intrinsische Immunogenität auch unerwünschte Reaktionen gegen das virale Protein selbst hervorrufen und die Immunogenität gegen die eingeführten Fremdsequenzen überlagern kann. Mit viralen

Kapsiden als Antigenträger konnten erfolgreich B-Zell-, T-Helferzell- und zytotoxische T-Zellantworten ausgelöst werden.

Durch Verwendung von Kapsiden, z.B. abgeleitet vom porcinen Parvovirus (Sedlik et al., 1997), vom Ty Virus (Allsopp et al., 1996) und vom humanen Hepatitis B-Virus (DeVal et al., 1991; Storni et al., 2002), welche mit CD8⁺ T-Zellepitopen modifiziert waren, konnte eine Stimulation von CD8⁺ T-Zellantworten erreicht werden. Für die MHC-I-abhängige Prozessierung der viralen Kapside als exogene Antigene wird der Mechanismus der Kreuzpräsentation über DCs als maßgebliche APCs angenommen, wobei die genauen Schritte für die unterschiedlichen Kapside noch nicht bis ins Detail verstanden sind (Lenz et al., 2001; Morón et al., 2002; Ruedl et al., 2002; Morón et al., 2003).

Strategien, virale Kapside über den Mechanismus der Zellpermeabilität direkt in das Zytosol von Zellen einzuschleusen, sind meines Wissens nur für HBV-Corepartikel beschrieben. Gratton et al. untersuchten den Einfluss von zellpermeablen Peptiden für den Eintritt von kompletten Viren; nach Vorinkubation von rekombinanten Adenoviren mit den aus dem Antennapedia-Homeoboxprotein bzw. aus dem HIV-TAT-Protein abgeleiteten Zellpermeabilitätsmotiven konnte eine verstärkte Virusaufnahme in Zellen *in vitro* sowie *in vivo* gezeigt werden (Gratton et al., 2003). Dieser Ansatz wäre auch für die Übertragung auf virale Kapside denkbar.

Für bakteriell hergestellte HBV-Corepartikel, welche aus mit dem TLM modifizierten Core-Monomerproteinen assembliert waren, konnte im Gegensatz zu Corepartikeln ohne TLM Zellpermeabilität in Hepatomzelllinien nachgewiesen werden (Stöckl, 2002; Brandenburg, 2004). Über die Eigenschaft der Zellpermeabilität könnten Antigene tragende HBV-Corepartikel direkt in das Zytoplasma von APCs eingeschleust und gezielt dem MHC-I-abhängigen Prozessierungsweg zugänglich gemacht werden; dadurch wäre möglicherweise eine effizientere Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort im Vergleich zur Kreuzpräsentation zu erreichen.

4.6.1 Struktureller Aufbau der rekombinanten HBV-Corepartikel als Träger für das SIINFEKL-Epitop

Im Rahmen der Arbeit sollte die Anwendung von rekombinanten HBV-Corepartikeln, welche für die Einbringung von Fremdsequenzen mit zu den flexibelsten Systemen zählen (siehe 2.4.3), als partikuläre Träger für das SIINFEKL-Epitop untersucht werden. Für den strukturellen Aufbau der rekombinanten HBV-Corepartikel wurden Überlegungen für die Herstellung der Corepartikel, für die Gewährleistung ihrer Zellpermeabilität sowie für die proteolytische Prozessierung der eingebrachten Fremdsequenz berücksichtigt.

Zur Ausübung seiner Funktionalität sollte das TLM auf der Oberfläche der HBV-Corepartikel gut exponiert sein. Für rekombinante HBV-Corepartikel, welche durch Assemblierung von C-terminal verkürzten und N-terminal um den *StrepII-tag*, einen 14 AS langen *Spacer* aus der *Precore*-Sequenz und das TLM verlängerten Core-Monomerproteinen aufgebaut waren, wurde Zellpermeabilität in Hepatomzelllinien beobachtet im Gegensatz zu den Partikeln ohne

TLM (Stöckl, 2002). Die Modifikation der Epitop tragenden HBV-Corepartikel mit dem TLM wurde analog gewählt.

Durch Insertion von Antigensequenzen an den kompletten C-Terminus der HBV-Core-Monomerproteine, im Gegensatz zum N-Terminus bzw. zum *spike tip*, konnten CD8⁺ T-Zellantworten erreicht werden (Del Val et al., 1991; Ulrich et al., 1998; Pumpens und Grens, 2001; Storni et al., 2002).

Im bakteriellen Expressionssystem führte allerdings die Produktion von C-terminal verkürzten HBV-Core-Monomerproteinen, bei welchen Bereiche der C-terminalen Argininreichen Region deletiert wurden, zu deutlich besseren Ausbeuten unter Beibehaltung der korrekten Assemblierung der Corepartikel im Vergleich zur Verwendung von Proteinen der gesamten Länge; der *Codon usage* der C-terminalen Argininreichen Sequenz ist für die Transkription in *E.coli*. äußerst ungünstig (Übersicht Pumpens und Grens, 2001). Diese Beobachtung konnte durch Erfahrungen des Labors bei der bakteriellen Produktion von HBV-Corepartikeln bestätigt werden (Stöckl, 2002).

Unter Berücksichtigung der immunmodulatorischen Befunde und der Erfahrungen bei der bakteriellen Produktion der HBV-Corepartikel wurde bei den Epitop tragenden HBV-Corepartikeln der verkürzte C-Terminus (einschließlich AS 149) des Core-Monomerproteins für die Insertion des SIINFEKL-Epitops gewählt. Auf das Einbringen einer zwischengeschalteten *Linker* Sequenz wurde verzichtet, da nach Vorhersagen über das Programm *PAProC* (Universität Tübingen) nach der endogenen verkürzten Sequenz des Core-Monomerproteins eine proteosomale Prozessierung und Freisetzung des SIINFEKL-Epitops gegeben sein sollte. Außerdem wurde im Bereich von AS 141-149 des HBV-Core-Monomerproteins ein intrinsisches CTL-Epitop charakterisiert, welches sich ebenfalls positiv auf die Prozessierung auswirken könnte (Übersicht Pumpens und Grens, 2001).

4.6.2 Stimulation von transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen durch die rekombinanten SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel

Die beiden rekombinanten HBV-Corepartikel-Spezies als Träger für das SIINFEKL-Epitop (mit und ohne TLM) erwiesen sich als sehr gute Stimulatoren von transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen (siehe 3.2.3.3).

Die Insertion des SIINFEKL-Epitops an den verkürzten C-Terminus (bis AS 149) des HBV-Core-Monomerproteins ohne zwischengeschaltete *Linker*sequenz hat sich für die effiziente MHC-I-abhängige Präsentation des CD8⁺ T-Zellepitops als geeignete Position herausgestellt. Dieser Befund bedeutet für die Generierung von rekombinanten HBV-Corepartikeln als Epitop- bzw. Antigenträger ein wichtiges Ergebnis; die Verwendung von C-terminal verkürzten Core-Monomerproteinen könnte eine vorteilhafte Alternative darstellen, modifizierte Partikel in höheren Ausbeuten aus pro- und eukaryotischen Expressionssystemen unter Beibehaltung ihrer korrekten Assemblierung gewinnen zu können.

Die starke und schnelle Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen in OT-1 Milzzellkulturen durch die SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel machte die effektive Prozessierung der Partikel als exogene Antigene über den MHC-Klasse I-Weg mittels Kreuzpräsentation deutlich. Die zusätzliche Insertion des TLM in die HBV-Corepartikel zeigte keinen positiv verstärkenden Einfluss auf die Stimulation. Zu kleineren Konzentrationen hin wurde sogar ein etwas schlechterer Effekt durch die TLM modifizierten HBV-Corepartikel beobachtet im Gegensatz zu den Corepartikeln ohne TLM.

Die durch die Kreuzpräsentation bedingte, starke immunmodulatorische Wirkung der SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel *per se* überdeckte möglicherweise bei höheren Konzentrationen (bis 4µg/ml, 0,1 nM) Effekte, welche zusätzlich durch das TLM ausgelöst, aber nicht mehr aufgelöst werden konnten. Bei niedrigeren Konzentrationen könnte die mögliche Zellpermeabilität der TLM tragenden HBV-Corepartikel, welche im Rahmen der Arbeit noch nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte, aufgrund der mangelnden Selektivität des TLM zu ihrer Ausverdünnung in alle OT-1 Milzzellen der Kultur geführt haben, auch in solche Zellen, in welchen ihre Prozessierung nicht stattfinden konnte.

Aufgrund der bakteriellen Produktion der rekombinanten HBV-Corepartikel ist vom Einschluß bakterieller Nukleinsäuren in die Partikel auszugehen, welche auch nach der Reinigung noch in ihnen enthalten blieben (Wingfield et al., 1995). Der zusätzliche Adjuvanseffekt durch die eingeschlossenen Nukleinsäuren führte wahrscheinlich noch zu einer Verstärkung der immunmodulatorischen Wirkung der rekombinanten HBV-Corepartikel selbst. Mögliche positiv verstärkende Effekte durch die Modifikation mit dem TLM könnten dann noch schwerer aufzulösen gewesen sein.

Da die rekombinanten HBV-Corepartikel im Rahmen der Arbeit ein Nebenprojekt darstellten, wurde ihre funktionelle Charakterisierung noch nicht weitergeführt. Sie bietet allerdings noch interessante Aspekte.

Die zusätzliche Einbringung von Bindungssequenzen für Oberflächenrezeptoren von DCs z.B. könnte die TLM tragenden HBV-Corepartikel direkt an deren Zelloberfläche konzentrieren; damit wäre die bevorzugte Transduktion der Partikel in DCs denkbar, was der fehlenden Spezifität des TLM und der Ausverdünnung in für die Prozessierung nicht relevante Zellen positiv entgegenwirken könnte.

Weiter könnten andere Modifikationen bzw. Insertionsstellen für das TLM in die HBV-Corepartikel die Zellpermeabilität der Partikel steigern, was sich auf ihre MHC-Klasse I-abhängige Prozessierung förderlich auswirken könnte.

Über die Stabilität von zellpermeablen (Epitop tragenden) HBV-Corepartikeln, über ihre intrazelluläre Lokalisation und über die Wechselwirkung mit intrazellulären Proteinen im Zytoplasma von Zellen (APCs) ist bislang sehr wenig bekannt. Solche weiterführenden mechanistischen Untersuchungen könnten für die MHC-I-abhängige Prozessierung von zellpermeablen HBV-Corepartikeln als Antigenträger wichtige Aufschlüsse geben.

4.7 Einsatz von rekombinanten gesamten Ovalbumin-Proteinen

Bei einer Vakzinierung bietet der Einsatz von gesamten Proteinen, z.B. bekannten Tumorantigenen, den Vorteil, dass nach ihrer Prozessierung theoretisch alle möglichen MHC-Epitope aus den Proteinen präsentiert werden können. Die Ermittlung und Kenntnis spezifischer Epitope ist somit im Vorfeld nicht mehr notwendig. Durch ihre Unabhängigkeit von einem bestimmten MHC-Repertoire sind Proteine vielseitiger einsetzbar. Die Präsentation von Proteinen ist sowohl über den MHC-Klasse I- als auch MHC-Klasse II-Weg möglich; damit ist die gleichzeitige Auslösung von unterstützenden CD4⁺ T-Helferzell-, sowie zytotoxischen CD8⁺ T-Zellantworten denkbar. Lösliche Proteine sind in der Regel nur schwach immunogen und benötigen für die Auslösung einer effektiven Immunantwort die zusätzliche Applikation von Adjuvans. Da gesamte Proteine als exogene Antigene nicht bevorzugt über den MHC-I-abhängigen Weg präsentiert werden, müssen sie gezielt für diesen Prozessierungsweg in das Zytoplasma von Zellen eingeschleust werden (siehe 2.4.1).

Gesamte Proteine, welche mit zellpermeablen Molekülen modifiziert waren, konnten mit Erfolg für die Auslösung von spezifischen CD8⁺ T-Zellantworten dienen. Für die Stimulation von CD8⁺ T-Zellen *in vitro* und *in vivo* wurden hauptsächlich DCs eingesetzt, welche mit den zellpermeablen Proteinen vorher beladen worden waren (siehe 2.4.2). Eine effektive direkte Applikation von löslichen zellpermeablen Proteinen, gänzlich ohne Adjuvans, würde für Vakzinierungen, z.B. für die Applikation von Tumorantigenen, ein elegantes Verfahren darstellen.

4.7.1 Korrelation der Zellpermeabilität der rekombinanten Ovalbumin-Proteine mit ihrer MHC-Klasse I-abhängigen Prozessierung und ihrer Stimulationseffizienz *in vitro*

Für Fusionsproteine aus dem TLM und Ovalbumin (TLM-OVA-HA) konnte Zellpermeabilität in Zelllinien im Gegensatz zu OVA-HA mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen werden (siehe 3.2.4.3). Ähnlich wie bei den TLM-eGFP-Fusionsproteinen (siehe 4.3) machten die Ergebnisse deutlich, dass zellpermeables TLM-OVA-HA nahezu alle Zellen erreichte; die in den Zellen zu erwartende Proteinmenge war allerdings ebenfalls sehr gering und konnte nicht quantifiziert werden.

Nach der Arbeitshypothese sollte die Zellpermeabilität mit einer stärkeren Prozessierung der zellpermeablen Ovalbumin-Proteine über den MHC-Klasse I-Weg und somit mit einer größeren Dichte an SIINFEKL-H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche und einer besseren Stimulationseffizienz von spezifischen CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zu den nicht zellpermeablen Proteinen einhergehen.

Die Messung von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche von Zelllinien und von APCs nach Inkubation mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (siehe 3.2.4.4) ließ für die Proteine *in vitro* keine eindeutige kausale Korrelation ihrer Zellpermeabilität mit ihrer MHC-I-abhängigen Prozessierung und mit der durch sie ausgelösten Stimulation von spezifischen CD8⁺ T-Zellen ableiten. Die Befunde legen nahe, dass die Inkubationen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen insgesamt nur zu sehr niedrigen Dichten an SIINFEKL-H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche geführt haben. Die Sensitivität des in den Versuchen eingesetzten Antikörpers 25.D1.16 war möglicherweise nicht ausreichend, um die niedrigen Dichten noch detektieren und eventuelle Unterschiede auflösen zu können; physiologische Effekte können noch in einem Bereich unter der Nachweisgrenze des Antikörpers ausgelöst werden (Porgador et al., 1997).

Bei den *in vitro* Stimulationsversuchen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen in OT-1 Milzzellkulturen war des Weiteren auffällig, dass die zellpermeablen TLM-Fusionsproteine nur in einem engen Konzentrationsbereich eine bessere Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen bewirken konnten im Vergleich zu den nicht zellpermeablen Proteinen (siehe 3.2.4.5). Bei Konzentrationen > 2-3 µM zeigten die rekombinanten Ovalbumin-Proteine ähnlich starke Stimulationseffizienzen. Bei hohen Proteinmengen wurde die Präsentation der Proteine wahrscheinlich maßgeblich durch die Kreuzpräsentation der exogenen Proteine bestimmt, so dass ein zusätzlicher positiv verstärkender Einfluss durch das TLM nicht mehr aufgelöst worden sein könnte. Im optimalen Konzentrationsbereich (0,3-1,5 µM) wirkte wahrscheinlich die Kreuzpräsentation der Ovalbumin-Proteine immer weniger effizient, im Gegensatz dazu konnten aber die zellpermeablen im Vergleich zu den nicht zellpermeablen Proteinen noch eine stärkere Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen bewirken. Bei kleinen Konzentrationen (< 0.3 µM) war die Kreuzpräsentation der Ovalbumin-Proteine wahrscheinlich dann zu schwach, um noch eine Stimulation der CD8⁺ T-Zellen auslösen zu können. In diesem Konzentrationsbereich könnte dann der Ausverdünnungseffekt der zellpermeablen Proteine in alle OT-1 Milzzellen, auch in solche, welche keinen Beitrag zur T-Zellstimulation leisten konnten, zu stark ins Gewicht gefallen sein, so dass auch sie keine Aktivierung der CD8⁺ T-Zellen mehr erreichen konnten.

Aus den Untersuchungen in OT-1 Milzzellkulturen konnte als Ergebnis das Potential der zellpermeablen TLM-Fusionsproteine abgeleitet werden, trotz fehlender Selektivität *in vitro* in einem optimalen Konzentrationsbereich eine stärkere CD8⁺ T-Zellantwort auslösen zu können als die Proteine ohne das TLM.

4.7.2 Immunisierungsstrategien für die *in vivo* Untersuchungen mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen

Um nach Immunisierungen mit Antigenen *in vivo* gewünschte Effekte zu erzielen, sind der Applikationsort des Antigens, die eingesetzte Antigenmenge und der Einsatz von Adjuvantien von essentieller Bedeutung.

Subcutan injizierte und auch intraperitoneal verabreichte Antigene lösen im Allgemeinen die stärksten Reaktionen aus, wahrscheinlich weil die Antigene von Langerhans-Zellen in der Haut oder von peritonealen Makrophagen aufgenommen und in den lokalen Lymphknoten präsentiert werden können.

Die Stärke einer Immunantwort hängt von der Dosis des Antigens ab. Unterhalb einer bestimmten Schwelle lösen die meisten Proteine keine Reaktion aus. Oberhalb der Schwelle nimmt die Reaktion proportional zu der verabreichten Menge bis zum Erreichen eines Plateaus zu, sinkt aber bei sehr hohen Dosierungen wieder ab.

Die Verabreichung von löslichen Proteinen alleine ist meistens nur schwach oder überhaupt nicht immunogen und erfordert in der Regel die zusätzliche Gabe von Adjuvantien. Adjuvantien, z.B. unvollständiges Freundsches Adjuvans (IFA), Aluminiumhydroxid, sowie ISCOMs, können die Immunogenität von Proteinen dadurch steigern, dass sie lösliche Antigene in partikuläres Material verwandeln. Damit bildet sich am Immunisierungsort ein Depot, welches zu einer verzögerten Antigenfreisetzung, verlängerten Antigenverfügbarkeit und erhöhten Antigenstabilität führt. Als weitere Adjuvantien, welche hauptsächlich zu der erhöhten Immunogenität beitragen, werden häufig ganze abgetötete Bakterien, bakterielle Polysaccharide und Nukleinsäuren eingesetzt. Die genaue Wirkungsweise der mikrobiellen Bestandteile ist noch nicht im Detail verstanden; sie führen wahrscheinlich zu einer besseren Antigenpräsentation durch APCs, zur Produktion und Freisetzung von inflammatorischen Zytokinen und zu einer starken lokalen Entzündungsreaktion (Übersicht Janeway et al., 2002).

Als Idealvorstellung für den Einsatz von zellpermeablen Proteinen wäre erstrebenswert, dass sie aufgrund ihrer zellpermeablen Eigenschaft nach *in vivo* Applikation direkt in den MHC-I abhängigen Abbauweg von APCs gelangen und ohne jeglichen Zusatz von Adjuvantien die Induktion einer CTL-Antwort bewirken könnten. Eine solche erfolgreiche direkte Applikation von zellpermeablen Proteinen wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben; die Immunisierung von Mäusen mit zellpermeablen CTL-Epitopen allerdings, intraperitoneal und gänzlich ohne Adjuvans, konnte erfolgreich für die Induktion von spezifischen CTLs und einer Antitumor-Antwort eingesetzt werden (Pietersz et al., 2001).

Für die *in vivo* Untersuchungen der rekombinanten Ovalbumin-Proteine im adoptiven Transfermodell wurde in Anlehnung an die Ergebnisse von Pietersz et al. (2001) als Immunisierungsstrategie eine einmalige intraperitoneale Applikation der löslichen Proteine, ohne zusätzliche Gabe von Adjuvans, gewählt.

Bei den Initialexperimenten im Tumormodell wurde befürchtet, dass die Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen ohne Adjuvans insgesamt nur eine schwache Antitumor-Antwort bewirken könnte und damit kein Messbereich für mögliche Unterschiede zwischen den jeweiligen Proteinen gegeben wäre. Ein Depot bildendes Adjuvans sollte für die Immunisierungen nicht eingesetzt werden, weil dadurch die Gefahr bestand, die strukturelle Integrität des TLM in Mitleidenschaft zu ziehen und die Zellpermeabilität der Fusionsproteine aufzuheben. Die Mäuse wurden im Tumormodell einmalig subcutan mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, unter zusätzlicher Applikation von CpG-ODN als Adjuvans, immunisiert. In früheren Experimenten in Tumormodellen konnte mit dieser Immunisierungsstrategie eine Induktion von CTLs unter Verwendung von löslichen Antigenen erzielt werden (persönliche Information von Kammertöns T.).

CpG-ODN stellen kurze bakterielle Oligonukleotidsequenzen dar, welche unmethylierte Cytosin-Guanin Dinukleotide in einem bestimmten speziesspezifischen Basenkontext enthalten. Für CpG-ODN konnte die Aktivierung von murinen B-Zellen, Makrophagen und DCs, aber nicht von T-Zellen und NK-Zellen gezeigt werden (Übersicht Wagner, 2002). Durch die Verwendung von CpG-ODN als Adjuvans für die Immunisierung von Mäusen mit Proteinen konnten starke B-Zell-, T-Helferzell- und CTL-Antworten hervorgerufen werden (Lipford et al., 1997; Sparwasser et al., 2000; Cho et al., 2000). CpG-ODN polarisierten die Immunantwort vornehmlich zu einer T_H1-Antwort, was sich auch an einem bevorzugten Klassenwechsel zu IgG_{2a} bei der humoralen Immunantwort ablesen ließ (Chu et al., 1997).

4.7.3 Stimulation von spezifischen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* durch die rekombinanten Ovalbumin-Proteine

Das adoptive Transfermodell (siehe 3.2.4.6) stellte, ähnlich wie die OT-1 Milzzellkulturen *in vitro*, ein artifizielles Testsystem für die funktionellen Analysen *in vivo* dar, weil bereits eine hohe Vorläuferfrequenz an transgenen naiven CD8⁺ T-Zellen in den Tieren bereitgestellt wurde. Der Ansatz war allerdings gut für einen Vergleich geeignet, wie effizient die verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteine spezifische CD8⁺ T-Zellen *in vivo* in einem natürlichen Gewebe- und Zellkontext aktivieren können.

Die transferierten CD8⁺ T-Zellen wiesen konzentrationsabhängig nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA eine stärkere Proliferation auf als nach Immunisierung mit OVA-HA; dieser Effekt konnte deutlich bei einer geringen Proteinmenge (10 µg je Maus, i.p.) beobachtet werden. Präliminäre Ergebnisse zeigten außerdem eine stärkere zytolytische Aktivität von spezifischen Zielzellen in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA im Vergleich zu OVA-HA (125 µg je Maus, i.p.).

Das Protokoll für die Messung der zytotoxischen Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr optimiert werden. Der adoptive Transfer von OT-1 Milzzellen in C57BL/6 Mäuse bewirkte auch ohne Immunisierung eine messbare Lyse der spezifischen Zielzellen. Wodurch die zytotoxische Aktivität in den Kontrollgruppen bedingt war, konnte noch nicht genau geklärt werden. Die Messung der zytotoxischen Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen in Abhängigkeit von der für die Immunisierung eingesetzten Menge an rekombinanten Ovalbumin-Proteinen steht noch aus.

Die bisherigen Ergebnisse im adoptiven Transfermodell konnten zeigen, dass die zellpermeablen TLM-Fusionsproteine nach einmaliger intraperitonealer Immunisierung, ganz ohne Adjuvans, eine stärkere Stimulation von transgenen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* erzielen konnten als die Proteine ohne das TLM.

In dem zweiten, für die funktionelle Charakterisierung eingesetzten *in vivo* Untersuchungsmodell, dem Tumormodell (siehe 3.2.4.7), zeigten die rekombinanten Ovalbumin-Proteine in C57BL/6 Mäusen nur einen sehr schwachen Antitumor-Effekt. Die Insertion des TLM wies einen leicht positiven Einfluss auf die Verringerung des Tumorauswachsens auf (nach Gabe von OVA-HA 2 von 14 Tieren tumorfrei; nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA 4 von 14 Tieren tumorfrei; kumulatives Ergebnis).

Die Versuche wurden analog in OT-1 Mäusen durchgeführt, in der Hoffnung, die schwachen Effekte und möglichen Unterschiede in den transgenen Tieren „spreizen“ zu können. In den transgenen Tieren zeigte die Immunisierung mit OVA-HA keine Antitumor-Antwort, während nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA fast die Hälfte der Tiere tumorfrei blieb (nach Gabe von OVA-HA 0 von 8 Tieren tumorfrei; nach Immunisierung mit TLM-OVA-HA 4 von 9 Tieren tumorfrei; kumulatives Ergebnis).

Das vollständige Ausbleiben einer Antitumor-Antwort in OT-1 Tieren nach Immunisierung mit OVA-HA war unerwartet; um der Frage nachzugehen, ob der unterschiedliche Antitumor-Effekt in den transgenen Tieren in einer unterschiedlichen lytischen Aktivität der spezifischen CTLs nach Applikation der verschiedenen Ovalbumin-Proteine begründet liegen könnte, wurde nach Immunisierung von OT-1 Tieren statt Gabe von Tumorzellen ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt. In den transgenen Tieren löste das Adjuvans alleine schon einen ähnlich starken Effekt aus (spezifische Lyse 89,6%) wie die Proteine plus Adjuvans (spezifische Lyse bei OVA-HA 92,03% und bei TLM-OVA-HA 96,7%) (Daten nicht gezeigt). Für den unterschiedlichen Antitumor-Effekt der rekombinanten Ovalbumin-Proteine in OT-1 Mäusen kann somit nicht maßgeblich eine unterschiedliche zytotoxische Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen verantwortlich gemacht werden. Weitere Faktoren (denkbar wären z.B. Aktivierung von weiteren Effektorzellen, Ausbildung von T-Gedächtniszellen, aber auch Beteiligung von Toleranzmechanismen) spielen möglicherweise eine Rolle und müssen in weitergehenden mechanistischen Analysen untersucht werden.

Weshalb in der nicht immunisierten Kontrollgruppe bei C57BL/6 Tieren und der mit Adjuvans immunisierten Gruppe bei OT-1 Tieren jeweils ein Tier tumorfrei blieb, konnte noch nicht geklärt werden.

Bei der unbehandelten Kontrollgruppe in C57BL/6 Tieren (1 von 15 Tieren tumorfrei) könnte das Auftreten möglicherweise auf einen Fehler bei der Applikation der Tumorzellen zurückzuführen sein; alle anderen nicht immunisierten Tiere erkrankten in den jeweiligen Experimenten ähnlich schnell und das Auswachsen der Tumoren verlief ebenfalls relativ gleichförmig.

Die Aussagekraft der nur mit Adjuvans immunisierten Kontrollgruppe bei OT-1 Mäusen ist aufgrund der kleinen Tierzahl (n=3) nur bedingt gegeben; eine größere Gruppe konnte im Rahmen der Arbeit nicht mehr mit dem Adjuvans immunisiert werden, weil der Hersteller des Adjuvans dessen Vertrieb während der Versuche eingestellt hat. Um den Adjuvanseffekt in den transgenen Tieren beurteilen zu können, wird die Kontrollgruppe mit einer größeren Anzahl an OT-1 Mäusen wiederholt, wobei allerdings nicht mehr genau dieselben experimentellen Bedingungen eingehalten werden können.

Mäuse konnten als *high responder* auf CpG-ODN charakterisiert werden; die systemische Applikation von CpG-ODN führte in Mäusen zu einem transienten „Zytokin-Sturm“ im Blut, wobei beträchtliche Mengen an proinflammatorischen Zytokinen gemessen wurden. Außerdem wurde eine vorübergehende extrameduläre Hematopoese bei vergrößerter Milz beobachtet (Übersicht Wagner, 2002).

Bei der für das Tumormodell eingesetzten subcutanen Applikation konnte CpG-ODN ebenfalls Effekte ohne Antigen bewirken. In OT-1 Mäusen konnte CpG-ODN eine starke unspezifische Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen auslösen (siehe Tumorstadium und *in vivo* Zytotoxizitätstest in der Adjuvanskontrollgruppe); auch in den Wildtyp-Tieren konnte nach Immunisierung nur mit CpG-ODN ein verzögertes Einsetzen des Tumorauswachsens festgestellt werden.

Im Tumormodell erzielten unter den bisherigen Immunisierungsbedingungen die rekombinanten Ovalbumin-Proteine in C57BL/6 Mäusen nur eine schwache Antitumor-Antwort, wobei für die zellpermeablen TLM-Fusionsproteine ein leicht positiv verstärkter Effekt festzustellen war. In OT-1 Mäusen konnte dieser unterschiedliche Antitumor-Effekt „gespreizt“ werden.

4.7.4 Mechanistische Betrachtungen für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine

Bei Ansätzen für einen direkten Transfer von exogenen Antigenen in das Zytosol von APCs, im Gegensatz zu DNA basierenden Ansätzen z.B., ist grundsätzlich zu beachten, dass als hauptmaßgebliche Quelle von Peptidliganden für MHC-I-Moleküle neu in der Zelle synthetisierte Proteine angesehen werden. Bei der Neusynthese können, z.B. durch falsch eingebaute oder fehlende Aminosäurereste oder durch vorzeitigen Abbruch der Translation, 30 bis 80% nicht funktionale Proteine entstehen, welche als sogenannte DRiPs (*defective ribosomal products*) bezeichnet werden. Die DRiPs dienen als Hauptquelle für den proteasomalen Abbauweg und Präsentation über den MHC-Klasse I-Weg (Yewdell et., 2001; Princiotta et al., 2003). Lelouard et al. konnten zeigen, dass DCs nach einem inflammatorischen Stimulus neu synthetisierte ubiquitinierte Proteine (z.B. DRiPs) in großen zytosolischen Aggregaten, den sogenannten DALIS (*dendritic cell aggresome-like induced structures*), akkumulieren können. Die Bildung von DALIS ist transient, erfordert kontinuierliche Proteinsynthese und spielt wahrscheinlich für die gezielte Regulation der MHC-Klasse I-Präsentation während der Reifung von DCs eine wichtige Rolle (Lelouard et al., 2002; Lelouard et al., 2004).

Dass auch für exogene Antigene nach Einbringung in das Zytosol von Zellen grundsätzlich eine Prozessierung über den MHC-Klasse I-Weg und die Auslösung einer CD8⁺ T-Zellantwort erreicht werden kann, konnte gezeigt werden (siehe 2.4.1). Systematische quantitative Analysen allerdings über die Korrelation zwischen der Menge an exogenem Antigen, welches durch die unterschiedlichen Methoden in das Zytoplasma von APCs eingeschleust werden konnte, und die daraus resultierende Zahl an spezifischen Peptid beladenen MHC-I-Komplexen stehen noch aus.

Modifikationen von exogenen Antigenen, (im Speziellen von den zellpermeablen TLM-Fusionsproteinen), welche sie gezielt dem proteolytischen Abbau im Zytoplasma der Zelle zuführen, könnten für eine verbesserte Prozessierung der Antigene über den MHC-Klasse I-Weg in APCs eine hilfreiche Strategie darstellen. Die Einbringung von destabilisierenden Sequenzen in die Proteinsequenz, z.B. bestimmte N-terminale Reste nach der sogenannten N-Terminus Regel (Varshavsky, 1992), welche die Halbwertszeit von zytosolischen Proteinen beeinflussen, wäre dafür einsetzbar. Des Weiteren könnte sich die gezielte Beeinflussung der Ubiquitinierung der Proteine (Ben-Neriah, 2002; Liu, 2004) sowie das bevorzugte *Targeting* von Proteinfragmenten in das Endoplasmatische Retikulum (Restifo et al., 1995) als vorteilhaft erweisen (Übersicht Yewdell et al., 1999).

Genaue mechanistische Untersuchungen, welche APCs über welche Mechanismen die zellpermeablen TLM-Fusionsproteine in welchen Kompartimenten der Zelle prozessieren und welche zusätzlichen Prozesse, z.B. die Reifung von APCs, die zellpermeablen Proteine beeinflussen könnten, stehen noch aus.

In OT-1 Milzzellkulturen konnten auf DCs, nicht auf B-Zellen und Makrophagen, SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe nach Inkubation mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen nachgewiesen werden. Trotz der Zellpermeabilität von TLM-OVA-HA im Gegensatz zu OVA-HA wurde eine ähnlich starke Fraktion von DCs positiv für beladene SIINFEKL-Komplexe mit dem Antikörper 25.D1.16 detektiert (siehe 3.2.4.4).

Die zellpermeablen Ovalbumin-Proteine könnten möglicherweise zu einer etwas größeren Dichte der SIINFEKL beladenen Komplexe auf der Zelloberfläche von DCs und/oder zu einer verlängerten Antigenpräsentation (Wang und Wang, 2002) im Vergleich zu den nicht zellpermeablen Proteinen geführt haben, was sich für ihre nachfolgende verbesserte Aktivierung von spezifischen CD8⁺ T-Zellen positiv ausgewirkt haben könnte.

Für die Präsentation über den MHC-Klasse II-Weg und Stimulation von transgenen CD4⁺ T-Zellen wurden nach ersten präliminären Ergebnissen in OT-2/Rag^{-/-} Milzzellkulturen keine unterschiedlichen Effekte durch die verschiedenen rekombinanten Ovalbumin-Proteine gemessen (Daten nicht gezeigt). Die Proteine scheinen somit eine ähnlich starke CD4⁺ T-Helferzellantwort induzieren zu können.

Für die Auslösung von effizienten zytotoxischen Immunantworten gegen Tumoren wurde auch die notwendige Induktion von unterstützenden CD4⁺ T-Helferzellantworten beschrieben (Toes et al., 1999; Marzo et al., 2000). Die Beteiligung von CD4⁺ T-Helferzellen wurde auch für die Aufrechterhaltung von Gedächtnis CTL beobachtet (Clarke, 2000). Zellpermeable TLM-Fusionsproteine könnten durch die gleichzeitige Stimulation sowohl von spezifischen CD8⁺ als auch CD4⁺ T-Zellantworten die Auslösung einer Antitumor-Antwort sowie die Ausbildung einer Gedächtnis-T-Zellantwort vorteilhaft beeinflussen.

Unklar ist bislang, inwieweit das TLM aufgrund seines viralen Ursprungs Immunogenität besitzt. In OT-1 Milzzellkulturen konnte mit dem irrelevanten Protein TLM-eGFP keine spezifische Stimulation der transgenen CD8⁺ T-Zellen festgestellt werden (3.2.4.5). Das TLM führte somit nicht *per se* zu einer Aktivierung. Der Befund stellt eine gute Evidenz dafür dar, dass das TLM wahrscheinlich keine störende intrinsische Immunogenität besitzt.

Ein kritischer Punkt für die Einsatzmöglichkeit des TLM für einen Antigentransfer stellt seine fehlende Selektivität dar. Die zellpermeablen Ovalbumin-Proteine konnten im Vergleich zu den nicht zellpermeablen sowohl *in vitro* (OT-1 Milzzellkulturen) als auch *in vivo* (adoptives Transfermodell) eine verstärkte Aktivierung von transgenen CD8⁺ T-Zellen im Kontext von verschiedenen Zellpopulationen erreichen. Für eine Applikation im Rahmen eines Antigentransfers könnte die fehlende Selektivität des TLM möglicherweise kein Hindernis darstellen.

4.7.5 Ausblick für die rekombinanten Ovalbumin-Proteine

Für die zellpermeablen TLM-Fusionsproteine konnte gezeigt werden, dass sie grundsätzlich das Potential zum Antigentransfer besitzen und sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine CD8⁺ T-Zellantwort auslösen können; unter den bisherigen experimentellen Bedingungen konnten die erzielten Effekte allerdings noch keinen sehr guten Erfolg verzeichnen.

Die Aufklärung der mechanistischen Wirkungsweise der zellpermeablen TLM-Fusionsproteine stellt für das rationale *Design* ihres strukturellen Aufbaus einen wichtigen Schritt dar. Die Transduktion der Proteine in APCs und ihre Präsentation über den MHC-Klasse I-Weg könnte durch eine veränderte Modifikation mit dem TLM, durch die Einbringung von bestimmten (Rezeptor)bindungsstellen für APCs und von Sequenzen, welche die Proteine gezielt dem zytosolischen proteolytischen Abbau zuführen, möglicherweise optimiert werden. Aus einer gesteigerten Zellpermeabilität und verbesserten MHC-I-abhängigen Prozessierung der Proteine könnte in Folge auch eine effektivere Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort resultieren.

Die Etablierung eines verbesserten Immunisierungsprotokolles in Bezug auf die eingesetzte Proteinmenge, Immunisierungsrouten, das zeitliche Schema der Immunisierungen sowie die Verwendung von Adjuvans bei der *in vivo* Applikation der Ovalbumin-Proteine könnte die erzielten Effekte möglicherweise ebenfalls optimieren.

In einem einheitlichen Testsystem sollte anschließend in Vergleichsstudien eine systematische Evaluierung erfolgen, welche CD8⁺ T-Zellantworten die TLM-Fusionsproteine, entsprechende mit anderen Zellpermeabilitätsmotiven modifizierte Proteine sowie andere Strategien auslösen können. Dadurch wäre eine fundierte abschließende Beurteilung möglich, inwieweit das vorhandene Potential des TLM als Antigentransfer-System eine geeignete Anwendung in der Vakzinentwicklung finden kann.

5 Material

5.1 Zelllinien

Humane Zelllinien

Hela	humane Cervixcarinoma-Zelllinie	ACC 57
HepG2	humane Hepatoblastom-Zelllinie	ACC 180

Murine Zelllinien auf C57BL/6-Hintergrund

ANA-I	murine Makrophagen-Zelllinie	Cox et al., 1989
EL-4	murine T-Lymphom-Zelllinie	ATCC TIB-39
EG7.OVA	murine T-Lymphom-Zelllinie, abgeleitet von EL-4, exprimiert Ovalbumin	ATCC CRL-2113
RMA-S	murine Lymphom-Zelllinie, defizient für TAP-2	Ljunggren et al., 1985

Hybridome

25.D1.16	Hybridom, produziert spezifischen Antikörper, der SIINFEKL beladenen H-2K ^b -Komplex erkennt;	Porgador et al., 1997
----------	--	-----------------------

Die verwendeten humanen Zelllinien wurden ursprünglich von ATCC (*American Type Culture Collection*, Rockville USA) bzw. von DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen.

Freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden Zelllinien von Herrn Dr. Schäfer, Robert Koch-Institut Berlin, (EL-4), von Herrn Prof. Walden, Charité Berlin, (RMA-S, EG7.OVA), von Herrn Dr. Krüken, Universität Düsseldorf, (ANA-I), und von Herrn Dr. Kammertöns, Max-Delbrück-Zentrum Berlin, (EG7.OVA). Das Hybridom 25.D1.16 wurde von Prof. Rammensee, Universität Tübingen, mit Einverständnis von Prof. Germain, National Institute of Allergy and Infectious Diseases Bethesda USA, freundlicherweise überlassen.

5.2 Bakterienstämme

DH5 α	(GibcoBRL, Eggenstein)
M15(pRep4)	(Qiagen, Hilden)
XL-1 blue	(Stratagene, USA)
BL21(D3)	(Labor Rammensee, Tübingen)

5.3 Antikörper

Primäre Antikörper

anti HA-tag, monoklonal, Maus, Klon 12CA5	(Roche, Mannheim)
anti GFP, monoklonal, Maus	(Clontech, Heidelberg)
anti Ovalbumin, Kaninchen, polyklonal,	(selbst generiert, Dez. 2002)
anti HBcAg, Kaninchen, polyklonal, B0586	(Dako, USA)
anti Digoxigenin, F _{ab} -Fragment, Cy5 konjugiert	(Roche, Mannheim)

anti Maus V α 2 T-Zellrezeptor, Ratte, FITC konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)
anti Maus V α 2 T-Zellrezeptor, Ratte, PE konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)
anti Maus IFN γ , Ratte, PE konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)
anti Maus CD3, Ratte, PE konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)
anti Maus CD69, Hamster, PE konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)
anti Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II Rezeptor), Ratte	(Pharmigen, Hamburg)
anti Maus CD4, Klon GK1.5, Ratte, Cy5 konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti Maus CD8, Klon 53-6.72, Ratte, FITC bzw. Cy5 konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti Maus CD11b, Klon 5C6, Ratte, PE konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti Maus CD11c, Klon N418, Hamster, FITC konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti Maus CD19, Klon 1D3, Ratte, FITC konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti Maus CD25, Klon 2E4, Ratte, PE konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti Maus Ly6G, Klon RB6-8C5, Ratte, FITC bzw. PE konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti Maus NK1.1, Klon PK136, Maus, PE konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti SIINFEKL-H-2K ^b , Klon 25.D1.16, Maus, Digoxigenin gekoppelt	(Labor Kroczek, Berlin)
anti SIINFEKL-H-2K ^b , Klon 25.D1.16, Maus, Hybridomüberstand,	(selbstgeneriert, Mai 2002)
anti human CD11c, MCA460F, FITC konjugiert	(Serotech, USA)
anti human CD14, Klon 63D3, Maus, FITC konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti human CD40, Klon G28-5, Maus, FITC konjugiert	(Labor Kroczek, Berlin)
anti human CD80, Maus, PE konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)
anti human CD83, Maus, FITC konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)
anti human CD86, Maus, FITC konjugiert	(Pharmigen, Hamburg)

Die vom Labor Prof. Kroczek, Robert Koch-Institut Berlin, freundlicherweise zur Verfügung gestellten Antikörper wurden aus den jeweiligen Hybridomüberständen isoliert und mit den entsprechenden Farbstoffen bzw. mit Digoxigenin konjugiert. Die Stammlösungen waren so austitriert, dass sie in einer 1:12 Verdünnung in der Durchflußzytometrie eingesetzt werden mussten.

Sekundäre Antikörper

Ziege anti Maus IgG, Peroxidase konjugiert	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
Kaninchen anti Maus IgG, Peroxidase konjugiert	(Amersham Pharmacia, Biotech Schweden)
Ziege anti Kaninchen IgG, Cy3 konjugiert	(Dianova, Hamburg)
Pferd anti Kaninchen IgG, FITC konjugiert	(Vector Lab, USA)
Pferd anti Maus IgG, FITC konjugiert	(Vector Lab, USA)

5.4 Kits

Mini/Maxi-Plasmidreinigungskit	(Qiagen, Hilden)
<i>QIAquick Gel Extraction Kit</i>	(Qiagen, Hilden)
<i>QIAquick PCR Purification Kit</i>	(Qiagen, Hilden)
ECL 1 und 2 Substrat	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
<i>AmpliTaq® FS BigDye Terminator</i>	(Applied Biosystems, USA)

5.5 Enzyme

Restriktionsendonukleasen	(Roche, Mannheim)
Taq DNA Polymerase	(Qiagen, Hilden)
Advantage 2 Polymerase	(Clontech, USA)
Lysozym	(Sigma, Deisenhofen)
Alkalische Phosphatase	(Roche, Mannheim)

5.6 Plasmide

pASK-IBA7	(IBA, Göttingen)
peT15b	(Novagen, USA)
pSM2 (HBV-Subtyp ayw)	(Weiß L., 1995)
pASK-WT _k	(Stöckl L., 2002)
pAC-neo-OVAI	(Labor Rammensee, Tübingen)
pQe8-eGFP (Klon 14)	(Oess S., 1999)
pQe8-TLMeGFP (Klon 16)	(Oess S., 1999)

5.7 Synthetische Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma TIB-Molbiol (Berlin) synthetisiert.

Primer für die Sequenzanalyse

T7proseq	5' TAATACGACTCACTATAG 3'
T7terseq	5' GCTAGTTATTGCTCAGCGG 3'
Ovaseqint	5' CTGCAGATCAAGCCAGAGAG 3'
f-pASK	5' AGAGTTATTTTACCACTCCCT 3'
b-pASK	5' GACGCAGTAGCGGTAAACG 3'

PCR-Primer

Ovfw-NdeI

5'GGGAATTCCATATGGGCTCCATCGGTGCAG 3'

OvTLM-NdeI

5'GGGAATTCCATATGCCCTTATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGGGGACCCT
GGCTCCATCGGTGCAGC 3'

OvHAre-BamHI

5'CGCGGATCCAGCATAGTCTGGGACGTCATATGGATAAGGGGAAACACATCTGC
C 3'

f-1903-BamHI

5'AAAGGATCCATGGGGGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGACATCGACCCTTATAA
AGAA 3'

f-TLM-1861-BamHI

5' TTTGGATCCATGCCCATATCGTCAATCTTCTCGAGGATTGGGGACCCTACTGTTC
AAGCCTCCAAGCTGTGCCTT 3'

c2349+OVA

5' CCCAAGCTTTTACAGTTTTTCAAAGTTGATTATACTAACAACAGTAGTTTCCGG
AAGTGTTGA 3'

5.8 Längenstandards

<i>low molecular weight marker</i>	(Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)
1 kb-DNA-Leiter	(PeqLAB, Erlangen)
100 bp-DNA-Leiter	(PeqLAB, Erlangen)

5.9 Chromatographiesäulen und SäulenmaterialAffinitätschromatographie

Ni ²⁺ -NTA-Agarose (Füllmaterial)	(Qiagen, Hilden)
Leersäule HR 5/5	(Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)
Streptag-Tröpfelsäulen (1ml)	(IBA, Göttingen)
NHS-aktivierte Sepharosesäulchen (1ml)	(Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)

Anionenaustauschchromatographie

Mono Q HR 5/5	(Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)
---------------	--

Gelfiltrationschromatographie

Superose 6 10/300 GL	(Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)
----------------------	--

5.10 Synthetische Peptide

SIINFEKL	(EMC, Reutlingen)
----------	-------------------

<u>724FC.1</u> GFKQSSKAL-K(FITC)-NH ₂	(Biosynthan, Berlin)
---	----------------------

Peptid 0041
RGYVYQGL

TLM-SIINFEKL
PLSSIFSRIGDPMARLSIINFEKL

TripelS-SIINFEKL
PSSSSSRIGDPMARLSIINFEKL

Antp(43-58)-SIINFEKL
RQIKIWFQNRRMKWKKMARLSIINFEKL

Antp(41-55)-SIINFEKL
TERQIKIWFQNRRMKMARLSIINFEKL

Die Peptide TLM-SIINFEKL und TripelS-SIINFEKL sowie das Kontrollpeptid 0041 wurden von Herrn Dr. Stefan Stevanovic, Universität Tübingen, synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Beide Peptidepaare (TLM-SIINFEKL / TripelS-SIINFEKL und Antp(43-58)-SIINFEKL / Antp(41-55)-SIINFEKL) wurden von Herrn Dr. Hubert Kalbacher, Universität Tübingen, hergestellt und freundlicherweise überlassen.

RA248 Fluo (Fluo-TLM-Amid)
Fluo-PLSSIFSRIGDP-NH₂

RA249 Fluo (Fluo-TLM)
Fluo-PLSSIFSRIGDP

RA250 Fluo (Antp(43-58)-Amid)
Fluo-RQIKIWFQNRRMKWKK-NH₂

RA251 Fluo (Antp(43-58))
Fluo-RQIKIWFQNRRMKWKK

Die N-terminal FITC konjugierten Peptide wurden von Herrn Rainer Fischer, Universität Tübingen, synthetisiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

5.11 Reagenzien für die Zellkultur

Trockenpulver für DMEM	(GibcoBRL, Eggenstein)
Trockenpulver für RPMI-1640	(GibcoBRL, Eggenstein)
AIM-V (serumfreies Ersatzmedium)	(GibcoBRL, Eggenstein)
FCS (fötales Kälberserum)	(Biochrom, Berlin)
Natriumpyruvat-Lösung (100mM)	(Biochrom, Berlin)
L-Glutamin-Lösung (200mM)	(PAA, Linz)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (100fach)	(PAA, Linz)
Nicht essentielle Aminosäuren (100fach)	(Sigma, Deisenhofen)
β-Mercaptoethanol-Lösung (50mM)	(GibcoBRL, Eggenstein)
Trypsin/EDTA-Lösung	(PAA, Linz)
Ficoll, Lymphoprep (Dichte 1,077g/ml)	(Biochrom, Berlin)
Lympholyte-M	(Cedarlane, Canada)
CFSE (5-6-Carboxyfluorescein diacetate succimidyl ester)	(Molecular Probes, USA)
Phytohemagglutinin (PHA)	(Sigma, Deisenhofen)

5.12 Zytokine, Interleukine, Interferone

rekombinantes humanes GM-CSF (rhGM-CSF)	(Novartis, Basel)
rekombinantes humanes IL-4 (rhIL-4)	(Peprotech, Tebu, Frankfurt)
rekombinantes humanes IL-2 (rhIL-2)	(Peprotech, Tebu, Frankfurt)
rekombinantes murines IFN γ (rmIFN γ)	(Peprotech, Tebu, Frankfurt)
rekombinantes murines IL-7 (rmIL-7)	(Peprotech, Tebu, Frankfurt)
rekombinantes murines IL-2 (rmIL-2)	(Sigma, Deisenhofen)

5.13 Buffy-Coat-Konserven

Buffy-Coat-Konserven von gesunden Spendern (spezialstabilisiertes Blutspendematerial nach Entzug eines Großteils des Plasmas und des Erythrozytenkonzentrates) wurden vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes und von der Blutbank im Virchow-Klinikum, Berlin, erhalten bzw. für die in Kiel durchgeführten Versuche von der Blutbank des Universitätsklinikums Kiel zur Verfügung gestellt.

5.14 Mäuse

C57BL/6-Mäuse und OT-1-Mäuse (Hogquist et al., 1994) wurden von der Tierzuchtanlage Marienfelde Berlin bezogen.

C57BL/6-Mäuse und OT-1-Mäuse für die Versuche im Tumormodell sowie OT-1/Rag^{-/-} - Mäuse und OT-2/Rag^{-/-}-Mäuse (Barnden et al., 1998) wurden von Dr. Kammertöns, Max-Delbrück-Zentrum Berlin, zur Verfügung gestellt.

5.15 Radioaktive Chemikalien

⁵¹ Cr	Na ₂ ⁵¹ CrO ₄ -Lösung, 37 MBq/ml	(Amersham Pharmacia Biotech, Schweden)
------------------	---	--

5.16 Sonstige Chemikalien und Verbrauchsmittel

Ampicillin	(Roth, Karlsruhe)
Aprotinin	(Roth, Karlsruhe)
Bradford Reagenz	(Biorad, USA)
Brefeldin A	(Sigma, Deisenhofen)
BSA (Rinderserum Albumin, Fraktion V)	(Sigma, Deisenhofen)
DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid)	(Roche, Mannheim)
Desthiobiotin (5-Methyl-2-oxo-4-imidazolinecaproic acid)	(ICN, USA)
Dialyseschläuche	(Roth, Karlsruhe)
Didesoxynukleotide	(Roche, Mannheim)
ECL-Western-Blot-Detektionssystem	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
Eindeckelmedium für die Immunofluoreszenz	(Citifluor, England)
Filternetze, 40 μ m, steril	(Falcon)
HABA (2-(4-Hydroxyphenylazo)benzoic acid)	(ICN, USA)
Hybond-P (PVDF-Membran für Western Blot)	(Amersham Pharmacia Biotech)
Hyperfilm ECL	(Amersham Pharmacia Biotech)

Imidazol	(Merck, Darmstadt)
<i>ImmunEasy® Mouse Adjuvant</i>	(Qiagen, Hilden)
IPTG (Isopropyl- β -thiogalaktosid)	(Roth, Karlsruhe)
Milchpulver	(Sigma, Deisenhofen)
Ovalbumin	(Sigma, Deisenhofen)
Phalloidin-TRITC	(Sigma, Deisenhofen)
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	(Roth, Karlsruhe)
Propidiumiodid	(Sigma, Deisenhofen)
Ratten IgG	(Nordic)
Saponin	(Sigma, Deisenhofen)
<i>Spin-X® Centrifuge Tube Filter (0.22μm, acetate)</i>	(Costar, USA)
Zellkultur-Plastikmaterialien	(TPP, Biochrom, Berlin)
Zellkulturschalen (10cm) für Generierung von DCs	(Costar, USA)
Zentrifugalkonzentratoren	(Millipore, USA)

Alle nicht gesondert aufgeführten Chemikalien, Lösemittel und Reagenzien wurden kommerziell bezogen und ohne weitere Aufbereitung eingesetzt.

Das verwendete Wasser entstammte einer Reinstwasseranlage der Firma Millipore.

5.17 Geräte

Apparatur für „ <i>semi-dry</i> “ Western Transfer	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
Brutschränke	(Heraeus, Hanau)
Chromatographiegeräte, Äkta Explorer und Ettan LC	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
Durchflußzytometer, Facs-Calibur	(Becton Dickenson, Heidelberg)
Elektrophorese-Apparaturen (Proteine)	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
Elektrophorese-Apparaturen (DNA)	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
Entwicklermaschine, Agfa Curix 60 Aqua	(Agfa, Köln)
Fluoreszenzmikroskop, DM RBE mit Fotoeinheit	(Leica, Wetzlar)
<i>French press</i> Zellaufschlußgerät	(Avestin, Canada)
Heizblock	(Eppendorf, Hamburg)
Lichtmikroskop Diavert	(Leica, Wetzlar)
pH-Meter, 765 Calimatic	(Knick, Berlin)
Photometer Ultraspec 3300 pro	(Amersham Pharmacia Biotech Schweden)
Potter für Zell-Homogenisation	(Braun, Melsungen)
Schüttelinkubator	(Unitron HT-Infors, Schweiz)
Sonifiziergerät, Sonoplus HD 2070	(Bandelin, Berlin)
Sterilbank, HeraSafe	(Heraeus, Hanau)
Thermo-Cycler PTC-100	(MJ Research, USA)
Waagen	
Feinwaage	(Sartorius, Göttingen)
Universalwaage	(Sartorius, Göttingen)
Wasserbad GFL 1083	(GFL, Burgwedel)
Zentrifugen	
Tischzentrifuge Biofuge fresco	(Heraeus, Langenselbold)
Untertischzentrifuge Minifuge 2	(Heraeus, Langenselbold)
Kühlzentrifuge Superspeed RC-5B mit folgenden Rotoren: GS 3, SS 34	(Sorvall, Langenselbold)

6 Methoden

6.1 Zellbiologische Methoden

6.1.1 Kultivierung und Passagieren von eukaryotischen Zellen

Die Zellkulturen werden bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 6% und bei einer Luftfeuchtigkeit > 90% kultiviert. Das Kulturmedium wird je nach Verbrauch alle 2 - 4 Tage gewechselt.

Suspensionszellen werden zur Weiterkultivierung in der geeigneten Konzentration (1:10 - 1:20) in neues Medium verdünnt.

Zum Passagieren von adhären wachsenden Zelllinien wird der Zellrasen nach einem Waschschrift mit PBS durch Zugabe von Trypsin/EDTA vom Boden der Kulturflasche abgelöst; durch Zugabe von FCS-haltigem Kulturmedium wird die Aktivität von Trypsin/EDTA wieder abgestoppt. Nach dem Waschen der Zellen werden sie in der notwendigen Verdünnung (1:3 - 1:5) neu ausgesät.

Kultivierungsmedium für adhärente humane Zelllinien	DMEM 10% FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin
Kultivierungsmedium für murine Suspensionszelllinien	DMEM 5% FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1 mM Natriumpyruvat 2 mM Glutamin 50 µM β-Mercaptoethanol
PBS	8 g NaCl 0,2 g KCl 1,15 g Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O 0,2 g KH ₂ PO ₄ ad 1 l auffüllen; pH 7,2 einstellen steril filtrieren

6.1.2 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren werden die pelletierten Zellen in 1,5 ml Einfriermedium aufgenommen und langsam in einem Gefrierbehälter auf -80 °C gebracht. Der Gefrierbehälter ist mit Isopropanol gefüllt und gewährleistet über den Temperaturkoeffizienten von Isopropanol eine kontrollierte Abkühlrate der Zellen von 1 °C pro Minute. Zur längerfristigen Aufbewahrung der Zellen werden sie in einem Stickstoff-Tank (-196 °C) gelagert.

Die eingefrorene Zellsuspension wird möglichst rasch im 37 °C warmen Wasserbad fast vollständig aufgetaut. Die Zellen werden dann zügig in vorgewärmtes Medium aufgenommen, pelletiert und einmal gewaschen, um das DMSO vollständig zu entfernen. Anschließend werden die Zellen in Kultur genommen. Um das Wachstum und die Proliferation der aufgetauten Zellen, wenn nötig, zu fördern, können sie für die ersten Tage / Wochen nach dem Auftauen in Kulturmedium mit 20% FCS gehalten werden.

Einfríermedium	Entsprechendes Kulturmedium 20% FCS 10% DMSO
----------------	--

6.1.3 Gewinnung peripherer mononukleärer Zellen

Die Gewinnung von *Peripheral Blood Mononuclear Cells* (PBMCs) aus *Buffy-coat*-Konserven gesunder Spender erfolgt durch Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Trennlösung. Da die Dichte von Ficoll mit 1,077 g/ml identisch ist wie die von Lymphozyten und Monozyten, werden diese durch Zentrifugation in der Interphase angereichert und dort als weißer Ring sichtbar.

Ausgangsmaterial eines *Buffy-Coats*, ca. 60 ml, wird auf 140 ml mit PBS verdünnt. 15 ml Ficoll werden in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt, vorsichtig mit 35 ml verdünntem Spendermaterial überschichtet und anschließend bei Raumtemperatur für 30 min, 340 g, ohne Bremse zentrifugiert. Die Interphase wird vorsichtig abgenommen und zweimal mit kaltem PBS gewaschen (4 °C, 400 g, 7 min). Die Ausbeute pro *Buffy Coat* liegt in der Regel bei $6-8 \times 10^8$ PBMC. Die isolierten PBMC werden zur *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen aus CD14⁺ Monozyten eingesetzt.

6.1.4 Gewinnung von hitzeinaktiviertem humanen Plasma

Hierfür wird nach Dichtegradientenzentrifugation der Blutkonserven über Ficoll das sich über der Interphase befindliche Plasma abgenommen und für 40 min bei 56 °C hitzeinaktiviert. Durch anschließende Zentrifugation bei 1000 g wird das Plasma weitestgehend von Partikeln befreit und portioniert bei -20 °C gelagert.

6.1.5 Generierung von humanen dendritischen Zellen aus Monozyten

Die *in vitro* Generierung von dendritischen Zellen erfolgt aus CD14⁺ Monozyten, die durch zwei Adhärensschritte und anschließende Kultivierung unter Zugabe von rhGM-CSF und rhIL-4 im Differenzierungsmedium erreicht wird (Übersicht Fong und Engelmann, 2000).

Die durch Dichtegradientenzentrifugation isolierten PBMCs (siehe 6.1.3) werden in RPMI 1640 + 1% humanes Plasma (bezeichnet als R1⁺) auf eine Zelldichte von $1,5 \times 10^7$ Zellen/ml eingestellt. In eine 10 cm Kulturschale werden 12 ml R1⁺ vorgelegt, 6 ml der Zellsuspension dazugegeben und die Zellen gleichmäßig verteilt.

Für den ersten Adhärensschritt werden die Zellen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Die nicht adhärenen Zellen werden anschließend vorsichtig mit warmen R1⁺ von den Platten gewaschen und als nicht adhärenente PBMC-Fraktion eingefroren. Die zweite Adhärens erfolgt über Nacht erneut in R1⁺ (Zugabe 18 ml R1⁺ je Kulturschale).

An Tag 1 wird der Überstand mit den überwiegend darin enthaltenen B-Zellen, aber auch noch einige T-Zellen und Thrombozyten, abgenommen und der Zellrasen mit warmen PBS gewaschen. Die noch adhärenen Monozyten werden bis Tag 7 in 24 ml / Kulturschale Differenzierungsmedium RF10⁺ kultiviert, angereichert mit 800 U/ml rhGM-CSF und 1000 U/ml rhIL-4.

An Tag 4 werden 6 ml Differenzierungsmedium von den Platten abgenommen und durch 12 ml frisches Medium ersetzt, das 1600 U/ml rhGM-CSF und 1000 U/ml rhIL-4 enthält.

An Tag 6 bis 7 werden die unreifen in Suspension befindlichen dendritischen Zellen zur Charakterisierung und für funktionale Untersuchungen eingesetzt.

Sollen die dendritischen Zellen für einen funktionellen Assay zur Untersuchung der zellpermeablen Proteine eingesetzt werden, wird die Kultivierung der Zellen statt in RF10⁺ in AIM-V (einem serumfreien Ersatzmedium) durchgeführt, um eine Aktivierung der Zellen durch Serumbestandteile auszuschließen.

RI ⁺	RPMI 1640 + 1% humanes Plasma
RF10 ⁺	RPMI 1640 10% FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 2 mM L-Glutamin
Kultivierungsmedium	AIM-V (vollwertiges Ersatzmedium, serumfrei)
Stammlösung rhGM-CSF	10 ⁵ U/ 22 µl (H ₂ O)
Stammlösung rhIL-4	2,5x10 ⁴ U/ µl (H ₂ O)

6.1.6 Generierung von Phytohemagglutinin (PHA) stimulierten T-Zell-Blasten

Zur Gewinnung von autologen Zielzellen zum Einsatz im Zytotoxizitätsassay (siehe 6.4.4.1) werden PHA stimulierte T-Zell-Blasten generiert. PHA ist ein Lektin, das den T-Zellrezeptor vernetzen kann und somit zu einer unspezifischen, nicht Antigen-abhängigen Stimulation und Proliferation von T-Zellen führt.

Die nicht adhärenente PBMC-Fraktion (siehe 6.1.5) wird aufgetaut und in einer Dichte von 1x10⁶ Zellen/ml in AIM-V ausgelegt. Zur Stimulation werden 2 µg/ml PHA zugegeben. Die optimale Konzentration der eingesetzten PHA-Charge wird vorher austitriert. An Tag 2 wird der Kultur 30 U/ml rhIL-2 zugesetzt. Nach drei bis vier Tagen Kultivierung werden die T-Zell-Blasten als Zielzellen im Zytotoxizitätstest eingesetzt.

6.1.7 Gewinnung und Kultivierung von murinen primären Milzzellkulturen

Die Maus wird durch Genickbruch getötet und die Milz über die seitliche Bauchdecke unter der Sterilbank herauspräpariert. Die Milz wird einmal mit PBS gewaschen und noch anhaftende Fettreste werden weitestgehend entfernt.

Zur Gewinnung der Milzzellen wird die Milz vorsichtig steril mit einem Spritzenstempel durch ein Netz (40µm) in einer Kulturschale gerieben. Die Zellsuspension wird in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt und abzentrifugiert.

Zur Lyse der Erythrozyten wird das Zellpellet in 4 ml frisch hergestelltem Erythrozytenlysepuffer aufgenommen und 4–6 min bei RT inkubiert. Werden mehrere Milzen zusammenaufbereitet, wird entsprechend mehr Lysepuffer eingesetzt und bei großen Milzen die Inkubationszeit auf 7 min erhöht. Die Erythrozytenlyse wird durch Zugabe von 36 ml PBS abgestoppt; die Zellen werden pelletiert (380 g, RT, 8 min) und anschließend einmal mit PBS

gewaschen. Dabei sollten möglichst alle bei der Erythrozytenlyse entstandenen Aggregate entfernt werden. Wenn nötig wird die Zellsuspension nochmals durch ein Netz filtriert.

Die gewonnenen Milzzellen werden für die Analyse mittels Durchflußzytometrie, für adoptive Transferexperimente, sowie für Proliferations- und Stimulationsexperimente eingesetzt. Für die Weiterkultivierung werden die Milzzellen in 24 Loch Platten in einer Dichte von $4-6 \times 10^6$ Zellen/2ml je Loch ausgelegt; in 96 Loch Rundboden-Platten werden ca. $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ Zellen in 200 μ l je Loch ausgesät.

Erythrozytenlysepuffer	Lösung A 0,83% NH_4Cl in Wasser, steril Lösung B 0,17 M Tris/HCl (pH 7,2) in Wasser, steril Vor Gebrauch werden 9 Teile A und 1 Teil B zusammengemischt.
Milzzellkultivierungsmedium	RPMI 1640 10% FCS 5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung 1 mM Natriumpyruvat 2 mM L-Glutamin 5 ml nicht essentielle Aminosäuren 50 μ M β -Mercaptoethanol

6.1.8 Fluoreszente Markierung von Zellen

Für Proliferationsuntersuchungen werden die gewonnenen Milzzellen (siehe 6.1.7) fluoreszent markiert.

CFSE (*5-6-Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der durch Modifikation der Carboxy-Gruppen des Moleküls mit Acetomethyl-Estergruppen ein relativ ungeladenes Molekül darstellt. Dieser Farbstoff kann durch Zellmembranen hindurch in das Zytosol von Zellen gelangen. Durch endogene Esterasen werden die lipophilen Gruppen gespalten, was zur geladenen Form des Farbstoffes führt, welcher sehr viel langsamer wieder aus der Zelle wandert. Durch die aktivierte Gruppe kann der Farbstoff kovalent an freie Aminogruppen zellulärer Proteine gebunden werden, so dass die Mutterzellen fluoreszent markiert werden. Bei jeder Teilung wird der Farbstoff gleichmäßig von der Mutterzelle auf die Tochterzellen verteilt, so dass die Intensität der Markierung bei jeder Teilung kontinuierlich abnimmt (Lyons et al., 1994).

5×10^7 Milzzellen werden in 900 μ l Ladepuffer aufgenommen und in ein 50 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Dazu werden 100 μ l einer 50 μ M CFSE-Lösung (angesetzt in Ladepuffer) gegeben und die Zellen für 10-15 min bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die Reaktion wird durch Auffüllen des Röhrchens mit Ladepuffer gestoppt. Die Zellen werden pelletiert (380 g, 8 min, RT) und anschließend nochmals mit PBS gewaschen. Die markierten Zellen werden dann für *in vitro* Proliferationsanalysen bzw. für adoptive Transferexperimente eingesetzt.

Ladepuffer	PBS mit 0.1% BSA
CFSE-Stammlösung	5 mM in DMSO, Lagerung bei -20 °C
50 μ M CFSE-Lösung	CFSE-Stammlösung 1:100 in Ladepuffer verdünnen

6.1.9 Zytosolpräparation aus eukaryotischen Zellen

Das Zytosol von Zellen wird durch differentielle Zentrifugation gewonnen.

Bei adhärenen Zellen (z.B. HepG2) werden die Zellen einer 80% konfluent gewachsenen 6 cm Kulturschale gewaschen, 400 µl Homogenisationspuffer auf den Zellenrasen gegeben und die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber abgelöst, möglichst ohne viele Zellen dabei zu beschädigen.

Bei Suspensionszellen werden die Zellen (z.B. 3×10^6 EL-4 Zellen) pelletiert und das Pellet in 400 µl Homogenisationspuffer aufgenommen.

Die Zellsuspension wird in einen Mikro-Potter überführt und durch 25 Hübe aufgeschlossen. Anschließend wird das Homogenat bei 13000 rpm, 13 min, 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, was unaufgeschlossene Zellen und Zelltrümmer abtrennt. Der Überstand wird dann bei 100.000 rpm (450.000 g) in einer Ultrazentrifuge für 18 min bei 4 °C zentrifugiert, wobei das Zytosol (Überstand) von der Mikrosomenfraktion usw. abgetrennt wird. Wenn nötig, soll die Zytosolpräparation bei -20 °C bis zur Analyse gelagert werden.

Homogenisationspuffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,8
	5 mM MgCl ₂
	30 mM KCl
	250 mM Sucrose
	5 mM DTT
	1 mM PMSF
	10 µg/ml Aprotinin

6.2 Proteinchemische Methoden

6.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

In einer diskontinuierlichen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) werden die mit SDS beladenen und denaturierten Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt.

Es werden dazu lineare Minigele (9 x 6 cm) mit einer Dicke von 1 cm verwendet, die mit einem Sammelgel überschichtet werden. Die Zusammensetzung der Gele ist in folgender Tabelle jeweils für das Gießen von 10 Minigelen angegeben.

Trenngel

	10% Gel	12% Gel	15% Gel
Acrylamidmixtlösung, enthält 40 % Acrylamid	20 ml	24 ml	30 ml
4 x Trenngelpuffer	20 ml	20 ml	20 ml
H ₂ O	40 ml	36 ml	30 ml
TEMED	60 µl		
Ammoniumperoxodisulfat	kleine Spatelspitze		

6.2.3 Silberfärbung von Polyacrylamid-Gelen

Die Silberfärbung ist eine sehr sensitive Methode, mit der noch Proteinmengen im unteren Nanogramm-Bereich nachgewiesen werden können. Das Prinzip beruht auf der selektiven Reduktion der von Proteinen komplexierten Silberionen durch Formaldehyd. Dabei entstehen Silberkeime, die während der Entwicklung des Gels die weitere Reduktion von Silberionen katalysieren (Heukeshoven und Dernick, 1988).

Die Proteine nach elektrophoretischer Auftrennung in den Polyacrylamid-Gelen werden durch Schwenken der Gele in Fixierungslösung für ca. 30 min fixiert. Danach werden die Gele für ca. 45 min in der Konditionierungslösung geschwenkt und anschließend über 45 min unter mehrmaligem Wechsel des ddH₂O gewässert. Daraufhin folgt die Inkubation der Gele in der Silbernitratlösung für 30 min. Die Farbentwicklung erfolgt durch Zugabe von Natriumcarbonatlösung. Wenn die gewünschte Farbtintensität erreicht ist, wird die Farbreaktion durch Zugabe von Eisessig abgestoppt.

Fixierungslösung	30% Ethanol 10% Essigsäure in Wasser
Konditionierungslösung	0,4 M Natriumacetat pH 6,0 30% Ethanol, 2 ml Glutaraldehyd 100 mg Na ₂ S ₂ O ₃ x 5H ₂ O für 100 ml in Wasser
Silbernitratlösung	0,1% AgNO ₃ 75 µl Formaldehydsg. (37 %) für 100 ml in Wasser
Natriumcarbonat-Lösung	2,5% Na ₂ CO ₃ 125 µl Formaldehydsg. (37%) für 100 ml in Wasser

6.2.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

6.2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Durch die Bindung an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue G250 von 465 nm nach 595 nm (Bradford, 1976). Allerdings ist diese Methode nicht bei Anwesenheit von Detergenzien anwendbar und die Sensitivität variiert je nach Protein (Stoschek, 1990).

1 ml Bradfordreagenz (1:5 verdünnt aus der Biorad-Stammlösung) werden in einer Küvette mit 3-30 µl proteinhaltiger Probe (je nach Proteingehalt) gemischt; die Extinktion wird bei 595 nm in einem Spektralphotometer vermessen.

6.2.4.2 Proteinbestimmung durch Absorptionsmessung bei 280 nm

Tryptophan, sowie schwächer auch Tyrosin und Phenylalanin, absorbieren bei 280 nm. Aufgrund dieser Absorption kann die Konzentration von Proteinen ermittelt werden. Der Wert berechnet sich nach folgender Formel:

$$c(\text{Protein}) = 1,55 \times E_{280} - 0,76 \times E_{260} \text{ (mg/ml)}$$

Die Formel berücksichtigt Verunreinigungen der Probe durch Anwesenheit von Nukleinsäuren.

Die proteinhaltigen Proben, wenn nötig verdünnt, werden im Spektralphotometer bei 280 und 260 nm in einer Quarzküvette vermessen. Als Referenzwert dient das jeweilige Lösemittel, in welchem die Proteine vorliegen.

6.2.5 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen in Proteingemischen wird ein Western Blot mit anschließender immunologischer Detektion durchgeführt.

Der Transfer gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine auf eine Nitrozellulose- oder PVDF-Membran wird nach dem diskontinuierlichen *Semi dry* Verfahren (Kyshe-Andersen, 1984) durchgeführt, unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems bei 1-1,5 mA/cm² für 50 min.

Der Blot wird wie folgt aufgebaut:

Kathode (-)

6 Whatmann 3 MM Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer

Polyacrylamidgel

Membran, entsprechend vorequiliert

2 Whatmann 3 MM Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer II

4 Whatmann 3 MM Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer I

Anode (+)

Der Nachweis der Proteine auf der Membran erfolgt durch Ponceau S – oder Coomassie Brilliant Blue – Färbung.

Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl 20% Ethanol in Wasser
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl 20% Ethanol in Wasser
Kathodenpuffer	40 mM Capronsäure 20% Ethanol in Wasser
Ponceau S-Färbelösung	2% Ponceau S in 3% Trichloressigsäure

Nach dem Transfer wird die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4 °C bzw. für eine Stunde bei 37 °C in 10% Milchpulver/PBST geschwenkt.

Danach wird die Membran mit dem primären Antikörper (Verdünnung in 10% Milchpulver/PBST angesetzt) für 1-3 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nichtgebundener Antikörper wird durch fünfmaliges Waschen mit PBST entfernt.

Die folgende Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper erfolgt ebenfalls in 10 % Milchpulver/PBST für 1 h bei RT.

Nach erneutem fünfmaligen Waschen wird der Blot mit dem ECL-System (Amersham Pharmacia) nach Herstellerangaben entwickelt. Als Substrat dient Luminol (3-Aminophtalhydrazid) und H₂O₂. Als Produkte bei der Peroxidase vermittelten Reaktion entstehen 3-Aminophtalsäure, Stickstoff und Lichtquanten bei einer Wellenlänge von 425 nm. Die Detektion der Lichtquanten erfolgt durch Auflegen eines Photofilms, der anschließend in einer Entwicklermaschine entwickelt wird.

PBST

0.05% Tween 20 in PBS

6.2.6 Induktionskulturen von *E.coli* zur Proteinproduktion

In der Arbeit werden verschiedene rekombinante Proteine produziert und gereinigt.

eGFP und TLM-eGFP

Bei den verwendeten Expressionsplasmiden pQe8-eGFP und pQe8-TLM-eGFP steht die zu exprimierende DNA unter der Kontrolle des lac I-Repressors, welcher von dem *E.coli* Stamm M15(pRep4) konstitutiv gebildet wird (codiert auf dem Plasmid pRep4). Durch Zugabe von IPTG kann die Induktion des gewünschten Proteins erfolgen (Farabaugh, 1978).

OVA-HA und TLM-OVA-HA

Bei den verwendeten Expressionsplasmiden pET15b-OVA-HA und pET15b-TLM-OVA-HA steht die zu exprimierende DNA unter der Kontrolle des T7-Promoters, welcher nicht durch die wirtseigene *E.coli* RNA-Polymerase abgelesen werden kann. Die Expression muß deshalb in einem speziellen Bakterienstamm, z.B. BL21(D3) durchgeführt werden, welcher das zusätzliche Gen für die T7-RNA-Polymerase besitzt. Die Expression der T7-RNA-Polymerase steht wiederum unter der Kontrolle des lac I-Repressors, welcher auf dem Plasmid pET15b codiert ist und nach Transformation der Bakterien mit diesem Plasmid gebildet wird. Durch Zugabe von IPTG ist die Expression der T7-RNA-Polymerase möglich, welche wiederum die Transkription des unter dem T7-Promotor stehenden Zielgens bewirkt und somit die Induktion des gewünschten Proteins einleitet (Studier, 1991).

Wtk, wtk-SII, TLM-wtk-SII

Bei den verwendeten Expressionsplasmiden für die (modifizierten) HBV-Core-Monomerproteine, die von dem Plasmid pASK-IBA7 abgeleitet sind, liegt das zu exprimierende Gen unter der Kontrolle eines Tetracyclin abhängigen Promotors/Operators (tetA). Die Proteinsynthese wird durch Zugabe von Anhydrotetracyclin (AHT) induziert (Skerra, 1994).

1 l vorgewärmtes LB-Medium (versetzt mit 100 µg/ml Ampicillin für pQe8, pET15b und pASK-IBA7 abgeleitete Expressionsplasmide und zusätzlich versetzt mit 25 µg/ml Kanamycin für die Verwendung von pQe8 abgeleiteten Plasmiden in M15(pRep4)), wird mit 30 ml einer Übernachtskultur angeimpft. Die Bakterien werden zu einer Dichte OD₅₉₀ von 0,3-0,5 bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen. Durch Zugabe von 1mM IPTG bzw. 0,2 mg/ml AHT (Endkonzentration) wird die übliche 4 bis 6 stündige Induktion gestartet. Ausgenommen ist die Induktion unter Verwendung der Plasmide pET15b-OVA-HA bzw. pET15b-TLM-OVA-HA, welche für ca. 14 h (über Nacht) erfolgt.

Die Bakterien werden anschließend geerntet und das Pellet einmal mit PBS gewaschen. Das Bakterienpellet wird nun zur Proteingewinnung aufgeschlossen oder bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert.

6.2.7 **Aufschluss von Bakterien**

Das gewaschene Bakterienpellet einer Induktionskultur wird in 20-30 ml Lysepuffer resuspendiert. Als Proteinaseinhibitoren werden 1 mM PMSF und 5 µg/ml Aprotinin (Endkonzentration) zugegeben.

Eine Möglichkeit des Zellaufschlusses besteht darin, die Bakterien durch Behandlung mit einem Ultraschallstab (4 x 2 min, 90% Leistung, Zyklus 4) aufzuschließen, wobei die Bakteriensuspension im Eisbad gekühlt wird.

Als weitere Möglichkeit für den Zellaufschluss kann die Verwendung einer *french press* dienen, durch welche die Bakterien bei ca. 15.000 - 25.000 psi in zwei Runden aufgeschlossen werden. In diesem Gerät wird sukzessive ein Teil der Bakteriensuspension stark komprimiert und dann schlagartig durch eine schmale Düse entweichen lassen. Dabei entstehen starke Scherkräfte und die Bakterien werden aufgeschlossen.

Nach dem Aufschluß werden unlöslichen Bestandteile durch Zentrifugation (10.000 g, 40 min, 4 °C) entfernt und das Lysat wird für weitere Reinigungsschritte eingesetzt.

6.2.8 **Reinigung von Proteinen mittels säulenchromatographischer Methoden**

Alle säulenchromatographischen Trennungen, außer die Affinitätschromatographie unter Verwendung von Streptactin belegten Tröpfelsäulen, werden mit dem *Äkta Explorer*-System (präparativer Maßstab) bzw. *Ettan LC*-System (analytischer Maßstab) (Amersham Pharmacia) durchgeführt. Dabei werden die Absorptionen bei 215 nm, 260 nm und 280 nm, sowie Druck, Leitfähigkeit, Gradient und Flussrate kontinuierlich aufgezeichnet.

6.2.8.1 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Mit Hilfe des pQe8- bzw. pET15b-Systems in Bakterien produzierte Proteine werden über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt.

Das Prinzip der Reinigung über Metall-Chelat-Chromatographie besteht darin, dass die den Proteinen N-terminal angefügten sechs Histidin-Reste mit den immobilisierten Nickelionen der Säule (durch Nitrilotriacetat vierfach koordiniert) einen oktaedrischen Komplex bilden, wobei die zwei freien Koordinationsstellen des Nickels mit den freien Elektronenpaaren des Histidins besetzt werden. Die Häufung von Histidinresten ermöglicht eine starke Bindung. Die Komplexbildung ist pH-Wert abhängig und erfolgt in der Regel unter neutralen bzw. alkalischen Bedingungen. Mit sinkendem pH-Wert nimmt die Affinität der Imidazolgruppierung in den Histidinresten zu den Metallionen durch Schwächung der elektrostatischen Wechselwirkungen ab (isoelektrischer Punkt von Histidin 6,0).

Die Elution des komplexierten Proteins kann durch pH-Änderung oder durch Chelatoren, wie z.B. EDTA oder Imidazol, erfolgen, welche mit den Histidinresten im gebundenen Protein um die immobilisierten Metallionen konkurrieren (Porath et al., 1975).

Das Lysat eines aufgeschlossenen Bakterienpellets wird mit einem Fluss von 1 ml/min auf eine mit Lysepuffer equilibrierte Ni²⁺-NTA-Agarose-Säule (Gelbett 1 ml) geladen. Anschließend wird solange nachgespült, bis die Extinktion bei 280 nm wieder einen Basiswert erreicht.

Die Elution der immobilisierten Proteine erfolgt durch Anlegen eines linearen Gradienten zwischen Lysepuffer und Imidazol haltigen Elutionspuffer über 11 Säulenvolumina (SV) bei einem Fluss von 4 ml/min.

Nach der Beendigung des Gradienten wird mit 10 ml Elutionspuffer nachgespült. Das Eluat wird zu Fraktionen à 1 ml aufgefangen.

Puffer für Aufreinigung der rekombinanten eGFP-Proteine

Lysepuffer	50 mM Tris/HCl 200 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 7,5
Elutionspuffer	50 mM Tris/HCl 200 mM NaCl 250 mM Imidazol pH 7,5

Puffer für Aufreinigung der rekombinanten OVA-Proteine

Lysepuffer	50 mM Natriumphosphat-Puffer 10 mM Imidazol pH 7,0
Elutionspuffer	50 mM Natriumphosphat-Puffer 300 mM Imidazol pH 7,0

6.2.8.2 Affinitätschromatographie (*Streptag*-System)

Mit Hilfe des pASK-IBA7 Vektors in Bakterien produzierte Proteine werden über Affinitätschromatographie gereinigt (Schmidt et al., 1996).

Das Prinzip der Reinigung besteht darin, dass der den Proteinen N-terminal angefügte acht Aminosäuren lange *Streptag* (WSHPQFEK) eine sehr hohe Affinität zu Streptactin (einem Streptavidin-Derivat) besitzt. Die Proteine können über den *Streptag* an Streptactin beladene Säulen gebunden werden. Die immobilisierten Proteine werden dann durch Desthiobiotin (ein Biotinderivat), welches eine größere Affinität zu Streptactin besitzt, in einer Konkurrenzreaktion von der Säule eluiert. Die Säule wird anschließend mit einem HABA-haltigen Puffer wieder regeneriert. Da das Streptactin belegte Säulenmaterial nicht druckstabil ist, werden die Reinigungen mit Tröpfelsäulen durchgeführt.

Das Lysat einer Induktionskultur wird über eine in Puffer W equilibrierte Streptactin-Sepharose Säule (1 ml Gelbett) gegeben. Nach dem Auftrag wird die Säule mit 20 ml Puffer W gewaschen und die immobilisierten Proteine werden mit 4 ml Puffer E eluiert. Das Eluat wird zu Fraktionen à 0,5 ml aufgefangen. Die Regeneration des Säulenmaterials erfolgt durch Waschen mit 15 ml HABA-haltigem Puffer und anschließendes Equilibrieren mit Puffer W. Werden die Säulen nicht sofort wiederverwendet, werden sie in Puffer W + 0,1% NaN₃ bei 4 °C gelagert.

Puffer W	100 mM Tris/HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer E	Puffer W mit 5 mM Desthiobiotin
Puffer R	Puffer W mit 2 mM HABA (2,-(4-hydroxy-phenylazo)-benzoesäure) filtrieren über 0,45 µm Filter

6.2.8.3 MonoQ-Ionenaustauschchromatographie

Bei einer MonoQ-Säule handelt es sich um eine Anionenaustauschersäule, welche als Austauschergruppen an ein Polymer gebundene quartäre Ammoniumgruppen trägt.

Die Anionenaustauschchromatographie wird zur Nachreinigung der rekombinanten OVA-Proteine eingesetzt, die über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie erhalten werden.

Das Protein haltige Eluat nach der Metall-Chelat-Chromatographie wird über Nacht gegen den Auftragspuffer der Anionenaustauschchromatographie dialysiert und auf eine mit diesem Puffer equilibrierte MonoQ-Säule (Gelbett 2ml) mit einem Fluss von 1 ml/min aufgetragen. Die Säule wird nach dem Auftrag solange gewaschen, bis die Absorption bei 280 nm einen Basiswert erreicht.

Anschließend werden die immobilisierten Proteine durch einen linearen Gradienten zwischen Auftrags- und Elutionspuffer über 15 SV eluiert und es wird mit 10 SV Elutionspuffer nachgewaschen, Fluss 1,5 ml/min.

Der Elutionspuffer unterscheidet sich vom Auftragspuffer durch einen höheren Phosphatanionengehalt. Die negativ geladenen Phosphatanionen konkurrieren mit dem Protein um die positiven Bindungsstellen an der Säule und verdrängen so das Protein.

Puffer für die rekombinanten OVA-Proteine

Auftragspuffer	10 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5
Elutionspuffer	150 mM Natriumphosphat-Puffer pH 6,5

6.2.8.4 Gelfiltration

Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie können Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Die Gelfiltration wird zur Abtrennung der vollständig assemblierten HBV-Corepartikel von Aggregaten und noch unassemblierten HbcAg-Monomeren/Dimeren nach *Streptag*-Affinitätschromatographie eingesetzt.

Das Protein haltige Eluat, das von den Streptactin Tröpfelsäulen erhalten wird, wird vereinigt und auf ein Volumen von 200-400 µl über Zentrifugationskonzentratoren (Ausschlussgrenze 10 kDa) eingengt.

Die Proteinlösung wird auf eine mit PBS equilibrierte Superose 6 10/300 GL-Säule mit einem Fluss von 0,4 ml/min aufgetragen. Diese Säule besitzt ein Ausschlussvolumen von 4×10^7 Da und ist für die Auftrennung im Bereich von 5000 – 5×10^6 Da geeignet.

Die Elution erfolgt isokratisch (Fluss 0,4 ml/min) und der Proteinpeak für die HBV-Corepartikel (Größe ca. $3-4 \times 10^6$ Da) kommt bei einem Elutionsvolumen von ca. 7,5-8 ml. HbcAg-Monomere/Dimere werden bei 16-17 ml eluiert. Fraktionen werden à 200 µl aufgefangen.

Die Eichung der Säule erfolgt durch Läufe mit bekannten Größenstandards.

6.2.8.5 Affinitätschromatographische Reinigung des polyklonalen Antiserums gegen Ovalbumin

Um die spezifischen Antikörper aus dem gegen Ovalbumin generierten polyklonalen Antiserum (siehe 6.4.3) anzureichern, wird das Antiserum über eine mit Ovalbumin beladene Sepharosesäule affinitätschromatographisch gereinigt.

Zur Herstellung der Ovalbumin beladenen Säule wird eine käufliche *HiTrap* NHS-aktivierte Sepharosesäule, Gelbett 1 ml nach Herstellerangaben mit Ovalbumin belegt. Das Auftragen der verschiedenen Lösungen erfolgt durch eine aufgesetzte 2 ml Spritze mit einem Fluss von 1 Tropfen/3 sec.

Durch Waschen des Gelbetts mit 6 SV 1 mM HCl wird die Gelmatrix aktiviert. Anschließend wird 1 SV Ovalbuminlösung (5 mg/ml in Kopplungspuffer) aufgetragen, die Säule oben und unten dicht verschlossen und das Gelbett in Antigenlösung für 30 min bei RT inkubiert.

Nicht abgesättigte aktive Gruppen an der Säulenmatrix werden durch Waschen mit 6 SV Blockierungspuffer abgesättigt und nicht gebundenes Ovalbumin durch zwei Runden mit alternierenden Waschpuffern mit niedrigem und hohem pH (jeweils 6 SV) ausgewaschen. Die mit Ovalbumin belegte Säule wird dann mit PBS equilibriert und die weitere Reinigung mit dem *Äkta Explorer*-System durchgeführt.

15 ml Antiserum werden mit einem Fluss von 0,15 ml/min auf die Affinitätssäule aufgetragen und solange mit PBS nachgewaschen, bis die Extinktion bei 280 nm wieder einen Basiswert erreicht.

Die Ovalbumin-spezifischen, an der Säule immobilisierten Antikörper werden mit saurem Glycinpuffer eluiert, Fluss 0,5 ml/min. Die aufgefangenen Fraktionen à 1 ml werden sofort durch Zugabe von 100 µl 0,75 M Tris/HCl pH 8,8 neutralisiert.

Die Säule wird nach der Elution wieder mit PBS gewaschen und in PBS mit 0,1% NaN₃ bei 4°C gelagert.

Die Antikörper haltigen Fraktionen werden in der SDS-Page mit anschließender Coomassie-Färbung auf Reinheit analysiert. Die drei Hauptfraktionen und die drei späteren Fraktionen werden jeweils vereinigt, gegen PBS dialysiert und nach Zusatz von 0,05% NaN₃ (Endkonzentration) in Aliquots à 200 µl eingefroren.

Ein Aliquot der Hauptfraktion wird zur Verwendung in der Immunfluoreszenzfärbung und im Westernblot ausgetestet und austitriert.

Kopplungspuffer	0,2 M NaHCO ₃ 0,5 M NaCl pH 8,3
Aktivierungspuffer	1 mM HCl
Blockierungspuffer	0,5 M Tris/HCl 0,5 M NaCl pH 8,0
Waschpuffer A	0,5 M Tris/HCl 0,5 M NaCl pH 8,0
Waschpuffer B	0,1 M Acetat 0,5 M NaCl pH 4,0
Elutionspuffer	0,1 M Glycin pH 2,7
Neutralisierungspuffer	0,75 M Tris/HCl pH 8,8

6.3 Molekularbiologische Methoden

6.3.1 Restriktionsspaltung von DNA

In der Gentechnologie werden vorwiegend Restriktionsenzyme vom Typ II eingesetzt. Ihre Erkennungsstellen auf der DNA sind vier bis acht Basen lang (häufig Palindrome) und die Spaltstellen liegen genau bei den Erkennungsstellen. Bei der Restriktionsspaltung der DNA können abhängig vom Enzym entweder DNA-Fragmente mit überstehenden Einzelstrangabschnitten oder DNA-Fragmente mit glatten Enden entstehen.

Als 1Unit (1U) an Restriktionsenzym wird diejenige Menge Enzym bezeichnet, welche 1µg DNA in einer Stunde hydrolysieren kann.

Restriktionsanalysen von Vektoren und PCR-Produkten werden während der Klonierung von gewünschten Konstrukten eingesetzt.

6.3.2 Agarosegelelektrophorese

DNA-Fragmente können mittels Agarosegelelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und danach mit großer Empfindlichkeit mit Ethidiumbromid nachgewiesen werden.

Für das Gießen der Gele wird Agarose in der erforderlichen Konzentration (verwendeter Konzentrationsbereich 0,8-2 %) in 1x TAE-Puffer unter Rühren aufgekocht. Die Lösung wird auf ca. 50-60 °C abkühlen lassen. Anschließend wird Ethidiumbromid (Endkonzentration 50 ng/ml) zugesetzt und die Lösung in eine abgedichtete, horizontale Gelkammer mit Ladekamm gegossen. Das Gel wird vor der Beladung mit DNA mindestens für eine Stunde erkalten und auspolymerisieren lassen.

Die aufzutrennenden DNA-Proben werden mit der entsprechenden Menge 5x Probenauftragspuffer versetzt und in die Geltaschen geladen. Unter Verwendung von 1x TAE als Laufpuffer wird die Gelelektrophorese bei einer Feldstärke von 2-10 V/cm durchgeführt.

Die Detektion und Dokumentation des Gels erfolgt anschließend auf dem UV-Transilluminator mit Photographier-Einheit.

1x TAE	40 mM Tris/HCl, pH 8,0 40 mM Natriumacetat 1 mM EDTA
--------	--

5xProbenauftragspuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 100 mM NaCl 30 % Glycerin, 0,25% Bromphenolblau
------------------------	--

6.3.3 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung von DNA und RNA in wässriger Lösung kann durch Absorptionsmessung bei 260 nm erfolgen. Bei dieser Wellenlänge entspricht die Extinktion von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 30 µg/ml Oligonukleotiden bzw. 40 µg/ml RNA.

Anhand der UV-Absorption kann auch die Reinheit einer DNA-/RNA-Präparation überprüft werden. Bei einer reinen Probe liegt das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280nm bei 1,8 - 2. Geringere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Protein oder Phenol hin.

6.3.4 DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen

Zur Aufreinigung linearer DNA-Fragmente aus präparativen Agarosegelen wird nach Ethidiumbromidfärbung die gewünschte Bande unter UV-Licht mit einem Skalpell möglichst knapp ausgeschnitten und ausgewogen. Die Elution der DNA aus dem Gel erfolgt mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) laut Anleitung des Herstellers.

Das Prinzip des Kits besteht darin, das Gelstück durch eine hohe Konzentration von chaotropen Salzen aufzulösen. Anschließend wird die gelöste DNA an ein Silikagel-Material unter hoher Salzkonzentration adsorbiert. Nach Waschschritten des Säulenmaterials zur Entfernung von Agarose- und Salzresten erfolgt die Elution der DNA-Fragmente bei niedriger Salzkonzentration und unter basischen Bedingungen (optimaler pH-Bereich 7,0 und 8,5). Das ausgeschnittene Agarose-Gelstück wird in dreifachem Volumen (m/V) QG-Puffer bei 50°C für 10 min geschmolzen. Die so erhaltene DNA-Lösung wird durch Zentrifugation auf eine Säule geladen und die DNA auf der Säule anschließend mit Waschlösung PE gewaschen. Für DNA-Fragmente < 500 bp und > 4 kb wird ein zusätzlicher Waschschriff mit Isopropanol durchgeführt. Nach Trockenzentrifugation der Säule wird die DNA in 30-50 µl H₂O eluiert.

6.3.5 Reinigung von DNA aus Reaktionsansätzen

Die Reinigung von DNA aus Restriktionsanalysen, PCR-, Dephosphorylierungs- oder Ligase-Reaktionen wird mittels *QIAquick PCR Purification Kit* laut Herstellerangaben durchgeführt. Das Prinzip der Reinigung ist analog wie unter 6.3.4 beschrieben.

Maximal 10 µg der zu reinigenden Nukleinsäuren werden auf 600 µl mit PB-Puffer versetzt, auf eine Spinsäule gegeben und durch Zentrifugation (13.000 rpm, 1 min) auf der Membran immobilisiert. Die DNA auf der Säule wird anschließend mit Waschlösung PE gewaschen. Nach Trockenzentrifugation der Säule wird die DNA in 30-50 µl H₂O eluiert.

6.3.6 Dephosphorylierung von linearisierter DNA mit alkalischer Phosphatase

Die Umsetzung linearisierter Vektoren mit alkalischer Phosphatase dient zur Verhinderung der Religation durch das Entfernen der 5' terminalen Phosphatgruppen.

Dazu werden bis zu 15 µg linearisierte DNA mit 1/10 des Endvolumens 10 x CIP-Puffer und 5 U alkalischer Phosphatase versetzt. Nach 30 minütiger Inkubation bei 37 °C werden weitere 5 U Enzym zugesetzt und erneut für 30 min inkubiert.

Die Reinigung der DNA aus dem Dephosphorylierungsansatz zur Abtrennung des Enzyms erfolgt mittels *QIAquick PCR Purification Kit* laut Herstellerangaben (siehe 6.3.5).

6.3.7 DNA-Ligation

Die Ligase des Phagen T4 katalysiert in einer ATP-abhängigen Reaktion die kovalente Verknüpfung der 5' Phosphatgruppe eines DNA-Moleküls mit der 3' OH-Gruppe eines anderen. In der Ligationsreaktion während der Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls erfolgt die Verknüpfung des geschnittenen Vektormoleküls mit dem zu klonierenden DNA-Fragment. Die Ligase verbindet die beiden DNA-Moleküle durch Knüpfung von zwei Phosphodiesterbindungen.

Die Ligation erfolgt bei einem 3-7 fachen molaren Überschuß des zu klonierenden DNA-Fragmentes gegenüber des Vektors (optimales Verhältnis muß ausgetestet werden).

Die Menge des *Inserts* berechnet sich nach folgendem Schema:

$$\text{Menge (Insert) [ng]} = \frac{(\text{Menge (Vektor) [ng]} \times \text{Basenpaare (Insert)} \times \text{molarer Überschuß})}{\text{Basenpaare (Vektor)}}$$

150 ng des linearisierten Vektors und die entsprechende Menge des *Inserts* werden mit H₂O auf ein Volumen von 17 µl gebracht, danach 2 µl 10 x Ligasepuffer und 1 µl T4-Ligase zugesetzt. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 16 °C.

Der Ligationsansatz wird ohne weitere Aufbereitung zur Transformation in *E. coli* eingesetzt.

6.3.8 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode erlaubt die Amplifizierung von DNA-Abschnitten. Man nutzt die Eigenschaft der DNA-Polymerase aus, einen DNA-Einzel- zum Doppelstrang aufzufüllen, wenn ein kurzer doppelsträngiger Bereich vorliegt. Man benötigt zwei Primer, die jeweils mit einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes hybridisieren, ausreichende Menge der vier Desoxynukleosid-Triphosphate und eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Für analytische PCR Analysen wird die DNA-Polymerase I aus *Thermus aquaticus* (Taq Polymerase) verwendet. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 72 °C. Zu beachten ist, dass die Taq Polymerase eine Fehlerrate von 1 Base in 10.000 bp besitzt, d.h. es kommt statistisch nach 25 Zyklen zu einem Fehler in 400 bp.

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten zum Einsatz für die Klonierung wird deshalb eine DNA-Polymerase I (*Advantage* Polymerase, Clontech) eingesetzt, welchen einen Korrekturlese-Mechanismus (*proofreading* Aktivität) besitzt. Sie bietet dadurch den Vorteil einer geringeren Fehlerfrequenz bei der DNA-Amplifikation. Das Temperaturoptimum dieser Polymerase liegt bei 68 °C. Außerdem werden durch diese Polymerase PCR-Produkte mit glatten Enden statt mit Einzelstrang-DNA-Überhängen synthetisiert (z.B. Überhang eines Adenosins bei Amplifikation mit der Taq Polymerase).

Um Subklonierungen unabhängig von vorhandenen Restriktionsschnittstellen durchführen zu können, werden für die Amplifikation von zu subklonierenden Fragmenten Überhang-Oligonukleotide eingesetzt, welche auf der 5'-Seite des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes die gewünschte Restriktionsschnittstelle enthalten. Um eine hinreichende Effizienz des Restriktionsverdau zu erzielen, werden in Abhängigkeit von der gewählten Schnittstelle auf der 5'-Seite noch zusätzlich 3-6 Nukleotide als Überhang angefügt.

Bei der Subklonierung von Fragmenten in Vektoren, welche selbst kein ATG-Codon oder Stop-Codon enthalten, werden diese ebenfalls durch die Oligonukleotide eingeführt. Ebenso werden zusätzlich gewünschte Sequenzabschnitte, welche z.B. für das TLM oder SIINFEKL-Epitop kodieren, durch Überhangprimer eingeführt.

Ein Ansatz einer Standard-PCR hat ein Gesamtvolumen von 50 μ l. 10-100 ng *Template* werden mit je 100 pmol Vorwärts- und Rückwärtsprimer (Endkonzentration 2 μ M), je 25 nmol jedes der vier dNTPs (Endkonzentration 500 μ M), 5 μ l 10x Reaktionspuffer und Wasser auf ein Volumen von 50 μ l gebracht. Nach Zugabe von 0,5 U Polymerase werden die Zyklen (in der Regel 25-30) in einem Thermoblock gestartet.

Als Negativkontrolle wird ein Ansatz ohne *Template* pipettiert.

Der PCR- Lauf wird nach folgendem Programm durchgeführt:

- | | |
|----------------------------|---|
| 1.) Denaturierung der DNA | 60 sec bei 94 °C |
| 2.) Denaturierung der DNA | 60 sec bei 94 °C |
| 3.) Anlagerung der Primer | 60 sec bei 55-62 °C
(Anlagerungstemperatur für das jeweilige Primerpaar) |
| 4.) DNA-Strangverlängerung | 120 sec bei 72 °C bzw. 68 °C
--> 25 -30 Zyklen für Schritte 2-4 |
| 5.) Endpolymerisierung | 10 min bei 72 °C bzw. 68 °C |

6.3.9 Sequenzierung von DNA-Molekülen

Zur automatischen Sequenzierung von DNA wird der *ABI PRISM Ready Reaction Dye Desoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (Perkin Elmer, Weiterstadt) verwendet.

Das Prinzip der Methode basiert auf einer Modifikation der klassischen Kettenabbruchmethode nach Sanger (1977). Ausgenutzt wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase, einzelsträngige DNA, die an definierten Stellen durch einen Primer doppelsträngig gemacht wird, zu einem Doppelstrang aufzufüllen. Als DNA-Polymerase wird in der Regel das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I benutzt, das keine 5'-3'-Nuklease-Aktivität besitzt. Das besondere bei dieser Methode ist nun, dass dem Reaktionsansatz neben den Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) noch 2',3'-Dideoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) zugegeben werden, die jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert sind. Wenn eine solche Base in die wachsende DNA-Kette eingebaut wird, kommt die DNA-Synthese zum Erliegen, weil am 3' Ende keine freie OH-Gruppe für die Kettenverlängerung vorhanden

ist. Nach mehreren Zyklen erhält man somit ein Gemisch aus verschiedenen DNA-Fragmenten, die sich in der Länge am 3' Ende unterscheiden, je nachdem, wann das entsprechende ddNTP eingebaut wurde.

Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente eines Ansatzes können gelelektrophoretisch aufgetrennt werden; nach Auswertung des Sequenzgels über Fluoreszenzmessung kann über die Länge des jeweiligen DNA-Fragmentes und Bestimmung des ddNTP's an seinem 3' Ende für jede Stelle in der Sequenz die entsprechende Base zugeordnet werden.

Durch Sequenzierung wird überprüft, ob bei einer Klonierung die Insertion des gewünschten Fragmentes in den Vektor in richtiger Orientierung, Leserahmen und Sequenz erfolgt ist.

Für die Reaktion werden 300-500 ng DNA, 10 pmol des spezifischen Primers und 4 µl *Terminator* Mischung, welche die Polymerase, die Mischung der dNTPs und fluoreszent markierten ddNTPs, sowie den konzentrierten Reaktionspuffer enthält, in einem Endvolumen von 20 µl gemischt.

Das *Cycle Sequencing* wird nach folgendem Programm durchgeführt:

Denaturierung der DNA	30 sec bei 96 °C
Anlagerung des Primers	20 sec bei 55 °C
DNA-Strangverlängerung	4 min bei 60 °C

Nach einer Denaturierung der DNA bei 96 °C für 2 min zu Beginn der Reaktion wird das obige Programm mit 28 Zyklen wiederholt.

Die weitere Aufbereitung der Ansätze wird durch eine Service-Einheit im Robert Koch-Institut Berlin, durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten werden durch Sequenzvergleiche auf ihre Richtigkeit überprüft.

6.3.10 Stammhaltung und -pflege von *E. coli*

Flüssigkulturen dienen der Anzucht von *E.coli* bis zur gewünschten Zelldichte bzw. Wachstumsphase.

Plattenkulturen dienen der Anzucht von Klonen (z.B. Ausplattieren nach der Transformation mit rekombinanter DNA), sowie der Arbeit mit Einzelkolonien. Sie eignen sich zur mittelfristigen Lagerung von Kulturen (ca. 4 Wochen). Die Platten werden zur Anzucht von *E. coli*. umgekehrt bei 37 °C ca. 18- 24 h inkubiert.

Dauerkulturen dienen der längerfristigen Lagerung (mehrere Jahre) bei -80 °C. Zum Anlegen einer Dauerkultur (Glycerolstocks) werden 800 µl einer dicht gewachsenen Übernachtskultur mit 300 µl sterilem Glycerin in ein Kryoröhrchen zusammenpipettiert, durch Vortexen gründlich gemischt und dann bei -80 °C gelagert.

Für die Anzucht wird mit einer sterilen Impföse etwas Material aus einem Glycerolstock herausgenommen und auf einer Platte ausgestrichen bzw. direkt ein entsprechendes Flüssigmedium angeimpft.

LB-Medium	1% Bactotrypton 0,5% <i>Yeast Extract</i> 0,5% NaCl in H ₂ O, pH 7,0	
Antibiotikazusatz	Ampicillin 100 µg/ml Kanamycin 25 µg/ml	(1000 fach Stocklösung 100 mg/ml) (1000 fach Stocklösung 25 mg/ml)

Alle Medien werden bei 120 °C für 20 min autoklaviert.

Die Rezepte sind für Flüssigmedien angegeben. Für Plattenmedien wird vor dem Autoklavieren 1,5% Agar hinzugegeben.

6.3.11 Gewinnung chemisch kompetenter *E. coli*

E. coli nehmen unter normalen Bedingungen keine DNA-Moleküle auf. Durch eine chemische Behandlungsmethode mit zweiwertigen Metallionen, deren Wirkmechanismus noch nicht genau verstanden ist, aber wahrscheinlich die Membranen löchrig macht, kann die Aufnahme von DNA in *E. coli* erreicht werden; die Bakterien werden dann als chemisch kompetent bezeichnet. Durch einen Hitzeschock, dessen Wirkungsweise ebenfalls noch nicht geklärt ist, wird die DNA-Aufnahme in die Bakterien wieder beendet. Die Selektion transformierter Zellen, die DNA aufgenommen haben, erfolgt anschließend durch Ausplattieren auf Platten mit dem entsprechenden Selektionsmedium.

800 ml LB-Medium werden mit 10 ml einer Übernacht-Kultur des entsprechenden *E. coli* Stamms angeimpft und die Bakterien im Schüttelinkubator zu einer Dichte von OD₆₀₀ = 0,5 angezogen. Die Bakterien werden kalt in sterilen Zentrifugenbechern pelletiert und in 50 ml eiskaltem TFB1 Puffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 90 min auf Eis wird im vorgekühlten Rotor abzentrifugiert und die Bakterien in 15 bis 20 ml TFB2 resuspendiert. Die Zellsuspension wird anschließend in 100-500 µl Aliquots abgefüllt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die chemisch kompetenten Bakterien können bis zu 3 Monaten bei -70 °C gelagert und für spätere Transformationen eingesetzt werden.

Die erwartete Transformationseffizienz bei dieser Methode beträgt 1×10^6 - 1×10^7 Kolonien/µg *supercoiled* Plasmid.

TFB1-Puffer	100 mM Rubidiumchlorid 50 mM Manganchlorid 30 mM Kaliumacetat 10 mM Calciumchlorid 15% Glycerin pH 5,8; sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C
TFB2-Puffer	10 mM MOPS, pH 8,0 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM Calciumchlorid 15% Glycerin sterilfiltrieren Lagerung bei 4 °C

6.3.12 Transformation von *E. coli* mit rekombinanter DNA

Für die Transformation werden 100 µl chemisch kompetenter Bakterien mit 20 µl Ligationsansatz (siehe 6.3.7) zusammenpipettiert und mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Der anschließende Hitzeschock erfolgt für genau 90 sec bei 42 °C; danach folgt eine 5-minütige Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 500 µl warmem LB-Medium können sich die Bakterien nach der Transformation erholen durch Inkubation für 50 min bei 37 °C im Schüttelinkubator. Der gesamte Ansatz der transformierten Bakterien wird dann pelletiert und in 100 µl LB-Medium auf geeigneten Selektionsplatten ausgestrichen. Die Selektionsplatten werden mit dem Deckel nach unten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

6.3.13 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Die Gewinnung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgt je nach benötigter Menge mittels *Qiaprep Spin Miniprep Kit* (10-20 µg Ausbeute) bzw. *Qiaprep Spin Maxiprep Kit* (200 bis zu 500 µg Ausbeute) nach Herstellerangaben.

Die Präparation basiert auf dem von Binboim und Doly (1979) beschriebenen Verfahren. Dabei werden die Bakterien unter alkalischen Bedingungen und SDS aufgeschlossen. Gleichzeitig kommt es zu einer Alkalidenaturierung der DNA. Nach Neutralisierung des Lysates können sich die Plasmid-DNA-Moleküle wieder zusammenlagern, weil die beiden Stränge aufgrund ihrer Konformation bei der Denaturierung noch "ineinander verkettet bleiben". Im Gegensatz dazu ist die genomische DNA unlöslich und läßt sich durch Zentrifugation leicht entfernen, während die Plasmide im Überstand zurückbleiben.

Wenn man die Zellen mit SDS und unter Zusatz von RNase im Lysepuffer aufschließt und die Reaktion anschließend mit Natriumacetat neutralisiert, werden auch Proteine zum größten Teil ausgefällt und die RNA abgebaut.

Um die so erhaltene Plasmid-DNA noch weiter aufzureinigen, schließt sich eine Aufarbeitung über eine Anionenaustauschersäule an. Die Plasmid-DNA wird dann nach Elution durch Isopropanol-Präzipitation aufkonzentriert und entsalzt.

Die Durchführung der präparativen Plasmid-DNA-Isolierung erfolgt laut Herstellerangaben.

Das Bakterienpellet aus 100-300 ml Übernachtskultur wird in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Durch vorsichtiges Mischen mit 10 ml Puffer P2 und einer fünfminütigen Inkubation bei RT werden die Bakterien lysiert. Zur Neutralisierung werden zu dem Lysat 10 ml Puffer 3 zugegeben, sofort vorsichtig gemischt und bei einer nachfolgenden Inkubation von 20 min auf Eis werden die chromosomale DNA und Protein der Bakterien ausgefällt.

Nach Zentrifugation bei 13.000 g für 30 min bei 4 °C wird der klare Überstand durch eine Gaze (zum Entfernen von Schwebeteilchen) auf eine mit Puffer QBT äquilibrierte Säule geladen. Nach 2 Waschrufen mit jeweils 30 ml Puffer QC wird die Plasmid-DNA mit 15 ml Puffer QF von der Säule eluiert. Die DNA wird durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und durch Zentrifugation bei 13.000 g für 30 min bei 4 °C gefällt. Das DNA-Pellet wird anschließend mit 5 ml 70% Ethanol gewaschen und für 10-15 min bei RT getrocknet. Das Pellet wird je nach Größe in 200-500 µl H₂O aufgenommen; die Konzentration, sowie Reinheit der Plasmidpräparation wird photometrisch und gelelektrophoretisch bestimmt.

6.4 Immunologische Methoden

6.4.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Um die Expression und die Lokalisation von Proteinen in Zellen oder Geweben festzustellen, eignet sich sehr gut die Methode der indirekten Immunfluoreszenzfärbung.

Bei Untersuchungen von adhärent wachsenden Zellen werden die Zellen auf Glasplättchen in der gewünschten Dichte ausgesät (ca. $3\text{-}5 \times 10^4$ HepG2-Zellen je Loch einer 24 Loch Platte). Nach einem Waschschrift mit PBS werden die Zellen in $-20\text{ }^\circ\text{C}$ kaltem Ethanol bzw. mit 4% Formaldehydlösung in PBS (RT) für ca. 15 - 20 Minuten fixiert und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Für Untersuchungen von Suspensionszellen werden Tropfpräparate angefertigt. 1×10^6 Zellen (z.B. EL-4-Zellen) werden pelletiert und zur Fixierung in $700\text{ }\mu\text{l}$ Ethanol bzw. 4% Formaldehydlösung resuspendiert (siehe oben). Nach 20 min werden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in $400\text{ }\mu\text{l}$ PBS aufgenommen und 4 Tropfpräparate auf Objektträgern hergestellt, welche für mehrere Stunden bei RT getrocknet werden.

Die fixierten Präparate können direkt für Färbungen eingesetzt oder bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ einige Monate gelagert werden.

Für die Immunfluoreszenzfärbung werden die Zellen durch Inkubation in PBST für 30 min rehydratisiert, sowie permeabilisiert. Danach werden unspezifische Bindungen durch Inkubation mit 10% BSA in PBST abgesättigt.

Die Inkubation mit dem antigenspezifischen Primärantikörper erfolgt für 1-2 h bei RT in einer feuchten Kammer. Nach drei Waschschriften mit PBST je 10 min werden die Präparate mit dem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper lichtgeschützt in einer feuchten Kammer für 1 h bei RT inkubiert. Die entsprechenden Antikörperverdünnungen werden in 10% BSA in PBST hergestellt.

Soll eine Gegenfärbung des Zellkörpers erfolgen, wird zur Anfärbung des Zytoskeletts Fluorochrom-konjugiertes Phalloidin in einer Verdünnung von 1:800 der Lösung des sekundären Antikörpers zugesetzt.

Nach Inkubation mit der Sekundärantikörperlösung wird erneut dreimal mit PBST je 10 min gewaschen. Die auf den Glasplättchen fixierten gefärbten Zellen werden mit der Zellseite nach unten in Glycerin/PBS auf Objektträgern „eingedeckelt“. Auf die Suspensionszellen wird ein Tropfen Glycerin/PBS gegeben und die Zellen blasenfrei mit einem Deckgläschen abgedeckt.

Die Auswertung der Präparate erfolgt mit einem Fluoreszenzmikroskop mit entsprechendem Filtersystem.

6.4.2 Durchflußzytometrie

Im Durchflußzytometer können Zellen auf morphologische Eigenschaften (Größe, Granularität und Integrität der Zellmembran), sowie nach Färbung mittels indirekter Immunfluoreszenz auf die Expression von intrazellulären und Oberflächenproteinen untersucht werden.

Das Gemisch der fluoreszent markierten Zellen wird in einem Durchflußzytometer (FACS-Gerät, *fluorescence activated cell scanner*) durch eine Kapillare gedrückt. Dadurch entsteht ein Strom einzelner Zellen, der nacheinander zwei Laserstrahlen, einen 488 nm Argonlaser und einen 635 nm Diodenlaser, passiert. An den Zellen kommt es zu einer Lichtstreuung und die Fluorochrome werden zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt.

Photodetektoren messen sowohl das gestreute, als auch das emittierte Licht. Ersteres liefert Informationen über die Größe und Granularität der Zellen. Die Messung der Fluoreszenz ermöglicht Aussagen über die Bindung der mit Fluoreszenzfarbstoffen-markierten Antikörper und damit über die Expression der interessierenden Proteine in und auf jeder Zelle.

Das in geringem Winkel gestreute und mit der Größe der Zellen korrelierende Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter, FSC*) bezeichnet. Das um 90° gestreute und mit der Granularität der Zelloberfläche korrelierende Licht heißt Seitwärtsstreuung (*side scatter, SSC*).

Über die Anregung mit dem Argonlaser können das Streulicht und die Fluoreszenzen der Wellenlängen 530 nm (FL1), 585 nm (FL2) und 650 nm (FL3), über die Anregung des Diodenlasers die Fluoreszenz der Wellenlänge 661 nm (FL4) gemessen werden.

Durch die Durchflußzytometrie ist eine schnelle, sechs Parameter umfassende Analyse von Zellen möglich (herkömmliche Geräte). Mittlerweile sind Geräte mit einem zusätzlichen Laser ausgestattet auf dem Markt, die noch weitere Parameter gleichzeitig messen können.

6.4.2.1 Färbung von Oberflächenmarkern

Pro Färbung werden ca. 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellen werden zur Blockierung von Fc-Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit 50 µl Polyglobinlösung für 5 min auf Eis inkubiert. Danach werden 4 µl der jeweiligen Fluorochrom-konjugierten Antikörperlösung zugegeben (10 µg/ml Endkonzentration des jeweiligen Antikörpers). Nach einer 20-30 minütigen Inkubation der Zellen lichtgeschützt auf Eis werden die Zellen zweimal mit FACS-PBS gewaschen und in 200 µl FACS-PBS für die Vermessung im Durchflußzytometer resuspendiert.

Wird ein nicht fluoreszent markierter Primärantikörper verwendet, erfolgt die Inkubation nach den Waschschritten analog für den Fluorochrom-konjugierten Sekundärantikörper.

Zur Erfassung der toten Zellen wird der Ansatz mit 0,3 µg/ml Propidiumiodid Endkonzentration versetzt. Propidiumiodid ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff, der aus intakten Zellen nach Eindiffusion wieder hinaustransportiert werden kann. Bei toten Zellen kann der Farbstoff durch die geschädigte Zellmembran in die Zelle gelangen und die abgestorbenen Zellen anfärben.

In Abhängigkeit der Frequenzen positiver Zellen werden 10^4 bis 10^6 lebende, PI-negative Zellen analysiert.

FSC- und SSC-Signale werden mit linearer, Fluoreszenzsignale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Die Daten werden mit dem Programm Cell Quest (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert. Sie werden entweder als eindimensionale Histogramme, die nur ein Fluoreszenzsignal zeigen, oder als zweidimensionale Punktfeld-Graphen (*Dot plots*), bei welchen für jede Zelle zwei Parameter gezeigt werden können, dargestellt.

Die Expressionsdichte des fluoreszent markierten Antigens wird durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) quantifiziert.

Fluorochrom	Anregungsmaximum (nm)	Emissionsmaximum (nm)	Detektion
FITC	488	525	FL-1
PE	488	575	FL-2
Cy5	633, 635	667	FL-4
Propidiumiodid (PI)	488	620	FL-2 / FL-3

6.4.2.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Um die Produktion von ansonsten sekretierten Zytokinen in einer Zelle nachzuweisen, müssen die gebildeten Zytokinmoleküle in der Zelle zurückgehalten werden.

Dazu wird Brefeldin A verwendet. Brefeldin A ist ein makrozyklisches, zytotoxisches, antivirales und antibiotisches Agenz, das aus mehreren Pilzen isoliert werden kann (Klausner et al., 1992). Brefeldin A verhindert den intrazellulären Proteintransport, dadurch dass es die Fusion von Golgi Stapeln mit dem ER induziert, so dass neusynthetisierte Proteine, welche für die Sekretion bestimmt sind, nicht weiterprozessiert werden. Die Proteine können so in der Zelle zurückgehalten und durch intrazelluläre Färbung analysiert werden. Zu lange Behandlung mit Brefeldin A führt zum Zelltod. Die Zellen werden deshalb für ca. 3 bis 4 h während des optimalen Syntheszeitraums mit Brefeldin A inkubiert.

Da bei der Färbung der intrazellulären Zytokine die spezifischen Antikörper in die Zellen gelangen müssen, müssen die Zellen fixiert und die Zellmembran durchlässig gemacht werden.

Nach der Inkubation der Zellen mit Brefeldin A werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 2% Formaldehydlösung in PBS (RT) für 20 min fixiert. Anschließend werden die Zellen zweimal mit Facs-PBS gewaschen; sie können dann direkt für die intrazelluläre Färbung eingesetzt oder bei 4°C mehrere Wochen gelagert werden.

Für die intrazelluläre Färbung werden ca. 1×10^6 Zellen in 50 μ l Saponinpuffer resuspendiert. Saponin ist ein Detergenz und macht die Zellmembran löchrig. Die Färbung der Zellen wird, wie unter 6.4.2.1 beschrieben, durchgeführt; allerdings erfolgt die Antikörperinkubation bei RT und alle Schritte werden mit Saponinpuffer durchgeführt. Nach dem letzten Waschschrift werden die Zellen in 200 μ l Facs-PBS aufgenommen und im Durchflußzytometer analysiert. Da die Zellen fixiert und somit tot sind, ist eine Färbung mit Propidiumiodid nicht sinnvoll. Die Aufnahme der Zellen und Auswertung der Daten erfolgt wie unter 6.4.2.1 beschrieben.

Facs-PBS	2,5% FCS 0,1% NaN ₃ in PBS
----------	---

Polyglobinlösung	0,05 mg /ml Ratten IgG anti Maus F _c -Rezeptoren Antikörper (Pharmigen), 1:200 verdünnt in Facs-PBS angesetzt
------------------	--

Propidiumiodidstammlösung	1 µg/ml angesetzt in Facs-PBS
Brefeldin A-Lösung (1000x)	5 mg Brefeldin A in 1 ml DMSO lösen Stammlösung bei -80 °C lagern Stammlösung 1:100 in serumfreien Medium vorverdünnen und 1: 10 in den Zellansatz zusetzen
Formaldehydlösung	2% Formaldehyd in PBS
Saponin-Lösung (10x)	5% Saponin (w/V) in Facs-PBS

6.4.3 Gewinnung eines polyklonalen Antiserums gegen Ovalbumin

Zur Generierung eines polyklonalen Antiserums gegen Ovalbumin wurde ein Kaninchen für jeden Immunisierungsschritt mit jeweils 6 mg Ovalbumin (Sigma) in kompletten (CFA) bzw. inkompletten Freundschens Adjuvans (IFA) intramuskulär immunisiert.

Vor der Immunisierung wurde dem Tier Serum entnommen, welches das Präimmunserum darstellt. Nach jedem Immunisierungsschritt wurde dem Tier ebenfalls Blut zur Serumgewinnung abgenommen. Die Seren wurden im Western Blot auf Spezifität und Zunahme des Antikörpertiters gegen Ovalbumin analysiert und anhand dieser Ergebnisse der Zeitpunkt für die Entblutung des Tieres festgelegt. Aus dem Tier wurden ca. 80 ml Serum gewonnen.

15 ml des Serums werden über Affinitätschromatographie gereinigt (siehe 6.2.7.5) und die erhaltene Antikörperlösung auf Einsatzmöglichkeit in der Immunfluoreszenzfärbung und im Western Blot ausgetestet bzw. austitriert.

Der übrige Teil des Serums wird in Aliquots à 10 ml bei – 20 °C gelagert.

Die Immunisierungen, Blutabnahmen und Entblutung des Tieres wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Huser, Robert Koch-Institut Berlin, durchgeführt.

<u>Tag</u>	<u>Behandlung</u>
	Entnahme des Präimmunserums
0	1. Injektion (6 mg Ovalbumin in CFA, intramuskulär)
14	1. Serumprobe 2. Injektion (6 mg Ovalbumin in CFA, intramuskulär)
25	2. Serumprobe 3. Injektion (6 mg Ovalbumin in CFA, intramuskulär)
39	3. Serumprobe 4. Injektion (6 mg Ovalbumin in IFA, intramuskulär)
47	4. Serumprobe
54	5. Injektion (6 mg Ovalbumin in CFA, intramuskulär)
61	Entblutung

6.4.4 Zytotoxizitätstest

6.4.4.1 Chromfreisetzungstest (*Chromrelease*)

Zytotoxische CD8⁺ T-Effektorzellen töten im Allgemeinen alle Zellen, welche den von ihnen spezifisch erkannten MHC-I:Peptid-Komplex präsentieren. Die CD8⁺ T-Zell-Funktion lässt sich darum mit einem einfachen und schnellen biologischen Test nachweisen, dem Abtöten der Zielzelle durch eine zytotoxische T-Zelle. Der Test beruht auf der Freisetzung von ⁵¹Cr. Lebende Zellen, besonders gut stark proliferierende Zellen, nehmen radioaktives Chromat (Na₂⁵¹CrO₄) zwar auf, geben es aber nicht spontan wieder ab. Werden die markierten Zellen abgetötet, kann das daraus freigesetzte radioaktive Na₂⁵¹CrO₄ im Überstand gemessen werden.

Zytotoxische T-Zellen können über verschiedene Wege Zielzellen lysieren. Zum einen kann durch sezernierte Zytokine und über das Fas/Fas-Liganden-System in der Zielzelle Apoptose induziert werden. Außerdem kann durch direkten Zell-Zell-Kontakt eine Lyse der Zielzelle hervorgerufen werden, wobei durch Einbau von Perforinen in die Zellmembran die Zielzelle löchrig gemacht werden und eine Nekrose hervorgerufen werden kann. Die zeitliche Abstufung der drei Mechanismen ergibt für die Lyse eine Dauer um 4 h, Fas/Fas-Liganden-System um 6 h und Zytokin vermittelte Apoptose bis über 24 h. Im Zytotoxizitätstest wird deshalb nur die direkte Lyse der Zielzellen als ein Tötungsmechanismus von zytotoxischen T-Zellen gemessen.

1x10⁶ Zielzellen werden in 1 ml Kultivierungsmedium aufgenommen und zur radioaktiven Markierung nach Zugabe von 3,7 MBq ⁵¹Cr für 1 h bei 37 °C im leicht schüttelnden Wasserbad inkubiert. Die Zellen werden anschließend gründlich 2 mal mit Kultivierungsmedium gewaschen und auf eine Zelldichte von 2x10⁵ Zellen/ml eingestellt, was einer Zellzahl von 5000 Zielzellen in 25 µl entspricht.

Während der radioaktiven Markierung werden die zytotoxischen T-Zellen geerntet, ausgezählt und vorbereitet.

In jedes Loch einer 96 Loch Rundbodenplatte werden 5000 Zielzellen in 25 µl vorgelegt und die zytotoxischen T-Zellen in 200 µl in einer Titrationsreihe von 100:1 bis 6.25:1 (Verhältnis von Effektorzellen : Zielzellen) in zweier Schritten zugegeben (Dreifachbestimmung). Wenn weniger Effektorzellen zur Verfügung stehen, wird die Titrationsreihe entsprechend zu geringeren Verhältnissen von Effektorzellen : Zielzellen hin angepasst.

Für die Spontanlyse wird den Zielzellen 200 µl Kultivierungsmedium ohne Effektorzellen zugesetzt und für die maximale Lyse wird 200 µl 10% Triton X100 in PBS zugegeben (jeweils Sechsfachbestimmung).

Um den Kontakt von Effektor- und Zielzellen zu erhöhen, werden die ausgelegten Zellen in der 96 Loch Platte für 2-3 min bei 350 g bei RT zentrifugiert. Die Platte wird dann für 4-5 h bei 37 °C inkubiert. Danach werden die Überstände auf spezielle Wattestäbchen geerntet, welche den flüssigen Kulturüberstand aufsaugen, das Zellpellet aber in der Platte zurücklassen. Die mit dem radioaktiven Überstand vollgesogenen Wattestäbchen werden in Röhren überführt und in einem γ-Counter ausgelesen.

Die prozentuale spezifische Lyse wird über folgende Formel berechnet:

$$\text{Spezifische Lyse} = \frac{(\text{cpm (Experimentalfreisetzung)} - \text{cpm (Minimalfreisetzung)})}{(\text{cpm (Maximalfreisetzung)} - \text{cpm (Minimalfreisetzung)})} \times 100\%$$

6.4.4.2 *in vivo* Zytotoxizitätstest

Dieses Testsystem erlaubt den Nachweis spezifischer zytotoxischer T-Zellen direkt im Tier (Oehen et al., 1998). Stark fluoreszent markierte, mit dem spezifischen Antigen beladene Zielzellen und als Vergleichspopulationen zwei schwächer fluoreszent markierte Zellfraktionen, die mit einem irrelevanten Antigen beladen bzw. unbeladen sind, werden adoptiv in einem Zellzahl-Verhältnis von 1:1:1 in das Tier transferiert. Nach 16 h wird die Milz aus dem Tier präpariert und die Milzzellen werden auf das Vorhandensein der entsprechenden fluoreszent markierten transferierten Zellen analysiert. Findet Lyse der mit dem spezifischen Antigen beladenen Zielzellen durch zytotoxische T-Zellen im Tier statt, sollte diese Zellpopulation im Vergleich zu den beiden Kontrollpopulationen in einem geringeren Verhältnis detektiert werden.

Für den adoptiven Transfer werden Milzzellen aus Mäusen des entsprechenden passenden Hintergrunds isoliert (siehe 6.1.7). Nach der Erythrozytenlyse und einem Waschschriff mit PBS werden die Zellen in 30 ml T-Zellmedium resuspendiert und in drei gleiche Fraktionen zu jeweils 10 ml aufgeteilt. Die Zellzahl je Fraktion sollte $1-5 \times 10^8$ Zellen nicht überschreiten; bei größeren Zellzahlen wird das Resuspendierungsvolumen entsprechend erhöht.

Die erste Fraktion bleibt unbehandelt, zur zweiten Fraktion werden $10 \mu\text{M}$ Endkonzentration eines nicht relevanten Antigens (Peptides) zugegeben und in die dritte Fraktion $10 \mu\text{M}$ Endkonzentration des entsprechenden spezifischen Antigens (Peptides). Die Zellen werden mit angeschraubtem Deckel für 1,5 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend werden die Zellen abzentrifugiert und zweimal gründlich mit PBS gewaschen, um die Antigene wieder vollständig zu entfernen.

Für die fluoreszente Markierung der Zellpopulationen mit CFSE (siehe 6.1.8) werden die Zellen in dem entsprechenden Volumen Ladepuffer aufgenommen. Die Endkonzentration an CFSE für die unbehandelten Zellen beträgt $0,05 \mu\text{M}$, für die mit dem nicht relevanten Antigen beladenen Zellen $0,5 \mu\text{M}$ und für die mit dem spezifischen Antigen beladenen Zellen $5 \mu\text{M}$ im Markierungsansatz. Nach der Markierung werden die Zellen zusätzlich zweimal mit PBS gewaschen. Die Zellzahl wird dann so eingestellt, dass 1×10^7 Zellen je Population (d.h. 3×10^7 Gesamtzellen) in $200 \mu\text{l}$ PBS je Tier adoptiv transferiert werden können.

16 h nach dem Transfer werden die Milzzellen aus dem Tier isoliert und mittels Durchflußzytometrie analysiert. FL1 wird für die lebenden Zellen aufgenommen, so dass die drei CFSE markierten Populationen sowie die unmarkierten Milzzellen deutlich dargestellt werden können (Aufnahme ca. 30.000 lebende CFSE markierte Zellen).

Die Auswertung erfolgt mittels Darstellung im Histogramm für FL1. Die prozentualen Verhältnisse der verschiedenen Zellpopulationen werden bestimmt; M1 gibt die mit dem spezifischen Antigen beladene und mit 5 μM CFSE markierte Zellfraktion an, M2 stellt die mit dem irrelevanten Antigen beladene und mit 0,5 μM CFSE markierte Zellfraktion dar und M3 bestimmt die unbehandelte und mit 0,05 μM CFSE markierte Zellfraktion. Die spezifische Lyse wird nach folgender Berechnung ermittelt:

$$\text{Spezifische Lyse (\%)} = (1 - (\text{M1 (\%)} / \text{M2 (\%)})) \times 100$$

6.5 Testsysteme zur Untersuchung der zellpermeablen Antigene

6.5.1 Internalisierung von Proteinen/Peptiden in eukaryotische Zellen

Um die Zellpermeabilität der eingesetzten Proteine/Peptide zu untersuchen, werden die Zellen nach Inkubation mit den Molekülen direkt auf ihr Vorhandensein im Zytoplasma untersucht.

Adhärente Zellen bzw. Suspensionszellen werden nach Waschen der Zellen mit einer 2 μM Protein-, Peptidlösung (angesetzt in serumarmem Medium mit 1% FCS) zeitabhängig (30 min bis über Nacht) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

Nach Abnahme der Protein-, Peptidlösung werden die Zellen zweimal sehr zügig mit PBS gewaschen, da die durch das TLM vermittelte Zellpermeabilität einen reversiblen Prozess darstellt und die zellpermeablen Moleküle bei dem veränderten Konzentrationsverhältnis wieder aus den Zellen herausdiffundieren können.

Die gewaschenen Zellen können zum einen zur Gewinnung von Zytosol (siehe 6.1.9) eingesetzt und das Vorhandensein der Proteine/Peptide im Zytosol über Western Blot (siehe 6.2.5) analysiert werden. Zum anderen können die Zellen fixiert und auf das entsprechende Protein in der indirekten Immunfluoreszenzfärbung (siehe 6.4.1) untersucht werden.

Beim Einsatz der rekombinanten eGFP Proteine bzw. der FITC-konjugierten Zellpermeabilitätsmotive kann auf eine Fixierung der Zellen verzichtet werden; die lebenden Zellen können direkt mit einem Fluoreszenzmikroskop bzw. in der Durchflußzytometrie auf fluoreszente Färbung hin analysiert werden.

6.5.2 Nachweis von SIINFEKL beladenen MHC-I-Komplexen auf der Zelloberfläche

Als indirekter Nachweis auf die Zellpermeabilität der rekombinanten Ovalbumin-Proteine, SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikel bzw. verlängerten SIINFEKL-Peptide wird die Präsentation von SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplexen auf der Zelloberfläche untersucht. Wenn die Proteine/Peptide in das Zytoplasma von Zellen translozieren und dort korrekt und in ausreichender Menge prozessiert werden, sollten SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf der Zelloberfläche nachweisbar sein.

EL-4 und ANA-I Zellen werden mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (0,1–1,5 μM) bzw. mit SIINFEKL tragenden HBV-Corepartikeln (50–0,5 $\mu\text{g/ml}$) über Nacht im Brutschrank inkubiert. Die zweimal gewaschen Zellen werden mit dem Antikörper 25.D1.16. (dieser Antikörper erkennt spezifisch SIINFEKL beladene H-2K^b-Komplexe (Progador et al., 1997)) und einem passenden Sekundärantikörper gefärbt und in der Durchflußzytometrie (siehe 6.4.2.1) analysiert.

Ebenso werden EL-4 Zellen mit verlängerten SIINFEKL-Peptiden konzentrationsabhängig (nM bis μM Bereich) und zeitabhängig (20–120 min) inkubiert; anschließend werden die Zellen nach Färbung mit dem Antikörper 25.D1.16 auf SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf der Oberfläche analysiert.

In Vergleichsexperimenten werden Glutaraldehyd-fixierte Zellen eingesetzt. Bei den fixierten, toten Zellen können zwar noch MHC-I-Komplexe von außen mit Peptid beladen und nachgewiesen werden, aber keine endogen prozessierten Komplexe mehr gebildet werden. Für die Glutaraldehyd-Fixierung von Zellen wird die serumfreie Zellsuspension mit einer 2%-igen Glutaraldehydlösung (in PBS) auf 0,05% Glutaraldehyd Endkonzentration versetzt und die Zellen 15 sec gevortext; durch Zugabe von einem Volumen 0,2 M Lysinlösung (in PBS) und Vortexen für 1 min wird die Vernetzungsreaktion abgestoppt. Die Zellen werden anschließend einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und dann für die Peptidinkubation eingesetzt.

Inkubationen mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden lassen auf eine exogene Beladung von H-2K^b-Molekülen mit diesen Peptiden schließen. Deshalb werden die Zellen nach Inkubation einem sauren Waschschrift unterzogen, um die Peptid-MHC-I-Komplexe auf der Zelloberfläche zu zerstören und dann das endogene, von innen heraus neu aufgebaute Peptid-MHC-I-Komplex-Repertoire analysieren zu können (Storkus et al., 1993)

EL-4 Zellen werden mit den verlängerten SIINFEKL-Peptiden inkubiert (0,75–1,5 μM , für 1,5 h) und anschließend einem sauren Waschschrift unterzogen. Dazu werden die Zellen im sauren Waschpuffer resuspendiert und 2-3 min auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von FCS haltigem Medium wird der saure Puffer neutralisiert; die Zellen werden danach zweimal mit Kultivierungsmedium und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend werden sie direkt auf SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf der Oberfläche mittels Durchflußzytometrie untersucht bzw. in Kultivierungsmedium aufgenommen und nach einer Erholungsphase von 1,5 bis 3,5 h im Brutschrank analysiert.

Saurer Waschpuffer

Lösung A	0,263 M Zitrat
Lösung B	0,123 M Na ₂ HPO ₄

1 Volumen A und 1 Volumen B mischen
 1% BSA (w/V) zugeben
 pH-Wert auf 3,2 einstellen
 sterilfiltrieren
 bei -20 °C lagern

6.5.3 Stimulierung von humanen spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch dendritische Zellen nach Beladung mit rekombinanten eGFP-Proteinen

In einem humanen *in vitro* T-Zell-Stimulationsprotokoll wird untersucht, wie effizient dendritische Zellen nach Beladung mit rekombinanten eGFP-Proteinen spezifische CD8⁺ T-Zellen stimulieren können.

Dazu werden aus dem *Buffy coat* eines gesunden Spenders aus der adhärennten PBMC-Fraktion DCs generiert. Die unreifen DCs werden mit den rekombinanten eGFP-Proteinen *gepulst*, zwei Teile davon eingefroren und der dritte Teil zur Stimulation der nicht adhärennten autologen PBMC-Fraktion eingesetzt. 7 Tage nach Stimulation werden die T-Zellen zweimal wöchentlich restimuliert mit DCs, die nicht bzw. mit Protein *gepulst* wurden. Nach der zweiten Restimulationsrunde werden die erhaltenen Zellen als Effektorzellen in einem Zytotoxizitätstest eingesetzt. Als Zielzellen dienen autologe PHA stimulierte T-Zell-Blasten, welche ohne Protein bzw. mit den rekombinanten eGFP-Proteinen vorinkubiert wurden.

Aus dem *Buffy coat* eines gesunden Spenders werden durch Dichtegradientenzentrifugation PBMCs gewonnen (siehe 6.1.3). Die nicht adhärennte Fraktion wird in 4 Aliquots eingefroren und aus der adhärennten Fraktion werden DCs durch Differenzierung mit rhIL-4 und rhGM-CSF generiert (siehe 6.1.5).

An Tag 7 werden die unreifen DCs geerntet. Die Zellen werden in drei Portionen aufgeteilt und über Nacht ohne Protein, mit 1 µM eGFP bzw. 1µM TLM-eGFP im Medium inkubiert. Am nächsten Tag werden von jedem Ansatz zwei Drittel der Zellen eingefroren und ein Drittel zur Stimulation eingesetzt. Dafür wird ein Aliquot der nicht adhärennten PBMC-Fraktion aufgetaut und Kokulturen von diesen Zellen mit den verschiedenen *gepulsten* DC-Fraktionen im Verhältnis 15 zu 1 angesetzt. Die Zellen werden in einer Dichte von 1x10⁶ Zellen/ml in einer T25 Kulturflasche kultiviert.

An Tag 2 nach Stimulationsbeginn wird den Kulturen 30U/ml rhIL-2 und 50U/ml rhIL-7 zugesetzt. An Tag 3 und 5 wird jeweils die Hälfte des alten Kultivierungsmediums durch neues ersetzt.

An Tag 7 nach Stimulationsbeginn werden die T-Zellen der Kokulturen geerntet. Je 1 Aliquot der jeweiligen *gepulsten* DC-Fraktionen wird aufgetaut und zur Restimulation der entsprechend stimulierten T-Zellen eingesetzt, Kultivierungsverhältnis 10:1 T-Zellen zu DCs. Zusätzlich werden zu Beginn der Restimulation in die jeweiligen Ansätze nochmals kein Protein bzw. 1 µM eGFP und TLM-eGFP zugegeben. Die Kultivierung erfolgt ebenfalls in einer Zelldichte von 1x10⁶ Zellen/ml in einer T25-Zellkulturflasche.

An Tag 2 nach Restimulationsbeginn werden ebenfalls 30U/ml rhIL-2 und 50U/ml rhIL-7 in die Kulturen zugesetzt und Medium wird je nach Verbrauch ausgetauscht.

Die zweite Restimulationsrunde beginnt Tag 7 nach der ersten und wird analog wie die erste Runde durchgeführt.

An Tag 5 nach der zweiten Restimulationsrunde werden die T-Zellen aus den jeweiligen Ansätzen geerntet und als Effektorzellen in einem Zytotoxizitätstest (siehe 6.4.4.1) eingesetzt.

Als Zielzellen für den Zytotoxizitätstest dienen autologe PHA stimulierte T-Zell-Blasten. Dafür wird 4 Tage vor dem Test 1 Aliquot der nicht adhärennten PBMC-Fraktion aufgetaut und mit 2 µg/ml PHA wie unter 6.1.6. beschrieben stimuliert.

3 Tage nach Kultivierung, 18 h vor dem Zytotoxizitätstest, werden drei Ansätze mit $1-2 \times 10^6$ T-Zell-Blasten in 2 ml Kultivierungsmedium vorbereitet:

Ansatz 1	ohne Protein	(T-Zell-Blasten -)
Ansatz 2	Zugabe $1 \mu\text{M}$ eGFP	(T-Zell-Blasten + eGFP)
Ansatz 3	Zugabe $1 \mu\text{M}$ TLM-eGFP	(T-Zell-Blasten + TLM-eGFP)

Die Zellen werden nach der Inkubation mit Protein zweimal gewaschen, radioaktivmarkiert und die Effektorzellen im Zytotoxizitätstest darauf ausgetestet. Nach Auslesen im γ -Counter werden die spezifischen Lysen ausgewertet.

6.5.4 Stimulation von OT-1 Milzzellen mit SIINFEKL abgeleiteten Antigenen

In einem funktionellen *in vitro* Testsystem werden die SIINFEKL abgeleiteten Antigene auf die Prozessierung und Präsentation über den MHC-Klasse I-Weg untersucht.

Dazu dienen Milzzellkulturen, gewonnen aus OT-1 Mäusen. Die OT-1 Maus ist transgen für den spezifischen T-Zell-Rezeptor, welcher den SIINFEKL beladenen H-2K^b-Komplex erkennt. In dieser Maus sind 80-90% der vorhandenen CD8⁺ T-Zellen transgen für diesen TCR und in einer Milzzellkultur beträgt ihr Anteil ca. 20% (Hogquist et al., 1994).

In OT-1 Milzzellkulturen werden die zu untersuchenden Antigene in einer Konzentrationsreihe zugegeben. Werden SIINFEKL-H-2K^b-Komplexe auf APCs gezeigt, kommt es zu einer Stimulation der transgenen CD8⁺ T-Zellen, was zu ihrer Aktivierung und Proliferation führt. In einer Zeitkinetik werden diese Stimulationsparameter gemessen. Die Stimulation der transgenen CD8⁺ T-Zellen wird in den mit verschiedenen Antigenen *gepulsten* Kulturen verglichen, was indirekt Aufschluss über die jeweilige Prozessierungseffizienz der Antigene über den MHC-Klasse I-Präsentationsweg gibt.

Milzzellen aus OT-1 Mäusen werden isoliert (siehe 6.1.7). Die Zellen werden je nach Ausbeute in einer Dichte von $5-6 \times 10^6$ Zellen in 2 ml T-Zell-Medium je Loch einer 24 Loch Platte bzw. $1 \times 10^5-1 \times 10^6$ Zellen in 200 μl T-Zell-Medium je Loch einer 96 Loch Platte ausgelegt.

In einer Titrationsreihe werden die zu untersuchenden Antigene zugegeben ($0,15-2 \mu\text{M}$ für rekombinante Ovalbumin-Proteine, $0,1-50 \mu\text{g/ml}$ für SIINFEKL tragende HBV-Core-Partikel und $20-500 \text{ nM}$ für verlängerte SIINFEKL-Peptide). Als Positivkontrolle wird 25 nM SIINFEKL-Peptid eingesetzt und als Negativkontrolle werden die Zellen unbehandelt belassen.

In einer Zeitkinetik (Tag 1 bis 4 nach Stimulation) wird die Aktivierung der transgenen CD8⁺ T-Zellen untersucht. Dazu wird ihre Expression des Aktivierungsmarkers CD69 sowie ihre Produktion von IFN γ mittels Durchflußzytometrie gemessen (siehe 6.4.2). Ebenso wird ihr Proliferationsverhalten durch CFSE-Markierung untersucht (siehe 6.1.8).

Die Stimulation der unterschiedlich *gepulsten* Kulturen wird verglichen.

6.5.5 Adoptives Transfermodell, um die Aktivierung von transgenen CD8⁺ T-Zellen *in vivo* nach Immunisierung mit den rekombinanten Ovalbumin-Proteinen zu untersuchen

Um die Stimulation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen durch die rekombinanten Ovalbumin-Proteine *in vivo* untersuchen zu können, wird ein adoptives Transfermodell (Maussystem) durchgeführt.

CFSE markierte Milzzellen einer OT-1 Maus, welche ca. 20% transgene naive CD8⁺ T-Zellen enthalten, werden in C57BL/6 Mäuse transferiert; die Tiere werden anschließend mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen immunisiert. An Tag 2 nach Immunisierung wird das Proliferationsverhalten sowie die IFN γ Produktion der transferierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz analysiert. An Tag 7 wird in einem *in vivo* Zytotoxizitätstest die zytolytische Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen untersucht. Die Immunisierungseffekte von OVA-HA und TLM-OVA-HA werden verglichen.

OT-1 Milzzellen werden isoliert (siehe 6.1.7) und CFSE markiert (siehe 6.1.8); mittels Durchflußzytometrie wird der Anteil an transgenen CD8⁺ T-Zellen in der Milzzellkultur bestimmt, welcher in der Regel bei 17 - 22% liegt (siehe 6.4.2). Die Milzzellen werden auf eine Zelldichte eingestellt, so dass 5×10^6 - 1×10^7 transgene CD8⁺ T-Zellen (abhängig vom weiteren Versuchsaufbau) je 200 μ l PBS enthalten sind. 200 μ l der vorbereiteten Zellsuspension werden je C57BL/6 Maus adoptiv transferiert.

18 h später werden die Mäuse intraperitoneal (i.p.) bzw. subcutan (s.c.) mit verschiedenen Mengen an rekombinanten Ovalbumin-Proteinen (10 - 150 μ g) ohne Adjuvans immunisiert.

2 Tage nach Immunisierung werden die Tiere getötet und die Milzen herauspräpariert. Die Proliferation der spezifischen CD8⁺ T-Zellen wird in den aufbereiteten Milzzellkulturen mittels Durchflußzytometrie analysiert (Färbung auf V α 2 und CD8) (siehe 6.4.2). Der prozentuale Anteil der proliferierten spezifischen CD8⁺ T-Zellen in der Milz sowie der MFI für die CFSE-Markierung dieser Zellen werden ausgewertet. Für die Messung der IFN γ Produktion werden die isolierten Milzzellen ca. 2 h *in vitro* mit 100 nM SIINFEKL-Peptid restimuliert und anschließend zusätzlich für 4-5 h mit Brefeldin A inkubiert. Der Anteil der IFN γ produzierenden spezifischen CD8⁺ T-Zellen wird danach mittels Durchflußzytometrie bestimmt (Färbung auf V α 2, CD8 und IFN γ) (siehe 6.4.2).

Für die Analyse der zytolytischen Aktivität der spezifischen CD8⁺ T-Zellen wird an Tag 7 nach Immunisierung ein *in vivo* Zytotoxizitätstest durchgeführt (siehe 6.4.4.2).

Die Effekte nach Immunisierung mit gleicher Menge OVA-HA und TLM-OVA-HA werden verglichen.

6.5.6 Untersuchung der rekombinanten Ovalbumin-Proteine auf ihre Effizienz, eine Antitumor-Antwort auszulösen

Um die Stimulation von spezifischen CD8⁺ T-Zellen nach Immunisierung mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen *in vivo* zu untersuchen, wird ein Tumormodell für Ovalbumin im Maussystem eingesetzt.

Die Tiere (C57BL/6 Mäuse bzw. OT-1 Mäuse) werden mit rekombinanten Ovalbumin-Proteinen, mit CpG-ODN als Adjuvans (Lipford et al., 1997), subcutan immunisiert. Zwei Wochen nach Immunisierung werden den Tieren Ovalbumin exprimierende Tumorzellen subcutan appliziert und anschließend das Tumorstadium über 60 Tage beobachtet. Die Effekte der Immunisierung mit den unterschiedlichen rekombinanten Ovalbumin-Proteinen auf das Tumorauswachsen werden verglichen.

Für jeden Immunisierungsansatz werden 150 µl Proteinlösung mit Adjuvans vorbereitet, welche 100 µg rekombinantes Ovalbumin-Protein und 18 µl *ImmunEasy Mouse Adjuvant* (Qiagen, Hilden) in PBS enthält. Die Tiere werden subcutan in die rechte Flanke immunisiert. Die Kontrolltiere bleiben entweder unbehandelt bzw. werden mit dem analogen Ansatz immunisiert, welcher allerdings kein Protein enthält.

Zwei Wochen nach Immunisierung werden den Tieren Ovalbumin exprimierende Tumorzellen gespritzt. Für die eine Versuchsreihe werden 5x10⁵ EG7.OVA Zellen und für die zweite Versuchsreihe 1x10⁵ B16.OVA Zellen in jeweils 200 µl PBS subcutan in die linke Flanke appliziert.

Das Tumorstadium wird über 60 Tage verfolgt, wobei die Tumorstadium durch Ausmessen der Länge, Breite und Höhe des Tumors mit einer Schieblehre ermittelt wird. Tiere, die einen Tumor größer 15mmx15mmx15mm entwickeln, werden getötet.

Die Versuche im Tumormodell wurden freundlicherweise in Kooperation mit Dr. Thomas Kammertöns am Max Delbrück-Zentrum, Berlin durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

- Adam**, J. K., B. Odhav, and K. D. Bhoola. 2003. Immune responses in cancer. *Pharmacol Ther* 99:113.
- Allsopp**, C. E., M. Plebanski, S. Gilbert, R. E. Sinden, S. Harris, G. Frankel, G. Dougan, C. Hioe, D. Nixon, E. Paoletti, G. Layton, and A. V. Hill. 1996. Comparison of numerous delivery systems for the induction of cytotoxic T lymphocytes by immunization. *Eur J Immunol* 26:1951.
- Arnold-Schild**, D., D. Hanau, D. Spehner, C. Schmid, H. G. Rammensee, H. de la Salle, and H. Schild. 1999. Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells. *J Immunol* 162:3757.
- Banchereau**, J., F. Briere, C. Caux, J. Davoust, S. Lebecque, Y. J. Liu, B. Pulendran, and K. Palucka. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18:767.
- Barnden**, M. J., J. Allison, W. R. Heath, and F. R. Carbone. 1998. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol Cell Biol* 76:34.
- Baumann**, S., A. Krueger, S. Kirchhoff, and P. H. Krammer. 2002. Regulation of T cell apoptosis during the immune response. *Curr Mol Med* 2:257.
- Becker-Hapak**, M., S. S. McAllister, and S. F. Dowdy. 2001. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 24:247.
- Belz**, G. T., F. R. Carbone, and W. R. Heath. 2002. Cross-presentation of antigens by dendritic cells. *Crit Rev Immunol* 22:439.
- Ben-Neriah**, Y. 2002. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol*. 3:20-6.
- Bevan**, M. J. 1976. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143:1283.
- Birnboim**, H. C., and J. Doly. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513.
- Bradford**, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248.
- Brandenburg**, B., Gentransfer unter Verwendung zellpermeabler, DNA bindender Fusionsproteine und zellpermeabler Nukleokapside, in Fakultät für Biologie, Chemie und Pharmazie. 2001, Freie Universität: Berlin.
- Brandenburg**, B., L. Stoeckl, H. Gelderblom, P.H. Hofschneider, and E. Hildt. 2004. Efficient Gene Transfer Mediated By Cell Permeable Nucleocapsid. Annual Meeting of the German Society of Virology, abstract book: 411

- Brossart, P., S. Wirths, W. Brugger, and L. Kanz.** 2001. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 29:1247-55.
- Bungener, L., J. Idema, W. ter Veer, A. Huckriede, T. Daemen, and J. Wilschut.** 2002. Virosomes in vaccine development: induction of cytotoxic T lymphocyte activity with virosome-encapsulated protein antigens. *J Liposome Res* 12:155.
- Carbone, F. R., N. A. Hosken, M. W. Moore, and M. J. Bevan.** 1989. Class I MHC-restricted cytotoxic responses to soluble protein antigen. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:551.
- Caron, N.J., Y. Torrente, G. Camirand, M. Bujold, P. Chapdelaine, K. Leriche, N. Bresolin, and J.P. Tremblay.** 2001. Intracellular delivery of a Tat-eGFP fusion protein into muscle cells. *Mol Ther* 3:310-8.
- Cerdan, C., Y. Martin, M. Courcoul, C. Mawas, F. Birg, and D. Olive.** 1995. CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high-affinity IL2 receptor. *Res Immunol* 146:164.
- Ceres, P., and A. Zlotnick.** 2002. Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry* 41:11525.
- Chen, W., F. R. Carbone, and J. McCluskey.** 1993. Electroporation and commercial liposomes efficiently deliver soluble protein into the MHC class I presentation pathway. Priming in vitro and in vivo for class I-restricted recognition of soluble antigen. *J Immunol Methods* 160:49.
- Chen, Y., J. Sidney, S. Southwood, A. L. Cox, K. Sakaguchi, R. A. Henderson, E. Appella, D. F. Hunt, A. Sette, and V. H. Engelhard.** 1994. Naturally processed peptides longer than nine amino acid residues bind to the class I MHC molecule HLA-A2.1 with high affinity and in different conformations. *J Immunol* 152:2874.
- Cho, H. J., K. Takabayashi, P. M. Cheng, M. D. Nguyen, M. Corr, S. Tuck, and E. Raz.** 2000. Immunostimulatory DNA-based vaccines induce cytotoxic lymphocyte activity by a T-helper cell-independent mechanism. *Nat Biotechnol* 18:509.
- Chu, R. S., O. S. Targoni, A. M. Krieg, P. V. Lehmann, and C. V. Harding.** 1997. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 186:1623.
- Clarke, S. R., M. Barnden, C. Kurts, F. R. Carbone, J. F. Miller, and W. R. Heath.** 2000. Characterization of the ovalbumin-specific TCR transgenic line OT-I: MHC elements for positive and negative selection. *Immunol Cell Biol* 78:110.
- Clarke, S. R.** 2000. The critical role of CD40/CD40L in the CD4-dependent generation of CD8+ T cell immunity. *J Leukoc Biol* 67:607.
- Console, S., C. Marty, C. Garcia-Echeverria, R. Schwendener, and K. Ballmer-Hofer.** 2003. Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem* 278:35109.

Cox, G.W., B.J. Mathieson, L. Gandino, E. Blasi, D. Radzioch, and L. Varesio. 1989. Heterogeneity of hematopoietic cells immortalized by v-myc/v-raf recombinant retrovirus infection of bone marrow or fetal liver. *J Natl Cancer Inst.* 81:1492-6.

Crowther, R. A., N. A. Kiselev, B. Bottcher, J. A. Berriman, G. P. Borisova, V. Ose, and P. Pumpens. 1994. Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77:943.

Del Val, M., H. J. Schlicht, H. Volkmer, M. Messerle, M. J. Reddehase, and U. H. Koszinowski. 1991. Protection against lethal cytomegalovirus infection by a recombinant vaccine containing a single nonameric T-cell epitope. *J Virol* 65:3641.

Derossi, D., A. H. Joliot, G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1994. The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem* 269:10444.

Derossi, D., S. Calvet, A. Trembleau, A. Brunissen, G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1996. Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem* 271:18188.

Derossi, D., G. Chassaing, and A. Prochiantz. 1998. Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 8:84.

Drin, G., S. Cottin, E. Blanc, A. R. Rees, and J. Temsamani. 2003. Studies on the internalization mechanism of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* 278:31192.

Elliott, G., and P. O'Hare. 1997. Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88:223.

Farabaugh, P. J. 1978. Sequence of the lacI gene. *Nature* 274:765.

Fearon, E. R. 1997. Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278:1043.

Fischer, P.M., E. Krausz, and D.P. Lane. 2001. Cellular delivery of impermeable effector molecules in the form of conjugates with peptides capable of mediating membrane translocation. *Bioconjug Chem.* 12:825-41.

Fischer, R., T. Waizenegger, K. Kohler, and R. Brock. 2002. A quantitative validation of fluorophore-labelled cell-permeable peptide conjugates: fluorophore and cargo dependence of import. *Biochim Biophys Acta* 1564:365.

Fischer, R., K. Kohler, M. Fotin-Mlecsek, and R. Brock. 2004. A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem* 279:12625.

Fong, L., and E.G. Engleman. 2000. Dendritic cells in cancer immunotherapy. *Annu Rev Immunol.* 18:245-73.

Foss, F. M. 2002. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 29:5.

- Frumento, G., P. E. Harris, M. A. Gawinowicz, N. Suci-Foca, and B. Pernis.** 1993. Sequence of a prominent 16-residue self-peptide bound to HLA-B27 in a lymphoblastoid cell line. *Cell Immunol* 152:623.
- Gambotto, A., G. Dworacki, V. Cicinnati, T. Kenniston, J. Steitz, T. Tuting, P. D. Robbins, and A. B. DeLeo.** 2000. Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* 7:2036.
- Gazit, E., W. J. Lee, P. T. Brey, and Y. Shai.** 1994. Mode of action of the antibacterial cecropin B2: a spectrofluorometric study. *Biochemistry* 33:10681.
- Gratton, J. P., J. Yu, J. W. Griffith, R. W. Babbitt, R. S. Scotland, R. Hickey, F. J. Giordano, and W. C. Sessa.** 2003. Cell-permeable peptides improve cellular uptake and therapeutic gene delivery of replication-deficient viruses in cells and in vivo. *Nat Med* 9:357.
- Green, D. R., N. Droin, and M. Pinkoski.** 2003. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 193:70.
- Gromme, M., and J. Neefjes.** 2002. Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* 39:181.
- Guermontprez, P., L. Saveanu, M. Kleijmeer, J. Davoust, P. Van Endert, and S. Amigorena.** 2003. ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425:397.
- Hafner, A., B. Brandenburg, and E. Hildt.** 2003. Reconstitution of gene expression from a regulatory-protein-deficient hepatitis B virus genome by cell-permeable HBx protein. *EMBO Rep* 4:767.
- Haicheur, N., F. Benchetrit, M. Amessou, C. Leclerc, T. Falguieres, C. Fayolle, E. Bismuth, W. H. Fridman, L. Johannes, and E. Tartour.** 2003. The B subunit of Shiga toxin coupled to full-size antigenic protein elicits humoral and cell-mediated immune responses associated with a Th1-dominant polarization. *Int Immunol* 15:1161.
- Hallbrink, M., A. Floren, A. Elmquist, M. Pooga, T. Bartfai, and U. Langel.** 2001. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta* 1515:101.
- Hara, T., S. M. Fu, and J. A. Hansen.** 1985. Human T cell activation. II. A new activation pathway used by a major T cell population via a disulfide-bonded dimer of a 44 kilodalton polypeptide (9.3 antigen). *J Exp Med* 161:1513.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone.** 2001 a. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1:126.
- Heath, W. R., and F. R. Carbone.** 2001 b. Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* 19:47.
- Heeg, K., W. Kuon, and H. Wagner.** 1991. Vaccination of class I major histocompatibility complex (MHC)-restricted murine CD8+ cytotoxic T lymphocytes towards soluble antigens: immunostimulating-ovalbumin complexes enter the class I MHC-restricted antigen pathway and allow sensitization against the immunodominant peptide. *Eur J Immunol* 21:1523.

- Heukeshoven, J.**, and R. Dernick. 1988. Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9:28.
- Hildt, E.**, and S. Oess. 1999. Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I. *J Exp Med* 189:1707.
- Hogquist, K. A.**, S. C. Jameson, W. R. Heath, J. L. Howard, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1994. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* 76:17.
- Homann, D.**, L. Teyton, and M. B. Oldstone. 2001. Differential regulation of antiviral T-cell immunity results in stable CD8+ but declining CD4+ T-cell memory. *Nat Med* 7:913.
- Horig, H.**, A. C. Young, N. J. Papadopoulos, T. P. DiLorenzo, and S. G. Nathenson. 1999. Binding of longer peptides to the H-2Kb heterodimer is restricted to peptides extended at their C terminus: refinement of the inherent MHC class I peptide binding criteria. *J Immunol* 163:4434.
- Hoshino, K.**, O. Takeuchi, T. Kawai, H. Sanjo, T. Ogawa, Y. Takeda, K. Takeda, and S. Akira. 1999. Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol* 162:3749.
- Hosken, N. A.**, M. J. Bevan, and F. R. Carbone. 1989. Class I-restricted presentation occurs without internalization or processing of exogenous antigenic peptides. *J Immunol* 142:1079.
- Inouye, S.**, K. Umesono, and F. I. Tsuji. 1999. Special properties of green fluorescent protein-S65A. *Methods Enzymol* 302:444.
- Janeway, C.A.**, P. Travers, M. Walport, and M. Shlomchik. Immunologie 5. Auflage. 2002, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag
- Kim, D. T.**, D. J. Mitchell, D. G. Brockstedt, L. Fong, G. P. Nolan, C. G. Fathman, E. G. Engleman, and J. B. Rothbard. 1997. Introduction of soluble proteins into the MHC class I pathway by conjugation to an HIV tat peptide. *J Immunol* 159:1666.
- Klausner, R. D.**, J. G. Donaldson, and J. Lippincott-Schwartz. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J Cell Biol* 116:1071.
- Kratz, P. A.**, B. Bottcher, and M. Nassal. 1999. Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:1915.
- Kyhse-Andersen, J.** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10:203.
- Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680.
- Laus, R.**, T. J. Graddis, I. Hakim, and D. Vidovic. 2000. Enhanced major histocompatibility complex class I-dependent presentation of antigens modified with cationic and fusogenic peptides. *Nat Biotechnol* 18:1269.

- Lelouard**, H., E. Gatti, F. Cappello, O. Gresser, V. Camosseto, and P. Pierre. 2002. Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* 417:177.
- Lelouard**, H., V. Ferrand, D. Marguet, J. Bania, V. Camosseto, A. David, E. Gatti, and P. Pierre. 2004. Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J Cell Biol* 164:667.
- Lenschow**, D. J., T. L. Walunas, and J. A. Bluestone. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* 14:233.
- Lenz**, P., P. M. Day, Y. Y. Pang, S. A. Frye, P. N. Jensen, D. R. Lowy, and J. T. Schiller. 2001. Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 166:5346.
- Lindgren**, M., M. Hallbrink, A. Prochiantz, and U. Langel. 2000. Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci.* 21:99-103.
- Lipford**, G. B., M. Bauer, C. Blank, R. Reiter, H. Wagner, and K. Heeg. 1997. CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants. *Eur J Immunol* 27:2340.
- Liu**, Y.C. 2004. Ubiquitin ligases and the immune response. *Annu Rev Immunol.* 22:81-127.
- Liu**, H., M. Rhodes, D. L. Wiest, and D. A. Vignali. 2000. On the dynamics of TCR:CD3 complex cell surface expression and downmodulation. *Immunity* 13:665.
- Ljunggren**, H.G., and K. Karre. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med.* 162:1745-59.
- Lundberg**, P., and U. Langel. 2003. A brief introduction to cell-penetrating peptides. *J Mol Recognit* 16:227.
- Lyons**, A. B., and C. R. Parish. 1994. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J Immunol Methods* 171:131.
- Magzoub**, M., L. E. Eriksson, and A. Graslund. 2002. Conformational states of the cell-penetrating peptide penetratin when interacting with phospholipid vesicles: effects of surface charge and peptide concentration. *Biochim Biophys Acta* 1563:53.
- Mai**, J. C., H. Shen, S. C. Watkins, T. Cheng, and P. D. Robbins. 2002. Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J Biol Chem* 277:30208.
- Mandal**, M., and K.D. Lee. 2002. Listeriolysin O-liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecule antigen in vivo: enhancement of antigen-specific cytotoxic T lymphocyte frequency, activity, and tumor protection. *Biochim Biophys Acta.* 1563:7-17.
- Marzo**, A. L., B. F. Kinnear, R. A. Lake, J. J. Frelinger, E. J. Collins, B. W. Robinson, and B. Scott. 2000. Tumor-specific CD4+ T cells have a major "post-licensing" role in CTL mediated anti-tumor immunity. *J Immunol* 165:6047.

- Matsuzaki, K.** 1998. Magainins as paradigm for the mode of action of pore forming polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1376:391.
- Matsuzaki, K., K. Sugishita, and K. Miyajima.** 1999. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with lipopolysaccharide-containing liposomes as a model for outer membranes of gram-negative bacteria. *FEBS Lett* 449:221.
- Mattern, T., H. D. Flad, and A. J. Ulmer.** 1998. Stimulation of human T lymphocytes by lipopolysaccharide (LPS) in the presence of autologous and heterologous monocytes. *Prog Clin Biol Res* 397:243.
- Matzinger, P.** 2002. The danger model: a renewed sense of self. *Science* 296:301.
- Michalek, M. T., E. P. Grant, and K. L. Rock.** 1996. Chemical denaturation and modification of ovalbumin alters its dependence on ubiquitin conjugation for class I antigen presentation. *J Immunol* 157:617.
- Moore, M. W., F. R. Carbone, and M. J. Bevan.** 1988. Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* 54:777.
- More, S. H., M. Breloer, A. K. Fentz, B. Fleischer, and A. von Bonin.** 2002. 'Ignorance' of antigen-specific murine CD4+ and CD8+ T cells is overruled by lipopolysaccharide and leads to specific induction of IFN-gamma. *Scand J Immunol* 55:329.
- Moron, G., P. Rueda, I. Casal, and C. Leclerc.** 2002. CD8alpha- CD11b+ dendritic cells present exogenous virus-like particles to CD8+ T cells and subsequently express CD8alpha and CD205 molecules. *J Exp Med* 195:1233.
- Moron, V. G., P. Rueda, C. Sedlik, and C. Leclerc.** 2003. In vivo, dendritic cells can cross-present virus-like particles using an endosome-to-cytosol pathway. *J Immunol* 171:2242.
- Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. J. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, and R. Ahmed.** 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* 8:177.
- Murray, K., and A. L. Shiau.** 1999. The core antigen of hepatitis B virus as a carrier for immunogenic peptides. *Biol Chem* 380:277.
- Nagahara, H., A.M. Vocero-Akbani, E.L. Snyder, A. Ho, D.G. Latham, N.A. Lissy, M. Becker-Hapak, S.A. Ezhevsky, and S.F. Dowdy.** 1998. Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med.* 4:1449-52.
- Nakanishi, T., A. Hayashi, J. Kunisawa, Y. Tsutsumi, K. Tanaka, Y. Yashiro-Ohtani, M. Nakanishi, H. Fujiwara, T. Hamaoka, and T. Mayumi.** 2000. Fusogenic liposomes efficiently deliver exogenous antigen through the cytoplasm into the MHC class I processing pathway. *Eur J Immunol* 30:1740.
- Nisbet, A. D., R. H. Saundry, A. J. Moir, L. A. Fothergill, and J. E. Fothergill.** 1981. The complete amino-acid sequence of hen ovalbumin. *Eur J Biochem* 115:335.

- Norbury**, C. C., and L. J. Sigal. 2003. Cross priming or direct priming: is that really the question? *Curr Opin Immunol* 15:82.
- Ochsenbein**, A. F. 2002. Principles of tumor immunosurveillance and implications for immunotherapy. *Cancer Gene Ther* 9:1043.
- Oehen**, S., and K. Brduscha-Riem. 1998. Differentiation of naive CTL to effector and memory CTL: correlation of effector function with phenotype and cell division. *J Immunol* 161:5338.
- Oehlke**, J., A. Scheller, B. Wiesner, E. Krause, M. Beyermann, E. Klauschenz, M. Melzig, and M. Bienert. 1998. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta* 1414:127.
- Oess**, S., Entdeckung und Charakterisierung eines neuen Zellpermeabilität vermittelnden Peptidmotives aus den Oberflächenproteinen des Hepatitis B-Virus, in Fakultät für Chemie und Pharmazie. 2000 Ludwigs-Maximilians-Universität: München.
- Oess**, S., and E. Hildt. 2000. Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther* 7:750.
- Pietersz**, G. A., W. Li, and V. Apostolopoulos. 2001. A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway. *Vaccine* 19:1397.
- Pooga**, M., U. Soomets, M. Hallbrink, A. Valkna, K. Saar, K. Rezaei, U. Kahl, J. X. Hao, X. J. Xu, Z. Wiesenfeld-Hallin, T. Hokfelt, T. Bartfai, and U. Langel. 1998. Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol* 16:857.
- Porath**, J., J. Carlsson, I. Olsson, and G. Belfrage. 1975. Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258:598.
- Porgador**, A., J. W. Yewdell, Y. Deng, J. R. Bennink, and R. N. Germain. 1997. Localization, quantitation, and in situ detection of specific peptide-MHC class I complexes using a monoclonal antibody. *Immunity* 6:715.
- Pouny**, Y., D. Rapaport, A. Mor, P. Nicolas, and Y. Shai. 1992. Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31:12416.
- Princiotta**, M. F., D. Finzi, S. B. Qian, J. Gibbs, S. Schuchmann, F. Buttgereit, J. R. Bennink, and J. W. Yewdell. 2003. Quantitating protein synthesis, degradation, and endogenous antigen processing. *Immunity* 18:343.
- Prochiantz**, A. 1996. Getting hydrophilic compounds into cells: lessons from homeopeptides. *Curr Opin Neurobiol* 6:629.
- Pumpens**, P., and E. Grens. 2001. HBV core particles as a carrier for B cell/T cell epitopes. *Intervirology* 44:98.

- Rea, D., M.E. Johnson, M.J. Havenga, C.J. Melief, and R. Offringa.** 2001. Strategies for improved antigen delivery into dendritic cells. *Trends Mol Med.* 7:91-4.
- Regnault, A., D. Lankar, V. Lacabanne, A. Rodriguez, C. Thery, M. Rescigno, T. Saito, S. Verbeek, C. Bonnerot, P. Ricciardi-Castagnoli, and S. Amigorena.** 1999. Fcγ receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* 189:371.
- Reid, D. C.** 2001. Dendritic cells and immunotherapy for malignant disease. *Br J Haematol* 112:874.
- Reimann, J., and R. Schirmbeck.** 1999. Alternative pathways for processing exogenous and endogenous antigens that can generate peptides for MHC class I-restricted presentation. *Immunol Rev* 172:131.
- Restifo, N.P., I. Bacik, K.R. Irvine, J.W. Yewdell, B.J. McCabe, R.W. Anderson, L.C. Eisenlohr, S.A. Rosenberg, and J.R. Bennink.** 1995. Antigen processing in vivo and the elicitation of primary CTL responses. *J Immunol.* 154:4414-22.
- Richard, J. P., K. Melikov, E. Vives, C. Ramos, B. Verbeure, M. J. Gait, L. V. Chernomordik, and B. Lebleu.** 2003. Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem* 278:585.
- Rock, K. L.** 2003. The ins and outs of cross-presentation. *Nat Immunol* 4:941.
- Rojas, M., S. Yao, and Y. Z. Lin.** 1996. Controlling epidermal growth factor (EGF)-stimulated Ras activation in intact cells by a cell-permeable peptide mimicking phosphorylated EGF receptor. *J Biol Chem* 271:27456.
- Rojas, M., J. P. Donahue, Z. Tan, and Y. Z. Lin.** 1998. Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability. *Nat Biotechnol* 16:370.
- Rotzschke, O., K. Falk, S. Stevanovic, G. Jung, P. Walden, and H. G. Rammensee.** 1991. Exact prediction of a natural T cell epitope. *Eur J Immunol* 21:2891.
- Ruedl, C., T. Storni, F. Lechner, T. Bachi, and M. F. Bachmann.** 2002. Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *Eur J Immunol* 32:818.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463.
- Schirmbeck, R., W. Bohm, and J. Reimann.** 1994. Injection of detergent-denatured ovalbumin primes murine class I-restricted cytotoxic T cells in vivo. *Eur J Immunol* 24:2068.
- Schmidt, T. G., J. Koepke, R. Frank, and A. Skerra.** 1996. Molecular interaction between the Strep-tag affinity peptide and its cognate target, streptavidin. *J Mol Biol* 255:753.
- Schodel, F., S. Kelly, S. Tinge, S. Hopkins, D. Peterson, D. Milich, and R. Curtiss, 3rd.** 1996 b. Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety. II. Expression in avirulent *Salmonella* spp. for mucosal immunization. *Adv Exp Med Biol* 397:15.

- Schodel**, F., D. Peterson, J. Hughes, R. Wirtz, and D. Milich. 1996 a. Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. presentation of foreign epitopes. *J Biotechnol* 44:91.
- Schutze-Redelmeier**, M. P., H. Gournier, F. Garcia-Pons, M. Moussa, A. H. Joliot, M. Volovitch, A. Prochiantz, and F. A. Lemonnier. 1996. Introduction of exogenous antigens into the MHC class I processing and presentation pathway by *Drosophila antennapedia* homeodomain primes cytotoxic T cells in vivo. *J Immunol* 157:650.
- Schutze-Redelmeier**, M. P., S. Kong, M. B. Bally, and J. P. Dutz. 2004. Antennapedia transduction sequence promotes anti tumour immunity to epicutaneously administered CTL epitopes. *Vaccine* 22:1985.
- Schwarze**, S. R., A. Ho, A. Vocero-Akbani, and S. F. Dowdy. 1999. In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science* 285:1569.
- Schwarze**, S. R., and S. F. Dowdy. 2000. In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* 21:45.
- Sedlik**, C., M. Saron, J. Sarraseca, I. Casal, and C. Leclerc. 1997. Recombinant parvovirus-like particles as an antigen carrier: a novel nonreplicative exogenous antigen to elicit protective antiviral cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:7503.
- Sette**, A., S. Buus, S. Colon, J. A. Smith, C. Miles, and H. M. Grey. 1987. Structural characteristics of an antigen required for its interaction with Ia and recognition by T cells. *Nature* 328:395.
- Shibagaki**, N., and M. C. Udey. 2002. Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immunol* 168:2393.
- Skerra**, A. 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in *Escherichia coli*. *Gene* 151:131.
- Sparwasser**, T., R. M. Vabulas, B. Villmow, G. B. Lipford, and H. Wagner. 2000. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol* 30:3591.
- Sprent**, J. 1973. Circulating T and B lymphocytes of the mouse. I. Migratory properties. *Cell Immunol* 7:10.
- Stittelaar**, K. J., P. Hoogerhout, W. Ovaas, R. R. van Binnendijk, M. C. Poelen, P. Roholl, C. A. van Els, A. D. Osterhaus, and E. J. Wiertz. 2001. In vitro processing and presentation of a lipidated cytotoxic T-cell epitope derived from measles virus fusion protein. *Vaccine* 20:249.
- Stöckl**, L., Charakterisierung der Bedeutung einer Zellpermeabilität vermittelnden Region für den Lebenszyklus des Hepatitis B-Virus und Etablierung von zellpermeablen Nukleokapsiden für den Protein- und Gentransfer, in Fakultät für Chemie und Pharmazie. 2002 Ludwigs-Maximilians-Universität: München.

- Stockl, L., A. Berting, B. Malkowski, R. Foerste, P. H. Hofschneider, and E. Hildt.** 2003. Integrity of c-Raf-1/MEK signal transduction cascade is essential for hepatitis B virus gene expression. *Oncogene* 22:2604.
- Storkus, W. J., H. J. Zeh, 3rd, R. D. Salter, and M. T. Lotze.** 1993. Identification of T-cell epitopes: rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution. *J Immunother* 14:94.
- Storni, T., F. Lechner, I. Erdmann, T. Bachi, A. Jegerlehner, T. Dumrese, T. M. Kundig, C. Ruedl, and M. F. Bachmann.** 2002. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J Immunol* 168:2880.
- Stoscheck, C. M.** 1990. Quantitation of protein. *Methods Enzymol* 182:50.
- Stryhn, A., L. O. Pedersen, A. Holm, and S. Buus.** 2000. Longer peptide can be accommodated in the MHC class I binding site by a protrusion mechanism. *Eur J Immunol* 30:3089.
- Studier, F. W.** 1991. Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J Mol Biol* 219:37.
- Takahashi, N., T. Orita, and M. Hirose.** 1995. Production of chicken ovalbumin in *Escherichia coli*. *Gene* 161:211.
- Thoren, P. E., D. Persson, M. Karlsson, and B. Norden.** 2000. The antennapedia peptide penetratin translocates across lipid bilayers - the first direct observation. *FEBS Lett* 482:265.
- Thoren, P. E., D. Persson, P. Isakson, M. Goksoer, A. Onfelt, and B. Norden.** 2003. Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun* 307:100.
- Toes, R. E., F. Ossendorp, R. Offringa, and C. J. Melief.** 1999. CD4 T cells and their role in antitumor immune responses. *J Exp Med* 189:753.
- Tough, D. F., S. Sun, and J. Sprent.** 1997. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* 185:2089.
- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350.
- Tyagi, M., M. Rusnati, M. Presta, and M. Giacca.** 2001. Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem* 276:3254.
- Ulrich, R., M. Nassal, H. Meisel, and D. H. Kruger.** 1998. Core particles of hepatitis B virus as carrier for foreign epitopes. *Adv Virus Res* 50:141.

- Urban, R.G., R.M. Chicz, W.S. Lane, J.L. Strominger, A. Rehm, M.J. Kenter, F.G. UytdeHaag, H. Ploegh, B. Uchanska-Ziegler, and A. Ziegler.** 1994. A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1534-8.
- Vanhoof, G., F. Goossens, I. De Meester, D. Hendriks, and S. Scharpe.** 1995. Proline motifs in peptides and their biological processing. *Faseb J* 9:736.
- Varshavsky, A.** 1992. The N-end rule. *Cell* 69:725.
- Villadangos, J. A., and H. L. Ploegh.** 2000. Proteolysis in MHC class II antigen presentation: who's in charge? *Immunity* 12:233.
- Villadangos, J. A.** 2001. Presentation of antigens by MHC class II molecules: getting the most out of them. *Mol Immunol* 38:329.
- Vives, E., P. Brodin, and B. Lebleu.** 1997. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 272:16010.
- Wadia, J. S., R. V. Stan, and S. F. Dowdy.** 2004. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 10:310.
- Wagner, H.** 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 5:62.
- Walunas, T. L., D. J. Lenschow, C. Y. Bakker, P. S. Linsley, G. J. Freeman, J. M. Green, C. B. Thompson, and J. A. Bluestone.** 1994. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1:405.
- Wang, R. F., and H. Y. Wang.** 2002. Enhancement of antitumor immunity by prolonging antigen presentation on dendritic cells. *Nat Biotechnol* 20:149.
- Wender, P. A., D. J. Mitchell, K. Pattabiraman, E. T. Pelkey, L. Steinman, and J. B. Rothbard.** 2000. The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:13003.
- Whiteside, T. L., and C. Odoux.** 2004. Dendritic cell biology and cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother* 53:240.
- Wingfield, P.T., S.J. Stahl, R.W. Williams, and A.C. Steven.** 1995. Hepatitis core antigen produced in Escherichia coli: subunit composition, conformational analysis, and in vitro capsid assembly. *Biochemistry* 34:4919-32.
- Yaron, A., and F. Naider.** 1993. Proline-dependent structural and biological properties of peptides and proteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28:31.
- Yewdell, J. W., C. C. Norbury, and J. R. Bennink.** 1999. Mechanisms of exogenous antigen presentation by MHC class I molecules in vitro and in vivo: implications for generating CD8+ T cell responses to infectious agents, tumors, transplants, and vaccines. *Adv Immunol* 73:1.

Yewdell, J. W., U. Schubert, and J. R. Bennink. 2001. At the crossroads of cell biology and immunology: DRiPs and other sources of peptide ligands for MHC class I molecules. *J Cell Sci* 114:845.

Zhang, X., S. Sun, I. Hwang, D. F. Tough, and J. Sprent. 1998. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8⁺ T cells in vivo by IL-15. *Immunity* 8:591.

Zlotnick, A., N. Cheng, J. F. Conway, F. P. Booy, A. C. Steven, S. J. Stahl, and P. T. Wingfield. 1996. Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry* 35:7412.

Zlotnick, A., N. Cheng, S. J. Stahl, J. F. Conway, A. C. Steven, and P. T. Wingfield. 1997. Localization of the C terminus of the assembly domain of hepatitis B virus capsid protein: implications for morphogenesis and organization of encapsidated RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:9556.

Zlotnick, A., J.M. Johnson, P.W. Wingfield, S.J. Stahl, and D. Endres. 1999. A theoretical model successfully identifies features of hepatitis B virus capsid assembly. *Biochemistry*. 38:14644-52.

8 Abkürzungsverzeichnis

AHT	Anhydrotetracyclin	GFP	grün fluoreszierendes Protein
Antp (43-58)	Zellpermeabilitätsmotiv der Antennapedia-Homeodomäne	GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony stimulating factor</i>
APC	antigenpräsentierende Zelle	HABA	2-(4-Hydroxy-phenylazo)-benzoesäure
AS	Aminosäuren	HBcAg	HBV Core-Monomerprotein (<i>hepatitis B core antigen</i>)
β_2m	β_2 -Mikroglobulin	HBV	Hepatitis B-Virus
bp	Basenpaar	HIV-1	humane Immundefizienz Virus Typ 1
BSA	bovines Serumalbumin	HLA	humanes Leukozyten Antigen
CD[#]	<i>cluster of differentiation</i> [Nummer]	H2	Gewebeverträglichkeit 2 (<i>histocompatibility 2</i>)
CD25	α -Kette des IL-2-Rezeptors	IEP	Isoelektrischer Punkt
CD69	<i>very early activation antigen</i>	IFA	inkomplettes Freundsches Adjuvans
CFA	komplettes Freundsches Adjuvans	IFN γ	Interferon γ
CFSE	<i>5-6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester</i>	Ig	Immunglobulin
CpG-ODN	CpG-Oligodesoxynukleotide	IL-[#]	Interleukin-[Nummer]
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)	i.p.	intraperitoneal
C-Terminus	Carboxyterminus	IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Cy5	Cyaninfarbstoff 5	ISCOMs	<i>immune stimulatory complexes</i>
DC	dendritische Zelle	i.v.	intravenös
DMSO	Dimethylsulfoxid	K-FGF	Kaposi-Fibroblasten Wachstumsfaktor
DNA	Desoxyribonukleinsäure	LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
DTT	Dithiothreitol	LCMV	lymphozytischer Choriomeningitis Virus
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>	LPS	Lipopolysaccharid
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>		
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
FCS	fötale Kälberserum		
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat		
FSC	Vorwärtsstreuung (<i>forward scatter</i>)		

MIR	<i>major immunodominant region</i>	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylen- diamin
MTS	Membrantranslokationsmotiv (<i>membrane translocating sequence</i>)	TGF	<i>transforming growth factor</i>
MuCMV	murines Zytomegalovirus	TGN	Transgolgi-Netzwerk
NHS	N-Hydroxysuccinimid	TLM	Translokationsmotiv
NTA	Nitrilotriacetat	TLR	Toll-Signalrezeptor (<i>toll- like receptor</i>)
N-Terminus	Aminoterminus	TNF	Tumornekrosefaktor
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)	Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
PBS	Phosphat gepufferte Saline	VLP	virale Kapside, Virus ähnliche Partikel (<i>virus like particle</i>)
PBST	PBS mit 0.05% Tween		
PCR	Polymerasekettenreaktion		
PE	R-Phycoerythrin		
PHA	Phytohemagglutinin		
PI	Propidiumiodid		
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid		
PVDF	Polyvinylendifluorid		
RAG	rekombinationsaktivierende Gene		
rh	rekombinant human		
rm	rekombinant murin		
RNA	Ribonukleinsäure		
RT	Raumtemperatur		
s.c.	subcutan		
SDS	Sodiumdodecylsulfat		
SDS-Page	SDS-Polyacrylamid- Gelelektrophorese		
SSC	Seitwärtstreuung (<i>side scatter</i>)		
SV	Säulenvolumen		
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA-Puffer		
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>		
TCR	T-Zell-Rezeptor		

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zum Gelingen der Dissertation beigetragen haben, meinen Dank aussprechen.

Herrn Dr. Eberhard Hildt danke ich für die interessante Themenstellung, für seine Diskussion und Anregungen während der Arbeit, für den großen Freiraum zur Bearbeitung des Projektes und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der Labormittel.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee danke ich für sein Interesse an der Arbeit, für seine Diskussion und guten Denkanstöße zur Weiterentwicklung des Projektes sowie für seine Bereitschaft, die Dissertation an der Universität Tübingen zu vertreten.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Burger danke ich für sein Interesse an der Arbeit und seine freundliche Bereitschaft, die Betreuung der Dissertation zu übernehmen.

Allen meinen Laborkollegen aus der Nachwuchsgruppe 1 möchte ich herzlich für ihre große Hilfsbereitschaft und das ausgezeichnete Arbeitsklima danken.

Meinen Praktikanten Anne Schumacher, Mirjam Preuß und Fabian Grammes danke ich für ihre hilfreiche Mitarbeit im Projekt.

Frau Dr. Esther Witsch, Herrn Dr. Andreas Hutloff und Herrn Dr. Martin Dorner danke ich für ihre großartige Unterstützung beim Erlernen von immunologischen Methoden und „Aushelfen“ mit dem einen oder anderen Antikörper sowie für ihre Diskussion und Ideen für das Projekt.

Frau Petra Matz gilt ein ganz herzliches Dankeschön; sie hat mir geduldig tierexperimentelles Arbeiten gezeigt und mich netterweise bei den Tierexperimenten mitunterstützt.

Herrn Dr. Hans Huser danke ich ebenfalls für seine Mithilfe beim tierexperimentellen Arbeiten und bei der Generierung des Antiserums gegen Ovalbumin.

Herrn Dr. Thomas Kammertöns und Frau Petra Straub, Max Delbrück-Zentrum Berlin, danke ich für die Betreuung und Durchführung der Versuche im Tumormodell. Durch Thomas' Begeisterungsfähigkeit für „neue Spielwiesen“ konnte die Kooperation so schnell zustande kommen und brachte das Projekt produktiv voran.

Herrn Prof. Jörg Steinmann, Universitätsklinikum Kiel, danke ich für den interessanten Forschungsaufenthalt in seinem Labor, der neue Denkanstöße brachte. Die Zusammenarbeit mit ihm und seinen Mitarbeiterinnen Frau Dr. Sabine Laus und Frau Petra Deegen hat Spaß gemacht.

Herrn Prof. Gelderblom, Robert Koch-Institut Berlin, danke ich für die elektronenmikroskopischen Analysen.

Herrn Prof. Germain (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda USA), Herrn Dr. Krüken (Universität, Düsseldorf), Herrn Dr. Schäfer (Robert Koch-Institut, Berlin) und Herrn Prof. Walden (Charité, Berlin) danke ich für die Bereitstellung von Zelllinien und Hybridomen.

Herrn Fischer, Herrn Dr. Kalbacher und Herrn Dr. Stevanovic (alle Universität Tübingen) danke ich für die Synthese und die freundliche Überlassung von Peptiden.

Mein aller herzlichster Dank gilt meinen lieben Eltern, Ursula und Alois Bleifuß, die es mir ermöglicht haben zu studieren und mich überall, wo nur möglich, unterstützt haben.

Ebenfalls ein ganz besonderer Dank gilt meinen Freunden und meiner ganzen Familie, die mich durch ihre moralische Unterstützung gerade bei Tiefpunkten immer wieder aufgebaut haben und auf die ich mich immer verlassen kann.

10 Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Privatdozenten:

Bisswanger, Bock, Bohley, Braun, Breyer-Pfaff, Eisele, Fröhlich, Grabmayr, Gauglitz, Gönnerwein, Günzl, Häflinger, Hagenmaier, Hamprecht, Hanack, Jäger, Jung, Kaiser, Krug, Lindner, Maier, Mayer, Mecke, Nakel, Pfaff, Pfeiffer, Pommer, Poralla, Probst, Rammensee, Reinecke, Reuter, Stegmann, Stoeva, Strähle, Voelter, Weber, Wegmann, Weser, Werringloer, Wiesinger, Wiesmueller, Wohlleben

11 Lebenslauf

Elke Maria Bleifuß

Geburtstag: 11.08.1971

Geburtsort: Wertheim, am Main

12/2000 bis 09/2004 Promotion am Robert Koch-Institut, Berlin,
Nachwuchsgruppe Molekulare Virologie von Dr. E. Hildt

02/ bis 11/2000 Wissenschaftliche Mitarbeitern am Nikolaus Fiebiger-Zentrum,
Erlangen

04/ bis 11/1999 Diplomarbeit am Universitätsklinikum Tübingen, Abteilung für
Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie,
Gruppe von Dr. G. Klein

10/1993 bis 11/1999 Studium der Biochemie an der Universität Tübingen

04/1997 bis 04/1998 Praktikum am Max Planck-Institut für Biochemie und
Neurobiologie, Martinsried

02/ bis 09/1993 Chemielaborantin am Paul Ehrlich-Institut, Langen,
Abteilung Allergologie

09/1990 bis 02/1993 Ausbildung zur Chemielaborantin, Fresenius in Bad Homburg

1981 bis 1990 Gymnasium

1977 bis 1981 Grundschule