

---

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Expansion von T-Zellen seltener Spezifität  
mittels B-Zellen**

von

**Caroline Zentz**

aus

**Versailles**

2004

---

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt betreut und von Prof. Dr. Horst Domdey vor der Fakultät vertreten.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 23.07.2004

Caroline Zentz

Dissertation eingereicht am 23.07.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 10.11.2004

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Immunsystem: Unspezifische und spezifische Abwehr.....	1
1.1.1	Die spezifische Abwehr: B- und T-Zellen.....	2
1.1.2	Antigenpräsentation.....	4
1.1.3	Der T-Zell-Rezeptor (TCR).....	5
1.2	Viren als Krankheitserreger.....	6
1.2.1	Onkogene Viren.....	7
1.2.2	Die Humanen Papillomviren (HPV).....	8
1.2.3	Das Epstein-Barr-Virus.....	10
1.2.4	EBV und Tumoren.....	12
1.3	Die adoptive T-Zell-Therapie.....	13
1.3.1	Mini-LCLs als professionelle antigenpräsentierende Zellen: Das mini-EBV als viraler Vektor.....	15
1.3.2	CD40-Ligand-aktivierte B-Blasten als professionelle antigenpräsentierende Zellen.....	17
1.4	Immunreaktionen gegen EBV und HPV.....	18
1.5	Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	19
<b>2</b>	<b>Material.....</b>	<b>20</b>
2.1.1	Bakterienstämme.....	20
2.1.2	Zelllinien.....	20
2.1.3	Viren.....	21
2.1.4	Plasmide.....	21
2.1.5	Antikörper.....	22
2.1.6	Peptide und HLA-Peptid-Tetramere.....	23
2.2	Sonstige Reagenzien und Materialien.....	23
2.3	Geräte.....	24

---

<b>3</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>25</b>
3.1	Arbeiten mit DNA.....	25
3.1.1	Polymerase-Kettenreaktion .....	25
3.2	Arbeiten mit Bakterien.....	26
3.2.1	Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien.....	26
3.2.2	Transformation von Bakterien .....	27
3.3	Arbeiten mit Viren.....	28
3.3.1	EBV: Herstellung von infektiösen mini-EBV-Überständen .....	28
3.3.2	EBV: Herstellung von mini-LCLs .....	28
3.3.3	Rekombinante Vacciniaviren .....	29
3.4	Arbeiten mit Zellen .....	29
3.4.1	Grundlegende Arbeiten mit Zellen.....	29
3.4.2	Isolation von primären humanen Lymphozyten aus Vollblut.....	30
3.4.3	Phänotypisierung von Zellen mittels FACS-Analyse .....	30
3.4.4	Immunzytochemische Analyse von Zellen.....	31
3.4.5	Herstellung von T-Zelllinien .....	32
3.4.6	Funktionelle Analyse von T-Zellen .....	33
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>37</b>
4.1	Arbeiten mit primärem Tumormaterial .....	37
4.1.1	Asservierung primären Tumormaterials .....	37
4.1.2	Untersuchung von Tumorbiopsien auf HPV16-DNA .....	38
4.1.3	HLA-Assoziation HPV16-positiver Karzinome .....	39
4.1.4	Etablierung von Zelllinien aus primärem Tumormaterial .....	40
4.2	Herstellung von E6-, E7-exprimierenden mini-LCLs.....	41
4.2.1	Herstellung von mini-EBV-Plasmiden .....	41
4.2.2	Herstellung und Charakterisierung mini-EBV-infizierter B-Zelllinien (mini- LCLs).....	43
4.2.3	T-Zell-Stimulation mit mini-LCLs .....	47
4.2.4	Einzelzellklonierung der E7-mini-LCL-spezifischen T-Zellen .....	53
4.3	Herstellung von T-Zelllinien mit Peptid-beladenen B-Blasten.....	58
4.3.1	Die B-Blasten waren nach Langzeitkultivierung EBV-frei.....	59
4.3.2	Mit peptidbeladenen B-Blasten konnten T-Zellen stimuliert und expandiert werden .....	60

---

4.3.3	In B-Blasten-stimulierten T-Zellkulturen vermehrten sich tetramerfärbende Zellen .....	61
4.3.4	YML-stimulierte T-Zellen reagierten auf YML-beladene Zielzellen mit spezifischer IFN- $\gamma$ -Sekretion.....	63
4.3.5	YML-spezifische T-Zellen lysierten YML-beladene Zielzellen.....	64
4.3.6	YML-stimulierte T-Zellen lysierten Zielzellen, die E7 endogen prozessieren.....	65
4.3.7	YML-stimulierte T-Zellen lysierten YML-beladene CaSki-Zellen.....	66
4.3.8	Einzelzellklonierung der YML-spezifischen T-Zelllinien.....	67
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>73</b>
5.1	Einsatz von mini-LCLs für die Stimulation seltener T-Zellen .....	76
5.2	Aktivierte B-Zellen expandieren T-Zellen seltener Spezifität.....	80
5.3	Charakterisierung der T-Zellklone .....	84
5.4	Identifikation HPV-assoziiertes Karzinome .....	86
5.5	Ausblick .....	89
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>93</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>94</b>

# 1 Einleitung

Die Infektion mit dem humanen Papillomvirus steht in kausalem Zusammenhang mit dem Entstehen von Zervixkarzinomen, der zweithäufigsten Krebserkrankung bei Frauen weltweit. Auch in einem signifikanten Teil der Kopf-Hals-Karzinome ist HPV-DNA zu finden. Die Möglichkeiten der Therapie derartiger Tumorerkrankungen sind beschränkt und wenig zufriedenstellend. Große Hoffnung wird derzeit auf die Etablierung geeigneter adoptiver T-Zelltherapien gelegt. Da sich im Blut HPV-Infizierter wie auch Nichtinfizierter nur äußerst wenige HPV-spezifische T-Zellen finden - meist liegen die Zellzahlen unter der Nachweisgrenze - erfordert ihre Expansion den Einsatz besonders effizienter Methoden.

In dieser Arbeit werden nach zwei verschiedenen Methoden spezifische, zytotoxische T-Zellen gegen das humane Papillomvirus 16 expandiert und detailliert analysiert. Beide Methoden beruhen auf der Verwendung von aktivierten B-Zellen als Antigenpräsentatoren. B-Zellen sind ein bei der Etablierung von Immuntherapien noch selten eingesetzter Zelltyp, der aber viele Vorteile gegenüber herkömmlichen Systemen hat.

Zur Einführung werden im Folgenden, nach einem kurzen Überblick über das Immunsystem, die Zellarten und Virustypen detailliert besprochen, die zum Verständnis dieser Arbeit wichtig sind.

## 1.1 Das Immunsystem: Unspezifische und spezifische Abwehr

Voraussetzung für eine erfolgreiche Erregerabwehr und damit die Gesunderhaltung unseres Körpers ist ein funktionierendes Immunsystem (lat. immunis = frei, unberührt). Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Organen, Zellen und Proteinen, die darauf spezialisiert sind, den Körper vor den unterschiedlichsten Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen zu schützen. Es besteht aus zwei miteinander kooperierenden Abwehrmechanismen: der von Geburt an vorhandenen, unspezifischen Abwehr, und der im Laufe des Lebens erworbenen

und sich ständig anpassenden spezifischen Abwehr. Die unspezifische Abwehr kann Fremdkörper und Krankheitserreger bereits beim ersten Kontakt unschädlich machen. Haut und Schleimhäute hindern Erreger am Eindringen in den Körper, und Phagozyten, natürliche Killerzellen, antibakterielle und antivirale Proteine, sowie Entzündungsreaktionen wehren Erreger ab, die die mechanischen Barrieren überwinden konnten. All diese Mechanismen bleiben im Laufe des Lebens unverändert.

Schon während der Auseinandersetzung der unspezifischen Abwehr mit dem Erreger und besonders, wenn die unspezifische Abwehr nicht in der Lage ist, den Erreger schnell und effizient zu bekämpfen, wird die spezifische Abwehr aktiviert. Sie wirkt über spezielle Lymphozyten (zelluläre Immunität) und zirkulierende Antikörper (humorale Immunität), also lösliche Moleküle, die Toxine, freie Bakterien und Viren in den Körperflüssigkeiten unschädlich machen. Die wichtigsten Merkmale dieser Abwehr sind Spezifität, Vielfalt, Gedächtnis und Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd. Die Zellen der spezifischen Abwehr werden im Folgenden genauer besprochen.

### **1.1.1 Die spezifische Abwehr: B- und T-Zellen**

Sobald die Barriere der unspezifischen Abwehr von einem Erreger überwunden wird, haben spezielle Lymphozyten die Aufgabe, seine weitere Verbreitung zu verhindern und ihn unschädlich zu machen. Die Besonderheit dieser Abwehrzellen ist, dass sie Antigene (Fremdstoffen, die eine Immunantwort auslösen) mithilfe exakt passender Rezeptoren spezifisch als körperfremd erkennen können. Diese Rezeptoren befinden sich membrangebunden auf der Zelloberfläche oder in löslicher Form als Antikörper in den Körperflüssigkeiten. Durch die Gedächtnisfunktion der spezifischen Abwehrzellen kommt es bei einem erneuten Kontakt mit demselben Antigen zu einer sehr viel schnelleren und effektiveren Abwehrreaktion. Auf dieser Eigenschaft beruht zum Beispiel die Wirksamkeit von Impfungen.

Man unterscheidet bei den Lymphozyten zwischen B-Zellen und T-Zellen. Wie alle Blutzellen stammen beide zunächst von pluripotenten Stammzellen im Knochenmark ab. B-Zellen reifen im Knochenmark heran, T-Zellen im Thymus (Kruisbeek, 1993;

van Ewijk, 1991). Reife B- und T-Zellen beginnen dann durch den Körper zu zirkulieren und konzentrieren sich hauptsächlich in den Lymphknoten und der Milz (siehe Abb. 1.1 und 1.2), da dort die höchste Wahrscheinlichkeit ist, auf ein antigenes Epitop (der Bereich des Antigens, der von einem Lymphozyten oder Antikörper erkannt wird) zu treffen. Hier findet die Antigenerkennung und die weitere Vermehrung der Zellen hauptsächlich statt, weil B- und T-Lymphozyten, und sog. antigenpräsentierende Zellen in enger räumlicher Dichte vorliegen und daher besonders effizient interagieren können.

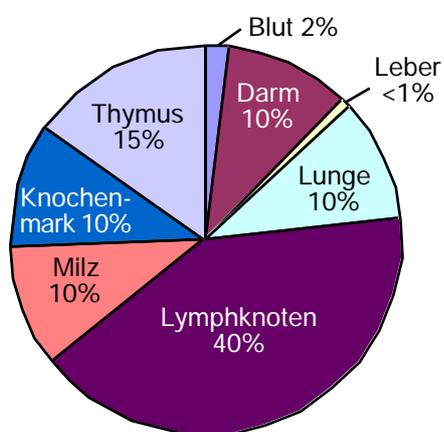


Abb. 1.1: T-Zellen im Körper  
( $3 \times 10^{11}$ )

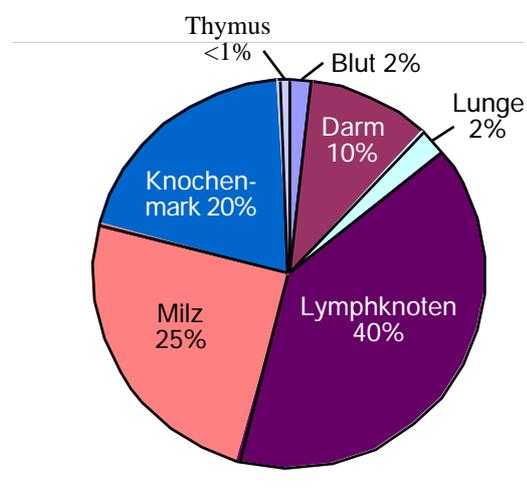


Abb. 1.2: B-Zellen im Körper  
( $1,5 \times 10^{11}$ )

Abbildung 1.1 und 1.2: Geschätzte Anzahl und Verteilung von T- und B-Lymphozyten im Körper eines Gesunden (nach Westermann und Pabst, 1992)

B- und T-Zellen können mithilfe ihrer spezifischen Rezeptoren zwischen körpereigenen oder körperfremden Strukturen unterscheiden. Jede Zelle erkennt nur ein genau zu ihrem Rezeptor passendes Epitop. T- und B-Zellen reagieren sehr unterschiedlich, sobald ihr Oberflächenrezeptor einen passenden Bindungspartner gefunden hat. Wird der membrangebundene Antigenrezeptor einer B-Zelle durch die Bindung eines Epitops aktiviert, proliferiert die Zelle, und ein Teil der B-Zellen differenziert zu so genannten Plasmazellen, die Antikörper gegen das Antigen ausschütten. Antikörper sind eine lösliche Form der Antigenrezeptoren der B-Zelle

und binden Pathogene oder Proteine. Diese werden dadurch markiert und in der Folge von Phagozyten aufgenommen und unschädlich gemacht. Plasmazellen leben ungefähr 2-3 Tage. Aus dem anderen Teil der B-Zellen werden nach dem Epitopkontakt langlebige B-Gedächtniszellen, die noch Jahre später bei erneutem Kontakt zu ihrem Antigen sehr schnell die spezifischen Antikörper bilden können. Eine andere wichtige Rolle nehmen die B-Zellen als sog. professionelle antigen-präsentierende Zellen (APC) ein: Sie prozessieren Proteine intrazellulär und präsentieren Epitope dieser Proteine auf ihrer Zelloberfläche. Dadurch kann die Zelle ihrer Umgebung signalisieren, ob sie pathogene Strukturen aufgenommen hat oder selbst infiziert ist. Diese Zell-Zell-Interaktionen sind von grundlegender Bedeutung für das Zusammenspiel der verschiedenen Bestandteile des Immunsystems. Sie werden später noch genauer behandelt (siehe 1.1.2).

Werden die spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Lymphozyten aktiviert, startet auch hier die Proliferation und die T-Zellen beginnen sich zu differenzieren. Es gibt zwei Arten von T-Effektorzellen: Zytotoxische T-Zellen (CD8-positiv) können infizierte Zellen und Tumorzellen direkt zerstören. T-Helferzellen (CD4-positiv) sezernieren Zytokine (Botenstoffe) und aktivieren weitere Zellen zum Aufbau einer Immunität gegen das Antigen, so z.B. B-Zellen zur Antikörperproduktion. Im Gegensatz zu den Antikörpern der B-Zellen befinden sich die T-Zell-Rezeptoren (TCR) immer membrangebunden auf der Oberfläche der T-Zellen und erkennen nur Epitope, die ihnen von anderen Körperzellen präsentiert werden.

## 1.1.2 Antigenpräsentation

Professionelle Antigenpräsentierende Zellen (APC) bauen intrazellulär ständig eigene und aus der Umgebung aufgenommene Proteine ab. Dabei entstehen Peptide, die nach der Bindung an sog. MHC-Moleküle über spezielle Transportwege an die Oberfläche der Zelle gebracht werden. Diese Peptide sind die Epitope, die von T-Zellen im Kontext von sog. MHC-Molekülen (*major histocompatibility complex*) erkannt werden. Die Peptide bestehen aus 9 bis über 15 Aminosäuren. T-Zellen erkennen nur die Struktur aus Epitop und dem MHC-Molekül. Die MHC-Moleküle sind das Selbstmarkierungssystem des Körpers. Sie sind für eine effektive Epitop-

Präsentation auf der Zelloberfläche notwendig. Beim Menschen nennt man diese Moleküle auch humane Leukozytenantigene (HLA; Dausset, 1981). Es gibt so viele HLA-Gene, die an der Präsentation von Epitopen beteiligt sind, dass es praktisch unmöglich ist, zwei Menschen mit gleichem HLA-Typ zu finden, die keine Geschwister sind. Ursprünglich wurden diese Moleküle bei der Transplantationsforschung gefunden, wo das Immunsystem transplantierte, allogene Gewebe und Organe wegen des unterschiedlichen HLA-Typs abstößt (Bijur, 1996; Tilney und Kupiec-Weglinski, 1991).

Es gibt zwei Klassen von MHC-Molekülen. MHC-Klasse-I-Moleküle sind in allen kernhaltigen Zellen exprimiert. An sie sind Peptide gebunden, die von zytoplasmatischen Proteinen stammen. Die Kombination aus Peptid und MHC-Klasse-I-Molekülen wird von zytotoxischen T-Zellen erkannt. Das Zusammenspiel von MHC-Klasse-I und zytotoxischen T-Zellen ist also verantwortlich für die Bekämpfung von virusinfizierten Zellen und für das Abtöten von körpereigenen entarteten Zellen, bevor sich Tumoren entwickeln können. Dagegen präsentieren MHC-Klasse-II-Moleküle Peptide, die von Proteinen stammen, die aus dem extrazellulären Raum durch Endozytose aufgenommen wurden. Sie werden von T-Helferzellen erkannt und sind nur auf professionellen APC und aktivierten T-Zellen zu finden. Zu den professionellen APC gehören neben den aktivierten B-Zellen auch die dendritischen Zellen (DC), die Makrophagen, und die Langerhans-Zellen.

### 1.1.3 Der T-Zell-Rezeptor (TCR)

Die T-Zell-Rezeptoren (TCR) wurden 1983 von Meuer et al. identifiziert (Meuer et al., 1983). TCR sind aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette aufgebaut, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Jede Kette verfügt über eine konstante und eine variable (V-) Region. In den V-Regionen beider Ketten liegen die Bereiche, die die Epitopspezifität festlegen. Die V-Region der  $\alpha$ -Kette wird von ca. 100 sogenannten V- („*variable*“) und 50 J („*joining*“) -Gensegmenten codiert, die  $\beta$ -Kette von ca. 30 V-, zwei D- („*diversity*“) und zwölf J-Segmenten. Der TCR selbst besteht dann aber aus nur je einem Gensegment: Bei der T-Zellentwicklung im Thymus werden durch somatische Rekombinationen in diesen Gensegmenten

funktionsfähige TCR mit unterschiedlichsten Spezifitäten gebildet. Zufälliges Einfügen von zusätzlichen Nukleotiden (N-Nukleotiden) zwischen den rekombinierenden Regionen durch die terminale Desoxyribonucleotidyltransferase erhöht die Anzahl möglicher TCR-Spezifitäten. Dadurch können die verschiedensten Epitope von T-Zellen erkannt werden. Jede T-Zelle exprimiert nur eine Art von TCR. Inzwischen wurden erste Röntgenstrukturanalysen von Komplexen aus TCR, Peptid und MHC-Molekül aufgeklärt (Garboczi et al., 1996). Die epitopspezifischen Kontakte finden überwiegend über eine Region des TCR statt, die besonders hohe Variabilität hat. Diese hypervariable Region wird als CDR3 bezeichnet.

Die strukturelle Diversität von TCR kann sehr hoch sein. Rezeptoren gegen ein und denselben Peptid-MHC-Komplex können beispielsweise unterschiedliche variable Gensegmente enthalten. Allerdings finden sich auch immundominierende TCR: T-Zellen mit TCR einer bestimmten Struktur können das epitopspezifische Repertoire eines Spenders für ein bestimmtes Epitop dominieren, wahrscheinlich aufgrund einer besonders guten Bindung an den HLA-Peptid-Komplex. Die genaue Aufklärung der Diversität des TCR-Repertoires gegen ein therapeutisch relevantes Epitop kann helfen, besonders effektive, therapeutisch wirkungsvolle T-Zellen und TCR zu identifizieren.

## 1.2 Viren als Krankheitserreger

Viren sind Komplexe aus einem DNA- oder einem oder mehreren RNA-Molekülen und einer Hülle aus Protein (Capsid). Einige Viren verfügen zusätzlich über Virushüllen, also Membranen, die das Capsid einschließen. Viren haben keinen eigenen Stoffwechsel, weshalb sie für ihre Vermehrung auf eine Wirtszelle angewiesen sind. Sie infizieren Zellen, um deren Biosyntheseapparat für die Herstellung ihrer eigenen Genome und Proteine zu benutzen. Wenn sie hierbei die Wirtszelle und damit den Organismus schädigen, sind sie Krankheitserreger. Das Immunsystem eines jeden von uns wurde schon mit Erkrankungen konfrontiert, denen eine Virusinfektion zugrunde lag, wie zum Beispiel Windpocken, Warzen,

Röteln, oder eine einfache Erkältung. Mit einem gesunden Immunsystem schaffen wir es, die meisten Virusinfektionen abzuwehren.

### 1.2.1 Onkogene Viren

Wenn sich körpereigene Zellen den normalen Kontrollmechanismen des Wachstums und der Teilung entziehen, können sie zu Krebszellen werden. Seit den letzten Jahrzehnten beunruhigt die ständig ansteigende Anzahl neuer Krebserkrankungen die Menschen zunehmend. In den Industrieländern stirbt etwa jeder Vierte an Krebs (Jemal et al., 2002).

Der Übergang von einer normalen Zelle zu einer Krebszelle lässt sich häufig morphologisch und zellbiologisch gut erkennen. Krebszellen haben durch die Störung der normalen Wachstumskontrolle eine erhöhte Zellteilungsrate. Sie haben ihre Differenzierungsfähigkeit verloren und sie können metastasieren, haben also eine gesteigerte Fähigkeit zur Invasion benachbarter Gewebe. Diese neuen Eigenschaften werden durch Änderungen der genetischen Information (Mutationen) hervorgerufen, die bei jeder Zellteilung von der betroffenen Mutterzelle an die Tochterzelle weitergegeben werden. Ursachen für solche Mutationen können chemische Karzinogene, genetische Prädisposition, Röntgen- und UV-Strahlung sowie andere Umwelteinflüsse sein. Auch Infektionen mit bestimmten Viren können die Entstehung von Tumoren hervorrufen.

Bestimmte Gene einiger Viren codieren Proteine, die beispielsweise durch die Störung der Zellzyklus-Kontrolle zu einem unkontrollierten Wachstum infizierter Zellen führen. Viren, die solche Onkogene tragen, werden als Tumoviren bezeichnet. 1910 beobachtete Peyton Rous, dass gesunde Hühner nach Transplantation von Tumorzellen von am Spindelzellsarkom erkrankten Hühnern ebenfalls ein Spindelzellsarkom entwickelten. (Rous, 1979). Später entdeckte man, dass diese Übertragung durch ein Virus verursacht wird und nannte dieses Virus Rous-Sarkom-Virus. Das erste humane Tumovirus beschrieben 1964 die Forscher Tony Epstein und Yvonne Barr. Sie identifizierten mithilfe des 20 Jahre zuvor entwickelten Elektronenmikroskops in Burkitt-Lymphomzellen von Kindern das Epstein-Barr-Virus (EBV; Epstein et al., 1964). Die Eigenschaften dieses Virus, auf

die in 1.2.3 noch genau eingegangen wird, machen es zu einem interessanten Forschungsobjekt, und auch in vorliegender Arbeit nimmt es eine wichtige Stellung ein. Es gibt weitere Tumoviren, u.a. die Hepatitis B und C-Viren, die an der Entstehung des primären Leberkarzinoms beteiligt sind, und das Retrovirus HTLV-1, das eine Form der Leukämie bei Erwachsenen hervorruft. Für diese Arbeit steht neben EBV noch eine andere Art von Tumoviren im Vordergrund: Die humanen Papillomviren (HPV). Bereits vor 30 Jahren entdeckte man einen Zusammenhang zwischen einer HPV-Infektion und dem Auftreten von Zervixkarzinomen (zur Hausen et al., 1974). Inzwischen ist bekannt, dass in nahezu allen Zervixkarzinomen und mindestens einem Drittel der Kopf-Hals-Karzinome DNA von Mitgliedern der HPV-Familie gefunden wird. Diese Virusfamilie und die mit ihr assoziierten Erkrankungen werden im nächsten Kapitel beschrieben.

### 1.2.2 Die Humanen Papillomviren (HPV)

Humane Papillomviren (HPV) sind kleine DNA-Viren, die zur Familie der Papovaviren gehören. Es sind über 70 verschiedene HPV-Typen bekannt (zur Hausen, 1996), wobei keiner von ihnen *in vitro* propagierbar ist. HPV-Partikel haben mit ca. 55 nm sehr kleine Kapside, die aus 72 Kapsomeren bestehen und nicht von einer Membran umschlossen sind. Im Kapsid befindet sich das zirkuläre doppelsträngige DNA-Genom mit neun offenen Leserahmen auf ca. 8000 bp. Die virale DNA wird nur von einem DNA-Strang aus transkribiert, alle Proteine sind also auf einem DNA-Strang in überlappenden Leserahmen codiert. Alle Mitglieder der HPV-Familie sind in der Lage, gutartige bzw. bösartige Tumoren hervorzurufen, weshalb die einzelnen HPV-Typen in „*low risk*“- und „*high risk*“-Typen klassifiziert sind (Lorincz et al., 1992). Die gutartigen kutanen Warzen an Händen oder Füßen gehen auf eine Infektion mit „*low risk*“-HPV-Typen wie den Typen 1, 2, 4 und 41 zurück. In Präkanzerosen und invasiven Tumoren der Zervix ist in 99,7 % der Fälle DNA der „*high risk*“-Typen 16, 18, 45, 31 u.a. zu finden, wobei mit 53 % der Typ 16 am häufigsten vertreten ist (Walboomers et al., 1999). Intraepitheliale Neoplasien der Vulva sind in über 90% mit HPV assoziiert (Junge et al., 1995). Auch in etwa einem Drittel der Kopf-Hals-Karzinome ist HPV-DNA nachweisbar (Klussmann et al., 2001a; van Houten et al.,

2001), wobei gerade Oropharynxkarzinome in bis zu 52% und Tonsillenkarcinome in bis zu 64% HPV16-positiv sind (Ringstrom et al., 2002).

Die Infektion durch HPV findet durch die Bindung des viralen Capsids an einen Rezeptor auf der Zellmembran einer Epithelzelle des Wirts und anschließende Endocytose statt (Day et al., 2003; Roden et al., 1994). Im Genitalbereich werden nach sexueller Übertragung zunächst basale Epithelzellen infiziert. Die Virusvermehrung findet in diesem Stadium nur gleichzeitig mit der Replikation der Wirts-DNA statt und führt zu keinen morphologischen Veränderungen. Die meisten dieser Infektionen sind transient. Ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer HPV-assoziierten Dysplasie besteht nur bei persistierender Infektion, wo mit zunehmender Differenzierung der Keratinozyten in den höher gelegenen Epithelschichten das Virusgenom zunehmend unabhängig von der Wirts-DNA repliziert. Dabei treten erste morphologische Veränderungen (Läsionen) auf, das Virusgenom liegt weiterhin episomal vor. Über die Hälfte dieser Läsionen bildet sich innerhalb von vier Jahren spontan zurück. Aus diesem Stadium kann sich aber auch eine schwere Dysplasie entwickeln. Das Virusgenom liegt dann zunehmend in die Wirts-DNA integriert vor, beim invasiven Karzinom ist dies in 2/3 der Fälle zu beobachten. Eine spontane Regression wird dann in der Regel nicht mehr beobachtet.

In allen „*high risk*“-HPV-positiven Zervixkarzinomen werden die zwei viralen Onkogene E6 und E7 konstitutiv exprimiert (zur Hausen, 2000). In HPV-positiven Kopf-Hals-Karzinomen ist dies in ca. 50% der Fall (van Houten et al., 2001; Wiest et al., 2002). Beide Proteine entwickeln durch vielfältige Wechselwirkungen mit zellulären Proteinen ihre wachstumsfördernden und transformierenden Eigenschaften (zur Hausen, 2000). E6 interagiert zum Beispiel mit dem Tumorsuppressor p53, was zur Degradation von p53 und dem proapoptotischen Protein Bak (Thomas und Banks, 1998) führt, was Apoptoseresistenz und gesteigerter chromosomaler Instabilität bedingt. Zur Wachstumsstimulation durch E6 tragen auch die Aktivierung der Telomerase und Interaktionen mit Proteinen aus der Familie der Src-Kinasen bei (Oda et al., 1999; Veldman et al., 2001). E7 bindet und degradiert u.a. das Retinoblastom-Protein Rb. Diese Degradation führt zur Freisetzung des Transkriptionsfaktors E2F (Boyer et al., 1996), der dann Gene der Zellproliferation aktiviert und damit die Onkogenese durch HPV unterstützt. E7 stört

außerdem durch die Bindung an die Cycline A und E und durch die Inaktivierung von Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen (CDK-Inhibitoren) die Kontrolle des Zellzyklus, was ebenfalls zu unkontrollierter Proliferation beiträgt (Funk et al., 1997). Die Proteine E6 und E7 der „*high risk*“-HPV-Typen spielen damit bei der Karzinogenese durch HPV die zentrale Rolle.

Infektionen mit „*high risk*“-HPVs sind keine Seltenheit. Allerdings beschränken sich die Untersuchungen fast ausschließlich auf junge Frauen, deren Zervikalabstriche auf das Vorhandensein von HPV-DNA untersucht wurden. Man schätzt, dass ca. 20-46 % der 20-25-jährigen Frauen transient infiziert sind (Hinchliffe et al., 1995; Melkert et al., 1993). In den meisten Fällen wird die Infektion in den ersten acht Monaten spontan eliminiert, nur etwa 2-5% der Infektionen persistieren und können nach ca. 15-20 Jahren zu malignen Zellveränderungen führen. Während der langen Zeit der Persistenz steigt die Anzahl der infizierten Zellen, in denen das HPV-Genom nicht nur episomal vorliegt, sondern durch Rekombination auch ins zelluläre Genom integriert. Bei der Untersuchung von Karzinomzellen stellte man fest, dass das Virusgenom dabei präferentiell im Leserahmen des viralen Gens *E2* linearisiert wird, der dadurch unterbrochen wird. *E2* ist für die Kontrolle der Expression der Onkogene *E6* und *E7* zuständig. Durch die Zerstörung des *E2*-Leserahmens kommt es zu einer Überexpression von E6 und E7 (Lehn et al., 1985). Da beide Onkogene konstitutiv in Zervixkarzinomzellen und HPV-positiven Tonsillenkarzinomzellen exprimiert werden und außerdem auch in einem großen Teil der Kopf-Hals-Karzinomzellen der anderen Lokalisationen zu finden sind (Snijders et al., 1992; Wilczynski et al., 1998), stellen beide Proteine ein vielversprechendes Ziel für die adoptive T-Zelltherapie (siehe 1.3) dar.

### 1.2.3 Das Epstein-Barr-Virus

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zur Familie der Herpesviren. Alle Mitglieder dieser Familie haben ein Protein-Core mit einer doppelsträngigen, linearen DNA, die von einem Nukleokapsid aus 162 Kapsomeren umgeben ist. Zwischen Nukleokapsid und der lipidhaltigen Virushülle, die Glykoprotein-*Spikes* trägt und essentiell für die Infektiosität des Virus ist, liegt ein Protein-Tegument. Mit einem Durchmesser von

100 bis über 120 nm und einer Genomgröße von 100 bis 230 kb (EBV: 172 kb; Baer et al., 1984) mit bis zu 200 Genen gehören die Herpesviren zu den größten und komplexesten Viren.

EBV ist eins der häufigsten humanen Viren, über 95 % der erwachsenen Westeuropäer sind infiziert. Die Infektion findet meist im Kindes- und Jugendalter durch Aufnahme über die oralen Schleimhäute statt („*kissing disease*“). Es ist nicht klar, ob das Virus bei der primären Infektion epitheliale Zellen der Mundschleimhaut oder in der Schleimhaut befindliche B-Zellen infiziert. Im Gegensatz zur meist asymptomatisch verlaufenden Infektion im Kindesalter führt eine Primärinfektion im Erwachsenenalter in bis zu 50% der Fälle zu einer Erkrankung mit massiver Proliferation von Lymphozyten, die man „Infektiöse Mononukleose“ (IM) nennt. In der Regel klingt die Erkrankung ohne Komplikationen innerhalb weniger Wochen wieder ab. Im Verlauf der Infektion, sei sie symptomlos oder als IM manifestiert, werden hohe Zahlen an T- und B-Gedächtniszellen gebildet, die Menschen mit einem gesunden Immunsystem lebenslang vor einer erneuten Erkrankung schützen. Allerdings verbleibt das Virus nach Primärinfektion trotz Anwesenheit spezifischer Abwehrzellen in ruhenden B-Zellen. Aus diesem B-Zell-Reservoir werden regelmäßig Viren freigesetzt, die die Epithelzellen der Mundschleimhaut infizieren. Dort findet eine lytische Replikation von EBV statt, weshalb von Seropositiven EBV lebenslang mit dem Speichel ausgeschieden wird (Gerber et al., 1972). In den infizierten B-Zellen befindet sich das Virus hauptsächlich in der latenten Phase seines Lebenszyklus, die man als Latenz 0 bezeichnet. In dieser Phase wird wahrscheinlich kein virales Antigen exprimiert (Thorley-Lawson, 2001). Die Wirts-B-Zelle proliferiert dabei nicht und entgeht der Überwachung durch das Immunsystem (Kieff, 1996). Beim gesunden EBV-Infizierten sind etwa eine bis 50 von  $10^6$  B-Zellen latent mit EBV infiziert (Kieff und Rickinson, 2001). Wird das Virus zum lytischen Infektionszyklus reaktiviert, werden infektiöse EBV-Partikel gebildet (Liebowitz, 1998). Ein gesunder Organismus, der die Primärinfektion bereits überstanden hat, erlebt sowohl die latente also auch die lytische Phase dank seines kompetenten Immunsystems in der Regel als symptomlos. In Immunsupprimierten führt eine Reaktivierung allerdings häufig zu malignen Erkrankungen.

## 1.2.4 EBV und Tumoren

Nach der Veröffentlichung von Epstein et al. 1964 beobachteten Henle et al., dass periphere Lymphozyten nach Kokultivierung mit letal bestrahlten EBV-positiven Burkitt-Lymphomzellen zu verstärktem Wachstum induziert werden (Henle et al., 1967). Dies war ein Hinweis auf ein mögliches onkogenes Potential von EBV. Bei näherer Untersuchung wurde klar, dass EBV primäre B-Zellen *in vitro* sehr effizient infiziert und aktiviert. Die B-Zellen beginnen stark zu proliferieren, vergrößern sich, verstärken die Expression von immunologisch relevanten Oberflächenmolekülen und nehmen den Phänotyp aktivierter B-Zellen an (Pope et al., 1968). Sie werden dann als lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) bezeichnet. *In vivo* gibt es mehrere humane Tumorerkrankungen, die kausal mit EBV in Zusammenhang gebracht werden (Liebowitz, 1998; Niedobitek, 1999). Das Virus wurde ursprünglich aus den Zellen eines Burkitt-Lymphoms isoliert, einem monoklonalen B-Zell-Lymphom, das in Afrika die häufigste Tumorerkrankung von Kindern ist. Charakteristischerweise befindet sich EBV in Burkitt-Zellen im Latenztyp I, in dem nur die beiden nukleären RNA-Moleküle EBER1 und EBER2 und das nukleäre Antigen EBNA1 exprimiert werden. Dagegen befindet sich in Zellen der knapp 40% EBV-positiven Hodgkin-Lymphome, dem in der westlichen Welt häufigsten malignen Lymphom, das Virus in der Latenz II. Hier werden zusätzlich die latenten Membranproteine LMP1 und LMP2 exprimiert (Herbst, 1996; Young et al., 2000). Außerdem wurde EBV in einigen Tumoren gefunden, die nicht lymphoiden Ursprungs sind, so u.a. in dem in Südostasien häufigen undifferenzierten Nasopharynxkarzinom (Latenz II) (Nicholls et al., 1997; Zheng et al., 1994). Die Latenz III, in der alle sechs EBV-kodierten nukleären Antigene (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, EBNA-LP), drei latente Membranproteine (LMP1, 2A, 2B) und die nukleären RNA-Moleküle (EBER1, EBER2) exprimiert sind, findet sich bei der infektiösen Mononukleose, bei den oben genannten *in vitro* generierten LCLs, und bei Lymphomen von Immunsupprimierten, insbesondere nach Transplantationen.

### 1.3 Die adoptive T-Zell-Therapie

Die adoptive Immuntherapie beruht auf der Transfusion von Effektorzellen, in der Regel T-Zellen, mit dem Ziel, das Immunsystem des Empfängers zu unterstützen. Im Gegensatz zur spezifischen adoptiven T-Zell-Therapie versteht man unter der unspezifischen adoptiven T-Zelltherapie die Gabe von T-Zellen, die nicht auf bestimmte Spezifitäten selektiert oder spezifisch reaktiviert wurden, sondern alle möglichen Spezifitäten des Spenderbluts repräsentieren. Die Wirksamkeit eines unspezifischen adoptiven Transfers von T-Zellen wurde erstmals bei der Behandlung von Patienten mit rezidivierender chronischer Leukämie nach Knochenmarkstransplantation mit Leukozyten des Spenders gezeigt (Kolb et al., 1990) und ist inzwischen klinische Routine (Kolb et al., 2004). Man geht davon aus, dass eine Fremderkennung der Leukämie-Zellen durch die allogenen T-Zellen vermittelt wird. Die Gesamtheit von Spenderlymphozyten enthält aber auch T-Zellen, die gesundes Gewebe des Empfängers erkennen und angreifen können („*Graft-versus-host Disease*“). Daher wird die Entwicklung von spezifischen adoptiven Therapien mit antigenspezifischen T-Zellen mit großem Interesse verfolgt.

Für die spezifische adoptive Immuntherapie werden Antigen-spezifische T-Zellen *in vitro* aktiviert und expandiert. Die Spezifität der T-Zellen kann sich dabei beispielsweise gegen Tumorantigene oder virale Antigene richten. Für die Herstellung ausreichender Mengen spezifischer T-Zellen sind professionelle APC nötig, die den zu aktivierenden T-Zellen passende Epitope *in vitro* präsentieren (siehe 1.1.1.1). Die APC müssen dafür entweder das Antigen endogen exprimieren, um die Epitope des Antigens nach intrazellulärer Prozessierung in ausreichender Menge auf ihrer Oberfläche auf MHC zu präsentieren, oder mit synthetisch hergestellten Peptiden, die Epitope repräsentieren, exogen beladen werden. Die wichtigsten professionellen APC des Immunsystems sind dendritische Zellen (DC), Makrophagen und aktivierte B-Zellen (also auch LCLs). Allen gemeinsam ist neben der Expression von MHC Klasse I und II die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle wie B7.1 und B7.2. Diese liefern das zusätzlich zum präsentierten Antigen notwendige Signal für die Aktivierung naiver T-Zellen.

Die spezifische adoptive T-Zelltherapie steht noch ganz am Anfang. Erste überzeugende Ergebnisse konnten und können bei der Prophylaxe und Therapie von Posttransplantations-Lymphomen (PTLD) mit Epstein-Barr-Virus-spezifischen T-Zellen und der manifesten CMV-Infektion nach Transplantation mit CMV-spezifischen T-Zellen erzielt werden. Dabei werden EBV-spezifische T-Zellen durch die Stimulation mit der autologen EBV-infizierten B-Zelllinie, der LCL, *in vitro* hergestellt (Rooney et al., 1998). CMV-spezifische T-Zellen wurden durch die Kokultivierung mit PBMCs (periphere mononukleäre Zellen aus dem Blut) und CMV-infizierten Fibroblasten spezifisch stimuliert und als monoklonale CD8-positive T-Zelllinien verabreicht (Riddell et al., 1992). Heute werden allerdings eher polyklonale CD4- und CD8-positive T-Zellen gegeben, da sich dabei ein größerer therapeutischer Erfolg abzeichnet (Einsele, 2002; Peggs et al., 2003).

Die Therapie von soliden Tumoren mittels adoptiver T-Zelltherapie muss von etwas anderen Voraussetzungen ausgehen. Anders als bei der Therapie von Leukämien steht hier kein Spender zur Verfügung, der über geeignete T-Zellen verfügt, die relativ einfach *in vitro* stimulierbar sind, sondern es müssen die tumorspezifischen T-Zellen, die von sich aus nicht genügend Aktivität entwickeln, den Tumor erfolgreich zu bekämpfen, *in vitro* ausreichend reaktiviert und expandiert werden. Bei Leukämie-Patienten wird außerdem vor der Knochenmarkstransplantation das Immunsystem des Patienten durch Chemotherapie zerstört, um eine Abwehrreaktion gegen das Transplantat zu verhindern. Daher steht hier den transferierten Zellen das gesamte T-Zellkompartiment zu ihrer Expansion zur Verfügung. Möglicherweise ist auch die immunsupprimierende Wirkung von z.B. regulatorischen T-Zellen oder tolerogenen Mechanismen durch die ablative Behandlung abgeschwächt oder verschwunden. Andererseits ist die notwendige medikamentöse Immunsuppression nach Transplantation ein gewisses Hindernis beim Neuaufbau der spezifischen Immunität.

Die Entwicklung von Therapien gegen solide Tumoren konzentriert sich zur Zeit besonders auf das als stark immunogen angesehene maligne Melanom. Gute Ergebnisse wurden mit dem Transfer von expandierten tumorinfiltrierenden Lymphozyten (TILs) erreicht, nachdem vor der Gabe der T-Zellen eine Lymphozytendepletion durch Chemotherapie durchgeführt wurde, um die Persistenz und Funktion der adoptiv transferierten T-Zellen zu verbessern (Dudley et al., 2002).

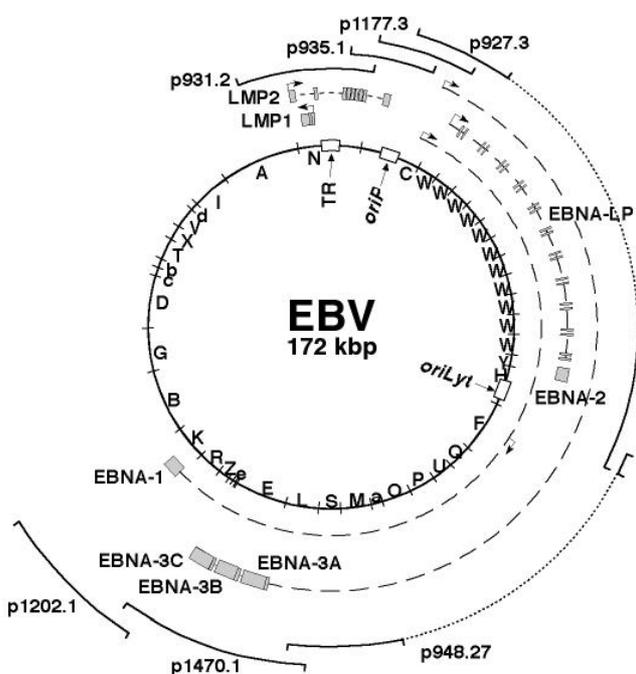
Außerdem konnten nach dem Transfer von T-Zellklonen aus polyklonalen Linien auch relativ gute klinische Resultate erzielt werden (Yee et al., 2002). In beiden Fällen konnte eine Regression der Melanome der Patienten beobachtet werden.

Für die Herstellung der T-Zellen wurde in beiden Studien mit dendritischen Zellen (DC) als APC gearbeitet. Dem Einsatz dieser Zellen sind aber wegen des hohen experimentellen Aufwands, sie aus peripherem Blut zu isolieren und zu professionellen APC *in vitro* heranreifen zu lassen (siehe S.73), Grenzen gesetzt. Auch der Einsatz replikationsfähiger viraler Vektoren, die die gewünschten Zielantigene in die APC transferieren, ist für klinische Anwendungen problematisch. Hier zeigt sich der Bedarf nach alternativen, effizienten und sicheren Stimulationssystemen.

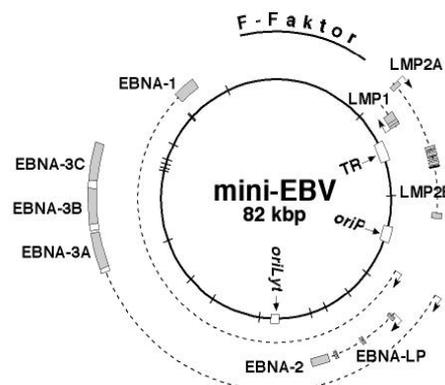
### **1.3.1 Mini-LCLs als professionelle antigenpräsentierende Zellen: Das mini-EBV als viraler Vektor**

Heute gelingt es, die besonderen Eigenschaften von Viren, nämlich genetische Information in menschliche Zellen einschleusen zu können, für Forschung und Therapie zu nutzen. Dabei werden im Labor virusfremde Sequenzen in das virale Genom eingebaut. Nach der Verpackung in infektiöse Partikel kann die neue genetische Information über den normalen viralen Infektionsweg in Zielzellen gelangen. Mittels solcher „viralen Vektoren“ können fehlerhafte Gene in Zellen ersetzt oder neue Gene eingebracht werden. Entweder werden diese Zellen dann direkt in den Körper zurückgegeben, oder die Zellen werden, wie in der vorliegenden Arbeit, *in vitro* zur Stimulation anderer Zellen, hier autologer T-Zellen, verwendet. In dieser Arbeit wird u.a. die Eignung von mini-EBV-Vektoren für die Immuntherapie untersucht. EBV infiziert und aktiviert B-Zellen *in vitro* sehr effizient. Die entstehenden LCLs eignen sich gut als antigenpräsentierende Zellen. Die Stimulation von PBMCs EBV-seropositiver Gesunder führt zu einer starken Reaktivierung EBV-spezifischer zytotoxischer T-Zellen (Rickinson et al., 1981). Daher war es erfolgversprechend, das EBV-Genom zu einem geeigneten Genvektor für die Immuntherapie umzubauen, durch den Fremdartigene direkt in B-Zellen eingebracht werden können.

Das erste EBV-Vektor-Plasmid wurde konsekutiv aus sieben Plasmidkonstrukten mit teilweise überlappenden Fragmenten des EBV-Genoms aufgebaut, deren Lage in der EBV-Genomkarte (Abb.1.3 A,B) dargestellt ist. Die Konstruktion erfolgte in *E.coli* mit der „*chromosomal building*“-Technik (O'Connor et al., 1989), die durch homologe Rekombination den Um- und Aufbau von Plasmiden ermöglicht, die für herkömmliche gentechnologische Methoden zu groß sind. Das mini-EBV-Vektor-Plasmid umfaßt sämtliche für die latenten Proteine codierenden Sequenzen des EBV-Genoms, sowie die regulatorischen Elemente, die für latente und lytische Replikation (*oriP*, *oriLyt*) sowie Verpackung in Viruspartikel (*TR*) nötig sind. Es befinden sich im Plasmid insgesamt 41% der Sequenz des Wildtyp-EBV-Stamms B95.8.



1.3A. Das Genom des EBV-Stamms B95.8



1.3B. Das mini-EBV-Plasmid 1478.A.

**Abbildung 1.3A.** Das Genom des EBV-Stamms B95.8. Die Nomenklatur in Einzelbuchstaben richtet sich nach den Fragmenten, die durch den Verdau der EBV-DNA mit *Bam*HI entstehen. Graue Kästen stellen die Leseraster, gestrichelte Linien die Primärtranskripte der latenten Gene dar. Außen um das EBV-Genom sind die mit Codenummern bezeichneten subgenomischen Fragmente gezeigt, aus denen das mini-EBV-Plasmid durch „*chromosomal building*“ konstruiert wurde. **1.3B.** Das mini-EBV-Plasmid 1478.A. Weiße Kästen markieren die übernommenen regulatorischen Elemente aus B95.8 (Kempkes et al., 1995b).

Mit der Entwicklung der Verpackungszelllinie TR2/293 wurde die Verpackung der mini-EBV-Vektoren in infektiöse Partikel ermöglicht (Delecluse et al., 1999). Die Viruspartikel infizieren und aktivieren humane B-Zellen genauso effizient wie Wildtyp-EBV und ermöglichen damit die einfache Herstellung von mini-EBV-infizierten B-Zelllinien (mini-LCLs) als APC (Delecluse et al., 1999). Da in den mini-EBV-Plasmiden die Gene für wichtige Strukturproteine fehlen, werden von den mini-LCLs keine Viruspartikel gebildet, was ein wichtiger Sicherheitsvorteil ist (Kempkes et al., 1995a; Kempkes et al., 1995b).

Durch die Klonierung in *E. coli* wurde die genetische Modifikation des mini-EBV-Plasmids möglich. Der Einbau von Fremdantigenen, die in den mini-LCLs zur Expression kommen, eröffnete die Möglichkeit, mini-LCLs als APC für die Stimulation von T-Zellen verschiedenster Spezifitäten zu verwenden. Moosmann et al. konnten zeigen, dass sich mini-EBV als potente APC für die Herstellung von T-Zellen eignen, die spezifisch gegen das CMV-Tegumentprotein pp65 und gegen EBV reagieren (Moosmann et al., 2002). Die Zellen zeigen eine hohe spezifische Lyse von pp65-exprimierenden Zielzellen. In den Kulturen dominiert die CMV-Reaktivität über die EBV-Reaktivität. Im vorliegenden Fall sollte untersucht werden, ob das mini-EBV-System ausreichend potent ist, um T-Zellen selektiv zu expandieren, die viel seltener als CMV-spezifische T-Zellen sind. Wegen des hohen therapeutischen Interesses wurden dafür die Proteine E6 und E7 von HPV16 ausgewählt. Über mini-EBV-Vektoren wurde die Sequenz der HPV-Antigene in B-Zellen eingebracht. Damit standen professionelle APC zur Verfügung, die für die Stimulation von HPV-spezifischen T-Zellen verwendet werden konnten.

### **1.3.2 CD40-Ligand-aktivierte B-Blasten als professionelle antigenpräsentierende Zellen**

Die kontinuierliche Aktivierung von CD40 auf B-Zellen ermöglicht eine Langzeitkultivierung aktivierter B-Zellen. Der CD40-Rezeptor auf der Oberfläche von B-Zellen wurde 1989 in der Burkitt-Lymphomzelllinie Raji gefunden. Es ist bekannt, dass über diesen Rezeptor Protein-Phosphorylierungen vermittelt werden, die Effekte

wie interzelluläre Adhäsion, Proliferation, Zelldifferenzierung zur Folge haben (Armitage et al., 1992; Sabel et al., 2000). Die Suche nach dem zellulären Liganden des CD40-Rezeptors führte zu einem 261 Aminosäure großen Typ II-Membranprotein, das hauptsächlich auf T-Zellen gefunden wird (Spriggs et al., 1992). T-Zellen exprimieren diesen Liganden (CD40L) 5-10 min nach Aktivierung, 8-12 Stunden später nimmt die Expression ab, bis sie 48 Stunden später zum Erliegen kommt (Graf et al., 1995). Eine effiziente Stimulierung von CD40 kann entweder durch Anti-CD40-Antikörper oder durch Verwendung des physiologischen Liganden CD40L (CD154) erreicht werden. Die besten Ergebnisse wurden erzielt, wenn die stimulierenden Moleküle auf der Oberfläche einer sog. *Feeder-Zelle* bereitgestellt wurden (Banchereau und Rousset, 1991; Garrone et al., 1995). Es entstehen dann sog. B-Blasten, die auf ihrer Oberfläche immunstimulatorische Moleküle wie CD69, CD86, CD23 u.a. exprimieren und damit dem Phänotyp aktivierter B-Zellen entsprechen. Allerdings konnte auf diese Weise bisher keine über mehrere Monate hinweg proliferierende EBV-freie B-Zelllinie hergestellt werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Technik soweit vorgebracht, dass für die vorliegende Arbeit EBV-freie B-Blasten verwendet werden konnten, die als etablierte Zelllinie über Monate in Kultur zu halten sind. Diese B-Blasten können als APC verwendet werden, indem sie mit Peptid beladen und mit T-Zellen kokultiviert werden.

## 1.4 Immunreaktionen gegen EBV und HPV

Die spezifische Immunität gegen EBV ist im Vergleich zu der gegen HPV sehr gut untersucht. Die Stimulation von peripheren mononukleären Zellen (PBMCs) mit autologen LCLs führt zu einer starken Reaktivierung zytotoxisch aktiver HLA-restringierter EBV-spezifischer T-Zellen (Rickinson et al., 1996; Rickinson et al., 1981). Die T-Zellkulturen werden von CD8-positiven Zellen dominiert und weisen überwiegend Spezifitäten gegen die latenten Proteine EBNA3A, 3B und 3C auf. Inzwischen wurden über 50 MHC Klasse I-restringierte Epitope der latenten EBV-Proteine identifiziert (Khanna und Burrows, 2000). Da die meisten lytischen Gene von EBV in den latent infizierten LCLs nicht exprimiert werden, wurde die Rolle der Immunität gegen lytische Antigene lange unterschätzt. Inzwischen ist bekannt, dass

bei der primären Infektion *in vivo* gerade gegen lytische Antigene ein starkes T-Zellgedächtnis ausgebildet wird, das auch bei später latent EBV-Infizierten erhalten bleibt (Callan et al., 1998; Tan et al., 1999).

Über die Immunität gegen die Mitglieder der HPV-Familie ist weniger bekannt. Man weiß, dass als Reaktion auf eine HPV-Infektion sowohl eine zelluläre als auch eine humorale Immunantwort induziert wird. Zytotoxische T-Zellen, T-Helferzellen und Antikörper gegen verschiedene HPV-Proteine können bei Gesunden und bei Patienten mit HPV-assoziierten Dysplasien oder Karzinomen gefunden werden (Todd et al., 2004; van der Burg et al., 2001). Allerdings sind die T-Zellhäufigkeiten und Antikörpertiter sehr niedrig, oft auch unter der Nachweisgrenze. Dass HPV-spezifische Immunreaktionen dennoch eine wichtige Rolle spielen, zeigt sich an dem vermehrten Auftreten von HPV-assoziierten Neoplasien bei Immunsupprimierten, z.B. AIDS-Patienten und Organtransplantat-Empfängern (Frisch et al., 2000; Petry et al., 1994). Methoden, die eine starke Aktivierung und Expansion solcher T-Zellen erlauben, könnten eine erfolgreiche adoptive Therapie von HPV-positiven Tumoren ermöglichen.

## 1.5 Aufgabenstellung und Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte das Potential zweier neuartiger APC-Systeme für die Stimulation HPV16-spezifischer T-Zellen untersucht werden. Beide Systeme beruhen auf der Verwendung von aktivierten B-Zellen. In einem Fall handelte es sich um CD40-aktivierte B-Lymphoblasten (B-Blasten). Für die T-Zellstimulation wurden die B-Blasten exogen mit Peptiden beladen, die HPV16-Epitope repräsentieren. Im anderen Fall wurde mit sog. mini-LCLs gearbeitet, die durch Infektion von B-Zellen mit einem Vektor auf der Basis von EBV hergestellt wurden und die gewünschten HPV-Antigene also nach endogener Prozessierung präsentierten. Die aus den beiden Stimulationsprotokollen hervorgehenden T-Zellen wurden phänotypisch und funktionell charakterisiert.

## 2 Material

### 2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
E. coli DH5	F <sup>-</sup> , F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> , m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), supE44, l <sup>-</sup> , thi-1, gyrA96, relA1
E. coli DH10B	F <sup>-</sup> , mcrA, D (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80dlacZ M15, DlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, D (ara, leu)7697, galU, galK, l <sup>-</sup> , rpsL, nupG
E. coli CBTS	leu(am), trp(am), lacZ2210(am), galK(am), galE?, sueC, rpsL, supD43,74, sueB, metB1, RecA99(am)

E. coli CBTS wurde freundlicherweise von M. O'Connor zur Verfügung gestellt.

### 2.1.2 Zelllinien

TR <sup>-</sup> 2/293	Adenovirus Typ 5-immortalisierte humane Nierenzelllinie 293 mit rekombinantem „terminal repeat“-deletiertem EBV-Genom auf der Basis eines bakteriellen F-Faktor-Plasmids (Delecluse et al., 1999)
B95.8	durch EBV-Infektion von Krallenaffen-PBMCs entstandene lymphoblastoide Zelllinie
BSC-40	epitheliale Nierenzelllinie der Meerkatze
K562	humane chronische myelogene Leukämie (CML) -Zelllinie aus dem Knochenmark
MRC-5	humane embryonale Lungenfibroblasten
CaSki	humane Zervixkarzinom-Zelllinie mit integriertem HPV16-Genom (Pattillo et al., 1977)
CaSki-A2ko	humane Zervixkarzinom-Zelllinie CaSki, durch homologe Rekombination mit fehlender HLA-A0201-Expression (Evans et al., 1996)
CD40L	murine L-Zellen (Bindegewebsfibroblasten) mit CD40-Ligand transfiziert (Garrone et al., 1995)

Die Zelllinien wurden über die ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, Virginia, USA) oder die ECACC (*European Collection of Animal Cell Cultures*, Salisbury, Großbritannien) bezogen. TR-2/293 (Delecluse et al., 1999) wurden freundlicherweise von H.-J. Delecluse, Birmingham zur Verfügung gestellt. CaSki und CaSki-A2ko wurden freundlicherweise von S. Bauer, München zur Verfügung gestellt. Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit hergestellte mini-LCLs und LCLs aus primären B-Lymphozyten verschiedener Spender verwendet.

### 2.1.3 Viren

EBV B95.8	EBV-Laborstamm
vvWyeth	Wildtyp-Vacciniavirus (Stamm Wyeth)
vvSR16	rekombinantes Vacciniavirus (Stamm Wyeth) mit modifizierter HPV16-E6 und -E7 Expressionskassette

Vacciniaviren wurden freundlicherweise von Xenova, Cambridge zur Verfügung gestellt.

### 2.1.4 Plasmide

pSG-5	eukaryontisches Expressionsplasmid mit SV40-Promotor (Stratagene)
p509	BZLF1-Expressionsplasmid (Hammerschmidt und Sugden, 1988)
p1242.1	<i>tet-shuttle</i> -Plasmid zur Modifikation von EBV-Vektoren
p1478A (pV)	Mini-EBV (Kilger et al., 1999)
p1736 (pM)	Mini-EBV mit MUC-1-Expressionskassette (Kilger et al., 1999)
pDCM111	Resolvase-Expressionsplasmid
pT <sub>2</sub>	<i>tet-shuttle</i> -Plasmid (1242.1 mit SV40-Promotor-Kassette)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden konstruiert und verwendet:

pP6 (E6-mini-EBV) mini-EBV mit HPV16-E6-Expressionskassette

pP7 (E7-mini-EBV) mini-EBV mit HPV16-E7-Expressionskassette

Beide mini-EBV-Plasmide wurden konstruiert durch

1. Amplifikation der codierenden DNA-Sequenzen der Gene E6 und E7 von HPV16 durch PCR-Amplifikation aus der Tumorbiopsie des Tonsillenkarzinompatienten „Tu156“, und Einbau der Amplifikate in einen PCR-Klonierungsvektor (pCR2.1-TOPO, Invitrogen)
2. Einbau der codierenden genomischen Sequenz in einen Transfer-Vektor (*tet-shuttle*-Plasmid) mit SV40-Promotor-Expressionskassette (pT2),
3. Vereinigung der Gesamtsequenz des Transfervektors mit der des mini-EBV 1478.A durch homologe Rekombination (das Produkt wird als Kointegrat bezeichnet)
4. Entfernung der nicht benötigten Teilsequenzen des Transfervektors aus dem Kointegrat durch ortsspezifische Rekombination, dabei entsteht das fertige mini-EBV.

### 2.1.5 Antikörper

CD3-PerCP	Caltag Laboratories, San Francisco
CD3-Cy5.5	Caltag Laboratories, San Francisco
CD4-PE	Caltag Laboratories, San Francisco
CD19-FITC	Caltag Laboratories, San Francisco
CD8-FITC	Pharmingen
CD56-APC	Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg
CD11a/CD18	Immunotech, Marseille
CD54	Immunotech, Marseille
CD58	Immunotech, Marseille
CD80	Immunotech, Marseille
CD86	Immunotech, Marseille
HLA-Klasse-I	Acris Antibodies, Hiddenhausen
HLA-B7-PE	Chemicon Europe
HPV16-E6	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HPV16-E7	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg

## 2.1.6 Peptide und HLA-Peptid-Tetramere

Peptide wurden von Eurogentech in 70% Reinheit mit unmodifizierten Termini (NH<sub>2</sub>, COOH) bezogen. Der tetramere HLA-Peptid-Komplex HLA-A\*0201/YMLDLOPETT (HPV16-E7) wurde von ProImmune Limited bezogen.

## 2.2 Sonstige Reagenzien und Materialien

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Amersham, Merck oder Sigma in Analysenqualität bezogen.

Amersham Pharmacia, Freiburg

Ficoll-Paque<sup>TM</sup> PLUS Separating Solution), T4-DNA-Ligase

Becton-Dickinson GmbH, Heidelberg

FACS Flow , FACS Rinse , FACS-Röhrchen

Biochrom AG, Berlin

Fötale Kälberserum (Seromed<sup>®</sup>)

Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien

humanes Serum

Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein

Zellkulturmedium RPMI 1640, Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)

IMGM Laboratories, Martinsried

HLA-Typisierung aus Zellkulturen oder EDTA-Blut

Landesklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Salzburg,

Leukozytenkonzentrate aus 500 ml Blut anonymer Spender (*Buffy Coats*)

Mabtech AB, Nacka, Schweden

IFN- ELISA Kit, IFN- ELISpot Kit

Millipore GmbH, Eschborn

MAHAN4510 MultiScreen Filtrationsplatten für ELISpot unsteril

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

T-Helferzellen CD4-MicroBeads, Zytotoxische T-Zellen CD8-MicroBeads, Anti-PE-Beads, IFN- -Secretion assay, MACS columns MidiMACS

Packard Bioscience GmbH, Dreieich

96 Loch-Luma-Platten

Perkin-Elmer Life Sciences, Köln

Europium solution (DELFI A ), BATDA reagent, Chromium-51 Radionukleid

R&D Systems, Wiesbaden

rekombinantes humanes IL-4, rekombinantes humanes IL-12

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

TriPure Isolationsreagenz, Transfektionsreagenz Fugene, humanes Interleukin 2

Sequiserie, Vaterstetten

DNA-Sequenzierungen

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Darmstadt

Oligosynthesen

## 2.3 Geräte

Durchflußzytometer	„FACSCalibur“ Becton-Dickinson
ELISA-Reader „EL800“	Bio-TEK instruments, INC.
Fluorimeter Multilabel Counter	Wallac
Inkubator für Zellkultur	Heraeus
Mikroliterpipetten	Gilson
Mikroskop, Phasenkontrast-/UV-	Zeiss
PCR-Maschinen	Biometra, Stratagene Europe
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus
Stickstoff-Tiefkühlagereinrichtung	Messer
Szintillationszähler „TopCount“	Packard
Ultrazentrifugen	Beckman, Kontron
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall, Kontron

## 3 Methoden

### 3.1 Arbeiten mit DNA

Grundlegende DNA-Arbeitstechniken wurden gemäß Standardprotokollen angewandt. Dazu gehörten Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, die Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, die Analyse oder Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolysen, die Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, die Auffüllung 3'-rezessiver DNA-Enden mit Klenow-Polymerase, die Ligation freier DNA-Enden, die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse, und Affinitätsmatrix-Reinigung (Plasmidpräparations-Kits von Qiagen und Genomed) oder durch Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation.

#### Polymerase-Kettenreaktion

Taq-DNA-Polymerase und der dazugehörige Puffer wurden von der Firma MBI Fermentas bezogen. Das Temperaturprofil der PCR richtete sich nach den Schmelztemperaturen der Oligonukleotide und der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. In der Regel wurden 40 Zyklen durchlaufen. Die Oligonukleotide wurden von ARK Scientific bezogen.

Folgende Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgelistet:

- Klonierungsprimer: Mittels PCR wurden die Sequenzen der Gene E6 und E7 von HPV16 amplifiziert, um sie in die mini-EBV-Vektoren zu klonieren (E6-L1, E6-R1, E7-L1, E7-R1).
- 
- HPV16-Primer: Tumorbiopsien wurden auf das Vorhandensein von HPV16-spezifischen Sequenzen hin untersucht (HPV16-Primer).
- 
- Cam-up, cam-down, gp85c, gp85d: Für alle mini-LCLs wurde die Anwesenheit von mini-EBV-spezifischen Sequenzen (des Gens für die Chloramphenicol-Acetyltransferase, „cam“-Primer) und die Abwesenheit von Wildtyp-EBV-spezifischen Sequenzen (des viralen Glykoproteins gp85) kontrolliert. Mit den gleichen Primern wurden alle B-Blasten auf EBV-Freiheit getestet.

Primer	T <sub>m</sub> [°C]	Sequenz	Länge [bp]
E7-L1	72,9	5'- AGA TCT ATG CAT GGA GAT ACA CCT ACA TTG CAT G -3'	34
E7-R1	76,4	5'- GGA TCC TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT GGG GC -3'	32
E6-L1	73,0	5'- AGA TCT ATG CAC CAA AAG AGA ACT GCA ATG TTT C -3'	34
E6-R1	75,8	5'- GGA TCC TTA CAG CTG GGT TTC TCT ACG TGT TCT TG -3'	35
HPV16-L1	68,5	5'- AGC TGT AAT CAT GCA TGG AGA TAC ACC -3'	27
HPV16-R1	70,7	5'- AAC CAT CCA TTA CAT CCC GTA CCC TC -3'	26
HPV16-L2	67,6	5'- ACT TCT AAG GCC AAC TAA ATG TCA CCC -3'	27
HPV16-R2	68,7	5'- CAC ATA CAG CAT ATG GAT TCC CAT CTC -3'	27
cam-up	62,1	5'- TTC TGC CGA CAT GGA AGC CAT C -3'	22
cam-down	63,3	5'- GGA GTG AAT ACC ACG ACG ATT TCC-3'	24
gp85c	61,9	5'- TGG TCA GCA GCA GAT AGT GAA CG -3'	23
gp85d	60,9	5'- TGT GGA TGG GTT TCT TGG GC -3'	20

Tabelle 1: In PCR-Reaktionen verwendete Oligonukleotide

Die Oligonukleotide für die Amplifikation der T-Zellrezeptorsequenzen der einzelnen T-Zellklone sind im Ergebnisteil auf Seite 57, Tabelle 4.2.2 aufgelistet. Insgesamt sind es 22 Vorwärts-Primer, die alle bekannten V -Segmente abdecken, und 16 Rückwärts-Primer, die alle bekannten J -Segmente abdecken. Um den Pipettier-Aufwand möglichst gering zu halten, wurden Gruppen zu je 3 (Mischungen A aus A1-A3 und B aus B1-B3) oder 4 (Mischungen C1-C4 bis F1-F4 und I aus Ia-Ic bis Iva-IVd) unterschiedlichen Oligonukleotiden gebildet, wobei sich die Kennzeichnung mit Buchstaben auf die Vorwärts- und die mit römischen Zahlen auf die Rückwärts-Primer bezieht. Für jeden Klon wurden letztendlich 24 Reaktionsansätze pipettiert (AI-AIV, BI-BIV, CI-CIV, ....., FI-FIV).

## 3.2 Arbeiten mit Bakterien

### 3.2.1 Vermehrung und Aufbewahrung von Bakterien

Es wurde mit dem Laborstamm DH5<sup>α</sup> des Bakteriums *E. coli* für Plasmide üblicher Größe (bis 15 kb), für größere Plasmide alternativ mit dem *E. coli*-Stamm DH10B gearbeitet. Der temperatursensitive recA-positive *E. coli*-Stamm CBTS (O'Connor et al., 1989) fand bei der Neukonstruktion von Plasmiden durch homologe Rekombination Verwendung.

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% NaCl) oder zur Vereinzelnung von Kolonien auf LB-Agarplatten (15 g Bacto-Agar ad 1l LB-Medium) kultiviert. Bei Selektion auf Resistenzen gegen Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (15 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) oder Tetracyclin (30 µg/ml) zugesetzt. Zum Anlegen von Stammkulturen wurden bis zur Sättigung gewachsene Flüssigkulturen mit 7% DMSO oder 20% Glycerin versetzt und bei -80°C tiefgefroren.

### 3.2.2 Transformation von Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation (Chuang et al., 1995) oder durch Hitzeschockbehandlung (Inoue et al., 1990) in Bakterien eingebracht. Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden Bakterien bei Raumtemperatur in Flüssigkultur in SOB-Medium vermehrt und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (OD 0,5). Ein Liter Bakterienkultur wurde auf Eis gekühlt, die Bakterien abzentrifugiert und mehrmals mit kaltem destilliertem Wasser, dann mit kaltem 10%igem Glycerol gewaschen, in 2 ml 10%igem Glycerol resuspendiert, in 100-µl-Anteile aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert. Für die Elektroporation wurden die elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, bis zu einem Mikroliter Plasmid (bis zu 500 ng DNA) oder Ligationsprodukt zugegeben und in gekühlten Küvetten mit 1 mm Spaltbreite unter Benutzung eines Elektroporationsgerätes (GenePulser, Bio-Rad) elektroporiert. Ein Kondensator der eingestellten Kapazität 25 µF wurde durch Anlegen einer Spannung von 1,25 kV aufgeladen und über die Probe, mit einem in Reihe geschalteten Widerstand von 200 Ohm, entladen. Eine Entladungszeit von über 4, vorzugsweise 5 Millisekunden bestätigte den genügend hohen Widerstand der Probe. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml SOB-Medium überführt, bei der geeigneten permissiven Temperatur geschüttelt (eine Stunde bei 37°C bzw. zwei Stunden bei 30°C) und auf Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert.

## 3.3 Arbeiten mit Viren

### 3.3.1 EBV: Herstellung von infektiösen mini-EBV-Überständen

Die mini-EBV-Vektoren lassen sich mit Hilfe der EBV-Verpackungszelllinie 293/TR<sup>-</sup> (Delecluse et al., 1999) in infektiöse Viruspartikel verpacken. Zur fortlaufenden Kultivierung wurden 293/TR<sup>-</sup>-Zellen mit hygromycinhaltigem (100 µg/ml) Standardmedium kultiviert. Der zur Transfektion bestimmte Anteil der Zellen wurde jeweils von der Wachstumsfläche gespült, zweimal mit PBS gewaschen und in Standardmedium ohne Hygromycin ausplattiert. Die Transfektion erfolgte nach drei bis fünf Tagen mit 30-50% konfluenten Zellen. Die Zellen einer 15-cm-Schale wurden in serumhaltigem Standardmedium mit 24 µg mini-EBV-Plasmid, 12 µg Plasmid p509 (BZLF1), 12 µg Plasmid pRA (BALF4) und 60 µl des Transfektionsreagens Fugene (Roche) nach dem Protokoll des Herstellers transfiziert. Nach 24 und 72 Stunden wurde jeweils das überstehende Medium vorsichtig abgenommen und durch frisches ersetzt (12 ml pro 15-cm-Schale). 96 Stunden nach Transfektion wurde das virionhaltige überstehende Medium geerntet, zur Abtrennung von Zellbestandteilen zentrifugiert (400 g, 10 min), filtriert (0.8 µm) und in Aliquots bei -80°C gelagert. Der abgenommene Überstand wurde durch frisches Medium ersetzt und der Vorgang an Tag 5 und Tag 6 wiederholt.

### 3.3.2 EBV: Herstellung von mini-LCLs

Für die Generierung von (mini-) LCLs wurden frische oder eingefrorene PBMC mit B95.8-Virus oder mini-EBV infiziert. Zu einer Suspension von 0,5 Mio PBMCs wurden 100 µl des mini-EBV-Überstandes oder 10 µl des B95.8-Virusüberstandes gegeben. Als Negativkontrolle auf endogene EBV-Infektion diente stattdessen 100 µl RPMI-Medium, das auf die gleich Anzahl PBMCs gegeben wurde. Alle Ansätze wurden in Multiplikaten von 4-12 angesetzt. Einen Tag nach Viruszugabe und jede weitere Woche wurden 100 µl Medium durch die gleiche Menge frischen Mediums mit 1 µg/ml Cyclosporin A zur T-Zell-Inhibition ersetzt.

### 3.3.3 Rekombinante Vacciniaviren

Durch Infektion mit rekombinanten Vacciniaviren erreicht man die schnelle und starke Expression des rekombinanten Proteins in einer Vielzahl von Zellarten. Für diese Arbeit wurde von J. Hickling, Xenova, Cambridge, England freundlicherweise das HPV16-E6- und E7-exprimierende Vacciniavirus SR16 auf der Basis des Stamms Wyeth zur Verfügung gestellt. Es wurde analog konstruiert wie das von Bournnell et al. beschriebende Vacciniaviruskonstrukt TA-HPV. Als Kontrolle diente das unmodifizierte Vacciniavirus Wyeth (Bournnell et al., 1996).

## 3.4 Arbeiten mit Zellen

### 3.4.1 Grundlegende Arbeiten mit Zellen

#### 3.4.1.1 Kultivierung

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter 5% Kohlendioxid und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Standardmedium für Suspensionszellen und adhärenente Zellen war RPMI 1640, supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika (100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin). Glutamin war als N-Acetylalanylglutamin enthalten („stabiles Glutamin“). Medien und Zusätze wurden von Biochrom bezogen.

#### 3.4.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung (in PBS) gemischt. Der Farbstoff dringt nur in tote Zellen ein, weshalb sich im Mikroskop anhand der Blaufärbung tote von vitalen Zellen unterscheiden lassen. Die Zählkammer hat 2 Zählgitter aus 4 großen Quadraten mit je 16 Kleinquadraten und je einer Seitenlänge von 1 mm. Mit der Tiefe von 0,1 mm ergibt sich ein Volumen von  $0,1 \text{ mm}^3$  (=0,1 µl) für ein Großquadrat. Die Zahl der in einem Großquadrat gezählten Zellen muss daher mit 10.000 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert werden, daraus ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter.

### 3.4.1.3 Gefrierlagerung von Zellen

Zellen können eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert (1200 rpm, 5 min, 4°C), in 0,8 ml RPMI-Medium mit 50% FCS und 10% DMSO resuspendiert und in 2 ml-Gefäße (Nunc-Cryotype ) pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in ein allseitig verschlossenes Styroporbehältnis gegeben und bei –80°C tiefgefroren. Einige Tage später wurden die Zellen zur Dauerlagerung in die Gasphase über flüssigem Stickstoff transferiert. Zum Auftauen wurden die Zellen in warmem Kulturmedium (37°C) möglichst schnell erwärmt und sofort zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Kulturgefäß überführt.

Da LCLs und mini-LCLs besonders auf autokrine Stimuli angewiesen sind, wurde beim Auftauen dieser Zellen darauf geachtet, das anfängliche Kulturvolumen nach dem Auftauen klein zu halten, etwa entsprechend der Zelldichte einer halb gesättigten Kultur ( $1 - 2 \cdot 10^5$  Zellen pro ml).

### 3.4.2 Isolation von primären humanen Lymphozyten aus Vollblut

Für die Auftrennung von frischem Blut oder Leukozytenkonzentraten (*Buffy Coats*) in die zellulären Bestandteile wurde beides 1:2 mit PBS verdünnt und mit Ficoll-Trennlösung der Dichte 1,07 („Biocoll“, Biochrom) unterschichtet. Durch Zentrifugation (1000 g, 20 min) wird die Anreicherung von Monozyten, B- und T-Lymphozyten in der Interphase zwischen schwerer und leichter Flüssigkeitsphase erreicht. Kurz über dem Erythrozytenpellet am Boden befindet sich dann die dünne Schicht von Leukozyten. In der Schicht über der Interphase befindet sich verdünntes Plasma. Es wurden nur die Zellen der Interphase, sog. PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) geerntet und vor der weiteren Verwendung mehrfach bei 700 g gewaschen, um Ficoll-Reste und restliche Thrombozyten zu entfernen.

### 3.4.3 Phänotypisierung von Zellen mittels FACS-Analyse

Nach Färbung von Zellen mit Antikörpern oder HLA-Peptid-Tetrameren, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man in der FACS-Analyse auf der Basis einzelner Zellen bestimmen, welche Zellpopulationen vertreten sind, wieviele

Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren, und welches relative Expressionsniveau auf der Oberfläche erreicht wird. Dazu wurden  $1 \times 10^5$  -  $1,5 \times 10^6$  Zellen in kaltem PBS mit 2% FCS gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation der Zellen entweder zusammen mit spezifischen Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern 20 min auf Eis, oder mit HLA-Peptid-Tetrameren 20 min bei 37°C. Bei Tetramerfärbungen schloß sich nach einem Zwischenwaschgang die Färbung mit z.B. FITC-konjugierten CD8-Antikörpern 20 min auf Eis ein. Nach zweimaligem Waschen in PBS mit 2% FCS wurde die Oberflächenexpression in einem „FACSCalibur“-Durchflußzytometer (Becton Dickinson) gemessen, in dem bis zu vier Fluoreszenzfarben gleichzeitig abgefragt werden können. In dem Gerät wird jede Zelle von einem Laserstrahl getroffen und kann anhand der spezifischen Streuung und Fluoreszenz einem bestimmten Zelltyp zugeordnet werden.

#### 3.4.4 Immunzytochemische Analyse von Zellen

Die Expression der Proteine E6 und E7 in mini-LCLs wurde durch immunzytochemische Färbungen nachgewiesen. Die mini-LCL-Zellen wurden mittels Cytospin auf Objektgläser gebracht (0,5 Mio Zellen, 600-800 rpm, 5 min) und mit Azeton fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidaseaktivität durch 0,3% Wasserstoffperoxid für 10 min blockiert. Die Zellen wurden für 20 min mit 10%-igem normalem Pferdeserum überschichtet. Nach Abklopfen des Überschusses folgte die Inkubation mit monoklonalem Antikörper Maus-anti-HPV16-E6 bzw. -E7 in einer Verdünnung von 1:50 für eine Stunde bei Raumtemperatur. Als Negativkontrolle wurde PBS an Stelle des ersten Antikörpers verwendet. Nach weiteren PBS-Bädern wurde mit biotinyliertem Pferd-anti-Maus-IgG in der Verdünnung 1:300 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren PBS-Bädern folgte die Inkubation mit einem Avidin-Biotin-PO-Komplex in einer Verdünnung von 1:200 für 30 min bei Raumtemperatur. Das verwendete Chromogen war eine 0,01%-ige 3-Amino-9-ethyl-Karbazol-Lösung in 0,1M Natriumazetatpuffer pH5,5, die 0,0015% Wasserstoffperoxid und 6% Dimethylsulfoxid enthielt. Das Färbeprodukt zeigt sich als roter Niederschlag.

### 3.4.5 Herstellung von T-Zelllinien

#### 3.4.5.1 T-Zellstimulation mit mini-LCLs

Für die Herstellung polyklonaler T-Zelllinien mittels mini-LCL-Stimulation wurden frische oder aufgetaute PBMC von Gesunden oder Tumorpatienten mit bestrahlten antigenexprimierenden mini-LCLs in IL-2-haltigem Medium kokultiviert. Pro Einzelgefäß einer 24-Loch-Platte wurden zwei Millionen PBMC und 50 000 mit 50 Gy bestrahlte mini-LCLs in 2 ml Standardmedium mit 6 U/ml nativem IL-2 kultiviert. Das entspricht einem Effektor/Stimulator-Verhältnis von 40:1. An Tag 10 und dann einmal pro Woche wurden die Zellen geerntet und mit bestrahlten mini-LCLs im Verhältnis 4:1 in frischem IL-2-haltigem Medium weiterkultiviert. Diese Stimulationsmethode ist von einem Protokoll für klinischen adoptiven EBV-T-Zell-Transfer (Roskrow et al., 1998) abgeleitet.

#### 3.4.5.2 T-Zellstimulation mit Peptid-beladenen B-Blasten

Für die Herstellung peptidspezifischer T-Zelllinien wurden PBMCs aus Leukozytenpräparaten (*Buffy Coats*) verwendet. Diese enthalten Leukozyten aus 500 ml peripherem Blut anonymen Spender. Es wurden parallel zwei Ansätze pipettiert: Für die Kultur der B-Blasten wurden an Tag 0 multiple Ansätze von je 1 Mio, 0,5 Mio und 0,1 Mio PBMCs pro Gefäß einer 24-Lochplatte auf bestrahlte adhärenz CD40L-exprimierende Stimulatorzellen in RPMI-Medium mit 2 ng/ml IL-4 und 1 µg/ml Cyclosporin A pipettiert. Die Kulturen wurden wöchentlich auf frische bestrahlte Stimulatorzellen in frischem Medium überführt. Nach drei Wochen wurde ein Teil der B-Blasten für 1 Stunde mit 2 µg/ml YML-Peptid bei 37°C beladen, dreimal gewaschen, gezählt und im Verhältnis von T-Zellen:B-Zellen = 4:1 zur T-Zellkultur gegeben.

Für die T-Zellkultur wurden 8 Mio PBMC pro Gefäß in 2 ml RPMI-Medium mit 0,1 ng/ml IL-12, 2,5 ng/ml IL-7 und 1 µg/ml Peptid pipettiert. Als Peptid wurde ein HLA-Klasse I-Epitop von HPV16-E7 (Aminosäuren 11-20) mit der Aminosäuresequenz YMLDLQPETT verwendet. In den ersten drei Wochen wurde einmal pro Woche die Hälfte Medium durch frisches Medium mit genannten Zusätzen ersetzt. Ab der vierten Woche begann die Stimulation mit peptidbeladenen B-Blasten.

### 3.4.5.3 Magnetische Separation von tetramerpositiven T-Zellpopulationen

Zur magnetischen Separation von Zellen wurde das Verfahren von Miltenyi Biotech verwendet. Es beruht auf der Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern, an die superparamagnetische ca. 50 nm große Partikel gekoppelt sind. Mit diesen Antikörpern lassen sich verschiedene Zielzellpopulationen markieren. In einer mit paramagnetischer Matrix ausgekleideten Säule, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet, werden die Zellen durch die Antikörper in der Säule magnetisch festgehalten. Nicht markierte Zellen durchlaufen die Säule. Nach Entfernen des magnetischen Felds kann man die markierten Zellen einfach von der Säule spülen. Das Ergebnis wurde anschließend über eine FACS-Messung analysiert. Als Puffer wurde PBS mit 2% FCS verwendet, das restliche Protokoll entspricht dem des Herstellers.

### 3.4.5.4 Einzelzellklonierung von T-Zellen

Um vereinzelte T-Zellen zur Proliferation anzuregen, wurden bestrahlte allogene PBMCs von vier verschiedenen anonymen Spendern (je  $2,5 \times 10^5$  / ml), und ebenfalls bestrahlte autologe E7-mLCLs ( $10^5$  / ml) in IL-2-haltigem Medium (1000 U/ml) in zweiwöchigem Abstand frisch zu den Kulturen dazugegeben. Nach 3-5 Wochen wurde mikroskopisch festgestellt, in welchen der Kulturen Proliferation von Zellen stattgefunden hatte. Die proliferierenden Klone wurden zu Zellzahlen ( $>10^6$  bis  $10^7$ ) expandiert, die detaillierte Analysen mit IFN- $\gamma$ -ELISPOT, IFN- $\gamma$ - und GM-CSF-ELISA sowie Zytotoxizitäts-Analysen und die Kryokonservierung ermöglichten.

## 3.4.6 Funktionelle Analyse von T-Zellen

### 3.4.6.1 Nachweis der IFN- $\gamma$ -Produktion nach spezifischer Stimulierung der T-Zellen

#### 3.4.6.1.1 IFN- $\gamma$ -ELISA

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung von IFN- $\gamma$ -Konzentrationen in Zellkulturüberständen ein „*enzyme-linked immunosorbent assay*“ (ELISA) verwendet. PBMCs oder T-Zellen wurden mit Stimulatorzellen oder Peptiden 24 bis 36 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Überstände wurden auf eine 96-Loch-Platte (Maxisorp von Nunc) gegeben, die zuvor mit einem monoklonalen Antikörper gegen

humanes IFN- $\gamma$  über Nacht bei 4°C beschichtet, gewaschen (0,05% Tween20 in PBS) und mit Standardmedium für eine Stunde blockiert worden war. Zusammen mit einer Standardverdünnungsreihe von humanem IFN- $\gamma$  als Konzentrationsstandard wurde die Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach weiteren drei Waschgängen wurde ein biotinylierter monoklonaler Antikörper gegen ein zweites Epitop des humanen IFN- $\gamma$  zugegeben und eine Stunde inkubiert. Nach weiterem Waschen folgte die Zugabe von alkalischer Phosphatase-konjugiertem Streptavidin. Nach einer Stunde wurde ungebundenes Enzym gewaschen und Nitrophenylphosphat-Substratlösung (*Alkaline Phosphatase Substrate Kit* von BIO-RAD) zugegeben. Sobald sich eine deutliche gelbe Farbe entwickelt hatte, wurde die Absorption bei 405 nm im ELISA-Lesegerät in zeitlichen Abständen mehrmals gemessen.

#### 3.4.6.1.2 IFN- $\gamma$ -ELISpot Assay

ELISpot steht für (engl.:) „*enzyme-linked immunospot*“. Diese Methode dient dazu, einzelne IFN- $\gamma$ -sezernierende Zellen nachzuweisen, wodurch sich eine quantitative Aussage über die Häufigkeit solcher Zellen in einer Zellpopulation machen läßt. Die zugrunde liegende Technik geht auf die ELISA-Technik (siehe 3.4.6.1.1) zurück: Eine 96-Loch-Mikroplatte mit Zelluloseester-Boden (ermöglicht die unspezifische Bindung von Proteinen) wurde mit monoklonalen Antikörpern gegen humanes IFN- $\gamma$  drei Stunden bei Raumtemperatur oder bei 4°C über Nacht beladen. Nach einigen Waschgängen mit 0,05% Tween 20 in PBS, und der Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mit Standardmedium für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen (PBMCs oder T-Zellen mit Stimulatorzellen oder Peptiden) auf die Platte gegeben und 23 bis 36 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und dabei nicht bewegt. In dieser Zeit banden die immobilisierten Antikörper in der unmittelbaren Nachbarschaft von aktivierten T-Zellen sezerniertes IFN- $\gamma$ . Nach weiteren Waschgängen, wodurch ungebundene Substanzen und Zellen entfernt wurden, wurde ein biotinylierter Antikörper gegen humanes IFN- $\gamma$  zugegeben, und wieder eine Stunde inkubiert. Nach weiterem Waschen wurde Alkalische-Phosphatase-konjugiertes Streptavidin zugegeben. Nach einer Stunde wurde ungebundenes Konjugat abgewaschen und Substratlösung (BCIP/NBT) zugegeben. Es bildeten sich blau-schwarze Aggregate, die als Punkte (*spots*) die Stellen der Zytokinsekretion

markierten. Jeder Punkt repräsentiert eine individuelle IFN- $\gamma$ -sezernierende Zelle. Mithilfe eines Stereomikroskops wurden die Punkte ausgezählt.

#### 3.4.6.1.3 IFN- $\gamma$ -Sekretions-Analyse

Zur quantitativen Bestimmung IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen wurde der IFN- $\gamma$ -Sekretionsassay (*capture assay*) verwendet. Dabei werden die T-Zellen zunächst mit einem bispezifischen Antikörper beladen, der über einen CD45-spezifischen Arm an die Zelloberfläche bindet und über einen Interferon- $\gamma$ -spezifischen Arm IFN- $\gamma$  einfängt. Werden die T-Zellen bei ausreichend hoher Verdünnung mit den Stimulatorzellen koinkubiert, stammt das vom bispezifischen Antikörper eingefangene IFN- $\gamma$  von der Zelle, auf deren Oberfläche der Antikörper gebunden ist. Mit einem weiteren IFN- $\gamma$ -spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörper wird das gebundene IFN- $\gamma$  und damit die sezernierende Zelle gefärbt. Die Analyse erfolgte durchflußzytometrisch.

#### 3.4.6.2 Zytotoxizitäts-Analysen: Chrom-Freisetzung und Europium-Freisetzung

Zum Nachweis antigenspezifischer Zytotoxizität wurden E6- und E7-exprimierende Zielzellen mit einem Markierungsreagenz behandelt, das nur im Falle des Zelltodes beim daraufhin erfolgenden Zerfall der Zellmembran wieder freigesetzt werden kann. T-Zellen (Effektoren) und Zielzellen werden dabei 2-4 Stunden koinkubiert. Werden die Zielzellen zytotoxisch angegriffen, wird ihre Zellmembran aufgelöst und die Markierung freigesetzt. Die freigesetzte Markierung kann im Zellüberstand quantifiziert werden. Bei der klassischen Methode, der Chrom-Freisetzung (*chromium release*), werden die Zielzellen zur Markierung mit löslichem radioaktivem Chrom-51 in Form von Dichromat behandelt, nach dem Experiment wird die Zahl radioaktiver Zerfälle im Überstand gemessen. Eine nichtradioaktive Alternative dazu ist die TDA-Freisetzung (Blomberg et al., 1996). Anstelle von Chrom-51 wird hierbei der organische Chelatligand BATDA zur Markierung eingesetzt. In der Zelle wird BATDA zu TDA hydrolysiert, das die Membran nicht mehr passieren kann, also in der Zelle verbleibt. Wird die Zelle lysiert, wird TDA in den Zellüberstand freigesetzt. Dort wird es durch Zugabe von Europium(III)-Ionen zu einem Chelatkomplex umgesetzt.

Dieser Komplex hat eine charakteristische Fluoreszenz mit langer Zerfallszeit, daher erfolgt die quantitative Auswertung durch zeitaufgelöste Fluorometrie.

Für die Chrom-Freisetzung wurde etwa eine Million Zielzellen in etwa 200 µl Medium suspendiert. Die Zellen wurden mit 40 µCi  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  (Amersham) 60 Minuten lang bei 37°C markiert, dann zweimal mit Medium gewaschen und auf die in 96-Loch-Platten vorgelegten Effektorzellen gegeben. Pro Gefäß einer solchen 96-Loch-Platte mit V-förmigen Gefäßböden wurden 2500 oder 5000 markierte Zielzellen mit einem definierten Vielfachen von Effektorzellen in insgesamt 200 µl Standardmedium für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde 100 µl Überstand vorsichtig abgenommen und in 96-Loch-Platten aus undurchsichtigem Kunststoff überführt. Je Gefäß wurden 170 µl Szintillationsflüssigkeit (MicroScint-40, Packard) zugegeben, die Platten versiegelt, die Flüssigkeitsphasen durch vorsichtiges Schütteln (Vortex) gut gemischt und die Platten in einem Szintillationszähler (TopCount, Packard) ausgewertet. Für jede Zielzellart wurden parallel die Maximalfreisetzung M (vollständige Zellyse mit 0,5% Triton X-100) und die Spontanfreisetzung S (Zielzellen ohne Zugabe von Effektoren) ermittelt. Die Ergebnisse wurden als relative spezifische Lyse L angegeben. Diese wurde aus den einzelnen Freisetzungswerten F wie folgt berechnet:  $L = (F-S) / (M-S)$ .

Für die BATDA-Freisetzungsanalyse wurden BATDA-Reagenz und Europium-Lösung von der Firma Wallac (Turku, Finnland) bezogen. Eine Million Zellen wurde mit 1 µl BATDA-Reagenz 10 bis 15 Minuten bei 37°C markiert. Bei der mikroskopischen Ermittlung der Zellzahl wurde kontrolliert, ob mehr als 90% vitale Zellen vorlagen. Verschiedene Zahlen von Effektorzellen wurden in jeweils 100 µl Standardmedium in 96-Loch-V-Bodenplatten vorgelegt und jeweils 5000 markierte Zielzellen in jeweils 100 µl Medium dazugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 2-4 Stunden bei 37°C wurden je 20 bis 40 µl des Überstandes abgenommen, in die Gefäße einer üblichen 96-Loch-Flachbodenplatte überführt, je 200 µl Europium-Lösung dazugegeben, 15 Minuten schonend geschüttelt und die Fluoreszenz des gebildeten Europium-Chelatkomplexes zeitaufgelöst im Fluorimeter (Wallac Multilabel Counter) gemessen. Die Ermittlung von Maximal- und Spontanfreisetzung und die Auswertung und Berechnung der relativen spezifischen Lyse erfolgten wie beim Chrom-Release.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Arbeiten mit primärem Tumormaterial

Für diese Arbeit war HPV16-positives Patientenmaterial von besonderem Interesse. Durch den engen Anschluß an das Klinikum Großhadern war es möglich, mehrere Biopsien von HNO- und Zervixkarzinom-Patienten mittels der in dieser Arbeit etablierten PCR auf HPV16-DNA zu testen, Tumorzelllinien einiger Spender und Fibroblastenkulturen der meisten Spender zu etablieren und Patienten-PBMCs zu konservieren.

#### 4.1.1 Asservierung primären Tumormaterials

Es wurden von insgesamt 125 Patienten Tumorbiopsien aus dem Kopf-Hals-Bereich und von 9 Patienten Zervixkarzinombiopsien asserviert. Von 88 Kopf-Hals-Patienten und sieben Patientinnen mit Zervixkarzinom konnten je 20 ml Blut aufgearbeitet werden. Die Anzahl der Biopsien aus den verschiedenen Lokalisationen der Primärtumoren ist in Tabelle 4.1.1 aufgelistet.

Diagnose	Anzahl
Oropharynx-Ca	24
Larynx-Ca	22
Hypopharynx-Ca	16
Lymphknoten-Ca	5
Andere Lokalisation	26
Unklare Diagnose	32
Zervix-Ca	9
Summe	134

Tabelle 4.1.1: Anzahl und Diagnosen der asservierten Tumorbiopsien. Die am häufigsten diagnostizierten Tumoren sind namentlich benannt. Unter „Unklare Diagnose“ fallen alle Tumorbiopsien aus dem Kopf-Hals-Bereich, deren genaue Diagnose bei der Übergabe nicht festgehalten werden konnte.

#### 4.1.2 Untersuchung von Tumorbiopsien auf HPV16-DNA

Für die Untersuchung der Biopsien auf HPV16-DNA musste ein zuverlässiger Test etabliert werden. Verschiedene Methoden des typspezifischen und typübergreifenden Nachweises von HPV-DNA in Tumormaterial durch PCR wurden verglichen, wobei sich die in dieser Arbeit neu etablierte PCR auf die Sequenzen von HPV16-E6, -E7 und den Anfangsbereich der Sequenz von E1 als reproduzierbarer erwies als die von Bauer et al. beschriebene typübergreifende (Bauer et al., 1991) oder die typspezifische PCR nach Walboomers et al. (Walboomers et al., 1999). Darum wurde die DNA aller Biopsien nach der hier etablierten PCR auf das Vorhandensein HPV16-spezifischer Sequenzen getestet. Nach Isolierung der genomischen DNA aus einem ca. 1mm<sup>3</sup> großen Stück der Patientenbiopsien wurde untersucht, ob ein HPV16-spezifisches Fragment von 368 bp amplifiziert werden konnte. Die zu amplifizierende Sequenz enthielt 8 bp aus dem 3'-Ende von E6, die gesamte Sequenz von E7 und die ersten 55 bp aus dem 5'-Ende von E1. Das Fragment entspricht den Basenpaaren 552-920 der 1985 veröffentlichten DNA-Sequenz von HPV16 (Seedorf et al., 1985). Es wurde nach Optimierung aller Parameter folgendes PCR-Programm verwendet: 95°C 5min, (95°C 1min, 62°C 1min, 72°C 1 min) x 40 Zyklen, 72°C 10min.

Von allen 134 asservierten Biopsien waren insgesamt neun HPV16-positiv: fünf von neun Zervixkarzinombiopsien, eine von 13 Oropharynxkarzinombiopsien (eine Biopsie aus einem Tonsillenkarzinom), drei von 16 Hypopharynxkarzinombiopsien. Ein repräsentatives Ergebnis der Analyse von sechs Patientenbiopsien, wonach drei HPV16-negativ und drei HPV16-positiv waren, ist in Abbildung 4.1.1 zu sehen.

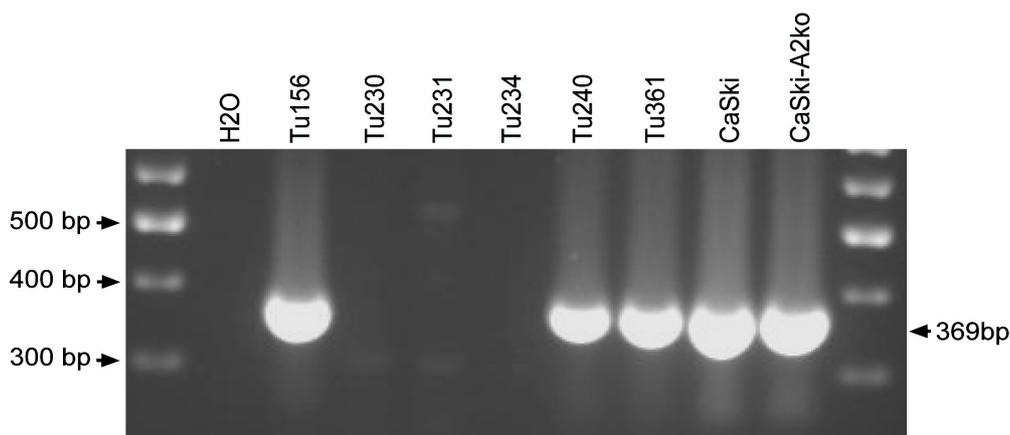


Abbildung 4.1.1: PCR-Analyse auf HPV16-Sequenzen von DNA aus verschiedenen Tumorbiopsien. Das HPV16-spezifische Fragment nach Gelelektrophorese der Proben in einem 1%igen Agarosegel hat eine erwartete Größe von 369 bp. Als Positivkontrolle wurden die Zervixkarzinomzelllinien CaSki und CaSki-A2ko verwendet. Die Biopsien der Spender Tu156, Tu240 und Tu361 sind HPV16-positiv.

### 4.1.3 HLA-Assoziation HPV16-positiver Karzinome

Für HPV16-E7 sind einige T-Zellepitope bekannt (Siehe Abbildung 4.3.1). Daher war es für die spätere T-Zellanalyse wichtig, den HLA-Typ der Spender zu bestimmen, deren T-Zellen restimuliert werden sollten, um Möglichkeiten der Peptid- und Tetramerverwendung zu klären, und um mögliche HLA-kompatible allogene Zielzellen zu finden. Die HLA-Typisierung wurde mittels sequenzspezifischer PCR-Amplifikation (SSP) durchgeführt (IMGM, Martinsried). Es wurde bei sieben von neun HPV16-positiven Patienten (77,8%) das HLA-Allel B\*44 gefunden, darunter bei allen der fünf HPV16-positiven Zervixbiopsien. Dagegen weisen nur 24% der gesunden Mitteleuropäer das Allel B44 auf (Schipper et al., 1996). Bei vier der fünf HLA-B44-positiven Zervixpatienten wurde zusätzlich das HLA-Allel B\*08 gefunden. Da aus der T-Zellstimulation des HPV16-positiven Tonsillenzellkarzinompatienten Tu156 ein CD4-positiver T-Zellklon etabliert wurde (siehe unten), wurde für diesen Patienten zusätzlich eine HLA-Klasse-II-Typisierung veranlasst. Sie ergab die Allele DRB1\*04, DRB1\*07, DQB1\*02, DQB1\*03. Sowohl für die Allele B44 und B8, als auch DRB1\*07 und DQB1\*03 wurde eine Assoziation mit zervikalen intraepithelialen Neoplasien beschrieben (Bontkes et al., 1998). Die genauen Diagnosen und die Verteilung der HLA-B44 und -B8-Allele bei allen HPV16-positiven Proben zeigt Tabelle 4.1.2.

Nummer / Name	Diagnose	HPV-16	HLA-B44	HLA-B8
1. T156	Tonsillen-Ca	+	+	-
2. T189	Hypopharynx-Ca	+	+	-
3. T240	Hypopharynx-Ca	+	-	-
4. T346	Hypopharynx-Ca	+	-	-
5. T353		+	+	+
6. T226		+	+	+
7. T348	Zervix-Ca	+	+	+
8. T361		+	+	+
9. T216		+	+	-

Tabelle 4.1.2: Diagnose und HLA-Allele aller HPV16-positiver Tumorbiopsien. Die Biopsien aus vier Kopf-Hals-Karzinomen und fünf Zervixkarzinomen waren in einer typspezifischen PCR über den E7-Bereich von HPV16 positiv.

#### 4.1.4 Etablierung von Zelllinien aus primärem Tumormaterial

Von insgesamt ca. 40 Tumorbiopsien verschiedener Patienten wurden Explantationskulturen zur Generierung von Tumorzelllinien angelegt. In allen Fällen konnten Fibroblastenlinien gezogen und in mehreren Aliquots kryokonserviert werden. In vier Fällen gelang die Generierung von Tumorzelllinien aus dem primärem Tumormaterial, zwei stammen aus Biopsien des Kopf-Hals-Bereichs und zwei aus Zervixkarzinombiopsien. Diagnosen und Namen der betreffenden Tumore sind in Tabelle 4.1.3 aufgelistet, wobei Zelllinien und Primärmaterial den gleichen Namen tragen. Sowohl die Biopsie als auch die Zelllinie Tu216 war nach dem Ergebnis der PCR HPV16-positiv.

Patient	Zelllinie	Diagnose	HPV16
Tu216	+	Zervix-Ca	+
Tu188	+	Zervix-Ca	-
Tu179	+	HNSCC	-
Tu182	+	HNSCC	-

Tabelle 4.1.3: Etablierte Zelllinien aus primärem Tumormaterial. Es wurden vier Zelllinien aus primärem Tumormaterial generiert, zwei aus Biopsien des Kopf-Hals-Bereichs (HNSCC: *head and neck squamous cell carcinoma*) und zwei aus Zervixkarzinombiopsien, wovon eine und die daraus entstandene Zelllinie (Tu216) HPV-16-positiv waren.

## 4.2 Herstellung von E6-, E7-exprimierenden mini-LCLs

### 4.2.1 Herstellung von mini-EBV-Plasmiden

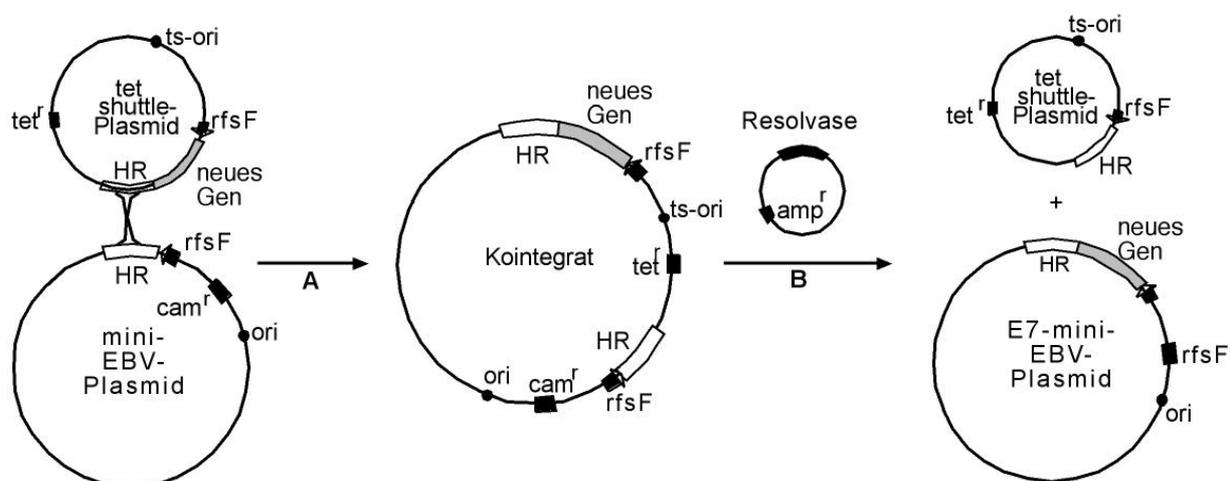
Es wurden zwei mini-EBV-Plasmide mit den Fremdgenen *E6* bzw. *E7* von HPV16 hergestellt. Beide Plasmide wurden auf der Basis des mini-EBV-Plasmids 1478.A (Kilger et al., 1999) konstruiert. Dieses Plasmid enthält die für die 11 latenten Gene kodierenden Abschnitte des EBV-Genoms, die für die latente und lytische DNA-Replikation notwendigen Elemente *oriP* und *oriLyt*, sowie die zur Verpackung nötigen *terminal repeats (TR)*. Insgesamt enthält das mini-EBV-Plasmid 1478.A 41% der Sequenz des EBV-Genoms von B95.8. Zu Selektionszwecken in *E. coli* trägt das Plasmid außerdem ein Chloramphenicol-Resistenzgen (*cam<sup>r</sup>*).

#### 4.2.1.1 Die Bildung eines Kointegrats aus dem mini-EBV-Plasmid und einem *shuttle*-Vektor

Die Konstruktion der neuen mini-EBV-Plasmide mit den Fremdantigenen *E6* und *E7* aus HPV16 erfolgte, wie schon die Konstruktion des 1478.A selbst, über die „*chromosomal building*“-Technik (O'Connor et al., 1989). Diese Technik ermöglicht den gezielten Umbau von großen Plasmiden wie dem Plasmid 1478.A mit einer Größe von über 80 kb durch homologe Rekombination und sequenzspezifische Rekombination in *E. coli*. Im ersten Schritt wird das Fremdantigen über konventionelle Klonierungsmethoden in ein Transporterplasmid, das *tet-shuttle*-Plasmid, eingebaut, das eine zu dem mini-EBV 1478.A homologe Sequenz von mehreren tausend Basenpaaren trägt. Das *shuttle*-Plasmid trägt außerdem ein Tetracyclin-Resistenzgen (*tet<sup>r</sup>*) und repliziert durch seinen temperatursensitiven Replikationsursprung nur bei 30°C. Werden *shuttle*-Plasmid und mini-EBV-Plasmid in einen rekombinationskompetenten *E. coli*-Stamm wie den Stamm CBTS transformiert, findet eine Rekombination über die homologen Bereiche beider Plasmide statt, es entsteht ein Kointegrat. Bei Kultivierung mit den Antibiotika Tetracyclin und Chloramphenicol bei 42°C wird auf Bakterien selektiert, die ausschließlich das Kointegrat tragen. Die Temperaturerhöhung auf 42°C stabilisiert das Konstrukt, da der CBTS-Stamm bei dieser Temperatur *recA*-negativ ist und damit die Rekombinationsfähigkeit verliert. Nach Isolation des Kointegrats wird der rekombinationsdefiziente *E. coli*-Stamm DH10B (*recA<sup>-</sup>*) damit transformiert.

#### 4.2.1.2 Resolvierung und Selektion auf das neue mini-EBV-Plasmid

Im zweiten Schritt werden die vom *shuttle*-Plasmid stammenden, nicht benötigten Sequenzen durch ortsspezifische Rekombination aus dem Kointegrat entfernt. Das Enzym Resolvase (Protein D) des F-Plasmids von *E. coli*, das nach Transfektion eines entsprechenden Expressionsplasmids in der Bakterienzelle exprimiert wird, vermittelt die Rekombination zwischen den beiden *rfsF*-Stellen auf dem Kointegrat (Lane et al., 1986). Es entsteht das neue mini-EBV-Plasmid mit dem Fremdgen und ein Plasmid, das aus den übrigen Sequenzen des *shuttle*-Plasmids besteht. Da nicht direkt auf das Resolvat selektiert werden kann, müssen über Parallelausstriche Bakterienklone gefunden werden, die chloramphenicolresistent, aber tetracyclinsensitiv sind. Aus diesen wird Plasmid-DNA isoliert und es werden erneut Bakterien transformiert. Diesmal werden chloramphenicolresistente und ampicillinsensitive Klone ausgewählt. So erhält man ein Bakterium, das nur das neue mini-EBV, nicht aber das Resolvaseplasmid trägt. Abbildung 4.2.1 verdeutlicht die einzelnen Klonierungsschritte. Abbildung 4.2.2 zeigt die Struktur eines so konstruierten mini-EBV-Plasmids mit dem Fremdgen *HPV16-E7*.



**Abbildung 4.2.1: „Chromosomal building“ - Konstruktion eines mini-EBV-Plasmids mit dem Gen *HPV16-E7*.** A: Kointegration bei 30°C, *cam*, *tet*; Stabilisation bei 42°C, *cam*, *tet*; Transfer in stabilen Stamm (*recA*). B: Transfer des Resolvaseplasmids, Resolvierung bei 42°C, *cam*, *amp*. (HR, Homologe Region; (*ts*-) *ori*, (temperatursensitiver) Replikationsursprung; *rfsF*, Resolvase-Erkennungsstellen)

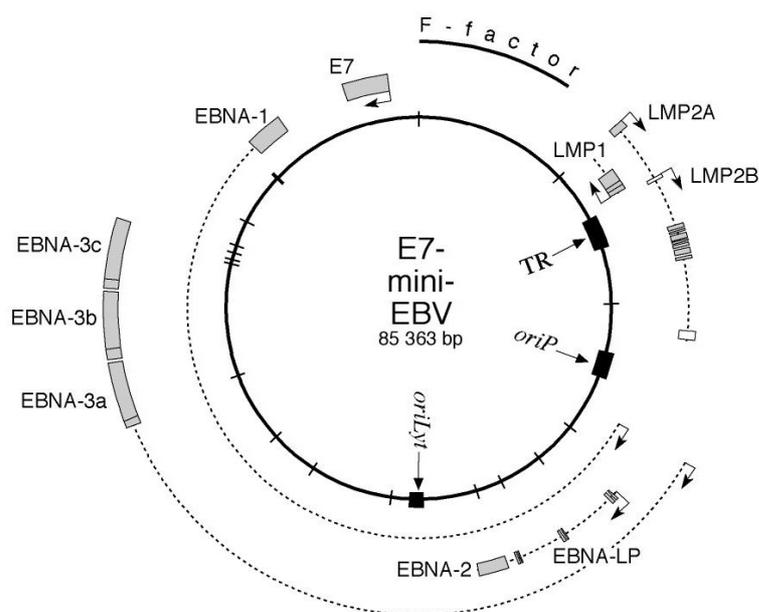


Abbildung 4.2.2: Struktur des HPV16-E7-mini-EBV-Plasmid auf der Basis des mini-EBV-Plasmids 1478.A.

## 4.2.2 Herstellung und Charakterisierung mini-EBV-infizierter B-Zelllinien (mini-LCLs)

### 4.2.2.1 Verpackung von mini-EBV und Infektion von PBMCs

Das mini-EBV-Plasmid repliziert dank seiner verschiedenen Replikationsursprünge sowohl in *E.coli* als auch in eukaryotischen Zellen. Nach Transfektion der aus Bakterien aufgereinigten mini-EBV-Plasmid-DNA und des Plasmids für die Expression des Transaktivators BZLF1 für die Induktion des lytischen Zyklus in die Verpackungszelllinie TR<sup>-2</sup>/293 werden extrachromosomale Konkatemere gebildet. Diese werden in Viruspartikel (mini-EBV-Partikel) verpackt und können einfach als Zellkulturüberstand geerntet werden. Zur Infektion von PBMCs wird 200 µl des geernteten Überstands auf ein halbe Million PBMCs gegeben. Die Zellen werden dann unter Zugabe von Cyclosporin A (zur Unterdrückung von T-Zellen) bis zum Auswachsen von mini-LCLs (mLCLs) mehrere Wochen kultiviert. Dies wurde mit PBMCs von 30 unterschiedlichen Spendern (12 Gesunden, neun HPV16-positiven Tumorpatienten, neun HPV16-negativen Tumorpatienten) unter Benutzung von E6-, E7- und Kontroll-mEBV-Überständen durchgeführt.

Bei 24 von 30 Spendern wuchsen E6-mLCLs aus. Für alle 30 Spender gelang die Etablierung von E7-mLCLs, allerdings waren zwei von sechs Linien eines HPV16-positiven Tumorpatienten Mischlinien mit Wildtyp-EBV (siehe 4.2.2.2). Die Etablierung von Kontroll-mLCLs gelang bei allen Spendern.

#### 4.2.2.2 Mini-LCLs waren frei von Wildtyp-EBV

Um zu zeigen, dass die entstehenden mLCLs nicht durch endogenes Wildtyp-EBV des Spenders, sondern durch die alleinige Infektion mit mini-EBV zur Proliferation angeregt wurden, wurde eine PCR-Methode verwendet, mit der die Anwesenheit von spezifischen mini-EBV-Sequenzen (dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen) und die Abwesenheit von Wildtyp-EBV-spezifischen Sequenzen (Gen für das virale Glykoprotein gp85) überprüft werden können. Abbildung 4.2.3 zeigt ein Beispiel einer solchen Analyse. Die getesteten E6-, E7-, und Kontroll-mLCLs eines gesunden Erwachsenen waren frei von Wildtyp-Virus. Nur die Wildtyp-EBV-infizierte Linie (LCL B95.8) zeigte die gp85-spezifische Bande von 461 bp. Bei 10 Gesunden und 13 Tumorpatienten konnte in nur zwei von 110 getesteten Linien eine gp85-spezifische Bande aus mLCLs nachgewiesen werden. 98% aller getesteten Linien waren also Wildtyp-EBV-freie mini-LCLs.

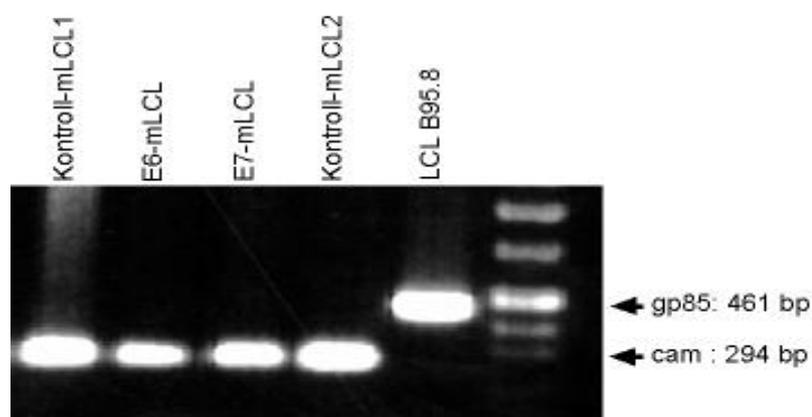
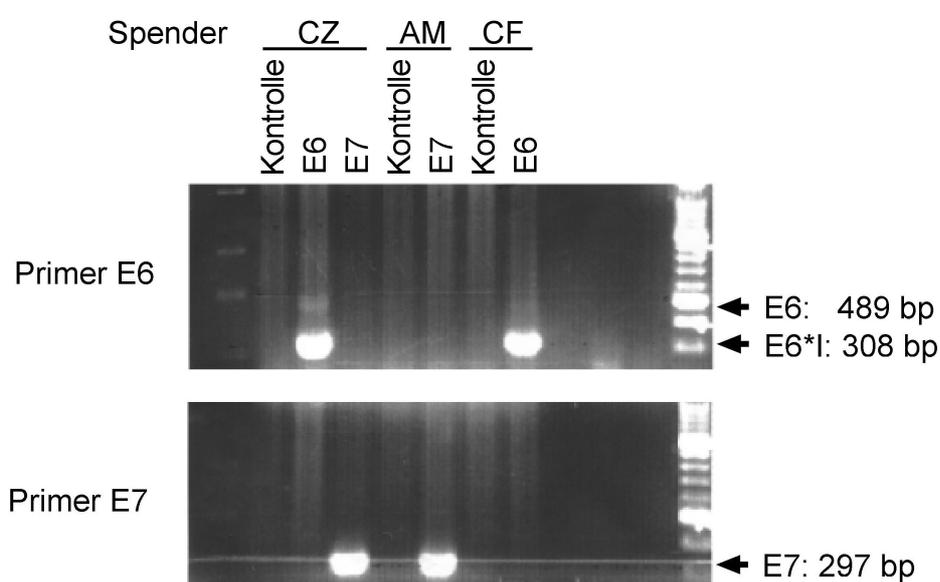


Abbildung 4.2.3: PCR-Analyse auf Wildtyp-EBV mit DNA aus (mini-)EBV-infizierten B-Zelllinien eines gesunden erwachsenen Spenders. Aus B-Zelllinien, die durch Infektion mit E6- oder E7-mini-EBV oder mini-EBV ohne Fremdgen (Kontroll-mini-EBV) hergestellt wurden, konnte nur die spezifische Bande des Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gens (*cam*, 294 bp) amplifiziert werden. Die B95.8-Wildtyp-Sequenz *gp85* mit 461 bp wurde nur aus der B95.8-infizierten Linie (LCL B95.8) amplifiziert. Die mini-LCLs waren damit frei von Wildtyp-Virus.

#### 4.2.2.3 Mini-LCLs transkribierten und translatierten die Gene *E6* und *E7*

Die Expression der Fremdantigene *E6* und *E7* in den mLCLs wurde sowohl auf RNA-Ebene durch RT-PCR, als auch auf Protein-Ebene durch immunzytochemische Färbungen bestätigt. Abbildung 4.2.4 zeigt das Ergebnis der RT-PCR, wonach in beiden mini-LCLs das jeweilige Fremdgen transkribiert wurde. In E6-mLCLs lag nur ein geringer Teil als Vollängentranskript von 489 bp vor, das Haupttranskript war die 308 bp-große Spleißform *E6\*1* (Hsu et al., 1993). In E7-mLCLs wurde Vollänge-*E7*-mRNA mit 297 bp transkribiert.



**Abbildung 4.2.4:** RT-PCR von E6- und E7-mini-LCLs aus drei Spendern. In beiden mLCLs wurde das jeweilige Fremdgen transkribiert. In E6-mLCLs (oben) war der mRNA-Level der Spleißform *E6\*1* (308bp) weitaus höher als für das Vollängentranskript (489bp). E7-mini-LCLs (unten) bildeten das E7-Vollängentranskript von 297bp. In Kontroll-mLCLs (Kontrolle) war weder ein E6- noch ein E7-Transkript nachzuweisen.

Abbildung 4.2.5 zeigt das Ergebnis der immunzytochemischen Färbung für beide mini-LCLs. Die Färbung mit monoklonalen Antikörpern gegen die Proteine E6 bzw. E7 zeigte eine deutliche Expression von E6 bzw. E7 in mini-LCLs.

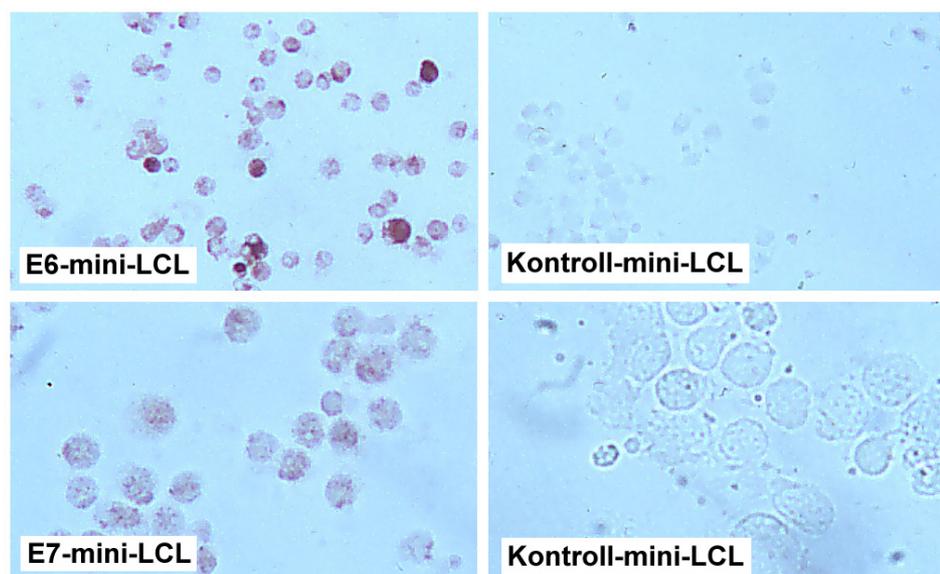
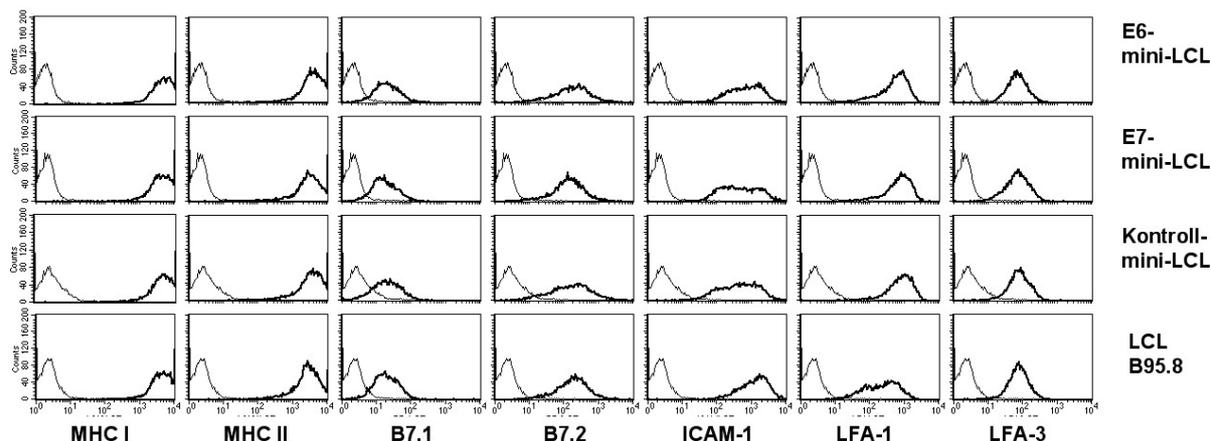


Abbildung 4.2.5: Immunzytochemische Färbung von E6- und E7-mini-LCLs und Kontroll-mLCLs. In beiden Linien war das entsprechende Fremdantigen durch Färbung mit monoklonalen Antikörpern nachzuweisen.

#### 4.2.2.4 Mini-LCLs exprimierten die für die T-Zell-Stimulation wichtigen Oberflächenmoleküle

Die mini-LCLs sollten als effektive Stimulatorzellen für die Expansion spezifischer T-Zellen eingesetzt werden. Daher musste gezeigt werden, dass die zellfremden Proteine E6 und E7 die Expression der für T-Zellinteraktionen wichtigen Moleküle in den mini-LCLs nicht vermindern oder unterdrücken. E6- und E7-mLCLs wurden für FACS-Analysen mit monoklonalen Antikörpern gegen HLA-Klasse-I und -II, B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), ICAM-1 (CD54), LFA-1 (CD11a), und LFA-3 (CD58) inkubiert und anschließend mit einem sekundären PE-markierten Antikörper gefärbt. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem sekundären, nicht aber mit den primären Antikörpern inkubiert. Wie Abbildung 4.2.6 zeigt, wurden auf der Oberfläche von E6-, E7-, und Kontroll-mLCLs alle untersuchten Oberflächenmoleküle in einer der Wildtyp-LCL-entsprechenden Stärke exprimiert. Daher sollten die mLCLs in gleichem Maße wie die Wildtyp-LCLs für die Stimulation von T-Zellen geeignet sein.



**Abbildung 4.2.6: Expressionsanalyse der für die Interaktion mit T-Zellen wichtigen Oberflächenmoleküle auf (mini-)LCLs.** Durch Färbung vitaler Zellen mit monoklonalen Antikörpern und anschließender FACS-Analyse wurde die Expression von MHC Klasse I und II, der kostimulatorischen Moleküle B7.1 und B7.2, und der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, LFA-1 und LFA-3 auf einer E6-, einer E7-, einer Kontroll-mLCL, und zum Vergleich auf einer Wildtyp-(B95.8)-LCL überprüft. Die Färbung mit dem spezifischen Antikörper wird durch die starke Linie dargestellt, die Kontrollfärbung mit dem sekundären Antikörper allein durch die dünne Linie. Die untersuchten Oberflächenmoleküle wurden auf mini-LCLs in vergleichbarer Stärke wie auf Wildtyp-LCLs exprimiert.

### 4.2.3 T-Zell-Stimulation mit mini-LCLs

Die E6-, E7-mLCLs wurden als Stimulatorzellen für T-Zellen mit dem Ziel der Herstellung E6-, E7-spezifischer T-Zellkulturen verwendet. Dazu wurden kryokonservierte oder frische autologe PBMCs mit mini-LCLs, die zur Verhinderung ihrer weiteren Proliferation bestrahlt worden waren, in Gegenwart des für T-Zellen stimulatorischen Zytokins IL-2 kultiviert. Wöchentlich wurde das alte Kulturmedium durch neues Medium mit IL-2 und frisch bestrahlten mini-LCLs ersetzt. Insgesamt wurde mit drei gesunden Spendern, deren HPV-Status nicht bekannt war, und mit sechs Tumorpatienten, deren Tumorbiopsien laut PCR HPV16 enthielten, gearbeitet. E6-mLCL-stimulierte Kulturen wurden für einen Tumorpatienten, E7-mLCL-stimulierte Kulturen für drei Gesunde und fünf HPV16-positive Tumorpatienten angelegt. Kontroll-T-Zellkulturen, die mit mini-LCLs ohne Fremdgen stimuliert wurden, wurden immer parallel angelegt. Bei einem der Tumorpatienten wurden zusätzlich tumorinfiltrierende Lymphozyten als T-Zellquelle verwendet.

#### 4.2.3.1 Mini-LCL-stimulierte T-Zellkulturen wurden von CD8-positiven T-Zellen dominiert

Sowohl in Kontroll-, als auch in E6- und E7-mLCL-stimulierten T-Zellkulturen dominierten nach wenigen Wochen die CD8-positiven T-Zellen. Im Folgenden werden die Ergebnisse mit T-Zellen des Patienten mit HPV16-positivem Tonsillenkarcinom Tu156 gezeigt, da nur Zellen dieses Spenders eine ausgeprägte Spezifität gegen E7-mLCLs entwickelten. Die T-Zellkulturen der anderen Spender wurden detailliert mittels Chrom-Freisetzung und IFN- $\gamma$ -ELISpot analysiert, zeigten aber Reaktivitäten, die gegen mini-LCLs mit und ohne Fremdgen gleich ausfielen.

Abbildung 4.2.7 zeigt FACS-Analysen von T-Zellen des Spenders Tu156 an Tag 29 und Tag 64 nach Stimulation mit E7-mLCLs. Der Prozentsatz an CD8-positiven Zellen stieg mit fortlaufender Kultur, der der CD4-positiven Zellen nahm ab. Ebenfalls sank der Anteil CD4-negativer CD8-negativer Zellen.

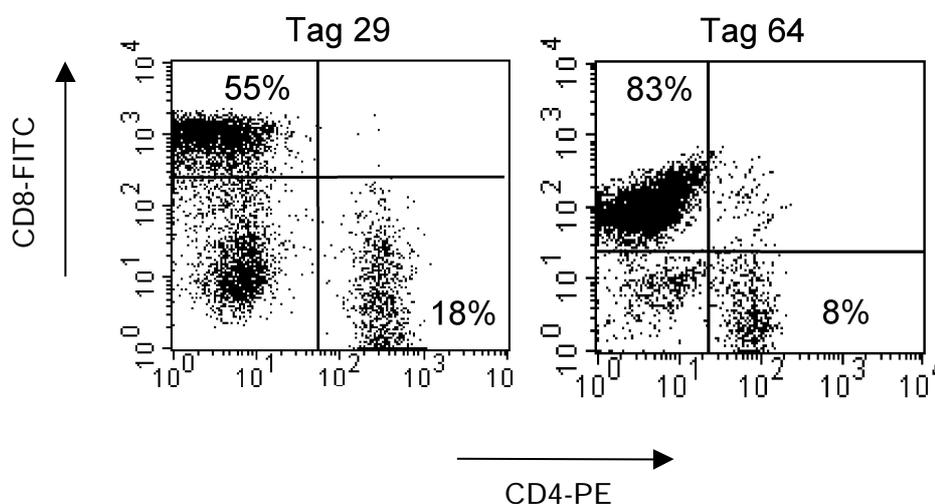
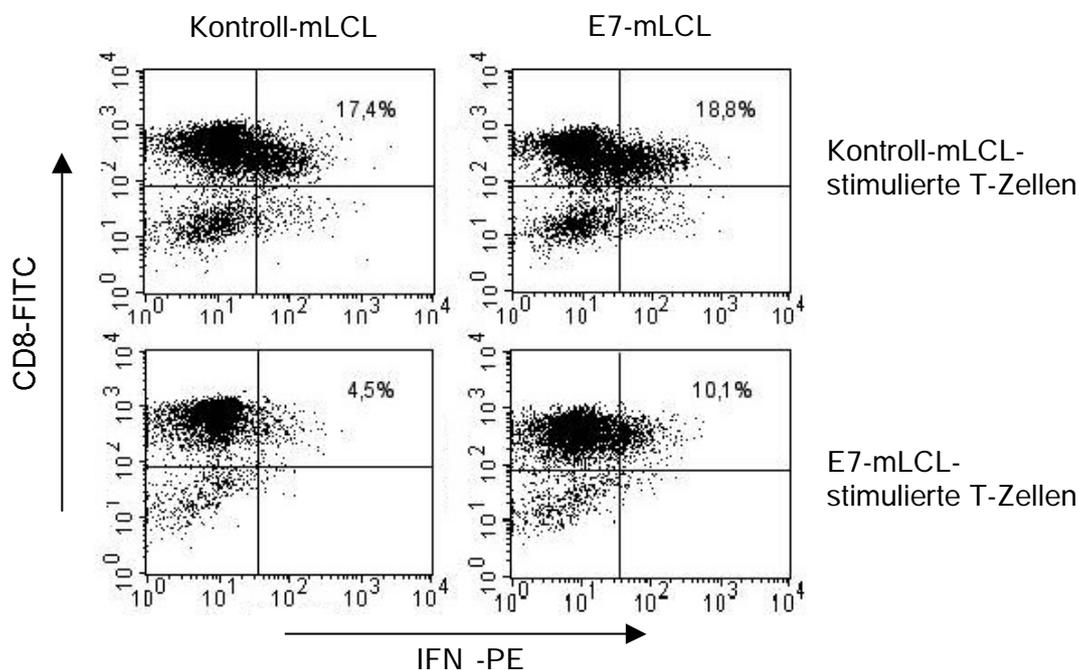


Abbildung 4.2.7: FACS-Analyse einer T-Zellkultur nach 29 und 64 Tagen wöchentlicher Stimulation mit E7-mLCLs. CD8-positive Zellen dominierten über CD4-positive Zellen zunehmend die Kultur.

#### 4.2.3.2 E7-mLCL-stimulierte T-Zellen reagierten mit spezifischer IFN- $\gamma$ -Sekretion auf E7-mLCLs

Die IFN- $\gamma$ -Ausschüttung nach Kontakt mit antigenexprimierenden Zielzellen und die spezifische Lyse derselben sind wichtige Effektorfunktionen zytotoxischer T-Zellen. Die IFN- $\gamma$ -Sekretions-Analyse mit den Kontroll- und den E7-mLCL-stimulierten T-Zellen des Spenders Tu156 zeigte eine spezifische Reaktion der E7-stimulierten T-Zellen: An Tag 56 wurden die Zellen auf spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion nach 12-stündiger Kokultivierung mit Stimulatorzellen, hier Kontroll- und E7-mLCLs, getestet. Wie die FACS-Auswertung in Abbildung 4.2.8 zeigt, wurden ca. 18% der Kontroll-mLCL-stimulierten T-Zellen nach Kokultivierung sowohl mit Kontroll-mLCL als auch mit E7-mLCLs zur Produktion von IFN- $\gamma$  angeregt. Dagegen reagierten E7-mLCL-stimulierte T-Zellen unterschiedlich auf die verschiedenen Stimulatorzellen: Gegenüber 4,5% nach Stimulation mit Kontroll-mLCLs konnten nach Stimulation mit E7-mLCLs 10,1% IFN- $\gamma$ -sekretierende Zellen nachgewiesen werden. Das könnte auf die Anwesenheit von ca. 5% E7-spezifischer T-Zellen hindeuten.



**Abbildung 4.2.8: FACS-Analyse IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen nach Kokultivierung mit verschiedenen Stimulatorzellen.** 56-Tage alte Kontroll- und E7-mLCL-stimulierte T-Zellen eines Tumorpatienten wurden über Nacht mit Kontroll- oder E7-mLCLs kokultiviert, und der Anteil IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen wurde bestimmt. Anders als Kontroll-mLCL-stimulierte T-Zellen reagierten E7-mLCL-stimulierte T-Zellen auf E7-mLCLs in größerer Zahl mit IFN- $\gamma$ -Sekretion (10,1%) als auf Kontroll-mLCLs (4,5%).

#### 4.2.3.3 E7-mLCL-stimulierte T-Zellen waren zytotoxisch aktiv und lysierten E7-exprimierende Zielzellen

##### 4.2.3.3.1 Die Infektion mit Vacciniavirus führte zur Expression von E7 in Zielzellen

Als Zielzellen für die Untersuchungen sowohl der IFN- $\gamma$ -Sekretion wie der Lyse durch Chrom- oder Europium-Freisetzungen konnten in dieser Arbeit autologe und allogene mini-LCLs und EBV-freie B-Blasten verwendet werden. EBV-freie B-Blasten sind dabei besonders interessante Zielzellen, da bei ihrer Verwendung die HPV-spezifische Lyse nicht von der EBV-spezifischen Lyse durch EBV-spezifische T-Zellen, die bei der Stimulation mit mini-EBV-infizierten mLCLs immer in den T-Zellkulturen mitproliferieren, überlagert werden kann. Die Expression von E7 in den B-Blasten wurde hier durch Infektion mit dem Vacciniaviruskonstrukt SR16 erreicht, das die Gensequenzen von HPV16-*E6* und -*E7* trägt. Außerdem konnte als Kontrolle mit dem Vacciniastamm *Wyeth* gearbeitet werden, der keine HPV-Sequenzen trägt. Der Nachweis, dass die Infektion von B-Blasten mit dem Vacciniakonstrukt *SR16* zur Expression von E7 in den B-Blasten führt, wurde mittels RT-PCR erbracht. Aus den B-Blasten eines gesunden Spenders wurde 16 Stunden nach Infektion die Gesamt-RNA isoliert und auf die Anwesenheit der E7-Sequenz untersucht. Abbildung 4.2.9 zeigt, dass die mRNA von E7 (369 bp) in *SR16*-infizierten Kontroll-mLCLs exprimiert wurde. Damit stand eine geeignete Methode zur Herstellung E7-exprimierender Zielzellen für die Abfrage der HPV-Spezifität der T-Zellkulturen zur Verfügung.

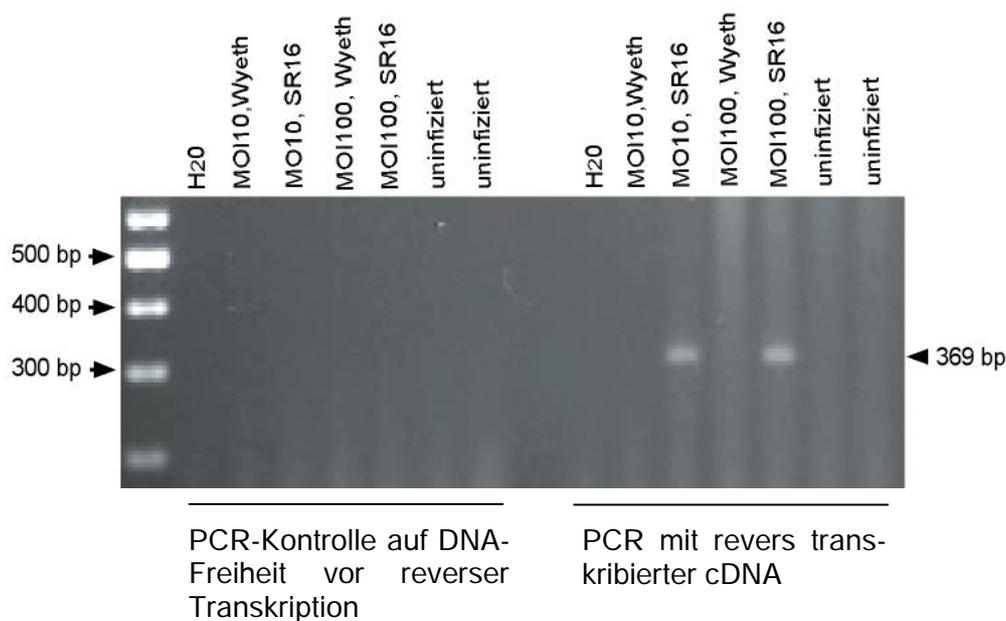


Abbildung 4.2.9: Kontrolle der Expression des Fremdantigens E7 nach Vaccinia-infektion einer Kontroll-mLCLs eines gesunden Spenders mittels RT-PCR. *SR16*-infizierte Kontroll-mLCLs exprimierten E7. Die spezifische Bande nach RT-PCR mit den Primern E7-L1 und E7-R1 lieferte ein spezifisches Fragment von 369 bp.

#### 4.2.3.3.2 E7-mini-LCLs zeigten bei Chromfreisetzungsexperimenten eine spezifische Lyse von E7-exprimierenden Zielzellen

Abbildung 4.2.10 zeigt das Ergebnis von Chromfreisetzungsexperimenten mit T-Zellen des Tumorpatienten Tu156 an Tag 31. Zielzellen waren hier autologe mLCLs (Abbildung 4.2.10 oben) oder Vaccinia-infizierte B-Blasten eines partiell HLA-kompatiblen (HLA-B44, B51) Spenders (Abbildung 4.2.10 unten). Mit steigendem Effektor-Zielzell-Verhältnis nahm die spezifische Lyse zu. Kontroll-T-Zellen lysierten mLCLs mit oder ohne E7 gleichermaßen gut, dagegen zeigten E7-stimulierte T-Zellen eine stärkere Lyse der E7-mLCLs. Insgesamt zeigten die T-Zellen gegenüber mini-LCLs eine relativ starke Lyse von mindestens 40%, die auf EBV-spezifische T-Zellen und NK-Zellen zurückzuführen ist. Bei der Verwendung von EBV-freien B-Blasten war die Lyse mit ca. 20% niedriger, was durch das Fehlen EBV-spezifischer T-Zellreaktionen vor allem auf NK-Zellaktivitäten zurückzuführen ist. Die E7-stimulierten T-Zellen lysierten *SR16*-infizierte B-Blasten signifikant stärker. Die höchstens 10% Lyse von *Wyeth*-infizierten B-Blasten durch die E7-stimulierten T-Zellen sind im Vergleich zu den Kontroll-mLCL-stimulierten T-Zellen niedrig. Insgesamt deuten die Ergebnisse aus diesem Lyse-Experiment auf das Vorhandensein E7-spezifischer zytotoxischer T-Zellen in den mit E7-mLCL-stimulierten Kulturen hin.

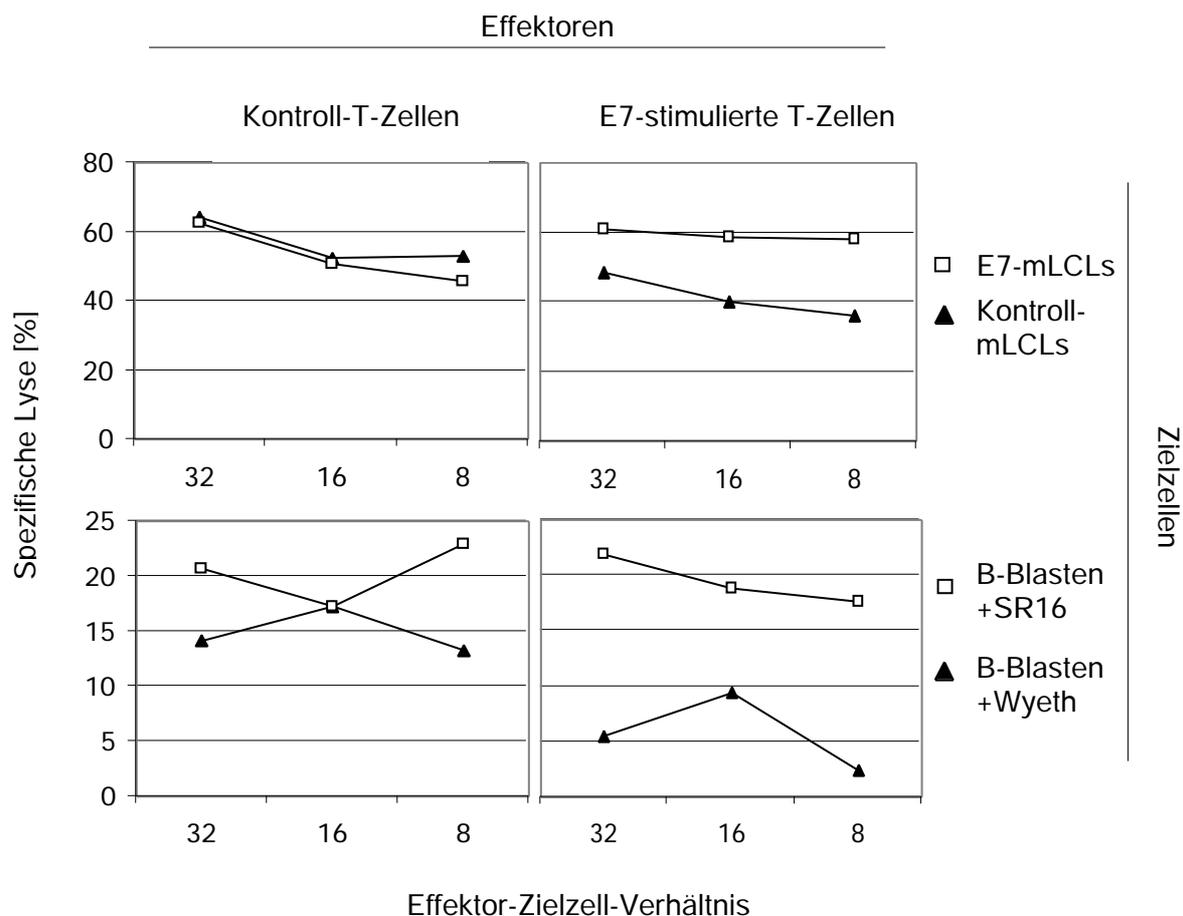


Abbildung 4.2.10: Zytotoxische Aktivität von E7- und Kontroll-mLCL-stimulierten T-Zellen des Spenders Tu156, bestimmt durch Chrom-Freisetzung aus autologen mini-LCLs (oben) und partiell HLA-kompatiblen (HLA-B44, B51) Vaccinia-infizierten B-Blasten (unten). E7-exprimierende Zielzellen werden von den E7-stimulierten T-Zellen stärker lysiert als Kontrollzellen. Kontroll-T-Zellen lysieren die Zielzellen ohne signifikanten Unterschied.

#### 4.2.3.3.3 Eine weitere E7-mini-LCL-stimulierte T-Zelllinie des gleichen Spenders zeigte eine spezifische Lyse von E7-exprimierenden mini-LCLs

Mit neu aufgetauten T-Zellen des gleichen Spenders wurde erneut die Stimulation mit E7- und Kontroll-mLCLs durchgeführt. An Tag 21 wurde ein Europium-Freisetzungsversuch mit autologen mini-LCLs als Zielzellen durchgeführt. Das Ergebnis in Abbildung 4.2.11 zeigt klar, dass E7-mLCL-stimulierte T-Zellen E7-mLCLs signifikant stärker lysierten als die Kontroll-mLCLs. Dieser Effekt konnte also sowohl in Chrom- wie auch in Europium-Freisetzungsversuchen beobachtet werden. Die hier dargestellten Ergebnisse wurden aber bereits an Tag 21, also 10 Tage früher, erzielt. Es ist also bereits nach dreiwöchiger Stimulation mit E7-mLCLs eine E7-spezifische Zytotoxizität in den Kulturen nachweisbar.

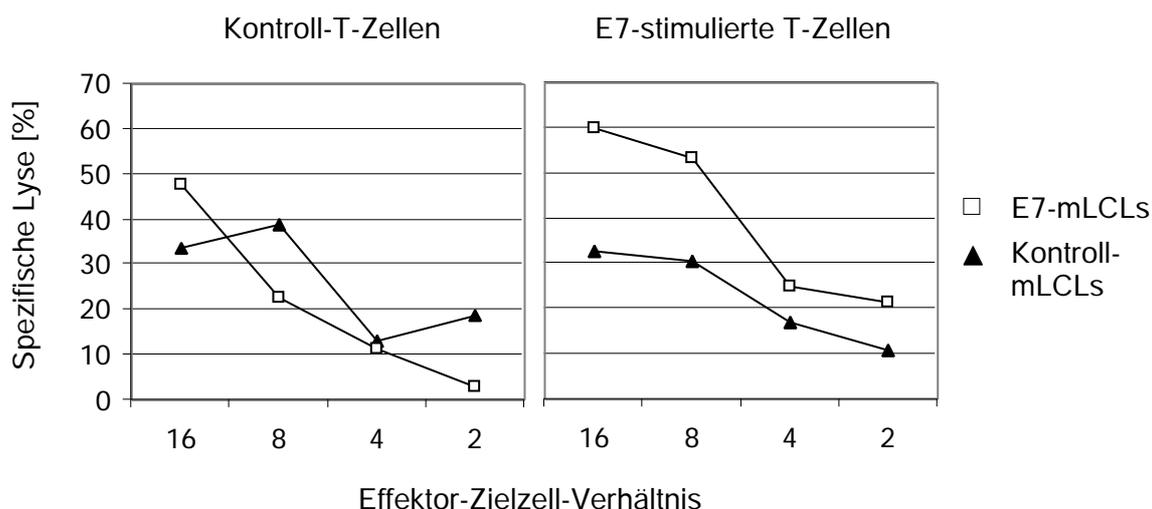


Abbildung 4.2.11: Zytotoxische Aktivität von E7- und Kontroll-mLCL-stimulierten T-Zellen des Spenders Tu156, bestimmt durch Europium-Freisetzung aus autologen mini-LCLs. E7-mLCLs werden von E7-stimulierten T-Zellen stärker lysiert als Kontroll-mLCLs (rechts). Kontroll-T-Zellen lysieren beide Zielzellen vergleichbar stark (links).

#### 4.2.4 Einzelzellklonierung der E7-mini-LCL-spezifischen T-Zellen

Für den HLA-Typ des Spenders Tu156 (A29, A3; B44, B51; Cw15, Cw16) sind bisher keine Epitope des Proteins HPV16-E7 bekannt. Daher waren keine Analysen mit HLA-Molekül-Tetrameren oder Peptidepitopen möglich. Um Phänotyp, Avidität und Reaktivität E7-spezifischer T-Zellen dieses Spenders dennoch detaillierter untersuchen zu können, wurden Einzelzellklonierungen aus der frisch aufgetauten polyklonalen T-Zelllinie von Tag 34 nach dem Protokoll von Abschnitt 3.4.5.4 angelegt. Es wurden 10 Platten mit je 0,5 und 10 Platten mit je 5 Zellen pro Gefäß einer 96-Loch-Platte angelegt.

##### 4.2.4.1 Anzahl und Phänotyp der ausgewachsenen T-Zellklone

Da die T-Zellklone auf eine polyklonale Linie mit über 80% CD8-positiven T-Zellen zurückgingen, resultierte die Einzelzellklonierung in deutlich mehr CD8-positiven Klonen als CD4-positiven Klonen. In Abbildung 4.2.12 ist exemplarisch die FACS-Analyse für einen CD8-positiven und einen CD4-positiven T-Zellklon dargestellt. Tabelle 4.2.1 zeigt die Anzahl der erhaltenen Klone aus den insgesamt 1920 angesetzten Einzelkulturen. Es entstanden insgesamt 12 CD4-positive und 23 CD8-positive T-Zellklone.

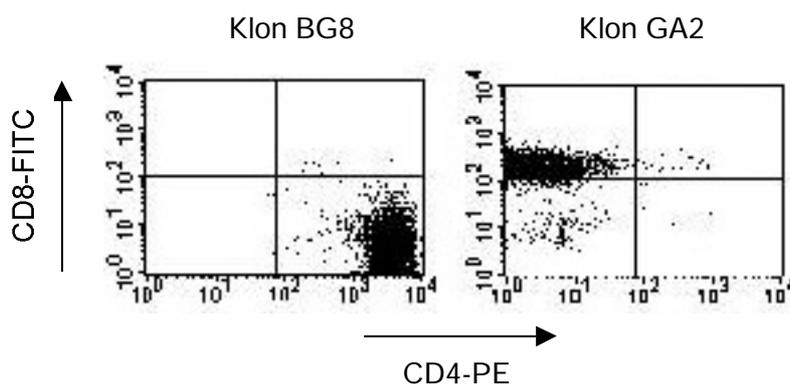


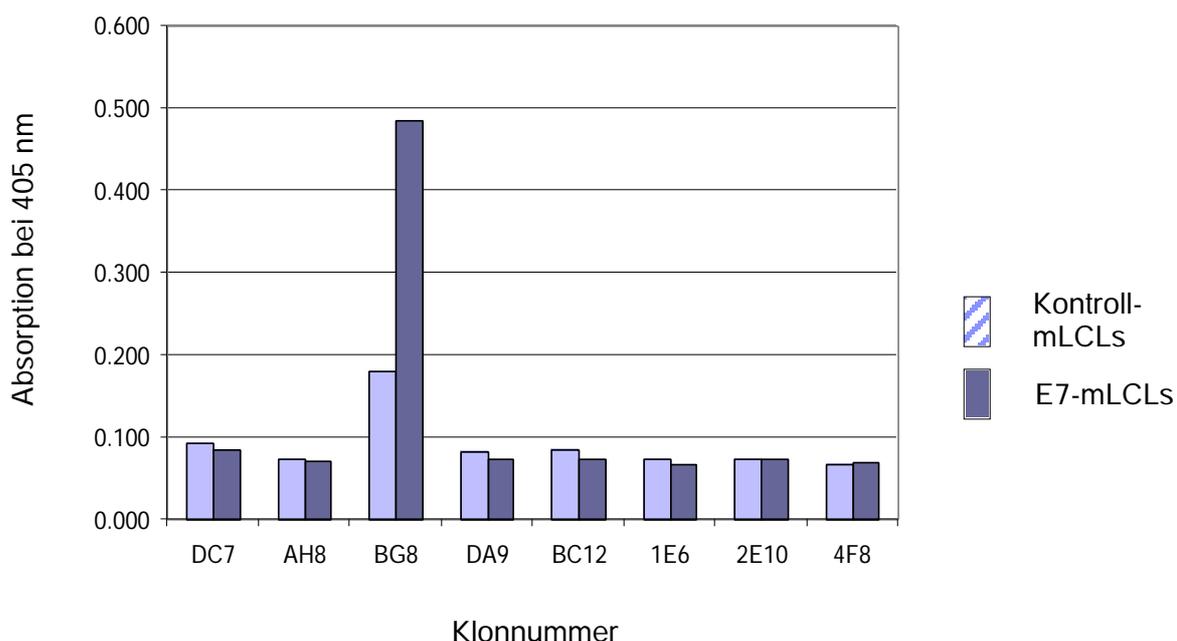
Abbildung 4.2.12: FACS-Analyse zweier T-Zellklone des Spenders Tu156. Klon BG8 ist CD4-positiv, Klon GA2 CD8-positiv.

Zellen/Loch	Zahl CD4 <sup>+</sup> -Klone	Zahl CD8 <sup>+</sup> -Klone
0,5	2	4
5	10	19
Summe	12	23

Tabelle 4.2.1: Anzahl der Klone aus der polyklonalen T-Zelllinie des Spenders Tu156.

#### 4.2.4.2 IFN- $\gamma$ -Sekretion bei T-Zellklonen des Spenders Tu156

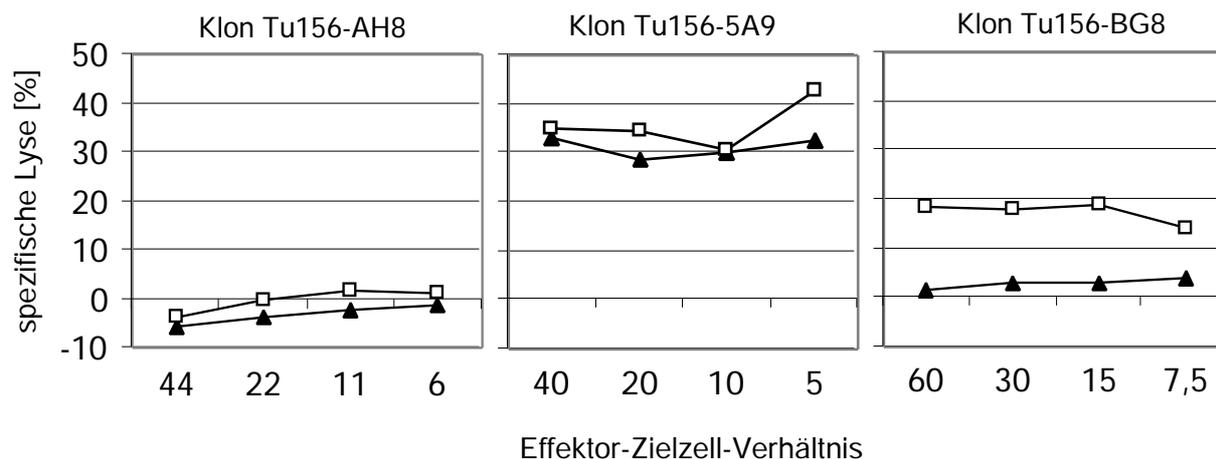
Alle T-Zellklone des Tumorspenders Tu156 wurden auf die Sekretion von IFN- $\gamma$  nach spezifischer Stimulation mit E7- und Kontroll-mLCL durch Quantifizierung des IFN- $\gamma$  im Überstand (ELISA) untersucht. Es wurden drei unterschiedliche Reaktionsmuster gefunden: nicht-reaktiv, EBV-spezifisch reaktiv, und E7-spezifisch reaktiv. Dabei konnte ein Klon als E7-spezifisch reaktiv definiert werden: Der Klon Tu156-BG8 reagierte auf die E7-mLCL mit stärkerer IFN- $\gamma$ -Produktion als auf die Kontroll-mLCL (Abbildung 4.2.13).



**Abbildung 4.2.13: IFN- $\gamma$ -ELISA mit T-Zellklonen des Spenders Tu156.** T-Zellklone wurden mit autologen Kontroll- und E7-mLCLs als Stimulatorzellen über Nacht kokultiviert. Am nächsten Tag wurde mittels ELISA die Menge an IFN- $\gamma$  im Überstand gemessen. Der Klon BG8 reagierte auf E7-mLCLs mit 2,5-fach stärkerer IFN- $\gamma$ -Sekretion als auf Kontroll-mLCLs.

#### 4.2.4.3 Der Klon Tu156-BG8 zeigte eine spezifische Lyse der E7-mini-LCL

Durch Europium-Freisetzung wurde die Frage geklärt, ob und welche Klone Zielzellen spezifisch lysieren konnten. Zielzellen waren E7- und Kontroll-mLCLs. Abbildung 4.2.13 zeigt drei CD4-positive Klone als Beispiel. Klon Tu156-AH8 war ein nicht-reaktiver Klon, der keine der Zielzellen erkannte, Tu156-5A9 war ein EBV-spezifischer Klon, erkannte also E7- sowie Kontroll-mLCLs gleichermaßen, und der E7-spezifische Klon Tu156-BG8 aus dem ELISA-Ergebnis zeigte eine signifikant stärkere Lyse der E7-mLCL.



**Abbildung 4.2.14: Zytotoxische Aktivität von T-Zellklonen des Spenders Tu156, bestimmt durch Europium-Freisetzung.** Dargestellt ist ein nicht-reaktiver Klon (AH8), ein EBV-spezifischer Klon (5A9), und der E7-spezifische Klon BG8. Der Klon AH8 lysierte weder Kontroll-mLCLs (Dreiecke), noch E7-mLCLs (Quadrate). Der Klon 5A9 zeigte eine EBV-spezifische Lyse, da beide Zielzellarten vergleichbar stark lysiert wurden. Der Klon BG8 lysierte die E7-mLCL stärker als die Kontroll-mLCL. Dies deutet auf eine Spezifität dieses Klons gegen HPV16-E7 hin.

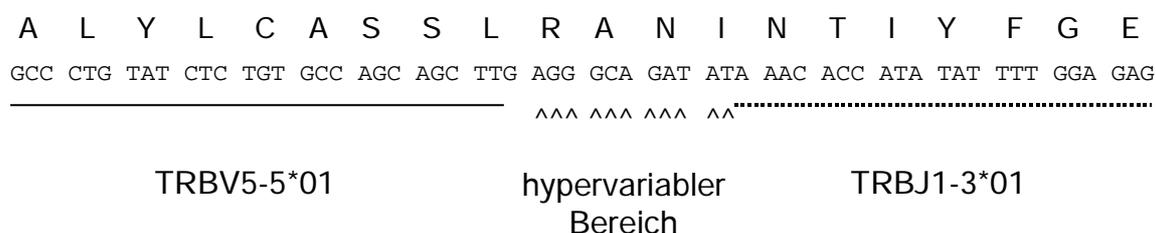
#### 4.2.4.4 Die T-Zell-Rezeptor-Analyse des T-Zellklons Tu156-BG8

Um den Aufwand und die benötigte Zellzahl für die Analyse der TCR-Sequenz möglichst gering zu halten, wurde eine PCR auf genomischer DNA-Ebene durchgeführt. Die Vorwärts-Primer sollten demnach innerhalb der TRBV-Region liegen, die Rückwärtsprimer innerhalb der TRBJ-Region (Lefranc und Lefranc, 2001). Um möglichst wenige Primer zu benötigen, wurde nach Übereinstimmungen in den TRBV-Sequenzen gesucht. Die 55 TRBV- Sequenzen konnten durch 22 Primer abgedeckt werden. Innerhalb der 16 TRBJ-Sequenzen konnten keine übereinstimmenden Bereiche gefunden werden, darum wurden 16 TRBJ-spezifische Primer verwendet. Zur leichteren Handhabung wurden Gruppen zu je drei oder vier TRBV- ("Vorwärts")-Primern und je vier TRBJ-("Rückwärts")-Primern gebildet (siehe Tabelle 4.2.2). Auf diese Weise ergaben sich 24 PCR-Reaktionen, die zur Analyse jedes T-Zellklons nötig waren. Die PCR-Reaktion wurde über die genaue Einstellung der Temperatur, Zyklusanzahl und DNA-Menge so optimiert, dass sie ein spezifisches Produkt lieferte. Dieses wurde mit Hilfe des Primergemisches, das zur Amplifikation des Fragments führte, sequenziert (Sequiserie).

Name/ Sequenz	Tm [°C]	Mix	Name/ Sequenz	Tm [°C]	Mix
A1	CAGGTGTGATCCAATTTTC	56, 1			
A2	GGTATCGACAAGACC	47, 3			
A3	GGAGTAGACTCCACTCTC	50, 2			
B1	CCACACACCTGATCAAAACG	64, 1	Ia	GTGAGTCTGGTGCCTTG	57, 6
B2	GGAGCTCATGTTTGTCTAC	54, 5	Ib	CAAGACAGAGAGCTGGG	56, 8
B3	CCACTCTGAAGATCCAGC	58, 3	Ic	CCGTTCCCAAAGTGGAG	61, 7
			Id	GTACGGTCAGCCTAGAG	52, 7
C1	CCTGGTCACAGATGG	58, 3	IIa	CAGAACCAGGAGTCCTC	55, 2
C2	TACTGGTACCGACAGG	51, 8	IIb	CGACGTA CTGCTCGTAG	55, 2
C3	CAGTTGAAAGGCCTGATG	59, 3	IIc	CCTGGGCCAAAATACTG	59, 0
C4	CTCCGCACAACAGTTCC	60, 4	IId	CGAAGTACTGCTCGTAG	51, 3
D1	CAACATCTCAGATCCTGG	56, 3	IIIa	GTCCCCGAACCGAAGGTG	67, 9
D2	GCATAGGAGTGTATCCTG	52, 5	IIIb	GTCCCATTCCCAAAGTGG	62, 8
D3	CCTCATCCACTATTCCTATG	56, 0	IIIc	GCGCCGAAGTACTGAATG	62, 0
D4	CGATTCTCATCTCAATGCC	60, 8	IIId	CGAAAGTCAGGACGTTGG	61, 9
E1	GAGCTGGGTTATCTGTAAG	53, 7	IVa	CTACAACAGTGAGCCAAC	53, 7
E2	CACCATGATGTTCTTTGAC	56, 0	IVb	GAAGTACTGGGTCTCTTG	51, 5
E3	GAGTCTAAACAGGATGAGTC	52, 5	IVc	GAAGAACTGCTCATTGTAGG	56, 4
E4	GTCTTCCACGCTGAAGATC	59, 9	IVd	CGAGTCCCATCACCAAATG	65, 2
F1	GGTCATCCAGAACCCAAG	60, 5			
F2	GACACTGTCTACTGGTAC	45, 9			
F3	GAAACAGGTATGCCCAAG	58, 0			
F4	CAGCATCCTGAGGATCC	59, 2			
TCR V -Primer (vorwärts)			TCR J -Primer (rückwärts)		

Tabelle 4.2.2: Primer für die Amplifizierung der variablen Domäne des TCR. . Die 22 TCR-V -Primer wurden zur Verwendung in der PCR zu 6 Mischungen A-F zusammengefaßt, die 16 TCR-J -Primer zu vier Mischungen (I – IV). Pro Analyse ergeben sich 6 x 4 = 24 nötige Reaktionen.

Die Amplifikation des TCR-Fragments des Klons Tu156-BG8 ergab eine Bande von 320 bp. In dieser Arbeit richtet sich die Bezeichnung der TCR nach der Nomenklatur von Wei et al. (Wei et al., 1994). Die Sequenzierung zeigte eine Kombination der Gensegmente TRBV5-3\*01 mit TRBJ1-3\*01. Zwischen TRBV und TRBJ sind 11 N-Nukleotide (^) eingefügt. Die Sequenz der Beta-Kette dieses T-Zellklons im Bereich der CDR3 lautete wie folgt (über den als Triplets dargestellten Nukleotiden ist die Aminosäuresequenz im Einbuchstabencode angegeben):



### 4.3 Herstellung von T-Zelllinien mit Peptid-beladenen B-Blasten

Die Stimulation von T-Zelllinien mittels peptidbeladener B-Blasten wurde mit PBMCs aus *Buffy Coats* (Leukozytenkonzentraten aus einer 500 ml - Blutspende eines anonymen Spenders) durchgeführt. Damit waren Anfangszahlen von 200 Mio PBMC pro T-Zelllinie ansetzbar. Als Peptid wurde das am besten untersuchte dominante HLA-Klasse-I-Peptid YMLDLQPETT (kurz: YML) eingesetzt (Siehe Abbildung 4.3.1). Während der ersten drei Wochen wurden die aus HLA-A2-positiven *Buffy Coats* aufgereinigten Zellen in RPMI-Medium mit 2% humanem Serum, 0,1 ng/ml IL-12,1 µg/ml YML-Peptid, und 2,5 ng/ml IL-7 in Kultur gehalten. In wöchentlichem Abstand wurde das Medium durch frisches ersetzt. Um möglichst bald auf die Stimulation mit peptidbeladenen APC überzugehen, wurden die autologen B-Blasten, sobald nach etwa drei Wochen ausreichende Zellzahlen erreicht waren, mit Peptid beladen und nach letaler Bestrahlung als Stimulatorzellen zusammen mit den T-Zellen kultiviert. Die Beladung erfolgte, indem das Peptid für eine Stunde zu den B-Blasten-Kulturen gegeben wurde. Freies Peptid wurde anschließend durch Waschen

entfernt. Ab Tag 30 wurde das humane Serum durch 10% FCS ersetzt. Ab Tag 21 wurden in regelmäßigen Abständen FACS-Analysen mit YML-Peptid-Tetrameren durchgeführt. Der Zeitpunkt des ersten Nachweises YML-tetramerpositiver T-Zellen war Beginn der funktionellen Analysen der T-Zelllinien.

MHGDT	PTLHE	<u>YMLDL</u>	<u>QPETT</u>	20	HLA-A2
DLYCY	EQLND	SSEEE	DEI DG	40	
PAGQA	<u>EPDRA</u>	HYNI V	TFCK	60	HLA-B18
CDSTL	RLCVQ	STHVD	IRTLE	80	
<u>DLLMG</u>	<u>TLGIV</u>	CPICS	QKP	98	HLA-A2

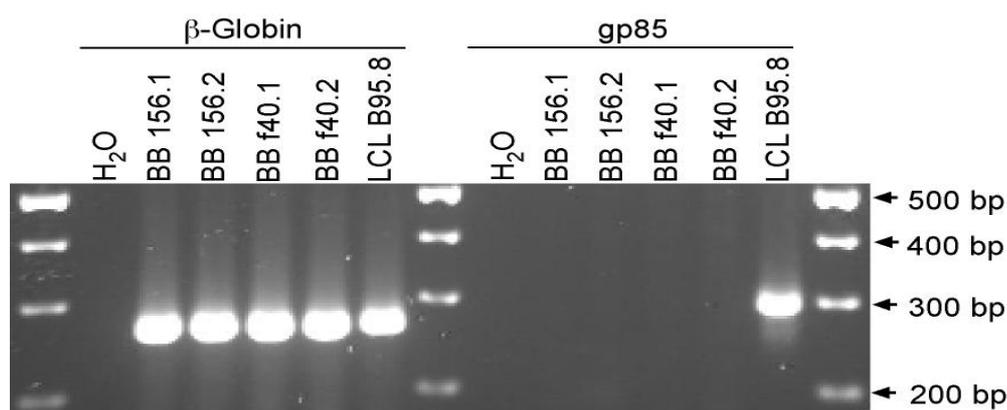
**Abbildung 4.3.1: Aminosäuresequenz und bekannte HLA-Klasse-I-Epitope von HPV16-E7.** In den 98 Aminosäuren des Proteins E7 sind bisher drei HLA-A2-Epitope und ein HLA-B18-Epitop bekannt. Das bisher allgemein am besten untersuchte und in dieser Arbeit für die Stimulation von T-Zellen verwendete Epitop ist das HLA-A2-restringierte 10mer YMLDLQPETT (Ressing et al., 1995).

#### 4.3.1 Die B-Blasten waren nach Langzeitkultivierung EBV-frei

Für die Herstellung von B-Blasten wurden PBMCs mit IL-4, CD40L und Cyclosporin A kultiviert. Der CD40L-Stimulus wurde über die Verwendung einer CD40L-transfizierten murinen Fibroblastenlinie (Garrone et al., 1995) bereitgestellt. Um die B-Blasten auch in Langzeitkultur EBV-frei zu erhalten, wurden kleine Anfangszellzahlen zwischen 50.000 und 200.000 PBMCs pro Gefäß gewählt. Da von  $10^6$  B-Zellen 0,5 - 50 Zellen EBV-positiv sind, war bei dieser Zellzahl die Wahrscheinlichkeit, eine EBV-positiv B-Zelle in der Kultur zu haben, sehr gering.

Für eine schnelle Proliferation bevorzugen die B-Zellen gegenseitigen Kontakt und wöchentliches Umsetzen auf CD40L-exprimierende Fibroblasten in frischem Medium mit IL-4 und Cyclosporin A. Die PCR-Analyse in Abbildung 4.3.2 zeigt, dass sich aus keiner der so hergestellten vier B-Blasten-Linien von den exemplarisch dargestellten

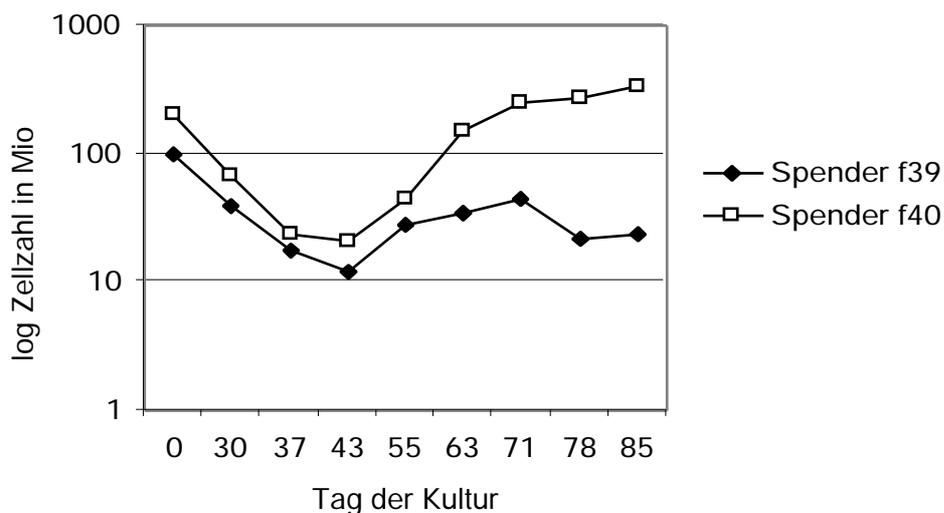
zwei Spendern die EBV-spezifische Sequenz von gp85 amplifizieren ließ. Als Positiv-Kontrolle wurde die Wildtyp-B95.8-LCL aufgetragen. B-Blasten sind also EBV-frei. Alle B-Blasten-Linien, die zu längerer Kultivierung bestimmt waren, wurden stets in der beschriebenen Weise hergestellt und getestet. War die schnelle Herstellung großer Zahlen von B-Blasten aus peripherem Blut notwendig, wurden B-Blasten auch aus größeren Anfangszellzahlen hergestellt. In diesem Fall betrug die Anfangszelldichte  $2 \times 10^6/\text{ml}$ . Solche B-Blastenkulturen wurden ab ihrer ersten Stimulation bis zu 5 Wochen kultiviert und verwendet. Es ist gezeigt worden, daß bis zu diesem Zeitpunkt EBV-infizierte Zellen in den Kulturen selten oder nicht nachweisbar sind (Schultze et al., 1997), weshalb beim Einsatz dieser B-Blasten als Stimulatoren keine EBV-spezifischen T-Zellen expandiert werden.



**Abbildung 4.3.2: PCR-Analyse auf EBV-Freiheit der B-Blasten von zwei Spendern.** Die DNA-Kontrolle auf  $\beta$ -Globin (linker Teil) war in beiden B-Blastenkulturen (1 und 2) beider Spender (156 und f40) positiv. Eine gp85-spezifische Bande war nur in der Wildtyp-LCL (LCL B95.8) nachweisbar. Die Kulturen der Spender Tu156 und f40 waren EBV-frei (rechter Teil).

#### 4.3.2 Mit peptidbeladenen B-Blasten konnten T-Zellen stimuliert und expandiert werden

Durch die Kultivierung mit CD40L-aktivierten B-Zellen konnten von beiden Spendern f39 und f40 T-Zellen über einen Zeitraum von über 85 Tagen stimuliert werden. Abbildung 4.3.3 zeigt die errechneten Zellzahlen während des Kultivierungszeitraums für die T-Zellkulturen beider Spender.



**Abbildung 4.3.3: Proliferation von T-Zellkulturen, stimuliert mit YML-Peptid-beladenen B-Blasten.** Frisch aufgearbeitete PBMCs der zwei *Buffy Coat*-Spender f39 und f40 wurden mit YML-Peptid-beladenen B-Blasten 85 Tage stimuliert. Die Zellzahl wurde bei jeder Stimulation bestimmt. Bis Tag 43 nahm die Zellzahl in den Kulturen beider Spender ab. Von diesem Zeitpunkt an vermehrten sich die Zellen wieder und erreichten ein Plateau (Spender f39) bzw. proliferierten so stark, dass die Anfangszellzahl überschritten wurde (Spender f40).

### 4.3.3 Tetramerpositive Zellen vermehrten sich in B-Blasten-stimulierten T-Zellkulturen

Trotz der hohen Spezifität und Selektivität der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Komplex aus Peptid und HLA-Molekül ist deren Affinität zu gering, um die stabile Bindung eines einzelnen solchen Komplexes an eine antigenspezifische T-Zelle und damit eventuell ihre Färbung und Detektion zu erreichen. Die Lösung dieses Problems wurde durch Oligomerisierung, also Erhöhung der Avidität erreicht. Ein tetrameres Aggregat aus biotinylierten HLA-Peptid-Komplexen, untereinander über die vier Koordinationsstellen des Streptavidins für Biotin verbunden, bindet selektiv und stabil an epitopspezifische T-Zellen und macht sie durch eine fluoreszierende Gruppe detektierbar und quantifizierbar (Altman et al., 1996). Solche „Tetramere“ sind heute das Standardwerkzeug für die direkte Visualisierung antigenspezifischer T-Zellen und käuflich zu erwerben.

Die peptidstimulierten T-Zellkulturen beider *Buffy Coat*-Spender wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur mit YML-Peptid-HLA-Tetrameren, die PE markiert waren, gefärbt. Nach der anschließenden Färbung mit FITC-markierten

Antikörpern gegen CD8 wurden die Zellen mittels FACS-Messung analysiert. In Abbildung 4.3.4 sind die FACS-Auswertungen der Färbungen mit YML-Tetramer zu verschiedenen Zeitpunkten der T-Zellkultur des Spenders f40 dargestellt. Abbildung 4.3.5 zeigt den Anteil der YML-tetramerpositiven Zellen an der Gesamtpopulation in den T-Zellkulturen der Spender f30 und f40 zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten. Die YML-positiven T-Zellen des Spenders f39 vermehrten sich um das 6000-fache, die des Spenders f40 um das 300.000-fache (siehe Tabelle 4.3.1).

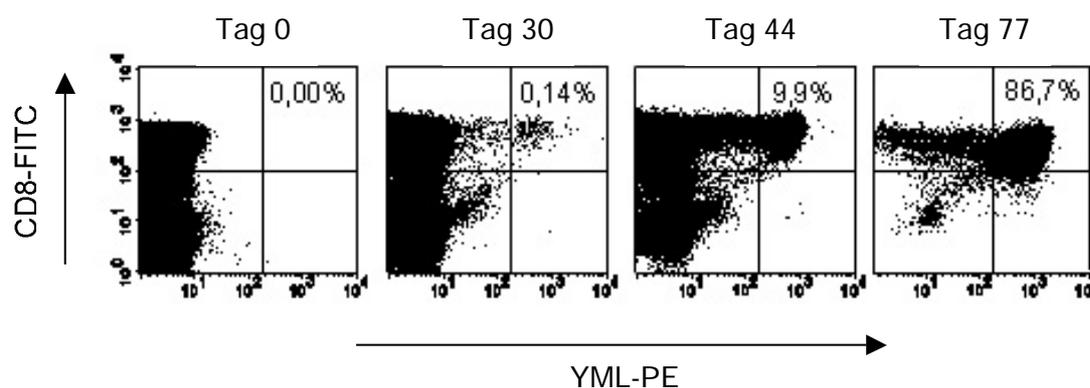


Abbildung 4.3.4: FACS-Analyse der YML-stimulierten T-Zellen des Spenders f40 zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur. Die Färbung mit YML-Tetramer zeigte eine Zunahme der YML-spezifischen T-Zellen im zeitlichen Verlauf von 0,00% an Tag 0 auf 86,7% an Tag 77.

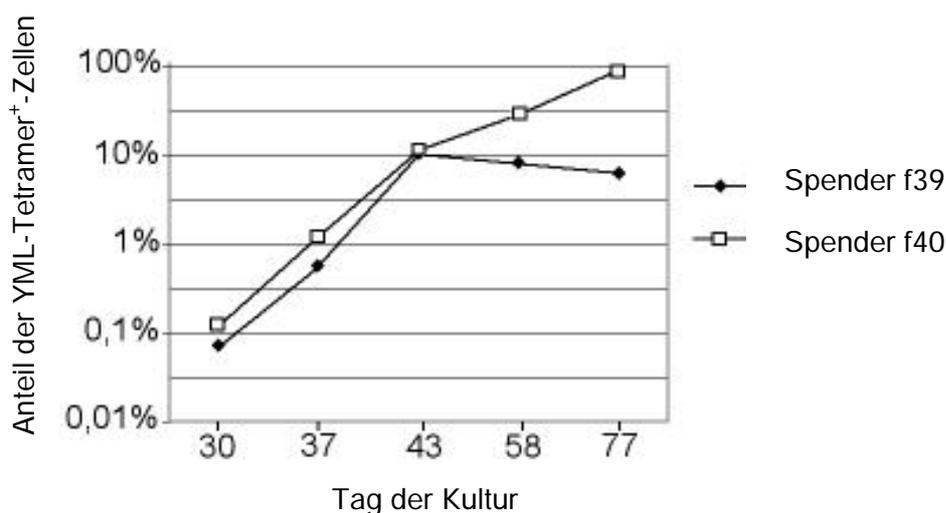


Abbildung 4.3.5: Anteil der YML-tetramerpositiven Zellen an der Gesamtpopulation in den T-Zellkulturen der Spender f30 und f40 zu verschiedenen Kultivierungszeitpunkten.

		Spender f39			
Zeitpunkt	Tag 0	Tag 30	Tag 43	Tag 77/78	
Anteil YML <sup>+</sup>	0/338000*	0,07%	10,0%	6,0%	
Zellzahl gesamt	100 Mio	38,4 Mio	11,8 Mio	21,7 Mio	
Vermehrung des Anteils YML <sup>+</sup>	-	>300x	>30.000x	>30.000x	
Vermehrung YML <sup>+</sup> absolut	-	>100x	>3000x	>6000x	

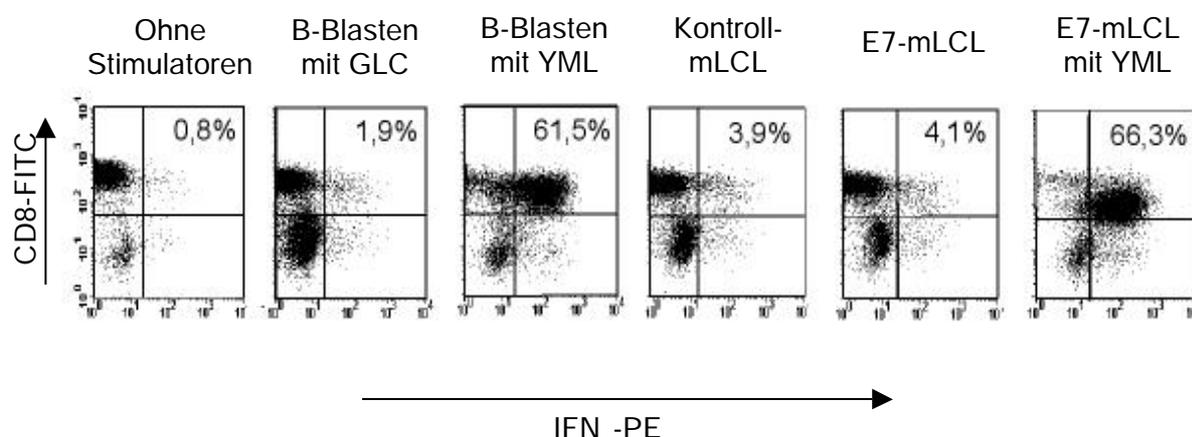
		Spender f40			
Zeitpunkt	Tag 0	Tag 30	Tag 43	Tag 77/78	
Anteil YML <sup>+</sup>	0/293000**	0,14%	9,9%	86,7%	
Zellzahl gesamt	200 Mio	66,7 Mio	21,1 Mio	273,0 Mio	
Vermehrung des Anteils YML <sup>+</sup>	-	>400x	>29.000x	>250.000x	
Vermehrung YML <sup>+</sup> absolut	-	>136x	>3000x	>300.000x	

Tabelle 4.3.1: Das Expansionsverhalten der YML-positiven T-Zellen der Spender f39 und f40 ( \* bei dem Betrag wird ein Anteil YML-positiver Zellen von < 1/338.000 bzw. \*\* ein Betrag von < 1/293.000 angenommen).

#### 4.3.4 YML-stimulierte T-Zellen reagierten auf YML-beladene Zielzellen mit spezifischer IFN- $\gamma$ -Sekretion

Die Reaktionsmuster der Peptid-stimulierten T-Zellen der Spender f39 und f40 wurden durch IFN- $\gamma$ -Sekretions-Analyse (Abschnitt 3.4.6.1.3) bestimmt. An Tag 56 wurden die T-Zellen auf spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion nach der 16-stündigen Kokultivierung mit verschiedenen Stimulatorzellen getestet. Stimulatorzellen waren hierbei B-Blasten beladen mit einem indifferenten immundominanten Peptidepitop von EBV (GLC-Peptid, aus dem lytischen Protein BMLF1), B-Blasten beladen mit YML-Peptid, E7-mLCLs beladen mit YML-Peptid und E7-mini-LCLs ohne Peptid. In Abbildung 4.3.6 ist für Spender f40 gezeigt, dass nur 1,9% reaktive T-Zellen nach

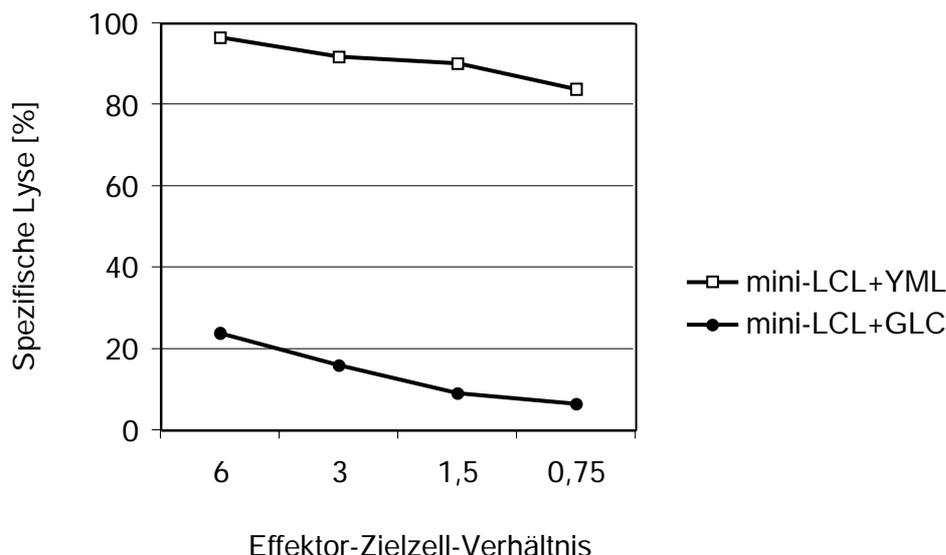
Stimulation mit GLC-Peptid regierten, dagegen 61,5% der T-Zellen auf Stimulation mit YML-Peptid. E7-mLCLs riefen, wie auch Kontroll-mLCLs, nur bei 4,1% IFN- $\gamma$ -Sekretion hervor. Wurden die E7-mLCLs mit YML-Peptid beladen, reagierten 66,3% der T-Zellen. Die YML-spezifischen T-Zellen reagierten demnach auf ihr Epitop nicht nur mit Proliferation, sondern auch mit IFN- $\gamma$ -Sekretion. Die Stimulationseffizienz durch E7-mini-LCLs scheint mit B-Blasten vergleichbar zu sein, allerdings reicht die Menge an exprimiertem E7-Protein offenbar für eine effiziente Prozessierung oder Präsentation des Epitops nicht aus.



**Abbildung 4.3.6: Epitopspezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion durch die YML-Peptid-stimulierten T-Zellen des Spenders f40.** Nach 16-stündiger Kokultivierung von T-Zellen mit verschiedenen Stimulatorzellen wurden die IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD8 und IFN- $\gamma$  gefärbt und der Anteil doppelt positiver Zellen an der Gesamtkultur im FACS bestimmt. Die T-Zellen erkannten alle mit YML-Peptid-beladenen Stimulatorzellen (B-Blasten mit YML-Peptid, E7-mLCLs mit YML-Peptid), sie reagierten aber weder in Abwesenheit von Stimulatoren, noch auf die Stimulation mit Zellen, die mit einem immundominanten EBV-Peptidepitop (B-Blasten mit GLC-Peptid) beladen wurden, noch auf E7-exprimierende mLCLs.

#### 4.3.5 YML-spezifische T-Zellen lysierten YML-beladene Zielzellen

Nachdem gezeigt war, dass YML-Peptid-stimulierte T-Zellen auf YML-Peptid-beladene Stimulatorzellen mit der Sekretion von IFN- $\gamma$  reagierten, war die nächste Frage, ob sie solche Stimulatorzellen auch lysieren. Daher wurde die Reaktion der T-Zellen auf Peptid-beladene Zielzellen in der Europium-Freisetzung untersucht. In Abbildung 4.3.7 ist zu sehen, dass fast 100% der YML-Peptid-beladenen Zielzellen spezifisch lysiert wurden.



**Abbildung 4.3.7: Spezifische Lyse von YML-beladenen Zielzellen.** Die Europium-Freisetzung zeigt, dass YML-Peptid-stimulierte T-Zellen des Spenders f40 YML-beladene Kontroll-mLCLs eines HLA-A2,-B8-kompatiblen Spenders lysierten, nicht aber Kontroll-mLCLs, die mit dem immundominanten EBV-Peptid GLC beladen waren.

#### 4.3.6 YML-stimulierte T-Zellen lysierten Zielzellen, die E7 endogen prozessieren

Ein häufig beobachtetes Phänomen bei peptidstimulierten T-Zellen ist die fehlende Erkennung von Peptiden aus endogen prozessierten Proteinen (Alexander-Miller et al., 1996). In der IFN- $\gamma$ -Sekretionsanalyse wurden E7-mLCLs nur erkannt, wenn sie exogen mit YML-Peptid beladen waren. Um dieses Verhalten gegenüber Peptiden, die von endogen prozessierten Proteinen stammen, genauer zu untersuchen, wurde die Reaktion der T-Zellen auf andere Zielzellen getestet, in denen E7 stärker exprimiert wird als in mini-LCLs. Dies ist erfahrungsgemäß bei Vaccinia-infizierten Zellen der Fall. Wie in Abbildung 4.3.8 dargestellt, wurden Kontroll-mLCLs eines HLA-A2, -B8-kompatiblen Spenders lysiert, wenn sie mit dem E6/E7-Vaccinia-konstrukt **SR16** infiziert waren. Nichtinfizierte und mit dem Kontroll-Virus infizierte Kontroll-mLCLs wurden nicht erkannt. Das zeigt, dass YML-Peptid-spezifische T-Zellen Zielzellen erkannten, die das Epitop nach endogener Prozessierung präsentierten.

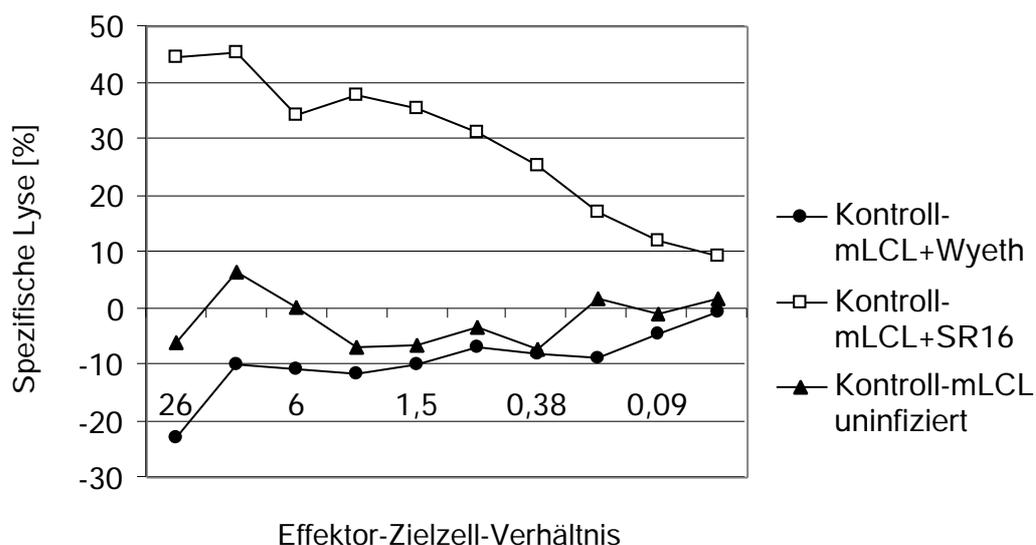
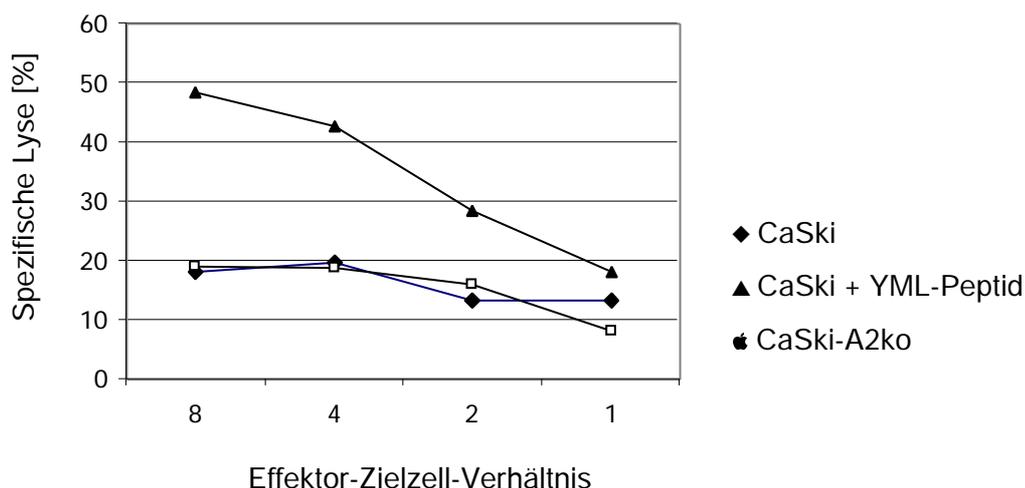


Abbildung 4.3.8: Die lytische Aktivität von YML-spezifischen T-Zellen gegen Zielzellen, die das E7-Protein endogen prozessierten. Die polyklonale T-Zelllinie des Spenders f40 an Tag 89 der Kultur zeigte in der Europium-Freisetzung eine starke spezifische Lyse von Vaccinia-*SR16*-infizierten Zielzellen, uninfizierte und Kontroll-Vaccinia (Wyeth) -infizierte Zielzellen wurden nicht lysiert.

#### 4.3.7 YML-stimulierte T-Zellen lysierten YML-beladene CaSki-Zellen

Die Erkennung von Tumorzellen ist die Voraussetzung für eine erfolgreiche adoptive T-Zelltherapie. Die Zervixkarzinomzelllinie CaSki ist HLA-A2- und HPV16-positiv und liefert damit geeignete Zielzellen für die Überprüfung der tumorspezifischen lytischen Aktivität der YML-Peptid-spezifischen T-Zellen. Wie Abbildung 4.3.9 zeigt, wurden CaSki-Zellen nur nach exogener Beladung mit YML-Peptid erkannt.



**HPV16-positive Tumorzelllinie CaSki.** Die polyklonale T-Zelllinie des Spenders f40 an Tag 58 der Kultur zeigte in der Europium-Freisetzung eine starke spezifische Lyse von YML-Peptid-beladenen Tumorzellen, CaSki-Zellen alleine wurden nicht lysiert.

### 4.3.8 Einzelzellklonierung der YML-spezifischen T-Zelllinien

Zur Überprüfung des T-Zellrepertoires in den polyklonalen T-Zellkulturen wurde eine Einzelzellklonierung mit T-Zellen von Tag 65 durchgeführt. Die YML-tetramergefärbten Zellen wurden durch magnetische Zellseparation angereichert. Die separierten Zellen wurden nach dem Protokoll in 3.4.5.4 kloniert. Die Zellverdünnung war 0,7 Zellen pro Gefäß einer 96-Loch-Platte in insgesamt 10 Platten pro Spender.

#### 4.3.8.1 Die magnetische Zellseparation der T-Zelllinien reicherte tetramerpositive Zellen effizient an

Um die Effizienz der Einzelzellklonierung zu verbessern, wurde eine Separation von YML-tetramerpositiven Zellen durchgeführt. Dazu wurden die polyklonalen T-Zelllinien beider Spender mit PE-gekoppelten YML-Tetrameren gefärbt. Anschließend wurden an magnetische Partikel gekoppelte Anti-PE-Antikörper dazugegeben. Über eine Säule, die sich im magnetischen Feld befand, ließen sich die YML-positiven von den YML-negativen Zellen trennen. Der Anteil der tetramernegativen Zellen konnte dadurch bei Spender f40 um das 20-fache, bei Spender f39 um das 10-fache vermindert werden. Die Anreicherung der YML-positiven Zellen fiel mit Faktor 4 (f40) bzw. 6 (f39) geringer aus, was an einer Population schwach tetramergefärbender Zellen lag (Abbildung 4.3.10). Diese Population ließ sich nicht klonieren, weshalb der Schluss naheliegt, dass es sich hier

um Zellfragmente oder ein mit dem Separationsverfahren verbundenes Artefakt handelte.

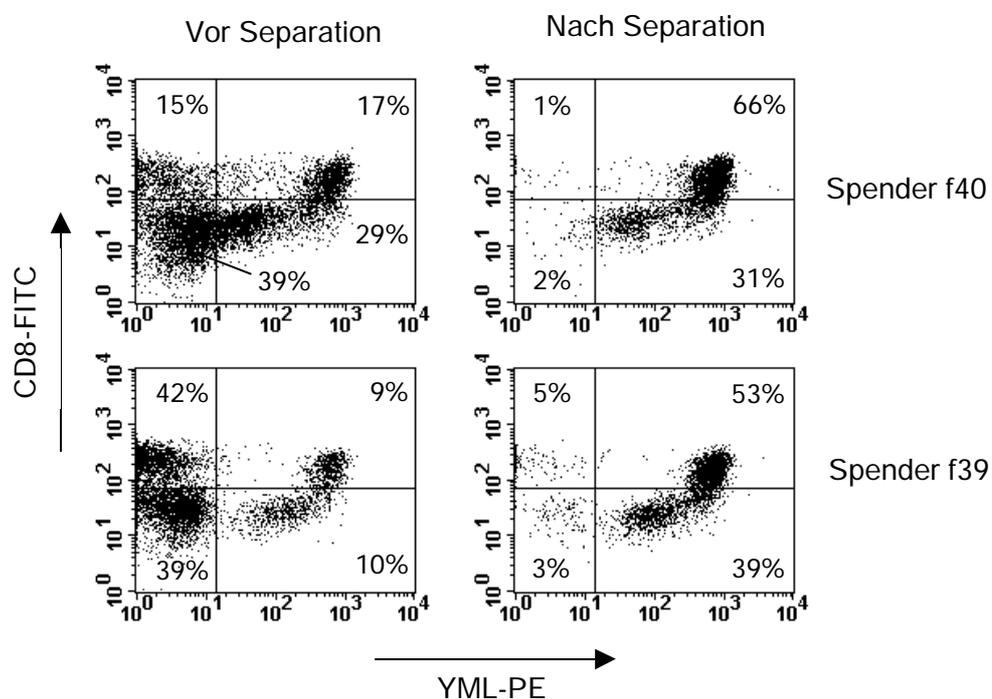


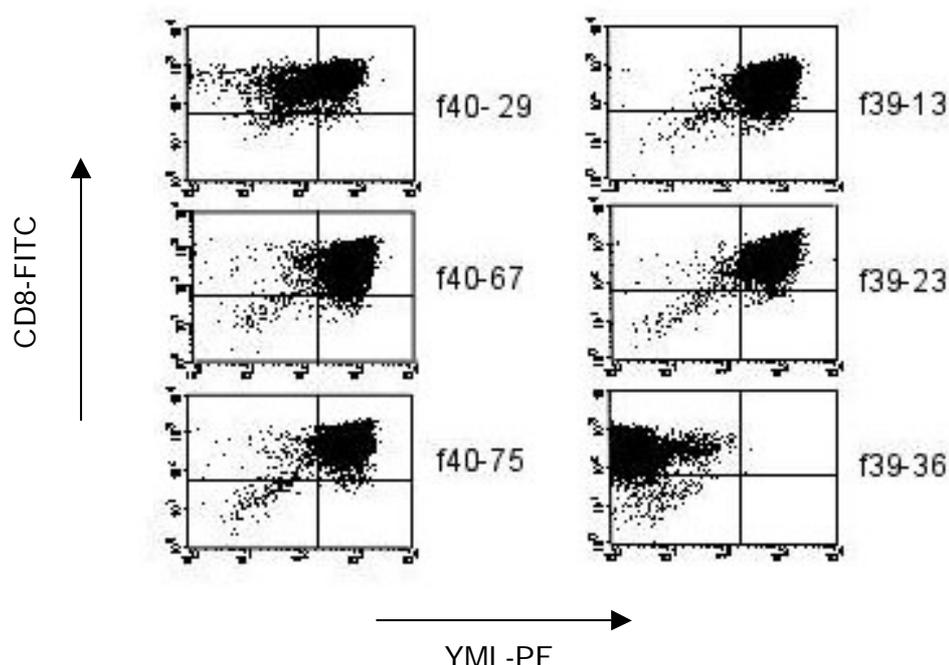
Abbildung 4.3.10: FACS-Analyse nach magnetischer Separation der YML-tetramerpositiven T-Zellen. Die Anteil der tetramer negativen Zellen konnte durch magnetische Separation YML-positiver Zellen von insgesamt 54% auf 3% (Spender f40) und von 81% auf 8% (Spender f40) gesenkt werden.

#### 4.3.8.2 Anzahl und Phänotyp der YML-spezifischen T-Zellklone

Aus der Einzelzellklonierung konnten insgesamt 29 Klone des Spenders f39 und 58 Klone des Spenders f40 aus je 10 Klonierungsplatten pro Spender etabliert werden. Mittels ELISA wurde getestet, welche der 87 Klone auf das YML-Peptid und nicht auf das CMV-Peptid GLC mit der Sekretion von IFN- reagierte. Nach der Auswertung konnten acht YML-Peptid-spezifische Klone des Spenders f39 und 24 YML-Peptid-spezifische Klone des Spenders f40 identifiziert werden. Bei der anschließenden FACS-Messung der Tetramer-PE- und CD8-FITC-markierten Klone wurde ersichtlich, dass alle Klone, die im ELISA gegen das YML-Peptid spezifisch reagierten, CD8- und tetramerpositiv waren, mit Ausnahme eines Klons, der CD8-positiv und tetramer negativ war. Dies zeigt, dass die polyklonalen Kulturen YML-Peptid-spezifische Zellen enthielten, die das Tetramer nicht binden konnten, sich aber durch das Peptid zur Proliferation und Zytokinsekretion stimulieren ließen. Möglicherweise

waren die Zellzahlen YML-Peptid-spezifischer Zellen in den polyklonalen Kulturen also höher als die Ergebnisse der FACS-Analysen mit tetramergefärbten Zellen erwarten ließen.

Abbildung 4.3.11 zeigt das Ergebnis der FACS-Analyse von je drei Klonen jedes Spenders, für f39 ist auch der tetramernegative Klon dargestellt. Auffällig ist, dass die Zellen des Klons f40-29 schwächer mit Tetramer färbten, was aber auf die hohe Zahl an Zellen, die in die Tetramerfärbung eingesetzt wurde, zurückgeführt werden konnte. Wiederholte Färbungen mit kleineren Zellzahlen oder mehr Tetramer lieferten das gleiche Färbemuster wie bei den restlichen tetramerpositiven Klonen.

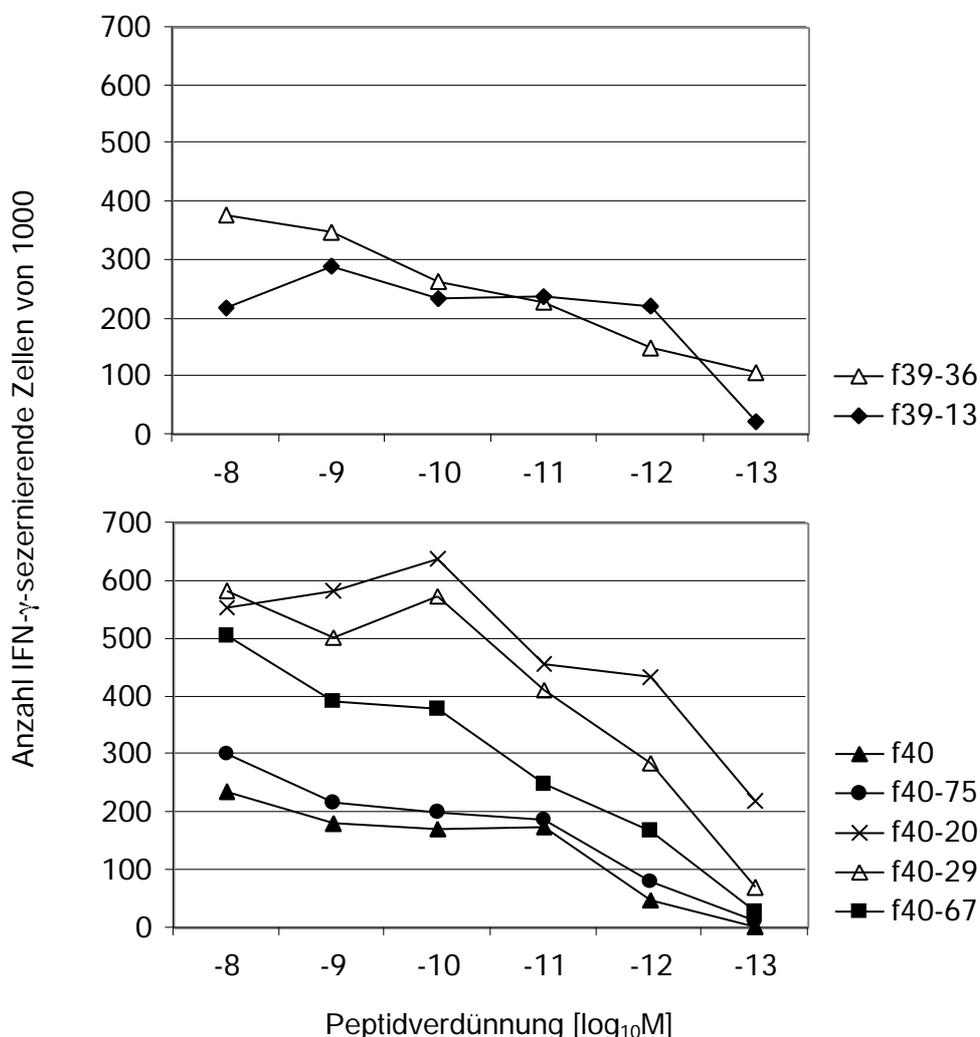


**Abbildung 4.3.11: FACS-Analyse der T-Zellklone der Spender f39 und f40.** T-Zellklone, die auf das YML-Peptid mit Interferon- $\gamma$ -Sekretion reagierten, waren CD8- und tetramerpositiv, mit Ausnahme des Klons f39-36. Dieser war CD8-positiv und tetramernegativ.

#### 4.3.8.3 Die T-Zellklone beider Spender zeigten eine hohe funktionelle Avidität

Methoden zur T-Zellrestimulation, die auf der Verwendung von Peptiden beruhen, führen häufig zur Expansion von Klonen mit niedriger Avidität (Alexander-Miller et al., 1996). Durch die Bestimmung der funktionellen Avidität einer T-Zelle wird die Menge

an TCR bestimmt, die für eine Aktivierung der T-Zelle stimuliert werden müssen. Im vorliegenden Fall wurde die Avidität der T-Zellklone mittels ELISpot-Analyse bestimmt. Die T-Zellen wurden mit Zielzellen kokultiviert, die mit absteigenden Peptidverdünnungen beladen worden waren. Anschließend wurde die Menge des in den Überstand abgegebenen IFN- bestimmt. Wie Abbildung 4.3.12 zeigt, reagierten die Klone bis zu einer Peptidkonzentration von  $10^{-10}$  bis  $10^{-11}$  M. Bis zu einer Verdünnung von  $10^{-12}$  M waren Reaktivitäten nachweisbar. Einige Klone reagierten auch noch bei einer Verdünnung von  $10^{-13}$  M, wobei der Klon f40-20 die stärkste Avidität aufwies.



**Abbildung 4.3.12: Bestimmung der Avidität der YML-spezifischen T Zellklone.** Kontroll-mLCLs wurden mit absteigenden Verdünnungen von YML-Peptid beladen und mit T-Zellen kokultiviert. Nach 12 Stunden wurde die Menge an IFN- im Überstand bestimmt. Die meisten T-Zellklone zeigten eine halbe maximale Reaktion bei einer Peptidkonzentration zwischen  $10^{-10}$  -  $10^{-12}$  M. Sie waren demnach hochavid.

#### 4.3.8.4 Die T-Zellklone lysierten Zielzellen, die E7-Protein endogen prozessierten

Es wurden 22 YML-tetramerpositive Klone von f39 und f40 auf Zytotoxizität getestet. Zur Analyse der Erkennung von endogen prozessiertem Peptid wurden Zielzellen verwendet, in denen durch einen Vacciniavirusvektor HPV16-E7 zur Expression gebracht wurde. Die Europium-Freisetzung in Abbildung 4.3.13 zeigt, dass die T-Zellklone beider Spender Zielzellen lysierten, wenn das E7-Protein über Vacciniavirus-Infektion in den Zielzellen zur Expression gebracht wurde. Zielzellen, die mit dem Kontrollvirus infiziert wurden, wurden nicht lysiert. Die Klone f40-29 und f40-75 reagierten besonders stark mit bis zu über 40% spezifischer Lyse. Der Klon f40-82 reagierte signifikant, aber mit bis knapp 30% schwächer. Die Klone des Spenders f39 zeigten allgemein eine schwächere spezifische Lyse von bis zu ca. 30%.

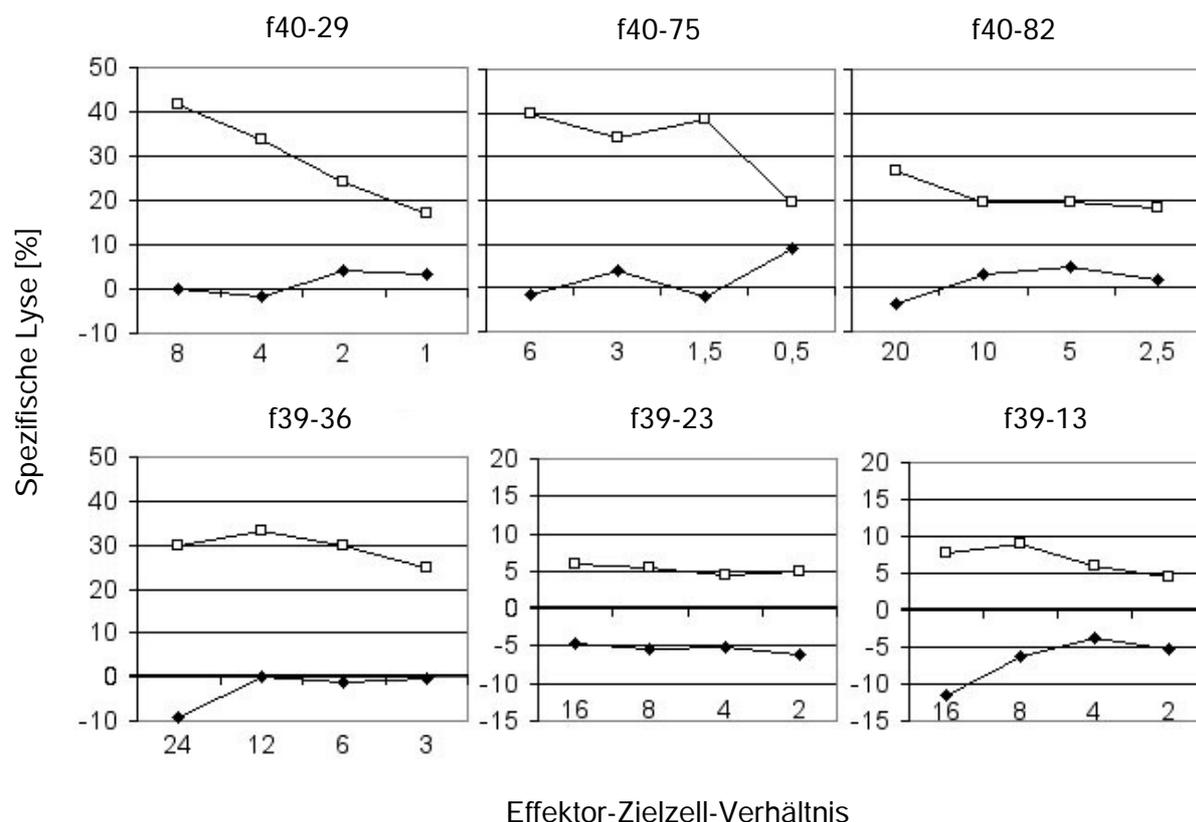


Abbildung 4.3.13: Spezifische Lyse von Vaccinia-infizierten Kontroll-mLCLs in der Europium-Freisetzung. Nur Zielzellen, die mit dem Konstrukt *SR16* (offene Quadrate) infiziert waren, also E7 exprimierten, wurden von den T-Zellklonen lysiert. *Wyeth*-infizierte Zellen (schwarze Rauten) blieben unerkannt.

#### 4.3.8.5 T-Zell-Rezeptor- (TCR-) Analyse der T-Zellklone des Spenders f40

Die klonale Komposition der T-Zellantwort gegen das YML-Epitop wurde untersucht, indem die Anzahl der YML-spezifischen T-Zellklone mit unterschiedlichen TCR bestimmt wurde. Dazu wurde die Sequenz der TCRV -Kette identifiziert. Für die TCRV -Bezeichnung gibt es zwei verschiedene Nomenklaturen. Die ältere Methode richtet sich nach der Reihenfolge der Entdeckung der einzelnen Gensegmente (Wei et al., 1994), eine neuere nach der Anordnung der Segmente auf dem Genloкус (Lefranc und Lefranc, 2001). Die Angaben in dieser Arbeit richten sich nach der bisher häufiger verwendeten Nomenklatur nach Wei et al., in Klammern ist aber auch die neuere angegeben.

Durch DNA-PCR und anschließende Sequenzierung des Fragments wurde die TCR V -Sequenz der Klone des Spenders f40 ermittelt. Von Spender f40 wurden für sieben spezifisch reaktive Klone die TCR-Sequenzen analysiert (f40-20, -29, -40, -46, -67, -75, -82). Die PCR-Amplifikation ergab für alle Klone ein Fragment von ca. 270 bp. Die Sequenzierung zeigte eine Kombination der Gensegmente TRBV5-2\*01 (nach Lefranc et al.: TRBV5-6\*01), TRBD1-\*01 und TRBJ1-5\*01. Zwischen TRBV und TRBD sind 3 N-Nukleotide (^), zwischen TRBD und TRBJ sind 9 N-Nukleotide eingefügt. Für alle Klone des Spenders f40 ergab sich die gleiche TCR-Sequenz. Das spricht dafür, dass alle YML-tetramerpositiven T-Zellklone des Spenders f40 wahrscheinlich auf eine Population von T-Zellen des gleichen Klons *in vivo* zurückgehen. Die TCR dieser Klone hatten im hypervariablen Bereich folgende Sequenz:

S	A	L	Y	L	C	A	S	S	S	G	Q	E	H	S	N	Q	P	Q	H
CG	GCC	CTC	TAT	CTC	TGT	GCC	AGC	AGC	TCG	<b>GGA</b>	<b>CAG</b>	GAA	CAC	TCA	AAT	CAG	CCC	CAG	CAT
									^ ^ ^				^ ^ ^	^ ^ ^					
TRBV5-2*01									TRBD1*01			TRBJ1-5*01							

## 5 Diskussion

Die effiziente Antigenpräsentation durch professionelle APC ist eine Grundvoraussetzung für die zellvermittelte Immunität *in vivo* und *in vitro*. Bisher wurden für die Expansion virusspezifischer und tumorspezifischer T-Zellen vor allem reife, immunologisch kompetente dendritische Zellen (DC) als APC verwendet. Sie sind sehr effizient in der Stimulation von spezifischen T-Zellen, und lange Zeit waren sie die einzig bekannten APC, die zur primären Aktivierung naiver T-Zellen fähig sind. Methoden wie direktes Beladen mit Antigen (Peptiden, Proteinen oder Zelllysaten) oder Gentransfer (virale Vektoren, Elektroporation, Lipofektion, RNA-Transfektion) erwiesen sich als erfolgreich, um DC effektiv als APC einzusetzen. Allerdings liegen DC in den meisten Geweben und im Blut in einem unreifen Status vor. Daher müssen reife DC über aufwändige Methoden *in vitro* hergestellt werden: Bei der gängigsten Produktion aus peripheren Blut-Monozyten erfolgt die Differenzierungsphase zu unreifen DC durch Kultivierung mit GM-CSF und IL-4, und die anschließende Reifung mittels Tumornekrosefaktor- (TNF- $\alpha$ ), LPS oder CD40L (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Ardavin et al., 2001). Da sie aber als reife DC (sog. *MoDC*, für „*monocyte-derived DC*“) *in vitro* nicht proliferieren und nicht länger als drei Tage überleben, sind durch den technischen Aufwand und die Kosten ihrer Herstellung ihrer Verwendung als APC in immuntherapeutischen Ansätzen Grenzen gesetzt.

Aktiviert B-Zellen sind ebenfalls sehr potente APC. Ruhende B-Zellen sind in großer Menge aus dem peripheren Blut isolierbar und können auf zwei einfache Weisen aktiviert werden: Entweder durch Infektion mit (mini-)EBV-Partikeln (Delecluse et al., 1999; Moosmann et al., 2002), oder über die Stimulierung von CD40 mit Antikörpern (Banchereau und Rousset, 1991) oder CD40L (Garrone et al., 1995). Beide Methoden führen zu APC, die effizient für die Stimulation von T-Zellen eingesetzt werden können. In dieser Arbeit wurden B-Zellen auf beide Weisen aktiviert und ihre Potenz für die Stimulation von T-Zellen seltener Spezifitäten gezeigt.

Das Interesse an Protokollen für die effiziente Stimulation HPV-spezifischer T-Zellen ist groß. Das Zervixkarzinom ist zu 99,7% HPV-assoziiert (Walboomers et al., 1999) und die zweithäufigste Krebsart bei Frauen weltweit (Boyle, 1997). Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereiches (HNSCC) ist zu ca. 30% HPV-assoziiert (Klussmann et al., 2001a) und der fünft-häufigste Tumortyp weltweit. Die therapeutischen Möglichkeiten, die zur Behandlung von Patienten mit Zervixkarzinomen oder Kopf-Hals-Karzinomen zur Verfügung stehen, sind begrenzt. Beide Krebsarten haben eine äußerst schlechte Prognose, daher werden alternative Therapien dringend benötigt. Die adoptive T-Zelltherapie erweckt große Hoffnungen, da HPV-spezifische T-Zellen aus PBMCs von Gesunden und Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren *ex vivo* detektiert werden können, auch wenn das nur mit sehr feinen Nachweismethoden wie dem ELISpot (Todd et al., 2004; van der Burg et al., 2001) gelingt. Bei ca. 40% der Gesunden und ca. 30% der Patienten mit intraepithelialer Neoplasie oder Zervixkarzinom sind HPV-spezifische T-Zellen nachweisbar (van der Burg et al., 2002). Mittels Tetramerfärbung wurden 0,002-0,079% der Lymphozyten *ex vivo* als spezifisch für das HLA-Klasse-I-restringierte E7-Epitop YML von HPV16 eingestuft (Youde et al., 2000). Auch Nilges et al. meinen, YML-spezifische T-Zellen mittels Tetramerfärbung *ex vivo* detektiert zu haben (Nilges et al., 2003). Bei der kritischen Betrachtung der Färbungen sowohl von Youde et al. als auch von Nilges et al. bleibt es allerdings fraglich, ob die angegebenen Werte angesichts der zu knapp gelegten Populationsgrenzen dem Prozentsatz YML-spezifischer Zellen *in vivo* wirklich entsprechen. In beiden Fällen handelt es sich keinesfalls um klar von den tetramernegativen Zellen abgrenzbare Populationen. In der vorliegenden Arbeit konnten mit dem YML-Tetramer *ex vivo* keine YML-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings detektieren Tetramere nur T-Zellen einer bestimmten Epitopspezifität und machen daher keine Aussage über die Gesamtzahl HPV-spezifischer T-Zellen. Wieviele es also durchschnittlich in Gesunden oder Patienten mit HPV-Tumoren gibt, bleibt offen.

HPV-Infektionen rufen, im Gegensatz zu CMV und EBV, nur eine schwache Immunantwort hervor. Für einzelne Epitope von CMV und EBV können je bis zu 5% T-Gedächtniszellen im peripheren Blut Seropositiver gefunden werden (Gillespie et al., 2000; Tan et al., 1999). Solche Zahlen sind erst mittels der verfeinerten Nachweismethoden wie ELISpot und Tetramerfärbungen verfügbar. Rückblickend erklären diese großen Anteile spezifischer T-Zellen im Blut aber die vielen

erfolgreichen Expansionen von T-Zellen solcher Spezifitäten (Moosmann et al., 2002). Anders ist die Situation für HPV. Hier liegt der Anteil spezifischer T-Zellen im Blut trotz der verfeinerten Nachweismethoden auch bei bereits HPV-Infizierten meist höchstens knapp über der Nachweisgrenze. Es ist aber möglich, HPV-spezifische T-Zellen sowohl aus Patienten, als auch aus Gesunden zu Zellzahlen zu expandieren, die eine genauere Analyse der Zellen ermöglicht (Santin et al., 1999; Schreurs et al., 2003). Am häufigsten sind T-Zellstimulationen mit rekombinanten Proteinen, mit Peptid-Epitopen, oder mit rekombinanten Adenoviren, die E6 und E7 exprimieren, durchgeführt worden. Die Erfolge sind je nach Studie unterschiedlich. Einige Studien sind erfolgreicher bei der Restimulation von T-Zellen Gesunder (Luxton et al., 1997; Nakagawa et al., 2000), andere bei der von Patienten-T-Zellen (Bontkes et al., 2000; Nimako et al., 1997). Allerdings wird die Aussagekraft der Ergebnisse dieser und ähnlicher Studien aufgrund der oft wenig stringenten Kriterien, die eine HPV-spezifische Reaktivität definierten, teilweise sehr kritisch betrachtet (van der Burg et al., 2002). Aus den bereits zitierten und den vielen anderen Arbeiten auf diesem Gebiet (de Gruijl et al., 1998; Santin et al., 1999; Schoell et al., 1999; Welters et al., 2003) lässt sich aber zusammenfassen, dass HPV-Infektionen häufig zu einer spezifischen Immunität *in vivo* führen, und HPV-spezifische T-Zellen *in vitro* expandiert werden können. Die Herstellung HPV-spezifischer T-Zellen mündete bis heute nur einmal in eine adoptive Therapie: Einer Patientin mit HPV18-positivem Zervixkarzinom wurden HPV18-E7-spezifische T-Zellen verabreicht. Dabei zeigte sich, dass die adoptiven T-Zellen im Körper persistierten und in der Lunge akkumulierten, wo sich eine Vielzahl an Metastasen gebildet hatte (Santin et al., 2000). Allerdings ist nichts darüber bekannt, ob die T-Zellen gegen die Tumorzellen reagierten. In diesem Fall wurden dendritische Zellen zur Expansion der spezifischen T-Zellen verwendet. Der hohe technische und finanzielle Aufwand, der zur Herstellung von ausreichenden Mengen DC nötig ist, ist wahrscheinlich der Grund, dass bis heute keine weiteren Therapieversuche unternommen wurden.

Mini-LCLs und B-Blasten sind neuartige APC, deren Herstellung einfach ist, und die viele Monate in Kultur proliferieren, so dass ausreichende Zellzahlen für viele T-Zellrestimulationsrunden verfügbar sind. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass es mittels aktivierter B-Zellen möglich ist, HPV-spezifische T-Zellen *ex vivo* zu expandieren.

## 5.1 Einsatz von mini-LCLs für die Stimulation seltener T-Zellen

In dieser Arbeit wurden in mini-LCLs zwei Fremdgene von HPV16 eingebracht, um APC für die Stimulation HPV16-spezifischer T-Zellen herzustellen.

Die Expression der Gene E6 und E7 in mini-LCLs konnte durch den Nachweis von E6- und E7-mRNA erbracht werden. E6-mLCLs transkribieren ihr Fremdgen hauptsächlich in der Spleißform E6\*I, Vollängentranskripte sind kaum nachzuweisen (Abbildung 4.2.4). In Zervixbiopsien und Zervixkarzinomzelllinien überwiegen ebenfalls die E6\*I-Transkripte (Hsu et al., 1993). Das Vollängentranskript wie auch die zweite Spleißform E6\*II wird in mini-LCLs nicht in klar detektierbarer Menge gebildet, beide Transkripte sind auch in HPV-positiven Zellen allgemein nur selten und in nur geringen Mengen nachweisbar. Die Funktion der beiden Spleißvarianten ist nicht bekannt, es wird vermutet, dass sie eine Rolle in der Entstehung von Zervixkarzinomen spielen (Cho et al., 2002; Sherman et al., 1992). Da das Muster der E6- und E7-Transkripte der Situation in HPV16-positiven Tumorzellen entspricht, sollte das Fehlen der Vollängentranskripte kein Nachteil für die Verwendung der mini-LCLs als APC sein.

Allgemein scheint der direkte Nachweis von E6 und E7 auf Proteinebene schwierig zu sein, da die Proteine nur schwach exprimiert werden: Viele Gruppen zeigen ausschließlich Ergebnisse auf mRNA-Basis (Cho et al., 2002; Hsu et al., 1993). Manchen gelingt ein direkter Nachweis von E7 auf Proteinebene gar nicht (Chiriva-Internati et al., 2002), andere detektieren E6 und E7 nur indirekt nach Fusion mit Peptid epitopen (z.B. HA-Tag) für den Nachweis mit epitopspezifischen Antikörpern (Guccione et al., 2002; Sherman et al., 2002). Nur wenigen Gruppen gelingt ein direkter Nachweis der Proteine nach Transfektion von Expressionsplasmiden in Säugerzellen (Gunn et al., 2001; Zwerschke et al., 1999). Wenn die Detektion von HPV16-E7-Protein in CaSki-Zellen gelingt, dann auch nach Signalverstärkung durch Peroxidase-konjugierte Zweitantikörper nur mit schwachen Signalen (Choo et al., 2000; Lee et al., 2002). Ein Grund dafür, dass ein Nachweis der mRNA von E6 und E7 einfach gelingt, der Nachweis auf Proteinebene aber zu Problemen führt, liegt wohl zum Großteil an der Codon-Verwendung von HPV16. Sie weicht von der humaner Zellen stark ab und führt daher zu einer schwachen Translationseffizienz

viraler mRNAs: Für die Translation der viralen Codons werden tRNA-Moleküle gebraucht, die für die Translation humaner Gene unüblich sind und daher nur in geringer Menge von der Zelle zur Verfügung gestellt werden. Die virale Proteinexpression ist daher auf der Ebene der Translation limitiert. Möglicherweise liegt diesem Phänomen ein Selektionsdruck zugrunde, nach dem das Virus durch niedrige Proteinexpression leichter der Erkennung durch das Immunsystem entgeht (Cid-Arregui et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte die Expression sowohl von E6 als auch von E7 in mini-LCLs über Immunzytochemie-Färbungen mit monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden (Abbildung 4.2.5). Die Färbung musste spezifisch optimiert werden, bevor eine deutliche Detektion erzielt werden konnte. Essentiell dabei war unter anderem die sofortige Fixierung der Zellen direkt nach der Entnahme aus der Kultur. Zumindest E7 ist bekanntermaßen ein Protein mit kurzer Halbwertszeit (Reinstein et al., 2000). Möglicherweise konnte die schnelle Fixierung den rapiden Abbau der Proteine über das Proteasom verhindern. Die genaue Lokalisation von E6 und E7 in mini-LCLs konnte anhand dieser Färbungen nicht festgestellt werden, da es sich nicht um eine Fluoreszenzfärbung handelt und somit keine konfokale Lasermikroskopie, die eine schichtweise Dokumentation ermöglichte, verwendet werden konnte. Es gibt bisher einige Arbeiten, die der Frage der Lokalisation von E6 und E7 in der Zelle nachgehen: E7 scheint mit der nuklearen Matrix assoziiert zu sein (Greenfield et al., 1991), wird aber auch im Zytoplasma gefunden. Die Färbung von Fusionsproteinen aus E6 und einem HA-Tag zeigte für das E6-Fusionsprotein eine Färbung in Nukleus und Zytoplasma (Smotkin und Wettstein, 1987). Die Lokalisation von E6 und E7 sollte aber für die Eignung der mini-LCLs als APC keine Rolle spielen.

Damit die Stimulation von T-Zellen mit E6- und E7-mini-LCLs erfolgreich sein kann, müssen die antigenpräsentierenden Eigenschaften der Zellen trotz der Expression von funktionellem E6 und E7 erhalten bleiben. Die Proteine E6 und E7 haben eine Vielzahl zellulärer Bindungspartner und greifen in verschiedene Signalwege der Wirtszelle ein, wodurch die Regulation von Zellzyklus, Apoptose, Mitose u. a. gestört wird (zur Hausen, 2000). Es werden immer neue direkte und indirekte Zielproteine gefunden, und die weitreichenden Wirkungen der Interaktionen von E6 und E7 mit zellulären Partnern sind bis heute Gegenstand intensiver Forschung (Hershko und Ginsberg, 2004; Lu et al., 2004). Es ist bekannt, dass auch in Zervixkarzinomzellen

Mechanismen existieren, die dazu führen, dass sie der Erkennung durch das Immunsystem entgehen („*immune escape*“) (Connor und Stern, 1990; Street et al., 1997; Tindle, 2002). In Zervixkarzinomen wird häufig eine veränderte Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen bis hin zum kompletten Verlust beobachtet (Connor und Stern, 1990; Keating et al., 1995). Bis heute ist nicht geklärt, welche Mechanismen diesem Verlust zugrunde liegen. Um auszuschließen, dass durch die Expression von E6 und E7 die antigenpräsentierenden Eigenschaften von mini-LCLs verändert werden, wurde die Expression von Oberflächenmolekülen überprüft, die für die Interaktion mit T-Zellen wichtig sind. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, dass die Expression von MHC Klasse I und II, B7.1 und 2, LFA-1 und -3, sowie von ICAM-1 mit der auf Standard-LCLs vergleichbar war (Abbildung 4.2.6). E6- und E7-mini-LCLs sollten sich demnach ebenso gut als Antigenpräsentatoren eignen wie Standard-LCLs. In Zytotoxizitätsanalysen wurde die effiziente Präsentation von Epitopen anhand der hohen EBV-spezifischen Lysen von E7-mini-LCLs bestätigt (Abbildung 4.2.10 und 4.2.11).

Für den HPV16-positiven Tumorpatienten Tu156 konnte die Spezifität der E7-mini-LCL-stimulierten T-Zellen gegenüber E7-exprimierenden mini-LCLs durch spezifische IFN- $\gamma$ -Sekretion und durch zwei verschiedene Arten von Lyse-Experimenten gezeigt werden (Abbildung 4.2.10 und 4.2.11). Durch die Verwendung Vaccinia-infizierter EBV-freier B-Blasten standen E7-exprimierende Zielzellen zur Verfügung, mithilfe derer die lytischen Aktivitäten von HPV-spezifischen T-Zellen getrennt von den Aktivitäten der EBV-spezifischen T-Zellen analysiert werden konnten (Abbildung 4.2.10). Um die Spezifität gegen das Protein E7 noch eindeutiger darzustellen, wäre die Färbung der T-Zellen mit E7-epitopspezifischen HLA-Molekül-Tetrameren oder die Verwendung peptidepitop-beladener Zielzellen in Lyse- oder Zytokin-Sekretionsexperimenten sinnvoll. Leider sind aber bis heute für den HLA-Typ dieses Spenders (A29 A31 B44 B51 Cw15 Cw16) keine E7-Epitope bekannt. Um dennoch die T-Zellen genauer untersuchen zu können, die beobachteten Effekte verstärkt sichtbar zu machen, und möglicherweise Epitope in E7 für diesen seltenen HLA-Typ zu finden, wurde eine Einzelzellklonierung durchgeführt. Es konnten dabei nicht-reaktive und EBV-spezifisch reaktive Klone, sowie ein E7-mini-LCL-spezifischer Klon etabliert werden (Abbildung 4.2.13). Der E7-mini-LCL-spezifische T-Zellklon ist CD4-positiv und lytisch aktiv (Abbildung 4.2.13). Es ist bereits beschrieben, dass CD4-positiv T-Zellen autologe Zervixkarzinomzellen lysieren können (Pilch et al., 2002).

Der nächste Schritt wird sein, diesen Klon auf seine Spezifität gegen Zielzellen, die mit rekombinantem E7-Protein exogen beladen wurden, zu prüfen. Nach Endozytose und Prozessierung des E7-Proteins findet die Präsentation von E7-Peptiden auf HLA-Klasse-II-Molekülen statt. Diese Zielzellen sollten von dem Klon erkannt und in dem vorliegenden Fall auch lysiert werden.

Um noch genauer zu klären, auf welche Zielstrukturen die beobachteten lytischen Aktivitäten der polyklonalen Linie zurückgehen, wäre es interessant, weitere E7-mini-LCL-spezifische Klone herzustellen und zu charakterisieren. Weiterhin sollten die T-Zellen anderer Spender nach Stimulation mit mini-LCLs untersucht werden, um die Reaktivitäten vergleichen zu können. Es werden sich nach den Klonierungen mehrerer Spender-T-Zelllinien TCR-Sequenzvergleiche anstellen lassen, die einen Eindruck über die Diversität des E7-mini-LCL- bzw. E7-Protein-spezifischen T-Zellrepertoires vermitteln könnten. Bisher gelang eine detektierbare Expansion E7-mini-LCL-spezifischer T-Zellen allerdings nur aus einem von sechs HPV16-positiven Karzinompatienten und keinem der drei Normalspender mit unbekanntem HPV16-Status. Möglicherweise verfügte der Patient Tu156 im Vergleich zu den anderen Spendern über ein besonders stark ausgeprägtes T-Zellgedächtnis gegen HPV16. Da von den Tumorpatienten nur geringe Mengen Blut (bis 25 ml) zur Verfügung standen, wurde für alle Spender die Stimulation mit nur zwei bis vier Mio PBMCs an Tag 0 begonnen. Da HPV ein nur schwaches Immungedächtnis hervorruft, also nur sehr wenige HPV-spezifische T-Zellen im Blut sind, könnte die Stimulation mit größeren Mengen PBMCs zu einem größeren Erfolg bei der Restimulation von HPV-spezifischen Zellen verschiedener Spender führen.

Um eine effektivere T-Zellstimulation zu ermöglichen, könnte auch die Expression der Fremdantigene in mini-LCLs durch den Einbau eines anderen Promotors verstärkt werden. Allerdings gilt der verwendete CMV-Promotor für B-Zellen als effektiv und es wird schwierig sein, einen besseren Promotor für die Genexpression in B-Zellen zu finden. Ob eine stärkere Expression dieser HPV-Proteine in funktioneller Form in humanen Zellen überhaupt möglich ist, ist zweifelhaft. Da beide Onkoproteine über Wechselwirkungen mit mehreren zellulären Bindungspartnern extensiv in verschiedene Signalwege der Zelle eingreifen, scheinen die Proteine bei zu hoher Expression für die Zellen toxisch zu sein: Mit einem synthetischen E7-Protein, das ausschließlich von Codons translatiert wird, die von humanen Zellen

bevorzugt verwendet werden, wurde eine Überexpression von E7 erreicht (Cid-Arregui et al., 2003). Die transient transfizierten Zellen zeigten eine 20- bis 100-fach höhere Expression des Proteins, begleitet von einer stark verminderten Viabilität der Zellen. Vielversprechender ist daher die Verwendung von veränderten E6- und E7-Gensequenzen, die funktionslose Proteine codieren. Dies kann durch Punktmutationen in funktionellen Domänen, oder durch sog. „*shuffling*“, also dem Zerlegen von Gensequenzen und ihrem Zusammenfügen in veränderter Reihenfolge unter Erhalt aller immunrelevanten Bereiche, erreicht werden (Osen et al., 2001). Dadurch könnte eine stärkere Expression der Proteine in mini-LCLs und damit eine effizientere Stimulation epitopspezifischer T-Zellen möglich sein.

## 5.2 Aktivierte B-Zellen expandieren T-Zellen seltener Spezifität

Es ist bekannt, dass CD40L-aktivierte B-Zellen (B-Blasten) antigenpräsentierende Eigenschaften haben, die mit denen von dendritischen Zellen vergleichbar sind (von Bergwelt-Baildon et al., 2002). B-Blasten sind aber sehr viel einfacher und in großer Zahl aus geringsten Mengen Blut herzustellen, und sie proliferieren *in vitro* (Schultze et al., 1997). Um die Fähigkeit von B-Blasten in der T-Zellstimulation zu zeigen, wurden sie bereits in verschiedenen Arbeiten mit Peptid (Schultze et al., 1997) oder Tumorzelllysat (Lapointe et al., 2003) beladen, oder retroviral (Kondo et al., 2002) oder mit RNA transfiziert (Coughlin et al., 2004). Inzwischen gibt es Hinweise, dass B-Blasten nicht nur T-Gedächtnis-Zellen sondern auch naive CD8- sowie CD4-positive Zellen aktivieren können (von Bergwelt-Baildon et al., 2004; von Bergwelt-Baildon et al., 2002).

Bisher wurde der EBV-Status in den verwendeten B-Blastenlinien kaum berücksichtigt. Für die Stimulation von T-Zellen seltener Spezifitäten wie z.B. HPV16-E7 bringt aber die gleichzeitige Stimulation von EBV-spezifischen T-Zellen, die im peripheren Blut sehr häufig sind, Probleme beim Nachweis und der genauen Charakterisierung der Zellen mit sich. In den zitierten Arbeiten wurde zur Herstellung der B-Blasten mit mindestens zwei Mio PBMCs an Tag 0 begonnen, es waren bei erfahrungsgemäß 3-10% B-Zellen also etwa 0,2 Mio B-Zellen in der Kultur. Davon sind bei EBV-seropositiven Gesunden bis zu 10 Zellen mit EBV infiziert, die im Laufe

der Kultivierung Viren freisetzen, die dann andere B-Zellen der Kultur infizieren. Das Resultat nach wenigen Wochen ist eine B-Blastenkultur, die zu ca. 80% aus EBV-positiven aktivierten B-Zellen besteht (Schultze et al., 1997). In unserem Labor ist es inzwischen erstmals möglich, proliferierende B-Blasten über viele Monate hinweg EBV-frei in Kultur zu halten. Dafür wurde eine Anfangszellzahl bei der Etablierung der B-Blastenlinien zwischen 25.000 und höchstens 200.000 PBMCs pro Kultur gewählt. Dies entspricht ca. 0,04 bis 0,7 EBV-positiven B-Zellen pro Ansatz. Aus den B-Zellen dieser Kulturen konnte auch nach mehreren Monaten andauernder Kultivierung keine EBV-DNA nachgewiesen werden (Abbildung 4.2.15). Diese EBV-freien B-Blasten sollten ein hohes Potential besitzen, T-Zellen mit der seltenen Spezifität gegen das bisher am besten untersuchte HLA-A2-restringierte Epitop von HPV16 („YML“, Abbildung 4.2.14) zu stimulieren.

Bei der Arbeit mit Normalspendern und besonders mit Tumorpatienten besteht eine Limitation an PBMCs, da selten die Bereitschaft für Blutabnahmen über 100 ml vorhanden ist. Durch die Verwendung von *Buffy Coats* (Leukozytenkonzentraten aus 500 ml Blut anonymer Spender) konnte diese Limitation an PBMCs umgangen werden. Die PBMCs der zwei *Buffy Coat*-Spender f39 und f40 wurden drei Wochen mit YML-Peptid und anschließend mit YML-Peptid-beladenen B-Blasten stimuliert. Die phänotypische Analyse der Zellen ergab eine 6000- bzw. 300.000-fache Zunahme YML-tetramerpositiver Zellen im Zeitraum von 77 Tagen (Abbildung 4.3.3). Die T-Zellen zeigten eine spezifische Lyse YML-Peptid-beladener Zielzellen (Abbildung 4.3.4 und 4.3.5), sowie Vaccinia-infizierter Zielzellen, die nach endogener Prozessierung von E7 das YML-Epitop auf der Oberfläche präsentierten (Abbildung 4.3.6). Beobachtungen, nach denen die Expansion YML-Peptid-spezifischer T-Zellen nicht aus Gesunden sondern nur aus Patienten möglich ist (Evans et al., 1997; Rensing et al., 1996; Youde et al., 2000), oder gar nicht gelingt (Jochmus et al., 1997), sind demnach durch Schreurs et al. (Schreurs et al., 2003) und durch die vorliegende Arbeit widerlegt. Keines der bisher veröffentlichten Studienergebnisse zeigt eine annähernd vergleichbare Expansion von HPV-spezifischen T-Zellen durch antigenspezifische Stimulation. Die neuartige Stimulationsmethode mit peptid-beladenen EBV-freien B-Blasten erwies sich demnach als besonders leistungsfähig, um T-Zellen seltener Spezifität aus Gesunden zu expandieren.

Die Frage, ob es sich ursprünglich um eine primäre Aktivierung naiver YML-spezifischer T-Zellen, oder um eine Restimulation von T-Gedächtniszellen handelte, ist schwierig zu beantworten. Für eine Restimulation von Gedächtniszellen könnte zwar sprechen, dass hauptsächlich hochaffine T-Zellklone aus den Linien etabliert wurden, was auf eine *in vivo*-Selektion von leistungsfähigen T-Zellen nach der primären Infektion hindeuten würde. Allerdings war eine Selektion YML-tetramerpositiver Zellen der Klonierung vorgeschaltet, und diese führt präferenziell zur Anreicherung hochavidere Zellen. Trotzdem: Viele Menschen verfügen über ein HPV-spezifisches Immungedächtnis (Koutsky, 1997). Die Infektion mit HPV in der Bevölkerung ist sehr verbreitet, die Wahrscheinlichkeit, bereits mit HPV infiziert zu sein (oder transient infiziert gewesen zu sein), liegt bei jungen Frauen bei ca. 40% (Woodman et al., 2001). Aus beiden Beobachtungen läßt sich vermuten, dass es sich hier eher um eine Restimulation von Gedächtniszellen gehandelt hat. Um zu untersuchen, ob eine primäre Aktivierung naiver T-Zellen über die Stimulation mit YML-Peptid-beladenen B-Blasten möglich ist, könnte vor Stimulation eine magnetische Separation von CD45RA<sup>+</sup>RO<sup>-</sup> und CCR7<sup>+</sup>-Zellen, also naiven T-Zellen (Sallusto et al., 1999), durchgeführt werden.

Für einen sinnvollen Einsatz in der adoptiven Immuntherapie müssen die YML-Peptid-spezifischen T-Zellen in der Lage sein, HPV16-positive Tumorzellen zu bekämpfen. Da sowohl CaSki-Zellen, wie auch Zellen der HLA-A2-negativen Zelllinie CaSki-A2ko mit gleicher Stärke lysiert wurden (ca. 20%, Abbildung 4.3.7), kann nicht von einer spezifischen HLA-A2-restringierten Aktivität der T-Zellen gegen die Tumorzelllinie CaSki gesprochen werden. Zwar werden für diese Zelllinie Immunevasionsmechanismen beschrieben (Street et al., 1997; Tindle, 2002), da aber CaSki-Zellen nach exogener Beladung mit YML-Peptid stark und spezifisch lysiert werden (ca. 50%), ist die Menge an MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche für eine effiziente Peptidpräsentation ausreichend. Ob CaSki-Zellen geeignete Zielzellen für die Abfrage der Tumorreaktivität von T-Zellen darstellen, ist zweifelhaft. Arbeiten, in denen eine CaSki-spezifische Lyse als signifikant angesehen wurde, verwendeten entweder keine Kontrollzellen (Santin et al., 1999) oder Kontrollen mit HPV16-negativen Tumorzellen völlig anderen Typs (Youde et al., 2000), was eine klare Aussage unmöglich macht. Jochmus et al. postulieren, dass Lysen der Zelllinie CaSki durch Allo- oder Kreuzreaktivitäten ausgelöst werden könnten (Jochmus et al., 1997). Es wurde bereits beobachtet, dass solche HLA-unabhängigen Reaktivitäten

als häufige Folge von T-Zellstimulationen mit Peptiden entstehen können (Staerz et al., 1989). Schreurs et al. scheinen aber den Nachweis einer CaSki-spezifischen Lyse durch einen YML-spezifischen T-Zellklon zu erbringen (Schreurs et al., 2003). Eine der geeignetsten Kontrollen zur Klärung dieser Frage ist sicher die hier verwendete HLA-A2-negative CaSki-Zelllinie. Ob YML-spezifische T-Zellen autologe Tumorzellen erkennen können, auch wenn die Zervixkarzinomzelllinie CaSki nicht erkannt wird, und umgekehrt, bleibt weiter ungeklärt. Die Etablierung und Verwendung weiterer HPV16-positiver Tumorzelllinien könnte hier weiterhelfen.

Durch die Einzelzellklonierung der YML-spezifischen polyklonalen T-Zelllinien der Spender f39 und f40 sollte die Diversität des Repertoires YML-spezifischer T-Zellen in beiden Spendern untersucht und verglichen werden. Möglicherweise liegt die Ursache für ineffiziente T-Zellantworten gegen Tumorzellen *in vitro* wie *in vivo* an T-Zellen niedriger Avidität. Die Avidität einer T-Zelle ist das Produkt aus der Anzahl ihrer Bindungsstellen (TCR) und deren Affinität. Niederavide T-Zellen sind also Zellen, die ihr MHC-gebundenes Peptid nur in unphysiologisch hoher Dichte erkennen. Für die Wirksamkeit *in vivo* müssen T-Zellen hochavid sein (Alexander-Miller et al., 1996), also auch auf geringe Dichten an präsentiertem Antigen reagieren, was typischerweise der Situation auf der Oberfläche von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen entspricht. Daher sollten bei einer adoptiven T-Zelltherapie vorzugsweise besonders avide T-Zellen verabreicht werden. Es ist bekannt, dass ein Problem von Restimulationen mit unphysiologisch hohen Peptidkonzentrationen die Selektion niedrig aviden T-Zellen ist, die *in vivo* keine ausreichenden Reaktivitäten entwickeln (Alexander-Miller et al., 1996). Die in dieser Arbeit etablierten YML-reaktiven Klone und die polyklonale Linie des Spenders f40 zeigten aber eine starke Avidität (eine halbe maximale Reaktion bei einer Peptidkonzentration zwischen  $10^{-10}$  -  $10^{-12}$  M). Youde et al. beobachteten an ihren Klonen eine halbe maximale Lyse bei einer Peptidkonzentration von  $10^{-11}$  M, konnten also ähnlich avide T-Zelllinien herstellen wie die in dieser Arbeit beschriebenen, und konnten ebenfalls eine Erkennung von endogenem prozessiertem Antigen beobachten. Es ist aber zweifelhaft, ob die dort dargestellte lytische Aktivität der T-Zellen gegen CaSki-Zellen eine HPV-spezifische Aktivität der T-Zellen darstellt, denn es wurden nicht die passenden Zellen als Kontrolle verwendet. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit eine Lyse von CaSki-Zellen in der gleichen Größenordnung wie bei Youde et al. erreicht werden. Die hier als Kontrolle eingesetzten CaSki-A2ko-Zellen wurden aber mit

gleicher Stärke wie CaSki-Zellen lysiert, was die fehlende HLA-Restriktion und damit die Unspezifität dieser Lyse zeigt. Bei den Arbeiten von Schreurs et al. wurde eine halbe maximale Lyse bei einer Peptidkonzentration von  $10^{-7}$  bis  $10^{-8}$  M beobachtet. Diese im Vergleich niedrig aviden Klone zeigten eine spezifische Lyse von CaSki-Zellen: Die HLA-Restriktion wurde in diesem Fall durch die Verwendung einer zweiten HPV16-positiven, HLA-A2-negativen Zervixkarzinomzelllinie gezeigt: SiHa-Zellen wurden von den spezifischen T-Zellen nur dann lysiert, wenn sie mit HLA-A2 transfiziert worden waren (Schreurs et al., 2003).

Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass die Avidität der T-Zellen nicht allein dafür verantwortlich zu sein scheint, dass Tumorzellen bekämpft werden. Für die Effektivität *in vitro* und besonders *in vivo* ist eine hohe Avidität möglicherweise nicht ausreichend. Neben dem Aktivierungsstatus der T-Zellen (Oh et al., 2003) sollte noch ein weiterer Faktor berücksichtigt werden: Bisher wurde angenommen, dass bei einer gegebenen Menge Peptid-MHC-Moleküle die Avidität von T-Zellen über ihre Aktivierung entscheidet. Jede T-Zelle müsste die gleiche Menge an TCR-Aktivierungen erfahren, um aktiviert zu werden. Unterschiedlich avide T-Zellklone benötigten dazu unterschiedliche Mengen an Peptid-MHC-Molekülen. Eine hochavide T-Zelle bräuchte weniger Peptid-MHC-Moleküle, um aktiviert zu werden. Inzwischen wird aber postuliert, dass verschiedene T-Zellen über die Aktivierung unterschiedlich vieler TCR aktiviert werden können. Der Grund für diese Annahme liegt in der Beobachtung, dass die Interaktion von CD8 mit dem TCR/CD3-Komplex TCR-vermittelte Signalwege zu verstärken vermag (Wheeler et al., 1998). Für CD8 scheint dies nicht zu gelten. Verschiedene Expressionsniveaus von CD8 Heterodimeren gegenüber CD8 Homodimeren in den T-Zellen könnten also zu einer anderen Aktivierbarkeit führen (Cawthon et al., 2001). Möglicherweise sollte in zukünftigen Untersuchungen neben der Bestimmung der Avidität also auch das Verhältnis von CD8 Heterodimeren zu CD8 Homodimeren in T-Zellen berücksichtigt werden.

### 5.3 Charakterisierung der T-Zellklone

Eine besonders wichtige Rolle bei der spezifischen Erkennung von Peptid-MHC-Molekülen durch T-Zellen spielt die CDR3-Region des TCR. Die Struktur des TCR

und der CDR3-Region wird während der TCR-Genumordnungen bei der T-Zellreifung festgelegt. Hier werden auf DNA-Ebene V, D, und J-Gensegmente rekombiniert und an den Verbindungsstellen einzelne Nukleotide nach dem Zufallsprinzip eingefügt. Durch die Bestimmung der TCR-Sequenzen der variablen Region der  $\alpha$ -Kette des TCR kann die Zusammensetzung individueller CDR3-Regionen, die zur Erkennung z.B. des YML-Peptids führt, identifiziert werden. Da die Herstellung YML-spezifischer T-Zellen und ihre Klonierung schwierig ist, wurde bisher nur in Einzelfällen Näheres über die TCR YML-spezifischer T-Zellen bekannt: Aus mehreren YML<sub>11-20</sub>-Peptidspezifischen Klonen eines gesunden Spenders gelang die Amplifikation des Gensegments V 3 (Schreurs et al., 2003). Leider haben die Autoren diese TCR-Sequenz aber nicht veröffentlicht. Bei der Stimulation von polyklonalen T-Zellen einer Patientin mit zervikaler Neoplasie mit dem E7<sub>11-19</sub>-Peptid, welches um das letzte Threonin am C-Terminus kürzer ist als das in dieser Arbeit verwendete, konnte eine Zunahme von T-Zellen mit Expression eines V 3-Segments um 65% festgestellt werden (Nilges et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit waren die Sequenzen der T-Zellklone des Spenders f40 alle gleich. Es lag also höchstwahrscheinlich eine Expansion monoklonaler YML-spezifischer T-Zellen vor. Der Rezeptor enthielt TRBV5-2\*01. Das ist der erste beschreibende V 5-haltige Rezeptor für das HPV16-E7-Epitop YML.

Das T-Zellrepertoire *in vivo* könnte heterogener sein, als es sich hier darstellt, da die analysierten T-Zellklone auf Proliferation selektiert wurden. Außerdem kann die YML-Tetramerseparation, die der Klonierung vorgeschaltet war, verstärkt Klone mit hoher Affinität angereichert haben, YML-spezifische Klone mit niedriger Affinität gelangten möglicherweise gar nicht in die Kultur, da sie das Tetramer nicht binden konnten.

Obwohl sich bei der T-Zellantwort gegen viele virale Infektionen oft ein heterogenes T-Zellrepertoire gegen definierte Peptide herausbildet (Horwitz et al., 1994), gibt es verschiedene Beispiele, bei denen sich ein epitopspezifisches T-Zellrepertoire aus T-Zellen zusammensetzt, die alle den gleichen TCR verwenden. Dies ist z.B. für T-Zellen eines EBV-positiven Spenders beschrieben, die gegen ein bestimmtes Epitop aus EBNA-3 (FLR) reaktiv sind (Argaet et al., 1994). Eine Studie von Kalams et al. untersucht sogar, ob sich bei einem HIV-positiven Spender das T-Zellrepertoire gegen ein Epitop aus HIV-gp41 im Verlauf einiger Monate ändert. Dem Spender

wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten innerhalb von 36 Monaten Blut abgenommen und daraus wurden jeweils Klone gegen ein bestimmtes Epitop etabliert. Bei neun von 10 peptidspezifischen Klonen aus unterschiedlichen Blutabnahmen dieses Spenders wurde immer derselbe TCR gefunden (Kalams et al., 1994). Für die T-Zellantwort gegen das Epitop YML von HPV16 scheint es nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit auch eher eine fokussierte Auswahl an TCR zu geben. Allerdings wurde hier das T-Zellrepertoire nur eines Spenders zu nur einem Zeitpunkt untersucht. Es wäre sehr interessant, mehrere Spender auf ihr TCR-Repertoire gegen das YML-Peptid zu untersuchen, und das T-Zellrepertoire transient HPV-Infizierter mit dem von latent HPV-Infizierten zu vergleichen. Man weiß, dass bei verschiedenen Spendern die TCR der T-Zellen, die denselben Peptid-MHC-Komplex erkennen, oft erstaunlich häufig aus den gleichen Gensegmenten aufgebaut sein können, auch wenn unterschiedliche CDR3-Regionen gefunden werden (Lehner et al., 1995; Weekes et al., 1999). Nach den vorliegenden Ergebnissen scheint dies für die T-Zellantwort gegen YML möglich zu sein: Da für den Spender f39 neben den YML-tetramerpositiven Klonen auch der YML-tetramernegative Klon f39-36 etabliert wurde, wäre ein zumindest oligoklonales T-Zellrepertoire aus T-Zellen mit nur wenigen unterschiedlichen TCR denkbar. Besonders interessant dabei ist, ob die YML-spezifischen T-Zellen Gesunder andere TCR verwenden als die YML-spezifischen T-Zellen aus Patienten mit HPV-positiven Tumoren. Möglicherweise unterscheidet sich das TCR-Repertoire gegen HPV-Epitope dieser beiden Gruppen grundlegend voneinander, da die spezifischen T-Zellen der Patienten, anders als wohl die meisten der Gesunden, nicht in der Lage waren, das Virus zu eliminieren oder zumindest die Infektion zu kontrollieren. Die genaue Charakterisierung solcher T-Zellen könnte neue Möglichkeiten in der Therapie HPV-assoziiierter Tumore eröffnen.

## 5.4 Identifikation HPV-assoziiierter Karzinome

Für diese Arbeit wurden Tumorbiopsien von Kopf-Hals-Karzinompatienten sowie von Zervixkarzinompatientinnen gesammelt und auf Anwesenheit von HPV16-DNA untersucht. Um HPV detektieren zu können, wurden in den letzten Jahren von verschiedenen Gruppen unterschiedliche Methoden etabliert. Für immunzytochemische Untersuchungen stehen zwar inzwischen Antikörper zur Verfügung, die

Methode ist aber im Vergleich zu molekularbiologischen Techniken wenig sensitiv. Auch dem serologischen Nachweis mit HPV-spezifischen Antikörpern sind Grenzen gesetzt: Die humorale Immunantwort gegen HPV ist im Vergleich zu anderen Virusinfektionen (EBV, CMV) schwach. Bei epidemiologischen Studien konnten in ca. 50% der Zervixkarzinompatientinnen Antikörper gegen die HPV16-Proteine E6 und E7 gefunden werden, was einer typspezifischen Detektionsrate von nur 76-95% entspricht. Da 0,7% der Seren der Kontrollgruppe reaktiv waren (Meschede et al., 1998), obwohl bis zu etwa 46% der erwachsenen Frauen schon Kontakt mit „*high risk*“-HPV-Typen hatten (Hincliffe et al., 1995; Melkert et al., 1993), zeigen die Ergebnisse der Studie, dass die Serologie aufgrund der niedrigen oder fehlenden Antikörpertiter für eine zuverlässige HPV-Analytik nicht geeignet ist. Andere Methoden wie Southern-Blot-, Dot-Blot-, und *in situ*-Hybridisierungen sind aufwendig, unspezifisch oder zu langwierig, und darum nicht für die routinediagnostische HPV-Bestimmung geeignet. Heute werden vor allem die Flüssig-Hybridisierung (*Hybrid Capture Assay*) und die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), meist in Kombination mit histologischen Untersuchungen, angewandt (Dalstein et al., 2004; Kulmala et al., 2004). Der *Hybrid Capture Assay* funktioniert über RNA-Sondengemische für verschieden HPV-Typen, die in Lösung mit der denaturierten Proben-DNA hybridisieren. Nach der anschließenden Bindung an spezifisch gegen RNA-DNA-Doppelstränge gerichtete Antikörper wird über Sekundäntikörper die Detektion mittels Chemilumineszenz ermöglicht. Aufgrund der hohen Gerät- und Materialkosten ist diese Nachweismethode aber nur für Großanwendungen geeignet. Um für die vorliegende Arbeit ein möglichst einfach durchführbares Nachweissystem auf Routinebasis zur Verfügung zu haben, wurde die PCR gewählt. Diese einfache Technik erlaubt die schnelle und spezifische Detektion von HPV-DNA aus sehr kleinen Biopsien. Da das Interesse hauptsächlich auf der Detektion von HPV16 lag, wurden zwei Primer so definiert, dass ein Produkt aus der Region mit E7 und E1 von HPV16 amplifiziert wurde. Die PCR wurde auf die Verwendung dieser Primer optimiert. Die HPV-Untersuchung Gesunder ist wegen fehlender Biopsien in dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Karzinome der Zervix sind in 99,7% HPV-DNA-positiv. In mehr als der Hälfte (53%) wird DNA des Typs 16 gefunden (Walboomers et al., 1999). Die in dieser Arbeit untersuchten neun Zervixkarzinombiopsien waren zu 55.6% HPV16-positiv (Tabelle 4.2.1), was mit der Literatur gut übereinstimmt.

In mehr als Hälfte der HPV-positiven Kopf-Hals-Tumore wird ebenfalls HPV16-DNA gefunden (Klussmann et al., 2001b; Ringstrom et al., 2002): Aktuelle Studien belegen, dass in ca. 25% der Hypopharynxkarzinome HPV-DNA nachweisbar ist. Die in dieser Arbeit untersuchten Hypopharynxkarzinome waren in ca. 19% HPV16-positiv (3/16). Oropharynxkarzinome sind in ca. 50% HPV-positiv. Bei mehr als der Hälfte davon wird DNA von HPV16 gefunden, daher wurde in dieser Arbeit ein Wert von ca. 25% erwartet. Der Anteil von 4% (1/24) HPV16-positiver Oropharynxkarzinome in dieser Arbeit liegt deutlich unter dem erwarteten Wert. Die beobachteten Abweichungen können auf eine klare Ursache zurückgeführt werden: Bei der operativen Entfernung maligner Tumore wird bis in gesundes Tumorrandgewebe geschnitten, um möglichst alle malignen Zellen zu entfernen. Da die Kernbereiche der Biopsien für pathologische Routineuntersuchungen verwendet werden, kann es sich bei den hier analysierten Biopsiestücken zumindest teilweise um Proben gehandelt haben, die keine oder nur wenige Tumorzellen, sondern gesundes Gewebe enthielten. Die daraus resultierend geringe Menge an amplifizierbarer HPV-DNA, falls vorhanden, kann unter der Nachweisgrenze der PCR gelegen haben.

Bei der HLA-Typisierung der HPV16-positiven Spender trat verstärkt das Allel B44 auf, oft zusammen mit HLA-B8 (Tabelle 4.1.2). 77,8% der Spender hatten das Allel B44: Alle fünf HPV16-positiven Zervixkarzinompatientinnen und zwei der vier HPV16-positiven Kopf-Hals-Patienten. Gesunde Mitteleuropäer dagegen weisen in nur 24% das Allel B44 auf (Schipper et al., 1996). Da sich bei HLA-B44-positiven Patienten zervikale Läsionen (die Vorstufe des invasiven Zervixkarzinoms) häufiger progressiv entwickeln (Bontkes et al., 1998), schließen sich die Ergebnisse aus der Typisierung von Zervixkarzinompatientinnen in dieser Arbeit interessanterweise an die Literatur an. Das häufige Auftreten von HLA-B8 im Kontext von HLA-B44- und HPV16-positiven Zervixkarzinomen wird bisher in der Literatur nicht behandelt. Aufgrund der kleinen Patientenzahlen ist hier eine Signifikanz nicht gegeben, aber in einer größer angelegten Studie könnte ein möglicher Zusammenhang zwischen HPV-Infektion oder Tumorentstehung und dem HLA-Allel B44 aufgedeckt werden.

## 5.5 Ausblick

Auf dem Gebiet der Krebsprävention läßt sich auf eine mögliche Vermeidung der Entstehung HPV-assoziiierter Tumore in fernerer Zukunft hoffen: Hier sind die sog. „virus like particles“ (VLP) von Bedeutung, also virale Capside ohne DNA, die von APC besonders gut aufgenommen werden. Eine Impfstudie mit VLPs, die aus dem HPV16-Protein L1 aufgebaut sind, zeigte, dass geimpfte Frauen nicht nur vor einer präinvasiven HPV16-assoziierten Erkrankung, sondern auch vor einer persistierenden HPV16-Infektion im Zeitraum von 17 Monaten geschützt waren (Koutsky et al., 2002). Die Therapie bereits etablierter Tumore ist aber unverändert unbefriedigend. Seit Jahren gibt es keine entscheidenden Fortschritte in der Entwicklung neuer Behandlungs- und Heilungsstrategien. Dies trifft nicht nur auf die hier im Vordergrund stehenden HPV-assoziierten Tumore zu.

Neue therapeutische Möglichkeiten erhofft man sich von der Immuntherapie. Auch hier läßt ein Durchbruch noch auf sich warten, aber in einzelnen Bereichen gibt es derzeit bereits erste vielversprechende Erfolge. In einigen Fällen zum Beispiel hat die adoptive Zelltherapie erste Erfolge zu verzeichnen, etwa bei der Behandlung von Patienten mit rezidivierender chronischer Leukämie oder malignem Melanom (Abschnitt 1.3). Auch auf dem Gebiet des adoptiven Antikörpertransfers wird inzwischen erfolgreich mit einem therapeutisch wirksamen Immunglobulin gegen das verbreitete Tumorantigen Her2/neu gearbeitet (*Herceptin*), das in vielen Brustkrebs- und von Nierenzellkarzinomzellen exprimiert wird (Disis und Cheever, 1997). Allerdings ist für die Etablierung neuer Immuntherapien die Identifizierung von Tumormarkern, gegen die sich die Therapien richten können, von grundlegender Bedeutung. Tumorantigene sind Moleküle, die vom Tumor selbst produziert und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Berücksichtigt werden muss dabei, dass Tumore unter Selektionsdruck ihre Oberflächenexpression manipulieren können, so dass das targetierte Tumorantigen nicht mehr in Erscheinung tritt, der Tumor sich also der Erkennung durch die auf sein Tumorantigen ausgerichtete Therapie entzieht (Dudley et al., 2002). Die Erfolgchancen liegen daher höher, wenn der Tumor an mehreren Stellen, also über mehrere Tumorantigene gleichzeitig, angegriffen wird. Dank schneller und zuverlässiger Methoden zur Identifizierung neuer Tumormarker (SEREX (Sahin et al., 1997; Sahin et al., 1995) und AMIDA (Gires et al., 2004)) werden immer wieder neue Moleküle identifiziert. Als vielversprechende

Zielstrukturen für Krebsfrüherkennung und Therapie müssen sie in möglichst vielen Tumoren und gleichzeitig in möglichst wenigen normalen Körperzellen nachweisbar sein.

Tumore, deren Entstehung auf eine Virusinfektion zurückgeht, wie bei HPV-assoziierten Tumoren, stellen hier einen Sonderfall dar, da die malignen Zellen spezifische Tumorantigene in Form viraler Epitope präsentieren. Solche Epitope eignen sich besonders gut für immuntherapeutische Ansätze, da sie nur auf infizierten, nicht aber auf gesunden Zellen zu finden sind. Für das Zervixkarzinom und das HPV-assoziierte Tonsillenkarzinom werden HPV-Antigene, insbesondere E6 und E7, weiterhin vielversprechende Zielantigene für immuntherapeutische Ansätze bleiben, da in diesen Tumoren beide Proteine konstitutiv exprimiert werden. Aber auch hier gilt es, nicht nur einzelne Peptide wie das YML-Epitop zu targetieren, sondern den Tumor an mehreren Stellen anzugreifen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die hier vorgestellte neue Art antigenpräsentierender Zellen, nämlich aktivierte B-Zellen, ein großes Potential für die Verbesserung bisher üblicher Strategien zur Herstellung von T-Zellen für die Tumorthherapie hat.

## 6 Zusammenfassung

Ziel meiner Arbeit war, zu untersuchen, ob mittels aktivierter B-Zellen eine Expansion von T-Zellen gegen das humane Papillomvirus (HPV) 16 aus peripheren mononukleären Blutzellen möglich ist.

Aktivierte B-Zellen werden bisher kaum als antigenpräsentierende Zellen (APC) eingesetzt, obwohl sie viel Vorteile gegenüber herkömmlichen APC (z.B. dendritischen Zellen) haben. Es wurden zwei Technologien angewendet und weiterentwickelt, mit denen auf einfache Weise B-Zellen aktiviert und zu kontinuierlicher Proliferation gebracht werden können, um sie dann als APC für die Stimulation von spezifischen T-Zellen zu verwenden.

Die Infektion von B-Zellen mit sog. mini-Epstein-Barr-Viren (mini-EBV) führt zu aktivierten, proliferierenden B-Zellen, sog. mini-LCLs (lymphoblastoiden Zelllinien). Da in mini-LCLs kein infektiöses EBV gebildet wird, sind sie im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz als besonders sicher anzusehen. Die Technologie beruht auf einem rekombinanten, verkleinerten EBV-Genom, in das in dieser Arbeit die Fremdartigene HPV16-E6 oder -E7 eingebaut wurden, zwei in Zervixkarzinomzellen konstitutiv exprimierte Onkoproteine. Diese mini-EBV-Plasmide können in infektiöse Partikel verpackt werden. Die nach der Infektion von B-Zellen auswachsenden mini-LCLs exprimierten neben EBV-Antigenen auch das jeweilige Fremdantigen. Die Restimulation von T-Zellen führte im Fall eines HPV-positiven Tonsillenkarzinompatienten zu einer EBV- und HPV-spezifischen T-Zelllinie. Aus ihrer Einzelzellklonierung wurde die T-Zell-Rezeptorsequenz eines HPV-spezifischen Klons bestimmt, die für spätere Analysen und den Vergleich der therapeutischen Relevanz verschiedener HPV-spezifischer T-Zellklone interessant sein wird. Für drei gesunde Spender und 5 weitere HPV-positive Tumorspender konnten keine spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden.

Die zweite Methode der B-Zellaktivierung beruht auf der Stimulation des CD40-Rezeptors auf B-Zellen durch CD40L. Es entstehen dabei aktivierte, proliferierende B-Zellen, sog. B-Blasten. In dieser Arbeit wurden B-Blasten mit einem HLA-A2-restringierten Peptidepitop von HPV16-E7 („YML“) exogen beladen und zur

Stimulation von T-Zellen aus dem Blut zweier anonymer gesunder Spender eingesetzt. Die T-Zelllinien beider Spender zeigten eine etwa 6000- bzw. 300.000-fache Vermehrung der epitopspezifischen T-Zellen, die für beide Spender zu therapeutisch relevanten Zellzahlen führte. Es konnten hochavide Einzelzellkone etabliert werden, deren T-Zell-Rezeptor-Sequenzierung das Vorhandensein des bisher nicht im Zusammenhang mit diesem Epitop gefundene Segment V 5 ergab. Alle YML-spezifischen Zellen lysierten Zielzellen, die das Epitop YML nach endogener Prozessierung von E7 auf ihrer Zelloberfläche präsentierten.

Es wurde gezeigt, dass beide Stimulationsprotokolle geeignet sind, effizient HPV-spezifische T-Zellen zu expandieren. Die B-Blasten-Methode zeigte sich im Vergleich zur mini-LCL-Methode effizienter, da sie bei zwei von zwei Spendern zu relevanten Mengen spezifischer T-Zellen führte. Die Aufgabe der Zukunft ist die Erweiterung des B-Blasten-Systems auf weitere gesunde Spender und auf Patienten, um die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Immuntherapie von Karzinomen zu schaffen.

## 7 Abkürzungen

AIDS	erworbenes Immundefizienzsyndrom ( <i>acquired immune deficiency syndrome</i> )
amp	Ampicillin, -Resistenz
APC	antigenpräsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
BATDA	Bis-(acetoxymethyl)-2,2':6',2''-terpyridin-6,6''-dicarboxylat
bp	Basenpaare
ca.	zirka
cam	Chloramphenicol, -Resistenz
CD...	Oberflächenmarker ( <i>cluster of differentiation</i> )
CMV	humanes Cytomegalovirus
DC	dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest ( <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
FACS	Durchflusszytometer ( <i>fluorescence-activated cell sorter</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
<i>g</i>	Fallbeschleunigung im Schwerfeld der Erde, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPV	humanes Papillomvirus
IFN-	Interferon-
IL-2	Interleukin-2
LCL	lymphoblastoide Zelllinie ( <i>lymphoblastoid cell line</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute
PBMC	periphere mononukleäre Zellen ( <i>peripheral blood mononuclear cells</i> )
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Reverse Transkriptase
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TDA	2,2':6',2''-Terpyridin-6,6''-dicarboxylat
tet	Tetracyclin, -Resistenz
TR	Verpackungssignale des EBV-Genoms ( <i>terminal repeats</i> )

## 8 Literaturverzeichnis

- Alexander-Miller, M. A., Leggatt, G. R., und Berzofsky, J. A. (1996). Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic T lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4102-4107.
- Altman, J. D., Moss, P. A., Goulder, P. J., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., und Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* **274**, 94-96.
- Ardavin, C., Martinez del Hoyo, G., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C. F., Marin, A. R., Ruiz, S., Parrillas, V., und Hernandez, H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol* **22**, 691-700.
- Argaet, V. P., Schmidt, C. W., Burrows, S. R., Silins, S. L., Kurilla, M. G., Doolan, D. L., Suhrbier, A., Moss, D. J., Kieff, E., Sucley, T. B., und et al. (1994). Dominant selection of an invariant T cell antigen receptor in response to persistent infection by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* **180**, 2335-2340.
- Armitage, R. J., Sato, T. A., Macduff, B. M., Clifford, K. N., Alpert, A. R., Smith, C. A., und Fanslow, W. C. (1992). Identification of a source of biologically active CD40 ligand. *Eur J Immunol* **22**, 2071-2076.
- Baer, R., Bankier, A. T., Biggin, M. D., Deininger, P. L., Farrell, P. J., Gibson, T. J., Hatfull, G., Hudson, G. S., Satchwell, S. C., Seguin, C., und et al. (1984). DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* **310**, 207-211.
- Banchereau, J., und Rousset, F. (1991). Growing human B lymphocytes in the CD40 system. *Nature* **353**, 678-679.
- Bauer, H. M., Ting, Y., Greer, C. E., Chambers, J. C., Tashiro, C. J., Chimera, J., Reingold, A., und Manos, M. M. (1991). Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *Jama* **265**, 472-477.
- Bijur, S. (1996). Current concepts in the immunology of allograft rejection. *Indian J Med Sci* **50**, 13-19.
- Blomberg, K., Hautala, R., Lovgren, J., Mukkala, V. M., Lindqvist, C., und Akerman, K. (1996). Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods* **193**, 199-206.
- Bontkes, H. J., de Gruijl, T. D., van den Muysenberg, A. J., Verheijen, R. H., Stukart, M. J., Meijer, C. J., Scheper, R. J., Stacey, S. N., Duggan-Keen, M. F., Stern, P. L., Man, S., Borysiewicz, L. K., und Walboomers, J. M. (2000). Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes in women with cervical neoplasia. *Int J Cancer* **88**, 92-98.
- Bontkes, H. J., van Duin, M., de Gruijl, T. D., Duggan-Keen, M. F., Walboomers, J. M., Stukart, M. J., Verheijen, R. H., Helmerhorst, T. J., Meijer, C. J., Scheper, R. J., Stevens, F. R., Dyer, P. A., Sinnott, P., und Stern, P. L. (1998). HPV 16 infection and progression of cervical intra-epithelial neoplasia: analysis of HLA polymorphism and HPV 16 E6 sequence variants. *Int J Cancer* **78**, 166-171.

- Bournsnel, M. E., Rutherford, E., Hickling, J. K., Rollinson, E. A., Munro, A. J., Rolley, N., McLean, C. S., Borysiewicz, L. K., Vousden, K., und Inglis, S. C. (1996). Construction and characterisation of a recombinant vaccinia virus expressing human papillomavirus proteins for immunotherapy of cervical cancer. *Vaccine* **14**, 1485-1494.
- Boyer, B., Valles, A. M., und Thiery, J. P. (1996). Model systems of carcinoma cell dispersion. *Curr Top Microbiol Immunol* **213 (Pt 1)**, 179-194.
- Boyle, P. (1997). Global burden of cancer. *Lancet* **349 Suppl 2**, SII23-26.
- Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J., und Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* **187**, 1395-1402.
- Cawthon, A. G., Lu, H., und Alexander-Miller, M. A. (2001). Peptide requirement for CTL activation reflects the sensitivity to CD3 engagement: correlation with CD8alpha-beta versus CD8alpha-alpha expression. *J Immunol* **167**, 2577-2584.
- Chiriva-Internati, M., Liu, Y., Salati, E., Zhou, W., Wang, Z., Grizzi, F., Roman, J. J., Lim, S. H., und Hermonat, P. L. (2002). Efficient generation of cytotoxic T lymphocytes against cervical cancer cells by adeno-associated virus/human papillomavirus type 16 E7 antigen gene transduction into dendritic cells. *Eur J Immunol* **32**, 30-38.
- Cho, C. W., Poo, H., Cho, Y. S., Cho, M. C., Lee, K. A., Lee, S. J., Park, S. N., Kim, I. K., Jung, Y. K., Choe, Y. K., Yeom, Y. I., Choe, I. S., und Yoon do, Y. (2002). HPV E6 antisense induces apoptosis in CaSki cells via suppression of E6 splicing. *Exp Mol Med* **34**, 159-166.
- Choo, C. K., Ling, M. T., Suen, C. K., Chan, K. W., und Kwong, Y. L. (2000). Retrovirus-mediated delivery of HPV16 E7 antisense RNA inhibited tumorigenicity of CaSki cells. *Gynecol Oncol* **78**, 293-301.
- Chuang, S. E., Chen, A. L., und Chao, C. C. (1995). Growth of E. coli at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res* **23**, 1641.
- Cid-Arregui, A., Juarez, V., und zur Hausen, H. (2003). A synthetic E7 gene of human papillomavirus type 16 that yields enhanced expression of the protein in mammalian cells and is useful for DNA immunization studies. *J Virol* **77**, 4928-4937.
- Connor, M. E., und Stern, P. L. (1990). Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer* **46**, 1029-1034.
- Coughlin, C. M., Vance, B. A., Grupp, S. A., und Vonderheide, R. H. (2004). RNA-transfected CD40-activated B cells induce functional T-cell responses against viral and tumor antigen targets: implications for pediatric immunotherapy. *Blood* **103**, 2046-2054.
- Dalstein, V., Riethmuller, D., Sautiere, J. L., Pretet, J. L., Kantelip, B., Schaal, J. P., und Mougin, C. (2004). Detection of cervical precancer and cancer in a hospital population; benefits of testing for human papillomavirus. *Eur J Cancer* **40**, 1225-1232.
- Dausset, J. (1981). The major histocompatibility complex in man. *Science* **213**, 1469-1474.
- Day, P. M., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**, 1-11.

- de Gruijl, T. D., Bontkes, H. J., Walboomers, J. M., Stukart, M. J., Doekhie, F. S., Remmink, A. J., Helmerhorst, T. J., Verheijen, R. H., Duggan-Keen, M. F., Stern, P. L., Meijer, C. J., und Scheper, R. J. (1998). Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res* **58**, 1700-1706.
- Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C., und Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 5188-5193.
- Disis, M. L., und Cheever, M. A. (1997). HER-2/neu protein: a target for antigen-specific immunotherapy of human cancer. *Adv Cancer Res* **71**, 343-371.
- Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Robbins, P. F., Yang, J. C., Hwu, P., Schwartzentruber, D. J., Topalian, S. L., Sherry, R., Restifo, N. P., Hübicki, A. M., Robinson, M. R., Raffeld, M., Duray, P., Seipp, C. A., Rogers-Freezer, L., Morton, K. E., Mavroukakis, S. A., White, D. E., und Rosenberg, S. A. (2002). Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* **298**, 850-854.
- Einsele, H. (2002). Immunotherapy for CMV infection. *Cytotherapy* **4**, 435-436.
- Epstein, M. A., Achong, B. G., und Barr, Y. M. (1964). Virus Particles in Cultured Lymphoblasts from Burkitt's Lymphoma. *Lancet* **15**, 702-703.
- Evans, C., Bauer, S., Grubert, T., Brucker, C., Baur, S., Heeg, K., Wagner, H., und Lipford, G. B. (1996). HLA-A2-restricted peripheral blood cytolytic T lymphocyte response to HPV type 16 proteins E6 and E7 from patients with neoplastic cervical lesions. *Cancer Immunol Immunother* **42**, 151-160.
- Evans, E. M., Man, S., Evans, A. S., und Borysiewicz, L. K. (1997). Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* **57**, 2943-2950.
- Frisch, M., Biggar, R. J., und Goedert, J. J. (2000). Human papillomavirus-associated cancers in patients with human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1500-1510.
- Funk, J. O., Waga, S., Harry, J. B., Espling, E., Stillman, B., und Galloway, D. A. (1997). Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev* **11**, 2090-2100.
- Garboczi, D. N., Utz, U., Ghosh, P., Seth, A., Kim, J., VanTienhoven, E. A., Biddison, W. E., und Wiley, D. C. (1996). Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J Immunol* **157**, 5403-5410.
- Garrone, P., Neidhardt, E. M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C., und Banchereau, J. (1995). Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* **182**, 1265-1273.
- Gerber, P., Lucas, S., Nonoyama, M., Perlin, E., und Goldstein, L. I. (1972). Oral excretion of Epstein-Barr virus by healthy subjects and patients with infectious mononucleosis. *Lancet* **2**, 988-989.
- Gillespie, G. M., Wills, M. R., Appay, V., O'Callaghan, C., Murphy, M., Smith, N., Sissons, P., Rowland-Jones, S., Bell, J. I., und Moss, P. A. (2000). Functional heterogeneity and high

frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* **74**, 8140-8150.

Gires, O., Munz, M., Schaffrik, M., Kieu, C., Rauch, J., Ahlemann, M., Eberle, D., Mack, B., Wollenberg, B., Lang, S., Hofmann, T., Hammerschmidt, W., und Zeidler, R. (2004). Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci* **61**, 1198-1207.

Graf, D., Muller, S., Korthauer, U., van Kooten, C., Weise, C., und Kroczeck, R. A. (1995). A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* **25**, 1749-1754.

Greenfield, I., Nickerson, J., Penman, S., und Stanley, M. (1991). Human papillomavirus 16 E7 protein is associated with the nuclear matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11217-11221.

Guccione, E., Massimi, P., Bernat, A., und Banks, L. (2002). Comparative analysis of the intracellular location of the high- and low-risk human papillomavirus oncoproteins. *Virology* **293**, 20-25.

Gunn, G. R., Zubair, A., Peters, C., Pan, Z. K., Wu, T. C., und Paterson, Y. (2001). Two *Listeria monocytogenes* vaccine vectors that express different molecular forms of human papilloma virus-16 (HPV-16) E7 induce qualitatively different T cell immunity that correlates with their ability to induce regression of established tumors immortalized by HPV-16. *J Immunol* **167**, 6471-6479.

Hammerschmidt, W., und Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* **55**, 427-433.

Henle, W., Diehl, V., Kohn, G., Zur Hausen, H., und Henle, G. (1967). Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* **157**, 1064-1065.

Herbst, H. (1996). Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease. *Semin Cancer Biol* **7**, 183-189.

Hershko, T., und Ginsberg, D. (2004). Up-regulation of Bcl-2 homology 3 (BH3)-only proteins by E2F1 mediates apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 8627-8634.

Hinchliffe, S. A., van Velzen, D., Korporaal, H., Kok, P. L., und Boon, M. E. (1995). Transience of cervical HPV infection in sexually active, young women with normal cervicovaginal cytology. *Br J Cancer* **72**, 943-945.

Horwitz, M. S., Yanagi, Y., und Oldstone, M. B. (1994). T-cell receptors from virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing a single immunodominant nine-amino-acid viral epitope show marked diversity. *J Virol* **68**, 352-357.

Hsu, E. M., McNicol, P. J., Guijon, F. B., und Paraskevas, M. (1993). Quantification of HPV-16 E6-E7 transcription in cervical intraepithelial neoplasia by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Int J Cancer* **55**, 397-401.

Inoue, H., Nojima, H., und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.

Jemal, A., Thomas, A., Murray, T., und Thun, M. (2002). Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* **52**, 23-47.

- Jochmus, I., Osen, W., Altmann, A., Buck, G., Hofmann, B., Schneider, A., Gissmann, L., und Rammensee, H. G. (1997). Specificity of human cytotoxic T lymphocytes induced by a human papillomavirus type 16 E7-derived peptide. *J Gen Virol* **78** ( Pt 7), 1689-1695.
- Junge, J., Poulsen, H., Horn, T., Hording, U., und Lundvall, F. (1995). Human papillomavirus (HPV) in vulvar dysplasia and carcinoma in situ. *Apmis* **103**, 501-510.
- Kalams, S. A., Johnson, R. P., Trocha, A. K., Dynan, M. J., Ngo, H. S., D'Aquila, R. T., Kurnick, J. T., und Walker, B. D. (1994). Longitudinal analysis of T cell receptor (TCR) gene usage by human immunodeficiency virus 1 envelope-specific cytotoxic T lymphocyte clones reveals a limited TCR repertoire. *J Exp Med* **179**, 1261-1271.
- Keating, P. J., Cromme, F. V., Duggan-Keen, M., Snijders, P. J., Walboomers, J. M., Hunter, R. D., Dyer, P. A., und Stern, P. L. (1995). Frequency of down-regulation of individual HLA-A and -B alleles in cervical carcinomas in relation to TAP-1 expression. *Br J Cancer* **72**, 405-411.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., und Hammerschmidt, W. (1995a). immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5875-5879.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., und Hammerschmidt, W. (1995b). immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* **69**, 231-238.
- Khanna, R., und Burrows, S. R. (2000). Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Microbiol* **54**, 19-48.
- Kieff, E. (1996). Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields Virology*, K. B.N., D.M., Howley, P.M, ed. (Philadelphia, Lippincott-Raven).
- Kieff, E., und Rickinson, A. B. (2001). Epstein-Barr virus and its replication. In *Fields Virology, Fourth Edition*, K. DM, und H. PM, eds. (Philadelphia, Pennsylvania, Lippincott Williams and Wilkins), pp. 2581.
- Kilger, E., Pecher, G., Schwenk, A., und Hammerschmidt, W. (1999). Expression of mucin (MUC-1) from a mini-Epstein-Barr virus in immortalized B-cells to generate tumor antigen specific cytotoxic T cells. *J Gene Med* **1**, 84-92.
- Klussmann, J. P., Weissenborn, S., und Fuchs, P. G. (2001a). Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* **345**, 376; author reply 377.
- Klussmann, J. P., Weissenborn, S. J., Wieland, U., Dries, V., Kolligs, J., Jungehuelsing, M., Eckel, H. E., Dienes, H. P., Pfister, H. J., und Fuchs, P. G. (2001b). Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* **92**, 2875-2884.
- Kolb, H. J., Mittermuller, J., Clemm, C., Holler, E., Ledderose, G., Brehm, G., Heim, M., und Wilmanns, W. (1990). Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood* **76**, 2462-2465.
- Kolb, H. J., Simoes, B., und Schmid, C. (2004). Cellular immunotherapy after allogeneic stem cell transplantation in hematologic malignancies. *Curr Opin Oncol* **16**, 167-173.
- Kondo, E., Topp, M. S., Kiem, H. P., Obata, Y., Morishima, Y., Kuzushima, K., Tanimoto, M., Harada, M., Takahashi, T., und Akatsuka, Y. (2002). Efficient generation of antigen-specific

- cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40-activated B cells. *J Immunol* **169**, 2164-2171.
- Koutsky, L. (1997). Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med* **102**, 3-8.
- Koutsky, L. A., Ault, K. A., Wheeler, C. M., Brown, D. R., Barr, E., Alvarez, F. B., Chiacchierini, L. M., und Jansen, K. U. (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347**, 1645-1651.
- Kruisbeek, A. M. (1993). Development of alpha beta T cells. *Curr Opin Immunol* **5**, 227-234.
- Kulmala, S. M., Syrjanen, S., Shabalova, I., Petrovichev, N., Kozachenko, V., Podistov, J., Ivanchenko, O., Zakharenko, S., Nerovjna, R., Kljukina, L., Branovskaja, M., Grunberga, V., Juschenko, A., Tosi, P., Santopietro, R., und Syrjanen, K. (2004). Human papillomavirus testing with the hybrid capture 2 assay and PCR as screening tools. *J Clin Microbiol* **42**, 2470-2475.
- Lane, D., de Feyter, R., Kennedy, M., Phua, S. H., und Semon, D. (1986). D protein of miniF plasmid acts as a repressor of transcription and as a site-specific resolvase. *Nucleic Acids Res* **14**, 9713-9728.
- Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J., und Hwu, P. (2003). CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* **63**, 2836-2843.
- Lee, C. J., Suh, E. J., Kang, H. T., Im, J. S., Um, S. J., Park, J. S., und Hwang, E. S. (2002). Induction of senescence-like state and suppression of telomerase activity through inhibition of HPV E6/E7 gene expression in cells immortalized by HPV16 DNA. *Exp Cell Res* **277**, 173-182.
- Lefranc, M.-P., und Lefranc, G. (2001). *The T cell receptor factsbook* (San Diego, Calif., Academic Press).
- Lehn, H., Krieg, P., und Sauer, G. (1985). Papillomavirus genomes in human cervical tumors: analysis of their transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5540-5544.
- Lehner, P. J., Wang, E. C., Moss, P. A., Williams, S., Platt, K., Friedman, S. M., Bell, J. I., und Borysiewicz, L. K. (1995). Human HLA-A0201-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of influenza A is dominated by T cells bearing the V beta 17 gene segment. *J Exp Med* **181**, 79-91.
- Liebowitz, D. (1998). Pathogenesis of Epstein-Barr virus. In *Human Tumor Virus*, D. McCance, ed. (American Society for Microbiology).
- Lorincz, A. T., Reid, R., Jenson, A. B., Greenberg, M. D., Lancaster, W., und Kurman, R. J. (1992). Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. *Obstet Gynecol* **79**, 328-337.
- Lu, Z., Hu, X., Li, Y., Zheng, L., Zhou, Y., Jiang, H., Ning, T., Basang, Z., Zhang, C., und Ke, Y. (2004). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein interferences with insulin signaling pathway by binding to tuberin. *J Biol Chem*.
- Luxton, J. C., Rose, R. C., Coletart, T., Wilson, P., und Shepherd, P. S. (1997). Serological and T-helper cell responses to human papillomavirus type 16 L1 in women with cervical dysplasia or cervical carcinoma and in healthy controls. *J Gen Virol* **78** (Pt 4), 917-923.

- Melkert, P. W., Hopman, E., van den Brule, A. J., Risse, E. K., van Diest, P. J., Bleker, O. P., Helmerhorst, T., Schipper, M. E., Meijer, C. J., und Walboomers, J. M. (1993). Prevalence of HPV in cytologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer* **53**, 919-923.
- Meschede, W., Zumbach, K., Braspenning, J., Scheffner, M., Benitez-Bribiesca, L., Luande, J., Gissmann, L., und Pawlita, M. (1998). Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* **36**, 475-480.
- Meuer, S. C., Cooper, D. A., Hodgdon, J. C., Hussey, R. E., Fitzgerald, K. A., Schlossman, S. F., und Reinherz, E. L. (1983). Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. *Science* **222**, 1239-1242.
- Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H. J., Hollweck, G., Hislop, A. D., Blake, N. W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., Moss, P. A., Zeidler, R., Rickinson, A. B., und Hammerschmidt, W. (2002). B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* **100**, 1755-1764.
- Nakagawa, M., Stites, D. P., Patel, S., Farhat, S., Scott, M., Hills, N. K., Palefsky, J. M., und Moscicki, A. B. (2000). Persistence of human papillomavirus type 16 infection is associated with lack of cytotoxic T lymphocyte response to the E6 antigens. *J Infect Dis* **182**, 595-598.
- Nicholls, J. M., Agathangelou, A., Fung, K., Zeng, X., und Niedobitek, G. (1997). The association of squamous cell carcinomas of the nasopharynx with Epstein-Barr virus shows geographical variation reminiscent of Burkitt's lymphoma. *J Pathol* **183**, 164-168.
- Niedobitek, G. (1999). The Epstein-Barr virus: a group 1 carcinogen? *Virchows Arch* **435**, 79-86.
- Nilges, K., Hohn, H., Pilch, H., Neukirch, C., Freitag, K., Talbot, P. J., und Maeurer, M. J. (2003). Human papillomavirus type 16 E7 peptide-directed CD8<sup>+</sup> T cells from patients with cervical cancer are cross-reactive with the coronavirus NS2 protein. *J Virol* **77**, 5464-5474.
- Nimako, M., Fiander, A. N., Wilkinson, G. W., Borysiewicz, L. K., und Man, S. (1997). Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res* **57**, 4855-4861.
- O'Connor, M., Peifer, M., und Bender, W. (1989). Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* **244**, 1307-1312.
- Oda, H., Kumar, S., und Howley, P. M. (1999). Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9557-9562.
- Oh, S., Hodge, J. W., Ahlers, J. D., Burke, D. S., Schlom, J., und Berzofsky, J. A. (2003). Selective induction of high avidity CTL by altering the balance of signals from APC. *J Immunol* **170**, 2523-2530.
- Osen, W., Peiler, T., Ohlschlager, P., Caldeira, S., Faath, S., Michel, N., Muller, M., Tommasino, M., Jochmus, I., und Gissmann, L. (2001). A DNA vaccine based on a shuffled E7 oncogene of the human papillomavirus type 16 (HPV 16) induces E7-specific cytotoxic T cells but lacks transforming activity. *Vaccine* **19**, 4276-4286.

- Pattillo, R. A., Husa, R. O., Story, M. T., Ruckert, A. C., Shalaby, M. R., und Mattingly, R. F. (1977). Tumor antigen and human chorionic gonadotropin in CaSki cells: a new epidermoid cervical cancer cell line. *Science* **196**, 1456-1458.
- Peggs, K. S., Verfuether, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P. A., und Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* **362**, 1375-1377.
- Petry, K. U., Scheffel, D., Bode, U., Gabrysiak, T., Kochel, H., Kupsch, E., Glaubitz, M., Niesert, S., Kuhnle, H., und Schedel, I. (1994). Cellular immunodeficiency enhances the progression of human papillomavirus-associated cervical lesions. *Int J Cancer* **57**, 836-840.
- Pilch, H., Hohn, H., Neukirch, C., Freitag, K., Knapstein, P. G., Tanner, B., und Maeurer, M. J. (2002). Antigen-driven T-cell selection in patients with cervical cancer as evidenced by T-cell receptor analysis and recognition of autologous tumor. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**, 267-278.
- Pope, J. H., Achong, B. G., und Epstein, M. A. (1968). Cultivation and fine structure of virus-bearing lymphoblasts from a second New Guinea Burkitt lymphoma: establishment of sublines with unusual cultural properties. *Int J Cancer* **3**, 171-182.
- Reinstein, E., Scheffner, M., Oren, M., Ciechanover, A., und Schwartz, A. (2000). Degradation of the E7 human papillomavirus oncoprotein by the ubiquitin-proteasome system: targeting via ubiquitination of the N-terminal residue. *Oncogene* **19**, 5944-5950.
- Ressing, M. E., Sette, A., Brandt, R. M., Ruppert, J., Wentworth, P. A., Hartman, M., Oseroff, C., Grey, H. M., Melief, C. J., und Kast, W. M. (1995). Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J Immunol* **154**, 5934-5943.
- Ressing, M. E., van Driel, W. J., Celis, E., Sette, A., Brandt, M. P., Hartman, M., Anholts, J. D., Schreuder, G. M., ter Harmsel, W. B., Fleuren, G. J., Trimbos, B. J., Kast, W. M., und Melief, C. J. (1996). Occasional memory cytotoxic T-cell responses of patients with human papillomavirus type 16-positive cervical lesions against a human leukocyte antigen-A \*0201-restricted E7-encoded epitope. *Cancer Res* **56**, 582-588.
- Rickinson, A. B., Lee, S. P., und Steven, N. M. (1996). Cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus. *Curr Opin Immunol* **8**, 492-497.
- Rickinson, A. B., Moss, D. J., Allen, D. J., Wallace, L. E., Rowe, M., und Epstein, M. A. (1981). Reactivation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells by in vitro stimulation with the autologous lymphoblastoid cell line. *Int J Cancer* **27**, 593-601.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., und Greenberg, P. D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* **257**, 238-241.
- Ringstrom, E., Peters, E., Hasegawa, M., Posner, M., Liu, M., und Kelsey, K. T. (2002). Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* **8**, 3187-3192.
- Roden, R. B., Kirnbauer, R., Jenson, A. B., Lowy, D. R., und Schiller, J. T. (1994). Interaction of papillomaviruses with the cell surface. *J Virol* **68**, 7260-7266.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Srivastava, D. K., Bowman, L. C., Krance, R. A., Brenner, M. K., und Heslop, H. E. (1998). Infusion of cytotoxic

- T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* **92**, 1549-1555.
- Roskrow, M. A., Suzuki, N., Gan, Y., Sixbey, J. W., Ng, C. Y., Kimbrough, S., Hudson, M., Brenner, M. K., Heslop, H. E., und Rooney, C. M. (1998). Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood* **91**, 2925-2934.
- Rous, P. (1979). A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., *Experimental Medicine for Sept. 1, 1910*, vol. 12, pp.696-705. *J Exp Med* **150**, 738-753.
- Sabel, M. S., Yamada, M., Kawaguchi, Y., Chen, F. A., Takita, H., und Bankert, R. B. (2000). CD40 expression on human lung cancer correlates with metastatic spread. *Cancer Immunol Immunother* **49**, 101-108.
- Sahin, U., Tureci, O., und Pfreundschuh, M. (1997). Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* **9**, 709-716.
- Sahin, U., Tureci, O., Schmitt, H., Cochlovius, B., Johannes, T., Schmits, R., Stenner, F., Luo, G., Schobert, I., und Pfreundschuh, M. (1995). Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 11810-11813.
- Sallusto, F., und Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118.
- Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., und Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* **401**, 708-712.
- Santin, A. D., Hermonat, P. L., Ravaggi, A., Bellone, S., Cowan, C., Korourian, S., Pecorelli, S., Cannon, M. J., und Parham, G. P. (2000). Development, characterization and distribution of adoptively transferred peripheral blood lymphocytes primed by human papillomavirus 18 E7-pulsed autologous dendritic cells in a patient with metastatic adenocarcinoma of the uterine cervix. *Eur J Gynaecol Oncol* **21**, 17-23.
- Santin, A. D., Hermonat, P. L., Ravaggi, A., Chiriva-Internati, M., Zhan, D., Pecorelli, S., Parham, G. P., und Cannon, M. J. (1999). Induction of human papillomavirus-specific CD4(+) and CD8(+) lymphocytes by E7-pulsed autologous dendritic cells in patients with human papillomavirus type 16- and 18-positive cervical cancer. *J Virol* **73**, 5402-5410.
- Schipper, R. F., Schreuder, G. M., D'Amaro, J., und Oudshoorn, M. (1996). HLA gene and haplotype frequencies in Dutch blood donors. *Tissue Antigens* **48**, 562-574.
- Schoell, W. M., Mirhashemi, R., Liu, B., Janicek, M. F., Podack, E. R., Penalver, M. A., und Averette, H. E. (1999). Generation of tumor-specific cytotoxic T lymphocytes by stimulation with HPV type 16 E7 peptide-pulsed dendritic cells: an approach to immunotherapy of cervical cancer. *Gynecol Oncol* **74**, 448-455.
- Schreurs, M. W., Scholten, K. B., Kueter, E. W., Ruizendaal, J. J., Meijer, C. J., und Hooijberg, E. (2003). In vitro generation and life span extension of human papillomavirus type 16-specific, healthy donor-derived CTL clones. *J Immunol* **171**, 2912-2921.

- Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G., und Nadler, L. M. (1997). CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* **100**, 2757-2765.
- Seedorf, K., Krammer, G., Durst, M., Suhai, S., und Rowekamp, W. G. (1985). Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology* **145**, 181-185.
- Sherman, L., Alloul, N., Golan, I., Durst, M., und Baram, A. (1992). Expression and splicing patterns of human papillomavirus type-16 mRNAs in pre-cancerous lesions and carcinomas of the cervix, in human keratinocytes immortalized by HPV 16, and in cell lines established from cervical cancers. *Int J Cancer* **50**, 356-364.
- Sherman, L., Itzhaki, H., Jackman, A., Chen, J. J., Koval, D., und Schlegel, R. (2002). Inhibition of serum- and calcium-induced terminal differentiation of human keratinocytes by HPV 16 E6: study of the association with p53 degradation, inhibition of p53 transactivation, and binding to E6BP. *Virology* **292**, 309-320.
- Smotkin, D., und Wettstein, F. O. (1987). The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol* **61**, 1686-1689.
- Snijders, P. J., Cromme, F. V., van den Brule, A. J., Schrijnemakers, H. F., Snow, G. B., Meijer, C. J., und Walboomers, J. M. (1992). Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* **51**, 845-850.
- Spriggs, M. K., Armitage, R. J., Strockbine, L., Clifford, K. N., Macduff, B. M., Sato, T. A., Maliszewski, C. R., und Fanslow, W. C. (1992). Recombinant human CD40 ligand stimulates B cell proliferation and immunoglobulin E secretion. *J Exp Med* **176**, 1543-1550.
- Staerz, U. D., Zepp, F., Schmid, R., Hill, M., und Rothbard, J. (1989). Recruitment of alloreactive cytotoxic T lymphocytes by an antigenic peptide. *Eur J Immunol* **19**, 2191-2196.
- Street, D., Kaufmann, A. M., Vaughan, A., Fisher, S. G., Hunter, M., Schreckenberger, C., Potkul, R. K., Gissmann, L., und Qiao, L. (1997). Interferon-gamma enhances susceptibility of cervical cancer cells to lysis by tumor-specific cytotoxic T cells. *Gynecol Oncol* **65**, 265-272.
- Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B., und Callan, M. F. (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* **162**, 1827-1835.
- Thomas, M., und Banks, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**, 2943-2954.
- Thorley-Lawson, D. A. (2001). Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* **1**, 75-82.
- Tilney, N. L., und Kupiec-Weglinski, J. W. (1991). The biology of acute transplant rejection. *Ann Surg* **214**, 98-106.
- Tindle, R. W. (2002). Immune evasion in human papillomavirus-associated cervical cancer. *Nat Rev Cancer* **2**, 59-65.

- Todd, R. W., Roberts, S., Mann, C. H., Luesley, D. M., Gallimore, P. H., und Steele, J. C. (2004). Human papillomavirus (HPV) type 16-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses in women with high grade vulvar intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer* **108**, 857-862.
- van der Burg, S. H., de Jong, A., Welters, M. J., Offringa, R., und Melief, C. J. (2002). The status of HPV16-specific T-cell reactivity in health and disease as a guide to HPV vaccine development. *Virus Res* **89**, 275-284.
- van der Burg, S. H., Rensing, M. E., Kwappenberg, K. M., de Jong, A., Straathof, K., de Jong, J., Geluk, A., van Meijgaarden, K. E., Franken, K. L., Ottenhoff, T. H., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., und Offringa, R. (2001). Natural T-helper immunity against human papillomavirus type 16 (HPV16) E7-derived peptide epitopes in patients with HPV16-positive cervical lesions: identification of 3 human leukocyte antigen class II-restricted epitopes. *Int J Cancer* **91**, 612-618.
- van Ewijk, W. (1991). T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* **9**, 591-615.
- van Houten, V. M., Snijders, P. J., van den Brekel, M. W., Kummer, J. A., Meijer, C. J., van Leeuwen, B., Denkers, F., Smeele, L. E., Snow, G. B., und Brakenhoff, R. H. (2001). Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* **93**, 232-235.
- Veldman, T., Horikawa, I., Barrett, J. C., und Schlegel, R. (2001). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *J Virol* **75**, 4467-4472.
- von Bergwelt-Baildon, M., Schultze, J. L., Maecker, B., Menezes, I., und Nadler, L. M. (2004). Correspondence re R. Lapointe et al., CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* 2003;63:2836-43. *Cancer Res* **64**, 4055-4056; author reply 4056-4057.
- von Bergwelt-Baildon, M. S., Vonderheide, R. H., Maecker, B., Hirano, N., Anderson, K. S., Butler, M. O., Xia, Z., Zeng, W. Y., Wucherpfennig, K. W., Nadler, L. M., und Schultze, J. L. (2002). Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* **99**, 3319-3325.
- Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M., Bosch, F. X., Kummer, J. A., Shah, K. V., Snijders, P. J., Peto, J., Meijer, C. J., und Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**, 12-19.
- Weekes, M. P., Wills, M. R., Mynard, K., Carmichael, A. J., und Sissons, J. G. (1999). The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol* **73**, 2099-2108.
- Wei, S., Charmley, P., Robinson, M. A., und Concannon, P. (1994). The extent of the human germline T-cell receptor V beta gene segment repertoire. *Immunogenetics* **40**, 27-36.
- Welters, M. J., de Jong, A., van den Eeden, S. J., van der Hulst, J. M., Kwappenberg, K. M., Hassane, S., Franken, K. L., Drijfhout, J. W., Fleuren, G. J., Kenter, G., Melief, C. J., Offringa, R., und van der Burg, S. H. (2003). Frequent display of human papillomavirus type 16 E6-specific memory t-Helper cells in the healthy population as witness of previous viral encounter. *Cancer Res* **63**, 636-641.

- Westermann, J., und Pabst, R. (1992). Distribution of lymphocyte subsets and natural killer cells in the human body. *Clin Investig* **70**, 539-544.
- Wheeler, C. J., Chen, J. Y., Potter, T. A., und Parnes, J. R. (1998). Mechanisms of CD8beta-mediated T cell response enhancement: interaction with MHC class I/beta2-microglobulin and functional coupling to TCR/CD3. *J Immunol* **160**, 4199-4207.
- Wiest, T., Schwarz, E., Enders, C., Flechtenmacher, C., und Bosch, F. X. (2002). Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* **21**, 1510-1517.
- Wilczynski, S. P., Lin, B. T., Xie, Y., und Paz, I. B. (1998). Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* **152**, 145-156.
- Woodman, C. B., Collins, S., Winter, H., Bailey, A., Ellis, J., Prior, P., Yates, M., Rollason, T. P., und Young, L. S. (2001). Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* **357**, 1831-1836.
- Yee, C., Thompson, J. A., Byrd, D., Riddell, S. R., Roche, P., Celis, E., und Greenberg, P. D. (2002). Adoptive T cell therapy using antigen-specific CD8+ T cell clones for the treatment of patients with metastatic melanoma: in vivo persistence, migration, and antitumor effect of transferred T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 16168-16173.
- Youde, S. J., Dunbar, P. R., Evans, E. M., Fiander, A. N., Borysiewicz, L. K., Cerundolo, V., und Man, S. (2000). Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A\*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte-recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res* **60**, 365-371.
- Young, L. S., Dawson, C. W., und Eliopoulos, A. G. (2000). The expression and function of Epstein-Barr virus encoded latent genes. *Mol Pathol* **53**, 238-247.
- Zheng, X., Yan, L., Nilsson, B., Eklund, G., und Drettner, B. (1994). Epstein-Barr virus infection, salted fish and nasopharyngeal carcinoma. A case-control study in southern China. *Acta Oncol* **33**, 867-872.
- zur Hausen, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* **1288**, F55-78.
- zur Hausen, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**, 690-698.
- zur Hausen, H., Meinhof, W., Scheiber, W., und Bornkamm, G. W. (1974). Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer* **13**, 650-656.
- Zwerschke, W., Mazurek, S., Massimi, P., Banks, L., Eigenbrodt, E., und Jansen-Durr, P. (1999). Modulation of type M2 pyruvate kinase activity by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 1291-1296.

---

## Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Andreas Moosmann für die hervorragende Betreuung, die interessanten Diskussionen und der ausgiebigen Unterstützung bei der Lösung aller Probleme.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Genvektoren der GSF und der HNO-Forschung des Klinikums Großhadern für die angenehme und kollegiale Zusammenarbeit.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt, dessen Erfahrung und Hilfsbereitschaft mich vor den verschiedensten Problemen bewahrte.

Bei Herrn Prof. Dr. Horst Domdey bedanke ich mich für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu betreuen.

Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Reinhard Zeidler für interessante Diskussionen, fachlichen Beistand und wertvolle Aufmunterung.

Bei Frau Prof. Dr. med. Barbara Wollenberg und Herrn Dr. med. Peter Hillemanns bedanke mich für die Bereitstellung von Patientenmaterial.

Ich bedanke mich herzlich bei Brigitte Mack für ihre kompetente, gut gelaunte Hilfe bei immunhistochemischen Färbungen.

Bei Gabriele Hollweck bedanke ich mich für ihre unschätzbare Unterstützung im Labor.

Bei Roswitha Neumann möchte ich mich für ihre Zuverlässigkeit und Tatkraft bedanken, mit der sie allen undurchschaubaren bürokratischen Anforderungen entgegentrat.

Und besonders bedanke ich mich bei meinen lieben Kollegen Dr. Annette Janz, Martina Wiesner, Eva Hettich, Markus Kalla und Bianca Weissflog für die schöne Zeit mit ihnen.

---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben:

Name: Caroline Zentz  
Geburtsdatum: 27.08.1976  
Geburtsort: Versailles  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch/französisch

### Ausbildung:

1982–1995 Otto-von-Taube-Gymnasium Gauting, Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

1995–2000 Studium der Biologie an der Technischen Universität München

Nov. 1999 bis Juli 2000: Diplomarbeit an der TU-München über das Thema „Keratocan als Kandidatengen für die dominante Kataraktmutation *Cat3* in der Maus“

Feb. 2001 bis Juli 2004: Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität München mit dem Titel „Expansion von T-Zellen seltener Spezifität mittels B-Zellen“ in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Hammerschmidt an der GSF, Institut für Genvektoren, München