

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Diplom-Biologin Eva-Jasmin Freyschmidt

aus: Heidelberg

Tag der mündlichen Prüfung:

Modulation der Immunogenität von HPV16 L1/E7 Chimären Virus-ähnlichen Partikeln

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann

Prof. Dr. Ingrid Haas

Meinen Eltern

Diese Doktorarbeit wurde in der Zeit von November 1999 bis Juni 2003 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lutz Gissmann am Forschungsschwerpunkt Angewandte Tumorstudiologie (ATV) des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ) in Heidelberg durchgeführt.

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht und auf folgenden Konferenzen und Doktoranden-Foren präsentiert:

Michel, N., Öhlschläger, P. Osen, W. **Freyschmidt, E. J.**, Guthöhrlein, H. Kaufmann, A. M., Müller, M., Gissmann, L. (2002) T Cell Response to Human Papillomavirus 16 E7 in Mice: Comparison of Cr Release Assay, Intracellular IFN-gamma Production, ELISPOT and Tetramer Staining. *Intervirology* 45: 290-9

Freyschmidt, E. J. und Michel, N. (2003) Nachweis antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen. *Modern Aspects of Immunology Journal (Immunologie Aktuell)* 3: in press

Freyschmidt, E. J., Osen, W., Gissmann, L. (2001) Use of Immune Complexes to Enhance the Immunogenicity of HPV-16 L1/E7 Chimeric Virus-Like Particles (CVLP). 19th International Papillomavirus Conference. Florianopolis, Brasil, Sept. 1.-7. 2001

Freyschmidt, E. J., Gissmann, L. (2002) Modulation of Immunogenicity of HPV-16 L1/E7 Chimeric Virus-Like Particles (CVLPs). *Graduierten-Forum 2002*, DKFZ, Heidelberg. Jan. 10.-18. 2002 (Posterpreis)

Freyschmidt, E. J., Gissmann, L. (2002) Modulation of Immunogenicity of Chimeric Papillomavirus-like Particles. 2th Heinrich Behr Symposium 'Infectious and Human Cancers - Parasites, Bacteria and novel Viral Agents'. Heidelberg, Nov. 10.-13. 2002

Freyschmidt, E. J., Gissmann, L. (2002) Modulation of Immunogenicity of Chimeric Papillomavirus Like Particles (CVLPs): Binding to and Presentation by Dendritic Cells. Pfizer Symposium: Drug Discovery 2002 (eingeladene Teilnehmerin). Sandwich, UK, Sept. 11.-13. 2002

Freyschmidt, E. J., Gissmann, L. (2002) Modulation of Immunogenicity of Chimeric Papillomavirus Like Particles (CVLPs): Binding to and Presentation by Dendritic Cells. 7th International Symposium on Dendritic Cells. Bamberg, Sept. 19.-24. 2002

Danksagung

Prof. Dr. Lutz Gissmann, meinem Doktorvater und Gutachter dieser Arbeit, danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmittel und die wirklich wertvollen und interessanten Diskussionen. Besonders danke ich für seine stets offene Bürotür, die es ermöglichte, zu jeder Zeit und mit jedem Anliegen zu ihm zu kommen und durch die man stets motiviert wieder hinausging.

Prof. Dr. Ingrid Haas, danke ich für ihr enormes Interesse an dieser Arbeit, die anregenden und hilfreichen Diskussionen und die Bereitschaft diese Arbeit zu begutachten.

Birgit Aegeneyndt danke ich für die Aufarbeitung und Analyse der Chimären Virus-ähnlichen Partikel.

Dr. Martin Müller danke ich für hilfreiche Diskussionen, die Bereitstellung der Bakulovirus-Vorräte und der monoklonalen L1-spezifischen Antikörper.

Dr. Michael Pawlita und Dr. Gerhard Moldenhauer, Mitglieder meines Doktoranden-Komitees, danke ich für wertvolle und interessante Diskussionen und Lösungsvorschläge.

Dr. Natalio Garcia Garbi danke ich für die Einführung in die Präparation und Generierung von primären Dendritischen Zellen und für die Bereitstellung von TAP-defizienten Mäusen.

Dr. John Nieland danke ich für seine wertvollen wissenschaftlichen Ratschläge und seine Hilfsbereitschaft.

Dr. Gerhard Moldenhauer danke ich für die Bereitstellung der MHC Klasse II-spezifischen Antikörper.

Dr. Ton Schuhmacher und Mireille Toebes danke ich für die Einführung in die MHC Klasse I-Tetramer Herstellung und die Bereitstellung der produzierten MHC Klasse I-Tetramere.

Dr. Peter Sehr danke ich für ein stets offenes Ohr bei Protein-betreffenden Fragen.

Dr. Kerstin Dell danke ich für die Überlassung der Kapsomere.

Dr. Martin Lechmann und Stefan Faath danke ich für die Einführung in die intrazelluläre Interferon γ Färbung.

Thomas Holz danke ich für seine wirklich schnelle und kompetente Hilfe bei allen Problemen und Fragen, die das Arbeiten am Computer mit sich brachte.

Prof. Dr. Angel Alonso danke ich für seine Unterstützung bei allen Experimenten, in denen Sorbitol als Modulator der Immunogenität diente.

Corinna Klein danke ich für die Durchführung einiger EliSpots.

Birgit Hub und Prof. Dr. Hanswalter Zentgraf danke ich für die Erstellung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Herzlichen Dank an Birgit Ae., Heidi G., Esther G., Tanja P., Cornelia O., Peter S., Corinna K., allen Azubis, Ellinor O., Rosita A., Nico M., Katja P., Claudia W., Kerstin D. und Iris H. ohne die mancher Labortag (trotz wissenschaftlicher Stimulierung) nicht so lustig verlaufen wäre.

Ganz besonders- obwohl zuletzt aufgeführt- möchte ich meiner Familie danken. Meinen Eltern widme ich diese Arbeit, da sie mich viele Jahre hindurch nicht nur finanziell sondern moralisch und insbesondere liebevoll unterstützt haben. Meinen Geschwistern Julia und Benny danke ich für die vielen lustigen Stunden, die ich mit ihnen verbringen konnte und hoffentlich auch noch verbringen werde. Meiner Omi möchte ich für ihr reges Interesse und für gelegentliche Finanzspritzen danken. Ganz lieben Dank an Alex für das Durchlesen und Formatieren dieser Arbeit, Hilfe bei Computerfragen, Verpflegung mit 85 % Cacao, unendlich viel Geduld und die liebevolle Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

1.	HUMANPATHOGENE PAPILLOMVIREN (HPV)	1
1.1	AUFBAU VON HUMANPATHOGENEN PAPILLOMVIREN	2
1.1.1.	<i>Genomstruktur von Humanpathogenen Papillomviren</i>	2
1.1.2.	<i>Kapsidstruktur von Humanpathogenen Papillomviren</i>	4
1.2	INFEKTIONSZYKLUS VON HUMANPATHOGENEN PAPILLOMVIREN	5
1.3	NATÜRLICHE IMMUNANTWORTEN AUF HPV-INFEKTIONEN	5
1.3.1.	<i>Humorale Immunantwort auf HPV-Infektionen</i>	7
1.3.2.	<i>Zelluläre Immunantwort auf HPV-Infektionen</i>	7
2.	KONZEPTE VON HPV-VAKZINIERUNGEN	8
2.1	PRÄVENTIVE VAKZINIERUNG	8
2.2	THERAPEUTISCHE VAKZINIERUNG	9
2.2.1.	<i>Peptid-basierende Vakzine</i>	9
2.2.2.	<i>Protein-basierende Vakzine</i>	9
2.2.3.	<i>Chimäre Virus-ähnliche Partikel (CVLP)</i>	10
2.2.4.	<i>Kapsomere</i>	11
3.	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	12
3.1	MODULATION DER IMMUNOGENITÄT VON CVLPs DURCH BMDCs	12
3.2	MODULATION DER IMMUNOGENITÄT DURCH IMMUNKOMPLEXIERUNG DER CVLPs (CVLP-IC)	14
3.3	MODULATION DER IMMUNOGENITÄT DER CVLPs DURCH CpG ODNs	16
3.4	MODULATION DER IMMUNOGENITÄT DER CVLPs DURCH SORBITOL	17
3.5	UNTERSUCHUNG DES MHC KLASSE I PRÄSENTATIONSWEGS VON CVLPs UND CVLP-ICs	18

B. Material

1.	CHEMISCHE REAGENZIEN	20
2.	VERBRAUCHSMATERIALIEN	21
3.	GERÄTE UND ROTOREN	22
3.1	ZENTRIFUGEN	22
3.2	SONSTIGE GERÄTE	22
4.	VERWENDETE KITS	23
5.	RADIOCHEMIKALIEN	23
6.	ANTIKÖRPER	23
6.1	PRIMÄRANTIKÖRPER	23
6.2	SEKUNDÄRANTIKÖRPER	24
7.	PROTEINMARKER	24
8.	PUFFER UND LÖSUNGEN	25
9.	PEPTIDE	26

10.	ADJUVANTIEN	26
11.	BIOLOGISCHE MATERIALIEN	27
	11.1 ENZYM.....	27
	11.2 EUKARYOTISCHE ZELLEN.....	27
	11.2.1. <i>Kulturmedium für Eukaryotischen Zellen</i>	27
	11.2.2. <i>Medienzusätze</i>	28
	11.3 BAKULOVIRUS-VORRÄTE.....	29
	11.4 KAPSOMERE.....	29
	11.5 TIERE	29
12.	MATERIALIEN ZUR MHC-I TETRAMER HERSTELLUNG	29
	12.1 PLASMIDE, BAKTERIEN UND KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN.....	29
	12.2 VERBRAUCHSMATERIALIEN	30
	12.3 GERÄTE.....	30
	12.4 ENZYME.....	30
	12.5 PUFFER UND LÖSUNGEN	30

C. Methoden

1.	ALLGEMEINE ZELLKULTUR-METHODEN	32
	1.1 ZELLZAHL- UND VITALITÄTSBESTIMMUNG	32
	1.2 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	32
	1.3 KULTIVIERUNG VON Sf9 UND TN HIGH FIVE ZELLEN	33
2.	KULTIVIERUNG ZYTOTOXISCHER T-ZELLEN	33
	2.1 AUFARBEITUNG DER MILZEN IMMUNISIERTER MÄUSE	33
	2.2 RESTIMULIERUNG DER ZYTOTOXISCHEN T-ZELLEN	33
	2.2.1. <i>Herstellung des Concanavalin A (Con A)-induzierten Rattenmilzüberstands</i>	34
3.	KULTIVIERUNG VON PRIMÄREN DENDRITISCHEN ZELLEN (BMDCS)	35
	3.1 GENERIERUNG PRIMÄRER DENDRITISCHER ZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK VON C57BL/6 MÄUSEN.....	35
	3.1.1. <i>Herstellung des GM-CSF-Überstands</i>	35
4.	HERSTELLUNG DER CHIMÄREN VIRUS-ÄHNLICHEN PARTIKEL (CVLP) UND CVLP-IMMUNKOMPLEXE (CVLP-ICS) 36	
	4.1 AMPLIFIKATION REKOMBINANTER BAKULOVIRUS-STAMMVORRÄTEN.....	36
	4.2 INFEKTION DER INSEKTENZELLEN DURCH REKOMBINANTE BAKULOVIREN.....	36
	4.3 AUFBRECHEN DER INSEKTENZELLEN MITTELS ‚FRENCH PRESS‘	36
	4.4 AUFREINIGUNG DER CVLPs DURCH GRADIENTENZENTRIFUGATION	37
	4.5 BESTIMMUNG DER DICHTEN DER CsCl-FRAKTIONEN	37
	4.6 DIALYSE DER CVLPs	37
	4.7 HERSTELLUNG DER CVLP-ICS.....	38
	4.7.1. <i>Herstellung CVLP-spezifischer polyklonaler Mausseren</i>	38
5.	METHODEN ZUR ANALYSE VON CVLPs UND ANDEREN PROTEINEN	38
	5.1 SDS-POLYACRYLAMIDGEELEKTROPHORESE ZUR ANALYSE VON PROTEINEN.....	38
	5.1.1. <i>Analyse von Proteinen durch Western Blot (enhanced chemoluminescence (ECL))</i>	39
	5.1.2. <i>Proteinmengenabschätzung im SDS-Polyacrylamidgel</i>	39
	5.2 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA).....	40
	5.2.1. <i>Antigen-Capture ELISA zur Analyse der CsCl-Fractionen</i>	40

5.2.2.	<i>ELISA zur Überprüfung der CVLP-spezifischen polyklonalen Mausseren</i>	40
5.2.3.	<i>ELISA zur Typisierung der L1 spezifischen Antikörper</i>	41
5.3	PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE ELEKTRONENMIKROSKOPIE	41
6.	DURCHFLUSSZYTOMETRIE (FACS)-ANALYSE	41
6.1	ALLGEMEINE PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE FACS-ANALYSE	42
6.1.1.	<i>Analyse der Fcγ-Rezeptor II/III (CD32/CD16) Oberflächenexpression auf Zellen</i>	42
6.1.2.	<i>Analyse der CVLP- und CVLP-ICs-Bindung an Zellen</i>	42
6.1.3.	<i>Analyse der Aktivierungsmarker auf BMDCs</i>	43
6.1.4.	<i>Probenvorbereitung der intrazellulären IFNγ-Färbung</i>	44
6.1.5.	<i>Probenvorbereitung der MHC-I Tetramerfärbung</i>	44
7.	METHODEN ZUM NACHWEIS DER ANTIGENPRÄSENTATION	44
7.1	BELADUNG DER BMDCs UND BMDCs TAP ^{-/-} ZUR ÜBERPRÜFUNG DER ANTIGENPRÄSENTATION	44
7.2	INTRAZELLULÄRE INTERFERON γ -FÄRBUNG (IFN γ -FÄRBUNG) ZUM NACHWEIS DER ANTIGENPRÄSENTATION	45
7.3	IFN γ ENZYME-LINKED IMMUNOSPOT (ELISPOT) ZUM NACHWEIS DER ANTIGENPRÄSENTATION	46
8.	GENERIERUNG VON ZYTOTOXISCHEN T-ZELLEN: IN VITRO UND IN VIVO PRIMING	47
8.1	<i>IN VITRO PRIMING NAIVER T-ZELLEN DURCH CVLP-BELADENE BMDCs</i>	47
8.2	<i>IMMUNISIERUNG DER C57BL/6 MÄUSE (IN VIVO PRIMING)</i>	47
9.	NACHWEIS ANTIGEN-SPEZIFISCHER ZYTOTOXISCHER T-ZELLEN	48
9.1	MHC-I TETRAMER FÄRBUNG ZUM NACHWEIS ANTIGEN SPEZIFISCHER T-ZELLEN	49
9.1.1.	<i>MHC-I Tetramer Herstellung</i>	49
9.2	INTRAZELLULÄRE INTERFERON γ FÄRBUNG (IFN γ FÄRBUNG) ZUM NACHWEIS ANTIGEN SPEZIFISCHER T-ZELLEN	55
9.3	IFN γ ELISPOT ZUM NACHWEIS ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN	56
9.4	ZYTOTOXIZITÄTSTEST ZUM NACHWEIS ANTIGEN-SPEZIFISCHER T-ZELLEN	57
 D. Ergebnisse		
1.	HERSTELLUNG VON CHIMÄREN VIRUS-ÄHNLICHEN PARTIKELN (CVLPS)	59
2.	HERSTELLUNG VON CVLP-IMMUNKOMPLEXEN (CVLP-ICS)	62
2.1	HERSTELLUNG EINES CVLP-SPEZIFISCHEN MAUSSERUMS	62
2.2	TYPISIERUNG MONOKLONALER L1-SPEZIFISCHER ANTIKÖRPER	64
2.3	STANDARDISIERUNG DER CVLP-IMMUNKOMPLEXE HERSTELLUNG	65
3.	GENERIERUNG VON PRIMÄREN DENDRITISCHEN ZELLEN (BMDCS) AUS DEM KNOCHENMARK	66
4.	BINDUNG VON CHIMÄREN VIRUS-ÄHNLICHEN PARTIKELN UND CVLP-IMMUNKOMPLEXEN AN BMDCS	67
4.1	EXPRESSION DER Fc γ -REZEPTOREN III/II (CD16/CD32) AUF DENDRITISCHEN ZELLEN	67
4.2	SPEZIFISCHE BINDUNG VON CVLPS UND CVLP-ICS AN ZELLEN	68
5.	AKTIVIERUNG UNREIFER BMDCS DURCH CVLP-BELADUNG	70
5.1	AKTIVIERUNG UNREIFER BMDCS DURCH <i>IN VITRO</i> BELADUNG VON CVLP UND CVLP-IMMUNKOMPLEXE (CVLP-ICS)	71
5.2	AKTIVIERUNG VON BMDCS DURCH CVLPS-BELADUNG IN KOMBINATION MIT SORBITOL-BEHANDLUNG, CPG ODNs UND LPS	73

6. MHC KLASSE I ANTIGENPRÄSENTATION VON BMDCs: CROSS PRÄSENTATION	80
6.1 MHC KLASSE I ANTIGENPRÄSENTATION VON BMDCs NACH CVLP-BELADUNG IN KOMBINATION MIT CPG ODNs UND SORBITOL.....	81
6.2 ANTIGENPRÄSENTATION ÜBER MHC KLASSE I MOLEKÜLE VON BMDCs NACH BELADUNG MIT CVLP BZW. CVLP-ICS.....	84
6.3 MHC KLASSE I PRÄSENTATIONSWEG VON CVLPs UND CVLP-ICS IN BMDCs	89
7. IN VITRO PRIMING: GENERIERUNG ZYTOTOXISCHER T-ZELLEN DURCH CVLP-BELADENE BMDCs	92
8...IN VIVO PRIMING: GENERIERUNG ZYTOTOXISCHER T-ZELLEN DURCH IMMUNISIERUNG VON CVLPs UND CVLP-BELADENEN BMDCs	95
8.1 DIE HERSTELLUNG DER MHC-I-TETRAMERE	96
8.2 IMMUNISIERUNGEN.....	99
8.3 EXPERIMENT I.....	99
8.4 EXPERIMENT II	101
8.5 EXPERIMENT III	102
9. IMMUNOGENITÄT IM VERGLEICH: CHIMÄREN VIRUS-ÄHNLICHE PARTIKEL VERSUS UND HPV16L1(ΔN10) KAPSOMERE	106
9.1 AKTIVIERUNG UNREIFER BMDCs DURCH DIE <i>IN VITRO</i> BELADUNG MIT KAPSOMEREN	106
9.2 <i>IN VITRO</i> MHC KLASSE I ANTIGENPRÄSENTATION VON KAPSOMER-BELADENEN BMDCs.....	107
E. Diskussion	
1. DIE MODULATION DER IMMUNOGENITÄT VON HPV 16 CHIMÄREN VIRUS-ÄHNLICHEN PARTIKELN (CVLPs)	109
1.1 BMDCs ALS ‚NATURE’S ADJUVANTS‘	109
1.2 CVLPs ALS IMMUNKOMPLEXE.....	111
1.2.1 Bindung von CVLP-ICS an BMDCs	111
1.2.2 Induktion der Reifung von BMDCs durch CVLP-ICS.....	113
1.2.3 MHC Klasse I Antigenpräsentation von CVLP-ICS beladenen BMDCs (cross Präsentation).....	114
1.2.4 Priming von ZTLs durch CVLP-ICS beladene BMDCs	119
1.3 CVLPs IN KOMBINATION MIT CPG ODN.....	121
1.4 SORBITOL-BEHANDLUNG CVLP-BELADENER BMDCs	123
2. NACHWEISMETHODEN ANTIGEN-SPEZIFISCHER ZTLs	124
3. MHC KLASSE I ANTIGENPRÄSENTATIONSWEG VON CVLPs UND CVLP-ICS	125
4. IMMUNOGENITÄT VON HPV16 L1 KAPSOMEREN	130
F. Zusammenfassung	130
G. Abkürzungen und Symbole	132
H. Medizinische Fachbegriffe	137
I. Literatur	138
J. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	151

A. Einleitung

1. Humanpathogene Papillomviren (HPV)

Die Familie der Papillomviren umfasst ca. 130 Mitglieder (De Villiers, 1997), die streng wirts- und gewebsspezifisch sind (Rowson and Mahy, 1967). Insgesamt sind davon 85 humanpathogene Papillomvirus (HPV) Typen bekannt, mehr als zusätzlich 120 vermeintlich neue Typen sind schon teilweise charakterisiert (De Villiers, 1997; zur Hausen, 2000). Aufgrund ihres Tropismus werden humanpathogene Papillomviren in haut- oder schleimhautspezifische (kutane: z.B. HPV 1-4 bzw. mukosotrope: z.B. HPV 6, 16, 18) Typen eingeteilt. In Tabelle 1 sind einige Vertreter der humanpathogenen Papillomviren und die durch sie verursachte Krankheit zusammengestellt.

Tabelle 1: HPV-Typen und ihr Krankheitsbild
(nach Fields, 1996)

Krankheitsbild	Kutane HPV Typen	Krankheitsbild	Mukosale HPV Typen
Tiefe Fußwarzen	HPV1, 3	Flache Condylome des Genitaltrakts	HPV6, 11, 16*, 18*, 31* u.a.
Multiple Warzen, meist an Händen; Mosaik Warzen an Füßen und Händen (nur HPV2)	HPV2, 4	Zervixkarzinom	HPV6, 11, 16*, 18*, 31*, 33*, 35*, 45*
<i>Epidermodysplasia verruciformis (EV)</i> , unter zusätzlicher UV-Strahlung können sich die Läsionen zu Krebs entwickeln	HPV5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19-25, 36-38, 47, 49	Vulvakarzinom	HPV16*
Metzgerwarze an Händen von Fleischern und Fleischhändlern	HPV7	Peniskarzinom	HPV16*
		Papillome des Respirationstrakts	HPV6, 11

Etwa 30 HPV Typen sind mit unterschiedlicher Häufigkeit mit einer Infektion des Genitaltraktes assoziiert. Diese werden aufgrund ihres onkogenen Potentials in sogenannte ‚*high-risk*‘ und ‚*low-risk*‘ HPV-Typen eingeteilt (siehe Tabelle 1). Darunter sind als *low-risk* Typen z.B. HPV6 und HPV11 vertreten, die anogenitale Warzen (*Condyloma acuminata*) bedingen. Trotz ihrer Gutartigkeit stellen diese Warzen eine große Belastung für die Patienten dar, da sie schwer zu behandeln sind und nach Entfernung in 38-81 % der Fälle wiederkehren (Gross, 1997).

High-risk Typen wie HPV16, 18, 31, 33, 35, 45 u.a. bedingen hochgradige Dysplasien besonders des Zervix (Gebärmutterhals). Diese Veränderungen werden gemäß ihres Proliferationsgrads in CIN (zervikale intraepithelialen Neoplasien) I, II und III eingeteilt, welche Vorstufen des Gebärmutterhalskrebs darstellen. Zwar werden in annähernd 100 % aller untersuchten Zervixkarzinome *high-risk* HPV-Typen gefunden (Bosch et al., 1993; Walboomers et al., 1999; zur Hausen, 1996), eine Infektion allein führt allerdings nur selten zu Entstehung von Gebärmutterhalskrebs. Da HPV Infektionen des Genitaltrakts durch Geschlechtsverkehr übertragen werden, sind sie unter jungen, sexuell aktiven Frauen und - obwohl dort

seltener nachweisbar - Männern weit verbreitet. Die meisten Infektionen verlaufen unbemerkt und HPV-DNA ist nach einiger Zeit nicht mehr detektierbar. Auch bilden sich die meisten Läsionen spontan zurück. Nur eine Minderheit von Frauen entwickeln persistierende Infektionen mit *high-risk* HPV Typen, die hochgradigen Dysplasien hervorrufen können. Ob sich diese Läsionen zu invasiven Karzinomen entwickeln, hängt von zusätzlichen Faktoren (Rauchen, Infektionen mit anderen Mikroorganismen, z.B. Chlamydien) aber auch von Lebensumständen der Frauen (Zugang zur Krebsfrüherkennung) ab. Während Vorstufen des Zervixkarzinoms erfolgreich durch einen geringfügigen operativen Eingriff behandelt werden können, so erhalten Patientinnen mit fortgeschrittenem Krankheitsbild nach chirurgischer Entfernung des Tumors eine Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie. Trotz der durchgeführten Kombinationsbehandlung entwickeln 35 % dieser Patientinnen Rezidive, für die heute keine effektive Therapie existiert.

1.1 Aufbau von Humanpathogenen Papillomviren

1.1.1. Genomstruktur von Humanpathogenen Papillomviren

Alle Papillomviren sind sehr einheitlich aufgebaut. Sie besitzen ein 7,9 kbp großes Genom, welches im Viruspartikel mit zellulären Histonen assoziiert (Pfister and zur Hausen, 1978) und somit als DNA Minichromosom kondensiert vorliegt (Howley, 1996). Es besteht aus einer zirkulären, doppelsträngigen DNA, die in drei Abschnitte unterteilt werden kann: Eine nicht-kodierende Region *upstream regulatory region* (URR) bzw. *long control region* (LCR) von ca. 1 kB, eine *frühe Region* mit den offenen Leserastern (ORFs) E6, E7, E1, E2, E4 und E5, und eine *späte Region*, welche für L1 (das Hauptstrukturprotein) und L2 (das Nebenstrukturprotein) kodiert (siehe

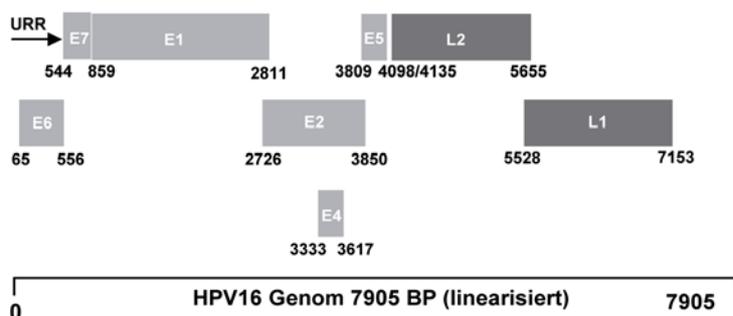


Abbildung 1: Genomaufbau von HPV16
(nach Seedorf et al. 1985)

region (URR) bzw. *long control region* (LCR) von ca. 1 kB, eine *frühe Region* mit den offenen Leserastern (ORFs) E6, E7, E1, E2, E4 und E5, und eine *späte Region*, welche für L1 (das Hauptstrukturprotein) und L2 (das Nebenstrukturprotein) kodiert (siehe Abbildung 1).

Die Hauptfunktionen der von *frühen* Genen kodierten Proteine E1, E2 und E4 von HPV16 sind in Tabelle 2 kurz zusammengefasst. Da die ORFs E5, E6 und E7 von *high-risk* HPV Typen für Proteine mit Wachstumsstimulierenden und transformierenden Eigenschaften kodieren, werden diese im Folgenden etwas näher beschrieben.

Der virale Transkriptionsfaktor E2 ist als Dimer aktiviert und bindet an palindromische Promotor-Sequenzen innerhalb der URR und reprimiert dadurch die E6 und E7 Transkription (Cripe et al., 1987; Bernard et al., 1989; Romanczuk and Howley, 1992). In Karzinomzellen ist das ursprünglich zirkuläre HPV-Genom meist in das Wirtsgenom integriert, die Öffnung des viralen Genoms

erfolgt bevorzugt im E1 und E2 ORF (Durst et al., 1985; Cullen et al., 1991). Die Repression der E6 und E7 Transkription wird dadurch aufgehoben und die Proteine E6 und E7 werden konstitutiv exprimiert (Schwarz et al., 1985; Francis et al., 2000). Diese Expression der HPV16 E6 und E7 Proteine und deren Interaktion mit einer Vielzahl von zellulären Proteinen der Wirtszelle führen diese aufgrund der Ausschaltung wichtiger Kontrollmechanismen in eine kontinuierliche Proliferation (siehe Tabelle 3). Diese Eigenschaft scheint auf *high-risk* Typen begrenzt zu sein, da E6 und E7 der *low-risk* Typen HPV6 oder 11 Zellen nicht transformieren können (Pecoraro et al., 1989; Barbosa et al., 1991).

Tabelle 2: Hauptfunktionen von HPV16 E1, E2 und E4

ORF	Hauptfunktion der Genprodukte	Referenz
E1	Helikase, ATPase, essentiell für virale Replikation	Del Vecchio et al. 1992 Chiang et al. 1992
E2	Viraler Transkriptionsfaktor, bindet E1, um Initiation der viralen DNA Replikation zu erleichtern; wichtig bei der Enkapsidierung des viralen Genoms	Mohr et al. 1990 Frattini et al. 1994
E4	Interagiert mit Proteinen des Zytoskeletts und erleichtert so die Freisetzung der Viren (daher eigentlich kein frühes Protein)	Roberts et al. 1993

Tabelle 3: Hauptfunktionen von HPV16 E6 und E7

Virales Onkoprotein	Zelluläres Bindungs-Protein	Identifizierte Funktion und deren Folgen	Referenz
E6	p53, vermittelt durch E6-assoziiertes Protein (E6-AP)	p53 Degradation: Antiapoptotischer Effekt, Chromosomale Instabilität	Werness et al. 1990 Scheffner et al. 1990
	Bkl Tyrosin Kinase, vermittelt durch E6-AP	Blockierung der Bkl Degradation: Stimulation der Mitose	Oda et al. 1999
	bcl-2 homologer Antagonist/Killer (BAK)	BAK Degradation: Antiapoptotischer Effekt	Thomas et al. 1998 Thomas et al. 1999
	Telomerase	Aktivierung der Telomerase: Immortalisierung (?)	Klingelhutz et al. 1996
	Interferon Regulationsfaktor	Inhibition der Interferon-Funktion (?)	Ronco et al. 1998
E7	Retinoblastom Protein (pRB) und Proteine der pRB Familie	Degradation von pRB, Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F Familie: Stimulation der Mitose	Dyson et al. 1989 Dyson et al. 1992
	Zyclin A und E	Aktivierung der Kinasen: Stimulation der Mitose	Arroyo et al. 1993 Zerfass et al. 1995
	P21 ^{CIP-1} und p27 ^{KIP-1} (Zyclin-abhängigen Kinase Inhibitoren)	Inaktivierung der Inhibitoren: Stimulation der Mitose	Funk et al. 1997 Jones et al. 1997 Zerfass-Thome et al. 1996

Offensichtlich führt E6 zwei Hauptfunktionen aus: Erstens scheint E6 aufgrund seines mutagenen und antiapoptotischen Effekts eine wichtige Rolle in der Tumorphprogression zu spielen. Durch die Bindung an p53 wird der G1/S Kontrollpunkt in DNA-geschädigten Zellen übergangen (Werness et al., 1990). Zweitens führt die Expression von E6 über verschiedene Wege (z.B. Aktivierung der Telomerase) zur Immortalisierung der Wirtszelle (Klingelhutz et al., 1996). Eine der Hauptfunktionen von E7 stellt die Bindung an das

Retinoblastom Protein (pRb) dar (Dyson et al., 1989). Diese Bindung resultiert zum einen in einer verstärkten Degradation durch Ubiquitinierung von pRb (Boyer et al., 1996). Zum anderen resultiert sie in der Freisetzung von Transkriptionsfaktoren der E2F Familie, welche die Transkription von Genen aktivieren, deren Produkte die Zellproliferation regulieren (Bagchi, et al. 1990; Bandara and La Thangue, 1991). E7 spielt zudem deshalb eine essentielle Rolle im Infektionszyklus von HPV, da es nicht nur das Differenzierungsprogramm der Keratinozyten interveniert, sondern auch die Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Replikationsmaschinerie der Wirtszelle induziert (Flores et al., 2000). Einem zweiten Onkoprotein von HPV, E5, wurde kürzlich ebenfalls eine Rolle bei der Vorprogrammierung der differenzierenden Zellen zugeschrieben, um die DNA-Synthese zu unterstützen (Genther et al., 2003). E5 wird in produktiven Infektionen exprimiert, durch seine hydrophoben Eigenschaften ist E5 hauptsächlich im Golgi-Apparat, Endoplasmatischen Reticulum (ER), in der Plasma- und Nukleusmembran zu finden (Burkhardt et al., 1989) (Conrad et al., 1993), wo es mit einer Vielzahl von Transmembran-Proteinen interagiert, hauptsächlich erforscht an E5 des bovinen Papillomviren 1 (BPV1) (Hwang et al., 1995; Conrad et al., 1993). In humanen Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass HPV16 E5 die Apoptose, welche durch TRAIL (Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand) oder FasL (Fas Ligand) induziert wurde, vermindert (Kabsch and Alonso, 2002). Die Rolle des humanen E5 Proteins bei natürlichen Infektionen ist immer noch weitgehend unklar, aber man geht davon aus, dass es eine schwache transformierende Aktivität besitzt und durch die Aktivierung von Membran-assoziierten Proteinkinasen in den Zellzyklus eingreift.

1.1.2. Kapsidstruktur von Humanpathogenen Papillomviren

Papilloma Virionen sind nicht von Lipiden umhüllt; und ihr Durchmesser beträgt ca. 52-55 nm. Die späten Gene L1 bzw. L2 (siehe Abbildung 2) kodieren für das Hauptstrukturprotein L1 (56-60 kDa) bzw. das

Nebenstrukturprotein L2 (49-60 kDa). 72 Pentamere des L1 Proteins lagern sich zu einem ikosaedrischen Kapsid zusammen (siehe Abbildung 2.A) (Christensen et al., 1994; Le Cann et al., 1994). Jedes Pentamer, auch Kapsomer genannt, ist dabei entweder von sechs oder fünf Pentamer-Nachbarn umgeben, es ist somit entweder eines der 60 hexavalenten oder eines der 12 pentavalenten Kapsomere eines Kapsids. Die Pentamere sitzen im Kapsid an den Eckpunkten eines $T = 7$ ikosaedrischen Gitters (siehe Abbildung 2.B) (Baker et al., 1991).

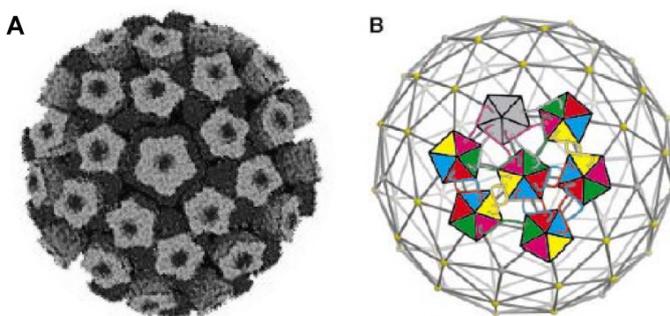


Abbildung 2: Modelle des Papillomavirus-Kapsids

(A) Computer-Modell eines Papillomavirus-Kapsids;

Quelle: www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html

(B) Gitter-Modell eines ikosaedrischen $T = 7$ Kapsids (Modis et al. 2002): Je ein Farbe repräsentiert ein L1 Molekül. Je ein rotes, blaues, gelbes, pinkes und grünes L1 Protein lagern sich zu einem Kapsomer zusammen.

, T^6 bezeichnet die Triangulationszahl, welche durch den Abstand zwischen zwei pentavalenten Kapsomere definiert ist. L2 ist an diesem Aufbau nicht direkt beteiligt, man spricht dem Nebenstrukturprotein eher eine Aufgabe bei der Bindung und Endkapsidierung des Virus-Genoms zu (Zhou et al., 1994; Zhao et al., 1998).

1.2 Infektionszyklus von Humanpathogenen Papillomviren

Die Vermehrung von Papillomviren ist von einem vollständigen Programm der Keratinozyten-Differenzierung abhängig und bis heute existiert kein Hinweis darauf, dass *in vivo* die viralen Gene in anderen Zellen außer Keratinozyten exprimiert werden. Papillomviren gelangen durch kleine Hautverletzungen in das *Stratum basale* des Epithels (siehe Abbildung 3) und infizieren dort Keratinozyten. Zunächst existieren ca. 10 Virusgenome pro Zelle, die dann bis zu 100 Kopien pro Zelle amplifiziert werden und extrachromosomal im Nukleus vorliegen (Durst et al., 1985). Wenn sich die infizierten Basalzellen teilen, verbleibt eine der Tochterzellen im *Stratum basale*, die andere Tochterzelle beginnt ihre Differenzierung und wandert in das *Stratum spinosum*.

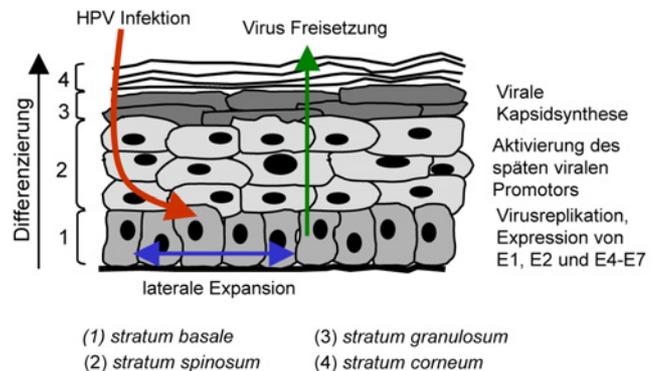


Abbildung 3: Infektionszyklus Humaner Papillomviren
(nach Stubenrauch 1999)

Damit beginnt vegetative Replikation des Virusgenoms und die Aktivierung des späten viralen Promotors. Im *Stratum granulosum* erfolgt die Synthese der viralen Kapsidproteine und die Virus-Freisetzung findet in den toten Hautschuppen des *Stratum corneum* statt.

1.3 Natürliche Immunantworten auf HPV-Infektionen

Papillomviren haben die folgenden Strategien entwickelt, um dem Immunsystem zu entkommen. Dadurch kann sich eine persistierende, chronische Infektion etablieren, die nach mehreren Jahrzehnten und in seltenen Fällen zur Entstehung von Krebs führen kann.

(i) Während des Infektionszyklus von Papillomviren kommt es in der betroffenen Zelle weder zu einem zytopathogenen Effekt noch zur Lyse. Vielmehr wird als Folge einer Infektion durch das Zusammenspiel der Onkoproteine E7, E6 und E5 (siehe A.1.1.1) Apoptose der Zellen verhindert bis die virale Replikation vervollständigt ist. Anschließend werden die Virus-beladenen Keratinozyten aufgrund der Differenzierung

zerstört und die Viren werden freigesetzt. Als Konsequenz kommt es bei HPV-Infektionen nicht zu Entzündungen und somit entsteht kein ‚Warnsignal‘ für das Immunsystem.

(ii) Keratinozyten sind keine professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APCs). APCs sind besonders effizient in der Generierung von Antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen (auch *Priming* genannt). Die Effizienz begründet sich u.a. darin, dass CD8⁺ T-Zellen durch APCs *Signal 1* (Antigenpräsentation) und *Signal 2* (kostimulatorische Signale) erfahren, welche zusammen für das *Priming* absolut notwendig sind (Matzinger, 1994) (siehe auch Abbildung 4). Keratinozyten aber können T-Zellen bestenfalls *Signal 1* vermitteln, nicht aber *Signal 2*, da ihnen kostimulatorische Moleküle wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) fehlen (Bal et al., 1990). Keratinozyten induzieren deshalb womöglich bei ihrer Antigenpräsentation T-Zell Toleranz.

(iii) Die APCs, mit denen HPV während einer Infektion am wahrscheinlichsten in Kontakt kommen, sind Langerhans Zellen, die im *stratum spinosum* lokalisiert sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen nicht durch den Kontakt mit HPV aktiviert werden (Fausch et al., 2002), was ebenfalls zur Ausbildung von Toleranz führen kann.

(iv) In Zervixkarzinomzellen ist - wie auch in anderen Tumorzellen - die Expression der *major histocompatibility complexes* (MHC) Klasse I vermindert oder sie enthalten Mutationen in den β 2-Mikroglobulin Genen (Connor and Stern, 1990; Keating et al., 1995; Garrido et al., 1997). Diese verminderte Expression der MHC Klasse I Moleküle an der Zelloberfläche korreliert mit der Ausbreitung des Tumors (van Driel et al., 1996). Generell sind für Tumore unterschiedliche Mechanismen bekannt, wie sie die MHC Klasse I Oberflächenexpression reduzieren können. Vambutas et al. zeigten zum Beispiel, dass das E7 Protein von HPV11 mit TAP-1 interagiert und somit eine verminderte Antigenpräsentation von infizierten Zellen bedingt (Vambutas et al., 2001). TAP-1 bildet zusammen mit TAP-2 den *transporter of antigen Presentation* (TAP), welcher den Eintritt von Peptiden in das Endoplasmatische Reticulum (ER) vermittelt, wo sie mit nascenten MHC Klasse I Molekülen assemblieren und über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche gelangen.

(v) Zervixkarzinomzellen können über CD95-CD95Ligand (CD95L (FasL)) Interaktion bei zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTLs) Apoptose induzieren (Contreras et al., 2000) und schützen sich somit vor der Deletion der ZTLs.

Trotz der Tatsache, dass Papillomvirus-Infektionen nicht sehr immunogen sind, gibt es zahlreiche Hinweise darauf (siehe A.1.3.1 und A.1.3.2), dass das Immunsystem eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von HPV-assoziierten Krankheiten spielt.

1.3.1. Humorale Immunantwort auf HPV-Infektionen

Bei den meisten Frauen mit zervikalen HPV-Infektionen lassen sich Antikörper nachweisen, welche spezifisch für konformative Epitope von HPV16 L1 sind (Kirnbauer et al., 1994). Solche Antikörper sind auch bei Patientinnen mit persistierenden HPV-Infektionen und CIN III Läsionen, jedoch seltener bei Patientinnen mit invasiven Karzinomen nachweisbar (Nonnenmacher et al., 1995), eine Tatsache, die im Infektionszyklus von HPV begründet ist, da im invasiven Karzinom das Virus seine produktive Infektion eingestellt hat. Ferner konnte gezeigt werden, dass invasive Zervixkarzinome mit der Präsenz von Antikörper spezifisch für die frühen Proteine E6 und/oder E7 von HPV16 bzw. HPV16 und 18 korrelieren (Muller et al., 1992; Stacey et al., 1992; Meschede et al., 1998; Lehtinen et al., 2003). Dabei zeigte sich, dass diese Antikörper als Marker für das Krankheitsstadium der Patientinnen auftraten (Jochmus-Kudielka et al., 1989; Muller et al., 1992; Meschede et al., 1998), was auf eine Antigenpräsentation als Folge der Disintegration von einzelnen Zellen hinwies, wie sie bei einem wachsenden Tumor auftritt. Allerdings zeigte sich, dass Antikörper gegen die frühen HPV-Proteine - aufgrund der geringen Spezifität - sich nicht als früher diagnostischer Marker für Gebärmutterhalskrebs eignen (Lehtinen et al., 2003). Des Weiteren wurden HPV16 E7-spezifische Antikörpertiter über einen längeren Zeitraum bei Patientinnen mit HPV-positiven, leichten bis moderaten Dysplasien untersucht (de Gruijl et al., 1996). Die höchsten Titer konnten bei Frauen detektiert werden, deren HPV-Infektion nach einiger Zeit nicht mehr nachweisbar war, während Patientinnen mit einer persistierenden Infektion häufiger sero-negativ waren.

1.3.2. Zelluläre Immunantwort auf HPV-Infektionen

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, welche die Bedeutung einer zellulären Immunantwort in der Pathogenese von HPV-assoziierten zervikalen Läsionen unterstützen. (i) Mehr als 60 % der HPV-positiven Läsionen mit der Diagnose leichte Dysplasie bilden sich spontan oder kurz nach der Entnahme einer Biopsie zurück (Nasiell, Roger, and Nasiell, 1986). Daraus wurde geschlossen, dass das Immunsystem mit viralen Proteinen in Kontakt kommt und so Regression der Läsion bewirkt. (ii) HPV-Infektionen treten verstärkt bei Immunsupprimierten (z.B. *acquired immunodeficiency syndrome* (AIDS)-Patienten oder Transplantationspatienten) auf (Maiman et al., 1990; Laga et al., 1992; Rudlinger et al., 1986). (iii) Immunohistochemische Studien von Zervixkarzinomen konnten zeigen, dass ein großer Anteil der zellulären Infiltrate von CD8 positiven ($CD8^+$) ZTLs dominiert wurde (Hilders et al., 1994). Rensing et al. konnten drei HLA-A*0201 restringente Epitope von HPV16 E7: Aminosäuren (AS) (AS 11-20, AS 82-90 und AS 86-93) (Rensing et al., 1995) identifizieren. Dies ermöglichte den Nachweis von HPV-16 E7 spezifischen ZTLs im peripheren Blut einiger Patientinnen mit Zervixkarzinomen oder zervikalen Läsionen (Rensing et al., 1996; Nimako et al., 1997), wobei die HPV-spezifischen ZTLs im peripheren Blut weniger

häufig zu finden waren als in der Population der die Tumoren infiltrierenden Lymphozyten (Evans et al., 1997). Hochaffine HPV16 E7-spezifische ZTLs finden sich sehr selten in Patientinnen mit Karzinomen oder CIN III, können aber durch die Verwendung einer sehr sensitiven Methode (HLA-Antigenpeptid-Tetramere) detektiert werden (Youde et al., 2000). (iv) Die Beteiligung der T-Helferzellen konnte bei der Rückbildung von zervikalen Dysplasien oder Zervixkarzinomen nachgewiesen werden (Nakagawa et al., 1999). Höpfl et al. untersuchten die *delayed-type hypersensitivity* (DTH) nach intradermaler Injektion von synthetischen HPV16 E7 Peptiden in CIN Patientinnen und konnten eine signifikante Korrelation zwischen der Regression der zervikalen Läsionen und dem Auftreten von T-Helferzellen feststellen (Hopfl et al., 2000).

All diese Beobachtungen sprechen für die Möglichkeit einer therapeutischen Vakzinierung, welche die Progression von HPV-assoziierten Läsionen verhindert und eine Regression der Läsionen bedingt.

2. Konzepte von HPV-Vakzinierungen

2.1 Präventive Vakzinierung

Da *high-risk* HPV-Typen das ätiologische Agens von zervikalen Dysplasien darstellen (zur Hausen, 2000), könnte die Prävention von Infektionen mit diesen Viren die Ausbildung von HPV-assoziierten Zervixkarzinomen verhindern. Eine präventive Vakzinierung ist eine große Herausforderung, da HPV-Infektionen sexuell übertragen werden, und deshalb sowohl Jungen wie Mädchen vor ihren ersten sexuellen Kontakten geimpft werden müssten (Gissmann et al., 2001). Zudem könnte aufgrund der langwierigen Pathogenese der Erfolg (die Verhinderung von Zervixkarzinomen) eines solchen Impfprogramms erst nach Jahrzehnten erkennbar werden (Plummer and Franceschi, 2002). Allerdings konnten schon die ersten Zwischenerfolge einer präventiven Vakzinierungs-Strategie aufgezeigt werden: HPV16-DNA-negative Frauen im Alter von 16-23 Jahren wurden mit sogenannten HPV16 VLPs behandelt und über mehrere Monate hinweg kolposkopisch so wie auf HPV16-DNA untersucht (Koutsky et al., 2002). Dabei konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung der VLPs sowohl eine HPV16-Infektion wie auch das Auftreten von HPV16-assoziierten CINs verhindern konnte und so wahrscheinlich immunisierte Frauen auch in den Folgejahren vor einer Zervixkarzinom-Entwicklung schützen wird.

2.2 Therapeutische Vakzinierung

Selbst wenn augenblicklich eine umfassende präventive Vakzinierung gestartet werden würde, könnten dabei Frauen, die mit *high-risk* HPV-Typen infiziert sind und möglicherweise schon klinische Symptome entwickelt haben, nicht mehr davon erfasst werden. Daher ist es zwingend erforderlich, parallel auch therapeutische Impfstoffe zu entwickeln. Im Folgenden werden einige verschiedene Ansätze von therapeutischen Vakzinen und deren Entwicklungsstand aufgeführt. Neben diesen existieren noch weitere Ansätze wie z.B. auf viralen Vektoren-basierende und DNA-basierende Vakzine, die hier jedoch nicht weiter erläutert werden.

2.2.1. Peptid-basierende Vakzine

Die Identifizierung von HPV-Peptiden (siehe auch 1.3.2), welche an MHC Klasse I Moleküle binden und somit T-Zellen über den spezifischen T-Zell-Rezeptor aktivieren, eröffnete die Möglichkeit der Entwicklung von Impfstoffen, die relativ günstig herzustellen und einfach aufzureinigen sind. In Mäusen konnte Regression von HPV16 E7 positive Tumoren (induziert durch Inokulation von syngenem HPV16 transformierten Zellen) durch die Injektion des E7₄₉₋₅₇ Peptids gezeigt werden (Feltkamp et al., 1993; Feltkamp et al., 1995). Bisher wurden zwei klinische Studien beendet, in welchen HLA-A*0201-restringente HPV16 E7-spezifische Peptide Patientinnen mit Zervixkarzinomen appliziert wurden: AS 86-93 (Steller et al., 1998) bzw. AS 11-20 und AS 86-93 (van Driel et al., 1999; Rensing et al., 2000). In der ersten Studie konnten in sieben von 12 Patientinnen E7 spezifische ZTLs detektiert werden, jedoch ohne klinische Konsequenz (Steller et al., 1998). In der zweiten Studie zeigten vier von 19 Patientinnen entweder ein stagniertes Tumorwachstum oder sogar Tumorregression (Rensing et al., 2000). Ein Nachteil der Peptid-Vakzinierung beim Menschen ist die Tatsache, dass diese vom speziellen HLA Typ abhängt, was die Anzahl der Patientinnen, die hiermit behandelt werden können, limitiert (van Driel et al., 1999; Rensing et al., 1999). Ein sehr großes Problem bei der Peptid-basierenden Vakzinierung stellt die Induktion von T-Zell Toleranz dar, welche statt des gewünschten Effekts sogar eine Verstärkung des Tumorwachstums zur Folge hat (Aichele et al., 1994; Toes et al., 1996).

2.2.2. Protein-basierende Vakzine

Aufgereinigte virale Proteine können von APCs aufgenommen werden und sowohl in den MHC Klasse II wie auch, besonders von Dendritischen Zellen (DCs), in den MHC Klasse I Präsentationsweg eingeschleust werden (siehe dazu auch 3.1). Dadurch können sie eine humorale wie auch zelluläre Immunantwort induzieren. Da lösliche Proteine aber schnell degradiert werden, sind multiple Protein-Immunisierungen

nötig, die zudem auch von Adjuvantien begleitet werden müssen, weil sie alleine kein bzw. nur eine schlechte ZTL-Antwort primen können. Die Immunisierung von Mäusen mit Glutathion-S-Transferase (GST)-HPV16 E7 Fusionsprotein konnte Mäuse, denen syngene HPV16 transformierte Zellen appliziert worden waren, vor dem Tumorwachstum schützen (Fernando et al., 1999). Mit der gleichen Vakzine wurde auch eine klinische Studie durchgeführt, bei der eine verstärkte humorale Immunantwort, aber keine ZTL Antwort detektiert werden konnte. Alle Patientinnen wiesen ein progressives Tumorwachstum während der Studie auf (Frazer IH TR, 1999). Ein anderes Fusionsprotein, bestehend aus HPV16 E7 und dem Hitzeschock-Protein Hsp65 von *Mycobacterium bovis*, zeigte bei seiner Immunisierung Erfolge bezüglich therapeutischer Effekte in Mäuse (Chu et al., 2000). In der klinischen Studie, in der acht Patienten mit schwergradigen HPV-bedingten perianalen Dysplasien mit dem Hsp65-HPV16 E7 Fusionsprotein behandelt wurden, konnte eine Verbesserung der Dysplasien festgestellt werden. Bei fünf dieser Patienten, die sich einer Operation hätten unterziehen müssen, musste nur ein geringfügiger Eingriff durchgeführt werden (Goldstone SE, 2000).

2.2.3. Chimäre Virus-ähnliche Partikel (CVLP)

HPV CVLPs bieten die Möglichkeit für die Entwicklung einer kombinierten therapeutischen-präventiven (siehe auch 2.1) Vakzine, da sie neben L1-spezifischen Antikörpern auch eine zelluläre Immunantwort, beispielsweise gegen das Protein E7, induzieren können (Greenstone et al., 1998; Peng et al., 1998; Schafer et al., 1999; Nieland et al., 1999). Dabei werden heterologe Proteine oder Peptide entweder an das Hauptstrukturprotein L1 oder das Nebenstrukturprotein fusioniert. In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung von HPV16 CVLPs, bestehend aus L1 (C-terminal um 34 AS deletiert) und den ersten 60 AS von E7 (HPV16 L1/E7₁₋₆₀) (Muller et al., 1997) (siehe Abbildung 12), in Mäusen neben einer humoralen auch eine zelluläre Immunantwort hervorruft (Schafer et al., 1999) die das Wachstum von E7-positive Tumorzellen verhindert. Kürzlich endete eine klinische Phase I Studie, in der HPV16 L1/E7₁₋₅₅ CVLPs bei Patientinnen mit HPV16-positiven CIN II/III getestet wurden (CT 1006; Auftraggeber: Medigene, Martinsried; Jochmus, persönliche Mitteilung). Einer Patientinnengruppe wurde vier Mal je 75 µg CVLPs, einer anderen Gruppe vier Mal je 250 µg CVLPs subkutan (s.c.) injiziert. Die Immunisierung hatte keine Nebenwirkungen und außer der humoralen Immunantwort gegen L1 in allen Patientinnen, konnte auch in einigen Patientinnen eine zelluläre Immunantwort gegen E7 nachgewiesen werden (siehe Tabelle 4). Obwohl die endgültige Auswertung der klinischen Parameter (Histologie, Größe der Läsion) 48 Wochen nach Beobachtung noch aussteht, kann dennoch bereits jetzt festgestellt werden, dass es keine gute Übereinstimmung zwischen der klinischen und immunologischen Antwort nach Immunisierung gibt. Möglicherweise war die ZTL Antwort insgesamt zu wenig effizient.

Immunisierung	anti-E7 Antwort			anti-L1 Antwort		
	ZTL	T _H 1	IgG	ZTL	T _H 1	IgG
75 µg CVLPs	3/11	7/11	3/12	5/11	10/11	12/12
250 µg CVLPs	2/12	6/12	9/12	6/12	10/12	12/12
Plazebo	0/10	0/12	0/12	1/10	6/10	0/12

Tabelle 4: Klinische Phase I Studie CT 1006

HPV16 positiven Patientinnen mit CIN II/III wurden an Tag 0, 2, 6 und 12 75 µg bzw. 250 µg HPV16 L1/E7₁₋₅₅ CVLPs bzw. Placebo s.c. injiziert. Die Immunantwort wurde in einem Zeitraum von 24 Wochen an folgenden Parametern überprüft: Generierung von E7-spezifischen ZTLs und T_H1 Zellen und Erhöhung des E7-spezifischen Immunglobulin G (IgG) Titers. ZTL: zytotoxische T-Zellen, T_H: T-Helferzellen (Jochmus persönliche Mitteilung)

Obwohl die Ergebnisse der klinischen Studie bei Beginn dieser Arbeit noch nicht bekannt waren, sollten rechtzeitig Möglichkeiten zur Verbesserung der zellulären Immunantwort untersucht werden.

2.2.4. Kapsomere

Ebenfalls in unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass HPV16 L1 Kapsomere L1-spezifische ZTLs hervorrufen und so Protektion und Regression von L1-positiven Tumoren in Mäusen bewirken können (Ohlschlager et al., 2003). Die Kapsomere wurden durch Expression von HPV16 L1 (mit einer Deletion der ersten 10 AS) als GST-Fusionsprotein (GST-HPV16L1ΔN10) in *Escherichia coli* (*E. coli*) und anschließender Aufreinigung hergestellt. Da Kapsomere ähnlich wie komplett assemblierte VLPs (T =7) ZTL Antworten induzierten, sind diese Ergebnisse von potentieller Relevanz bei der Entwicklung einer Vakzine, welche ebenfalls Prävention und Therapie kombiniert, denn Kapsomere sind im Vergleich zu CVLPs einfach herzustellen und können ebenso wie CVLPs heterologe Sequenzen der frühen HPV Proteine tragen. In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Modulation der Immunogenität von CVLPs auch die *in vitro* Immunogenität von Kapsomeren überprüft.

3. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten Möglichkeiten zur Verbesserung der Immunogenität von CVLPs entwickelt werden.

Um dieser Aufgabe nachzugehen, wurden *in vitro* die Aktivierung, Beladung und anschließende *cross Präsentation* von primären Dendritischen Zellen (DCs), die aus dem Knochenmark von Mäusen generiert wurden (*bone marrow derived* DCs (BMDCs)), mit CVLPs *in vitro* untersucht. Dabei wurden die Effekte von synthetischen Oligodeoxyribonukleotide (ODNs), welche unmethylierten Cytosin-Phosphat-Guanosin (CpG) Dinukleotide beinhalten (CpG ODNs), Sorbitol und die Komplexierung der CVLPs mit spezifischen IgG Antikörpern (CVLP-Immunkomplexe (CVLP-ICs)) untersucht. Im Maus-Modell wurden verschiedene Immunisierungsstrategien getestet: zum einen wurden die Antigene (CVLPs zusammen mit CpG ODNs oder Sorbitol und CVLP-ICs) direkt verabreicht zum anderen wurden syngene BMDCs injiziert, welche zuvor *ex vivo* mit den Antigenen beladen worden waren. Eine nähere Untersuchung des Antigenpräsentationswegs fand in BMDCs statt, die von TAP defizienten Mäusen stammten oder die mit Brefeldin A behandelt wurden.

Im Folgenden werden die untersuchten Komponenten (Dendritische Zellen, ICs, CpG, Sorbitol) kurz charakterisiert.

3.1 Modulation der Immunogenität von CVLPs durch BMDCs

DCs sind professionell Antigen-präsentierende Zellen (APC) und einzigartige Initiatoren primärer Immunantworten (Banchereau et al., 2000). Sie sind sehr effiziente Stimulatoren von B- und T-Lymphozyten, wenige DCs und niedrige Konzentrationen des Antigens reichen aus, um eine starke T-Zell-Antwort zu induzieren. DCs besitzen viele Möglichkeiten, um Antigene aufzunehmen: (i) durch Phagozytose können Partikel und Mikroben aufgenommen werden (Inaba et al., 1993; Moll et al., 1993; Svensson et al., 1997), (ii) durch Makropinozytose (Formung großer, Pinozytose-ähnlicher Vesikel) können extrazelluläre Flüssigkeit und Stoffe eingeschlossen werden (Sallusto et al., 1995), (iii) durch die Expression von Rezeptoren, welche eine adsorptive Endozytose vermitteln, wie z.B. C-Typ Lektin-Rezeptoren wie der Mannose Rezeptor (Sallusto et al., 1995) bzw. DEC-205, ein *orphan* Rezeptor (Jiang et al., 1995), wie auch Fc γ - und Fc ϵ -Rezeptoren (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Durch die unter (ii) und (iii) erwähnten Mechanismen können so effizient Antigene aufgenommen werden, dass pikomolare und nanomolare Konzentrationen des Antigens ausreichen (Sallusto et al., 1995).

Nicht nur die Eigenschaft Antigene hervorragend aufzunehmen macht DCs zu den leistungsfähigsten Initiatoren einer T-Zell-Antwort. Sie besitzen außerdem die Fähigkeit zur effizienten *cross* Präsentation und zu einem effizienten *cross-Priming* (erstmalig beschrieben von (Bevan, 1976)). Man versteht darunter die Stimulation und anschließende Generierung von zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen durch die Präsentation eines exogenen Antigens via MHC Klasse I Moleküle. In den meisten Zellen assoziieren MHC Klasse I Moleküle ausschließlich mit Peptiden, die von endogenen Proteinen stammen wie z.B. Tumorantigenen oder in der Wirtszelle synthetisierten Virusproteinen (Pamer and Cresswell, 1998). Die *cross* Präsentation von DCs ist deshalb so effizient, weil dadurch exogene Antigene von endosomischen Kompartimenten in das Zytosol exportiert werden können (Rodriguez et al., 1999) und so die Antigenpeptide in den konventionellen MHC Klasse I Präsentationsweg einschleust werden. Dieser beinhaltet die Beteiligung des Proteasom-Komplex und der TAP1-TAP2 Transporter, welche den Antigenpeptiden den Eintritt in das ER vermitteln, wo sie mit nascenten MHC Klasse I Molekülen assoziieren und dann als Antigen-MHC I-Komplex den Weg über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche antreten (York and Rock, 1996). Der Mechanismus des Endsom-Zytosol Transports ist nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass es sich dabei um einen neuen Membran-Transportweg handelt, der spezifisch für Dendritische Zellen ist (Rodriguez et al., 1999). Zudem werden Antigene von apoptotischen Zellen (Albert, et al., 1998) oder Antigen-Immunglobulin G Immunkomplexen (Regnault et al., 1999) nur von Dendritischen Zellen, nicht aber von Makrophagen und B-Zellen via MHC Klasse I Moleküle an ZTLs präsentiert.

Für die Initiation einer Immunantwort sind allerdings eine effiziente Antigenaufnahme und die anschließende Antigenpräsentation (*Signal 1*), nicht hinreichend. Eine Kostimulation der T-Zellen ist nötig (*Signal 2*), da das alleinige *Signal 1* Anergie und Deletion der T-Zelle zur Folge hat (Matzinger, 1994) (siehe Abbildung 4).

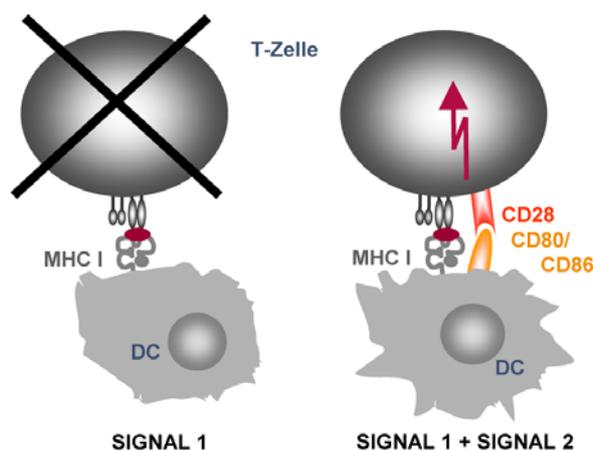


Abbildung 4: T-Zell Priming

Zur Initiation einer T-Zell-Antwort sind *Signal 1* (Antigenpräsentation) und *Signal 2* (Kostimulation) erforderlich. Das alleinige *Signal 1* führt zur Deletion der T-Zelle. Die Kostimulatorischen Signale CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) sind sehr stark auf reifen DCs exprimiert und interagieren mit CD28 (exprimiert auf T-Zellen). MHC I = MHC Klasse I

Kostimulatorische Signale wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2) sind auf reifen Dendritischen Zellen stark exprimiert (Banchereau et al., 2000), daher hängt das Ergebnis einer DC-T-Zell-Interaktion vom Reifestatus der DCs ab: reife DCs *primen* eine Immunantwort, während unreife DCs Toleranz induzieren können (Steinman and Nussenzweig, 2002).

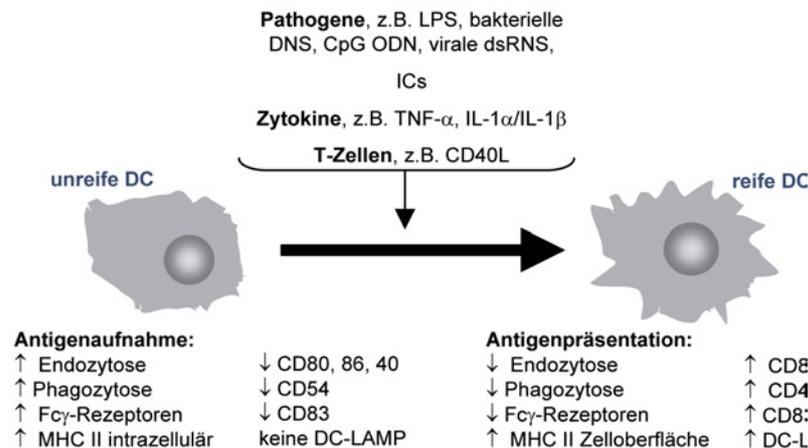


Abbildung 5: Reifung von Dendritischen Zellen

Pathogene, Zytokine und T-Zellen können Auslöser für die Reifung von DCs sein. Unreife DCs sind auf die Antigenaufnahme bzw. Reife DCs sind auf Antigenpräsentation spezialisiert und zeigen daher Merkmale auf, die mit dieser Spezialisierung in Zusammenhang stehen.

LPS: Lipopolysaccharide, CpG ODN: CpG Oligodinukleotide, dsRNA: doppelsträngige RNA, ICs: Immunkomplexe, TNF: Tumor-Nekrose-Faktor, IL: Interleukin, CD40L: CD40 Ligand, MHC II: MHC Klasse II, CCR1, CCR5, CCR6 = Chemokinrezeptoren, CD80, 86, 40 = kostimulatorische Signale, CD54 (ICAM-1): interzelluläres Adhäsionsmolekül, CD83 = CD-Marker, Funktion unbekannt, LAMP: Lysosom-assoziierte Membranproteine. (in Anlehnung an (Banchereau et al., 2000))

Verschiedene Faktoren wie Pathogene, Zytokine, Antigene aber auch T-Zellen können unreife DCs dazu veranlassen, sich phänotypischen und funktionellen Veränderungen zu unterziehen, welche zu einer APC (reife DC) zur Folge haben (Banchereau et al., 2000). In Abbildung 5 sind einige Merkmale von unreifen und reifen Dendritischen Zellen aufgeführt.

In der vorliegenden Arbeit sollten BMDCs mit CVLPs als CVLP-ICs und in Kombination mit CpG ODNs oder Sorbitol beladen werden, um durch die effiziente cross Präsentation bzw. die verstärkte Reifung der BMDCs eine starke in vitro wie in vivo Antwort von ZTLs zu erhalten.

3.2 Modulation der Immunogenität durch Immunkomplexierung der CVLPs (CVLP-IC)

Unreife DCs exprimieren Fc γ -Rezeptoren, welche Antigen-IgG Komplexe über den Fc-Teil der Antikörper binden können (Ravetch, 1994). Regnault et al. beschrieben erstmalig durch die IgG-Komplexierung von Ovalbumin (OVA) einen neuen Rezeptor-vermittelten MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg in BMDCs,

welcher TAP1-TAP2 und Proteasom-Komplex abhängig war (Regnault et al., 1999). Nach der IC-Aufnahme wurden die Antigene also in das Zytosol transferiert und dort in den MHC Klasse I Präsentationsweg eingeschleust (Rodriguez et al., 1999). Die IgG-Komplexierung führte zu der gleichen Antigenpräsentations-Stärke *in vitro* wie die 3-4 Fache Menge an löslichem unkomplexierten Protein. Zusätzlich induzierte die Fc γ -Rezeptor vermittelte Aufnahme der OVA-Immunkomplexe (OVA-ICs) eine vollständige BMDC - Aktivierung, was anhand der Oberflächenmoleküle (MHC II, CD40, CD80, CD86) nachgewiesen wurde (siehe auch Abbildung 5) (Regnault et al., 1999). Für die Induktion der DC-Reifung über Fc γ Rs bedarf es der FcR-assoziierten γ -Kette (Regnault et al., 1999). Die γ -Kette trägt ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM), das die Antigenaufnahme und die Aktivierung über Fc γ R I und Fc γ R III bedingt. Nach der Quervernetzung der Fc γ Rs durch den Liganden (Immunkomplex) wird ITAM durch Mitglieder der scr Familie der Protein-Tyrosinkinassen (PTKs) phosphoryliert. Dadurch wird Syk, ein Mitglied einer anderen PTK-Familie, aktiviert (Ravetch and Bolland, 2001). Dies zieht wiederum die Aktivierung verschiedener *downstream* Effektoren wie MAPKs etc. nach sich, welche letztendlich die Transkription von Genen induzieren, die in die Funktion und Reifung von DCs (Expression kostimulatorischer Moleküle, Expression von Zytokinen etc.) involviert sind (siehe Abbildung 6) (Ravetch and Bolland, 2001; Sedlik et al., 2003).

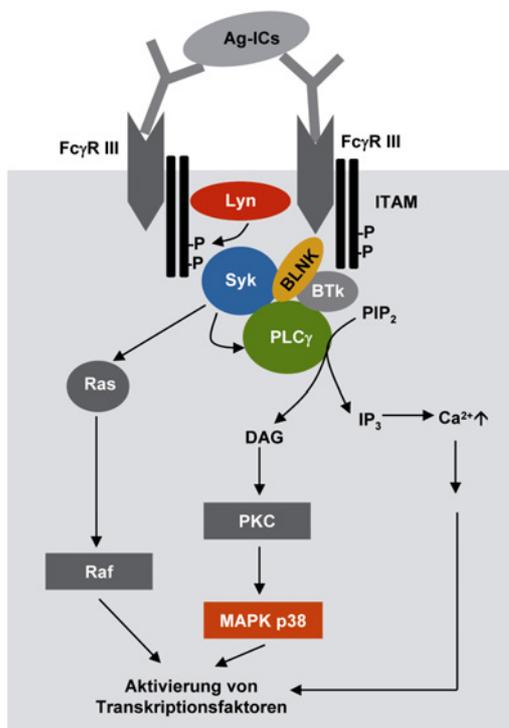


Abbildung 6: Modell der intrazellulären Signaltransduktionskaskade vermittelt durch Fc γ Rs III

Die Quervernetzung der Fc γ Rs III durch eine Quervernetzung des Liganden (Ag-ICs) löst eine Phosphorylierung von ITAM durch Lyn (scr Kinase-Familie) aus. Eine PTK, Syk, bindet an und wird durch ITAM aktiviert und aktiviert selbst PLC γ und Ras, was eine Aktivierung von Raf hat und damit von Transkriptionsfaktoren (z.B. ERK) zur Folge hat. PLC γ spaltet PIP $_2$ in DAG und IP $_3$. Während DAG PKC aktiviert, welche p38 phosphoryliert, stimuliert IP $_3$ die Erhöhung der intrazellulären Ca $^{2+}$ Konzentration, wodurch Ca $^{2+}$ -abhängige Enzyme aktiviert werden. Durch die FcR Aggregation werden auch Tec Kinasen aktiviert (z.B. Btk), welche über BLNK mit Syk und PLC γ verbunden werden. Die Signaltransduktionskaskade endet mit der Phagozytose/Endozytose, Aktivierung von Zytokinen, Ausschüttung von inflammatorischen Mediatoren und Expression von Molekülen, die in die Funktion und Reifung von DCs involviert sind. Ag-IC: Antigen-Immunkomplex; ITAM: ein *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*; PTK: Phosphotyrosinkinase; PLC γ : Phospholipase γ ; ERK: Extrazelluläres Signal-regulierte Kinase; BLNK: *B cell linker protein*; PIP $_2$: Phosphatidylinositolbiphosphat; DAG: Diacylglycerin; IP $_3$: Inositoltriphosphat; Btk: Bruton's Tyrosinkinase; PKC: Proteinkinase C; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase (nach Ravetch and Bolland, 2001; Sedlik et al., 2003)

In dieser Arbeit wurden CVLPs mit spezifischen IgGs komplexiert, um die Bindung über Fc γ -Rezeptoren an BMDCs zu vermitteln und so eine verbesserte Aktivierung dieser Zellen, cross Präsentation und anschließende Stimulation von ZTLs zu erreichen.

3.3 Modulation der Immunogenität der CVLPs durch CpG ODNs

Cytosin-Phosphat-Guanosin Dinukleotide mit einer spezifischen Sequenz innerhalb von synthetischen ODNs imitieren die immunstimulatorische Eigenschaft von bakterieller DNA (Krieg et al., 1995). *In vitro* sind sie in der Lage, die Expression von MHC II und kostimulatorischen Moleküle sowie die Ausschüttung von Interleukin (IL)-12 (aktiviert Natürliche Killerzellen und induziert die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H1 ähnlichen Zellen) von Monozyten und DCs zu induzieren (Heufler et al., 1996) (Halpern, Kurlander, and Pisetsky, 1996) (Jakob et al., 1998) (Sparwasser et al., 1998) (Hartmann, Weiner, and Krieg, 1999). *In vivo* fungieren CpG ODNs als Adjuvans, welche die T_H1 Immunantwort unterstützen (Chu et al., 1997) (Roman et al., 1997), was die Tumorphotektion verstärken kann, wenn die CpG ODNs zusammen mit dem Antigen verabreicht wurden (Weiner et al., 1997). CpG ODNs binden an den *Toll-like* Rezeptor 9 (TLR9) (Hemmi et al., 2000), welcher auf murinen und humanen DCs exprimiert ist (nur auf humanen plasmazytoiden DCs (Krug et al., 2001)). Dadurch wird eine Signaltransduktions-Kaskade ausgelöst, die letztendlich in der Expression von Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen endet (Kaisho and Akira, 2002) (Hacker, Redecke, and Hacker, 2002). Alle TLRs teilen sich einen gemeinsamen strukturellen Aufbau: der N-Terminus besteht aus Leucin-reichen Wiederholungen und der C-terminalen Signaldomäne TLR/IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne (O'Neill, 2000). TLR9 befindet sich wahrscheinlich normalerweise Membran-gebunden in Vesikeln in der Zelle, mit der Bindungsstelle für CpG ODNs im Inneren der Vesikel und mit der TIR Domäne Ende außen im Zytosol. Diese Vesikel könnten mit Phagosomen fusionieren, in welchen CpG ODNs auf noch ungeklärtem Wege möglicherweise prozessiert werden. (Hacker, Redecke, and Hacker, 2002).

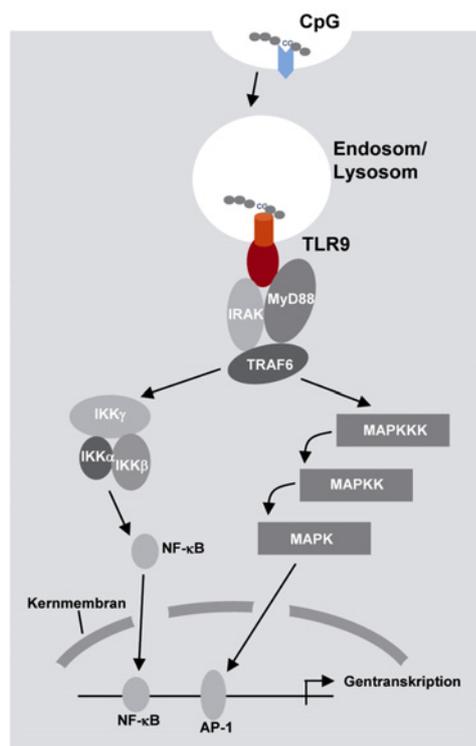


Abbildung 7: Modell der TLR9-Signaltransduktionskaskade

CpG ODNs binden an einen Zelloberflächenrezeptor (unbekannt) und werden so in die Zelle aufgenommen. CpG ODNs treten in den Endosomen/Lysosomen mit TLR9 in Kontakt, dessen TIR-Domäne ins Zellinnere ragt. Es bildet sich ein Signalkomplex aus MyD88, IRAK und TRAF6, der zelluläre Kinasen aktiviert (IKK und MAPK). Die Signaltransduktionskaskade endet in der Transkription von Genen, die für die Reifung der BMDCs essentiell ist. TLR9: *toll-like* Rezeptor 9; TIR: TLR/IL-1 Rezeptor; MyD88: myeloider Differenzierungsfaktor 88; IRAK: Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase; TRAF6: Tumornekrosefaktor Rezeptor-assoziiierter Faktor 6; IKK: IκB-Kinase; MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; NF-κB: *nuclear* Faktor-κB. (nach Hacker, Redecke, and Hacker, 2002)

Die Bindung an TLR9 hat die Bildung eines Signalkomplexes bestehend aus dem myeloiden Differenzierungsfaktor 88 (MyD88), IL-1 Rezeptor-assoziierte Kinase (IRAK) und TNF Rezeptor-assoziiertes Faktor 6 (TRAF6) zur Folge. Durch diesen Signalkomplex werden zelluläre Kinasen aktiviert wie I κ B-Kinase (IKK) und Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), deren Signaltransduktion in einer Expression von Genen endet, die in der Reifung von DCs involviert sind (siehe Abbildung 7) (Hacker, Redecke, and Hacker, 2002).

In dieser Arbeit sollte durch die Beladung von BMDCs mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs die Aktivierung und in vitro cross Präsentation von BMDCs gesteigert werden. Die Immunantwort in Mäusen sollte durch Immunisierung mit syngenen BMDCs, welche ex vivo mit CVLPs in der Kombination mit CpG ODNs beladen worden waren, ebenfalls verbessert werden.

3.4 Modulation der Immunogenität der CVLPs durch Sorbitol

Sorbitol ist ein osmotisch aktiver, nichtionischer Zuckeralkohol, der zum einen als Zuckeraustauschstoff (E420) (<http://www.sabona.de/Hilfsstoffe/Sorbit.htm>), der in unserer Nahrungskette wie auch als Stabilisator oder Konservierungsstoff mit antibakterieller Wirkung in Salben, die Antibiotika und Glukokortikoide enthalten, zu finden ist (Rodriguez et al., 2002). Diesbezüglich galt Sorbitol lange als inerte Komponente. Kürzlich konnte jedoch gezeigt werden, dass *in vitro* Sorbitol in Keratinozyten hyperosmotischen Stress auslöst, der eine Vielzahl von Kinasen-Aktivierungen nach sich zieht. So wird beispielsweise über andere Kinasen die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 aktiviert, die wiederum eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und andere Kinasen aktiviert (siehe Abbildung 8) (Alonso, persönliche Mitteilung, (Cheng et al., 2002)).

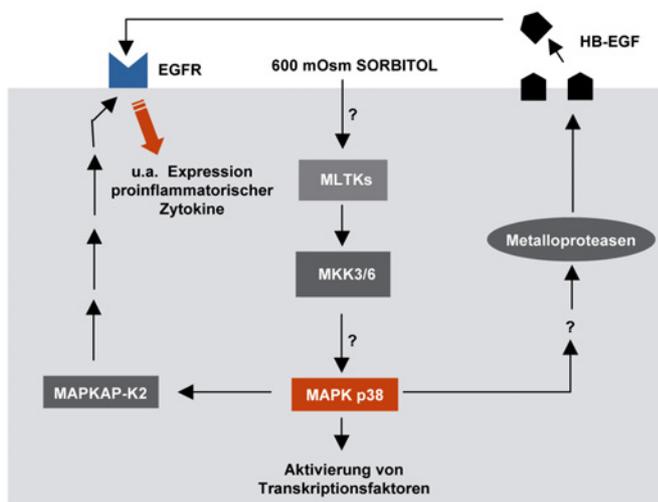


Abbildung 8: Aktivierung von MAPK p38 durch hyperosmotischen Stress

Hyperosmotischer Stress (600 mM Sorbitol) löst über MLTKs und MKK3/6 eine Aktivierung der MAPK p38 aus. MAPK p38 aktiviert u. a. Metalloproteasen, die eine Freisetzung von HB-EGFs veranlassen, welche dann an den EGFR binden, dessen Expression ebenfalls durch MAPK p38 hochreguliert wird. Die Aktivierung von EGFR ist u.a. mit der Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung, Inhibition der Apoptose und der Expression von proinflammatorischen Zytokinen assoziiert.

MAPK: Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MLTKs: *Mixed-lineage kinases (MLKs)-like* Mitogen-aktivierte Triplekinase; MKK3/6: MAPK Kinase 3/6; HB-EGFs: *heparin-binding growth factor (EGF)-like growth factors*; EGFR: *epidermal growth factor receptor*; MAPKAP-K2: Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase 2

Diese *downstream* gelegenen Substrate von p38 MAPK sind u.a. in die Produktion von Zytokinen wie IL-6 (u.a. in Wachstum und Differenzierung von B- und T-Zellen involviert), TNF α (löst u.a. lokale Entzündung und Endothelaktivierung aus) und Interferon (INF) γ (u.a. Aktivierung von Makrophagen und DCs, erhöht MHC-Expression) involviert (Servant, Grandvaux, and Hiscott, 2002). Des Weiteren zieht die Aktivierung von p38 MAPK eine Membranfreisetzung von *heparin-binding epidermal growth factor (EGF)-like growth factors* (HB-EGFs) nach sich (Alonso, persönliche Mitteilung), welche folglich an EGF-Rezeptoren (EGFRs) binden können und sie somit aktivieren (Shin et al., 2003). Die Expression von EGFR selbst wird ebenfalls durch p38 MAPK hochreguliert (Alonso, persönliche Mitteilung). Die EGFR Aktivierung ist u.a. mit der Kontrolle der Zellproliferation und -differenzierung, Inhibition der Apoptose und der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen assoziiert (Yarden and Sliwkowski, 2001).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die Behandlung von CVLP-beladenen BMDCs mit Sorbitol zu einer gesteigerten Aktivierung der BMDCs und zu einer verbesserten cross Präsentation führen kann. Durch die Immunisierung von syngenen BMDCs, welche zuvor mit CVLPs beladen und mit Sorbitol behandelt worden waren, sollte analysiert werden, ob auch das in vivo Priming von ZTLs verbessert werden kann.

3.5 Untersuchung des MHC Klasse I Präsentationswegs von CVLPs und CVLP-ICs

Wie unter 0 schon erwähnt, ist *cross* Präsentation von DCs deshalb so effizient, weil in DCs exogene Antigene über einen potentiellen neuen Transporter von endosomischen Kompartimenten in das Zytosol exportiert und so in den konventionellen MHC Klasse I Präsentationsweg eingeschleust werden (Rodriguez et al., 1999). Der konventionelle MHC Klasse I Präsentationsweg beinhaltet eine Degradation des Antigens mittels Proteasom und den anschließenden Transport der Antigenpeptide mittels TAP in das ER, wo sie mit nascenten MHC Klasse I Moleküle assemblieren. Diese stabilen trimären Komplexe, bestehend aus der Schwere Kette, β -Mikroglobulin und dem Antigenpeptid werden über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert, wo sie mit spezifischen T-Zellrezeptor interagieren (York and Rock, 1996) (Rock, 1996).

Brefeldin A (von *Penicillium brefeldianum*) inhibiert reversibel die Translokation von Proteinen in Eukaryotischen Zellen (Misumi et al., 1986). Während unter BFA Einfluss der Proteinexport aus dem ER blockiert ist (Fujiwara et al., 1988) findet gleichzeitig ein umfangreicher retrograder Transport von Golgi-Komponenten in das ER statt, was zu einer kompletten Auflösung der Golgi-Struktur führt (Lippincott-Schwartz et al., 1990). Aufgrund dieser Eigenschaften ist BFA ein spezifischer Inhibitor der konventionellen

Antigenprozessierung für MHC Klasse I-restringente T-Zell-Erkennung (Yewdell and Bennink, 1989).

Um zu überprüfen, ob die von CVLPs stammenden Antigenpeptide über den konventionellen MHC Klasse I Präsentationsweg cross präsentiert werden, sollten BMDCs aus dem Knochenmark TAP-defizienter Mäuse generiert oder BMDCs mit BFA behandelt, mit CVLPs beladen werden und anschließend die cross Präsentation in vitro überprüft werden.

Fragestellung:

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die molekularen Grundlagen zur Steigerung der Immunogenität von CVLPs in der Maus untersucht werden.

Im einzelnen sollte dazu folgende Fragen beantwortet werden:

- *Können CVLPs DCs aktivieren?*
- *Können DCs nach Beladung mit CVLPs HPV Antigene präsentieren?*
- *Führt diese Präsentation zur Aktivierung von T Zellen in vitro und in vivo?*
- *Lässt sich die DC-vermittelte Aktivierung von T Zellen steigern?*

Durch Aktivierung von für Antigen-präsentierende Zellen spezifischen Molekülen?

Durch Aktivierung allgemeiner Signalkaskaden?

B. Material

1. Chemische Reagenzien

Adenosin 5'-Triphosphat (ATP).....	Sigma, Deisenhofen
7-Amino-Actinomycin D (7-AAD).....	PharMingen, San Diego, CA, USA
Acrylamid/Bisacrylamid.....	Roth, Karlsruhe
Acrylamid-Mix (30%).....	Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxosulfat (APS).....	Roche Diagnostics, Mannheim
Amoniumchlorid.....	Merck, Darmstadt
Ampicillin.....	Roche Diagnostics, Mannheim
Bacto-Agar.....	Difco, Hamburg
Bacto-Hefe Extrakt.....	Difco, Hamburg
Bacto-Trypton.....	Difco, Hamburg
b-Cumarinsäure.....	Sigma, Deisenhofen
Biotin.....	Sigma, Deisenhofen
b-Mercaptoethanol.....	Merck, Darmstadt
Bovin Serum Albumin (BSA)	Sigma, Deisenhofen
Carbenicillin.....	Sigma, Deisenhofen
Casein.....	Sigma, Deisenhofen
Cäsiumchlorid.....	Roth, Karlsruhe
Chloramphenicol.....	Roche Diagnostics, Mannheim
Citronensäure-Monohydrat.....	Merck, Darmstadt
Code Blue Reagenz.....	Pierce, Rockford, USA
Deoxycholsäure.....	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
EDTA, Natriumsalz.....	Merck, Darmstadt
Ethanol.....	Merck, Darmstadt
Glycin.....	GERBU, Gaiberg
Glyzerin	Roth, Karlsruhe
Harnstoff.....	Sigma, Deisenhofen
HEPES.....	Roth, Karlsruhe
Isopropanol.....	Riedel de Haën, Seelze
Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktose (IPTG)	Sigma, Deisenhofen
Kaliumdihydrongenphosphat.....	Merck, Darmstadt
Kalziumchlorid.....	Sigma, Deisenhofen
Lipopolysaccharid (LPS) von E. coli.....	Sigma, Deisenhofen
Luminol.....	Sigma, Deisenhofen
Magermilchpulver.....	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid.....	Merck, Darmstadt
Manganchlorid.....	Merck, Darmstadt
Methanol.....	Riedel de Haën, Seelze
Metofane (Methoxyfluran) (nicht mehr erhältlich)	Pitman-Moore Inc., USA
Monensin.....	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat.....	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid.....	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat.....	Gibco BRL, Eggstein
NP40 Detergenz.....	Sigma, Deisenhofen
PMSF.....	Roche Diagnostics, Mannheim
Pokeweed Mitogen.....	Sigma, Deisenhofen
Protease-Inhibitoren, komplett EDTA-frei	Roche Diagnostics, Mannheim
Gel Code Blue Reagenz.....	Pierce, Rockford, IL, USA
Saccharose.....	Merck, Darmstadt
Salzsäure.....	Merck, Darmstadt

Schwefelsäure.....	Merck, Darmstadt
SDS.....	GERBU, Gaiberg
Sorbitol.....	Sigma, Deisenhofen
Streptavidin-PE.....	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
TEMED.....	Serva, Heidelberg
TMB (Tetramethylbenzidin)	Serva, Heidelberg
Tris.....	Roth, Karlsruhe
Triton X-100.....	GERBU, Gaiberg
Trypanblau.....	Sigma, Deisenhofen
Uranylacetat.....	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid.....	Sigma, Deisenhofen

2. Verbrauchsmaterialien

Eppendorf-Gefäß 1,5 ml.....	Eppendorf, Hamburg
24-Loch Platte (Zellkultur)	Costar, Bodenheim
Beckmann Zentrifugen-Röhrchen 25x89 mm.....	Beckmann, München
96-Loch ELISA Platten.....	Falcon, über Becton Dickinson, Heidelberg
96-Loch Rundbodenplatte (Zellkultur)	NUNC, Roskilde, DK
Dialysefilter 0,025 µm, Typ VS.....	Millipore, Eschborn
Edelstahlnetze (4 x4 cm, 0,5 mm Maschenweite)	DKFZ, Heidelberg
Einmalspritze 1 ml, steril.....	Braun, Melsungen
Einweg Handschuhe.....	Meditrade, Baxter, Thetford, UK
Festphasen-Szintillationsplatte (Luma-plate)	Packard, Bioscience, Meriden, USA
Frischhaltefolie.....	Melitta, Minden
Geltrocken-Folie.....	Promega, Mannheim
Glasfiber-Matten für Cell Harvester.....	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Kanülen (0,5 x 25), steril.....	Becton Dickinson, Drogheda, Irland
Kanülen (0,4 x 19), steril.....	Becton Dickinson, Fraga, Spanien
Kryoröhrchen 1,0 ml.....	Nalge, Rochster, USA
Kupfernetzchen (Maschengröße 300).....	Plano, Wetzlar
Micronic Polypropylen-Röhrchen 1,4 ml.....	Integra, Bioscience, Fernwald
Nitrozellulose Transfermembran.....	Schleicher&Schuell, Dassel
Pasteurpipetten.....	WU, Mainz
Petrischalen groß (Durchmesser 9,4 cm)	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen klein (Durchmesser 6 cm)	Greiner, Frickenhausen
Petrischalen klein (Durchmesser 3,5 cm)	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen.....	Steinbrenner Laborsysteme, Eberbach
Quickseal-Zentrifugenröhrchen.....	Beckmann, München
Röhrchen 15 ml (Plastik mit Schraubverschluss), steril.....	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen 50 ml (Plastik mit Schraubverschluss), steril.....	Greiner, Frickenhausen
96-Loch Platte (MultiScreen-HA Sterile Plates).....	Millipore, Eschborn
PP-Rundbodenröhrchen steril 14 ml.....	Greiner, Frickenhausen
Präzisions-Dispensertips (Ritips) 100 µl, 50 µl, 25 µl.....	Ritter, Schwabmünchen
Röntgenfilme X-Omat Blue.....	Kodak/NEN Life Science Prod., Köln
Scintillationswachs.....	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Spritze 2ml, steril.....	Becton Dickinson, Fraga, Spanien
Spritzenstempel.....	Terumo, Frankfurt Main
Sterilfilter; 0,2 µm; 0,45 µm.....	MembraPure, Lörzweiler
Sterilfiltrationsapparatur, Bottle-top-Filter.....	Nalgene, Rochester, USA
Whatman 3 MM Papier.....	Schleicher&Schuell, Dassel
Zellkulturflasche 175 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche 25 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturflasche 80 cm ²	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber 23 cm, steril.....	Nunc, Roskilde, USA

3. Geräte und Rotoren

3.1 Zentrifugen

Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge.....	Du Pont, Bad Nauheim
GSA Festwinkelrotor	
F28/50 Festwinkelrotor	
Beckmann XL 70 Ultrazentrifuge	Beckmann, Palo Alto, CA, USA
SW 28 Festwinkelrotor	
Ti70- Ausschwingrotor	
Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R.....	Heraeus, Hanau
Röhrchen-Einsatz 15ml und 50 ml	
96-Loch Rundbodenplatten- Einsatz	
Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge, 5417R)	Eppendorf, Hamburg

3.2 Sonstige Geräte

„French Press“.....	Avestin, Ottana, Kanada
¹³⁷ Cs-Quelle (Gammacell 1000)	MDS Nordion, Kanata, Kanada
-80°C-Kühlschrank.....	Labotec, Göttingen
Cell harvester.....	Dunn, Asbach
Doppel-Elektrophorese Kammer-Vertikal MBT70EL.....	NeoLab Migge, Heidelberg
(10 x 15 cm Proteingele)	
Durchflusszytometer, FACSort®	Becton Dickinson, Heidelberg
Eismaschine AF-3.....	Scotsman, Glasgow, Schottland
Elektroblot Apparatur, Semidry-Transfer Cell.....	Biorad, München
Elektronenmikroskop EM 10.....	Zeiss, Oberkochen
ELISA-Reader, Titertek Multiskan MKII.....	Labsystems, Turku, Finnland
ELISPOT-Reader.....	AID, Autoimmun Diagnostika, Strassberg
Kolben mit Schikane.....	über Dunn Labortechnik, Asbach
Laborwaage Basic.....	Satorius Göttingen
Lichtmikroskop.....	Zeiss, Oberkochen
Magnetrührer (heizbar)	Janke/Kunkel, Stauffen
Microbeta-Zähler (Microbeta Trilux 1450)	Wallac, Turku, Finnland
Mikrowelle.....	Bosch, Labotec, Göttingen
Multikanalpipette.....	Abimed, Langenfeld
Multistep-Pipette.....	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer.....	Migge, Heidelberg
Pinzette.....	Dimedda, Tuttlingen
Pipetboy.....	IBS Integra Bioscience, Fernwald
Pipettierhilfen Gilson, 10, 20, 100, 1000 µl.....	Gilson/Abimed, Langenfeld
Röntgenfilm Expositionskassetten.....	Kodak, Stuttgart
Schere.....	Dimedda, Tuttlingen
Spannungsgerät Powersupply EPS 3500.....	Pharmacia Biotech, Freiburg
Sterile Werkbank, Bio Gard Hood.....	Labotec, Göttingen
Stickstofftank „Chronos“.....	Messer, Krefeld
Thermomixer.....	Eppendorf, Hamburg
Ultraschallgerät, Sonifier B-12.....	Branson, Danbury, CT, USA
Vortex „Reax Top“.....	Heidolph, Kelheim
Wasserbad Thermomix U.....	Braun, Melsung

Zellinkubator (Steri-cult 200 incubator) Labotec, Göttingen

4. Verwendete Kits

SBA Clonotyping System III..... Southern Biotechnology Associates (SBA) -
Birmingham, USA; über Dunn, Asbach
Cytotfix/Cytoperm™ Kit..... BD Pharmingen, San Diego CA, USA

5. Radiochemikalien

[methyl-³H]-Thymidin..... Amersham, Freiburg
Na₂⁵¹CrO₄..... NEN DuPont, Bad Homburg

6. Antikörper

6.1 Primärantikörper

Bezeichnung	Typ	Spezifität	Einsatz in dieser Arbeit	Bezugsquelle/Referenz
16L1 VII 24.49.10.17.7 (MM3)	Maus monoklonal, IgM	anti HPV 16 L1	Typisierung	Martin Müller, DKFZ Heidelberg
16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4)	Maus monoklonal, IgG2a	anti HPV 16 L1	Herstellung von CVLP-ICs	Martin Müller, DKFZ Heidelberg
16L1 25/B subcl. B2 (MM5)	Maus monoklonal, IgG1	anti HPV 16 L1	Typisierung	Martin Müller, DKFZ, Heidelberg
16L1 1.4.7.22 (MM7)	Maus monoklonal, IgG1	anti HPV 16 L1	Herstellung von CVLP-ICs	Martin Müller, DKFZ, Heidelberg
(MM12)	Maus monoklonal, IgG1	anti HPV 16 L1	Typisierung	Martin Müller, DKFZ, Heidelberg
25/C	Maus monoklonal	anti HPV 16 L1 Kapsomere und Kapside (konformationsspez.)	ELISA 1:300; FACS 1:100	Muller et al., 1997
CVLP-spezifisches Maussereum	Maus polyklonal	anti CVLPs	Herstellung von CVLP-ICs	s.S. 38
4543	Kaninchen polyklonales	anti HPV 16 L1	ELISA 1:3000; FACS 1:300	Muller et al., 1997
Cam Vir-1	Maus monoklonal	anti HPV 16 L1231-245	Western Blot 1:2000	McLean et al., 1990; PharMingen, San Diego, CA, USA
anti HPV16 E7 (E7 Triton)	Maus monoklonal	anti HPV 16 E74-9	Western Blot 1:2000	Muller et al., 1997; Triton, Alameda, CA, USA
FITC anti-Maus CD8a (Ly-2)	Ratte monoklonal	anti Maus CD8a	FACS 1:100 (MHC-I Tetramer)	PharMingen, San Diego, CA, USA

PE anti-Maus CD8a (Ly-2)	Ratte monoklonal	anti Maus CD8a	Färbung) FACS 1:100 (intrazelluläre IFN γ -Färbung)	PharMingen, San Diego, CA, USA
Cy-Chrome TM anti-Maus CD4 (L3T4)	Ratte monoklonal	anti Maus CD4	FACS 1:100 (intrazelluläre IFN γ -Färbung)	PharMingen, San Diego, CA, USA
PE anti-Maus CD3 ϵ	Ratte monoklonal	anti Maus CD3 ϵ	FACS 1:100 (MHC-I Tetramer Färbung)	PharMingen, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II) 2.4G2	Ratte monoklonal	anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ R III/II)	FACS 1:100	PharMingen, San Diego, CA, USA
anti-Maus CD40	Ratte monoklonal	anti Maus CD40	FACS 1:50	Caltag, Burlingame, CA, USA
anti Maus CD80	Ratte monoklonal	anti Maus CD80	FACS 1:50	Caltag, Burlingame, CA, USA
anti Maus CD80 PE	Ratte monoklonal	anti Maus CD80	FACS 1:50	Caltag, Burlingame, CA, USA
anti-Maus CD54	Hamster monoklonal	anti Maus CD54	FACS 1:50	Caltag, Burlingame, CA, USA
anti Maus MHC II (K25-8.7)	Ratte monoklonal	anti Maus MHC Klasse II	FACS 1:50	Gerhard Moldenhauer, freundlicherweise zur Verfügung gestellt
anti-Maus IFN γ FITC	Ratte monoklonal	anti Maus IFN γ	FACS 1:50 (intrazelluläre IFN γ -Färbung)	Caltag, Burlingame, CA, USA
anti-Maus IFN γ (R4-6A2)	Ratte monoklonal	anti Maus IFN γ	ELISPOT 1:500	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA
anti-Maus IFN γ -Biotin (XMG1.2)	Ratte monoklonal	anti Maus IFN γ	ELISPOT 1:500	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

6.2 Sekundärantikörper

Bezeichnung	Einsatz in dieser Arbeit	Bezugsquelle
Ziege-anti-Kaninchen IgG HRP-Konjugat	1:5000 ELISA	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus IgG HRP-Konjugat	1:5000 ELISA, 1:5000 Western Blot	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt	FACS, 1:100	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Maus FITC gekoppelt	FACS, 1:100	Dianova, Hamburg
Ziege-anti-Kaninchen Cy3 gekoppelt	FACS, 1:100	Dr. Michael Pawlita, freundlicherweise zur Verfügung gestellt
Ziege F(ab') ₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt	FACS, 1:100	Caltag, Burlingame, CA, USA

7. Proteinmarker

Protein-Größenstandard..... Biorad, München

8. Puffer und Lösungen

ACT-Puffer (Erythrozytenlyse)	17 mM 160 mM	Tris NH ₄ Cl, pH 7,2
Elektrophorese-Puffer (SDS-Gelelektrophorese)	12,5 mM 100 mM 0,1 %	Tris Glycin SDS
EMBL-Puffer (Western Blot)	40 mM 39 mM 1,3 mM 20 %	Tris/HCl Glycin SDS Methanol pH-Wert mit NaOH auf 9,2 einstellen
Extraktionspuffer (Aufschluss von Insektenzellen)	10 mM 50 mM 150 mM 0,01 % 20 mM 1 mM	MgCl ₂ CaCl ₂ NaCl Triton X-100 HEPES, pH 7,4 PMSF
FACS-Puffer	3 % 0,02 %	FCS NaN ₃ in PBS, pH 7,5
HS-Puffer	149 mM 1 mM 0,5 mM	NaCl HEPES KCl, pH 7,2
PBS-Puffer	140 mM 2,7 mM 8,1 mM 1,5 mM	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄
Probenpuffer 2 x	1,25 ml 1,7 ml 6,8 ml 100 µl 100 µl 10 µl	1 M Tris/HCl, pH 6,8 30 % Acrylamid-Mix H ₂ O bidest 10 % SDS 10 % APS TEMED
Brefeldin A (BFA)-Lösung [1 mg/ml]	50 mg	BFA ad 50 ml EtOH
CsCl-Lösung (57,5 % (w/v))	4,7 g ad 8 ml	CsCl Extraktionspuffer (ohne Triton!))
ECL-Lösung	1,25 mM 62 µl ad 200 ml	Luminol H ₂ O ₂ 0,11 M Tris/HCl, pH 8,6 (unmittelbar vor Gebrauch)
ELISPOT Substrat-Lösung (BCIP/NBT)		Sigma, Deisenhofen
Magermilch-Lösung (1 % (w/v))	5 g ad 500 ml	Magermilchpulver PBS

Magermilch-Lösung (2,5 % (w/v))	12,5 g ad 500 ml	Magermilchpulver PBS
Magermilch-Lösung (5 % (w/v))	25 g ad 500 ml	Magermilchpulver PBS
Monensin-Lösung	3 mM	Monensin in EtOH
Saccharose-Lösung (40 % (w/v))	4 g ad 10ml	Saccharose H ₂ O
Substrat-Lösung (ELISA)	9,8 ml 0,1 ml 0,2 ml 10 µl	0,1 M Na-Acetat 0,1 Citronensäure TMB (100 mg in 10 ml DMSO) (unmittelbar vor Gebrauch) 30 % H ₂ O ₂ (unmittelbar vor Gebrauch)
Verstärker-Lösung	11 mg ad 10 ml	β-Cumarinsäure DMSO

9. Peptide

Bezeichnung	Sequenz	Stammlösung	Bezugsquelle
HPV 16 E7 ₄₉₋₅₇	RAHYNIVTF	100 µM	DKFZ, Heidelberg
HPV 16 L1 ₁₆₅₋₁₇₃	AGVDNRECI	100 µM	DKFZ, Heidelberg
Ovalbumin (gallus gallus)	SIINFEKL	100 µM	DKFZ, Heidelberg

10. Adjuvantien

CpG ODN [10,8 mg/ml] (ODN-1826): 5'-TCC ATG ACG TT CTG ACG TT-3'	Coley, Wellesley, MA, USA
LPS-Vorratslösung [1 mg/ml]	Sigma, Deisenhofen
Sorbitol [3 M]	Sigma, Deisenhofen
Pokeweed Mitogen.....	Sigma, Deisenhofen

11. Biologische Materialien

11.1 Enzym

Streptavidin-alkaline Phosphatase..... BD Pharmingen, San Diego CA, USA

11.2 Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Organismus	Gewebe	Beschreibung	Referenz
B16F10	Maus (C57BL/6J)	Haut, Melanom	Melanom Zell-Linie	(Fidler, 1975)
BMDCs	Maus (C57BL/6)	Knochenmark	= 'bone marrow derived dendritic cells'; primäre Dendritische Zellen, isoliert aus dem von C57BL/6 Mäusen	(Lutz et al., 1999) s. S. 35
BMDCs TAP-/-	Maus (C57BL/6) xxx	Knochenmark	= 'bone marrow derived dendritic cells'; primäre Dendritische Zellen, isoliert aus dem von C57BL/6 Mäusen	s. S. 35
CTL-2	Maus (C57BL/6)		zytotoxische T-Zellen, Proliferationstest	(Gillis and Smith, 1977)
JAWS II	Maus (C57BL/6)	Knochenmark	immortalisierte, unreife Dendritische Zellen, Monocyten	Dr. MacKay ZymoGenetics, Seattle, WA
Milzzellen	Maus (C57BL/6)	Milz		s. S. 33
Rattenmilzzellen	Ratte	Milz	zur Herstellung des Con A Überstands	s. S. 33
RMA	Maus (C57BL/6)	Thymom	z.B. zur Restimulierung der ZTLs	(Ljunggren and Karre, 1985)
RMA-E7	Maus (C57BL/6)	Thymom	RMA Zellen, stabile Transfektion mit HPV16 E7	(Speidel et al., 1997)
RMA-S	Maus (C57BL/6)	Thymom	RMA Zellen ohne funktionellen 'transporter of antigen presentation' (TAP)	(Ljunggren et al., 1990)
Sf9	<i>Spodoptera frugiperda</i>	Eierstock	Insektenzellen zur Virusamplifikation	(Vaughn et al., 1977)
TN HIGH five	<i>Trichoplusia ni</i>		Insektenzellen zur Expression von CVLPs nach Bakulovirusinfektion	Invitrogen, Karlsruhe
E7 oder L1 spezifische zytotoxische T-Zellen	Maus (C57BL/6)	Milz (Thymus)	naive CD8 positive T-Zellen, in vitro oder in vivo generiert durch CVLP Immunisierung	generiert durch Immunisierung mit CVLPs
OVA spezifische zytotoxische T-Zellen	Maus (C57BL/6)	Milz (Thymus)	naive CD8 positive T-Zellen, in vitro oder in vivo generiert durch OVA (Ovalbumin) Immunisierung	erhalten von Heidrun Guthöhrlein, DKFZ Heidelberg

11.2.1. Kukturmedium für Eukaryotischen Zellen

Zellen	Medium
B16F10	RPMI-Medium
BMDCs	BMDC-Medium
CTL-2	T-Zell-Medium
JAWS II	BMDC-Medium
Milzzellen	T-Zell-Medium
Rattenmilzzellen	DMEM kompl. Medium

Zellen	Medium
RMA	RPMI-Medium
RMA-E7	RPMI-Medium + Geneticin
RMA-S	RPMI-Medium
Sf9	TMN-FH kompl Medium
TN HIGH five	Ex-cell 450 kompl. Medium
T-Zellen	T-Zell-Medium

BMDC-Medium	RPMI 1640 / 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 10 % B16F10-Überstand	Gibco BRL, Eggstein
DMEM kompl. Medium	Dulbecco's MEM / 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggstein
Ex-cell 450 kompl. Medium	Ex-cell 450 1 x Antibiotic/Antimycotic	Gibco BRL, Eggstein
TC-1-Medium	Dulbecco's MEM / 2 mM L-Glutamin 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 30 mM β -Mercaptoethanol 100 mM Natriumpyruvat 1x MEM-non-essential AA (nicht essentielle AS)	Gibco BRL, Eggstein
RPMI-Medium	RPMI 1640 / 2 mM L-Glutamin 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Eggstein
RPMI-Medium + Geneticin	RPMI 1640 / 2 mM L-Glutamin 5 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 0,8 % (v/v) Geneticin (G418)	Gibco BRL, Eggstein
TNM-FH kompl.	TMN-FH-Medium 10 % FCS 1 x Antibiotic/Antimycotic	Sigma, Deisenhofen
T-Zell-Medium	Minimal Essential Medium Eagle, alpha modification (α MEM) 10 % FCS 2,5 % (v/v) Concanavalin A induzierter Rattenmilzüberstand 25 mM Methyl- α -Mannopyranosid 2 mM L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin	Sigma, Deisenhofen

11.2.2. Medienzusätze

B16F10-Überstand (GM-CSF).....	s.S. 35
Concanavalin A induzierter Rattenmilzüberstand.....	s.S. 34
FCS (Fötale Kälberserum, 30 Min bei 56° C inaktiviert).....	Gibco BRL, Eggstein
Geneticin (G418).....	Gibco BRL, Eggstein
Hygromycin B.....	Roche Diagnostics, Mannheim
L-Glutamin.....	Gibco BRL, Eggstein
Methyl- α -Mannopyranosid.....	Sigma, Deisenhofen
MEM-non-essential AA.....	Gibco BRL, Eggstein
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10.000 μ g/ml)-Lsg....	Gibco BRL, Eggstein
Trypsin/EDTA Lösung.....	Gibco BRL, Eggstein
100x Antibiotic/Antimycotic.....	Gibco BRL, Eggstein

11.3 Bakulovirus-Vorräte

Bezeichnung	Expression von	Referenz
A194	HPV16L1 Δ CE7 ₁₋₅₅	Dr. M. Müller, DKFZ
A246	HPV16L1 Δ CE7 ₁₋₆₀	Dr. M. Müller, DKFZ
A245	HPV16L1 Δ C	Dr. M. Müller, DKFZ
A107	HPV16L1 Δ CE7 ₁₋₆₀	Dr. M. Müller, DKFZ
wt	(Negativkontrolle)	BD Pharmingen, San Diego CA, USA

11.4 Kapsomere

HPV16L1(Δ N10)..... freundlicherweise erhalten von Dr. Kerstin Dell, DKFZ Heidelberg

11.5 Tiere

C57BL/6 Mäuse..... Charles River WIGA
 C57BL/6 TAP^{-/-}..... freundlicherweise erhalten von Prof. Dr. Hämmerling, DKFZ, Heidelberg
 Lewis Ratten..... Charles River WIGA

12. Materialien zur MHC-I Tetramer Herstellung

12.1 Plasmide, Bakterien und Kultivierung von Bakterien

pMbio H-2D^b..... Plasmid pMbio 5; enthält murines H-2D^b Gen im Leseraster mit carboxyterminaler Biotinylierungsstelle; über NdeI und BamHI einkloniert (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Ton N.M. Schumacher, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande).

pET 2m..... T7 RNA Polymerase pET Vektor (Novagen); enthält murines 2m Gen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Ton N.M. Schumacher, The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande)

Bakterienstamm (chemokompetent)..... *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

LB-Medium..... 10 g Bacto-Trypton
 5 g Bacto-Hefe Extrakt
 5 g NaCl
 ad 1 L H₂O bidest

LB-Agarplatten..... 1 L LB-Medium
 15 g Bacto-Agar

12.2 Verbrauchsmaterialien

Beckmann Zentrifugenröhrchen.....	Beckmann, München
Corex Röhrchen.....	DuPont, Bad Homburg
Dialyse-Membran	Roth, Karlsruhe
(Spectrapor Membran 1310160 cut-off 500 Da)	
Konzentrations-Säulen Centriplus YM-30, 10 ml.....	Phenomenex, Aschaffenburg
Millipore Filter no. 13722 YM30.....	Millipore, Eschborn
Schraubverschluss-Röhrchen (1,5 ml).....	Greiner, Frickenhausen
Spritzenfilter Waters Corporation P/N WAT 200516.....	Renner, Darmstadt
Vorfilter für HPLC AJO-4488 (GFC – 3000).....	Phenomenex, Aschaffenburg

12.3 Geräte

Spritze (10 ml).....	Hamillton, Bonaduz, Switzerland
Tischzentrifuge (Eppendorf Centrifuge, 5417R).....	Eppendorf, Hamburg
Sorvall RC-5B Refrigerated Superspeed Centrifuge.....	Du Pont, Bad Nauheim
GS-3 Festwinkelrotor	
Aufkonzentrierungseinheit ‚Stirred Cells Series 8000‘.....	Millipore, Eschborn
High-performance liquid chromatography (HPLC).....	Biomatic technologies, Stoughton, USA
Chromatograph Waters 600 mit Millenium Software	
HPLC-Säule groß: Gelfiltrationssäule BioSep-S 3000;.....	Phenomenex, Aschaffenburg
00H-2146-PO	
HPLC-Säule klein: Gelfiltrationssäule BioSep-S 3000;.....	Phenomenex, Aschaffenburg
00H-2146-KO, 300 x 7,8 mm	
Quarzküvette QS1000 Hellma®.....	über Neo Lab Migge, Heidelberg

12.4 Enzyme

Biotin Ligase*.....	M. Toebes, Netherland Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande (freundlicherweise zur Verfügung gestellt)
Dnase.....	Sigma, Deisenhofen
Lysozym.....	Sigma, Deisenhofen

* über aminoterminalen Hexahistidin-Anhang aufgereinigtes, in Bakterien exprimiertes, rekombinantes Enzym

12.5 Puffer und Lösungen

Ausgleichungs-Puffer	20 mM	Tris-HCL pH = 8.0
Bakterienlyse-Puffer	50 mM 1mM 25 %	Tris-HCl pH=8 EDTA Saccharose
Detergenz-Puffer	0.2 M 20 mM 2 mM 1 % 1 %	NaCl Tris HCL pH = 7.5 EDTA Deoxycholsäure (w/v) NP40 Detergenz (w/v)

Dialyse-Puffer	10 mM	KPO ₄ pH=7.4
Faltung-Puffer	4 M 20 mM 1x	Harnstoff Tris-HCl pH = 8.0 Protease Inhibitor
Lauf-Puffer	20 mM 150 mM	Tris pH = 7 NaCl
Ligase-Puffer 10x	50 mM 0.5 M	MgCl ₂ Tris pH=7.5
Lösungs-Puffer	8 M 20 mM	Harnstoff Tris-HCl pH = 8.0
Wasch-Puffer	0.5 % 1 mM	Triton EDTA
ATP-Lösung	0.5 M 1 M	ATP Tris pH=9.5
Biotin-Lösung	5 mM	Biotin in PBS
Carbenicillin-Vorratslösung	34 mg	Carbenicillin in 1 ml 100 % EtOH
Chloramphenicol-Vorratslösung	50 mg	Chloramphenicol in 1 ml H ₂ O
DNase-Lösung	10 mg/ml 50 % 75 mM	DNase Glyzerol (v/v) NaCl
MgCl ₂ Lösung	1 M	
MnCl Lösung	100 mM	
Proteaseinhibitor 25x	1 Stk. 2 ml	Tablette H ₂ O

C. Methoden

1. Allgemeine Zellkultur-Methoden

Alle Zellen (ausgenommen Insektenzellen) wurden im Zellinkubator (37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 7 % CO₂) kultiviert. Unter B. Material ist zu finden, welche Zellen in welchem Kulturmedium kultiviert wurden. Alle Handlungen mit den Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Tumorzelllinien wurden ihrem Wachstum entsprechend zwei Mal wöchentlich gesplittet. Hierzu wurde den Gewebekulturflaschen der Überstand entnommen und kurz mit PBS (B.8) durchgespült. Danach wurden die in der Gewebekulturflasche verbliebenen adhärennten Zellen zwischen ein bis zehn Min mit ca. vier ml 0,25 %igen Trypsin/EDTA-Lösung (B.11.2.2) inkubiert. Durch das Schlagen gegen die Gewebekulturschale lösten sich die zuvor adhärennten Zellen vom Boden und wurden dann in ca. sechs ml entsprechendes Kulturmedium (B.11.2.1) aufgenommen. Daraufhin wurden ca. neun ml der Zellsuspension verworfen, sofern die Zellen nicht anderweitig verwendet wurden. Die ‚alte‘ Gewebekulturflasche (80 cm²) mit dem restlichen Milliliter der Zellsuspension wurde ad 15 ml mit dem entsprechenden Kulturmedium aufgefüllt. Bei den JAWS II Zellen war zu beachten, dass die Zellen im Überstand zusammen mit den abtrypsinierten Zellen vereint und dann verdünnt wurden. Sollten Zellen für Versuche geerntet werden, so wurde mit ihnen wie bei der Verdünnung verfahren, nur dass diese Zellen in der neun ml Zellsuspension nicht verworfen, sondern für die Experimente verwendet wurden. Kultivierung zytotoxischer T-Zellen siehe C.2.

1.1 Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung

Zellzahl und Vitalität von Zellen wurden mittels Trypanblau-Färbung bestimmt: Trypanblau (B.1) dringt in tote, nicht aber in lebende Zellen, ein und färbt diese somit blau. Hierzu wurde die Zellsuspension 1:5 oder wenn erforderlich bis 1:20 in 1 x Trypanblau-Lösung verdünnt und in einer Neubauerzählkammer unter dem Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei war aus statistischen Gründen zu beachten, dass mindestens 40 Zellen innerhalb eines 16er Zählquadranten vorhanden waren. Die Anzahl lebender Zellen innerhalb eines 16er Zählquadranten wurde dann mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Dieses Produkt ergab die Zellzahl 1×10^4 Zellen/ml Zellsuspension.

1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Sollten Zellen eingefroren werden, so wurden sie entweder von dem konfluent bewachsenen Boden einer Gewebekulturflasche abtrypsiniert (s.o.), in Kulturmedium aufgenommen oder im Falle der zytotoxischen T-Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Boden der 24-Loch Platte gelöst. Die Zellen wurden dann mit 250 g sedimentiert. Das Zellsediment wurde in das entsprechende Kulturmedium aufgenommen und in das Kryoröhrchen überführt: pro gewünschtes Kryoröhrchen 400 µl Kulturmedium. Anschließend erfolgte pro Kryoröhrchen eine Zugabe und Durchmischen von 500 µl FCS und 100 µl DMSO. Die Kryoröhrchen wurden sofort für ca. zehn Min auf Eis gestellt, dann für max. vier Monate bei -70° C und anschließend im flüssigen Stickstoff (-196° C) eingefroren.

Beim Auftauen war darauf zu achten, dass die Zellen bei 37° C aufgetaut und dann möglichst schnell in frischem Kulturmedium aufgenommen wurden. Anschließend wurden die Zellen mit 250 g sedimentiert und danach in frischem Kulturmedium ausplattiert.

1.3 Kultivierung von Sf9 und TN high five Zellen

Sf9 und TN *high five* Zellen wurden höchstens drei Monate in Kultur gehalten, da sie bei längerer Kultivierung zum einen weniger gut Bakulovirus amplifizierten und zum anderen weniger Protein exprimierten. Sf9 Zellen wurden in 80 cm² Zellkulturflaschen mit ca. 20 ml TNM-FH-Medium kompl. bei 27° C ohne CO₂ Begasung kultiviert. Waren die Zellen konfluent, so wurden sie verdünnt. TN *high five* Zellen wurden kurz nach dem Auftauen mit Ex-cell 450 kompl. bei 27° C ohne CO₂ Begasung in 80 cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Waren sie konfluent, wurden sie zunächst noch in 175 cm²-Zellkulturflächen gehalten, bis sie dann letztendlich in Erlenmeyerkolben mit Schikane überführt wurden. Hierzu wurden 50 ml einer Zellsuspension mit einer Zelldichte von 2-3 x 10⁶ Zellen/ml mit 200 ml Ex-cell 450 kompl. pro Erlenmeyerkolben angesetzt. Die Zellsuspension wurde unter Schütteln bei 27° C ohne CO₂ Begasung kultiviert und bei Bedarf verdünnt.

2. Kultivierung zytotoxischer T-Zellen

Sowohl T-Zellen von frisch isolierten Milzen immunisierter Mäuse als auch spezifische T-Zellen, welche für *in vitro* Antigenpräsentations-Experimente verwendet wurden, sind nach der Aufarbeitung der Milz bzw. nach dem Auftauen sofort und danach einmal wöchentlich restimuliert worden. Dazu wurden die T-Zellen zusammen mit bestrahlten und somit inaktivierten Stimulator- und Fütterzellen inkubiert. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.1 Aufarbeitung der Milzen immunisierter Mäuse

Immunisierte Mäuse (C.8.2) wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Milz wurde entnommen, in PBS überführt und anschließend mit einem Spritzenstempel durch ein engmaschiges Drahtnetz gedrückt. Die Milzzellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren voneinander getrennt, dann fünf Min mit 250 g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in fünf ml ACT-Puffer (siehe B.8) aufgenommen. Nach fünfminütiger Inkubationszeit im 37° C Wasserbad (Lyse der Erythrozyten) wurden die Zellen nochmals abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde in 2,1 ml α -MEM Medium (10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen, ca. 600 μ l der aufgearbeiteten Milzzellen wurden mittels Interferon γ (IFN γ)-*Enzyme-linked ImmunoSpot Assay* (EliSpot) (C.9.3), Tetramer-Färbung (C.9.1) oder intrazellulärer IFN γ -Färbung auf ihre Spezifität überprüft. Die restlichen Zellen (ca. 2 x 10⁷) wurden in 25 cm²-Gewebekulturflaschen überführt und zusammen mit einem ml inaktivierten Stimulatorzellen (2 x 10⁶ Zellen/ml) (s. u.) inkubiert. Nach fünf Tagen erfolgten mit einem Teil der Milzzellen weitere Spezifitätsnachweise. Der andere Teil der Milzzellen wurde zur weiteren Kultivierung in sechs Löcher einer 24-Loch Platte in einer Verdünnungsreihe ausplattiert und eine Woche nach der Milzentnahme restimuliert (C.2.2).

2.2 Restimulierung der zytotoxischen T-Zellen

Die T-Zellen wurden ein Mal wöchentlich unter der Zugabe von frischem T-Zell-Medium (ad 2 ml/Loch), 100 μ l inaktivierten Stimulatorzellen (2 x 10⁶ Zellen/ml) und 100 μ l inaktivierten Fütterzellen (5 x 10⁷/ml) restimuliert. Um das Ausplattieren der Fütter- und Stimulatorzellen zu vereinfachen, wurden eine Multistep-Pipette und Präzisions-Dispensertips (Ritips) verwendet. Frühestens am Tag fünf nach der Restimulierung

wurden die T-Zellen für *in vitro* Antigenpräsentations-Experimente (C.7) oder weitere Spezifitätsnachweise (C.9) verwendet. (Zu einem früheren Zeitpunkt sind die T-Zellen noch so stark von der Restimulation aktiviert, dass sie einen zu starken Hintergrund bei Messungen verursachen können.)

Die Fütterzellen wurden aus der Milz einer Maus, getötet durch zervikale Dislokation, gewonnen. Die Aufarbeitung erfolgte wie bei den Milzen von immunisierten Mäusen (s.o.). Nach der Erythrozytenlyse wurden die Milzzellen sedimentiert und mit T-Zell-Medium (siehe B.11.2.1) auf eine Zelldichte von 5×10^7 /ml eingestellt und dann durch γ -Strahlenexposition durch eine ^{137}Cs -Quelle inaktiviert (33 Gy).

Bei den Stimulatorzellen handelt es sich zum einen um E7-exprimierende RMA Zellen (RMA-E7) (Speidel et al., 1997) und zum anderen um RMA-S Zellen, die mit E7₄₉₋₅₇ oder L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladen worden waren. RMA-S Zellen besitzen keinen funktionellen ‚*transporter of antigen presentation*‘ (TAP), trotzdem präsentieren sie MHC Klasse I Moleküle an der Zelloberfläche, besonders bei niedriger Temperatur (Ljunggren et al., 1990). Diese MHC Klasse I Moleküle sind zwischen 19-33° C stabil und nach Ljunggren et al. 1990 unbeladen. Bei 37 °C werden sie labil und können durch exogene Peptide stabilisiert werden. Nach De Silva et al. 1999 sind die MHC Klasse I Moleküle mit Selbst-Peptiden beladen, welche aber bei 37 °C leicht von den MHC Klasse I Molekülen dissoziieren und durch exogene Peptide stabilisiert werden können. In dieser Arbeit wurden RMA-S Zellen vor der Beladung ca. zwei h bei RT inkubiert, die Zellen wurden geerntet und in PBS gewaschen. Danach wurden sie zusammen mit E7₄₉₋₅₇ oder L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid (100 nM) für eine h bei 37 °C inkubiert, in PBS gewaschen, mit RPMI-Medium auf eine Zelldichte von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt und mittels γ -Strahlenexposition durch eine ^{137}Cs -Quelle inaktiviert (100 Gy).

2.2.1. Herstellung des Concanavalin A (Con A)-induzierten Rattenmilzüberstands

Zytotoxische T-Zellen in Kultur benötigen für ihre Proliferation Interleukin-2 (IL-2). Dieses war dem T-Zell-Medium nicht direkt beigefügt, sondern wurde zunächst von Rattenmilzzellen, die durch das Mitogen Concanavalin A (Con A) (B.11.2.2) stimuliert worden waren produziert (Gajewski, Joyce, and Fitch, 1989). Hierfür wurden männlichen Lewis Ratten (zw. 56-70 Tage alt) (B.11.5) die Milzen entnommen und aufgearbeitet (C.2.1). Die Milzzellen wurden in DMEM kompl. Medium (B.11.2.1) aufgenommen und pro 175 cm²-Gewebekulturflaschen in 50 ml DMEM kompl. Medium ($1,25 \times 10^6$ Milzzellen/ml) zusammen mit 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Con A für 24 h kultiviert. Danach wurde der Überstand geerntet, darin vorhandene Zellen durch Zentrifugation auf höchster Stufe mit ca. 3100 g (4600 UpM, Haereus Kühlzentrifuge 1,0R) sedimentiert. Der Con A-haltige Überstand wurde mittels Proliferationstest mit einem schon vorhandenen, ‚alten‘ Con A-haltigen Überstand verglichen und so indirekt sein IL-2 Gehalt bestimmt (C.2.2.1.1). Um das Con A, welches sich noch im Überstand befand, abzufangen, wurde dem T-Zell-Medium später Methyl- α -Mannopyranosid beigefügt (25 mM).

2.2.1.1. Proliferationstest zur Überprüfung des Con A-induzierten Rattenmilzüberstands

In einer 96-Loch Rundbodenplatte wurde sowohl der ‚alte‘ als auch der neu hergestellte Con A-induzierte Rattenmilzüberstand (s.o.) in einer seriellen Verdünnung von 1:2 bis 1:128 in Triplikaten ausplattiert (Endvolumen 100 $\mu\text{l}/\text{Loch}$). Anschließend wurden 5×10^3 CTL L2 Zellen in 100 μl α -MEM Medium (10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin) pro Loch zu den Con A-induzierten Rattenmilzüberständen hinzupipettiert. Nach 48 h im 37°C Zellinkubator wurden die Zellen mit 1 μCi ^3H -Thymidin pro Loch für weitere 24 h inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurde das ^3H -Thymidin in die DNA der proliferierenden CTL L2 Zellen eingebaut. Danach wurden die Zellen mittels *Cell Harvester* geerntet, auf eine Glasfaser-Matte pipettiert und zwei Mal mittels *Cell Harvester* mit H₂O durchspült, so dass freies ^3H -Thymidin weggewaschen wurde. Die Glasfaser Matte wurde anschließend für 90 Sek. in der Mikrowelle getrocknet, auf dem heizbaren Magnetprüfer mit Scintillationswachs überschmolzen und mittels Microbeta-Zähler analysiert.

3. Kultivierung von primären Dendritischen Zellen (BMDCs)

In der vorliegenden Arbeit wurden Dendritische Zellen aus dem Knochenmark (BMDCs = *bone marrow derived dendritic cells*) von C57BL/6 Mäusen mit GM-CSF in Anlehnung an das Protokoll Lutz et al. 1999 generiert. Dieses Protokoll ermöglicht eine Präparation von $1-3 \times 10^8$ DCs aus dem Knochenmark von einer Maus nach zehn bis zwölf Tagen. In der vorliegenden Arbeit wurden die BMDCs allerdings nur sechs bis neun Tage kultiviert, um einen großen Anteil an unreifen BMDCs zu gewährleisten.

3.1 Generierung primärer Dendritischer Zellen aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen

Weiblichen C57BL/6 Mäusen oder männlichen C57BL/6 TAP-defizienten (TAP^{-/-}) Mäusen wurde im Alter von sechs bis acht Wochen das Knochenmark steril entnommen (alle verwendeten Flüssigkeiten waren auf Eis gekühlt), dabei war darauf zu achten, dass die Zellen so wenig wie möglich Stress ausgesetzt waren, d.h. dass alle verwendeten Flüssigkeiten auf Eis gekühlt waren und so wenig wie möglich pipettiert wurde, da die Zellen sonst leicht spontan ausreifen.

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und kurz in 70 %i EtOH desinfiziert. Das Fell der Hinterbeine wurde abgetrennt und die Knochen vom Muskelfleisch und Sehnen befreit. Der *Femur* wurde aus dem Hüftgelenk gehebelt, *Tibia* und *Femur* durch Entfernen des Kniegelenks voneinander getrennt. *Tibia* wurde vom Fußgelenk befreit. Die Knochen wurden kurz in PBS geschwenkt, ca. eine Min in 70 % EtOH desinfiziert und danach nochmals in PBS geschwenkt. Von der *Tibia*, die mit einer Pinzette fixiert wurde, wurden jeweils die Knochenenden mit einer kleinen Schere gekappt. Mittels einer PBS gefüllten sterilen Spritze (2 ml) und einer sehr feinen Kanüle (0,4 x 19) wurde das Knochenmark mit dem PBS aus dem Knochen in ein 15 ml Röhrchen geschwemmt. Der Knochen wurde daraufhin weiß-durchsichtig. Der *Femur* wurde mittig mit einer kleinen Schere geteilt und das Knochenmark ebenfalls durch die Verwendung der Spritze in das 15 ml Röhrchen geschwemmt. Die Zellaggregate wurden durch Auf- und Abpipettieren mit einer zehn ml Pipette aufgelöst. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation mit 250 g (1200 UpM, Heraeus Megafuge 1,0 R) wurden die Zellen nochmals mit PBS gewaschen. Danach wurden sie in BMDC-Medium (B.11.2.1) aufgenommen und gezählt (alle Zellen bis auf Erythrozyten, die sich unter dem Lichtmikroskop durch ihren etwas dickeren Zellrand von den Vorläuferzellen unterscheiden). Das anschließende Kultivierungsprotokoll war vom Versuchsansatz abhängig, das Prinzip blieb jedoch gleich: die Zellen wurden in BMDC-Medium in Petrischalen ausplattiert (keine Zellkulturschale, da sonst die Zellen auch ohne Ausreifung anhaften konnten). Nach drei Tagen folgte ein Zusatz von neuem BMDC-Medium, an Tag fünf wurde das Medium gewechselt und an Tag sechs bzw. sieben wurden die Zellen für die Versuche verwendet.

3.1.1. Herstellung des GM-CSF-Überstands

Die Zelllinie B16F10, welche den Granulozyten-Macrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)) in den Überstand sezerniert, wurde nach ihrem Auftauen für zwei Tage in RPMI-Medium kultiviert. An Tag zwei wurden die Zellen verdünnt und unter Hygromycin-Selektion bis zur Konfluenz weiterkultiviert. Dann wurden die Zellen wieder verdünnt, auf große Zellkulturflaschen (je 60 ml RPMI-Medium) verteilt und ohne Hygromycin weiterkultiviert. Waren die Zellen konfluent, wurde der GM-CSF-haltige Überstand in 50 ml Röhrchen überführt und bei höchster Stufe zentrifugiert, um alle zellulären Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde anschließend in frische 50 ml Röhrchen überführt und bis zur Verwendung bei vier oder -20°C gelagert. Für das BMDC-Medium wurde er 10 %ig eingesetzt.

4. Herstellung der chimären Virus-ähnlichen Partikel (CVLP) und CVLP-Immunkomplexe (CVLP-ICs)

CVLPs wurden mittels Bakulovirus-Expressionssystem in Insektenzellen (TN HIGH five) exprimiert und über einen diskontinuierlichen Saccharosegradient und anschließende CsCl-Gradientenzentrifugation aufgereinigt.

4.1 Amplifikation rekombinanter Bakulovirus-Stammvorräten

20 ml Sf9-Zellen mit einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen/ml wurden in eine 175 cm²-Zellkulturflasche pipettiert. Nachdem sich die Zellen auf den Flaschenboden abgesetzt hatten (nach ca. 10-20 Min) wurde das Medium entfernt und zwei ml des zu amplifizierenden Bakulovirus-Stammvorrat plus 10 ml frisches TMN-FH Medium hinzupipettiert (Infektion). Nach sechs Tagen bei 27° C wurde der Überstand, in dem sich die amplifizierten Bakuloviren befanden, abgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und zehn Min bei höchster Stufe zentrifugiert (mit ca. 3600 g, 5000 UpM, Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R) um alle zellulären Bestandteile zu sedimentieren. Der Überstand wurde in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -4° C gelagert.

4.2 Infektion der Insektenzellen durch rekombinante Bakuloviren

TN HIGH five Zellen wurden in 1 L Kolben mit Schikane in 250 ml Ex-cell 450 kompl. Medium (B.11.2.1) ca. zwei Tage bei 27° C unter Schwenken bis zu einer Zelldichte von 2×10^6 /ml kultiviert. Danach wurden die Insektenzellen bei 366 g sedimentiert (Sorvall RC-5B, GSA, 1500 Upm, 30 Min) und in 30 ml Ex-cell 450 kompl. Medium aufgenommen und wieder in den Kolben überführt. Dann erfolgte die Infektion unter der Zugabe von acht ml des Virusvorrats (MOI 2-5) (B.11.3) der entsprechenden rekombinanten Bakuloviren. Nach eine h Schwenken bei RT wurden die Kolben ad 250 ml mit Ex-cell 450 kompl. Medium aufgefüllt und für drei Tage bei 27° C geschwenkt. Die Zellen wurden dann auf insgesamt sechs 50 ml PP-Röhrchen aufgeteilt und zehn Min mit ca. 580 g (2000 UpM, Heraeus Megafuge 1,0 R) sedimentiert. Die Insektenzellen wurden mit PBS gewaschen und danach in zwei 50 ml Röhrchen vereint und abermals sedimentiert. Das gewonnene Zellsediment wurde bei -70° C eingefroren.

4.3 Aufbrechen der Insektenzellen mittels ‚French Press‘

Das Sediment der eingefrorenen Insektenzellen, die mit den Bakuloviren infiziert worden waren, wurde am nächsten Morgen aufgetaut und in neun ml Extraktionspuffer (B.8) resuspendiert. Dieser und alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Nachdem 200 µl PMSF [100 mM] zugegeben worden war, wurden die Zellen mittels ‚French Press‘ aufgeschlossen: zunächst wurde EtOH, dann H₂O und sieben ml Extraktionspuffer in dieser Reihenfolge durchgepumpt. Jetzt erfolgte der Durchlauf der Insektenzellen-Suspension, auf den ein Durchspülen mit sieben ml Extraktionspuffer folgte. Wurden verschiedene Insektenzellen hintereinander aufgebrochen, so wurde nach jedem Durchlauf mit Extraktionspuffer durchgespült. Danach wurde wieder EtOH durch die ‚French Press‘ gepumpt, welches dann letztendlich auch in dieser belassen wurde. Bei der gesamten Prozedur war darauf zu achten, dass die Presse nicht trocken lief und dass ein Druck von 15.000-20.000 kPa vorhanden war.

4.4 Aufreinigung der CVLPs durch Gradientenzentrifugation

Die durch den Aufschluss mit der ‚French Press‘ entstandenen Insektenzell-Fragmente wurden zwei Mal durch einen Zentrifugationsschritt zehn Min, mit 11953 g, bei 4° C (Sorvall RC-5B, Rotor F28/50, 10.000 UpM) sedimentiert. Der Überstand wurde zunächst gesammelt und auf Eis gestellt solange der Saccharosegradient vorbereitet wurde. In ein 25 x 89 mm Beckmann Zentrifugen-Röhrchen wurden acht ml einer 57,5 %igen (w/v) CsCl-Lösung (4,7 g CsCl/8 ml Extraktionspuffer (ohne Triton!)) pipettiert, diese wurde mit zehn ml 40 %iger Saccharose-Lösung ((w/v) in Extraktionspuffer) überschichtet. Vorsichtig wurden auf das Saccharose-Kissen die vereinten Überstände des Insektenzell-Aufbruchs pipettiert. Wurden mehrere Röhrchen für die Gradientenzentrifugation vorbereitet, so mussten diese mit Extraktionspuffer austariert werden. Anschließend folgte eine 2¼ stündige Ultrazentrifugation (Beckmann-Ultrazentrifuge, Rotor SW 28) mit 103.600 g (24.000 UpM) bei 10° C. Danach wurde fast die gesamte Saccharose bis auf die Interphase, in der sich die CVLPs befanden, abgezogen. Die Interphase wurden zusammen mit dem CsCl-Kissen 30 Sek mit Ultraschall bei 60 W behandelt. Diese Suspension wurde dann unter Verwendung eines Refraktometers mit Extraktionspuffer (B.8) bzw. CsCl-Lösung auf einen Brechungsindex von 1,3672 (entspricht der Dichte von 1,38 g/ml) eingestellt und ad 13 ml (mit Extraktions-Puffer ohne Triton) in ein Quickseal-Zentrifugenröhrchen überführt. Bei der anschließenden 20 stündigen Ultrazentrifugation (Beckmann-Ultrazentrifuge, Rotor Ti70) bei 20° C und mit 211.0010 g (entspricht 48.000 UpM) konnte sich der CsCl-Gradient ausbilden. Dabei sammelten sich die Kapside bzw. ihre Kapsomere in den ihnen entsprechenden Dichten. Durch Abtropfen wurde der Gradient im Anschluß in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße fraktioniert und die erhaltenen ‚CsCl-Fraktionen‘ konnten sowohl im *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (C.5.2) oder im Western Blot (C.2.2) als auch mittels Elektronenmikroskopie (C.5.3) analysiert werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die CVLPs in der CsCl-Lösung bei 4° C aufbewahrt.

4.5 Bestimmung der Dichte der CsCl-Fraktionen

Um die Dichte der einzelnen CsCl-Fraktionen, welche durch das Abtropfen des CsCl-Gradienten entstanden waren, zu bestimmen, wurde zunächst mit einem Refraktometer der Brechungsindex (η) der CsCl-Fraktionen bestimmt. Dieser floss anschließend in die untenstehende Formel ein, mittels der die Dichte (ρ) berechnet werden konnte. Die Koeffizienten (a und b) von CsCl besitzen die folgenden Werte: a = 10,8601 und b = 13,4974.

$$\rho = a\eta - b$$

4.6 Dialyse der CVLPs

CVLPs wurden kurz bevor sie für Experimente verwendet wurden ca. eine h gegen HS-Puffer (B.8) unter sterilen Bedingungen dialysiert. Hierfür wurde ein Becherglas mit mindestens 350 ml HS-Puffer gefüllt und auf dessen Oberfläche ein Dialysefilter mit der glänzenden Seite nach oben gelegt. Auf das Dialysefilter wurden nun maximal 600 μ l der CsCl-Fraktion pipettiert. Nach einer h wurden die dialysierten CVLPs vom Filter mit einer Pipette abgezogen, in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und sofort auf Eis gestellt.

4.7 Herstellung der CVLP-ICs

Dialysierte CVLPs (C.4.6) wurden zusammen mit HPV16 L1-spezifischen Antikörpern (B.6.1) in einem 1,5 ml Eppendorf-Gefäß bei gelegentlichem Schütteln für 30-60 Min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierfür wurden unterschiedliche Verhältnissen von CVLPs zu den Antikörpern 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) IgG2a [2 µg/µl] oder 16L1 1.4.7.22 (MM7) IgG1 [2 µg/µl] verwendet. Wurden die Immunkomplexe mit einem polyklonalen CVLP-spezifischen Antiserum hergestellt, so wurde dieses 1:100 eingesetzt. Bei den Experimenten bezogen sich die CVLP-ICs Mengenangaben auf die reine CVLP-Konzentration. Die IgG-Konzentration wurde bei der Berechnung vernachlässigt. CVLPs und Antikörper wurden zunächst einzeln verdünnt und dann zusammen inkubiert.

Das CVLP:Antikörper Verhältnis wurde wie folgt berechnet:

$$2,83 \times 10^{10} \text{ Moleküle CVLP}/\mu\text{g} : 3,8 \times 10^{12} \text{ Moleküle IgG}/\mu\text{g}$$

4.7.1. Herstellung CVLP-spezifischer polyklonaler Mausseren

Weiblichen C57BL/6 Mäusen wurde vor der Immunisierung (Tag 0), 14 Tage (Tag 14) und 24 Tage nach der Immunisierung mit einer Pasteurpipette Blut aus dem Venengeflecht hinter dem Augapfel entnommen. Hierfür wurden die Mäuse ca. zehn Sek mit Metofane (Methoxyfluran), ein Inhalations-Anästhetikum, betäubt. Die Immunisierung wurde wie folgt durchgeführt: je zehn µg CVLPs wurden mit einer sterilen Einmalspritze (1 ml) und einer Kanüle (0,6 x 25) s. c. in den Schwanzansatz injiziert. Nach 14 Tagen wurde diese Injektion wiederholt. Das entnommene Blut wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt. Zunächst wurden die Blutzellen zehn Min mit ca. 2240 g (5000 UpM, Tischzentrifuge), anschließend zehn Min mit ca. 15.120 g (13.000 UpM, Tischzentrifuge) sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig vom Sediment abgenommen und in ein frisches 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Es folgte eine Analyse der Seren im Western Blot und ELISA.

5. Methoden zur Analyse von CVLPs und anderen Proteinen

5.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur Analyse von Proteinen

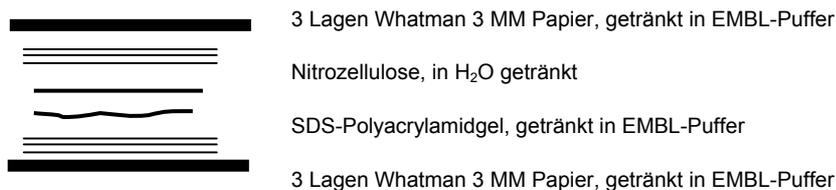
Proteine wurden in einem diskontinuierlicher Polyacrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen nach (Laemmli, 1970) aufgetrennt und nachgewiesen. Hierfür wurde ein ca. zwölf cm langer Trenngel (s.u.) zwischen zwei Glasplatten (10 x 15 cm), welche zuvor mit 1 %iger Agarose (B.1) abgedichtet worden waren, gegossen und sofort mit 70% igem EtOH überschichtet (um eine glatte und gleichmäßige Oberfläche zu erhalten). Nach der Polymerisierung des Trenngels wurde das EtOH entfernt und das Sammelgel (s.u.) über das Trenngel gegossen. Sofort wurde der Probenkamm eingesetzt. Nachdem auch das Sammelgel polymerisiert war, wurden die Glasplatten mit dem Polyacrylamidgel in die Doppel-Elektrophorese Kammer eingesetzt. Nachdem die Kammer mit Elektrophorese-Puffer (B.8) aufgefüllt worden war, wurde der Kamm entfernt und die Geltaschen ausgespült. Während der Polymerisierungszeit wurden die Proteinproben vorbereitet: sie wurden 1:1 mit 2 x konzentriertem Probenpuffer (B.8) verdünnt und bei 97° C ca. fünf min denaturiert. Anschließend wurden die Geltaschen mit den abgekühlten Proben beladen. Eine Spannung von 90 V wurde so lange angelegt, bis die Proben in das Trenngel eingelaufen waren. Dann wurde die Spannung auf 135 V erhöht. Anhand des aufgetragenen Proteinmarkers (B.7) konnte erkannt werden wann

die Gelelektrophorese beendet werden konnte. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde dann entweder für den Western Blot (C.5.1.1) oder für die Mengenabschätzung (C.5.1.2) verwendet

Trenngel		Sammelgel	
4,1 ml	H ₂ O	3,4 ml	H ₂ O
8,0 ml	30 % Acrylamid-Mix	0,85 ml	30 % Acrylamid-Mix
7,5 ml	1 M Tris pH 8,8	0,625 ml	1 M Tris pH 8,8
200 µl	10 % SDS	50 µl	10 % SDS
200 µl	10 % APS (unmittelbar vor Gebrauch)	50 µl	10 % APS (unmittelbar vor Gebrauch)
8 µl	TEMED (unmittelbar vor Gebrauch)	5 µl	TEMED (unmittelbar vor Gebrauch)

5.1.1. Analyse von Proteinen durch Western Blot (*enhanced chemoluminescence (ECL)*)

Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (C.5.1), wurden diese mittels Semidry-Elektrotransfer in einer Elektroblot-Apparatur auf Nitrozellulose Transfermembran übertragen. Hierfür wurden zwischen der Anode (unten) und der Katode (oben, Deckel der Elektroblot-Apparatur) folgende Schichten luftblasenfrei aufeinandergelegt:



Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 180 mA für 40 Min. Anschließend wurde die Nitrozellulose für mindestens eine h bei RT oder bei 4° C über Nacht in 2,5 %iger Magermilchlösung 0,2 % Tween 20 geschwenkt, wodurch unspezifische Antikörperbindungsstellen geblockt wurden. Danach wurde die Nitrozellulose bei 4° C über Nacht schwenkend mit dem ersten Antikörper (Cam Vir-1 1:2000 oder anti HPV16 E7 1:2000 bzw. CVLP-spezifisches polyklonales Mausserum 1:100 verdünnt in 2,5 %iger Magermilchlösung 0,2 % Tween 20), inkubiert. Daraufhin wurde die Nitrozellulose drei Mal für fünf Min ebenfalls in der 2,5 %iger Magermilchlösung 0,2 % Tween 20 gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulose mit dem Sekundärantikörper (Ziege anti Maus-HRP, 1:5000 in 2,5 %iger Magermilchlösung 0,2 % Tween 20 verdünnt) eine h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Die Nitrozellulose wurde wieder drei Mal für fünf Min in 2,5 %iger Magermilchlösung 0,2 % Tween 20, danach in PBS gewaschen. Anschließend wurde die Nitrozellulose eine Min in acht ml ECL-Lösung (B.8), zwei ml H₂O und 20 µl Verstärker-Lösung (B.8) geschwenkt. Dabei konnte die ‚*Horseradish-Peroxidase*‘ (HRP), welche an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, eine Oxidation des Luminols katalysieren. Das so angeregte Substrat resultierte in einer Chemilumineszenz, welche sofort, nachdem die Nitrozellulose in eine Plastikfolie gelegt worden war, auf einem Röntgenfilm (Exposition zw. 30 Sek-20 Min) sichtbar gemacht werden konnte.

5.1.2. Proteinmengenabschätzung im SDS-Polyacrylamidgel

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (C.5.1), bei der als Proteinkonzentrations-Standard auch fünf µg, zwei µg, ein µg, 0,5 µg, 0,2 µg und 0,1 µg BSA aufgetragen worden waren, wurde das Polyacrylamidgel ü.N. unter Schwenken und mehrmaligem Wasserwechsel in VE-Wasser entsalzt. Anschließend wurde es 20 min in ca. 20 ml *Gel Code Blue* Reagenz ebenfalls unter Schwenken eingefärbt und danach abermals unter Schwenken und mehrmaligem Wasserwechsel in VE-Wasser entsalzt bis die

Proteinbanden gut sichtbar wurden. Das Polyacrylamidgel wurde dann gespannt zwischen Geltrocken-Folie getrocknet. Anhand der Intensität des BSA-Proteinstandards konnten nun die Proteinmengen der Proben abgeschätzt werden.

5.2 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

In der vorliegenden Arbeit wurden für alle ELISAs eine 96-Loch ELISA-Platten verwendet. Die anschließende Absorptionsmessung wurde durch einen ELISA-Reader (Labsystems, Turku, Finnland) bei einer Wellenlänge von 450 nm durchgeführt.

5.2.1. Antigen-Capture ELISA zur Analyse der CsCl-Fractionen

Die einzelnen Fraktionen des CsCl-Gradienten (letzter Schritt der VLP bzw. CVLP Aufreinigung) wurden mittels Antigen-Capture ELISA auf L1ΔC bzw. L1ΔCE7₁₋₆₀ bzw. L1ΔCE7₁₋₅₅ Kapside überprüft (Muller et al., 1997). Hierzu wurde die eine Hälfte einer 96-Loch ELISA Platte mit je 50 µl/Loch monoklonalem Antikörper 25/C (1:300 in PBS) beschichtet (ü.N. bei 4°C). Die andere Hälfte der Platte wurde nicht beschichtet und diente bei der Auswertung als Negativkontrolle, da sie im Anschluss wie die beschichtete Plattenhälfte behandelt wurde. Anschließend wurde die 96-Loch ELISA Platte mit PBS/0,05 % Tween 20 gewaschen und mit 5 %iger Magermilchlösung (B.8) geblockt (1 h, 37° C). Es folgten drei Waschschrte. Daraufhin wurden je 50 µl der einzelnen Fraktionen des CsCl-Gradienten (1:300 in 1 %iger Magermilchlösung (B.8)) pro Loch in Duplikaten ausplattiert und inkubiert (1 h, 37° C). Als Positivkontrolle diente eine CsCl-Fraktion, deren Kapsidgehalt in früheren Experimenten getestet worden war. Ungebundene Proteine wurden durch dreimaliges Waschen entfernt. Die gebundenen Kapside wurden nun durch ein polyklonales Kaninchen anti-L1 Antiserum (4543; 1:3000 in 1 %iger Magermilchlösung) detektiert. Nach einem weiteren Waschschrte folgte eine Inkubation (1 h, 37° C) mit einem Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (1:5000 in 1 %iger Magermilchlösung), an den eine ‚Horseradish-Peroxidase‘ (HRP) gekoppelt war. Durch erneutes dreimaliges Waschen wurden ungebundene Antikörper-Enzym-Konjugate entfernt. Es wurden pro Loch 50 µl der Substrat-Lösung (B.8) pipettiert. Die Reaktion wurde nach ca. 20 Min (abhängig vom Verfärbungsgrad) mit jeweils 50 µl/Loch 2 M H₂SO₄ abgestoppt. Es folgte die Absorptionsmessung.

5.2.2. ELISA zur Überprüfung der CVLP-spezifischen polyklonalen Mausseren

Eine Hälfte einer 96-Loch ELISA Platte wurde mit je 30 ng CVLPs (nicht dialysiert, ad 50 µl PBS verdünnt) pro Loch beschichtet (ü.N. bei 4° C). Anschließend wurde die Platte mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und mit 5 %iger Magermilchlösung geblockt (1 h, 37° C). Es folgte ein Waschschrte. Die CVLP-spezifischen polyklonalen Mausseren (B.6.1) wurden als Duplikate in verschiedenen Verdünnungen (1:300, 1:600, 1:1000 in 1 %iger Magermilchlösung) sowohl auf die mit CVLPs beschichtete als auch auf die unbeschichtete Seite (Negativkontrolle) der Platte pipettiert. Als Positivkontrolle wurde das polyklonale Kaninchenserum 4543 verwendet. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C wurde die Platte drei Mal gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen polyklonalen Mausseren mit einem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Maus Antikörper (1:5000 in PBS) und das polyklonale Kaninchenserum mit einem HRP-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (1:5000 in PBS) detektiert (1 h bei 37°). Nach dreimaligem Waschen wurden pro Loch 50 µl Substrat-Lösung (B.8) pipettiert. Die Reaktion wurde nach ca. 20 Min (abhängig vom Verfärbungsgrad) mit jeweils 50 µl/Loch 2 M H₂SO₄ abgestoppt. Es folgte die Absorptionsmessung.

5.2.3. ELISA zur Typisierung der L1 spezifischen Antikörper

Die fünf monoklonalen anti L1-Antikörper (16L1 VII 24.49.10.17.7 (MM3); 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4); 16L1 25/B subcl. B2 (MM5); 16L1 1.4.7.22 (MM7); MM12), erhalten von Martin Müller, DKFZ Heidelberg, wurden mittels des *SBA Clonotyping System III* typisiert. Dazu wurde ein 96-Loch ELISA Platte mit je 30 ng CVLPs (nicht dialysiert, ad 50 µl PBS verdünnt) pro Loch beschichtet (ü.N. bei 4° C). Anschließend wurde die Platte mit PBS/0,05% Tween 20 gewaschen und mit 5 %iger Magermilchlösung geblockt (1 h, 37° C). Es folgte ein Waschschrift. Danach wurden die Hybridom-Überständen der monoklonalen Antikörper (1:10 in PBS) auf die eine Hälfte der Platte pipettiert. Die andere Hälfte der Platte wurde nur mit PBS behandelt und diente bei der Auswertung als Negativkontrolle, da mit ihr im Folgenden wie mit der mit Hybridom-Überstand behandelten Plattenhälfte umgegangen wurde. Der Inkubation (1 h bei 37° C) folgten drei Waschschrift. Anschließend wurden die zu typisierenden monoklonalen Antikörper mit den Antikörpern des *SBA Clonotyping System III* nach Protokoll detektiert. Nach dreimaligem Waschen wurden pro Loch 50 µl der Substrat-Lösung (B.8) pipettiert. Die Reaktion wurde nach ca. 15 Min (abhängig vom Verfärbungsgrad) mit jeweils 50 µl/Loch 2 M H₂SO₄ abgestoppt. Es folgte die Absorptionsmessung.

5.3 Probenvorbereitung für die Elektronenmikroskopie

Die Elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Zentgraf und Frau Birgit Hub durchgeführt. Zuvor wurden ca. 30 µl der Probe der CsCl-Gradientenzentrifugation 30 Min gegen H₂O dialysiert. Die Probe wurde dann für zwei Min auf ein Kohle-beschichtete Kupfernetzchen (Maschengröße 300; Plano, Wetzlar) gegeben. Anschließend wurde die Probe vorsichtig auf einem Zellstofftuch abgetropft. Das Kupfernetzchen wurde mit H₂O beträufelt, welches vorsichtig auf einem Zellstofftuch abgetropft wurde. Anschließend wurde das Kupfernetzchen ca. 30-60 Sek mit 2 %iger Uranylacetat-Lösung gefärbt. Nach dem Entfernen der Uranylacetat-Lösung wurde das Kupfernetz bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in einem Elektronenmikroskop analysiert.

6. Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse

Mittels Durchflusszytometrie, auch ‚*Fluorescence activated cell sorting*‘ (FACS) genannt, können einzelne Zellen erfasst und nach ihrer Größe und Granularität sortiert werden. Zusätzlich können aus einer gemischten Zellsuspension einzelne Zellen, sofern sie zuvor mit spezifischen Antikörpern (gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff) gefärbt worden sind, bestimmten Zellpopulationen zugeordnet werden. So kann man z.B. Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker voneinander unterscheiden.

Die zu analysierenden Zellen befinden sich im *FACSortTM* in einem Flüssigkeitsstrom und werden durch eine konische Kanüle (End-Durchmesser 20-40 µm) nacheinander aufgereiht. So passieren sie einzeln einen Argon-Laserstrahl (488 nm). Zum einen können durch die Lichtbeugung- und Streuung Aussagen über die Größe (*FSC= Forwardscatter*) und die Granularität (*SSC = sidescatter*) der Zellen getroffen werden und zum anderen werden die Fluoreszenzfarbstoffe, die an die Antikörper gekoppelt sind, angeregt. Beim Wiedererlangen des ursprünglichen Energieniveaus wird von den Fluoreszenzfarbstoffen Licht emittiert, welches von Fotodioden erfasst und amplifiziert wird. Das Softwareprogramm *CellquestTM* setzt diese Vorgänge graphisch um, so dass auf dem Monitor die einzelnen Zellen z.B. als Punkte erscheinen und so bestimmte Zellpopulationen sichtbar werden.

Zusätzlich kann bei der Durchflusszytometrie-Messung die Vitalität der Zellen nicht nur über ihre Größe und Granularität analysiert werden. Durch die Verwendung des dunkelroten Farbstoffes 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD), welcher nur in tote Zellen eindringt, können tote und lebende Zellpopulationen ermittelt und nur

letztere in die eigentliche Analyse einbezogen werden. Werden sowohl tote als auch lebende Zellen in die Auswertung miteinbezogen, kommt es zu einer falschpositiven Zellpopulation, da die Antikörper unspezifisch an tote Zellen binden.

Da die Emissionsspektren der einzelnen Farbstoffe FITC ($\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$), PE ($\lambda_{\max} = 575 \text{ nm}$), Cy-5 ($\lambda_{\max} = 670 \text{ nm}$) und 7-AAD ($\lambda_{\max} = 675 \text{ nm}$) teilweise überlappen, muss dies bei einer mehrfarbigen Analyse vor der Probenmessung durch Kompensation der einzelnen Farbkanäle korrigiert werden. Bei der Auswertung können spezifisch fluoreszierende Zellen als Prozentsatz von nicht-fluoreszierenden Zellen (oder einer anders definierten Zellpopulation) angegeben werden. Auch möglich bei der Auswertung ist es, die Mittlere Fluoreszenz (*Mean*; verwendet bei normaler Skalierung) oder die Geometrische Mittlere Fluoreszenz (*Geo Mean*; verwendet bei logarithmischer Skalierung) anzugeben.

6.1 Allgemeine Probenvorbereitung für die FACS-Analyse

Alle Vorbereitungen der Proben, die mittels Durchflusszytometrie analysiert werden sollten, wurden auf Eis durchgeführt. Waschschritte wurden in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen, wenn nicht anders beschrieben, wie folgt durchgeführt: das 1,5 ml Eppendorf-Gefäß wurde ad 1,5 ml mit eiskaltem PBS gefüllt und die Zellen wurden bei 4° C und mit ca. 1100 g (3500 UpM, Tischzentrifuge) sedimentiert. Ca. zehn Min vor der FACS-Analyse wurden zur Vitalitätsbestimmung fünf µl 7-AAD pro Ansatz hinzupipettiert. Wurden die Zellen vor der Färbung fixiert (B.4), so konnten sie gefärbt bis zur Analyse für 24 h problemlos bei 4° C gelagert werden. Erfolgte keine Fixierung, so wurden die Zellen sofort nach der Färbung vermessen. Eine detaillierte Auflistung der Primär- und Zweitantikörper-Verdünnungen ist unter B.6 zu finden.

6.1.1. Analyse der Fcγ-Rezeptor II/III (CD32/CD16) Oberflächenexpression auf Zellen

RMA und JAWS II Zellen so wie BMDCs wurden geerntet, in PBS gewaschen und auf eine Zelldichte von $5 \times 10^6/\text{ml}$ in PBS eingestellt. Ein ml dieser Zellsuspension wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und fünf Min bei 4° C und mit ca. 1100 g (3500 UpM, Tischzentrifuge) sedimentiert. Die Zellen wurden in 100 µl Ratte-anti-Maus CD32/CD16 Antikörper-Verdünnung (1:100 in PBS) für eine h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal in PBS gewaschen. Es folgte eine Inkubation mit 100 µl Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt (1:100 in PBS) für eine Stunde auf Eis. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, sonst aber gleich behandelt worden waren. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal in PBS gewaschen, das Zellsediment in 130 µl PBS aufgenommen, in 1,4 ml Micronic Polypropylen-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometrie vermessen.

6.1.2. Analyse der CVLP- und CVLP-ICs-Bindung an Zellen

RMA Zellen und BMDCs wurden geerntet, in PBS gewaschen und auf eine Zelldichte von $5 \times 10^4/\text{ml}$ in PBS eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspension wurden pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Die Zellen wurden mit 250 g für zwei Min (1200 UpM, Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0R) sedimentiert. Die Zellen wurden anschließend mit ein bis zehn µg dialysierten HPV16L1ΔC E7₁₋₅₅ bzw. HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs oder CVLPs komplexiert mit polyklonalem Mausserum MS B (1:100 verdünnt) bzw. IgG2a (CVLP:IgG2a = 1:670) in 60 µl PBS für 45 Min auf Eis inkubiert. Sollte die Bindung der CVLPs oder CVLP-ICs an die Zellen durch den Ratte-anti-Maus CD32/CD16 Antikörper geblockt werden, so wurden die Zellen zuvor mit diesem 1:100 in PBS ebenfalls für eine h auf Eis inkubiert und danach gewaschen (pro Loch 100 µl PBS, 250 g für zwei Min (1200 UpM, Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0R)). Nach der Inkubationszeit, in der die CVLPs bzw. CVLP-Immunkomplexe an die Zellen binden konnten, wurden die Zellen zwei Mal gewaschen (s.o.) und danach 30 Min mit 100 µl Primärantikörperverdünnung inkubiert: CVLPs wurden durch den Antikörper 25/C (1:100 in PBS) oder wie CVLP-ICs durch das

Antikörperserum 4543 (1:300 in PBS) detektiert Nach zwei weiteren Waschschrritten folgte eine Inkubation mit 100 µl entsprechende Sekundärantikörper-Verdünnung: CVLPs detektiert mit 25/C wurden mit dem Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus FITC gekoppelt (1:100 in PBS) inkubiert, CVLPs wie auch CVLP-ICs, die durch das Antikörperserum 4543 detektiert worden waren, mit Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 (1:100 in PBS) gekoppelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert, sonst aber gleich behandelt worden waren. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal in PBS gewaschen, das Zellsediment in 130 µl PBS aufgenommen, in 1,4 ml Micronic Polypropylen-Röhrchen überführt und mittels Durchflusszytometrie vermessen.

6.1.3. Analyse der Aktivierungsmarker auf BMDCs

6.1.3.1. Aktivierung der BMDCs

An Tag fünf bzw. sechs nach der Generierung der BMDCs aus dem Knochenmark (C.3.1) wurden ca. 1×10^6 Zellen vom Überstand in kleine Petrischalen (Durchmesser 3,5 cm, keine Zellkulturschalen, da sonst die Zellen auch ohne Ausreifung anhaften konnten) in einem ml BMDC-Medium (B.11.2.1) ausplattiert. Zu jedem Aktivierungsansatz wurde das entsprechende Antigen/Adjuvans dazupipettiert: 0,01-18 µg CVLPs bzw. zehn µg Kapsomere alleine oder nach vier Stunden in Kombination mit CpG ODNs (1 µg/ml) bzw. mit 0,01-18 µg CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) beladen. Zusätzlich wurden BMDCs mit und ohne CVLPs nach vier Stunden in Kombination mit CpG ODNs (0,1-1 µg/ml) beladen. Sollten die Zellen für 30 Min mit Sorbitol (Endkonzentration 600 mM) inkubiert werden, so fand dies frühestens vier Stunden nach der CVLP-Beladung und spätestens 30 Min vor der Antikörperfärbung statt. Als Negativkontrolle dienten BMDCs, die mit PBS oder zehn µg/ml denaturierten CVLPs beladen wurden bzw. BMDCs, zu denen eine äquivalenten Menge einer dialysierten CsCl-Fraktion hinzupipettiert wurde, die aus einer Bakulovirus-Wildtyp Aufarbeitung (keine Expression von Viruspartikeln) stammte. Ca. sechs Stunden nach der CVLP-Beladung wurde ein weiterer ml BMDC-Medium pro Petrischale hinzupipettiert. Die beladenen BMDCs wurden nun 48 h bei 37° C im Zellkulturinkubator weiterkultiviert.

6.1.3.2. Probenvorbereitung für die FACS-Analyse der aktivierten BMDCs

Der zweitägigen Inkubation der Antigen/Adjuvans beladenen BMDCs (s.o.), schloss sich eine Durchflusszytometrie-Analyse an. Sowohl die Zellen im Überstand als auch die adhärennten Zellen (gelöst mittels Zellschaber) wurden vereint und fünf Min mit 250 g (1200 UpM, Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R) sedimentiert. Das Zellsediment wurde in PBS gewaschen. Danach wurde das Sediment in PBS aufgenommen und auf eine Zelldichte von 5×10^4 /ml eingestellt. Nun wurden je 100 µl pro Färbeansatz (CD40, CD80 etc. und deren Kontrollen) in ein Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte pipettiert. Die Zellen wurden zwei Min bei 4° C mit ca. 250 g (1200 UpM, Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0R) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment der Zellen, die mit einem direkt gekoppelten Primärantikörper anti-Maus CD80 PE gefärbt werden sollten, wurde in 100 µl PBS resuspendiert. In der vorliegenden Arbeit wurde sowohl ein an PE direkt gekoppelter und ein ungekoppelter Antikörper spezifisch für Maus CD80 verwendet. Das Sediment der Zellen, die mit Primär- und Sekundärantikörper gefärbt werden sollte, wurden in 50 µl Primärantikörper-Verdünnung (1:50 in PBS) aufgenommen: anti-Maus CD40, anti-Maus CD54, anti MHC II und anti-Maus CD80. Nach einer 45 minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen. Es folgte die Färbung mit den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundärantikörpern, bzw. mit dem direkt gekoppelten Primärantikörper. Hierfür wurde das Sediment in 50 µl Primär-/Sekundärantikörper-Verdünnung aufgenommen: anti Maus CD80 PE (1:50 in PBS), Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt (1:100 in PBS) und Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt (1:100 in PBS). Nach einer Inkubationszeit von 45 Min auf Eis wurden die Zellen wieder zwei Mal mit PBS

gewaschen. Die Zellsedimente wurden in 130 μ l PBS aufgenommen und in 1,4 ml Micronic Polypropylen-Röhrchen überführt, pro Ansatz mit fünf μ l 7-AAD versehen und mittels Durchflusszytometrie vermessen.

6.1.4. Probenvorbereitung der intrazellulären IFN γ -Färbung

Siehe C.0 bei dieser Färbung wurde kein 7-AAD (s.o.) verwendet.

6.1.5. Probenvorbereitung der MHC-I Tetramerfärbung

Siehe C.9.1

7. Methoden zum Nachweis der Antigenpräsentation

7.1 Beladung der BMDCs und BMDCs TAP $^{-/-}$ zur Überprüfung der Antigenpräsentation

Nach der Isolation von Vorläuferzellen von DCs bzw. DCs TAP $^{-/-}$ aus dem Knochenmark (C.3.1) wurden 1×10^6 Zellen pro großer Petrischale (keine Zellkulturschalen!) ausplattiert und bis zu einem Gesamtvolumen von 10 ml mit BMDC-Medium (B.11.2.1) aufgefüllt. Nach drei Tagen wurden weitere zehn ml BMDC-Medium zugefügt. Am Tag fünf wurde das Kulturmedium gewechselt und am Tag sechs oder sieben wurden die BMDCs bzw. BMDCs TAP $^{-/-}$ mit dem Antigen bzw. Adjuvans beladen. Dazu wurden die Zellen, die sich im Überstand befanden, vereint, in BMDC-Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 5×10^5 /ml eingestellt. Pro Duplikat-Ansatz wurden je 50 μ l der Zellsuspension pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte pipettiert (siehe Abbildung 9). Sollte der Antigenpräsentationsweg hinsichtlich des ER-Golgi Transports untersucht werden, so wurden je fünf μ l einer Brefeldin A (BFA) Lösung [1 mg/ml] (B.8) (1:200-1:700 verdünnt, 500-140 ng/ml) zu den Zellen pipettiert. Pro Loch wurden nun je nach Versuchsansatz 40 pg-4 μ g (5 ng-500 μ g/ml) CVLP, 40 pg-vier μ g (5 ng-500 μ g/ml) CVLP-ICs, 25-2400 ng Kapsomere, 0,1-1 μ g/ml CpG ODN, ein μ g/ml LPS oder 600 mM Sorbitol in einem Gesamtvolumen von 30 μ l zugegeben. Als Positivkontrolle wurden RMA-E7 Zellen oder die BMDCs, die mit 100 nM E7₄₉₋₅₇ Peptid bzw. L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladen worden waren, verwendet. Als Negativkontrolle wurden BMDCs mit PBS oder mit OVA₂₅₈₋₂₆₅ Peptid beladen. Daraufhin wurde die Platte ca. 18 h bei 37° C im Zellkulturinkubator kultiviert. Versuchsabhängig wurden BMDCs mit CpG ODNs oder Sorbitol zu unterschiedlichen Zeitpunkten beladen (z.B. erst kurz vor der intrazellulären IFN γ -Färbung). Nach der Inkubationszeit wurde die Antigenpräsentation der beladenen BMDCs indirekt mittels intrazellulärer IFN γ -Färbung oder IFN γ -EliSpot nachgewiesen und quantifiziert.

		CVLP		IC		CpG		CpG		Sorbitol		Sorbitol	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PBS	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
L1 ₁₆₅₋₁₇₃	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4000 ng	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
400 ng	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
40 ng	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4 ng	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,4 ng	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
0,04 ng	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Abbildung 9: Beispiel eines Pipettierschemas für die Beladung von BMDCs

In jedes Loch wurden 25.000 BMDCs pipettiert, die danach immer in Duplikaten mit unterschiedlichen Konzentrationen an CVLPs/CVLP-ICs beladen wurden (C-H). Als Kontrollen dienten die Reihen A und B, in denen die Zellen mit PBS bzw. Antigenpeptid beladen wurden. Reihen 5-12 wurden ebenfalls mit CVLPs beladen, aber dann zusätzlich behandelt (CpG ODNs oder Sorbitol).

7.2 Intrazelluläre Interferon γ -Färbung (IFN γ -Färbung) zum Nachweis der Antigenpräsentation

Die Fähigkeit von Dendritischen Zellen, ein Antigen im Kontext von MHC Klasse I Molekülen zu präsentieren, wurde indirekt über die intrazelluläre IFN γ Färbung von E7 bzw. L1 spezifischen T-Zellen überprüft (als Negativkontrolle wurden OVA spezifische T-Zellen verwendet).

Wurde das E7₄₉₋₅₇ bzw. L1₁₆₅₋₁₇ Epitop durch zytotoxische T-Zellen über den für das Antigen spezifischen T-Zellrezeptor erkannt, aktivierte dies eine *de novo* IFN γ -Synthese in der T-Zelle. Eine Ausschüttung des Zytokins wurde in diesem Versuch durch die Verwendung eines Toxins (Monensin), welches den Golgi-Apparat zerstört, verhindert. IFN γ konnte sich dadurch in der T-Zelle in großen Mengen ansammeln und somit detektiert werden. Dazu wurden die T-Zellen fixiert und permeabilisiert und IFN γ wurde mittels fluoreszenz-markierten Antikörpern intrazellulär detektiert (siehe auch Abbildung 34). Um CD8⁺ zytotoxische T-Zellen von CD4⁺ T-Helferzellen zu unterscheiden, wurden diese beiden Korezeptoren ebenfalls durch fluoreszenz-markierte Antikörper angefärbt. Die Zellen wurden dann mittels Durchflusszytometrie vermessen und als IFN γ und CD8 doppelt positiven Zellen der CD8 einfach positiven Zellpopulation angegeben. Von der Menge an aktivierten T-Lymphozyten konnte nun auf die Effizienz der Antigenpräsentation rückgeschlossen werden. Für die Fixierung, Permeabilisierung und für die Waschvorgänge wurde ein Kit verwendet (*Cytofix/Cytoperm*TM). Um einige Pipettiervorgänge zu vereinfachen, wurden eine Multistep-Pipette und Präzisions-Dispensertips (Ritips) verwendet.

Die BMDCs, die am Vortag mit Antigen in einer 96-Loch Rundbodenplatte beladen worden waren (C.7.1), wurden versuchsabhängig mit 600 mM Sorbitol pro well stimuliert. Danach wurden pro Loch 50 μ l einer E7 bzw. L1 spezifische T-Zell-Suspension pipettiert (ca. 50.000-100.000 Zellen pro Loch). Die Zellen wurden mit 250 g für eine Min (1200 UpM, Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0 R) in der Platte sedimentiert und dann für insgesamt sechs h bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einer h wurden pro Loch 25 μ l einer verdünnten Monensin-Lösung (12 μ M Monensin/EtOH in RPMI-Medium) dazupipettiert. Die Platte wurde dann zwei Min mit 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte kopfüber abgetupft und kurz vorsichtig gevortext. Die Zellsedimente wurden jeweils in 100 μ l *Cytofix/Cytoperm* resuspendiert und 20 Min bei 4° C inkubiert. Danach wurde die Platte zwei Min mit 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte kopfüber abgetupft und kurz vorsichtig gevortext. Die Zellen wurden gewaschen: es wurden 100 μ l

Perm/Wash Puffer pro Loch pipettiert, die Platte wurde zwei Min mit 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte kopfüber abgetupft und kurz vorsichtig gevortext. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Pro Loch wurden 25 µl eines Antikörpermix (PE anti-Maus CD8a 1:100, *Cy-Chrome™* anti-Maus CD4 1:100 in PBS, anti-Maus IFN γ FITC 1:50 in PBS) pipettiert, die Platte wurde vorsichtig gevortext und 30 Min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach zwei Mal gewaschen und danach in jeweils 130 µl PBS/0,5% BSA resuspendiert. Die Durchflusszytometrie-Messung wurde am gleichen Tag oder aber ein bis zwei Tage später durchgeführt, sofern die Zellen lichtgeschützt bei 4° C aufbewahrt wurden. Bei der Auswertung mit dem Softwareprogramm *Cellquest™* wurden in einem Diagramm die CD8⁺ Zellen gegen CD4⁺ Zellen aufgetragen (tote Zellen erschienen als eine Art Diagonale). Ein Gatter (*gate*) wurde um die CD8⁺ Zellen gesetzt, welche dann in einer zweiten graphischen Darstellung gegen IFN γ positive Zellen aufgetragen wurden. Diese Primärdaten wurden dann mittels *Microsoft Excel* in einem Säulendiagramm dargestellt, welches den Prozentsatz der CD8 und IFN γ doppelt positive T-Zellen von CD8 einfach positiven T-Zellen darstellt.

7.3 IFN γ Enzyme-linked immunoSpot (EliSpot) zum Nachweis der Antigenpräsentation

Analog zur intrazellulären IFN γ Färbung wurde auch bei dieser Methode die *de novo* Synthese des Zytokins IFN γ einer E7 bzw. L1 spezifischen T-Zellen als indirekter Nachweis für die Antigenpräsentation der beladenen BMDCs herangezogen. Die Zytokin-Ausschüttung wurde auf Einzelzellniveau detektiert, wodurch die Frequenz der zytokinproduzierenden T-Zellen bestimmt werden konnte. Hierbei wurde die Anzahl der spezifischen T-Zellen (ermittelt durch die Zugabe der Antigen-beladenen BMDCs) als Prozentsatz aller unspezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen verglichen (ermittelt durch die Zugabe eines Mitogens, das eine unspezifische Zytokin-Synthese auslöst). Das sezernierte IFN γ wurde von spezifischen Antikörpern abgefangen und durch einen zweiten IFN γ spezifischen Antikörper, an den Biotin gekoppelt ist, detektiert. Streptavidin-Alkalin Phosphatase konnte nun an das gekoppelte Biotin binden und ein Substrat umsetzen, welches nach der Phosphatabspaltung ausfällt und daher als kleiner schwarz/violetter Punkt auf der Membran sichtbar wurde. Somit symbolisierte jeder kleine Punkt (*Spot*) eine T-Zelle, die durch eine Antigen-präsentierende BMDC spezifisch aktiviert worden war. Das Zählen und die Auswertung der einzelnen Punkte erfolgte durch einen EliSpot-Reader.

Die Arbeiten wurden bis zur Inkubation mit den Milzzellen unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Am Vortag wurden BMDCs in einer in 96-Loch Rundbodenplatte mit Antigen/Adjuvans beladen (C.7.1). ebenso wurde eine membranbeschichtete 96-Loch Platte (MultiScreen-HA Sterile Plates) mit 200 µl PBS/Loch fünf Min bei RT äquilibriert. Das PBS wurde verworfen, 150-200 ng anti-Maus IFN γ (R4-6A2) in 100 µl PBS pro Loch pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörper-Verdünnung verworfen und einmal mit 200 µl PBS/Loch gewaschen. Mit 200 µl RPMI-Medium (10 % FCS)/Loch wurde bei 37° C ein bis zwei Stunden geblockt und danach das Medium verworfen. E7- oder L1-spezifische T-Zellen wurde in einer seriellen Verdünnung (von 1×10^5 - $1,25 \times 10^4$ Zellen pro Loch) ausgesät, eine serielle Verdünnung als Triplikat pro Testreihe. Eine serielle Verdünnungsreihe blieb unbehandelt, in eine zweite wurde pro Loch 10 µl einer Lektin-Verdünnung (200 ng/Loch Pokeweed Mitogen) und in eine dritte wurde pro Loch 10 µl einer Antigenpeptid-Verdünnung (L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid Stammlösung (100 µM) 1:5 verdünnt; E7₄₉₋₅₇ Peptid Stammlösung (100 µM) 1:50 verdünnt) pipettiert (Positivkontrolle). Zu allen weiteren Verdünnungsreihen wurden die mit Antigen-beladenen Zellen vom Vortag pipettiert (25.000 pro Loch). Die Platte wurde dann über Nacht bei 37° C im Zellinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Milzzellen zusammen mit den Antigen-präsentierenden Zellen verworfen und die Löcher wurden fünf Mal mit 200 µl PBS/0,5% Tween 20 und danach einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Es wurden 200 ng anti-Maus IFN γ -Biotin (XMG1.2) in 100 µl PBS pro Loch pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag

wurde die Antikörperverdünnung verworfen und die Löcher fünf Mal mit jeweils 200 µl PBS/0,5 % Tween 20, danach einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Pro Loch wurden 100 µl 1:1000 Streptavidin-alkaline Phosphatase in PBS pipettiert und die Platte ohne Deckel ein bis zwei h bei RT inkubiert. Die Streptavidin-alkaline Phosphatase wurde verworfen und die Löcher vier Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Pro Loch wurden 100 µl EliSpot Substrat-Lösung (BCIP/NBT) pipettiert und abgedunkelt zwei bis 20 Min inkubiert. Sobald Punkte gut sichtbar waren, wurde die Reaktion abgestoppt: die gesamte Platte wurde unter fließendem Leitungswasser abgespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Punkte mittels EliSpot Reader quantifiziert.

8. Generierung von zytotoxischen T-Zellen: *in vitro* und *in vivo* *Priming*

8.1 *In vitro Priming naiver T-Zellen durch CVLP-beladene BMDCs*

Nach der Isolation von Vorläuferzellen von BMDCs aus dem Knochenmark (C.3.1) wurden 1×10^6 Zellen pro großer 9,4 cm-Petrischale (keine Zellkulturschale!) ausplattiert und bis zu einem Gesamtvolumen von zehn ml mit BMDC-Medium (B.11.2.1) aufgefüllt. Nach drei Tagen wurden weitere zehn ml BMDC-Medium zugefügt. Am Tag fünf wurde das Medium gewechselt und am Tag sechs wurden die BMDCs mit dem Antigen bzw. Adjuvans beladen. Dazu wurden die Zellen, die sich im Überstand befanden, vereint, in BMDC-Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von 5×10^5 /ml eingestellt. Pro Duplikat-Ansatz wurden je 50 µl der Zellsuspension pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte pipettiert (= 25.000 Zellen pro Loch). Pro Loch wurden nun in Duplikaten 25-1600 ng HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs, CVLPs in Kombination mit 0,1 µg/ml CpG ODNs (4 h nach CVLP-Beladung) bzw. ein µg/ml LPS oder CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) in einem Gesamtvolumen von 30 µl zugegeben. Als Positivkontrolle wurden BMDCs mit 100 nM L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid alleine bzw. in Kombination mit CpG ODNs bzw. LPS, als Negativkontrolle mit PBS alleine bzw. in Kombination mit CpG ODNs bzw. LPS beladen. Nach einer ca. 18 stündigen Inkubation im Zellinkubator wurde zu jedem Loch Milzzellen ($50 \mu\text{l} \cong 1 \times 10^5$ Zellen), die zuvor aus einer *naiven* C57BL/6 Maus aufgearbeitet und auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt worden waren (C.2.1), hinzupipettiert. Nach sieben Tagen bei 37° C im Zellinkubator wurden die Zellen der Duplikate vereint, in insgesamt 100 µl T-Zell-Medium aufgenommen und erneut mit je 50 µl pro Loch auf eine vorbereitete 96-Loch Rundbodenplatte, in der wie zuvor BMDCs mit Antigen und/oder Adjuvans als Duplikate beladen worden waren, ausplattiert (*'Boosting'*). Nach weiteren sieben Tagen bei 37° C im Zellinkubator wurden die Zellen der Duplikate abermals vereint und mittels INF γ -EliSpot (C.7.3) auf spezifische T Zellen überprüft.

8.2 Immunisierung der C57BL/6 Mäuse (*in vivo Priming*)

Das *in vivo Priming* wurde in drei unterschiedlichen Experimenten untersucht, in denen unterschiedliche Konzentrationen an Chimären HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ oder HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ Virus-ähnlichen Partikeln den Mäusen direkt injiziert wurden oder zuvor auf Dendritische Zellen geladen wurden, um dann diese *ex vivo* beladenen BMDCs zu injizieren. So wurden im ersten und zweiten Experiment fünf µg CVLPs bzw. CVLP-ICs pro C57BL/6 Maus verabreicht, im dritten Experiment waren es bei der hohen Konzentration (HK) 9,6 µg und bei der niedrigen Konzentration (NK) 1,2 ng. Bei der direkten Injektion entsprach die verabreichte

Menge an CpG ODNs der, mit der die BMDCs behandelt worden waren (0,1 µg/ml). Den Proben für die Sorbitol-Gruppen wurde kurz vor der Injektion der Zuckeralkohol beigemischt (600 mM). Pro C57BL/6 Maus wurden 100 µl bzw. 113 µl (Sorbitol-Gruppe) Antigen- bzw. *ex vivo* beladene BMDCs-Suspension mit einer sterilen Einmalspritze (1 ml) und einer Kanüle (0,6 x 25) s.c. in den Nacken gespritzt. Nach 14 Tagen wurden die Milzen der immunisierten Mäuse isoliert und aufgearbeitet (C.2.1). Unter den Milzzellen wurden Antigen-spezifische T-Zellen nachgewiesen (C.9).

Die *ex vivo* Beladung der BMDCs wurde wie folgt durchgeführt: BMDCs Am Tag sechs nach der Isolierung der BMDCs aus dem Knochenmark (C.3.1) wurden unter sterilen Bedingungen mit Antigen bzw. Adjuvans beladen. Dazu wurden die Zellen, die sich im Überstand befanden, vereint, in BMDC-Medium aufgenommen und auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ /ml eingestellt. Anschließend wurde ein ml pro 3,5 cm-Petrischale (keine Zellkulturschale!) pipettiert. Die $1,5 \times 10^5$ BMDCs pro Petrischale wurden nun mit den unterschiedlichen Konzentrationen CVLPs oder CVLP-ICs (je nach Experiment) beladen. Dem Versuch entsprechend wurden sofort oder vier h nach der CVLP-Beladung 0,1 µg/ml CpG ODNs zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von vier h wurden die Petrischalen ad zwei ml mit BMDC-Medium aufgefüllt. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet, kurz in PBS gewaschen und in PBS auf eine Zelldichte von $1,35 \times 10^6$ /ml eingestellt. Dem Experiment entsprechend erfolgte nun eine Zugabe von ca. 56 µl Sorbitol (Vorratskonzentration 1,2 M; Endkonzentration im Versuch 600 mM).

9. Nachweis Antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Antigen-spezifische T-Zellen (ZTLs), welche sowohl durch eine Immunisierung *in vivo* (C.8.2) als auch durch *in vitro Priming* (C.8.1) generiert worden waren, durch unterschiedliche Methoden (MHC-I Tetramer Färbung, intrazelluläre IFN γ -Färbung, IFN γ -EliSpot und der Zytotoxizitätstest (Cr⁵¹ release assay)) nachgewiesen und quantifiziert. Diese Methoden unterscheiden sich teilweise stark in dem Prinzip des Nachweises und in ihrer Sensitivität (Michel et al., 2002) und sind in der folgenden Tabelle 5 charakterisiert:

Tabelle 5: Nachweismethoden Antigen-spezifischer T-Zellen aus Freyschmidt und Michel, 2003

	MHC-I Tetramer Färbung	Intrazelluläre IFN γ Färbung	IFN γ EliSpot	Zytotoxizitätstest (Cr ⁵¹ -release assay)
Prinzip	Farbmarkierte MHC-I-Peptid-Tetramere binden spezifisch an T-Zellrezeptoren Antigen-spezifischer T-Zellen.	Ausgelöst durch Antigenerkennung synthetisieren T-Zellen u.a. IFN γ , dessen Sekretion blockiert wird. IFN γ kann somit intrazellulär durch fluoreszenzmarkierte Antikörper detektiert werden.	Von antigenspezifischen T-Zellen synthetisiertes IFN γ wird ausgeschüttet und von spezifischen Antikörpern „abgefangen“ und durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Ein so entstehender Spot repräsentiert eine antigen-spezifische T-Zelle.	Radioaktiv markierte Antigen-präsentierende Zellen werden von antigen-spezifischen zytotoxischen T-Zellen getötet, Radioaktivität wird dadurch freigesetzt und kann im Überstand gemessen werden.
Sensitivität (T-Zell Frequenz)	1 in 50.000	1 in 50.000	1 in 100.000	1 in 10.000
Dauer	3h (ohne Tetramer-Herstellung)	1 Arbeitstag	4 Tage	6 Tage (inkl. Restimulierung)
Vorteil	Detektion der spezifischen T-Zellen auf Einzelzellniveau. Einfaches Protokoll zur Färbung, Zusätzliche Parameter (CD8 u. CD4) messbar. Funktioneller Nachweis bezüglich der Sortieren lebender positiver Zellen möglich.	Detektion der spezifischen T-Zellen auf Einzelzellniveau. Zusätzliche Parameter (CD8 u. CD4) messbar. Funktioneller Nachweis bezüglich der Zytokin-Synthese.	Detektion der spezifischen T-Zellen auf Einzelzellniveau. Hohe Sensitivität, wenige Milzzellen werden benötigt, pro Tag geringer Zeitaufwand. Funktioneller Nachweis bezüglich der Zytokin-Synthese.	Funktioneller Nachweis der zytotoxischen Eigenschaft der T-Zelle.
Nachteil	Kein funktioneller Nachweis; aufwendige Tetramer Herstellung. Restriktion auf Epitop/MHC-I Komplex. Erfahrung am Durchflusszytometer nötig zur korrekten Messung.	Je nach Probenanzahl großer Zeitaufwand am Durchflusszytometer. Erfahrung am Durchflusszytometer nötig zur korrekten Messung. Kein funktioneller Nachweis bezüglich der Lyse.	Grosse Zeitspanne des Versuchsablaufs. Gefahr der subjektiven Beurteilung bei der Auswertung der Spots. Spezielles Auslesegerät (EliSpot-Reader) nötig.	Arbeiten mit radioaktivem Chromium; große zeitliche Spanne zwischen Milzpräparation und Messung. Geringe Sensitivität.

9.1 MHC-I Tetramer Färbung zum Nachweis Antigen spezifischer T-Zellen

MHC-I Tetramere (C.9.1.1) bestehen aus vier MHC Klasse I Molekülen, welche das Antigen-Peptid E7₄₉₋₅₇ gebunden haben und durch ihre Biotinylierung an Streptavidin, welches mit dem fluoreszierenden Farbstoff Phycoerythrin (PE) gekoppelt ist, binden.

Wurden durch eine Immunisierung Antigen-spezifische T-Zellen generiert, so konnten diese durch die MHC-I Tetramere quantifiziert werden, da Tetramere über eine ausreichende Avidität verfügen, um an T-Zellrezeptoren der spezifischen T-Zellen stabil zu binden und diese somit zu markieren. Eine Quantifizierung auf Einzelzellniveau war nun im Durchflusszytometer möglich. Durch die Fluoreszenzmarkierung von anderen Parametern der T-Zellen (z.B. CD8) konnten die T-Zellen weiter charakterisiert werden.

Die folgenden Arbeitsschritte müssen nicht steril durchgeführt werden.

Von einer aufgearbeiteten Milz einer immunisierten Maus (C.2.1) wurden 1×10^6 Milzzellen pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte ausgesät und mit 250 g für zwei Min sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und die Zellen wurden durch seitliches Klopfen gelöst. Pro Loch wurden nun 50 µl FACS-Puffer (B.8) mit fünf µg/ml FITC anti-Maus CD8a (Ly-2) und 1:5–1:30 verdünnten PE-gekoppelten MHC-I Tetrameren (H2-D^b mit Peptid Epitop HPV 16 E7₄₉₋₅₇) (C.9.1.1) zu den Zellen pipettiert. Für die korrekte Einstellung des Durchflusszytometers wurden zusätzlich folgende Ansätze benötigt: zwei Löcher ohne Antikörper mit fünf µg/ml FITC anti-Maus CD8a (Ly-2) Antikörper allein, oder zwei µg/ml PE anti-Maus CD3ε Antikörper allein (für Kompensation), sowie in Kombination beider Antikörper. Es folgte eine Inkubation von 15 Min bei 4° C. Nachdem pro Loch 150 µl FACS-Puffer zugegeben wurde, wurden die Zellen mit 250 g für zwei Min sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen durch leichtes Klopfen gelöst und in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Dieser Waschgang wurde bis zu fünf Mal durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl FACS-Puffer aufgenommen. Um nur lebende Zellen in die Auswertung mit einzubeziehen, wurden tote Zellen durch das Hinzufügen von fünf µl 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) markiert. Nach der Durchflusszytometrie-Messung (C.6) wurde der prozentuale Anteil von MHC-I Tetramer-PE und CD8-FITC doppelt positiven Zellen unter den CD8-FITC positiven Zellen bestimmt.

9.1.1. MHC-I Tetramer Herstellung

Die MHC-I Tetramere wurden im Rahmen einer Kooperation in Dr. Ton N.M. Schuhmachers Labor im Netherland Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande unter der Anleitung von Frau Mireille Toebes hergestellt. Hierzu wurden zunächst die Schwere (H-2D^b) und die Leichte Kette (β-2-Mikroglobulin) der MHC Klasse I Moleküle bakteriell exprimiert. Durch die Inkubation der beiden Ketten zusammen mit dem E7₄₉₋₅₇ Antigen-Peptid entstanden stabile Monomere, welche biotinyliert wurden und somit an Streptavidin, welches mit Phycoerythrin (PE) gekoppelt war, binden konnten. Durch das richtige Verhältnis von biotinylierten Monomeren und Streptavidin-PE konnten E7₄₉₋₅₇ spezifische MHC-I Tetramere hergestellt werden, welche für die MHC-I Tetramer-Färbung verwendet wurden (C.9.1). Die für die MHC-I Tetramer Herstellung speziellen Materialien sind unter B.12 zu finden.

9.1.1.1. Transformation der bakteriellen Vektoren der Schwere und Leichten Kette der MHC Klasse I Moleküle

20 µl chemokompetente Bakterien *E. coli* BL21 (DE3) pLysS wurden für 20 Min zusammen mit einem µg DNA (pMbio H2-D^b bzw. pET 2m) auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock für wurde 1,5 Min bei 42° C durchgeführt. Die Bakterien wurden für weitere zehn Min auf Eis inkubiert. Nachdem ein ml LB-Medium hinzupipettiert wurde, wurden die Bakterien 45 Min mit 150 UpM (Schüttler) bei 37° C inkubiert. 200 µl der Bakteriensuspension wurden auf eine Agarplatte mit 34 µg/ml Chloramphenicol und 50 µg/ml Carbenicillin ausplattiert und ü.N. bei 37° C inkubiert.

9.1.1.2. Bakterielle Expression und Ernten der Bakterien

Am folgenden Tag wurde eine Kolonie der Agarplatte (s.o.) in 20 ml LB-Medium mit Antibiotika über den Tag mit 150 UpM (Schüttler) bei 37° C kultiviert bis die Optische Dichte (OD) ca. 0,6 erreichte. Die Bakterienkultur wurde dann ü.N. bei 4° C aufbewahrt. Zwei Liter frisches LB-Medium mit Antibiotika wurden mit der Kultur vom Vortag geimpft und so lange mit 150 UpM (Schüttler) bei 37° C kultiviert bis die OD ca. 0,6 erreichte. Die Proteinproduktion wurde durch die Zugabe von Isopropyl-1-thio- β -D-Galaktose (IPTG, ein Laktose Analogon) induziert (Endkonzentration 0,4 M). Nach einer weiteren Inkubationszeit von vier bis fünf h mit 150 UpM (Schüttler) bei 37° C, in der die Bakteriensuspension leicht angefärbt erscheinen konnte, wurde je ein Liter der induzierten Bakterienkultur in drei große Beckmann Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und mit 4221 g für zehn Min bei 4° C sedimentiert (5000 UpM, GS-3 Rotor). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment wurde in 100 ml LB-Medium aufgenommen und auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt mit ca. 3630 g für 15-20 Min bei 4° C (5000 UpM, Heraeus Megafuge 1,0R). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment bei -20°C eingefroren.

9.1.1.3. Präparation der Einschlusskörper (inclusion bodies) der Schweren und Leichten Kette

Einige rekombinante Proteine, welche in Bakterien exprimiert werden und nicht löslich sind, formen sogenannte Einschlusskörper. Dies sind dichte Aggregate, die zwar aus dem gewünschten Protein bestehen, welche sich aber in einem nicht-nativen Zustand befinden. Die Gründe für die Entstehung von Einschlusskörpern können verschieden sein (Konzentration des produzierten Proteins, inkorrekte Faltung aufgrund der bakteriellen Umgebung oder Nichtausbilden von Disulfidbrücken in der reduzierenden intrazellulären Umgebung). Einschlusskörper können durch verschiedene Zentrifugationsschritte von restlichen zellulären Komponenten getrennt werden, ihre Aufreinigung ist demnach relativ einfach.

Das eingefrorene Bakteriensediment (ein Sediment entsprach 500 ml der Bakterienkultur) wurde auf Eis aufgetaut. Das Sediment wurde in acht ml Bakterienlyse-Puffer durch Vortexen resuspendiert. Nachdem der Bakteriensuspension 20 mg Lysozym gelöst in zwei ml Bakterienlyse-Puffer hinzugefügt wurden, wurde sie für mind. 30 Min im Kühlraum unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden $MgCl_2$ (Endkonzentration 10 mM), $MnCl_2$ (Endkonzentration 1 mM) und DNase (Endkonzentration 100 mM) hinzugefügt. Die Bakteriensuspension wurde für weiter 30 Min unter Schütteln im Kühlraum inkubiert. Nach dem Zufügen von 20 ml Detergenz-Puffer wurde die Suspension gut vermischt und für 30 Min in Trockeneis mit 100% technischem EtOH eingefroren. Anschließend wurde die Suspension im 37° C-Wasserbad wieder aufgetaut. Max. 20 ml der Suspension wurden je in ein Corex Röhrchen gefüllt und bei 15792 g 15-20 Min bei 4° C (10.000 UpM, JS 13.1 swing-out Rotor) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde durch Vortexen in einem ml Wasch-Puffer resuspendiert. Ein weiterer ml wurde hinzugefügt und anschließend wurde die Suspension sechs bis acht Mal mit einer Spritze aufgezogen und durch eine 0,8 mm Kanüle gepresst. Es folgte ein weiter Waschschrift: es wurden zehn ml Wasch-Puffer hinzugefügt und der letzte Zentrifugenschritt wurde wiederholt (s.o.). Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Das Sediment, welches aus 500 ml induzierter Bakterienkultur gewonnen worden war, wurde anschließend in zehn ml Wasch-Puffer aufgenommen und wie oben mit der Spritze wurden zusammenhängende Komponenten gelöst. Je ein ml wurde in ein 1,5 ml Kryoröhrchen gefüllt und mit ca. 15.120 g zehn Min (13.000 UpM, Tischzentrifuge) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und das Sediment der Einschlusskörper der Schweren und Leichten Kette wurde bei -70° C eingefroren.

9.1.1.4. Faltung von Schwerer Kette, Leichter Kette und Peptid zu Monomeren

Die einzelnen Komponenten mussten nun zu vollständigen MHC Klasse I Monomeren, die das Antigen-Peptid gebunden haben, gefaltet werden. Schwere und Leichte Kette fügen sich erst durch die Antigen-

Peptid-Bindung zu einem stabilen Komplex zusammen, weshalb die Herstellung der Monomere experimentell eine Einschritt-Reaktion.

Die Faltungs-Reaktion wurde in einem Endvolumen von 50 ml durchgeführt. Die Menge an Schwerer Kette, die als Einschlusskörper vorhanden ist, ist der limitierende Faktor für die folgende Monomer-Faltungs-Reaktion. Es wurde sich deshalb an Erfahrungswerten orientiert und wie folgt kalkuliert: drei ‚50 ml-Kultur-Sedimente der Schweren Kette‘, ein ‚50 ml-Kultur-Sediment der Leichten Kette‘ und vier mg Antigen-Peptid werden für eine 50 ml Faltungsreaktion benötigt.

Die Einschlusskörper wurden auf Eis aufgetaut. Das Sediment wurde durch Zugabe von 100-200 µl Lösungs-Puffer und sorgfältigem Vortexen resuspendiert. Konnte das Sediment so noch nicht resuspendiert werden, wurde mehr Lösungs-Puffer zugegeben. Die korrespondierenden Sedimente der Schweren oder Leichten Kette wurden vereint und mit Lösungs-Puffer auf einen ml aufgefüllt. Mit ca. 15.120 g für zwei bis fünf Min (13.000 UpM, Tischzentrifuge) wurden die restlichen Zellfragmente entfernt und der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Schraubverschluss-Röhrchen überführt. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Hierfür wurden die Einschlusskörper 1:100 in Lösungs-Puffer verdünnt und deren OD bei 280 nm vermessen (Referenz: Lösungs-Puffer alleine). Die gemessene OD wurde mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert und ging dann mit in die folgende Rechnung (siehe dafür Tabelle 6) ein:

Tabelle 6: Referenztabelle für Schwere und Leichte Kette und Antigen-Peptid

Molekül	Molekulargewicht (MW)	Extinktionsfaktor ϵ
H-2D ^b - Schwere Kette	34990	89600
β -2-Mikroglobulin Leichte Kette	11679	18200
Antigen-Peptid HPV-16 E7 ₄₉₋₅₇	~ 1000	-

$$\text{Konzentration } [M] = OD / \epsilon$$

$$\text{Konzentration } [g/L] = M \times Mw$$

Nach der OD-Messung wurden die folgenden Konzentrationen eingestellt: 250 µM Schwere Kette in zwei ml Lösungs-Puffer, 500 µM Leichte Kette in einem ml Lösungs-Puffer, vier mM Antigen-Peptid in einem ml H₂O oder PBS (4 mg Antigenpeptide in 1 ml). Es folgte das Ansetzen der 50 ml Faltungs-Reaktion, in der die folgenden Endkonzentrationen der Komponenten vorlagen: zehn µM H-2Db-Schwere Kette, zehn µM β -2-Mikroglobulin Leichte Kette und 80 µM Antigen-Peptid. In ein 50 ml Röhrchen wurden die einzelnen Komponenten in der folgenden Reihenfolge pipettiert (Reihenfolge wichtig!): (i.) ein ml Antigen-Peptid, (ii.) ein ml Lösungs-Puffer, (iii.) ein ml β -2-Mikroglobulin Leichte Kette, (iv.) drei ml Ausgleichungs-Puffer und (v.) zwei ml H-2D^b-Schwere Kette. Es wurde mit Faltungs-Puffer bis 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurde sofort mit der Dialyse begonnen.

9.1.1.5. Dialyse und Konzentrierung der Monomere

Die 50 ml der Monomer-Faltungs-Reaktion wurde in eine Dialyse-Membran gegeben, welche zuvor mit H₂O gewaschen worden war und nun mit Klammern geschlossen wurde (es wurde Platz für zusätzliches Volumen gelassen, ca. 10 %). Die Dialyse fand in dem 20-fachen Volumen, d.h. in einem Liter Dialyse-Puffer, bei 4 °C ohne Rühren statt. Nach 24 h wurde der Puffer gewechselt und unter Rühren für weitere 24 h dialysiert. Die dialysierten Monomere (nun ca. 60 ml wegen der Osmose) wurden in zwei 50 ml Röhrchen überführt (da das E7₄₉₋₅₇ Peptid ohne DMSO recht unlöslich ist, erscheint diese Lösung unklar). Während des Zentrifugierens der dialysierten Monomere mit ca. 2330g für 15-20 Min bei 4 °C (4000 UpM, Heraeus Megafuge 1,0 R) wurden die Millipore Filter für die Aufkonzentrierungseinheit mit H₂O für zehn Min bei Raumtemperatur äquilibriert. Der Überstand der Zentrifugation, dessen Volumen auf fünf ml (Beladungslimit der großen Säule der Hochleistungs-Flüssigkeitschromatography (*High-performance liquid*

chromatography (HPLC)) reduziert werden musste, wurde in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt und bis zur Konzentrierung auf Eis aufbewahrt. Nachdem überprüft worden war, dass die Aufkonzentrierungseinheit dicht war, wurden die dialysierten Monomere bei 4° C im Kühlraum mit 1,7 bar N₂ und unter ständigem Rühren auf zwei bis drei ml konzentriert. Dabei war darauf zu achten, dass das Filter nicht trocken lief und dass der durch das Rühren entstandene Meniskus 2/3 der Höhe des Konzentrationsgefäß erreichte. 600 µl der dialysierten und nicht konzentrierten Monomere wurden für die analytische HPLC) welche während der Konzentrierung durchgeführt wurde, zurückgehalten. Die erhaltenen zwei bis drei ml konzentrierte Monomere und zunächst anhaftende Monomere, welche mit zwei bis drei ml Lauf-Puffer unter Rühren vom Filter gewaschen wurden, wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die konzentrierten Monomere wurden auf 1,5 ml Schraubverschluss-Röhrchen aufgeteilt und mit ca. 20.120 g fünf Min zentrifugiert (15.000 UpM, Tischzentrifuge), um Aggregate zu entfernen. Die Überstände wurden vereint, mittels Walter Corp. Filter und einer zehn ml Spritze gefiltert und danach in einem 50 ml Röhrchen gesammelt. Die fünf ml dialysierten und konzentrierten Monomere wurden in der präparativen HPLC aufgereinigt.

9.1.1.6. . Analytische High-performance liquid chromatography (HPLC) der Monomere

Um die korrekte Faltung der entstandenen Monomere zu überprüfen, wurde nach der Dialyse und vor der Konzentrierung der Monomere ein 600 µl Aliquot entnommen, das nun mittels analytischer HPLC charakterisiert wurde. Da es sich hierbei um eine Größen-Ausschluss-Chromatography handelte, konnten die entstandenen Monomere von ihren freien Komponenten, die ebenfalls nach der Dialyse noch vorhanden waren, getrennt werden. Da Schwere und Leichte Kette wie oben schon erwähnt sich erst durch die Antigen-Peptid-Bindung zu einem stabilen Komplex zusammensetzen, konnte davon ausgegangen werden, dass die Monomere immer Antigen-Peptid gebunden hatten und somit nur einzelne Schwere und Leichte Ketten und freies Peptid von diesen getrennt werden mussten.

Die HPLC wurde zunächst mit einem Wasserlauf ohne Säule, allerdings mit einem Vorfilter, gestartet (Druck ca. 500 PSI). Nachdem alle Komponenten auf ihre Dichte und Funktionsfähigkeit überprüft worden waren, wurde die kleine HPLC-Säule angeschlossen und eine Durchflussrate von 0,1 ml/Min eingestellt. Es wurde mit Wasser gewaschen, um wie folgt das in der Säule vorhandene Methanol zu entfernen: Gestartet wurde mit 0,1 ml/Min und stufenweise auf vier ml/Min erhöht (2-3 Min). Während der ganzen Prozedur wurde darauf geachtet, dass keine Blasen entstanden und dass der Druck zw. 500-600 PSI aufrecht erhalten wurde. Dann wurde zur Äquillibrierung für 15 Min 100% Lauf-Puffer in die Säule geleitet, wobei sich der Druck auf 800-1000 PSI erhöhte. Die Ladungs-Spritze und deren Kanüle wurden ca. drei Mal mit Wasser gespült. Das 600 µl Aliquot von der Monomer-Dialyse wurde durch einen Waters Corp. Filter mittels Spritze gefiltert. Nachdem die Software-Einstellungen vorbereitet waren (Eingabe-Volumen 10 ml, Laufzeit 30 Min, UV = 230 nm), wurde die Säule mit dem Monomer-Aliquot beladen. Das Eluationsprofil der Monomere wurde am UV-Monitor verfolgt: nach ca. 16-17 Min tauchte ein starker Monomer-Gipfel auf, gefolgt von einem Gipfel unkorrekt gefalteter Komponenten, ungebundener Antigen-Peptide und Phosphatase-Inhibitoren. Bei der folgenden Präparativen HPLC konnte sich nun nach der hier ermittelten Eluationszeit orientiert werden.

9.1.1.7. Präparative HPLC der Monomere

Nach der Analytischen HPLC wurden die Messeinheit auf UV =280 nm verändert (weniger sensitiv, misst Aromatische Ringe). Die Beladungsspritze wurde wie oben mit Wasser gespült. Die Säule wurde nun mit den fünf ml dialysierten und konzentrierten Monomeren beladen und der Lauf wurde am Monitor verfolgt (Absorption zw. 0,00-0,03). Nach ca. 16-17 Min Laufzeit (siehe Analytische HPLC) konnten die korrekt gefalteten Monomere erwartet werden. Als die Absorption sehr rasch auf ca. 1,0 stieg, wurde der Durchfluss in einem 50 ml Röhrchen aufgefangen bis die Absorption auf ca. 0,03 gesunken war. Das Volumen der gereinigten Monomere, welche sofort auf Eis gestellt wurden, betrug zw. sieben und zehn ml.

9.1.1.8. Biotinylierung der Monomere

Für eine effiziente Biotinylierungs-Reaktion ist der pH-Wert und die Ionenkonzentration (NaCl, MgCl₂) entscheidend. Daher wurden die gereinigten Monomere während der Biotinylierungs-Reaktion verdünnt, um die Ionenkonzentration zu reduzieren.

Den zehn ml gereinigten Monomeren wurden ad 20 ml H₂O folgenden Komponenten hinzugefügt: 800 µl Phosphatase Inhibitoren [25 x Vorrat], 400 µl 0,5 M ATP, zwei ml 10 x Ligase-Puffer, 400 µl fünf mM Biotin, 100 µl Biotin-Ligase. Die Biotinylierung fand bei 25° C über Nacht statt.

9.1.1.9. Aufreinigung der biotinylierten Monomere mittels HPLC

Zunächst wurden die Konzentrations-Säulen für 30 Min bei 3444 g (5000 UpM, SA600 oder SS34 Rotor) und bei 4° C so lange zentrifugiert bis das obere Volumen auf der Säule ca. zwei bis fünf ml betrug (konnte einen Tag zuvor vorbereitet und bei 4° C aufbewahrt werden). Das Wasser wurde verworfen und zehn ml der Biotinylierungs-Reaktion (= die Hälfte) vom Vortag wurde auf die Konzentrations-Säulen gegeben und wie oben zentrifugiert. Nachdem der Puffer im ‚Auffang-Röhrchen‘ entfernt worden war, konnte die zweite Hälfte der Biotinylierungs-Reaktion auf die Konzentrations-Säule gegeben werden. Wieder wurde wie oben so lange zentrifugiert bis das Volumen der biotinylierten Monomere auf fünf ml eingeeengt wurde. Anschließend wurde auf das obere Röhrchen ein Deckel platziert (fixiert mit Klebeband) und die Monomere wurden gevortext, so dass sie sich von der Filtermembran lösen konnten. Das Röhrchen wurde auf dem Kopf stehend bei 3820 g drei Min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Monomerlösung wurde wie oben durch ein Walter Corp. Filter gefiltert bevor sie mittels HPLC aufgereinigt wurde. Die große HPLC-Säule und die Software-Einstellungen (UV = 280 nm, 4 ml/Min) wurden wie oben vorbereitet. Auf dem Monitor konnte das Eluatiionsmuster verfolgt werden: zunächst kleine Gipfel der Aggregate und Ligase, nach zwölf Min ein großer Gipfel der biotinylierten Monomere (Abs. 280nm ca. 0,6), von welchen ca. zehn ml (max Abs. 280 nm > ca. 0,13) aufgefangen wurden, dann ein dritter sehr starker Gipfel des Biotins und ATPs. Es war sehr wichtig beim Auffangen den Monomergipfel nicht mit dem Biotin des dritten Gipfels zu kontaminieren.

9.1.1.10. Konzentrierung der biotinylierten Monomere

Für die darauffolgenden Tetramerherstellung mussten das Volumen der biotinylierten Monomere konzentriert werden.

Die kleinen und großen Konzentrations-Säulen wurden mit Wasser äquilibriert (die kleine Konzentrations-Säule wurde mit Alufolie verschlossen), bei 3844 g und 4° C 30 Min zentrifugiert und wie oben verfahren. Die zehn ml gereinigten, biotinylierten Monomere wurden auf die große Konzentrations-Säule aufgetragen und wie oben wiederholt 30 Min zentrifugiert bis das Volumen auf ca. 600 µl eingeeengt worden war. Aus Erfahrungswerten ergab sich folgende Daumenregel: lag das Absorptionsmaximum des Monomergipfels im Eluatiionsprofil bei 0,6, so wurde bis 600 µl eingeeengt, lag es bei 0,4, so wurde bis 300 µl und lag es bei 0,2, so wurde bis 150 µl eingeeengt. Das obere Röhrchen wurde mit einem Deckel und Klebeband verschlossen, umgedreht, gevortext und bei 3820 g drei Min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die konzentrierten, biotinylierten Monomere wurden in ein Schraubverschluss-Röhrchen überführt und auf Eis gestellt.

9.1.1.11. Bestimmung der Monomer-Konzentration und Titration für die optimale Tetramer-Formation

Um die Konzentration der Monomere abzuschätzen, musste zuvor für diese Säule eine BSA-Referenz gefahren werden (BSA hat ungefähr das gleiche Molekulargewicht wie Monomere). Hierbei ergab sich, dass

ein μg BSA in einer ‚Gipfel-Fläche‘ von ‚600.000‘ resultierte. Diese ‚Gipfel-Fläche‘ wurde dann später mit der Monomere verglichen und so deren Konzentration abgeschätzt.

Zwei μl der biotinylierten Monomere wurden in 100 μl HPLC-Lauf-Puffer auf die kleine Säule aufgetragen (Wasserdurchlauf, maximale Durchflussrate 0,75 ml/Min, Druck 300-400 PSI). Die Software-Einstellungen wurden gesetzt (maximale Durchflussrate 0,75 ml/Min, 100% Lauf-Puffer, Abs. 280 nm) und das Eluationsprofil wurde auf dem Monitor verfolgt. Durch den Vergleich der ‚Monomer-Gipfel-Fläche‘ (berechnet durch ‚Millenium-Software‘) und der ‚Gipfel-Fläche‘ der BSA-Referenz konnte nun die Konzentration der Monomere angeschätzt werden.

Je zwei μl der Monomere wurden zum einen zusammen mit zwei μl Streptavidin-PE und zum anderen mit fünf μl Streptavidin-PE in ein frisches Schraubverschluss-Röhrchen pipettiert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Morgen wurden zu den vier μl bzw. sieben μl Monomer-Streptavidin-Lösung 100 μl HPLC-Lauf-Puffer pipettiert. Zur Analyse wurden die beiden Monomer-Streptavidin-PE-Lösungen auf die HPLC-Säule geladen. Das Eluationsprofil zeigte zunächst einen Gipfel der Tetramere (nach ca. 7 Min) gefolgt von einem kleinen des Streptavidin-PEs und dann einen Gipfel der restlichen Monomere. War der Tetramer-Gipfel zu niedrig und waren gleichzeitig zu viele Monomere übrig, so konnte dies auf zwei Dinge zurückzuführen sein: entweder war zu wenig Streptavidin-PE verwendet worden oder die Biotinylierung war nicht effizient genug verlaufen. War ersteres der Fall, so konnte dies durch die Zugabe einer bestimmten Menge an Streptavidin-PE behoben werden. Dies wurde durch weitere Probeläufe ausgetestet bis durch eine bestimmte Menge an Streptavidin-PE die größtmögliche Menge an Tetramere gebildet worden waren (erkennbar durch das Eluationsprofil). Das optimale Monomer:Streptavidin-PE μl -Verhältnis betrug 1:2,5. Nach diesem analytischen HPLC-Lauf konnten die Tetramere auch präparativ hergestellt werden.

9.1.1.12. Präparative Tetramer-Formation

Da das Injektionslimit der kleinen HPLC-Säule 150 μl beträgt, wurden das Monomere und Streptavidin-PE im Verhältnis 1:2,5 bis zu diesem Volumen angesetzt. Wichtig war, dass Streptavidin-PE schrittweise zu den Monomeren hinzupipettiert wurde (in 6 Schritten, mit 10 Min Pause zwischen den einzelnen Pipettiergängen). Alle Schritte wurden bei 4° C durchgeführt. Eine Inkubation über Nacht bei 4° C resultierte in einer sehr guten Tetramer-Formation (M. Toebes, persönliche Mitteilung). Die kleine HPLC-Säule wurde vorbereitet (0,75 ml/Min, 230 nm). Anschließend wurde der Tetramer-Ansatz auf die HPLC-Säule geladen. Nach ca. sieben Min wurden ca. zwei ml der gereinigten Tetramere aufgefangen (Absorptionsmaximum 0,01). Die Tetramere wurden bei 4° C aufbewahrt und innerhalb von zwei Wochen aufgebraucht oder aliquotiert und in Glycerol (16%) bei -20° C aufbewahrt und höchstens ein Mal aufgetaut.

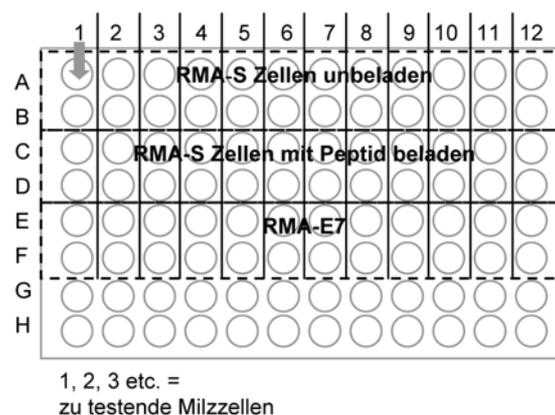
Die übrig gebliebenen Monomere, welche nicht in der präparativen Tetramer-Formation verwendet worden waren, wurden in Aliquots mit Glycerol (16 %) bei -20°C eingefroren.

Das Aliquot-Volumen wurde so gewählt, dass für eine präparative Tetramer-Formation ein Aliquot aufgetaut werden musste (in diesem Fall 40 μl Aliquots).

9.2 Intrazelluläre Interferon γ Färbung (IFN γ Färbung) zum Nachweis Antigen spezifischer T-Zellen

Die de novo IFN γ -Synthese einer T-Zelle, ausgelöst durch die Interaktion zwischen ihrem spezifischen T-Zellrezeptor und dem Antigen, welches im Kontext von MHC Klasse I Molekülen an der Oberfläche einer Antigen-präsentierenden Zelle präsentiert wird, kann nicht nur als indirekter Nachweis für die stattfindende Antigenpräsentation (C.0) herangezogen werden, sondern auch als Spezifitätsnachweis zytotoxischer T-Zellen, die aus der Milz einer immunisierten Maus gewonnen wurden. Zu diesem Zweck wurden die aufgearbeiteten Milzzellen von immunisierten Mäusen zusammen mit E7₄₉₋₅₇ Peptid bzw. L1₁₆₅₋₁₇₃ beladene RMA-S Zellen oder RMA-E7 (E7 Transfektanten) inkubiert. Waren durch die Immunisierung E7- bzw. L1-spezifische T-Zellen generiert (*Priming*) worden, wurden diese durch die Interaktion mit Peptid beladenen Zellen oder den Transfektanten zur IFN γ -Synthese aktiviert. Das intrazelluläre Zytokin wie auch die Korezeptoren CD4 und CD8 wurden durch fluoreszenzmarkierte Antikörper nachgewiesen. Für die Fixierung, Permeabilisierung und für die Waschvorgänge wurde ein Kit verwendet (*Cytofix/CytopermTM*). RMA-S Zellen, welche zuvor mind. zwei Stunden bei RT inkubiert worden waren, wurden einmal mit PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA aus Kulturflaschen geerntet und in 15 ml Röhrchen überführt. Dann wurden die Zellen in RPMI Medium auf eine Konzentration von 5×10^5 /ml eingestellt und der Hälfte der Zellen synthetisches 100 nM Antigenpeptid (E7₄₉₋₅₇ oder L1₁₆₅₋₁₇₃) zugegeben (pro getestete Milzzellsuspension wurden 5×10^3 Zellen ohne Antigenpeptid und 5×10^3 Zellen mit Antigenpeptid benötigt). $2,5 \times 10^3$ Zellen in 50 μ l mit und ohne Antigenpeptid wurden pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte als Duplikate ausgesät (pro zu testende Milzzellsuspension wurden zwei Löcher mit und zwei Löcher ohne Antigenpeptid benötigt). Sollte die Generierung von E7-spezifische zytotoxische T-Zellen überprüft werden, so wurden zusätzlich zu den Peptid-beladenen RMA-S auch RMA-E7 Zellen ausplattiert (siehe Abbildung 10). Waren die Milzen gerade erst den Mäusen entnommen worden und sollten sie sofort und nicht restimuliert getestet werden, so wurde eine sogenannte ‚ex vivo‘ intrazelluläre IFN γ -Färbung durchgeführt. Hierfür wurden etwa ein Viertel der aufgearbeiteten Milzzellen einer immunisierten Maus (C.2.1) weiterkultiviert und dreiviertel für die intrazelluläre IFN γ Färbung verwendet: nach der Erythrozytenlyse und anschließender Zentrifugation wurden die Milzzellen mit einer Pipette resuspendiert, dreiviertel der Zellen in 15 ml Röhrchen überführt und mit 250 g für fünf Min sedimentiert.

Abbildung 10: Beispiel eines Pipettierschemas für eine intrazelluläre IFN γ Färbung zum Nachweis Antigen-spezifischer TZellen



Sollten unter Milzzellen, welche in Kultur genommen und somit restimuliert worden waren (C.2), zytotoxische T-Zellen nachgewiesen werden, so wurden die Milzzellen in den Löcher der 24-Loch Platte, in denen die T-Zellen kultiviert worden und nun unter dem Lichtmikroskop gut erkennbar waren, vereint und sedimentiert.

Das Zellsediment wurde in 450 μ l T-Zell-Medium resuspendiert. 50 μ l der Milzzellsuspension wurde pro Loch der vorbereiteten 96-Loch Platte ausgesät, mit 250 g für zwei Min (1200 UpM, Heraeus Kühlzentrifuge Megafuge 1,0R) sedimentiert und dann für insgesamt sechs h bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach einer h wurden pro Loch 25 μ l einer verdünnten Monensin-Lösung (12 μ M Monensin/EtOH in RPMI) dazupipettiert. Die Platte wurde dann zwei Min mit 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte kopfüber abgetupft und kurz vorsichtig gevortext. Die Sedimente wurden jeweils in 100 μ l *Cytofix/Cytoperm* resuspendiert und 20 Minuten bei 4° C inkubiert. Danach wurde die Platte zwei Min mit 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte kopfüber abgetupft und kurz vorsichtig gevortext. Die Zellen wurden gewaschen: es wurden 100 μ l *Perm/Wash* Puffer pro Loch pipettiert, die Platte wurde zwei Min mit 250 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Platte kopfüber abgetupft und kurz vorsichtig gevortext. Der Waschvorgang wurde wiederholt. Pro Loch wurden 25 μ l eines Antikörpermix (PE anti-Maus CD8a 1:100, Cy-Chrome™ anti-Maus CD4 1:100 in PBS, anti-Maus IFN γ FITC 1:50 in PBS) pipettiert, die Platte wurde vorsichtig gevortext und 30 Min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach zwei Mal gewaschen und danach in jeweils 130 μ l PBS/0,5% BSA resuspendiert. Die Durchflusszytometrie-Messung wurde am gleichen Tag oder aber ein bis zwei Tage später durchgeführt, sofern die Zellen lichtgeschützt bei 4° C aufbewahrt wurden. Bei der Auswertung mit dem Softwareprogramm *Cellquest™* wurden in einem Diagramm die CD8 positiven Zellen gegen CD4 positive Zellen aufgetragen (tote Zellen erschienen als eine Art Diagonale). Ein Gatter (*gate*) wurde um die CD8⁺ Zellen gesetzt, welche dann in einer zweiten graphischen Darstellung gegen IFN γ ⁺ Zellen aufgetragen wurden. Diese Primärdaten wurden dann mittels *Microsoft Excel* in einem Säulendiagramm dargestellt, welches den Prozentsatz der CD8 und IFN γ doppelt positive T-Zellen von CD8 einfach positiven T-Zellen darstellt.

9.3 IFN γ EliSpot zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen

Wie die intrazellulären IFN γ Färbung (s.o.) so kann auch der IFN γ -EliSpot zum Nachweis Antigen-spezifischer Zellen herangezogen werden. Auch hier wird wie schon auf Seite 55 beschrieben (C.7.3) die *de novo* Synthese und die Ausschüttung des Zytokins IFN γ auf Einzelzellniveau detektiert und somit die Frequenz der zytokinproduzierenden Zellen bestimmt. Hierbei wurde die Anzahl der spezifischen T-Zellen (ermittelt durch die Zugabe des Antigen-Peptids) als Prozentsatz aller unspezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen verglichen (ermittelt durch die Zugabe eines Mitogens, das eine unspezifische Zytokin-Synthese auslöst). Das ausgeschüttete IFN γ wurde von spezifischen Antikörpern abgefangen und durch einen zweiten IFN γ spezifischen Antikörper, an den Biotin gekoppelt ist, detektiert. Streptavidin-Alkaline Phosphatase konnte nun an das gekoppelte Biotin binden und ein Substrat umsetzen, welches nach der Phosphatabspaltung ausfällt und daher als kleiner schwarz/violetter Punkt auf der Membran sichtbar wurde. Somit symbolisierte jeder kleine Punkt (*Spot*) eine T-Zelle, die durch eine Antigen-präsentierende BMDC spezifisch aktiviert worden war. Das Zählen und die Auswertung der einzelnen Punkte erfolgte durch einen *EliSpot-Reader*.

Eine membranbeschichtete 96-Loch Platte (MultiScreen-HA Sterile Plates) wurde mit 200 μ l PBS/Loch fünf Min bei RT äquilibriert. Das PBS wurde verworfen, 150-200 ng anti-Maus IFN γ (R4-6A2) in 100 μ l PBS pro Loch pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Antikörper verworfen und es wurde einmal mit 200 μ l PBS/Loch gewaschen. Mit 200 μ l RPMI-Medium (10 % FCS)/Loch wurde bei 37° C ein bis zwei Stunden geblockt und danach das Medium verworfen.

Sollte ein ‚*ex vivo*‘ untersucht werden, ob sich unter den Milzzellen Antigen-spezifische T-Zellen befinden, so wurden Zellen 600 μ l von gerade aufgearbeiteten Milzen immunisierter Mäuse (C.2.1) für die folgende Prozedur verwendet. Die Zellen wurden als Triplikate in einer seriellen Verdünnung (von ca. 1×10^5 - $1,25 \times 10^4$ Zellen pro Loch) ausgesät, eine serielle Verdünnung als Triplikat pro Testreihe. Pro Triplikat blieb eine serielle Verdünnungsreihe unbehandelt, in eine zweite wurde pro Loch 10 μ l einer Lektin-Verdünnung (200 ng/Loch Pokeweed Mitogen) und in eine dritte wurde pro Loch 10 μ l einer Antigenpeptid-Verdünnung

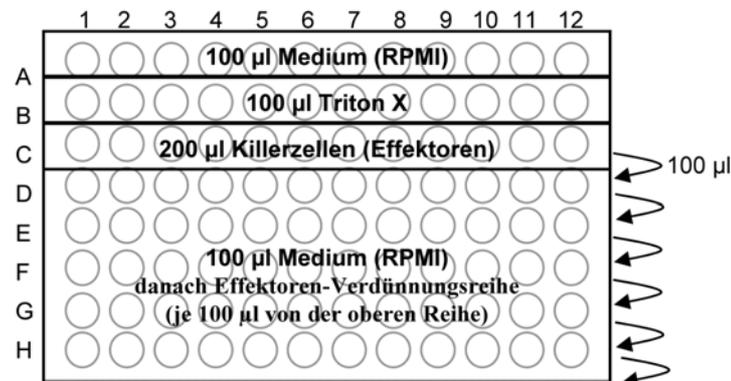
(L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid Stammlösung (100 µM) 1:5 verdünnt; E7₄₉₋₅₇ Peptid Stammlösung (100 µM) 1:50 verdünnt) pipettiert. Sollte das *in vitro Priming* von den Milzzellen, welche 14 Tage zuvor mit Antigen-beladenen BMDCs inkubiert worden waren (C.8.1), untersucht werden, so wurden diese als Triplikate, aber unverdünnt nach dem Blocken ausplattiert und wie oben mit Pokeweed Mitogen und Antigenpeptid behandelt. Die Platte wurde dann über Nacht bei 37° C im Zellinkubator inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Milzzellen verworfen und die Löcher wurden fünf Mal mit 200 µl PBS/0,5% Tween 20 und danach einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Es wurden 200 ng anti-Maus IFN γ -Biotin (XMG1.2) in 100 µl PBS pro Loch pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Antikörperverdünnung verworfen und die Löcher fünf Mal mit jeweils 200 µl PBS/0,5 % Tween 20, danach einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Pro Loch wurden 100 µl 1:1000 Streptavidin-alkaline Phosphatase in PBS pipettiert und die Platte ohne Deckel ein bis zwei h bei RT inkubiert. Die Streptavidin-alkaline Phosphatase wurde verworfen und die Löcher vier Mal mit 200 µl PBS gewaschen. Pro Loch wurden 100 µl EliSpot Substrat-Lösung (BCIP/NBT) pipettiert und abgedunkelt zwei bis 20 Min inkubiert. Sobald Punkte gut sichtbar waren, wurde die Reaktion abgestoppt: die gesamte Platte wurde unter fließendem Leitungswasser abgespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurden die Punkte mittels *EliSpot-Reader* quantifiziert.

9.4 Zytotoxizitätstest zum Nachweis Antigen-spezifischer T-Zellen

Der Zytotoxizitätstest ist unter den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Nachweisen für Antigen-spezifische T-Zellen die einzige Methode, welche eine tatsächliche zytotoxische Funktionalität der T-Zellen aufdecken kann. Hierfür wurden Antigen-präsentierende Zielzellen (RMA-E7, RMA-S mit E7 Peptid oder L1 Peptid beladen) mit ⁵¹Cr radioaktiv markiert und mit Milzzellen, die von immunisierten Mäusen stammten, kokultiviert. Befanden sich unter den Milzzellen Antigen-spezifische zytotoxische T-Zellen, so töteten diese die Antigen-präsentierenden Zellen, wodurch die Radioaktivität freigesetzt wurde, welche dann gemessen werden konnte. Die einzelnen Arbeitsschritte mussten unter Berücksichtigung der Strahlenschutzvorschriften durchgeführt werden.

2×10^6 Zielzellen wurden in zwölf bis 15 ml Rundbodenröhrchen überführt und wurden mit 250 g für zwei Min sedimentiert und in ca. 150 µl serumfreiem RPMI-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 100 µCi Na₂⁵¹CrO₄ wurden die Zellen eine h bei 37° C im Wasserbad inkubiert und gelegentlich geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen mit zehn ml RPMI-Medium gewaschen und mit 250 g für zwei Min sedimentiert. Der radioaktive Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden erneut mindestens zwei Mal wie zuvor gewaschen. Dann wurden die Zielzellen in RPMI-Medium so aufgenommen, dass die Zelldichte zwischen 5×10^4 /ml bis 1×10^5 /ml betrug. Die RMA-S Zellsuspension wurde auf zwei 50 ml Röhrchen aufgeteilt und zu den Zellen der einen Suspension wurde E7₄₉₋₅₇ Peptid oder L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid (100 nM) gegeben. Die in den 24-Loch Platten kultivierten Milzzellen der immunisierten Mäuse (C.2.1) wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert (ca. 7 ml), in 15 ml Röhrchen überführt und mit 250 g sedimentiert. Das Sediment wurde in 800 µl T-Zell-Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Milzzellen in den Reihen C-H in einer seriellen 1:2 Verdünnung mit 100 µl pro Loch auf einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert (eine Spalte pro Ansatz markierter Zielzellen). Die verbleibende Milzzellsuspension wurde zur Bestimmung der Zelldichte eingesetzt (wichtig für die Angabe des Verhältnisses von Effektorzellen (zytotoxische T-Zellen) zu markierten Zielzellen). In jedes Loch mit den vorgelegten Milzzellen wurden nun 100 µl der radioaktiv markierten Zielzellen pipettiert. Zudem wurden zu den Zielzellen in der Reihe A nur 100 µl T-Zell-Medium (Spontanlyse) und zu den Zielzellen der Reihe B 0,1 % Triton X-100 (Maximallyse) pipettiert (siehe Abbildung 11).

Abbildung 11: Beispiel eines Pipettierschemas für den Zytotoxizitätstest



Es folgte eine Inkubation von vier bis 4,5 h bei 37° C im Zellinkubator. Danach wurden pro Loch 50 µl Überstand der 96-Loch Rundbodenplatte mit einer Multikanalpipette auf eine Festphasen-Szintillationsplatte (Luma-plate) überführt. Nachdem diese Platte getrocknet war, konnte die durch die Lyse freigesetzte Radioaktivität mittels Microbeta-Zähler gemessen werden.

Die Spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$$\frac{[CPM (Probe) - CPM (Spontanlyse)]}{[CPM (Maximallyse) - CPM (Spontanlyse)]} \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$$

D. Ergebnisse

1. Herstellung von Chimären Virus-ähnlichen Partikeln (CVLPs)

Die CVLPs des Humanen Papillomvirus Typ 16 wurden mittels Bakulovirus-Expressionssystem produziert (C.4). Sie bestehen aus Fusionsproteinen des Hauptstrukturproteins HPV16 L1, dessen C-Terminus deletiert wurde (34 AS) und den ersten 60 AS von HPV16E7 (L1 Δ CE7₁₋₆₀) bzw. den ersten 55 AS von HPV16 E7 (L1 Δ CE7₁₋₅₅) (siehe Abbildung 12 (A)). Diese Monomere wurden mittels des Bakulovirus-Expressionssystem hergestellt und lagern sich zu Pentameren, den Kapsomeren, zusammen, die dann schließlich zu HPV16 Chimären Virus-ähnlichen Partikeln (CVLPs) assemblieren (siehe Abbildung 12 (B)).



Abbildung 12: Aufbau der Chimären Virus-ähnlichen Partikel:

A). Monomere der HPV16L1 Δ CE71-60 und HPV16L1 Δ CE71-55 CVLPs. Die Fusionsproteine des Hauptstrukturproteins HPV16L1 Δ C (Δ = 34 AS) und den ersten 60 AS bzw. 55 AS von HPV16 E7 (L1 Δ CE71-60 bzw. L1 Δ CE71-55) und ihre H-2Db-restringente Epitope L1165-173 und E749-57. (B). HPV16L1 Δ CE71-60 bzw. HPV16L1 Δ CE71-55 CVLPs: Je fünf Kopien eines Monomers (s. A.) lagern sich zu einem Kapsomer zusammen. 72 Kapsomere bilden eine HPV16 ähnliche Kapsidstruktur, den Chimären Virus-ähnlichen Partikel (CVLP). Kapsid Quelle: www.uct.ac.za/depts/mmi/stannard/papillo.html

CVLPs wurden durch zwei Gradienten-Zentrifugationsschritte aufgereinigt (C.4.4), fraktioniert und anschließend mittels Antigen-Capture-ELISA (C.5.2.1), Western Blot (C.5.1.1) und Elektronenmikroskopie (C.5.3) analysiert (siehe Abbildung 13-5 als Beispiele). Dabei befand sich ein Großteil der CVLPs in Fraktionen mit einer CsCl-Dichte von 1,28-1,32 g/ml (siehe Abbildung 13). Der im Antigen-Capture-ELISA verwendete Antikörper 25/C erkennt ein konformationsspezifisches Epitop und detektiert somit nur Kapsomere bzw. Kapside, nicht aber inkorrekt gefaltete L1/E7 Monomere oder Aggregate. In der Western Blot Analyse konnten die L1 Δ CE7₁₋₅₅ und L1 Δ CE7₁₋₆₀ Monomere in den korrespondierenden Fraktionen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 14). Hierbei waren die Banden der chimären Proteine bei ca. 55 kDa zu finden. Eine Abschätzung der Ausbeute an CVLPs pro Aufreinigung erfolgte durch einen Vergleich mit BSA-Proteinstandards im gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (siehe Abbildung 15). Neben der prominenten 55 kDa-Bande (A) traten bei manchen Aufreinigungen auch weitere, schwächere Banden von Degradationsprodukten der L1 Δ CE7₁₋₅₅ Monomere auf. Bei der Analyse der L1 Δ CE7₁₋₆₀ Monomere waren Banden von Degradationsprodukten, welche ähnlich intensiv oder intensiver waren als die 55 kDa-Bande,

viel häufiger zu sehen (B).

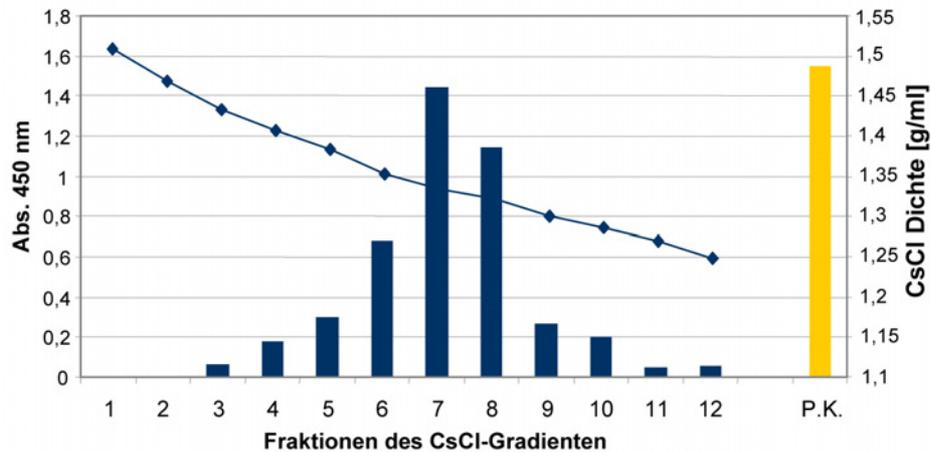


Abbildung 13: Antigen-Capture ELISA zur Analyse der CsCl-Fractionen

Eine Hälfte der 96-Loch ELISA Platte wurde mit dem L1-spezifischen Antikörper 25/C (1:300 in PBS) beschichtet. 50 μ l der einzelnen CsCl-Fractionen (1:300) wurden pro Loch in Duplikaten ausplattiert (Positivkontrolle: CsCl-Fraktion mit bekanntem Kapsidgehalt). Gebundene Kapside wurden durch das CVLP-spezifische polyklonale Kaninchen Antiserum (4543; 1:3000) detektiert. Als Sekundärantikörper fungierte Ziege-anti-Kaninchen-HRP (1:5000). Absorptionsmessung bei 450 nm. Von den dargestellten Werten wurden die der Negativkontrolle jeweils abgezogen. Die CsCl-Dichte (ρ) wurde mittels Refraktometer über den Brechungsindex (n) der CsCl-Fractionen bestimmt. Koeffizienten (a und b) von CsCl: $a = 10,8601$ und $b = 13,4974$. CsCl-Dichte (ρ) = $a^n - b$.

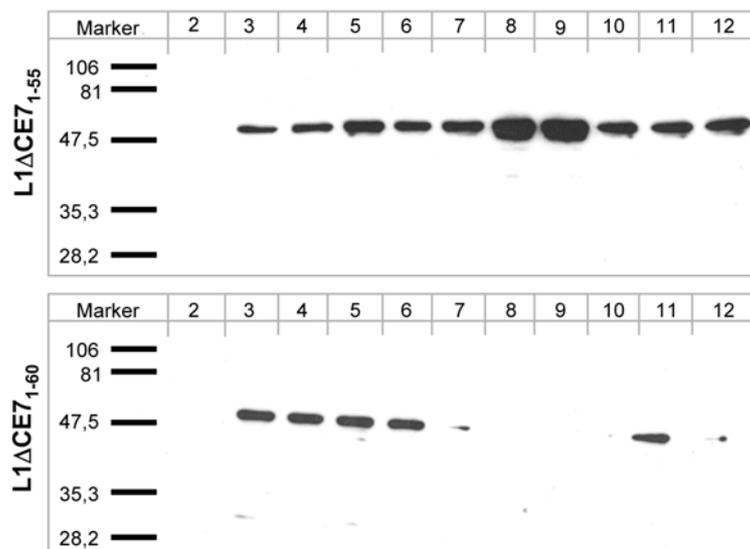


Abbildung 14: Analyse der CsCl-Fractionen durch Western Blot

Für den Nachweis der L1 Δ CE7₁₋₆₀ bzw. L1 Δ CE7₁₋₅₅ Monomere wurden 10 μ l pro CsCl-Fraktion durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Mittels Semidry-Elektrotransfer wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose Transfermembran übertragen. Die Nitrozellulose wurde anschließend geblockt und bei 4° C ü. N. mit L1/E7-spezifischen Erst-Antikörper (Cam Vir-1 1:2000 oder anti HPV16 E7 1:2000) inkubiert. Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers (Ziege anti Maus-HRP, 1:5000) wurde die Nitrozellulose in ECL-Lösung geschwenkt und die Chemilumineszenz auf einem Röntgenfilm (Exp. 30 Sek.-20 Min.) festgehalten.

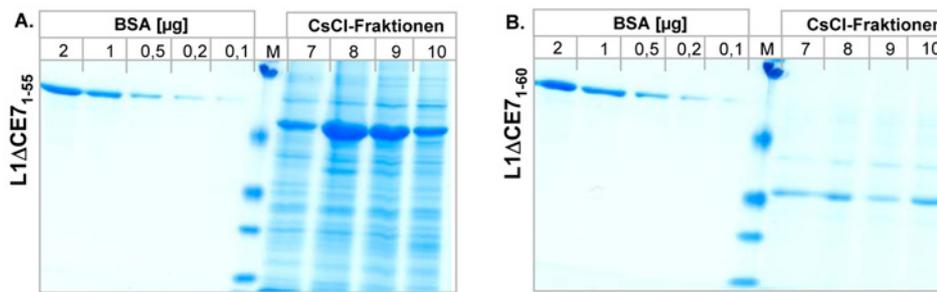


Abbildung 15: Konzentrationsbestimmung der CsCl-Fractionen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurden 10 μl pro CsCl-Fraktion auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Als Proteinmengenstandard dienten 2 μg , 1 μg , 0,5 μg , 0,2 μg und 0,1 μg BSA. Anschließend wurde das SDS-Gel \ddot{u} .N. entsalzt (in VE-Wasser). Es folgte eine 20 minütige Inkubation mit 20 ml Gel Code Blue Reagenz und eine erneute Inkubation in VE-Wasser. Das Polyacrylamidgel wurde danach zwischen Folie gespannt getrocknet. Die Proteinmengen der CsCl-Fractionen wurden anhand des BSA-Standards abgeschätzt.

Hier wie auch in der Analyse mittels Antigen-Capture-ELISA, Western Blot und folgender Elektronenmikroskopie (siehe Abbildung 15.B, Abbildung 14.B, Abbildung 16.C+D) zeigte sich, dass sich die Herstellung von HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ Partikeln als schwieriger erwies als die Produktion von CVLPs mit fusioniertem E7₁₋₅₅, daher wurde der Großteil der Experimente mit HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ Partikeln durchgeführt. Während in den CsCl-Fractionen (Dichte = 1,28-1,32 g/ml) der Aufreinigung von HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ Partikeln Konzentrationen zwischen 80-350 ng/ μl und somit eine Gesamtausbeute zwischen 210 μg -750 μg erzielt wurden, so ergaben sich für HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ Partikel nur eine Konzentration von 0-50 ng/ μl und somit eine Gesamtausbeute von 10-80 μg .

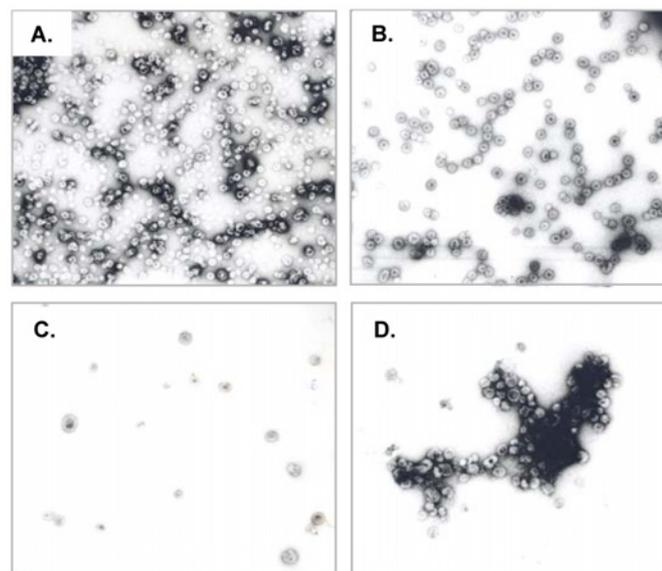


Abbildung 16: Analyse der CsCl-Fractionen durch Elektronenmikroskopie

30 μl der CsCl-Fraktion wurde 30 Min gegen H_2O dialysiert und danach für 2 Min auf ein Kohlebeschichtetes Kupfernetzchen (Maschengröße 300) pipettiert. Nach vorsichtigem Waschen mit H_2O wurde das Kupfernetzchen ca. 30-60 Sek. mit 2 %iger Uranylacetat-Lösung gefärbt und dann getrocknet. Die Proben wurden unter dem Elektronenmikroskop analysiert. Die CVLPs besitzen einen Durchmesser von ca. 50 nm (Vergrößerung im Originalbild 44.000-fach)

Deutlich wurde dieses Ergebnis auch in der Analyse mittels Elektronenmikroskopie. Während sich L1ΔCE7₁₋₅₅ Monomere zu Kapsiden zusammen gelagert hatten, die sich dicht aneinander reihten (siehe Abbildung 16 (A) und (B)), so konnten entweder keine oder nur vereinzelt HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ Partikel unter dem Mikroskop gesichtet werden (siehe Abbildung 16 (C)). Waren einige HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ Partikel vorhanden, bildeten diese keine einheitliche Struktur und sie schienen in einer unlöslichen Form vorzuliegen (siehe Abbildung 16 (D)). Die ‚leeren‘ HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ Partikel (erkennbar an der dunklen Kapsidmitte) besitzen einem Durchmesser von ca. 45-60 nm.

Durch das Bakulovirus-Expressionssystem konnten erfolgreich HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ und HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs hergestellt werden. Die Ausbeute von HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs, welche das E7 Epitop E7₄₉₋₅₇ tragen, war allerdings mit 10-80 µg pro Aufreinigung sehr viel geringer als die der HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs (210 µg-750 µg pro Aufreinigung). Die meisten Experimente wurden daher mit HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs durchgeführt.

2. Herstellung von CVLP-Immunkomplexen (CVLP-ICs)

CVLPs sollten mit L1 bzw. L1/E7 spezifischen Antikörpern komplexiert werden, um als Immunkomplexe (CVLP-ICs) mit den Fc-Teilen der Antikörper an die FcγRs Dendritischer Zellen zu binden. Die Komplexierung erfolgte zum einen mit einem polyklonalen Mausserum, dessen unterschiedlichen Immunglobulin-Typen an verschiedene FcRs binden können. Diese Bindung ist abhängig vom Vorhandensein der einzelnen Subtypen im Serum und kann deshalb stark variieren (Ravetch, 1994). Daher wurden außerdem monoklonale Antikörper mit bestimmten Subtypen verwendet, um die Bindung an spezielle Fcγ-Rezeptor Typen zu erzielen und um eine einheitliche Immunkomplex-Bindung an DCs in unterschiedlichen Versuchen zu garantieren.

2.1 Herstellung eines CVLP-spezifischen Mausserums

CVLPs wurden an zwei C57BL/6 Mäuse verimpft, um L1/E7 polyklonale Mausseren (MS A und MS B) zu gewinnen. Die Seren der Mäuse wurden vor der Immunisierung und 14 bzw. 24 Tage nach der Immunisierung auf deren Spezifität überprüft. Hierzu wurden die Löcher einer 96-Loch Rundbodenplatte mit CVLPs beschichtet, welche die spezifischen Mausseren binden konnten (C.4.7.1). Vor der Immunisierung existierten keine Antikörper, die CVLPs detektieren konnten, es war also keine Kreuzaktivität im Serum vorhanden (siehe Abbildung 17).

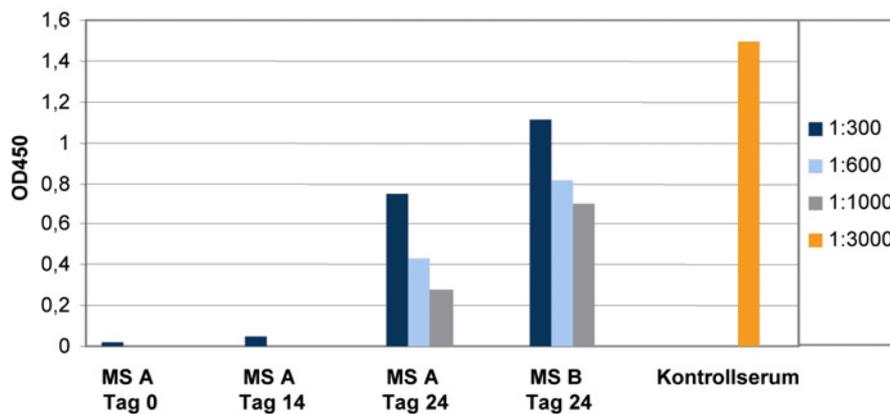


Abbildung 17: Analyse der polyklonalen CVLP-spezifischen Mausseren mittels ELISA

Die Hälfte einer 96-Loch ELISA Platte wurde mit je 30 ng CVLPs (nicht dialysiert, ad 50 µl PBS verdünnt) pro Loch beschichtet (ü.N. bei 4° C). Die CVLP-spezifischen polyklonalen Mausseren (MS A und MS B, entnommen an Tag 0, 14 und 24 nach der CVLP-Injektion) wurden als Duplikate (1:300, 1:600, 1:1000) auf beide Hälften der Platte pipettiert (unbeschichtete Plattenhälfte diente als Negativkontrolle). Als Positivkontrolle wurde das CVLP-spezifische polyklonale Kaninchenserum 4543 (1:3000) verwendet. Als Sekundär-Antikörper fungierten Ziege-anti-Maus-HRP (1:5000) und Ziege-anti-Kaninchen-HRP (1:5000). Absorption bei 450 nm. Die Werte der Negativkontrolle wurden jeweils von den dargestellten Absorptionswerten subtrahiert.

Auch nach 14 Tagen konnte noch keine Bindung nachgewiesen werden. Erst nach weiteren zehn Tagen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Spezifität der Mausseren. Auch in der Western Blot Analyse konnte die Bindung der Mausseren an die chimären Monomere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 18). Allerdings war hier zu sehen, dass ein Großteil des Serums Abbauprodukte und nicht das Volllänge Monomer detektiert, was womöglich die Folge von einer Immunisierung mit teilweise degradierten CVLPs war. Ein ähnliches Bandenmuster konnte man - wie schon erwähnt - bei einigen Konzentrationsabschätzungen im gefärbten SDS-Polyacrylamidgel. Bei der späteren Subklassen-Typisierung des polyklonalen Serums MS B (C.5.2.3) zeigte sich, dass die Signale für IgG und IgM etwa gleich hoch waren und dass sich ein großer Anteil an IgG2b im Serum befand siehe Abbildung 19).

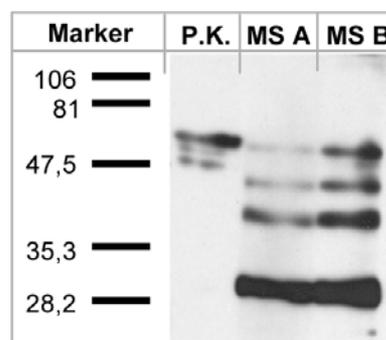


Abbildung 18: Analyse der polyklonalen CVLP-spezifischen Mausseren mittels Western Blot

Ca. 1 µg CVLPs wurde pro Geltasche aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die wurden auf eine Nitrozellulose Transfermembran übertragen. Die Nitrozellulose wurde geblockt und bei 4° C ü. N. mit den Mausseren (1:100) inkubiert. Als Positivkontrolle diente der L1-spezifische Antikörper Cam Vir-1 (1:2000). Die Primärantikörper wurden mit dem Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Maus-HRP (1:5000) detektiert. Nach der Inkubation der Nitrozellulose in ECL-Lösung wurde die Chemilumineszenz mit einem Röntgenfilm (Exp. 30 Sek.-20 Min.) erfasst.

2.2 Typisierung monoklonaler L1-spezifischer Antikörper

Bevor die monoklonalen L1-spezifischen Antikörper zur Komplexierung mit den CVLPs verwendet wurden, wurden ihre Subklassen typisiert, da die Fc-Teile der IgG Subtypen eine unterschiedliche Affinität zu den diversen Fc γ Rs besitzen (Ravetch, 1994) (siehe auch Tabelle 13). Die Typisierung erfolgte im ELISA (C:5.2.3). Hierzu wurden CVLPs von den monoklonalen Antikörpern detektiert, welche anschließend mittels eines Kits (SBA Clonotyping System III, B.4) typisiert wurden. Die Ergebnisse der Typisierung (siehe Abbildung 19) sind in Tabelle 7 zusammengefasst. In den folgenden Versuchen wurde das polyklonale Mausserum und die monoklonalen Antikörper MM4 (16L1 VIII 1.3.5.15; IgG2a) und MM7 (16L1 1.4.7.22; IgG1) zur Komplexierung der Chimären Virus-ähnlichen Partikeln verwendet.

Tabelle 7: Typisierung monoklonaler L1-spezifischer Antikörper

Antikörper	Subklassen
polyklonales Mausserum MS B	IgG2b, IgM
16L1 VII 24.49.10.17.7 (MM3)	IgM
16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4)	IgG2a kappa
16L1 25/B subcl. B2 (MM5)	IgG1 kappa
16L1 1.4.7.22 (MM7)	IgG 1 kappa
MM12	IgG 1 kappa

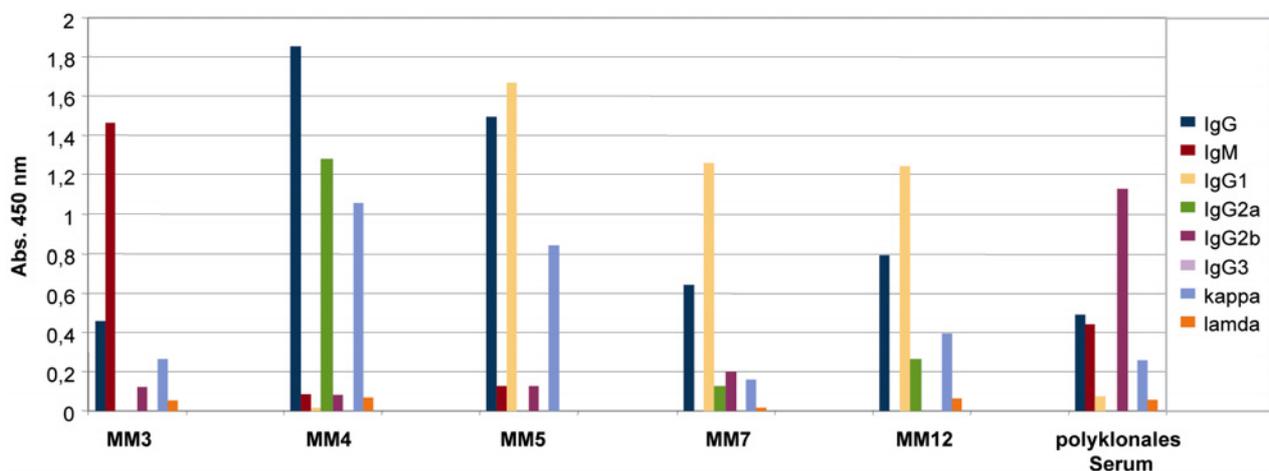


Abbildung 19: Typisierung monoklonaler L1-spezifischer Antikörper und des polyklonalen Mausserums B

Eine 96-Loch ELISA Platte wurde mit je 30 ng CVLPs pro Loch beschichtet. Nach dem Blocken wurden die 1:10 verdünnten Hybridom-Überstände der monoklonalen L1-spezifischen Antikörper (16L1 VII 24.49.10.17.7 (MM3); 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4); 16L1 25/B subcl. B2 (MM5); 16L1 1.4.7.22 (MM7); MM12) und das polyklonale Mausserum B (MS B) (1:300) auf eine Hälfte der Platte pipettiert (die andere Hälfte diente als Negativkontrolle). Anschließend wurden die zu typisierenden Antikörper mit den Antikörpern des SBA Clonotyping System III Kits nach Protokoll detektiert. Absorptionsmessung bei 450 nm. Die Werte der Negativkontrolle wurden subtrahiert.

2.3 Standardisierung der CVLP-Immunkomplexe Herstellung

Um die Herstellung der CVLP-Immunkomplexe zu standardisieren, mussten die molaren Verhältnisse von CVLP- zu Antikörper-Molekülen bestimmt werden. Dies bedurfte zunächst einer Konzentrationsbestimmung der monoklonalen IgG Antikörper mittels SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Färbung (C.5.1.2) (siehe Abbildung 12). Zusätzlich wurde auch die Konzentration an Antikörpern im polyklonalen Mausserum MS B abgeschätzt. Die Ergebnisse dieser Konzentrationsbestimmung sind in Tabelle 8 zusammengefasst. Für die folgenden Versuche wurde das Verhältnis von CVLP zu monoklonalen Antikörper wie folgt berechnet:

$$2,83 \times 10^{10} \text{ Moleküle CVLP}/\mu\text{g} : 3,8 \times 10^{12} \text{ Moleküle IgG}/\mu\text{g}$$

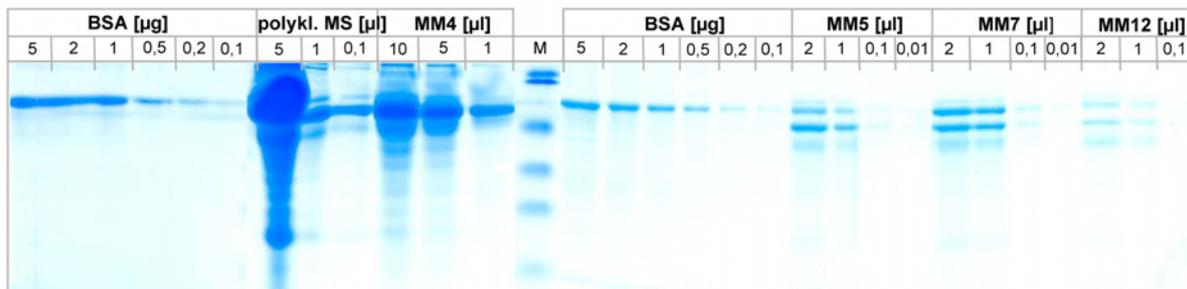


Abbildung 20: Konzentrationsabschätzung der L1-spezifischen monoklonalen Antikörper und des polyklonalen Mausserums MS B

Die Abbildung zeigt zwei SDS-Polyacrylamidgele, auf die jeweils ein BSA-Standard aufgetragen wurde (2 µg, 1 µg, 0,5 µg, 0,2 µg und 0,1 µg). Pro Tasche des Gels wurden unterschiedliche Mengen des polyklonalen Serums MS B und der monoklonalen Antikörper (16L1 VII 24.49.10.17.7 (MM3); 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4); 16L1 25/B subcl. B2 (MM5); 16L1 1.4.7.22 (MM7); MM12) aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die SDS-Gele ü.N. entsalzt (in VE-Wasser). Es folgte eine 20 minütige Inkubation mit 20 ml Gel Code Blue Reagenz und eine erneute Inkubation in VE-Wasser. Die Proteinmengen der CsCl-Fractionen wurden anhand des BSA-Standards abgeschätzt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Geschätzte Konzentrationen der Antikörper des polyklonalen Mausserums und der L1-spezifischen monoklonalen Antikörper

Antikörper	geschätzte Konzentration
polyklonales Mausserum B (MS B)	5 µg/µl
16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4)	2 µg/µl
16L1 25/B subcl. B2 (MM5)	0,5 µg/µl
16L1 1.4.7.22 (MM7)	2 µg/µl
MM12	0,1 µg/µl

Drei von fünf monoklonalen Antikörpern wurden als Subtyp IgG1 identifiziert. Jeweils einer der beiden anderen monoklonalen Antikörper war Subtyp IgM bzw. IgG2a. Das polyklonale Mausserum MS B, welches erfolgreich durch die Immunisierung von HPV16L1ΔCE71-60 CVLPs hergestellt werden konnte, enthielt hauptsächlich die Subtypen IgG2b und IgM. Um in den weiteren Experimenten die Herstellung von Immunkomplexen zu standardisieren, wurden die Konzentrationen der Antikörper bestimmt, um jeweils die molaren Verhältnisse von CVLPs:IgGs zu berechnen.

3. Generierung von primären Dendritischen Zellen (BMDCs) aus dem Knochenmark

DCs sind professionell Antigen-präsentierende Zellen (APCs), die sehr effizient in der Antigenaufnahme und -präsentation sind. Sie zeichnen sich besonders durch die Fähigkeit der *cross* Präsentation und des *cross Priming* (A.3.1) aus, weshalb sie bei Untersuchungen zur Immunogenität und deren Modulation von besonderem Interesse sind. In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst mit einer murinen, immortalisierten Dendritischen Zelllinie (JAWS II) gearbeitet, welche die Charakteristika von unreifen Dendritischen Zellen aufweist. Anfängliche Versuche wurden mit JAWS II Zellen durchgeführt, während in späteren Experimenten nur noch primäre DCs verwendet wurden. Die primären Dendritischen Zellen wurden aus pluripotenten Knochenmarkszellen der Maus generiert (BMDCs). Hierzu wurden Knochenmarkszellen aus C57/BL6 Mäusen entnommen und GM-CSF kultiviert. Dabei entwickelten sich die pluripotenten Stammzellen über Granulozyten/Makrophagen Vorläuferzellen zunächst zu unreifen BMDCs. Unreife BMDCs zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, aufgrund ihrer hohen Expression von FcγRs besonders effizient Immunkomplexe aufzunehmen und diese zu präsentieren. Durch diese Antigenaufnahme werden die BMDCs aktiviert und verändern dadurch sowohl das Expressionsmuster einiger Oberflächenmoleküle (siehe Abbildung 5) wie auch ihre Morphologie. So kann man sogar unter dem Lichtmikroskop zwischen unreifen BMDCs und Zellen, die *in vitro* mit einem Antigen, LPS, CpG ODN oder anderen stimulierenden Reagenzien behandelt wurden, unterscheiden. Während unreife BMDCs *in vitro* eine runde Morphologie aufweisen, so bilden reife BMDCs sternartige ‚Füßchen‘ aus, die unter dem Lichtmikroskop deutlich sichtbar sind (siehe Abbildung 21) den BMDCs mehr als sieben Tage ohne stimulierende Reagenzien kultiviert, so waren dort auch leichte morphologische Veränderungen sichtbar. Allerdings war die Anzahl gereifter BMDCs viel geringer als die in stimulierten Kulturen.

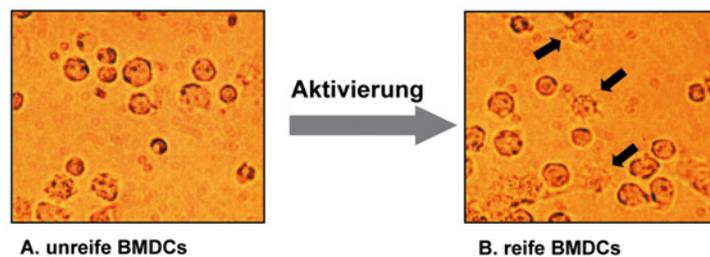


Abbildung 21: Morphologischer Vergleich von unreifen und reifen Dendritischen Zellen

Aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen wurden primäre Dendritische Zellen durch die Kultivierung mit GM-CSF generiert. Dabei waren unter dem Lichtmikroskop unreife BMDCs von anderen Zellen dadurch zu unterscheiden, dass sie rund und etwas größer waren und ihre Zellmembran weniger dick erschien (a). Waren die BMDCs am Tag fünf, sechs oder sieben der Kultivierung aktiviert worden, waren sie als sternartige Zellen zu erkennen, die kleine ‚Füßchen‘ ausgebildet hatten (b).

Aktiviert bzw. reife BMDCs sind morphologisch von unreifen BMDCs zu unterscheiden. Murine BMDCs reifen nach einiger Zeit in Zellkultur alleine, ohne stimulierende Reagenzien heran.

4. Bindung von Chimären Virus-ähnlichen Partikeln und CVLP-Immunkomplexen an BMDCs

In den folgenden Experimenten sollte zunächst gezeigt werden, dass die Fc γ Rs III/II (CD16/CD32) stark auf den generierten unreifen BMDCs sowie auf der immortalisierten Dendritischen Zelllinie JAWS II exprimiert sind. Des weiteren sollte untersucht werden, ob CVLPs und CVLP-ICs, bestehend aus CVLPs und einer 1:100 Verdünnung des hergestellten polyklonalen Mausserums MS B bzw. IgG2a Molekülen (16L1 VIII 1.3.5.15, MM4), an BMDCs über die Fc γ -Rs III/II (CD16/CD32) binden.

4.1 Expression der Fc γ -Rezeptoren III/II (CD16/CD32) auf Dendritischen Zellen

Mittels Durchflusszytometrie (C.6.1.1) konnte gezeigt werden, dass die Fc γ -Rs III/II (CD16/CD32) auf Dendritischen Zellen, nicht aber auf RMA-Zellen stark exprimiert sind (siehe Abbildung 22). Der verwendete monoklonale Detektions- wie auch Block-Antikörper der Firma Pharmingen ist sowohl spezifisch Fc γ -R III (CD16) als auch Fc γ -R II (CD32), weshalb zwischen diesen beiden Rezeptoren nicht differenziert werden kann.

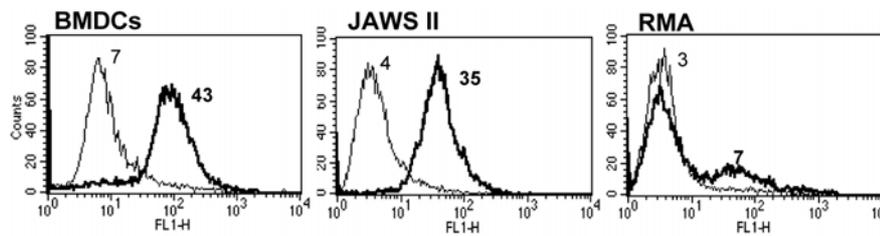


Abbildung 22: Expression der Fc γ -Rezeptoren III/II (CD16/CD32)

BMDCs, JAWS II und RMA Zellen wurden mit Ratte-anti-Maus CD32/CD16 (1:100) für 1 h auf Eis inkubiert. Als Sekundär-Antikörper fungierte Ziege-anti-Ratte-FITC (1:100). Zur Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Erst-Antikörper inkubiert worden waren. Für die Vitalitätsbestimmung wurden die Zellen zuvor mit 7-AAD inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL1-H vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein. Im Histogramm ist die Fluoreszenz der Negativkontrolle (dünne Linie) und die der mit Ratte-anti-Maus CD32/CD16 gefärbten Zellen dargestellt. (dicke Linie). Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt.

4.2 Spezifische Bindung von CVLPs und CVLP-ICs an Zellen

Nach der Inkubation von HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ bzw. HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs und deren Immunkomplexe mit DCs auf Eis (C.6.1.2), was eine Bindung an die Zellen, nicht aber die Aufnahme der Partikel ermöglicht, konnte ein Bindung der Partikel an DCs, nicht aber an RMA Zellen mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen werden (Abbildung 23). CVLPs, detektiert durch den 25/C Antikörper (A) bzw. durch das Antikörperserum 4543 (B), konnten sehr gut an DCs binden. CVLP-ICs, ob komplexiert mit dem polyklonalen Mausserum MS B (D) oder mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) (E) konnten ebenfalls sehr gut an BMDCs binden. Bei der Analyse der RMA Zellen waren zwei Zellpopulationen zu sehen, die sich hinsichtlich ihrer Größe und Granularität unterschieden. An eine der Zellpopulationen (größere Zellen, höhere Granularität) konnten CVLPs binden (Daten nicht gezeigt), an die andere Zellpopulation konnten CVLPs und CVLP-ICs nicht binden. Dieser Befund wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Es sei darauf hingewiesen, dass die Ergebnisse der CVLP und CVLP-IC Bindung an DCs nicht direkt miteinander verglichen werden können. Die Komplexierung der CVLPs resultiert in verdeckten Detektionsstellen für die Primärantikörper, so dass ein direkter Vergleich zwischen den Bindungsstärken von CVLP und CVLP-ICs an DCs nicht möglich ist. Aus dem gleichen Grund kann auch ein Vergleich zwischen der Bindung von CVLPs, komplexiert mit polyklonalem Mausserum MS B bzw. mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) nicht durchgeführt werden.

Um zu überprüfen, ob bei der oben gezeigten Bindung von CVLPs und CVLP-ICs die Fc γ Rs III/II (CD16/CD32) involviert sind, wurden die Rezeptoren zunächst durch eine Inkubation mit dem spezifischen Antikörper geblockt. Danach erfolgte wie oben eine Inkubation der Zellen mit CVLPs und CVLP-ICs auf Eis mit anschließender Färbung und Analyse mittels Durchflusszytometrie (siehe Abbildung 23).

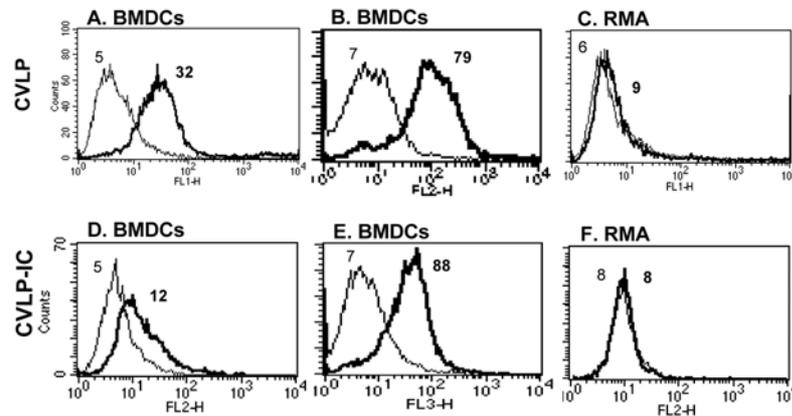


Abbildung 23: CVLP und CVLP-Immunkomplex Bindung an Dendritische Zellen

BMDCs und RMA Zellen wurden mit 10 µg CVLPs (A), (B) und (C), 10 µg CVLPs komplexiert mit polyklonalem Mausserum MS B (1:100 verdünnt) (D) und (F) oder komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) (E) auf Eis 45 Min. inkubiert. Anschließend wurden CVLPs durch den L1-spezifischen Antikörper 25/C (1:100) (A) und (C) bzw. durch das Antikörperserum 4543 (1:300) (B) detektiert. CVLP-ICs wurden durch das CVLP-spezifische Antikörperserum 4543 (1:300) detektiert (D), (E) und (F). Als Sekundärantikörper fungierte Ziege-anti-Maus-FITC (1:100) und Ziege-anti-Kaninchen-FITC (1:100) gekoppelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert worden waren. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL1-H (A) und (C) und Kanal FL2-H bzw. FL3-H (D), (E) und (F) vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Im Histogramm ist die Fluoreszenz der Negativkontrolle (dünne Linie) und die der Zellen mit gebundenen CVLPs bzw. CVLP-ICs dargestellt. (dicke Linie). Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt.

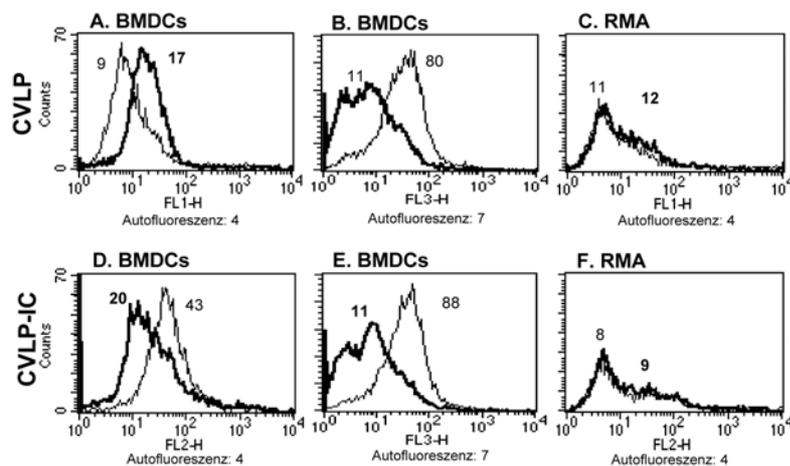


Abbildung 24: CVLP und CVLP-IC Bindung an DCs unter Fc γ -Rezeptoren III/II (CD16/CD32) Blockade

BMDCs und RMA Zellen wurden auf Eis zunächst 1 h mit 100 µl Ratte-anti-Maus CD32/CD16 (1:100) und dann mit 10 µg HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs (A), (B) und (C), 10 µg CVLPs komplexiert mit polyklonalem Mausserum MS B (1:100 verdünnt) (D) und (F) oder CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) (E) 45 Min. inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nicht mit Ratte-anti-Maus CD32/CD16 inkubiert worden waren. Anschließend wurden CVLPs durch den L1-spezifischen Antikörper 25/C (1:100) (A) und (C) bzw. durch das Antikörperserum 4543 (1:300) (B) detektiert, CVLP-ICs durch das CVLP-spezifische Antikörperserum 4543 (1:300) (D-F). Als Sekundärantikörper fungierte Ziege-anti-Maus-FITC (1:100) und Ziege-anti-Kaninchen-FITC (1:100) gekoppelt. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL1-H (A) und (C) und Kanal FL2-H bzw. FL3-H (B), (D-F) vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Im Histogramm ist die Fluoreszenz der Zellen mit gebundenen CVLPs bzw. CVLP-ICs ohne Blockierung (dünne Linie) und mit Blockierung der Fc γ -Rezeptoren III/II (CD16/CD32) (dicke Linie) dargestellt. Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt.

Das Blocken der Fc γ Rs resultierte in einer deutlichen Reduktion der Bindung von CVLP komplexiert mit polyklonalem Mausserum MS B (D) oder mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (E) an BMDCs. Zunächst schien die Bindung der CVLPs durch die Blockade der Rezeptoren zu steigen (A). Es stellte sich jedoch heraus, dass der verwendete Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus FITC gekoppelt; für die Detektion der CVLPs) mit dem für die Fc γ Rs spezifischen Ratten-Antikörper (anti-Maus CD16/CD32 (Fc γ III/II)) kreuzreagiert. Wurden nämlich CVLPs mit dem polyklonalen Kaninchen Antikörperserum 4345 detektiert, konnte durch die Blockade der Rezeptoren ein deutlicher Bindungsrückgang der CVLPs an BMDCs gezeigt werden (B).

CVLPs und CVLPs komplexiert mit dem polyklonalen Mausserum wie auch mit einem monoklonalen IgG2a Antikörper können sehr gut an BMDCs binden. Diese Bindung kann durch die Blockade der Fc γ -Rezeptoren III/II (CD16/CD32), die auf BMDCs stark exprimiert sind, reduziert werden.

5. Aktivierung unreifer BMDCs durch CVLP-Beladung

BMDCs, die *in vitro* aus pluripotenten Knochenmarkzellen generiert wurden (C.3.1), weisen, sofern sie bei der Isolierung keinem zu starken mechanischen Stress ausgesetzt waren, weitgehend Charakteristika von unreifen Dendritischen Zellen auf: hohe Fc γ Rs Expression, große Mengen an intrazellulären MHC Klasse II Molekülen, eine geringe Oberflächenexpression von Kostimulatorischen Molekülen wie CD80 (B7.1) und CD86 (B7.2), sowie nur eine geringe Präsenz von CD40 (Rezeptor des CD40 Liganden, der auf T-Helferzellen exprimiert ist) und CD54 (ICAM-1), einem interzellulärem Adhäsionsmolekül (siehe Abbildung 5). Durch die Aktivierung von unreifen Dendritischen Zellen, verändert sich nicht nur deren Morphologie (siehe Abbildung 21), sondern auch das Oberflächen-Expressionsmuster (Banchereau et al., 2000). Eine Aktivierung kann durch unterschiedliche Ereignisse eintreten. Die Aufnahme von Antigenen, Bindung von Immunkomplexen und folgender Quervernetzung von Fc γ Rs, die Interaktion zwischen CD40 und seinem Liganden und die Bindung von mikrobiologischen Substanzen, welche an verschiedene *Toll-like* Rezeptoren (TLR) der DCs binden, können BMDCS aktivieren und so eine Induktion der Reifung von BMDCs verursachen. Während die Präsenz von Fc γ Rs zurückgeht, sind dann MHC Klasse II, kostimulatorische Moleküle und interzelluläre Adhäsionsmoleküle sowie auch CD40 Rezeptoren verstärkt an der Oberfläche zu finden. Diese Oberflächenmoleküle, die auf aktivierten bzw. reifen DCs mittels spezifischer Antikörper in der Durchflusszytometrie-Analyse nachgewiesen werden können, werden auch Aktivierungsmarker genannt.

5.1 Aktivierung unreifer BMDCs durch *in vitro* Beladung von CVLP und CVLP-Immunkomplexe (CVLP-ICs)

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob eine *in vitro* Beladung mit HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ bzw. HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ CVLPs und CVLPs komplexiert zum einen mit dem polyklonalen Mausserum MS B (1:100 verdünnt) zum anderen mit dem monoklonalen Antikörper 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) zu einer Aktivierung unreifer BMDCs führt. Hierzu wurden primäre DCs zunächst nach dem Protokoll von Lutz et al. 1999 isoliert und zunächst nach neun Tagen in Kultur mit CVLPs und CVLP-ICs beladen. Mittels Durchflusszytometrie Analyse wurde nach zwei weiteren Tagen die Expression der Aktivierungsmarker überprüft (C.6.1.3). Das Ergebnis zeigte, dass kaum Unterschiede zwischen den beladenen und unbeladenen BMDCs feststellbar waren (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurden die BMDCs laut Protokoll aus dem Knochenmark generiert, aber nun schon nach dem sechsten Tag in Kultur mit Antigenen beladen. Als Positivkontrolle wurde ein Teil der Zellen mit LPS (1 μ g/ml) behandelt. Nach weiteren 48 Stunden wurden wie zuvor die Aktivierungsmarker auf der Zelloberfläche mittels spezifischer Antikörper und Durchflusszytometrie analysiert. BMDCs wurden durch 10 μ g/ml CVLPs und 10 μ g/ml CVLP-ICs (polyklonalem Mausserum MS B (1:100 verdünnt)) ähnlich stark aktiviert, die Aktivierung durch die Immunkomplexe lag allerdings immer etwas unter der von CVLP-beladenen BMDCs (siehe Abbildung 25a). Die Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD54 war durch LPS-Aktivierung stärker als durch Beladung von CVLPs und deren Immunkomplexe. Die Oberflächenexpression von MHC Klasse II Molekülen allerdings war nach Aktivierung durch LPS und CVLPs vergleichbar stark.

In einem weiteren Experiment wurden BMDCs am sechsten Tag nach ihrer Isolation aus dem Knochenmark mit 10 μ g/ml (A) bzw. 0,1 μ g/ml (B) CVLPs und 10 μ g/ml (C) bzw. 0,1 μ g/ml (D) CVLPs komplexiert mit Antikörper 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) beladen (siehe Abbildung 14b). Nach 48 Stunden wurde die Oberflächenexpression der Aktivierungsmarker überprüft. Hier zeigte sich, dass die CVLP Komplexierung mit dem IgG2a Antikörper (C) zu einer gesteigerten Aktivierung der BMDCs führte als unkomplexierte CVLPs (A) und auch CVLPs, welche mit polyklonalem Serum komplexiert worden waren (vergleiche Abbildung 25a (C)). Dies bestätigte sich in einem weiteren Versuch (siehe Abbildung 14d (A) und (B)), bei dem durch CVLP-ICs (CVLP:IgG2a = 1:670) vor allem die Aktivierungsmarker MHC II und CD54 stärker auf BMDCs exprimiert wurden als durch die Beladung mit CVLPs. Hier fiel die Erhöhung der Oberflächenexpression von CD80 eher schwach aus.

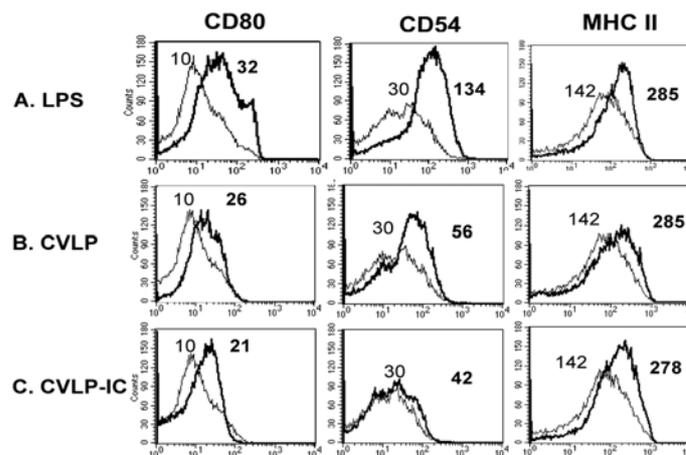


Abbildung 25a: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC

BMDCs wurden mit (A) 1 µg/ml LPS, (B) 10 µg CVLPs und (C) 10 µg CVLP-ICs (komplexiert mit polyklonalem Mäuserum MS B (1:100 verdünnt) beladen. 48 Stunden danach wurden die BMDCs geerntet und 3×10^5 BMDCs wurden pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern (1:50) 45 Min. auf Eis inkubiert: anti-Maus MHC II und anti-Maus CD54. Es folgte die Färbung mit dem direkt gekoppelten Primärantikörper anti-Maus CD80-PE und den Sekundärantikörpern: Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt (1:100) und Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt (1:100). Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie in den Kanälen FL2-H und FL1-H vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Im Histogramm ist die Fluoreszenz der PBS beladenen unaktivierten Zellen (dünne Linie) und die Fluoreszenz der beladenen bzw. aktivierten Zellen (dicke Linie) dargestellt. Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt.

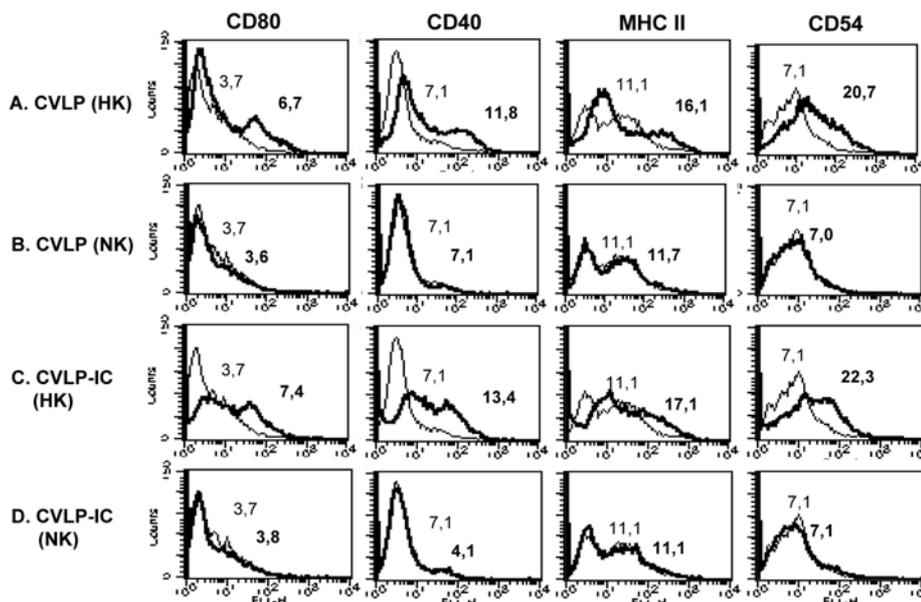


Abbildung 25b: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC

BMDCs wurden am fünften Tag nach der Isolierung aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen mit 10 µg/ml (HK) bzw. 0,1 µg/µl (NK) CVLPs bzw. CVLP-ICs beladen. Nach 48 Stunden wurden die BMDCs geerntet und 3×10^5 BMDCs wurden pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern (1:50) 45 Min. auf Eis inkubiert: anti-Maus CD80, anti-Maus CD40, anti-Maus MHC II und anti-Maus CD54. Es folgte die Färbung mit den Sekundärantikörpern: Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt (1:100) und Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt (1:100). Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL1-H vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Im Histogramm ist die Fluoreszenz der PBS beladenen unaktivierten Zellen (dünne Linie) und die Fluoreszenz der beladenen bzw. aktivierten Zellen (dicke Linie) dargestellt. Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt. HK: hohe Konzentration; NK: niedrige Konzentration

Eine Verschiebung der Gipfel ist in der Graphik kaum sichtbar, der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenz allerdings zeigt, dass auch hier eine verstärkte Expression durch CVLPs und deren Immunkomplexe stattgefunden haben muss. Beides, CVLPs und CVLP-ICs in niedriger Konzentration (0,1 µg/ml) konnten die BMDCs nicht mehr aktivieren (siehe Abbildung 25b (B) und (D)). Die Beladung von BMDCs mit einer äquivalenten Menge an einer Bakulovirus wt-Aufreinigung bzw. mit denaturierten BMDCs führte zu keiner Aktivierung der DCs (siehe Abbildung 26).

5.2 Aktivierung von BMDCs durch CVLPs-Beladung in Kombination mit Sorbitol-Behandlung, CpG ODNs und LPS

Mikrobiologische Substanzen wie CpG reiche Oligodinukleotide (CpG ODN), welche mikrobische DNA imitieren, und Lipopolysaccharide (LPS) werden erfolgreich als Adjuvantien bei Immunisierungen, besonders von Peptiden und löslichen Proteinen, eingesetzt, da sie durch ihre Bindung an die *Toll-like* Rezeptoren TLR-9 und TLR-4 eine sehr gute Reifung von Dendritischen Zellen induzieren können (Kaisho and Akira, 2002). In dem folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob die Kobeladung von CVLPs mit CpG ODNs bzw. LPS die Aktivierung der BMDCs noch verstärken kann. Ebenso sollte überprüft werden, ob der Zuckeralkohol Sorbitol eine Aktivierung von BMDCs alleine auslösen oder in Kombination mit CVLPs und CpG ODNs verstärken kann. Sorbitol ist eine osmotisch aktive, nichtionische Substanz, die in Lebensmittel als Zuckerersatzstoff und in einigen Salben als Stabilisator oder Konservierungsstoff mit antibakteriellen Eigenschaften fungiert. In Zellen, die *in vitro* unter hyperosmotischem Stress durch Sorbitol-Behandlung standen, konnte eine Stress-Kinase p38 vermittelte Transaktivierung des Epidermalen Wachstumsfaktor- Rezeptor (EGFR) nachgewiesen werden (Cheng et al., 2002). Diese Aktivierung durch eine Sorbitol-Behandlung war der Anlass zu überprüfen, ob dieser Zuckeralkohol auch einen Einfluss auf die Aktivierung von CVLP-beladenen BMDCs hat, d.h. die schon vorhandene Aktivierung durch die CVLPs womöglich noch steigern kann.

Am sechsten Tag nach ihrer Isolation aus dem Knochenmark von Mäusen wurden BMDCs mit 10 µg/ml CVLPs beladen (siehe Abbildung 25c (A)) und nach 48 Stunden mit Sorbitol (600 mM) 30 Min. bei 37° C inkubiert (D), anschließend wurde das Sorbitol gewaschen (C.6.1.3.1). Zusätzlich wurden BMDCs nur mit Sorbitol inkubiert, sechs (B) bzw. 48 Stunden (C) nachdem die anderen BMDCs mit CVLPs beladen worden waren. Hierbei zeigte sich, dass die alleinige Sorbitol-Behandlung teilweise zu einer schwachen Aktivierung der BMDCs geführt hatte, wenn sie nach 48 Stunden (C), also kurz vor der Färbung durchgeführt wurde.

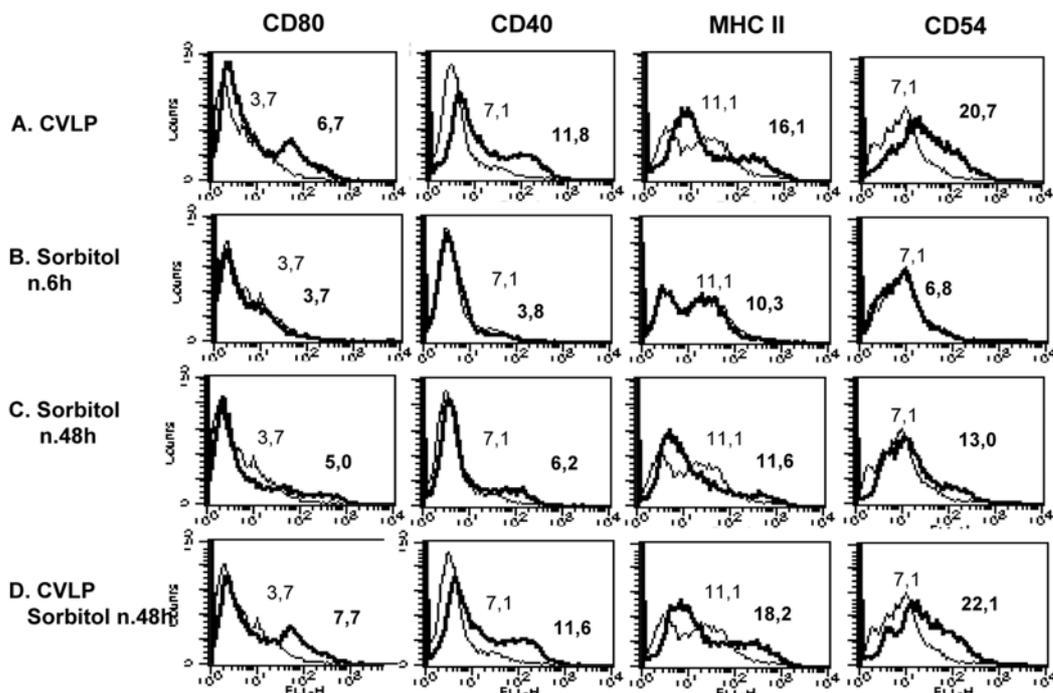


Abbildung 25c: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC

BMDCs wurden am fünften Tag nach der Isolierung aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen mit 10 µg CVLPs (A) beladen und nach 48 h mit 600 mM Sorbitol für 30 Min bei 37 °C inkubiert (D). Zusätzlich wurden unbeladene BMDCs mit Sorbitol behandelt (s.o.), sechs (B) bzw. 48 h (C) nachdem die BMDCs (A und D) mit CVLPs beladen worden waren. 48 Stunden nach der CVLP-Beladung wurden die BMDCs geerntet und 3×10^5 BMDCs wurden pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern (1:50) 45 Min. auf Eis inkubiert: anti-MausCD80, anti-Maus CD40, anti-Maus MHC II und anti-Maus CD54. Es folgte die Färbung mit den Sekundärantikörpern: Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt (1:100) und Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt (1:100). Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL1-H vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Im Histogramm ist die Fluoreszenz der PBS beladenen unaktivierten Zellen (dünne Linie) und die Fluoreszenz der beladenen bzw. aktivierten Zellen (dicke Linie) dargestellt. Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt.

Eine Sorbitol-Behandlung zwei Tage vor der Überprüfung der Aktivierungsmarker führte zu keiner Aktivierung der BMDCs (B). Wurden BMDCs, welche mit CVLPs beladen worden waren zusätzlich mit Sorbitol behandelt, konnte die CVLP-Aktivierung der BMDCs durch Sorbitol sogar noch gesteigert werden (D).

Dies zeigte sich nochmals in einem weiteren Versuch, bei dem BMDCs mit 18 µg/ml CVLPs beladen (siehe Abbildung 25d) und entweder sechs Stunden (C) bzw. 48 Stunden (D) danach mit Sorbitol für 30 Min. bei 37° C inkubiert wurden. Während die Expression von CD80 und CD40 nicht von der Sorbitol-Behandlung belangt worden zu sein schien, so führte diese Behandlung bei der Oberflächenexpression der MHC Klasse II Moleküle zu einer Verdopplung des Geometrischen Mittelwerts der Fluoreszenz, wenn sie kurz vor der Antikörperfärbung durchgeführt wurde (D).

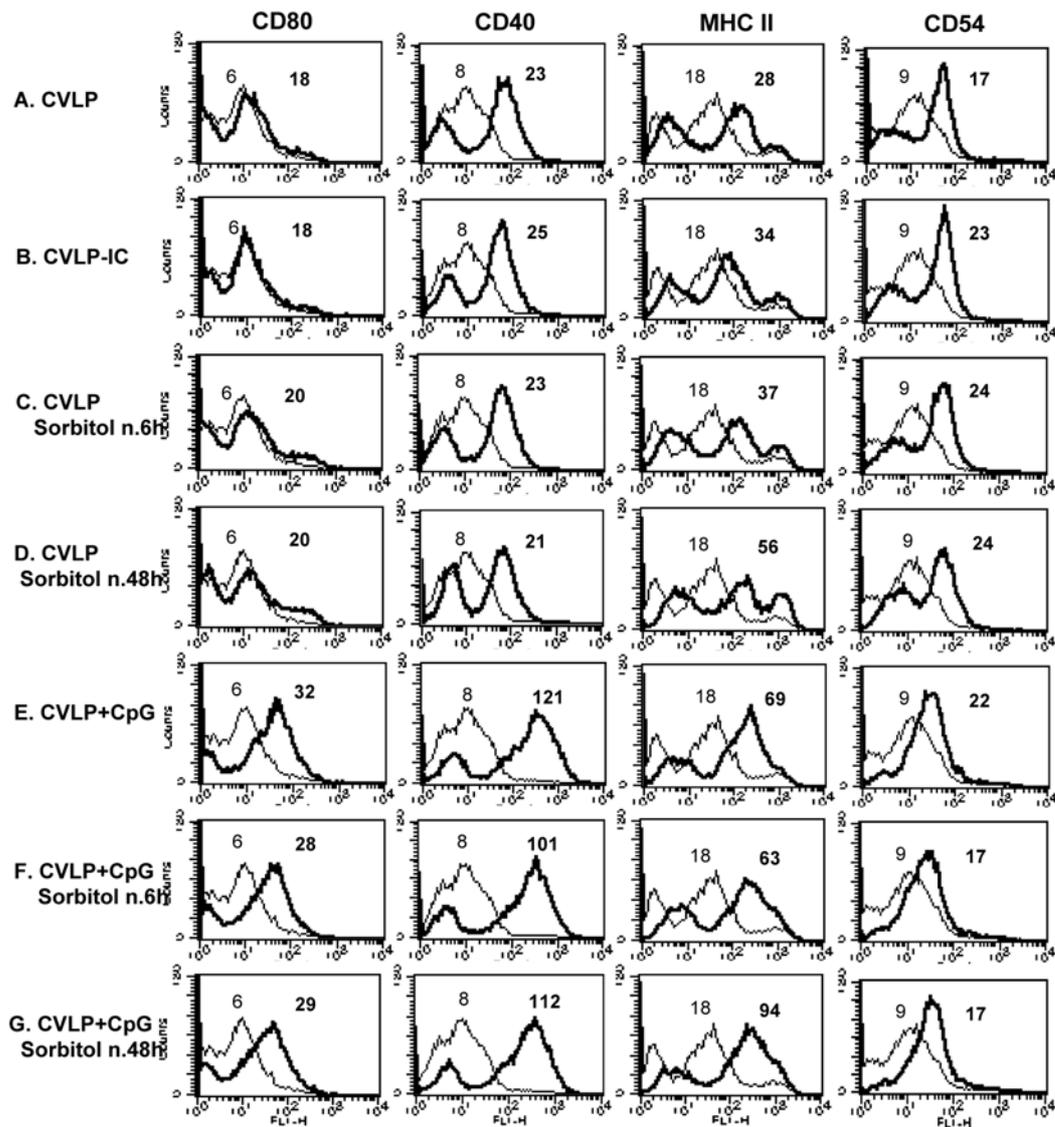


Abbildung 25d: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC

BMDCs wurden am fünften Tag nach der Isolierung aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen mit 18 µg CVLPs alleine oder nach 4 h in Kombination mit CpG ODNs (1 µg/ml) bzw. mit 18 µg und 1,8 µg CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) beladen. Zusätzlich wurden BMDCs mit 18 µg CVLPs alleine oder nach 4 h in Kombination mit CpG ODNs (1 µg/ml) beladen, die dann nach 6 h bzw. 48 h für 30 Min. mit Sorbitol (Endkonzentration 600 mM) inkubiert wurden. Als Negativkontrolle dienten BMDCs, die mit PBS beladen wurden. 48 Stunden nach der CVLP/CVLP-ICs-Beladung wurden die BMDCs geerntet und 3×10^5 BMDCs wurden pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert. Die Zellen wurden mit den Primärantikörpern (1:50) 45 Min. auf Eis inkubiert: anti-MausCD80, anti-Maus CD40, anti-Maus MHC II und anti-Maus CD54. Es folgte die Färbung mit den Sekundärantikörpern: Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt (1:100) und Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt (1:100). Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL1-H vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Im Histogramm ist die Fluoreszenz der PBS beladenen unaktivierten Zellen (dünne Linie) und die Fluoreszenz der beladenen bzw. aktivierten Zellen (dicke Linie) dargestellt. Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt. Die Autofluoreszenz der Zellen wie auch die Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Sekundär-Antikörper ist nicht gezeigt, letztere betrug für Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt 6 und für Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt 7.

Wurden die Zellen gleich sechs Stunden nach der CVLP-Beladung mit Sorbitol behandelt (C), führte dies immer noch zu einer Erhöhung der MHC Klasse II Expression, diese war aber deutlich niedriger. CD54 wurde ebenfalls durch beide Arten der Sorbitol-Inkubation gegenüber der einfachen CVLP-Beladung erhöht. Wenn also eine Sorbitol-Behandlung auch nur eine schwache Aktivierung der BMDCs auslösen konnte, so konnte sie jedoch den CVLP-Aktivierungs-Effekt verstärken.

Des Weiteren wurden BMDCs mit 18 µg/ml CVLPs und vier Stunden danach mit 1 µg/ml CpG ODNs beladen (siehe Abbildung 25d (E)) und zusätzlich entweder nach weiteren zwei Stunden (F) oder nach 48 Stunden (G) mit Sorbitol (Endkonzentration 600 mM) für eine halbe Stunde inkubiert. Die CpG ODN Behandlung alleine steigerte den Effekt der CVLP-Beladung aktivierte die beladenen BMDCs hinsichtlich der CD80, CD40 und MHC Klasse II Moleküle (vergleiche A). Diese Aktivierung konnte durch eine Sorbitol-Behandlung, die zwei Stunden nach der CpG ODNs-Beladung stattgefunden hatte (F), nicht verstärkt werden, sie minderte diese sogar in geringem Maße. Waren die beladenen BMDCs aber 48 Stunden nach der CpG ODNs-Beladung mit Sorbitol inkubiert worden (G), so konnte dies die Oberflächenexpression von MHC Klasse II und CD54 im Vergleich zur alleinigen CVLP-Beladung in Kombination mit CpG ODN verstärken. Durch diese BMDCs Behandlung wurden hinsichtlich der MHC Klasse II und CD54 Expression die besten Aktivierungs-Ergebnisse erzielt. Bezüglich der CD80 und der CD40 Expression konnte die zusätzliche Sorbitol-Behandlung keine Expressions-Steigerung auslösen.

Da es sich zeigte, dass durch die verschiedenen Antigen-Beladungen und Behandlungen die Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD40, CD54 und MHC Klasse II auf den gleichen BMDCs unterschiedlich stark ausgelöst wurden, wurden die Ergebnisse in einer Tabelle zusammengefasst. Dabei wurden die Werte der Geometrischen Mittleren Fluoreszenz (GMF) aller Aktivierungsmarker der selben Antigen-Beladung und Behandlung der BMDCs addiert und durch die Anzahl der überprüften Aktivierungsmarker geteilt (= GMF-Mittelwert) (da in Abbildung 25a die CD40-Expression nicht gemessen wurde). Der GMF-Mittelwert, der durch die Beladung mit CVLPs erreicht wurden, wurde auf den Referenzwert 1 gesetzt und alle weiteren GMF-Mittelwerte wurden als Steigerungsfaktor bezüglich dieses Wertes angegeben (siehe Tabelle 9). Dabei zeigte sich, dass besonders die Kobeladung von CVLPs mit CpG ODNs zu einer Steigerung der BMDC-Aktivierung führte (ca. Faktor 3). Diese konnte je nachdem wann eine zusätzliche Sorbitol-Behandlung der Zellen stattfand sogar noch erhöht bzw. reduziert werden. Durch die alleinige Sorbitol-Behandlung der CVLP-beladenen BMDCs konnte deren Aktivierung um einen Faktor von 1,2-1,4 gesteigert werden. Auch war der Zeitpunkt der Behandlung entscheidend. Waren die CVLP-ICs auf BMDCs geladen worden, so konnte die Aktivierung gegenüber des Referenzwertes leicht gesteigert werden (Faktor 1,1), allerdings nur, wenn es sich dabei um eine Komplexierung mit IgG2a handelte und nicht mit Antikörpern des polyklonalen Serums MS B. Letzteres, die alleinige Sorbitol-Behandlung nach sechs oder 48 Stunden und CVLPs bzw. CVLP-ICs mit einer sehr niedrigen Konzentration (0,1 µg/ml) führten zu einer reduzierten oder keinen Aktivierung der BMDCs.

Tabelle 9: Zusammenfassung der BMDCs Aktivierungs-Experimente

Beladung		Aktivierungs-Effizienz
CVLP + CPG Sorbitol n. 48h		3
CVLP + CPG		2,8
CVLP + CPG Sorbitol n. 6h		2,7
CVLP Sorbitol n. 48h		1,4
CVLP Sorbitol n. 6h		1,2
CVLP-IC (MM4)		1,1
CVLP		1
CVLP-IC (MS B)		0,9
Sorbitol n. 48h		0,6
PBS		0,5
CVLP-IC (NK)		0,5
CVLP (NK)		0,5
Sorbitol n. 6h		0,5

Die Summe der Geometrischen Mittleren Fluoreszenzen (GMF) der Aktivierungsmarker (CD80, CD40, MHC Klasse II und CD54) jeder Antigen-Beladung (linke Spalte) wurde durch die Anzahl der gemessenen Aktivierungsmarker geteilt (GMF-Mittelwert). Der durch die Beladung von BMDCs mit CVLPs (10-18 µg/ml) erreichte GMF-Mittelwert wurde als Referenzwert 1 herangezogen und alle weiteren GMF-Mittelwerte wurden als Steigerungsfaktor bezüglich dieses Wertes angegeben (rechte Spalte). CpG: CpG ODNs; C₆H₁₄O₆: Sorbitol; MM4 = IgG2a, 16L1 VIII 1.3.5.15 MM4 (CVLP:IgG2a = 1:670); MS B: polyklonales Mausserum B; NK: niedrig konzentriert (0,1 µg/ml).

Die Tatsache, dass im oben aufgeführten Experiment eine Kobeladung von BMDCs mit CVLPs und CpG ODNs zeitlich versetzt durchgeführt wurde (CVLPs und vier Stunden danach CpG ODNs), resultierte aus Versuchen, die andeuteten, dass CVLPs und CpG ODNs möglicherweise den gleichen Aktivierungs- bzw. Aufnahmeweg in BMDCs nutzen. Einer dieser Versuche wird im folgenden aufgeführt (siehe Abbildung 26a). Anhand der CD80 Expression auf BMDCs sollte gezeigt werden wie die Aktivierung von BMDCs zunimmt, wenn sie mit CVLPs und unterschiedlichen Konzentrationen an CpG ODNs und LPS beladen worden waren. Dazu wurden BMDCs mit CVLPs [2 µg/ml] beladen oder nicht, gleichzeitig mit unterschiedlichen Konzentrationen an CpG ODNs bzw. LPS behandelt. Zusätzlich wurde in diesem Experiment überprüft, ob die Aktivierung der BMDCs tatsächlich auf der nativen Proteinstruktur der

Chimären Virus-ähnlichen Partikeln beruht. Dazu wurden CVLPs denaturiert und ebenfalls mit BMDCs inkubiert. Diese wie auch die Beladung mit einer äquivalenten Menge einer CsCl-Fraktion stammte, die von einer Aufreinigung von Insektenzellen, die mit dem Bakulovirus Wildtyp infiziert waren, führte zu keiner Aktivierung der CD80 Expression. CVLP-beladene BMDCs insbesondere mit einer CpG ODN Konzentration von 0,5 µg/ml und 3 µg/ml CpG ODNs induzierten eine mehr als doppelt so gute Reifung als ohne Adjuvantien (gemessen an der GMF von CD80). Das beste Kobeladungsergebnis mit LPS wurde mit einer Konzentration von 1,0 µg/ml erzielt. Im Falle der Behandlung mit LPS war keine klare Konzentrations-Abhängigkeit zu beobachten. Während eine auffällige Differenz zwischen den mit CVLP-beladenen und nicht beladenen, CpG ODNs aktivierten BMDCs erkennbar war, so führte die CVLP-Beladung bei den mit LPS stimulierten Zellen kaum zu einer weiteren Aktivierungssteigerung.

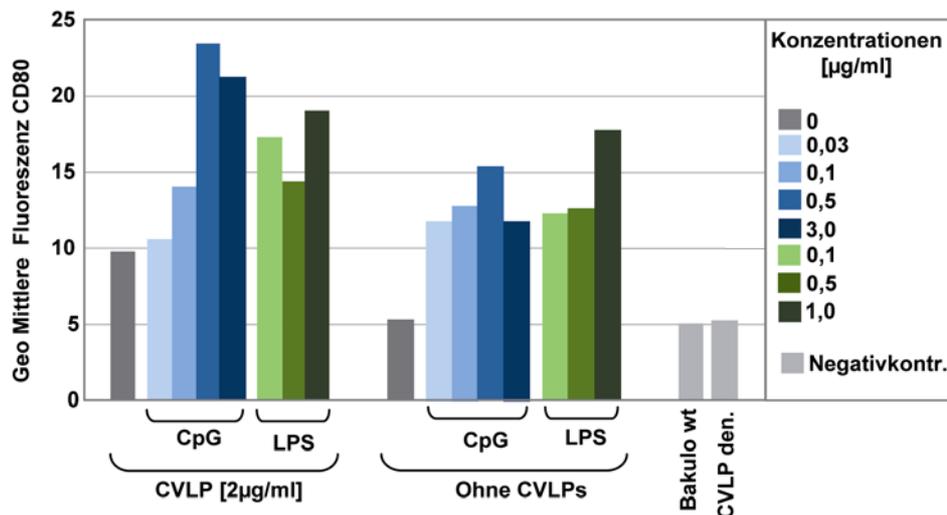


Abbildung 26a: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung mit CVLP in Kombination mit CpG und LPS

In 18 kleine 3,5 cm Petrischalen wurden 1×10^6 am fünften Tag nach der Isolierung aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen BMDCs pro Petrischale ausplattiert. BMDCs von je acht Petrischalen wurden entweder mit 2 µg CVLPs oder mit 100 µl PBS beladen. Als Negativkontrolle wurden zu den BMDCs einer Petrischale 2 µg denaturierte CVLPs bzw. 100 µl einer dialysierten CsCl-Fraktion, die aus einer Bakulovirus wt Aufreinigung stammte, pipettiert. Sowohl die CVLP als auch die PBS beladenen BMDCs wurden nun mit unterschiedlichen Konzentrationen CpG ODNs und LPS beladen. Jeweils eine Petrischale blieb unbehandelt. Nach 48 Stunden wurden 3×10^5 BMDCs geerntet und mit dem direkt PE-gekoppelten Antikörper: anti Maus CD80 PE (1:50) 45 Min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL2-H vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Das Säulendiagramm zeigt den Geometrischen Mittelwert der CD80 Fluoreszenz.

Zum anderen konnte durch dieses Experiment gezeigt werden, dass ein erheblicher Unterschied zwischen den Steigerungsfaktoren der Aktivierung von CVLP-beladenen BMDCs vorhanden war, je nachdem welches Adjuvans gleichzeitig verabreicht wurde. Um dies zu verdeutlichen, wurde das Verhältnis der Steigerungsfaktoren (SF), welche durch die Aktivierung ohne CVLPs bzw. mit CVLPs erreicht wurden, angegeben (siehe Abbildung 26b). Dabei wurde die Aktivierung der BMDCs, welche nicht mit den Adjuvantien behandelt worden waren, als Referenzwert 1 herangezogen. Während die Verhältnisse der Steigerungsfaktoren mit zunehmender LPS-Konzentration stiegen, so nahmen sie mit zunehmenden CpG

ODN-Konzentrationen ab. Aus dieser Tatsache wurde geschlossen, dass die Aktivierung bzw. die Aufnahme durch bzw. von CVLPs und CpG ODNs möglicherweise über einen gemeinsamen Weg in BMDCs ablaufen.

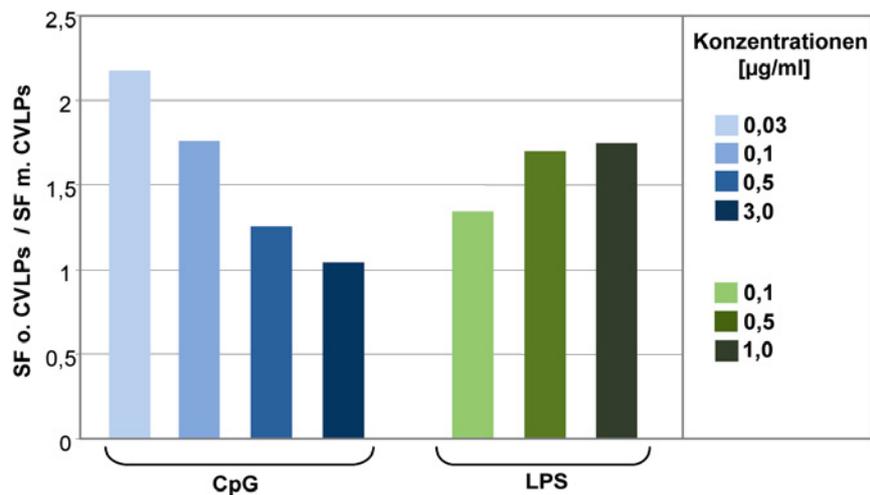


Abbildung 26b: Steigerung der Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung mit CVLP in Kombination mit CpG und LPS

Die Steigerung der Geometrischen Mittleren Fluoreszenzen von CD80, die durch die Beladung von BMDCs mit/ohne CVLPs und unterschiedlichen Konzentrationen an CpG ODN oder LPS erzielt wurden (s.Abb.14a), wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dabei wurden die Geometrischen Mittelwerte von BMDCs, welche nicht oder mit CVLPs beladen worden waren und nicht weiter behandelt wurden, als Referenzwert 1 angegeben. Die Zunahme der Geometrischen Mittleren Fluoreszenz, erzielt durch die Zugabe von CpG ODNs oder LPS in unterschiedlichen Konzentrationen, wurde als Steigerungsfaktor (SF) des Referenzwertes angegeben. Die Steigerungsfaktoren bzw. die Zunahme ohne CVLPs und mit CVLPs wurden zueinander ins Verhältnis gesetzt (SF ohne CVLP : SF mit CVLPs). NK = niedrig konzentriert.

BMDCs wurden sehr gut durch CVLPs bzw. deren Immunkomplexe aktiviert. Die Aktivierung konnte durch die Kobeladung von CVLPs mit CpG ODNs um etwa das 3-fache gesteigert werden. Wurden die kobeladenen BMDCs zusätzlich nach 48 Stunden mit Sorbitol behandelt, wurde die beste Aktivierung erzielt. Die verschiedenen Antigen- und Adjuvans-Behandlungen lösten unterschiedliche Expressionsstärken der verschiedenen Aktivierungsmarker auf den gleichen BMDCs aus. Die Analyse der Steigerungsfaktoren der Aktivierung von BMDCs, welche mit CVLPs und gleichzeitig mit CpG ODNs oder LPS beladen worden waren, zeigte, dass CpG ODNs und CVLPs möglicherweise den gleichen Aktivierungsweg in BMDCs nutzen.

6. MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs: cross Präsentation

DCs zeichnen sich besonders durch ihre Fähigkeit aus, exogene Antigene aufzunehmen und diese in den MHC Klasse I Präsentationsweg einzuschleusen (*cross* Präsentation). Ein lösliches Antigen kann somit von BMDCs an CD8⁺ T-Zellen präsentiert werden, welche mittels ihres T-Zellrezeptors (TZR) die Epitope des exogenen Antigens erkennen können (*Signal 1*). Dieser Präsentationsweg ist deshalb besonders interessant, da so aus *naïven* CD8⁺ T-Zellen Antigen-spezifische ZTLs gebildet werden können, ohne dass CD4⁺ T-Helferzellen sich an dieser Entwicklung beteiligen. Dies geschieht aber nur dann, wenn die T-Zelle außer dem *Signal 1*, was sie durch den Komplex aus MHC Klasse I Molekül und TZR erfährt, auch noch ein zweites und wahrscheinlich drittes Signal erhält, welches durch die Interaktion mit kostimulatorischen Molekülen (CD80 (B7.1) bzw. CD86 (B7.2), die auf aktivierten DCs zu finden sind, und durch die Ausschüttung von Zytokinen ausgelöst wird (Blankenstein and Schuler, 2002). Man spricht dann vom sogenannten *Priming* der *naïven* T-Zellen.

In den folgenden Versuchen wurde zunächst das *Signal 1*, die Antigenpräsentation der BMDCs überprüft, d.h. es sollte untersucht werden wie gut CVLPs, deren Immunkomplexe und CVLPs in Kombination mit CpG ODN oder Sorbitol-Behandlung von BMDCs über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden. Gleichzeitig sollte der Präsentationsweg untersucht werden, den die CVLPs und CVLP-ICs als exogene Antigene in den BMDCs einschlagen. Hierzu wurden BMDCs mit Brefeldin A (BFA), einer Substanz die den ER-Export inhibiert, behandelt. Um zu untersuchen, ob die Antigen-Epitope über das ER in den konventionellen MHC Klasse I Präsentationsweg eingeschleust werden, wurden BMDCs verwendet, die von TAP-defizienten (TAP^{-/-}) Mäusen stammten. Die Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle wurde in den folgenden Experimenten nicht direkt, sondern indirekt über die Aktivierung von Antigen-spezifischen CD8⁺ ZTLs gemessen. Diese Aktivierung ist nicht mit der von unreifen DCs zu verwechseln. Während letztere die Bezeichnung der Induktion zur Reifung der DCs bezeichnet und durch die Analyse von sogenannten Aktivierungsmarkern auf der Zelloberfläche der DCs nachgewiesen wird (siehe Abbildung 5) so bedeutet eine Aktivierung einer zytotoxischen T-Zelle, dass sie durch die Interaktion zwischen ihrem spezifischen TZR und dem MHC Klasse I Molekül der DCs zur Ausschüttung von Zytotoxinen und Zytokinen stimuliert wird. Die Antigenpräsentation einer beladenen DC wird somit indirekt durch die Produktion von IFN γ einer aktivierten T-Zelle nachgewiesen. Für die Quantifizierung der IFN γ -Produktion der T-Zelle stehen unterschiedliche Methoden zur Auswahl. Zum einen wurde in dieser Arbeit das ausgeschüttete Zytokin mittels IFN γ -EliSpot ermittelt (C.7.3) (Daten nicht gezeigt). Zum anderen wurde die Sekretion des Zytokins durch Monensin, was den Golgi-Komplex zerstört, verhindert und so das intrazelluläre IFN γ mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen, nachdem die T-Zelle fixiert und permeabilisiert worden war (intrazelluläre IFN γ Färbung; siehe Abbildung 27).

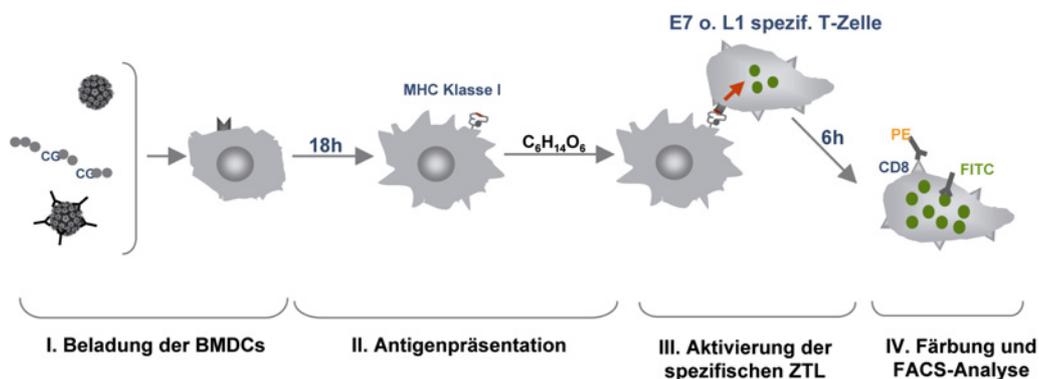


Abbildung 27: Intrazelluläre IFN γ Färbung

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs ausplattiert. Ein Drittel der Zellen wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an HPV16L1 Δ CE71-55 CVLPs (0-4000 ng) alleine beladen, die beiden anderen Drittel wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an CVLPs in Kombination mit 0,1 μ g/ml bzw. 1 μ g/ml CpG ODNs (gleichzeitig) beladen. Als Positivkontrolle dienten BMDCs, welche mit 100 nM L1165-173 Peptid beladen wurden. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde die Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt.

Die Ergebnisse beider Methoden waren sehr ähnlich, der IFN γ -EliSpot allerdings erwies sich bei der Durchführung der Präsentations-Experimente als sehr Material verbrauchend, weshalb der Großteil der Versuche mittels intrazellulärer IFN γ Färbung durchgeführt wurde. Eine Überprüfung der Antigenpräsentation wurde etwa 18 Stunden nach der Antigen-Beladung durchgeführt. Sechs Stunden nach der Antigenbeladung konnte noch keine Aktivierung der T-Zellen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

6.1 MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach CVLP-Beladung in Kombination mit CpG ODNs und Sorbitol

Im ersten Experiment wurden BMDCs mit unterschiedlichen Konzentrationen an HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs in Kombination mit CpG ODNs [1 μ g/ml] und [0,1 μ g/ml] gleichzeitig beladen. Nach ca. 18 Stunden wurde die Präsentation des Antigens über MHC Klasse I Moleküle mittels intrazellulärer IFN γ Färbung L1-spezifischer T-Zellen ermittelt (C.0). Dabei konnten erst bei abnehmender CVLP Konzentration und bei der geringeren Zugabe an CpG ODNs [0,1 μ g/ml] eine Steigerung der Antigenpräsentation festgestellt werden (siehe Abbildung 28a). Dies war ein weiterer Hinweis darauf gewesen, dass CVLPs und CpG ODNs womöglich den gleichen Aufnahmeweg in die BMDCs nutzen und sich deshalb gegenseitig inhibieren. Es wurde daher beschlossen im folgenden Experiment BMDCs mit unterschiedlichen Mengen an HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs zu beladen und die CpG ODN Behandlung zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchzuführen (siehe Abbildung 28b), da vermutet wurde, dass die gleichzeitige Verabreichung von CVLPs und CpG ODNs die Antigenpräsentation der BMDCs negativ beeinflusst. 18 Stunden nach der CVLP-Beladung wurde auch hier die Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle mittels intrazellulärer IFN γ Färbung L1-spezifischer T-Zellen ermittelt.

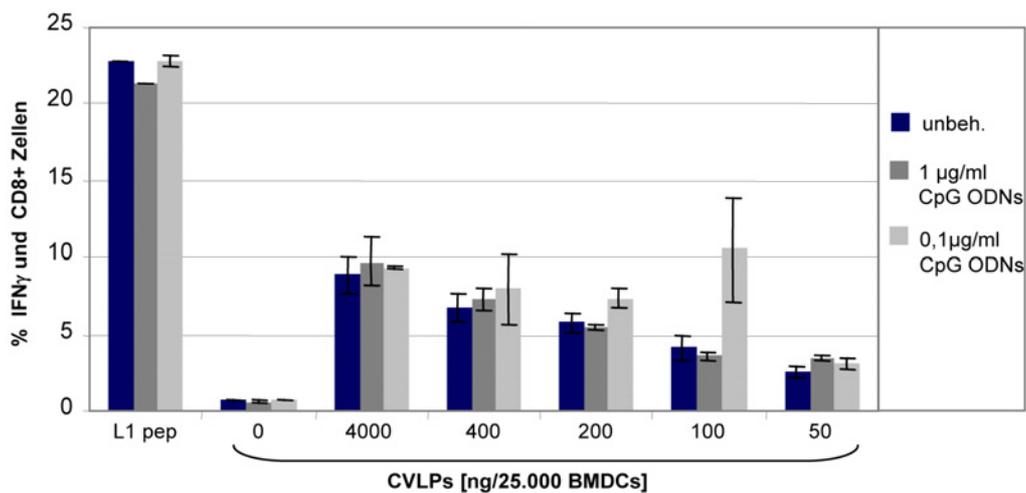


Abbildung 28a: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs
 Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs ausplattiert. Ein Drittel der Zellen wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs (0-4000 ng) alleine beladen, die beiden anderen Drittel wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an CVLPs in Kombination mit 0,1 μ g/ml bzw. 1 μ g/ml CpG ODNs (gleichzeitig) beladen. Als Positivkontrolle dienten BMDCs, welche mit 100 nM L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladen wurden. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde die Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt.

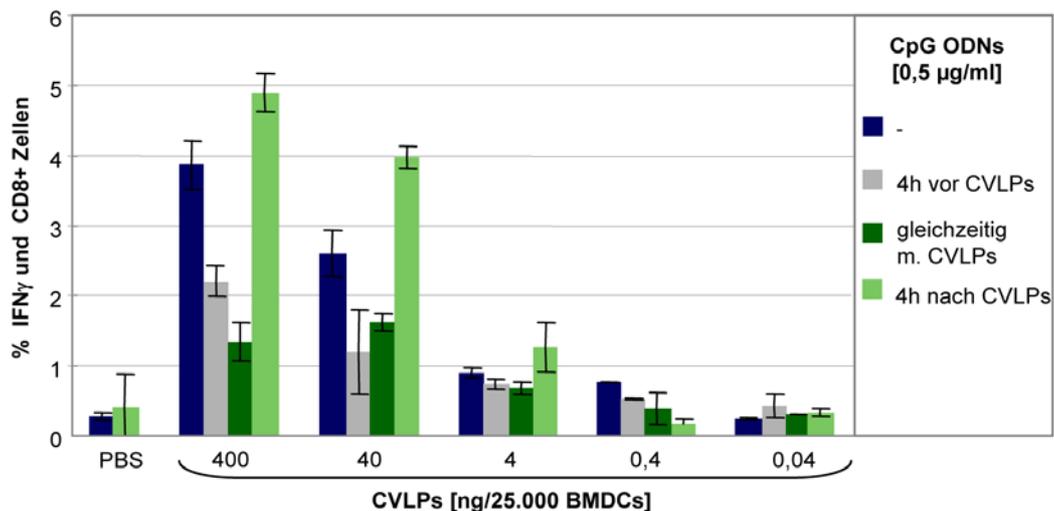


Abbildung 28b: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs zu unterschiedlichen Zeitpunkten

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs ausplattiert. Die Zellen wurde mit unterschiedlichen Konzentrationen an HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs (25-1600 ng) beladen. Ein Teil der Zellen war vier Stunden zuvor mit CpG ODNs beladen worden, ein Teil der Zellen wurde gleichzeitig mit CVLPs und CpG ODNs beladen und ein Teil der Zellen wurde erst vier Stunden nach der CVLP-Beladung mit CpG ODNs behandelt. Als Positivkontrolle dienten BMDCs, welche mit 100 nM L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladen wurden (nicht gezeigt). Als weitere Kontrolle dienten Zellen, die nur mit CVLPs, nicht aber mit CpG ODN behandelt wurden. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde die Antigenpräsentation wurde indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt.

Bei BMDCs, die entweder vier Stunden vor oder gleichzeitig mit der CVLP-Beladung (400 und 40 ng/25.000 BMDCs) mit 0,5 μ g/ml CpG ODNs behandelt worden waren, reduzierte sich die Präsentationsfähigkeit des CVLP-Epitops im Vergleich zur CVLP-Beladung ohne CpG ODN um etwa die

Hälfte. Wurden BMDCs zuerst mit CVLPs beladen und wurden dann nach vier Stunden die CpG ODNs hinzupipettiert, konnte die Antigenpräsentation gesteigert werden (siehe auch Abbildung 28c).

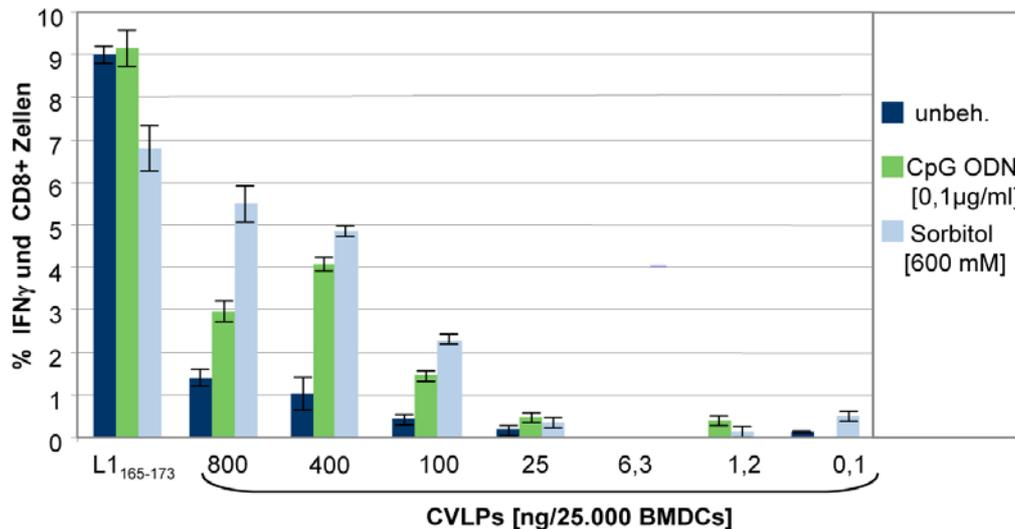


Abbildung 28c: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs und Sorbitol-Behandlung

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs ausplattiert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs (0,1-800 ng) beladen. Ein Teil der Zellen blieben danach unbehandelt und zum anderen Teil wurden später 0,1 μg/ml CpG ODNs pipettiert. Als Positivkontrolle dienten BMDCs, welche mit 100 nM L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladen wurden, als Negativkontrolle BMDCs, zu welchen PBS pipettiert wurde. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde zu einem der beladenen, aber unbehandelten Duplikate Sorbitol (Endkonzentration: 600 mM) pipettiert und die Antigenpräsentation wurde indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Der Wert der PBS beladenen BMDCs (Hintergrund) wurde subtrahiert.

Um den Einfluss von Sorbitol auf die Antigenpräsentation der Dendritischen Zellen zu untersuchen, wurden die BMDCs ca. 30 Min. mit dem Zuckeralkohol [600 mM] inkubiert, gewaschen und anschließend mit CVLPs beladen (C.7.1). Um Die Ergebnisse besser vergleichen zu können, wurden zusätzlich BMDCs untersucht, die wie im vorherigen Versuch zunächst mit CVLPs und dann vier Stunden später mit CpG ODNs beladen wurden. Auch hier wurde die Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung von L1-spezifischen T-Zellen untersucht. Die Vorbehandlung mit Sorbitol steigerte die Aktivierung der L1-spezifischen T-Zellen um ein 3-4 Faches (siehe Abbildung 28c) gegenüber der Aktivierung durch BMDCs, die nur mit CVLPs beladen worden waren. In anderen Experimenten konnte die Aktivierung sogar um Faktor sieben verbessert werden (Daten nicht gezeigt). Die Behandlung von BMDCs mit CpG ODNs bewirkte zwar eine Verstärkung der Aktivierung der T-Zellen, diese war allerdings schwächer als die Aktivierung durch BMDCs mit Sorbitol-Behandlung (siehe Abbildung 28c). Auffällig war, dass die Vorinkubation mit dem Zuckeralkohol bei BMDCs, welche mit L1-Peptid beladen worden waren, zu einer Reduktion der Präsentation bzw. der Aktivierung der L1-spezifischen T-Zellen führte. BMDCs, welche nicht mit CVLPs beladen worden waren, aber mit Sorbitol behandelt

wurden, konnten keine $\text{IFN}\gamma$ Produktion in den T-Zellen auslösen. Die $\text{IFN}\gamma$ Produktion war demnach kein direkter Effekt des Zuckeralkohols, sondern konnte nur im Zusammenhang mit der Antigenpräsentation durch Sorbitol gesteigert werden.

6.2 Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle von BMDCs nach Beladung mit CVLP bzw. CVLP-ICs

Da unreife DCs sehr stark $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ auf ihrer Zelloberfläche exprimieren (siehe Abbildung 22), sollte untersucht werden, ob durch die Komplexierung der CVLPs mit L1/E7-spezifischen Antikörpern die Beladung und damit auch die Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle von BMDCs verbessert werden kann. Hierzu wurden unreife BMDCs mit unterschiedlichen Konzentrationen an CVLP-ICs und CVLPs beladen. In den ersten beiden Experimenten (siehe Abbildung 29a und b) wurden Chimäre HPV16L1 Δ E7₁₋₆₀ Virus-ähnliche Partikel verwendet, weshalb die Präsentation der beladenen DCs mittels intrazellulärer $\text{IFN}\gamma$ Färbung der aktivierten E7-spezifischen T-Zellen erfasst wurde.

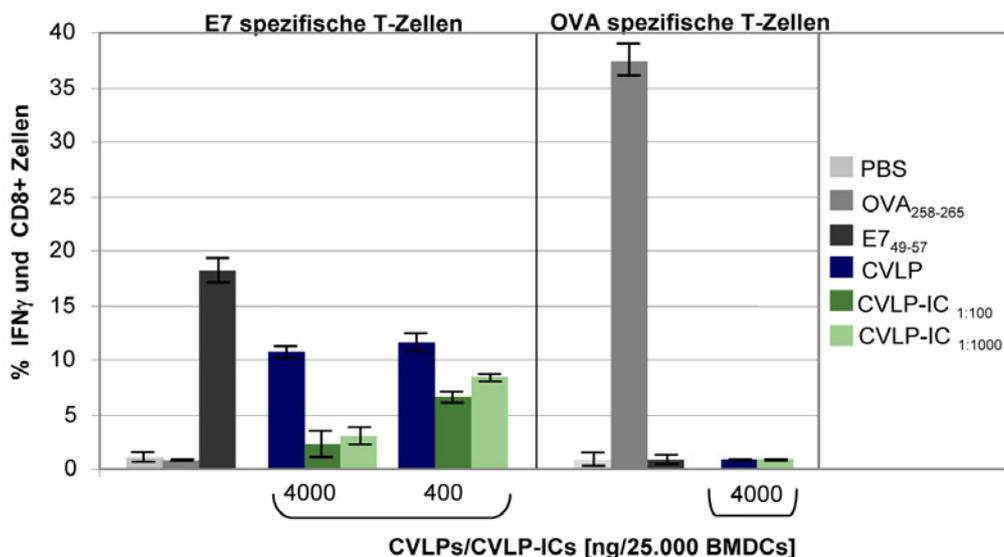


Abbildung 29a: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs und CVLP-Immunkomplexen

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs ausplattiert. Die Zellen wurden mit 4000 ng oder 400 ng HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ CVLPs oder CVLPs komplexiert mit dem polyklonalen Mausserum MS B (1:100 oder 1:1000 verdünnt) beladen. Als Kontrollen wurden BMDCs mit 100 μl PBS und mit 100 nM E7₄₉₋₅₇ Peptid bzw. OVA₂₅₈₋₂₆₅ Peptid beladen. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer $\text{IFN}\gamma$ Färbung nachgewiesen. Dafür wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 E7-spezifische T-Zellen bzw. als Kontrolle OVA-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt $\text{IFN}\gamma$ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt.

Als Positivkontrolle fungierten DCs beladen mit E7₄₉₋₅₇ Peptid und RMA-E7 Zellen. Die Beladung der BMDCs mit CVLPs führte im ersten Experiment (siehe Abbildung 29a) zu einer Aktivierung der T-Zellen, wobei kein großer Unterschied zwischen den verwendeten Konzentrationen (4000 ng und 400 ng/25.000

BMDCs) bezüglich der Präsentationsstärke erkennbar war. Ganz anders bei der BMDCs Beladung mit CVLPs, die mit dem polyklonalen Mausserum MS B komplexiert worden waren, wobei das Serum 1:100 und 1:1000 eingesetzt worden war. Hier war bei der Reduktion der Beladungsmenge an CVLP-ICs ein Anstieg der Antigenpräsentation zu beobachten, auch wenn diese nicht die der CVLPs gleichkam (siehe Abbildung 29a). Waren die CVLPs mit weniger polyklonalem Serum komplexiert worden, so schien dies ebenfalls die Antigenpräsentation zu steigern. Diese Tatsache sollte in einem weiteren Experiment später noch näher untersucht werden (siehe Abbildung 29c). Um zu überprüfen, ob die gemessene $\text{IFN}\gamma$ Produktion der E7-spezifischen T-Zellen tatsächlich auf deren Spezifität beruht, wurden BMDCs auch mit dem Ovalbumin (OVA)-Peptid AS 258-265 beladen, bzw. die Präsentation von CVLP und CVLP-IC-beladenen BMDCs mittels OVA-spezifischen T-Zellen getestet. Es zeigte sich, dass die Aktivierung tatsächlich spezifisch war, da E7-spezifische T-Zellen nur von BMDCs aktiviert werden konnten, die das E7 und nicht das OVA-Epitop über MHC Klasse I Moleküle präsentierten. Auf der anderen Seite wurden OVA-spezifische T-Zellen nicht durch die Präsentation des E7 Epitops aktiviert.

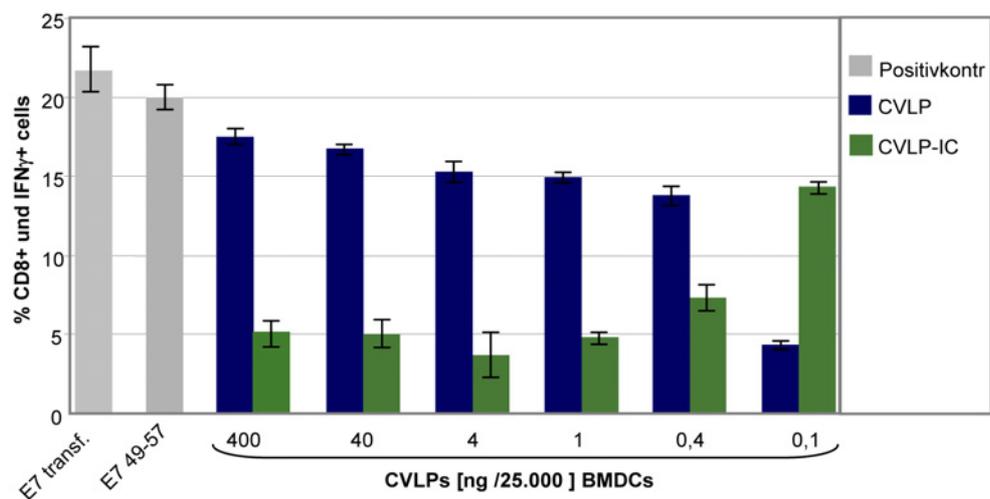


Abbildung 29b: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs und CVLP-Immunkomplexen
 Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs ausplattiert. Die Zellen wurden mit 0,1-400 ng HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs und CVLPs komplexiert mit dem polyklonalen Serum MS B (1:1000) beladen. Als Kontrollen wurden BMDCs mit PBS und mit E7₄₉₋₅₇ Peptid beladen. Zusätzlich wurden RMA-E7 Zellen als Positivkontrolle verwendet. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer $\text{IFN}\gamma$ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 E7-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt $\text{IFN}\gamma$ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Der Wert der PBS beladenen BMDCs (Hintergrund) wurde subtrahiert.

Im zweiten Experiment (siehe Abbildung 29b) wurden die Immunkomplexe so hergestellt, dass pro HPV16L1ΔCE7₄₉₋₅₇ CVLP Molekül ca. 180 IgG2a Antikörper Moleküle (MM4 (16L1 VIII 1.3.5.15)) vorhanden waren. CVLPs wie auch die Antikörper wurden für jeden Ansatz einzeln verdünnt und dann zusammen inkubiert. Was sich im ersten Experiment (siehe Abbildung 29a) schon andeutete, konnte hier bestätigt werden: Während die Präsentationsfähigkeit von CVLP-beladenen BMDCs mit sinkender CVLP-

Konzentration abnahm, stieg diese von CVLP-IC-beladenen BMDCs mit fallender Immunkomplex-Konzentration. So wurde die Aktivierung der T-Zellen durch BMDCs, die mit 0,1 ng CVLP beladen worden waren, durch die Komplexierung mit Antikörpern um einen Faktor von ca. 2,5 erhöht. Dies war ein Wert, der nur mit der vierfachen Menge an CVLPs erreicht werden konnte. Als Positivkontrolle fungierten DCs beladen mit E7₄₉₋₅₇-Peptid und RMA-E7 Zellen.

Nicht nur die Komplexierung der CVLPs mit Antikörpern selbst, sondern auch das molare Verhältnis von CVLP zu IgG2a Antikörper Molekülen war ausschlaggebend für eine Präsentationssteigerung der BMDCs, wenn diese mit niedriger Antigenkonzentration beladen wurden (siehe Abbildung 29c).

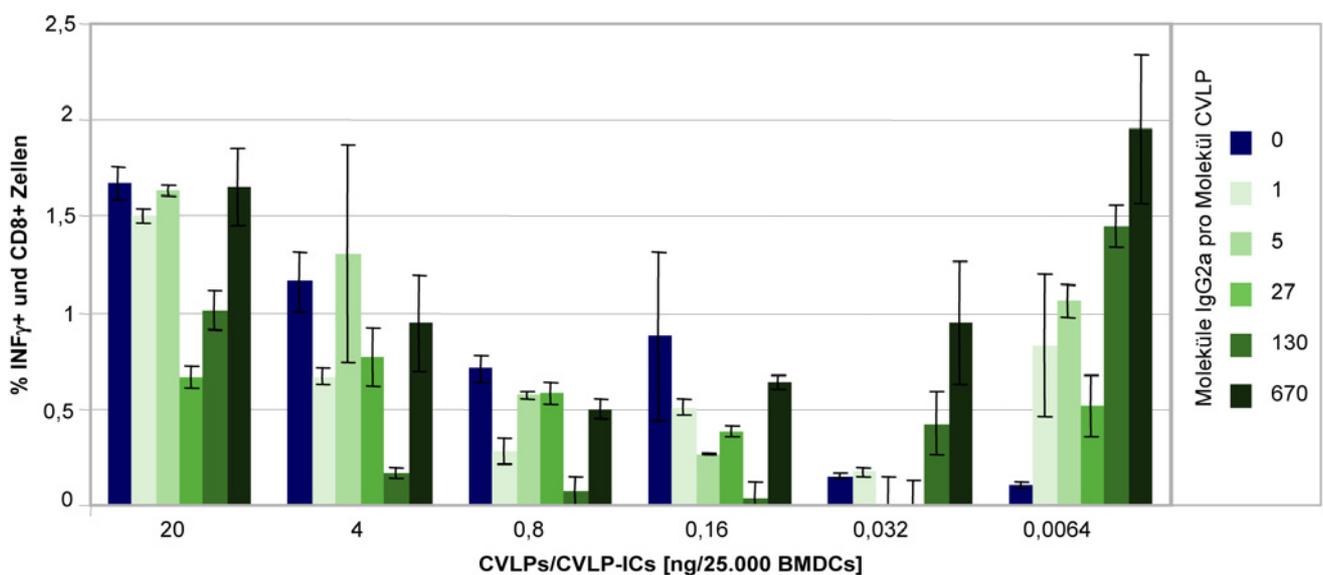


Abbildung 29c: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLP-Immunkomplexen

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs ausplattiert. Die Zellen wurden mit 0,0064-20 ng HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs und CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) mit unterschiedlichen CVLP:IgG2a Verhältnissen beladen. Als Kontrollen wurden zu den BMDCs mit 100 μ l PBS pipettiert. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Der Wert der PBS beladenen BMDCs (Hintergrund) wurde subtrahiert.

steigender Antikörperzahl pro CVLP zunahm. So konnte zum Beispiel die Antigenpräsentation versechsfacht bzw. verdoppelt werden, wenn DCs mit 0,0032 ng bzw. 0,0064 ng CVLPs pro 25.000 BMDCs beladen wurden, welche in einem molaren Verhältnis von 1:670 (CVLP:IgG2a) komplexiert worden waren, und nicht in einem äquimolaren Verhältnis. In diesem Experiment konnte durch die Beladung mit 0,0064 ng CVLP-ICs, entspricht vier Molekülen CVLPs pro Zelle (CVLP:IgG2a = 1:670) eine ebenso starke Aktivierung von L1-spezifischen T-Zellen erzielt werden, wie sie mit der ca. 3000-fachen Menge an unkomplexiertem Antigen (20 ng siehe Abbildung 29c) erreicht wurde.

Die dargestellten Experimente wurden mit CVLPs durchgeführt, die mit einem monoklonalen IgG2a Antikörper komplexiert waren. Da IgG1 Antikörper ebenfalls die Fähigkeit besitzen, hervorragend mit ihrem

Fc-Teil an FcγRs zu binden, wurde die Präsentation von BMDCs, welche mit CVLP-IgG2a-Komplexen oder CVLP-IgG1-Komplexen beladen worden waren, miteinander verglichen (siehe auch Abbildung 32b). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Präsentationsfähigkeit von CVLP-IC-beladenen BMDCs trotz der verschiedenen Antikörper Subtypen festgestellt werden.

Generell wurde die beste Antigenpräsentation mit CVLPs (0,1-0,8 µg/25.000 BMDCs (1,2-10 µg/µl)) erreicht, wenn die BMDCs nach 48 Stunden mit Sorbitol behandelt wurden, gefolgt von der Kombinations-Beladung mit CpG ODNs vier Stunden nach CVLP-Beladung (siehe Abbildung 28c). Die weitere Auswertung der Antigenpräsentation fiel komplexer aus, weshalb folgende Quantifizierung durchgeführt wurde: um die Ergebnisse der MHC Klasse I Antigenpräsentations-Ergebnisse zusammenzufassen, wurden alle Daten der BMDCs, welche mit CVLPs, CVLP-ICs und CVLPs in Kombination mit CpG ODNs bzw. mit Sorbitol beladen worden waren, in vier konzentrationsabhängige Gruppen gesplittet: (a) 0,006-1 ng/25.000 BMDCs (0,075-12,5 ng/µl), (b) 1,1-10 ng/25.000 BMDCs (13,75-125 ng/µl), (c) 10,1-100 ng/25.000 BMDCs (126,25-1250 ng/µl) und (d) ab 100,1 ng/25.000 BMDCs (ab 1251,25 ng/µl). In jeder Gruppe wurde für jedes Antigen der Mittelwert der IFNγ und CD8 doppelt positiven Zellen aller Experimente (gezeigte und nicht gezeigte) ermittelt. Der Mittelwert der Antigenpräsentation von BMDCs, die mit CVLPs beladen worden waren, wurde als Referenzwert 1 herangezogen und alle Mittelwerte wurden als Steigerungsfaktor bezüglich dieses Wertes angegeben (siehe Abbildung 30 und Tabelle 10).

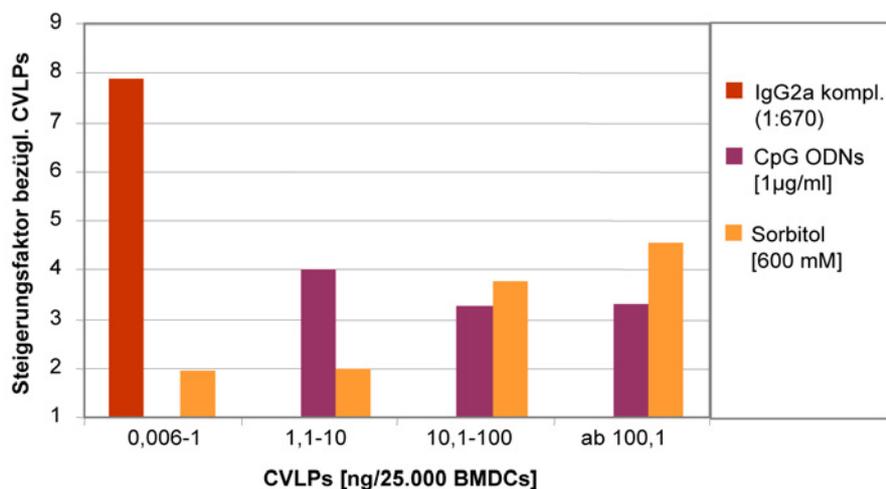


Abbildung 30: Zusammenfassung der MHC Klasse I Antigenpräsentations-Ergebnisse

Die Antigenpräsentations-Daten der BMDCs, welche mit CVLPs, CVLP-ICs und CVLPs in Kombination mit CpG ODNs bzw. mit Sorbitol beladen worden waren, wurden in vier konzentrationsabhängige Gruppen gesplittet: (a) 0,006-1 ng/25.000 BMDCs (0,075-12,5 ng/µl), (b) 1,1-10 ng/25.000 BMDCs (13,75-125 ng/µl), (c) 10,1-100 ng/25.000 BMDCs (126,25-1250 ng/µl) und (d) ab 100,1 ng/25.000 BMDCs (ab 1251,25 ng/µl). In jeder Gruppe wurde für jedes Antigen der Mittelwert der Antigenpräsentation (% IFNγ+ und CD8+ Zellen) aller Experimente (gezeigte und nicht gezeigte) ermittelt. Der Mittelwert der Antigenpräsentation von BMDCs, die mit CVLPs beladen worden waren, wurde als Referenzwert 1 herangezogen und alle Mittelwerte wurden als Steigerungsfaktor bezüglich dieses Wertes angegeben.

Dabei zeigte sich, dass die Antigen-Behandlung innerhalb der Konzentrations-Gruppen bezüglich ihres Steigerungsfaktors sehr unterschiedlich ausfielen: Bei sehr geringer Antigenkonzentration (0,006-1 ng/25.000 BMDCs (0,075-12,5 ng/μl)) konnte nur durch eine Sorbitol-Behandlung oder IgG2a-Komplexierung der CVLPs eine Steigerung der Antigenpräsentation erreicht werden. Dabei wurde durch die Verwendung von CVLP-ICs der größte Steigerungsfaktor (ca. 8) überhaupt erzielt. Ganz anders bei der nächst höheren Konzentrations-Gruppe (1,1-10 ng/25.000 BMDCs (13,75-125 ng/μl)): CpG ODNs, die bei geringerer CVLP-Konzentration die Antigenpräsentation nicht positiv beeinflussen konnten, führten hier zu dem besten Antigenpräsentations-Ergebnis (Steigerungsfaktor vier) Die Komplexierung der CVLPs führte ab dieser CVLP-Konzentration zu einer schlechteren Antigenpräsentation. Auch hier konnte eine Sorbitol-Behandlung die Antigenpräsentation steigern, allerdings nur um Faktor zwei. Ab 10,1 ng/25.000 BMDCs (126,25 ng/μl) wurde das beste Antigenpräsentations-Ergebnis von CVLPs-beladenen BMDCs erzielt, die nach 48 Stunden mit Sorbitol behandelt (Faktor 4,6) oder vier Stunden nach CVLPs-Beladung mit CpG ODNs beladen (Faktor 3,3) worden waren.

Tabelle 10: Zusammenfassung der MHC Klasse I Antigenpräsentations-Ergebnisse

CVLPs [ng/ 25.000 BMDCs] (ng/μl)	Beladung		Steigerungs- faktor
0,006-1 (0,075-12,5)	CVLP-IC		7,9
	CVLP Sorbitol n. 18h		1,9
	CVLP + CpG n.4h		0
	CVLP		1
1,1-10 (13,75-125)	CVLP + CpG n.4h		4
	CVLP Sorbitol n. 18h		2
	CVLP		1
	CVLP-IC		0,8
ab 10,1 (ab 126,23)	CVLP Sorbitol n. 18h		4,6
	CVLP + CpG n.4h		3,3
	CVLP		1
	CVLP-IC		0,3

Die Antigenpräsentations-Daten der BMDCs, welche mit CVLPs, CVLP-ICs und CVLPs in Kombination mit CpG ODNs bzw. mit Sorbitol beladen worden waren, wurden in drei konzentrationsabhängige Gruppen gesplittet: (a) 0,006-1 ng/25.000 BMDCs (0,075-12,5 ng/μl), (b) 1,1-10 ng/25.000 BMDCs (13,75-125 ng/μl) und (c) 10,1-100 ng/25.000 BMDCs (126,25-1250 ng/μl) In jeder Gruppe wurde für jedes Antigen der Mittelwert der Antigenpräsentation (% IFN γ + und CD8+ Zellen) aller Experimente (gezeigte und nicht gezeigte) ermittelt. Der Mittelwert der Antigenpräsentation von BMDCs, die mit CVLPs beladen worden waren, wurde als Referenzwert 1 herangezogen und alle Mittelwerte wurden als Steigerungsfaktor bezüglich dieses Wertes angegeben. CVLP-ICs: CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670); C₆H₁₄O₆: Sorbitol; CpG: CpG ODNs.

6.3 MHC Klasse I Präsentationsweg von CVLPs und CVLP-ICs in BMDCs

Der ‚klassische‘ MHC Klasse I Antigen-Präsentationsweg ist von der Funktion des TAP und des Golgi-Komplexes abhängig. Um zu untersuchen, ob CVLPs und CVLP-ICs in BMDCs in diesen ‚klassischen‘ Antigen-Präsentationsweg eingeschleust werden, sollte dieser zunächst durch die Verwendung von BMDCs, welche von TAP^{-/-} Mäusen stammten, näher analysiert werden. Dabei war interessant zu sehen, ob die unterschiedlichen Antigenpräsentations-Stärken von BMDCs, welche mit CVLPs oder deren Immunkomplexen beladen worden waren, womöglich einem differenten Antigenpräsentationsweg in den BMDCs zugrunde liegen. Die Verwendung von TAP^{-/-} BMDCs zeigte, dass trotz des nicht vorhandenen TAP die Epitope beider Antigenformationen, HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs alleine oder komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:180), von DCs über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden konnten. Dies wurde ebenfalls mittels intrazelluläre IFN γ Färbung L1-spezifischer T-Zellen überprüft (siehe Abbildung 31). Es konnte sogar eine leichte Verbesserung der Antigenpräsentation von TAP^{-/-} BMDCs verglichen mit Wildtyp BMDCs festgestellt werden.

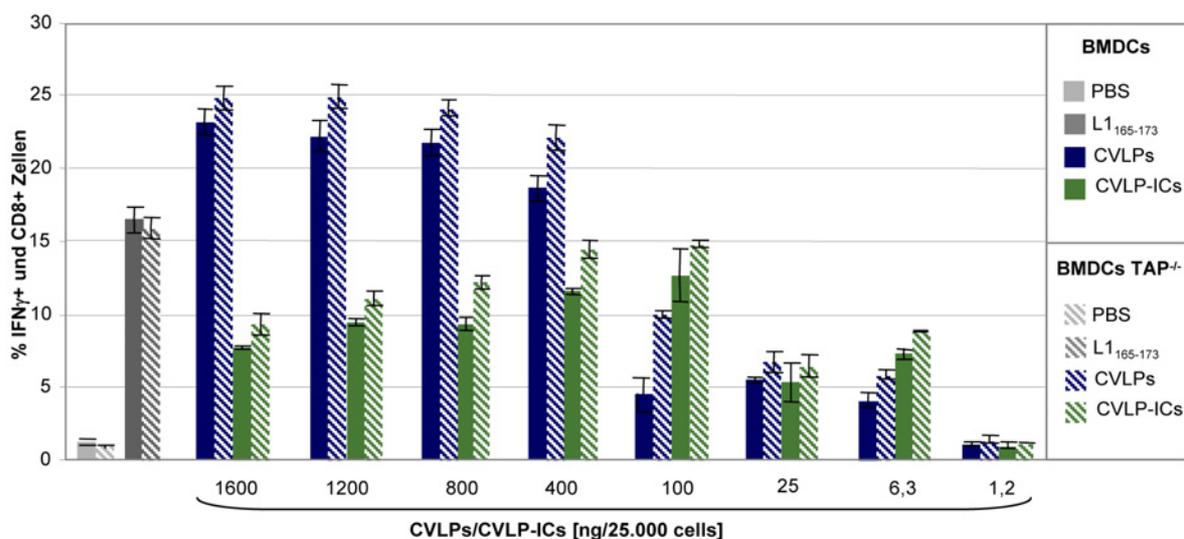


Abbildung 31: Untersuchungen des MHC Klasse I Präsentationsweges von CVLPs und CVLP-ICs in TAP^{-/-} BMDCs

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs bzw. BMDCs TAP^{-/-} ausplattiert. Die Zellen wurden mit 1,2-1600 ng HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs und CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:180) beladen. Als Kontrollen wurden BMDCs mit 100 μ l PBS behandelt. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt.

Um weiter zu überprüfen, ob die Präsentation von CVLPs wie auch CVLP-Immunkomplexen nicht nur TAP- sondern auch vom Golgi-Apparat-unabhängig verläuft, wurden die BMDCs vor der Beladung mit BFA inkubiert und danach mit CVLPs oder CVLP-ICs beladen (C.7.1). Zunächst wurde eine BFA Titration durchgeführt, die zeigen sollte, dass die im Versuch verwendete BFA-Konzentrationen die Anzahl der MHC Klasse I Moleküle, welche sich zum Behandlungszeitpunkt schon an der Oberfläche befanden, nicht

beeinflusst. Hierzu wurden RMA-E7 Zellen und BMDCs, welche mit E7₄₉₋₅₇ Peptid beladen worden waren, mit unterschiedlichen BFA-Konzentrationen behandelt und ihre Präsentationsfähigkeit über MHC Klasse I Moleküle mittels intrazellulärer IFN γ Färbung E7-spezifischer T-Zellen überprüft (siehe Abbildung 32). Während Peptid-beladene BMDCs selbst bei steigender BFA-Konzentration die E7-spezifischen T-Zellen etwa gleichbleibend stark aktivieren konnten, so nahm die Präsentationsfähigkeit der RMA-E7-Zellen mit wachsender BFA-Konzentration ab.

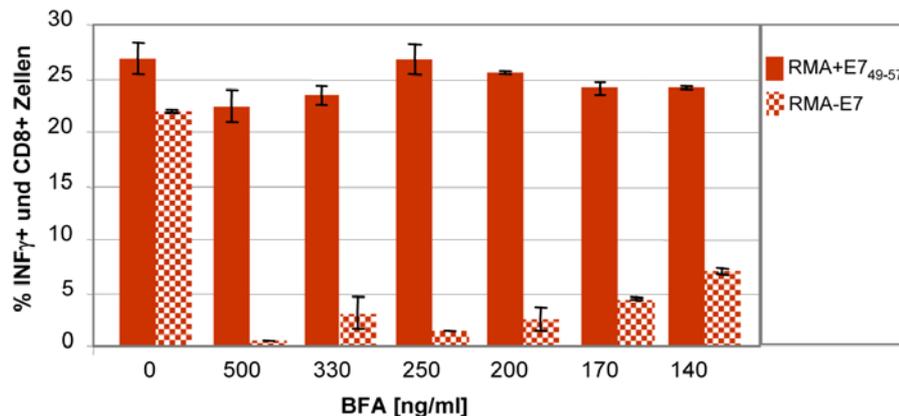


Abbildung 32a: Brefeldin A Titration an RMA-E7 Zellen

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 RMA-E7 und E7₄₉₋₅₇ Peptid beladenen RMA Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden mit BFA (1:200 bis 1:700 verdünnt) behandelt oder blieben als Kontrolle unbehandelt. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 E7-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Die unspezifische Aktivierung (durch PBS beladenen RMA-Zellen) wurde von den Werten subtrahiert.

Anhand dieses Ergebnis wurde entschieden, BMDCs im Folgeversuch zunächst mit 140 ng/ml BFA zu inkubieren und sie dann mit CVLPs bzw. CVLP-ICs zu beladen. Die Zerstörung des Golgi-Apparats hatte zur Folge, dass eine deutliche Reduktion der Antigenpräsentation bei BMDCs, die mit CVLPs oder CVLP-ICs, beladen worden waren, eintrat (siehe Abbildung 32b). Die BFA-Sensitivität war sowohl für HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ als auch für HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ Partikel vorhanden (siehe Abbildung 32b und c) und die Antigenkonzentration hatte keinen Einfluss auf eine Veränderung der Präsentation bei BMDCs, welche mit BFA behandelt worden waren. Die BFA-Sensitivität des Präsentationswegs veränderte sich auch nicht durch die Verwendung von IgG1 anstelle von IgG2a Antikörpern zur Komplexierung der CVLPs (siehe Abbildung 32c). Durch dieses Experiment konnte auch gezeigt werden, dass die Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle einen intrazellulären Weg nimmt und nicht dadurch stattfindet, dass extrazelluläre Proteasen die CVLPs prozessieren und diese dann außerhalb der Zelle durch Peptidaustausch auf MHC Klasse I Moleküle geladen werden.

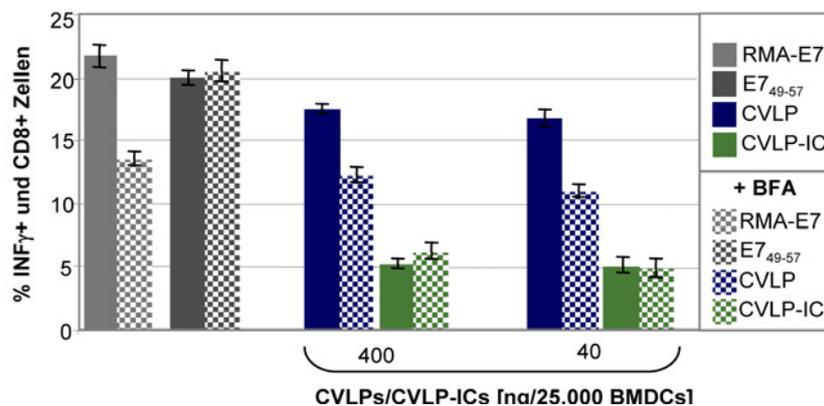


Abbildung 32b: Untersuchungen des MHC Klasse I Präsentationsweges von CVLPs und CVLP-ICs in BMDCs unter der Verwendung von BFA

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs bzw. als Kontrollen RMA-E7 und E7₄₉₋₅₇ Peptid beladenen RMA Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden mit BFA (1:700 verdünnt) behandelt oder blieben als Kontrolle BFA-unbehandelt. BMDCs wurden mit 400 ng bzw. 40 ng HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ CVLPs und CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:180) beladen. Als Negativkontrolle wurden BMDCs mit PBS behandelt. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 E7-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Die unspezifische Aktivierung (durch PBS beladenen BMDCs) wurde von den Werten subtrahiert.

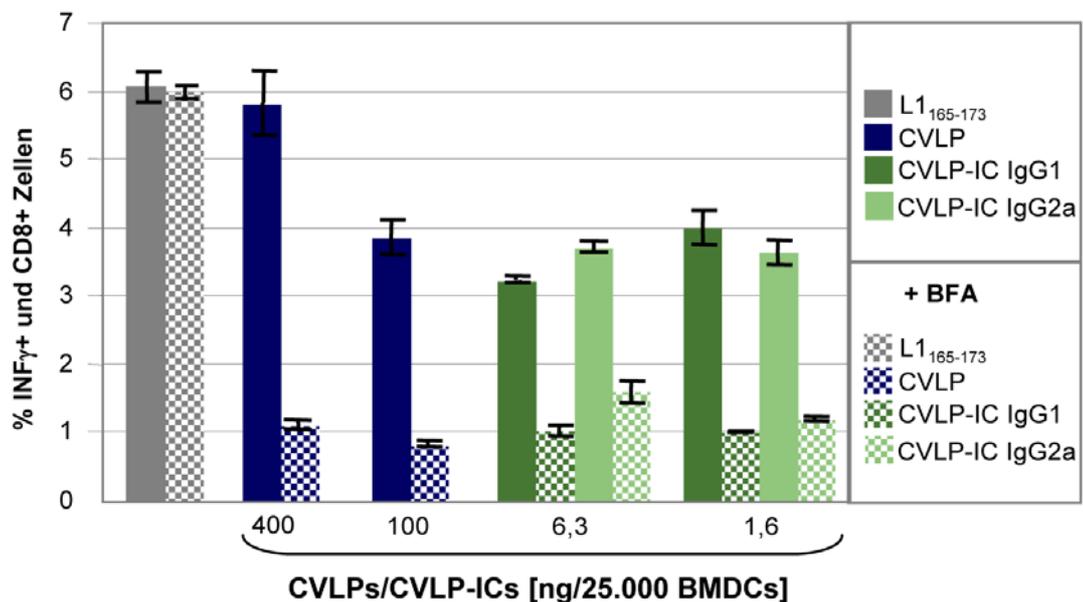


Abbildung 32c: Untersuchungen des MHC Klasse I Präsentationsweges von CVLPs und CVLP-ICs in BMDCs unter der Verwendung von BFA

Pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte wurden 25.000 BMDCs bzw. als Kontrollen L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladenen RMA Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden mit BFA (1:700 verdünnt) behandelt oder blieben als Kontrolle BFA-unbehandelt. BMDCs wurden mit 1,6-400 ng HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs und CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:180) bzw. 16L1 1.4.7.22 (MM7) (CVLP:IgG1 = 180) beladen. Als Negativkontrolle wurden BMDCs mit PBS behandelt. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Der Wert der PBS beladenen BMDCs (Hintergrund) wurde subtrahiert.

BMDCs, die in vitro mit exogenen CVLPs beladen worden waren, konnten diese konzentrationsabhängig über MHC Klasse I an L1- und E7-spezifische ZTLs präsentieren. Diese Präsentation konnte durch die Zugabe von CpG ODNs gesteigert werden, wenn das Adjuvans vier Stunden nach der CVLP-Beladung verabreicht wurde. Eine noch größere Präsentations-Steigerung wurde durch die Sorbitol-Behandlung von CVLP-beladenen BMDCs erzielt.

Während die Präsentationsfähigkeit von BMDCs, welche mit einer sinkenden Konzentration an CVLPs beladen worden waren, abnahm, so stieg sie bei einer sinkenden Konzentration an CVLP-Immunkomplexen. Dabei spielte das CVLP:IgG2a Verhältnis eine entscheidende Rolle.

Sowohl der Präsentationsweg von CVLPs als auch der von CVLP-ICs in den BMDCs war nicht TAP-abhängig, jedoch Brefeldin A-sensitiv.

7. In vitro Priming: Generierung zytotoxischer T-Zellen durch CVLP-beladene BMDCs

Naïve CD8⁺ T-Zellen können sich dann zu spezifischen ZTLs entwickeln und proliferieren, wenn sie *Signal 1* und *Signal 2* (und *Signal 3* (Blankenstein and Schuler, 2002)) durch die Interaktion mit APCs erhalten (siehe Abbildung 4) (Matzinger, 1994). Dabei entsteht das *Signal 1* für die T-Zelle, wenn ihr T-Zellrezeptor mit dem Antigenpeptid-beladenen MHC Klasse I Molekül auf der APC interagiert und *Signal 2*, sobald darauf eine Interaktion zwischen CD28 und den Kostimulatorischen Molekülen CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) folgt, welche auf reifen DCs exprimiert sind. Die Ausschüttung von Zytokinen, die möglicherweise für ein Priming unverzichtbar ist, stellt *Signal 3* dar (Blankenstein and Schuler, 2002). Bleibt *Signal 2* trotz der erfolgreichen TZR-Interaktion aus, so hat dies keine Aktivierung und Proliferation der T-Zelle zur Folge, sondern deren programmierten Zelltod. Damit *Signal 2* stattfinden kann, müssen DCs die Kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7.1) oder CD86 (B7.2) exprimieren.

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, ob ein *in vitro Priming* naiver T-Zellen durch BMDCs ausgelöst werden kann, welche mit HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs alleine, in Kombination mit CpG ODNs oder LPS bzw. CVLP komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) beladen worden waren (die Daten des *in vitro Primings* durch CVLP-beladene BMDCs, die mit Sorbitol behandelt worden waren, lagen zu diesem Zeitpunkt noch nicht vor). Hierzu wurden unreife BMDCs generiert und jeweils mit den verschiedenen Antigenen beladen, 18 Stunden danach wurden die beladenen BMDCs zusammen mit einer Milzzell-Suspension einer naiven Maus kokultiviert (C.8.1). Nach sieben Tagen wurden die Milzzellen mit frischen Antigen-beladenen BMDCs für eine weitere Woche kokultiviert. Dann wurde die L1-Spezifität der

T-Zellen mittels IFN γ -EliSpot ermittelt und quantifiziert (C.9.3). Hierbei wurden die Milzzellen entweder nicht beladen, unspezifisch mit Pokeweed Mitogen (PM) bzw. spezifisch mit dem L₁₆₅₋₁₇₃ Peptid stimuliert. Die IFN γ positiven Milzzellen wurden als Prozentsatz der IFN γ ausschüttenden Milzzellen angegeben, die unspezifisch stimuliert worden waren. Ohne CpG ODNs konnte nur mit der höchsten Konzentration an CVLPs eine Generierung spezifischer T-Zellen erreicht werden. Völlig gegensätzlich zeigte sich hier das *Priming* durch BMDCs, die mit CVLP-ICs beladen worden waren. Nur bei der geringsten Konzentration (25 ng/25.000 BMDCs) konnten L1-spezifische T-Zellen unter den untersuchten Milzzellen ausgemacht werden. Ein sehr gutes *in vitro Priming* konnte mit BMDCs erzielt werden, welche mit CVLPs und CpG ODNs (0,1 μ g/ml) beladen worden waren (siehe Abbildung 33). Die CpG ODNs waren ca. vier Stunden nach Zugabe von CVLPs zu den Zellen pipettiert worden. Dabei war das Optimum mit 800 ng CVLPs pro 25.000 BMDCs erreicht. Die Verwendung von sowohl mehr als auch weniger CVLPs führte zu einem immer noch sehr guten, aber schwächeren *in vitro Priming*. Die Kontrollansätze, in denen es bei PBS-Behandlung zu keiner und bei der L₁₆₅₋₁₇₃ Peptid-Beladung nur in Kombination mit CpG ODNs als Adjuvans zu einer Generierung L1-spezifischer T-Zellen kam, zeigten, dass das *in vitro Priming* tatsächlich auf der Beladung mit CVLPs beruhte.

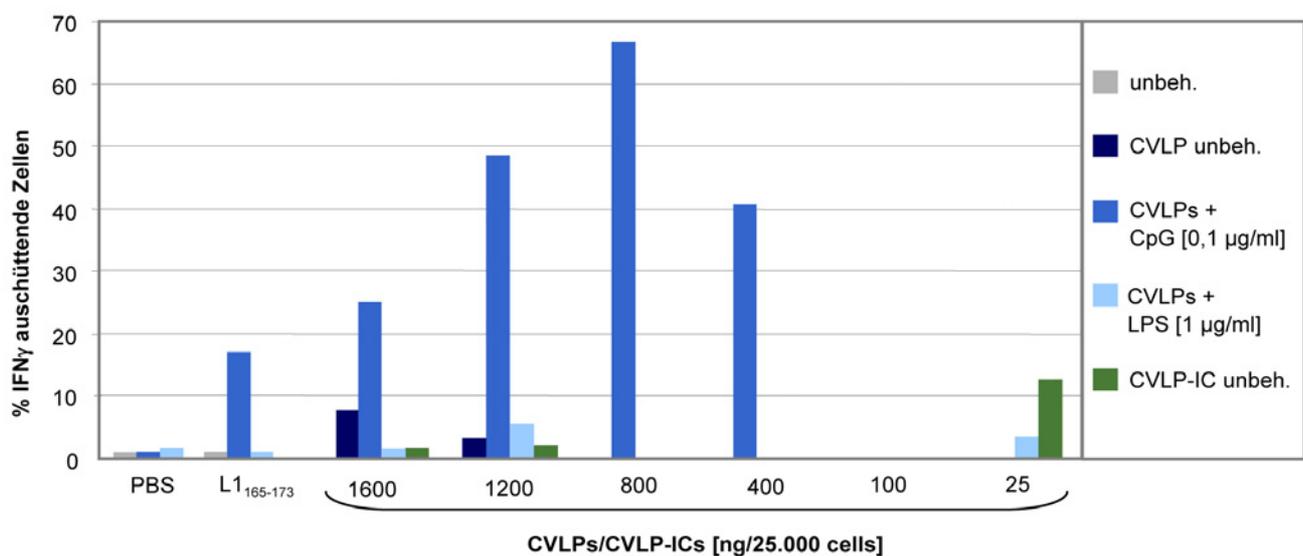
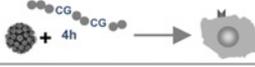


Abbildung 33: *In vitro Priming*: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch CVLP-beladene BMDCs

Die BMDCs wurden in Duplikaten mit 25-1600 ng HPV16L1 Δ CE71-55 CVLPs, CVLPs in Kombination mit 0,1 μ g/ml CpG ODN (vier Stunden nach CVLP-Beladung) bzw. 1 μ g/ml LPS oder CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) beladen. Als Positivkontrolle wurden BMDCs mit 100 nM L₁₆₅₋₁₇₃ Peptid alleine bzw. in Kombination mit CpG ODNs bzw. LPS, als Negativkontrolle mit PBS alleine bzw. in Kombination mit CpG ODNs bzw. LPS beladen. Nach ca. 18 h wurden pro Loch ca. 1×10^5 Milzzellen, die zuvor aus einer naiven C57BL/6 Maus aufgearbeitet worden waren, hinzupipettiert. Nach sieben Tagen Inkubation wurden die Zellen der Duplikate vereint und erneut als Duplikate auf eine vorbereitete 96-Loch Rundbodenplatte, in der wie zuvor BMDCs mit Antigen und/oder Adjuvans als Duplikate beladen worden waren (s.o.), ausplattiert (*Boosting*). Nach weiteren sieben Tagen Inkubation wurden die Zellen der Duplikate abermals vereint und mittels IFN γ -EliSpot wurden die L1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen unter den Milzzellen quantifiziert. Die Punkte der spezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen (Reaktion auf L₁₆₅₋₁₇₃ Peptid) wurden als Prozentsatz der unspezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen (Reaktion auf Pokeweed Mitogen) angegeben. Von beiden Werten wurde der RMA-S Wert (Hintergrund) subtrahiert.

Das Ergebnis des *in vitro Primings* L1 spezifischer ZTLs durch BMDCs, die mit CVLPs, CVLP-ICs oder CVLPs in Kombination mit CpG ODNs bzw. LPS beladen worden waren wurden ebenfalls in einer Tabelle zusammengefasst (siehe Tabelle 11). Dabei wurde der Prozentsatz an IFN γ ausschüttenden Zellen durch die Beladung von 1600 ng CVLP/25.000 BMDCs (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) als Referenzwert 1 herangezogen. Alle weiteren Prozentsätze wurden als Steigerungsfaktor bezüglich des Referenzwertes angegeben. Durch die Beladung der BMDCs mit 800 ng/25.000 BMDCs (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) zusammen mit CpG ODNs (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) konnte eine Steigerung der ZTL Antwort um einen Faktor neun erreicht werden, dies wurde gefolgt von der ZTL Antwort durch BMDCs, die mit 1200 ng/25.000 BMDCs (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) bzw. 400 ng/25.000 BMDCs (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) bzw. 1600 ng/25.000 BMDCs (20 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) und CpG ODNs (0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) beladen worden waren (Faktor 6,5 bzw. 5,5 bzw. 4,3). Das *in vitro Priming* konnte auch durch BMDCs, welche mit L1 Peptid und CpG ODNs beladen worden waren, gesteigert werden (Faktor 2,3). Und selbst nur 25 ng/25.000 BMDCs (0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) CVLPs, die mit IgG2a Antikörpern komplexiert waren (CVLP-ICs), konnten das *in vitro Priming* um Faktor 1,7 steigern.

Tabelle 11: Zusammenfassung der *in vitro Priming*-Ergebnisse

Beladung	CVLPs [ng/ 25.000 BMDCs] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)		Steigerungsfaktor
CVLP + CPG n.4h	800 (10)		9
CVLP + CPG n.4h	1200 (15)		6,5
CVLP + CPG n.4h	400 (5)		5,5
CVLP + CPG n.4h	1600 (20)		4,3
L1 Peptid+ CpG	0		2,3
CVLP-IC	25 (0,3)		1,7

Das durch die Beladung von BMDCs mit 1600 ng/25.000 BMDCs erreichte *in vitro Priming* (% IFN γ ausschüttenden Zellen) wurde als Referenzwert 1 herangezogen. Alle weiteren Prozentsätze wurden als Steigerungsfaktor bezüglich des Referenzwertes angegeben.

Durch die Beladung von BMDCs mit hohen Konzentrationen an CVLPs konnte *in vitro* ein Priming naïver T-Zellen ausgelöst werden. Durch die Kobeladung von BMDCs mit CVLPs und CPG ODNs konnte die *in vitro* Generierung von zytotoxischen T-Zellen gesteigert werden. Dies wurde auch bei der Kobeladung mit CpG ODNs und geringeren CVLP-Mengen erreicht. Ausschließlich geringe Konzentrationen an CVLP-Immunkomplexe, die auf BMDCs geladen worden waren, konnten ein *in vitro* Priming auslösen.

8. *In vivo Priming*: Generierung zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLPs und CVLP-beladenen BMDCs

In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die bekannte Immunogenität von HPV16L1 Δ CE7₁₋₆₀ oder HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs in C57BL/6 Mäusen durch die in dieser Arbeit *in vitro* getesteten Substanzen bzw. Antigenformen verbessert werden kann. Dabei war interessant zu sehen, ob die durch die *in vitro* Systeme erhaltenen Daten mit denen des Maus-Systems vergleichbar sind.

Zum Nachweis einer T-Zell Antwort *in vivo* wurden die Milzen der immunisierten Mäuse aufgearbeitet und bezüglich Antigen-spezifischer ZTLs untersucht. Hierzu wurden verschiedene Methoden verwendet, die sich nicht nur in ihrer Durchführung, sondern auch in ihrer Aussage unterscheiden. Durch die MHC-I-E7₄₉₋₅₇-Tetramere (C.9.1) konnte lediglich die E7-Spezifität des T-Zell-Rezeptors ermittelt werden, nicht aber die Funktionalität, d.h. die zytotoxische Eigenschaft der T-Zellen. Letztere war nur durch einen Zytotoxizitätstest (Cr^{51} -release assay) (C.9.4) zu ermitteln, welcher aber erst nach mehrmaligem Restimulieren der T-Zellen durchgeführt werden konnte. Er war deshalb nicht geeignet für die Ermittlung sogenannter ‚*ex vivo* Daten‘, d.h. Daten, die sofort nach der Milzentnahme und nicht nach *in vitro* Stimulation erhalten werden sollten. Andere Funktionalitätsnachweise, die sich aber nur auf die nach der TZR-Interaktion folgenden Aktivierung der T-Zelle beziehen, sind die Analysen der IFN γ Produktion (C.9.2) bzw. der IFN γ -Ausschüttung der T-Zellen (C.9.3). Dies kann mittels intrazellulärer IFN γ Färbung der T-Zellen (siehe Abbildung 34) bzw. im IFN γ -EliSpot (siehe Abbildung 34b) nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich diese beiden Methoden als Nachweis für ein erfolgreichen *in vivo Priming* verwendet. Da die Ergebnisse der MHC-I-E7₄₉₋₅₇-Tetramer Färbung wie auch des Zytotoxizitätstests weitgehend mit denen der intrazellulären IFN γ Färbung und des IFN γ -EliSpots übereinstimmten (siehe auch (Michel et al., 2002)), wurden davon nur exemplarisch einige Experimente zum Nachweis spezifischer ZTLs durch Tetramere bzw. Zytotoxizitätstest (Cr^{51} -release assay) gezeigt.

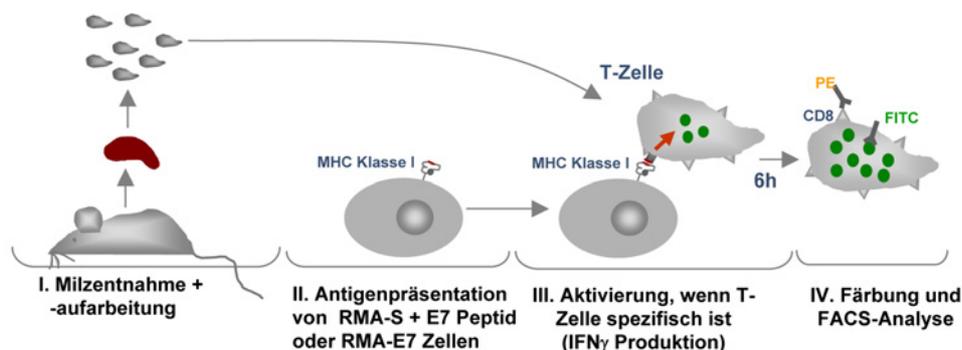


Abbildung 34a: Intrazelluläre IFN γ Färbung

I. Die Milzen immunisierter Mäuse werden entnommen und aufgearbeitet. II. Antigen-präsentierende Zellen werden als Zielzellen vorbereitet (entweder RMA-S Zellen, die mit Antigenpeptid beladen werden oder Antigen-Transfektanten (RMA-E7 Zellen)). III. Milzzellen und Zielzellen werden zusammen inkubiert. Sind die T-Zell-Rezeptoren der T-Zellen spezifisch, werden die T-Zellen aktiviert und produzieren IFN γ , dessen Ausschüttung durch die Zugabe von Monensin verhindert wird. Dadurch sammelt sich das produzierte IFN γ intrazellulär an. IV. Die T-Zellen werden fixiert, permeabilisiert und mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper spezifisch für IFN γ und CD8 angefärbt. Es folgt eine Analyse mittels Durchflusszytometrie. IFN γ : Interferon γ

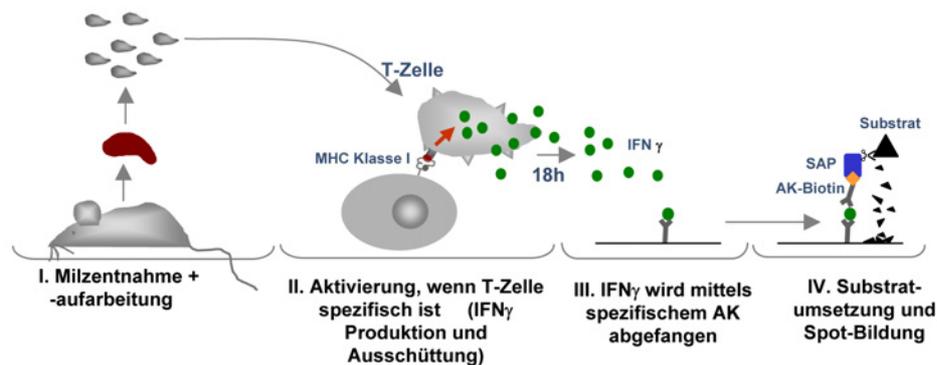


Abbildung 34b: IFN γ EliSpot

I. Die Milzen immunisierter Mäuse werden entnommen und aufgearbeitet. II. Die aufgearbeiteten Milzzellen werden mit Antigenpeptid beladen. Die Antigen-präsentierende Zellen unter den Milzzellen können dadurch das Antigen den T-Zellen präsentieren. Sind deren T-Zell Rezeptoren spezifisch, werden sie dadurch zur IFN γ Produktion angeregt. Zusätzlich werden weitere T-Zellen unspezifisch durch ein Lektin zur IFN γ Produktion angeregt (Positivkontrolle, nicht gezeigt) III. Das ausgeschüttete IFN γ wird von spezifischen Antikörpern, mit denen die Löcher einer speziellen 96-Loch Platte beschichtet wurden, abgefangen. IV. Ein IFN γ -spezifischer Antikörper, gekoppelt an Biotin, detektiert IFN γ . Streptavidin-alkaline Phosphatase bindet an Biotin und setzt das Substrat um, welches ausfällt und kleine Punkte (Spots) auf dem Plattenboden bildet. Diese Punkte werden im EliSpot-Reader ausgewertet. IFN γ : Interferon γ ; AK: Antikörper; AK-Biotin: anti-IFN γ Antikörper, gekoppelt an Biotin; SAP: Streptavidin-alkaline Phosphatase

8.1 Die Herstellung der MHC-I-Tetramere

Die MHC-I- E7₄₉₋₅₇-Tetramere, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, wurden in Zusammenarbeit von Nico Michel unter der Anleitung von Frau M. Toebes im Rahmen einer Kooperation in Dr. Ton N. M. Schuhmachers Labor im Netherland Cancer Institute, Amsterdam, Niederlande hergestellt (C.9.1.1).

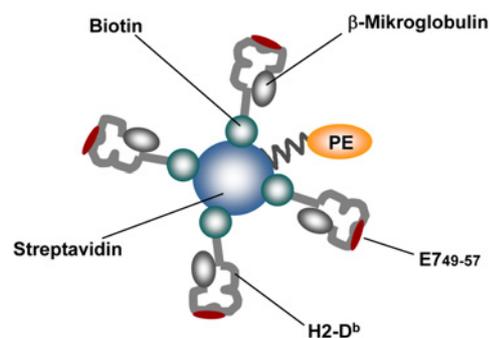


Abbildung 35: MHC-I-E7₄₉₋₅₇-Tetramere

Vier biotinylierte MHC-I-E7₄₉₋₅₇-Monomere bestehend aus H-2D β -Schwerer Kette, an die Biotin gebunden ist, β -2-Mikroglobulin Leichter Kette und Antigen-Peptid HPV-16 E7₄₉₋₅₇ binden an Streptavidin, welches mit PE gekoppelt ist. PE: Phycoerythrin

MHC-I Tetramere (siehe Abbildung 35) bestehen aus vier Antigen-Peptid (E7₄₉₋₅₇) beladenen MHC Klasse I Molekülen, welche über ihre Biotinylierung an Streptavidin, das mit dem fluoreszierenden Farbstoffs Phycoerythrin (PE) gekoppelt ist, binden. Nach der Formung der Monomere durch das Antigen-Peptid HPV-16 E7₄₉₋₅₇ und der bakteriell exprimierten H-2D β -Schweren Kette und β -2-Mikroglobulin Leichten Kette folgte nach mehreren Aufreinigungs- und Konzentrationsschritten die Biotinylierung und Konzentrierung der

Monomere. Konzentrationsabschätzung Anhand eines BSA-Standards (Molekulargewicht von BSA \approx Molekulargewicht der biotinylierten Monomere) wurde die Konzentration der biotinylierten Monomere abgeschätzt. Dazu wurde zunächst 1 μg BSA auf die HPLC-Säule aufgetragen (Daten nicht gezeigt). Die Fläche, welche durch unter dem BSA-Gipfel betrug 600.000 (berechnet durch ‚Millenium-Software‘). In einem zweiten HPLC-Lauf wurden nun 2 μl biotinylierte Monomere aufgetragen, deren Gipffläche 2.162.533 betrug. Daraus resultierte eine Konzentration der biotinylierten Monomere von 1,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (siehe Abbildung 36a).

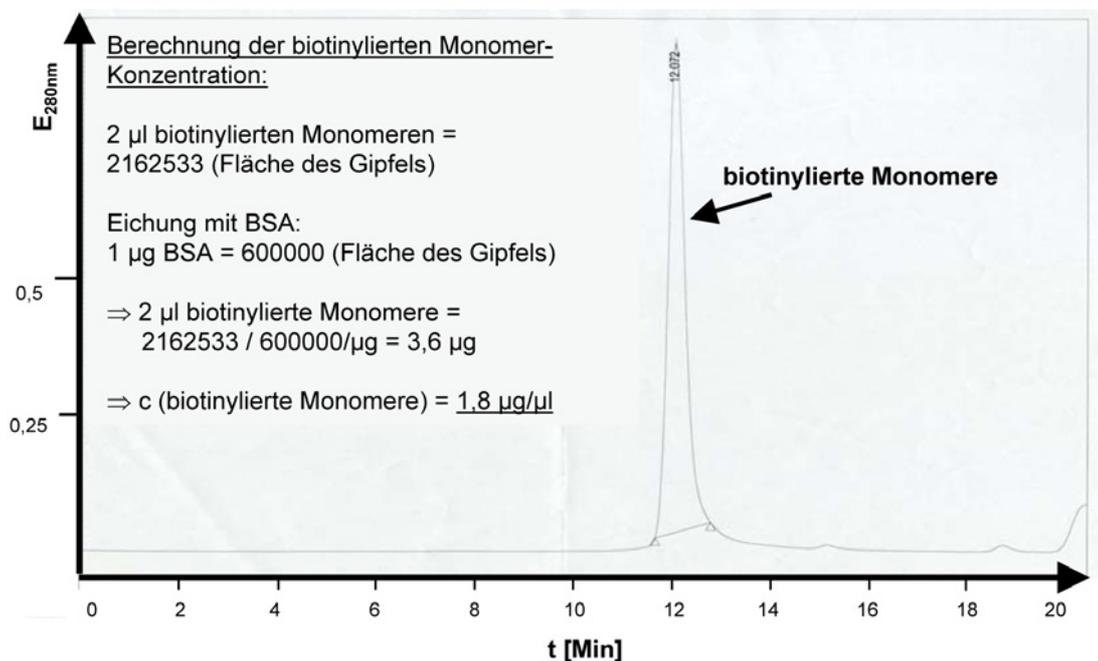


Abbildung 36a: HPLC Elutionsprofil der biotinylierten Monomere

MHC-I-E7₄₉₋₅₇-Monomere wurden durch die Inkubation von 10 μM H-2D^b-Schwere Kette, 10 μM β -2-Mikroglobulin Leichte Kette und 80 μM Antigen-Peptid HPV-16 E7₄₉₋₅₇ hergestellt. Nach deren Dialyse, Aufreinigung und Konzentrierung wurden die Monomere biotinyliert. Es folgte eine weitere Aufreinigung und Konzentrierung. Zur Konzentrationsbestimmung der biotinylierten MHC-I-E7₄₉₋₅₇-Monomere wurden 2 μl in 100 μl Lauf-Puffer auf die kleine HPLC-Säule aufgetragen (Druck 300-400 PSI, maximale Durchflussrate 0,75 ml/Min, 100% Lauf-Puffer, Abs. 280 nm). Eine BSA-Standardmessung war vorrausgegangen, bei der 1 μg BSA eine Gipfel-Fläche von 600.000 ergab.

Ebenfalls mittels analytischer HPLC wurde das optimale Verhältnis zwischen biotinylierten MHC-I-E7₄₉₋₅₇-Monomeren und Streptavidin-PE getestet, um eine effiziente Tetramerherstellung zu gewährleisten (C.9.1.1.12). Hierzu wurden 2 μl biotinylierte Monomere zusammen mit sowohl 2 μl als auch 5 μl Streptavidin-PE über Nacht inkubiert. Anschließend wurde deren Elutionsprofil untersucht (siehe Abbildung 36b). Um die entstandene Gipfel besser definieren zu können wurde ebenfalls ein Elutionsprofil von 2 μl biotinylierten Monomere alleine und 5 μl Streptavidin-PE alleine erstellt. Dabei zeigte sich, dass die biotinylierten Monomere wie zuvor nach 12 Min. einen großen Gipfel bildeten. Streptavidin-PE eluierte nach 10,5 Min., während Streptavidin alleine, also ohne den Farbstoff PE, etwa bei 12,2 Min. unmittelbar nach dem Monomer-Gipfel zu finden war. Bei der Inkubation von 2 μl biotinylierte Monomere (biotin.

Monomere) zusammen mit sowohl 2 μl Streptavidin-PE zeigte sich, dass verhältnismäßig viele ungebundene Monomere vorhanden waren. Der Gipfel der Monomere erreichte hier nahezu den Wert von Monomeren, die nicht mit Streptavidin-PE inkubiert worden waren. Die MHC-I-E₇₄₉₋₅₇-Tetramerbildung fiel hier sehr schwach aus. Ein ganz anderes Profil zeigte sich, als 2 μl biotinylierte Monomere (biotin. Monomere) inkubiert mit 5 μl Streptavidin-PE aufgetragen wurden. Hier war der Monomer-Gipfel deutlich reduziert und es hatten sich sowohl Tetramere, an die PE gekoppelt war (ca. bei 9 Min), als auch PE-entkoppelte Tetramere (ca. bei 9,5 Min) gebildet. Ebenso waren multivalente Tetramere (ca. bei 8,5 Min.) entstanden. Anhand dieses Profils wurde folgendes μl -Verhältnis zur optimalen Herstellung von MHC-I-E₇₄₉₋₅₇-Tetrameren festgelegt: Monomere:Streptavidin-PE = 1:2,5. Nach diesem analytischen HPLC-Lauf konnten die Tetramere auch präparativ hergestellt werden und für die MHC-I-Tetramerfärbung verwendet werden.

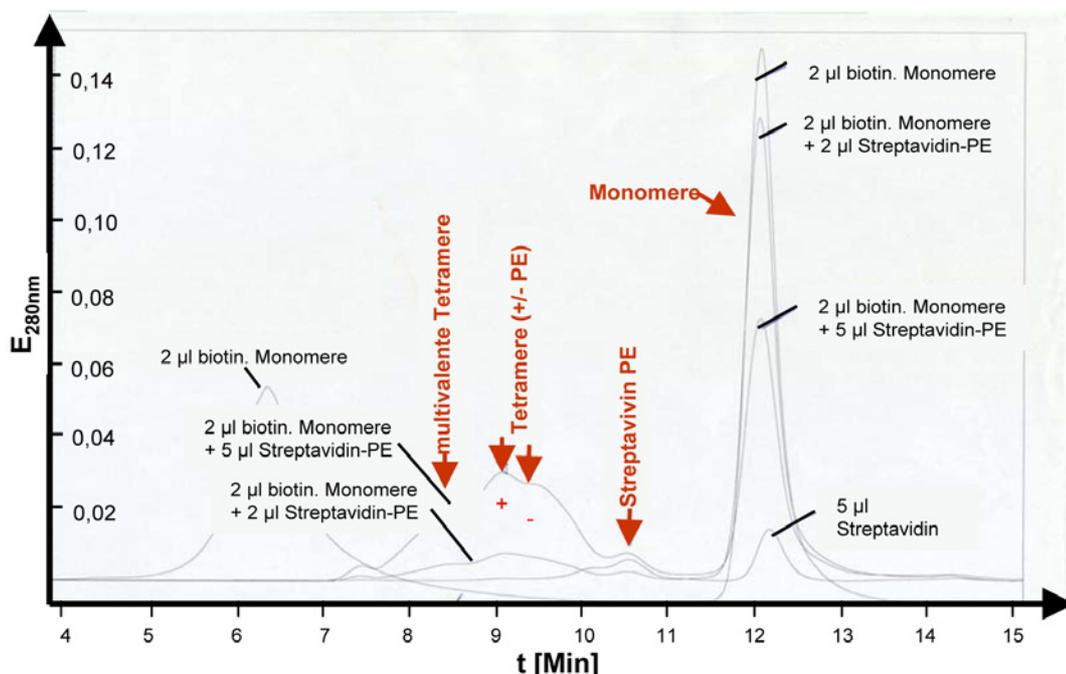


Abbildung 36b: HPLC Elutionsprofil der MHC-I-Tetramere-PE

Die Bedingung für eine effiziente Tetramerherstellung aus den biotinylierten Monomeren war ein optimales Verhältnis zwischen biotinylierten MHC-I-E₇₄₉₋₅₇-Monomeren und Streptavidin-PE. Dies wurde mittels analytischer HPLC getestet (Druck 300-400 PSI, maximale Durchflussrate 0,75 ml/Min, 100% Lauf-Puffer, Abs. 280 nm). Dabei wurde das HPLC-Profil von 2 μl biotinylierter Monomere (biotin. Monomere) + 2 μl Streptavidin-PE bzw. 2 μl biotinylierter Monomere + 5 μl Streptavidin-PE untersucht und mit dem Elutionsprofil von 2 μl biotinylierter Monomere alleine und 5 μl Streptavidin-PE alleine verglichen.

8.2 Immunisierungen

Zum Nachweis der T-Zell Antwort *in vivo* wurden den C57BL/6 Mäusen zum einen die Antigene (CVLPs, CVLP-ICs, CVLP in Kombination mit CpG oder Sorbitol) direkt injiziert und zum anderen wurden syngene BMDCs *ex vivo* mit den Antigenen beladen bzw. behandelt und dann den Tieren verabreicht. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die Milzzellen der C57BL/6 Mäuse auf die Existenz von zytotoxische E7- bzw. L1-spezifische T-Zellen untersucht.

8.3 Experiment I

Im ersten Experiment (siehe Abbildung 37) wurden pro Gruppe drei C57BL/6 Mäuse mit je 5 µg HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs bzw. CVLP-ICs bzw. mit 3x10⁵ BMDCs immunisiert, die mit 5 µg HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs bzw. CVLP-ICs beladen worden waren. Die Milzzellen der Mäuse wurden zwei Woche nach der Injektion auf ihre E7-Spezifität mittels MHC-I-Tetramer Färbung (C.9.1) und intrazellulärer IFN γ Färbung (C.9.2) überprüft. Für die Komplexierung der CVLPs wurde das polyklonale Mausserum MS B (siehe Tabelle 7) verwendet (1:1000). Die CD8⁺ wurden am Tag der Milzentnahme mittels intrazellulärer IFN γ Färbung bezüglich ihrer Zytokinproduktion nach Inkubation mit RMA-E7 Zellen bzw. mit E7₄₉₋₅₇ Peptid beladenen RMA-Zellen untersucht.

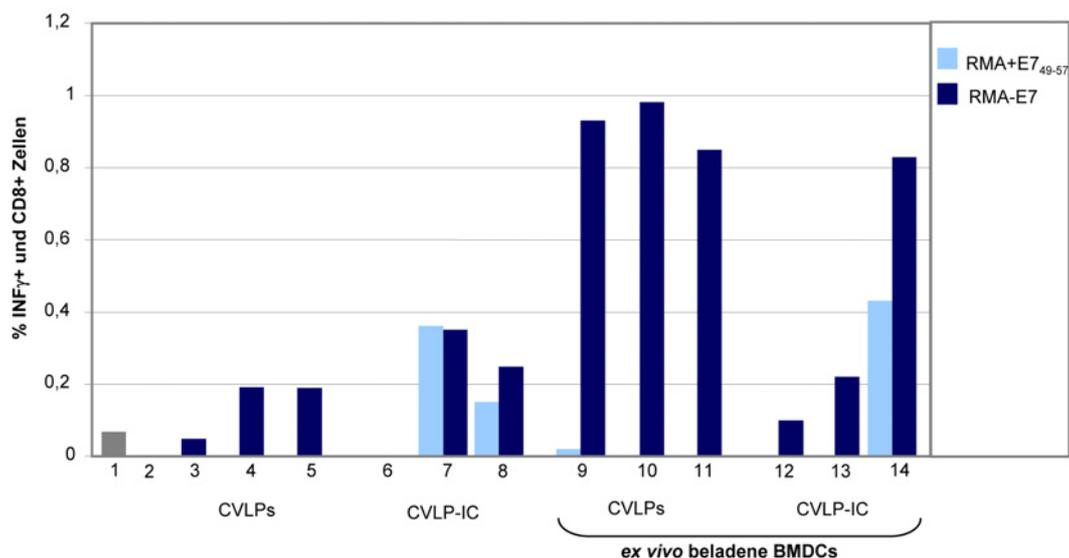


Abbildung 37a: *In vivo* Priming: Generierung E7-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs

Je drei C57BL/6 Mäuse wurden mit 5 µg HPV16L1ΔE7₁₋₆₀ CVLPs, CVLPs komplexiert mit dem Mausserum MS B (1:1000 verdünnt) bzw. mit 3x10⁵ BMDCs immunisiert, die *ex vivo* 18 h zuvor mit 5 µg HPV16L1ΔE7₁₋₆₀ CVLPs, CVLPs komplexiert mit dem Mausserum MS B (1:1000 verdünnt) beladen worden waren. Als Negativkontrolle wurden zwei Mäuse mit PBS behandelt. Nach 14 Tagen wurden die E7-spezifischen zytotoxischen T-Zellen unter den Milzzellen mittels intrazellulärer IFN γ Färbung quantifiziert. Dabei wurde die Aktivierung der Milzzellen durch RMA-S, RMA-E7 bzw. RMA-S Zellen, die mit E7₄₉₋₅₇ Peptid beladen worden waren (RMA-S+E7₄₉₋₅₇), überprüft. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Von den RMA-E7 bzw. RMA-S+E7₄₉₋₅₇ Werten wurde der RMA-S Wert (Hintergrund) subtrahiert und ist deshalb nicht dargestellt.

Generell war der Anteil an CD8 und IFN γ positiven Zellen, der durch die intrazelluläre IFN γ Färbung der E7-spezifischen T-Zellen ermittelt wurde, nicht sehr hoch (maximal ca. 1 % (siehe Abbildung 37a), im Vergleich zu anderen Experimenten bis zu 40 % (Daten nicht gezeigt)). Diese offensichtlich sehr schwache ZTL Antwort auf die Immunisierung mit CVLPs konnte enorm gesteigert werden, wenn die CVLPs zuvor *ex vivo* auf BMDCs geladen worden waren (fünffacher Anstieg IFN γ positiver Zellen). Die Immunisierung mit CVLP-ICs brachte keine Steigerung gegenüber unkomplexierten CVLPs. Die *ex vivo* Beladung der BMDCs mit CVLP-ICs resultierte in sehr unterschiedlichen Immunantworten bei den drei Mäusen (0,2-0,8 %). Auffällig war, dass IFN γ in den meisten Fällen nur nach *in vitro* Aktivierung mit RMA-E7 Zellen produziert wurde und dass nur die T-Zellen von solchen Mäusen, die mit CVLP-ICs behandelt worden waren, auf E7₄₉₋₅₇ Peptid beladene RMA-Zellen ansprachen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch die Immunisierung mit CVLP-ICs ZTLs mit einer stärkeren Avidität induziert wurden. Mittels MHC-I-Tetramer Färbung konnten T-Zellen mit einem E7-spezifischen TZR quantifiziert werden. Für dieses Ergebnis sind beispielhaft zwei Diagramme gezeigt (siehe Abbildung 37b) Der dabei ermittelte höchste Anteil an Tetramer-PE und CD8⁺ Zellen lag bei ca. 6,4 % (B. Maus #10). Dies entsprach in der intrazellulären IFN γ Färbung etwa 1 % positiver Zellen. Demnach war die MHC-I-Tetramer Färbung sensitiver, was nicht nur anhand dieses einen Beispiels gefolgert wurde, sondern auch in weiteren Analysen bestätigt werden konnte, die in Zusammenarbeit mit N. Michel, P. Öhlschläger, W. Osen und H. Guthöhrlein durchgeführt wurden (Michel et al., 2002).

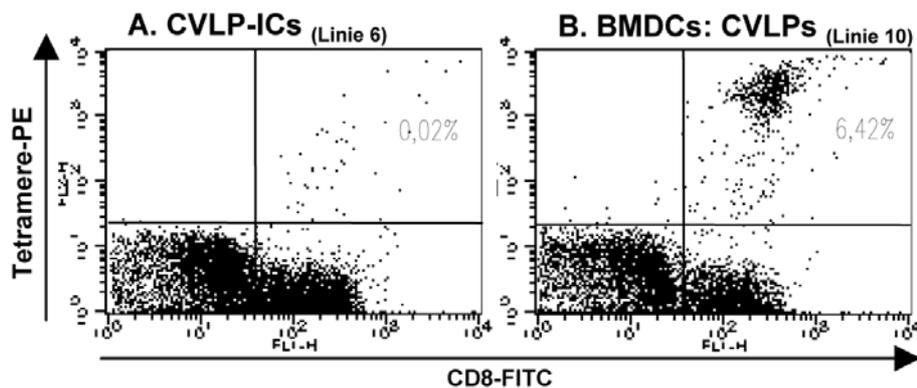


Abbildung 37b: *In vivo* Priming: Generierung E7-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs (MHC-I-Tetramer Färbung)

1 x 10⁶ Milzzellen einer immunisierten Maus wurden pro Loch einer 96-Loch Rundbodenplatte ausgesät. Die Zellen wurden mit FITC anti-Maus CD8a (Ly-2) und PE-gekoppelten MHC-I Tetrameren (H2-D^b mit Peptid Epitop HPV 16 E7₄₉₋₅₇) angefärbt. Es folgte eine Inkubation von 15 Min bei 4° C. Durch die Zugabe von 7-AAD, wurden nur lebende Zellen in die Auswertung einbezogen. Mittels Durchflusszytometrie-Messung wurde der prozentuale Anteil von MHC-I Tetramer-PE und CD8-FITC doppelt positiven Zellen unter den CD8-FITC positiven Zellen bestimmt. Gezeigt sind die Daten einer Maus, die mit CVLP-ICs (Linie 6) direkt und einer Maus, die mit BMDCs (Linie10) immunisiert wurde, welche *ex vivo* mit CVLPs beladen worden waren.

8.4 Experiment II

Es sollte die ZTL Antwort auf die Immunisierung mit HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs mit und ohne CpG ODNs getestet werden. Dafür wurden pro Gruppe vier C57BL/6 Mäuse immunisiert. Auch hier wurden BMDCs injiziert, welche *ex vivo* mit den Antigenen beladen worden waren. Hierbei wurden die CVLPs und die CpG ODNs gleichzeitig zu den BMDCs pipettiert. Pro Maus wurden 2 μ g CVLPs bzw. CVLP-ICs (komplexiert mit IgG2a (CVLP:IgG2a = 1:700)) injiziert. Die BMDCs wurden *ex vivo* mit der gleichen Menge an Antigen pro Maus beladen. Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die T-Zellen direkt nach der Milzentnahme auf deren spezifische Zytokin-Ausschüttung mittels IFN γ -EliSpot untersucht (C.9.3) (siehe Abbildung 38a). Pro Gruppe reagierten zwei der vier Mäuse kaum oder gar nicht auf die Immunisierung (siehe hohe Standardabweichung). Die T-Zellantwort auf eine Injektion mit CVLPs war sehr schwach, kaum über die der PBS-Kontrolle, sie konnte jedoch signifikant gesteigert werden, wenn CVLPs zuvor *ex vivo* auf BMDCs geladen worden waren. CVLPs mit CpG ODNs direkt injiziert lösten ebenfalls ein starkes *Priming* in den immunisierten Mäusen aus, wohingegen deren *ex vivo* Beladung auf DCs zu keiner T-Zellantwort führte. Da hier die CVLPs gleichzeitig mit CpG ODNs auf BMDCs geladen worden waren, war dies ein weiterer Hinweis darauf, dass hier möglicherweise ein gemeinsamer Aufnahmeweg in den BMDCs vorliegt. Die Komplexierung der CVLPs führte in diesem Experiment zu einem guten *Priming* (ca. 25 % IFN γ positive Zellen), während CVLP-ICs, welche *ex vivo* auf BMDCs geladen worden waren, selbst in den zwei positiven Mäusen, nur zu einer sehr schwachen Immunantwort führten.

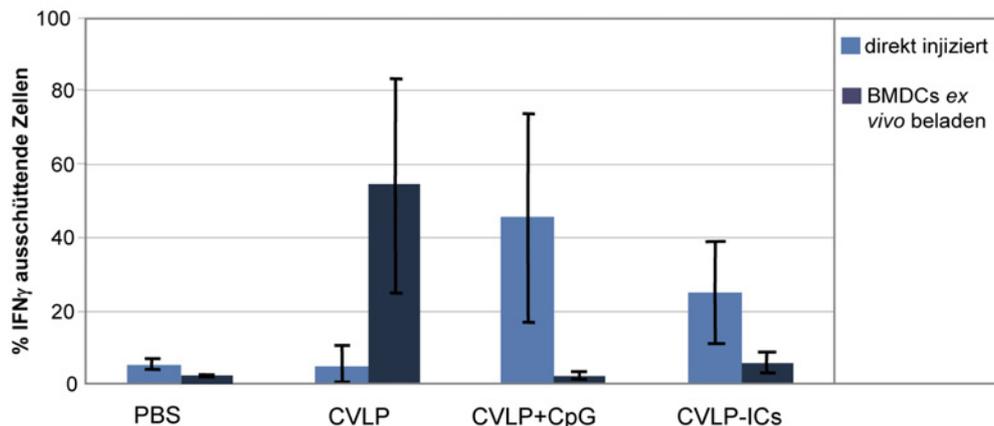


Abbildung 38a: *In vivo Priming*: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP- beladenen BMDCs (IFN γ -EliSpot)

Je vier C57BL/6 Mäuse wurden mit 2 μ g HPV16L1 Δ E7₁₋₅₅ CVLPs, CVLPs in Kombination mit CpG ODNs [1 μ g/ml] CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) IgG2a (CVLP:IgG2a = 1:700) bzw. mit 3x10⁵ BMDCs immunisiert, die *ex vivo* 18 h zuvor mit 2 μ g HPV16L1 Δ E7₁₋₅₅ CVLPs, CVLPs in Kombination mit CpG ODNs [1 μ g/ml] und CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:700) beladen worden waren. Als Negativkontrolle wurden zwei Mäuse mit PBS behandelt. Nach 14 Tagen wurden die L1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen unter den Milzzellen mittels IFN γ -EliSpot quantifiziert. Dabei wurden die Punkte einer seriellen Verdünnung addiert. Die Punkte der spezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen (Reaktion auf L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid) wurden als Prozentsatz der unspezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen (Reaktion auf Pokeweed Mitogen) angegeben. Von beiden Werten wurde der RMA-S Wert (Hintergrund) subtrahiert.

Die Milzzellen der einzelnen Mäuse wurden nach der dritten *in vitro* Stimulation (C.2.2) auch im Zytotoxizitätstest (Cr^{51} -*release assay*) überprüft (C.9.4). Die Ergebnisse dieses Tests stimmten mit den Ergebnissen des *ex vivo* EliSpots überein (Beispiele siehe Abbildung 38b), allerdings konnte mit dieser Analyse keine quantitative Aussage bezüglich der T-Zellantwort gemacht werden. So konnte zum Beispiel nur bestimmt werden, dass Maus 10 (immunisiert mit CVLPS und CpG ODNs) ZTLs im Gegensatz zu Maus 21 (immunisiert mit BMDCs *ex vivo* beladen mit CVLPS und CpG ODNs) entwickelt hatte, nicht aber, dass diese Immunantwort stärker war als die der Maus 19, der direkt CVLP-Immunkomplexe injiziert worden war. Was hier ebenfalls nur anhand von Beispielen gezeigt wurde, konnte in weiteren Analysen von Ergebnissen ermittelt durch IFN γ -EliSpot und Zytotoxizitätstest (Cr^{51} -*release assay*) in Zusammenarbeit mit N. Michel, P. Öhlschläger, W. Osen und H. Guthöhrlein gezeigt werden (Michel et al., 2002).

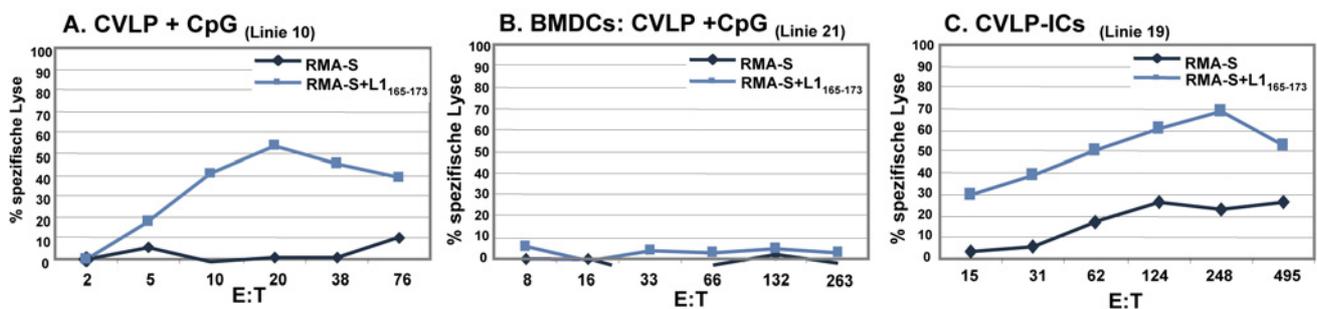


Abbildung 38b: In vivo Priming: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs (Zytotoxizitätstest (Cr^{51} -*release assay*))

Nach der dritten *in vitro* Stimulation der von den immunisierten Mäusen stammenden Milzzellen mit L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid wurden diese zusammen mit chromisierten Zielzellen (RMA-S Zellen) inkubiert, welche mit 100 nM L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladen worden waren. Dazu wurden die Milzzellen in einer seriellen Verdünnung in die Reihen C-H einer 96-Loch Rundbodenplatte ausplattiert (zwei Spalten pro Immunisierungsansatz). Zu jedem Loch wurden nun L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladenen bzw. unbeladene Zielzellen (RMA-S Zellen) pipettiert, die zuvor mit 100 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ inkubiert worden waren. Zu den Zielzellen in der Reihe A wurde nur T-Zell-Medium (Spontanlyse) und zu den Zielzellen der Reihe B 0,1 % Triton X-100 (Maximallyse) pipettiert. Nach einer vierstündigen Inkubation wurde die in den Überstand freigesetzte Radioaktivität gemessen. Die Spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

$[\text{CPM (Probe)} - \text{CPM (Spontanlyse)}] / [\text{CPM (Maximallyse)} - \text{CPM (Spontanlyse)}] \times 100 = \% \text{ spezifische Lyse}$. E: Effektorzellen (T-Zellen); T: Targetzellen (Zielzellen); E:T = Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen

8.5 Experiment III

In Experiment II wurde festgestellt, dass es zu keiner T-Zell Antwort kam, wenn Mäuse mit BMDCs immunisiert wurden, die *ex vivo* gleichzeitig mit CVLPs und CpG ODNs beladen worden waren, was auch mit den *in vitro* Antigenpräsentations-Daten übereinstimmte (siehe Abbildung 28). Daher sollten im folgenden Experiment BMDCs *ex vivo* zeitlich versetzt mit CVLPs und CpG ODNs beladen werden und anschließend in Mäuse injiziert werden. Gleichzeitig sollten CVLP-beladenen BMDCs injiziert werden, die mit Sorbitol behandelt worden waren. Und letztendlich sollte in diesem Experiment auch die T-Zellantwort auf eine Immunisierung mit BMDCs überprüft werden, die *ex vivo* mit einer sehr niedrigen Konzentration (1,2 ng pro Maus) an CVLP-ICs beladen wurden, da *in vitro* gezeigt werden konnte, dass dies zu einer sehr

guten Antigenpräsentation führte, wenn dabei auch auf das richtige CVLP:IgG2a Verhältnis geachtet wurde (1:670).

Daher umfasste das Experiment III die Immunisierung von je vier C57BL/6 Mäusen pro Gruppe mit CVLPs hochkonzentriert (HK = 9,6 µg pro Maus) und niedrigkonzentriert (NK = 1,2 ng pro Maus), CVLP-Immunkomplexen (CVLP:IgG2a = 1:670) ebenfalls hoch- und niedrigkonzentriert, CVLPs mit 0,1 µg/ml CpG ODNs (gleichzeitig bzw. vier Stunden später) und CVLPs mit Sorbitol [Endkonzentration 600 mM]. Ebenfalls vier C57BL/6 Mäuse pro Gruppe wurden mit BMDCs, welche 18 Stunden zuvor *ex vivo* mit der äquivalenten Menge an CVLPs bzw. deren CVLP-ICs (s.o.) beladen worden waren, immunisiert. Die BMDCs der Sorbitol Gruppe wurden mit CVLPs beladen und 18 Stunden später, kurz vor der Immunisierung, für eine halbe Stunde mit 600 mM Sorbitol inkubiert (C.7.1). Zwei Wochen nach der Immunisierung wurden die Milzen der Mäuse entnommen und die T-Zellen mittels IFN γ -EliSpot auf deren L1-Spezifität untersucht (C.9.3). Dabei wurde der Anteil spezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen gegenüber unspezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen ermittelt (siehe Abbildung 39).

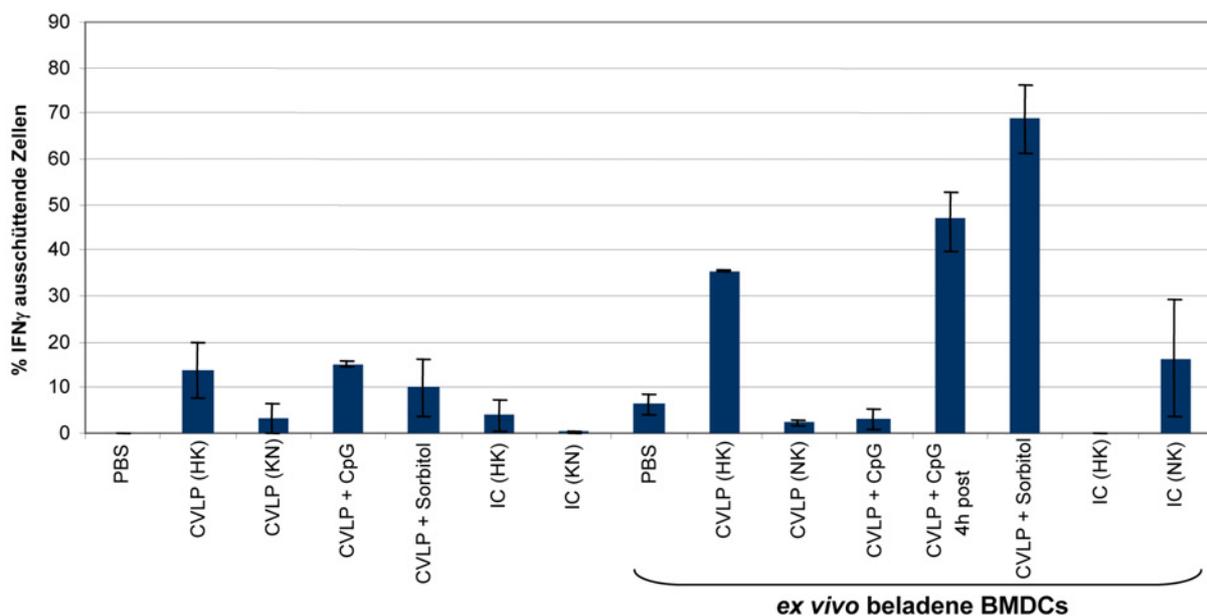


Abbildung 39: In vivo Priming: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs (IFN γ -EliSpot)

Je vier C57BL/6 Mäuse wurden mit 9,6 µg HPV16L1 Δ E7₁₋₅₅ CVLPs, 1,2 ng CVLPs, CVLPs in Kombination mit CpG ODNs [0,1 µg/ml], CVLPs in Kombination mit Sorbitol (Endkonzentration 600 mM), CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) bzw. mit $1,3 \times 10^5$ BMDCs immunisiert, die *ex vivo* 18 h zuvor mit 9,6 µg CVLPs, 1,2 ng CVLPs, CVLPs in Kombination mit CpG ODNs [0,1 µg/ml] (gleichzeitig bzw. CpG ODNs erst vier Stunden nach CVLPs), CVLPs in Kombination mit Sorbitol (Endkonzentration 600 mM), CVLPs komplexiert mit 16L1 VIII 1.3.5.15 (MM4) (CVLP:IgG2a = 1:670) beladen worden waren. Zudem wurde mit $1,3 \times 10^5$ BMDCs immunisiert, die mit 9,6 µg CVLPs beladen worden waren und 18 h später, kurz vor der Injektion mit 600 mM Sorbitol inkubiert wurden. Als Negativkontrolle wurden zwei Mäuse mit PBS behandelt. Nach 14 Tagen wurden die L1-spezifischen zytotoxischen T-Zellen unter den Milzzellen mittels IFN γ -EliSpot quantifiziert. Dabei wurden die Punkte einer seriellen Verdünnung addiert. Die Punkte der spezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen (Reaktion auf L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid) wurden als Prozentsatz der unspezifisch IFN γ ausschüttenden Zellen (Reaktion auf Pokeweed Mitogen) angegeben. Von beiden Werten wurde der RMA-S Wert (Hintergrund) subtrahiert.

Die Immunisierung mit direkt injizierten CVLPs in hoher Konzentration mit oder ohne CpG ODNs bzw. Sorbitol resultierte in einer vergleichbaren T-Zellantwort (10-16 % IFN γ positive Zellen). Die direkte Immunisierung mit der hohen Konzentration an CVLP-ICs hingegen zeigte in diesem Experiment eine ca. um die Hälfte schwächere Immunantwort. Die T-Zellantworten konnten auch hier enorm durch die *ex vivo* Beladung von BMDCs und deren folgenden Injektion gesteigert werden (bis zu siebenfach). Dabei wurde das beste Ergebnis erzielt, wenn die CVLPs beladenen BMDCs kurz vor der Injektion mit Sorbitol behandelt wurden. Dies konnte die T-Zellantwort gegenüber der von direkt injizierten CVLPs fünffach steigern. Mit CVLPs und CpG ODN *ex vivo* beladenen BMDCs konnte eine dreifache Steigerung gegenüber CVLPs ohne CpG ODNs erzielt werden (zweifach gegenüber *ex vivo* CVLP-beladenen BMDCs), aber nur, wenn die CpG ODNs vier Stunden nach der CVLP-Beladung dazugegeben wurden. Bei gleichzeitiger *ex vivo* Beladung von BMDCs mit CVLPs und CpG ODNs lag die T-Zellantwort unter der, der PBS-Kontrolle. Immunkomplexe konnten direkt injiziert nur mit einer hohen Konzentration ein T-Zellen *Priming* erreichen, wobei dieses aber schwächer war als das der ebenfalls hochkonzentrierten CVLPs. Erstaunlicherweise wurde zumindest in zwei von vier Mäusen eine sehr gute T-Zellantwort mit BMDCs ausgelöst, die *ex vivo* mit nur 1,2 ng CVLP-ICs beladen worden waren (siehe Legende Abbildung 39).

Die Ergebnisse der einzelnen Immunisierungs-Strategien der drei *in vivo* Experimente wurden in einer Tabelle zusammengefasst (siehe Tabelle 12). Dabei wurden die Immunisierungs-Strategien ihrem Erfolg nach, gemessen an generierten spezifischen ZTLs, aufgelistet (bezogen auf das Experiment 3). Als Referenzwert 1 wurde das Ergebnis der Immunisierung herangezogen, bei der CVLPs direkt in Mäuse injiziert wurden. Der Steigerungsfaktor bezüglich der Immunantwort lag bei fünf, wenn CVLPs nicht direkt in Mäuse injiziert wurden, sondern, wenn diese zunächst auf BMDCs *ex vivo* geladen wurden, die dann einer Sorbitol-Behandlung unterzogen wurden. Um ein Dreifaches konnte die Immunantwort gesteigert werden, wenn die *ex vivo* CVLP-beladenen BMDCs zusätzlich nach vier Stunden, und nicht gleichzeitig mit den CVLPs, mit CpG ODNs inkubiert wurden. Die *ex vivo* Beladung der CVLPs auf BMDCs konnte die Immunantwort um einen Faktor von 2,6 erhöhen. Wurden von vier Mäusen nur drei ausgewertet (eine Maus zeigte keine Reaktion auf die Immunisierung), so konnte eine Immunisierung mit BMDCs, welche *ex vivo* mit CVLP-IC (NK) beladen worden waren, die Immunantwort um knapp das Doppelte steigern. In diesem Versuch (Exp.3) resultierte eine direkte Injektion mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs oder Sorbitol keine Effizienz-Steigerung. Allerdings war das im Experiment 2 für die kombinierte Verabreichung von CVLPs mit CpG ODNs sehr wohl der Fall. Hier war die Immunisierung gegenüber der direkten Injektion von CVLPs zehn Mal so hoch. Die Injektion von hohen Konzentrationen an CVLP-ICs führte in den ersten beiden Experimenten zu einer Steigerung der Immunantwort gegenüber unkomplexierten CVLPs, nicht aber im dritten Experiment. Ebenso zeigte sich, dass in den beiden vorhergehenden Versuchen die *ex vivo* Beladung von BMDCs mit CVLP-ICs (HK) in einer Verbesserung Immunantwort resultierte. Die direkte Injektion von niedrigen Konzentrationen an CVLPs oder CVLP-ICs war nicht so effizient wie die direkte

Verabreichung von CVLPs in hoher Konzentration.

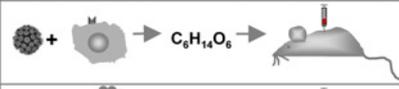
Immunisierung		Exp. 3	Exp. 2	Exp. 1
BMDCs: CVLP + Sorbitol		5	—	—
BMDCs: CVLP + CpG 4h post		3,3	—	—
BMDCs: CVLP (HK)		2,6	13,5	6,3
BMDCs: CVLP-IC (NK)		1,9 (1)	—	—
CVLP + CpG		1	10,5	—
CVLP (HK)		1	1	1
CVLP + Sorbitol		1	—	—
CVLP-IC (HK)		0,3	6,5	1,9
CVLP (NK)		0,2 ?	—	—
CVLP-IC (NK)		0	—	—
BMDCs: CVLP (NK)		0	—	—
BMDCs: CVLP + CpG		0	0,5	—
BMDCs: CVLP-IC (HK)		0	1,2	2

Tabelle 12: Zusammenfassung der *in vivo* Priming Ergebnisse

Die Immunisierungs-Strategien wurden ihrer Effizienz nach (ermittelt durch generierten spezifischen zytotoxischen T-Zellen) bezogen auf das Experiment 3 von oben nach unten aufgelistet. Die Effizienz der Immunisierung (Exp. 3) mit CVLPs (hohe Konzentration) wurde hierbei auf 1 gesetzt. Zu- und Abnahme der Effizienz wurden in der gleichen Spalte als Steigerungsfaktor bezüglich der Immunisierung mit CVLPs angegeben. Bei den Ergebnissen der Versuche 1 und 2 (Exp. 1 und Exp. 2) wurden nur die Steigerungsfaktoren innerhalb des Versuchs und nicht bezüglich der anderen Versuche dargestellt. Die Effizienz-Reihenfolge der Immunisierungs-Strategien wurde bei Exp. 1 und 2 nicht in der Graphik berücksichtigt. Der hier angegebene Steigerungsfaktor 1,9 (1) bei mit CVLP-IC (NK) beladenen BMDCs wurde erreicht, wenn nur die Immunantworten von drei von vier Mäusen berücksichtigt wurde, da eine Maus auf die Immunisierung nicht reagierte. HK = hoch konzentriert; NK = niedrig konzentriert.

Die Generierung L1- bzw. E7-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch die Immunisierung mit CVLPs konnte gesteigert werden, indem die CVLPs ex vivo auf BMDCs geladen und diese dann in die Mäuse injiziert wurden. Noch effizienter erwies sich dabei eine zusätzliche Beladung mit CpG ODNs (vier Stunden nach der CVLP-Beladung). Das beste Immunisierungsergebnis wurde mit BMDCs erzielt, die nach ihrer ex vivo CVLP-Beladung mit Sorbitol behandelt wurden. Die Immunisierung von CVLPs wurde auch durch deren Komplexierung mit IgG2a und anschließender Beladung auf BMDCs in geringer Konzentration gesteigert.

9. Immunogenität im Vergleich: Chimären Virus-ähnliche Partikel versus und HPV16L1(Δ N10) Kapsomere

Während der Anfertigung der vorliegenden Dissertation wurde immer deutlicher, dass nicht nur die Immunisierung von CVLPs, sondern auch von Kapsomeren eine starke Immunantwort in Mäusen hervorruft (Ohlschlager et al., 2003). In Experimenten, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass die Injektion von Kapsomeren, bestehend aus HPV16L1(Δ N10) Monomeren (siehe Abbildung 1), zur Generierung von L1-spezifischen Antikörpern und L1- wie auch E7-spezifischen T-Zellen führt. Durch ihre Expression der Monomere als ein Glutathion-S-Transferase Fusionsprotein in *E.coli* sind sie einfacher und in größeren Mengen aufzureinigen als CVLPs. In der vorliegenden Arbeit sollte überprüft werden, ob auch Kapsomere wie CVLPs BMDCs aktivieren können (vergleiche Abbildung 5) und ob diese von BMDCs über MHC Klasse I Moleküle an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden können.

9.1 Aktivierung unreifer BMDCs durch die *in vitro* Beladung mit Kapsomeren

BMDCs wurden am sechsten Tag nach ihrer Isolierung aus dem Knochenmark mit 10 μ g/ml Kapsomeren bzw. HPV16L1CE7₁₋₅₅ CVLPs beladen (C.6.1.3.1). Nach 48 Stunden wurde mittels Durchflusszytometrie die Expression der Aktivierungsmarker CD80, CD40, MHC Klasse II und CD54 überprüft (C.6.1.3). Kapsomere führten wie die Beladung von CVLPs zu einer Induktion der Reifung bei BMDCs (siehe Abbildung 40). Die Geometrischen Mittlere Fluoreszenzen der BMDCs, die mit Kapsomeren beladen worden waren, waren etwas niedriger als die der CVLP-beladenen BMDCs. Dies war aber sehr wahrscheinlich in der unterschiedlichen Konzentration an Kapsomeren im Vergleich zu CVLPs begründet. Wie nach dem Experiment überprüft wurde (Daten der HPLC nicht gezeigt) waren die Kapsomere größtenteils degradiert.

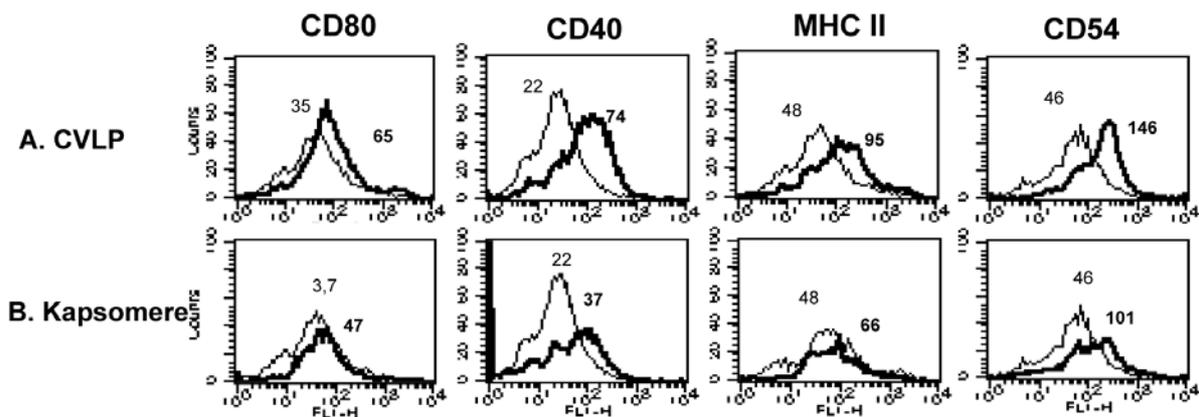


Abbildung 40: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung mit Kapsomeren

Je 1×10^6 BMDCs wurden am fünften Tag nach der Isolierung aus dem Knochenmark von C57BL/6 Mäusen ausplattiert. Die BMDCs wurden mit $10 \mu\text{g}$ CVLPs oder $10 \mu\text{g}$ Kapsomeren beladen (Negativkontrolle: PBS). Nach 48 Stunden wurden je 3×10^5 BMDCs mit den Primärantikörpern (1:50) 45 Min auf Eis inkubiert: anti-Maus CD80, anti-Maus CD40, anti-Maus MHC II und anti-Maus CD54. Es folgte die Färbung mit den Sekundärantikörpern: Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt (1:100) und Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt (1:100). Die Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie im Kanal FL1-H vermessen. In die Auswertung flossen nur lebende Zellen ein (ermittelt durch die Zugabe von 7-AAD). Im Histogramm ist die Fluoreszenz der PBS beladenen unaktivierten Zellen (dünne Linie) und die Fluoreszenz der beladenen bzw. aktivierten Zellen (dicke Linie) dargestellt. Der Geometrische Mittelwert der Fluoreszenzen ist über den dazugehörigen Gipfeln vermerkt. Die Autofluoreszenz der Zellen wie auch die Hintergrundfluoreszenz der verwendeten Sekundär-Antikörper ist nicht gezeigt, letztere betrug für Ziege-anti-Ratte FITC gekoppelt 19 und für Ziege F(ab')₂ anti-Hamster IgG (H+L) FITC gekoppelt 20.

9.2 *In vitro* MHC Klasse I Antigenpräsentation von Kapsomer-beladenen BMDCs

BMDCs wurden sechs Tage nach ihrer Isolierung aus dem Knochenmark mit unterschiedlichen Konzentrationen an Kapsomeren und HPV16L1CE7₁₋₅₅ CVLPs beladen (C.7.1). Nach ca. 18 Stunden wurde die Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung L1-spezifischer ZTLs überprüft (C.0). Die Präsentationsfähigkeit der BMDCs, die mit Kapsomeren beladen worden waren glich der von BMDCs, die mit CVLPs beladen worden waren (siehe Abbildung 41). Lediglich bei einer sehr hohen Konzentration des Antigens (2400 ng) wurde das von den Kapsomeren stammende Epitop besser präsentiert.

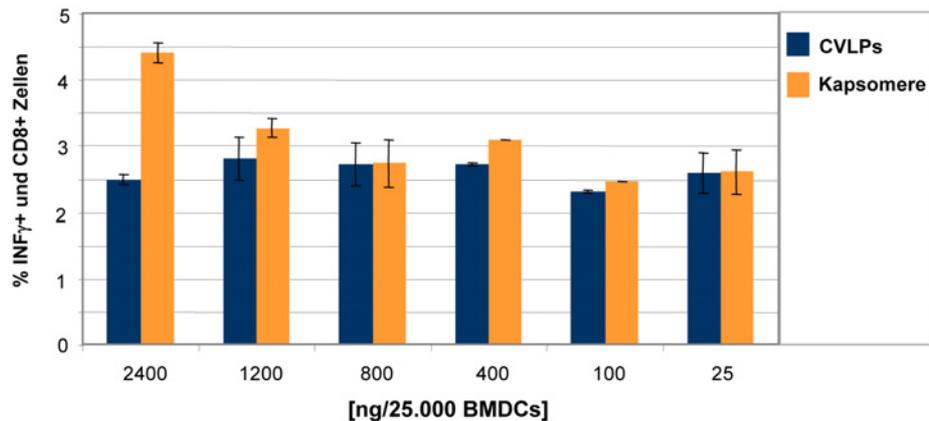


Abbildung 41: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Kapsomer-Beladung

Je 25.000 BMDCs wurden mit 25-2400 ng HPV16L1 Δ CE7₁₋₅₅ CVLPs und Kapsomeren beladen. Positivkontrolle: L1₁₆₅₋₁₇₃ Peptid beladenen RMA Zellen (nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurden BMDCs mit PBS behandelt. Es wurden jeweils Duplikate angelegt. Nach ca. 18 h wurde Antigenpräsentation indirekt mittels intrazellulärer IFN γ Färbung nachgewiesen. Dazu wurden pro Loch ca. 50.000-100.000 L1-spezifische zytotoxische T-Zellen ausplattiert. Doppelt IFN γ und CD8 positive T-Zellen wurden als Prozentsatz der CD8 positiven T-Zellen dargestellt. Der Wert der PBS beladenen BMDCs (Hintergrund) wurde subtrahiert.

Kapsomere konnten wie Chimäre Virus-ähnliche Partikel BMDCs aktivieren und von ihnen über MHC Klasse I Moleküle an zytotoxische T-Zellen präsentiert werden.

E. Diskussion

1. Die Modulation der Immunogenität von HPV 16 Chimären Virus-ähnlichen Partikeln (CVLPs)

HPV16 L1/E7 CVLPs (Muller et al., 1997) erwiesen sich in präklinischen Studien als immunogen: sie konnten im Maus-Modell L1-spezifische Antikörper sowie L1- und E7-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (ZTLs) induzieren (Schafer et al., 1999). Die T-Zell-Antwort hatte sogar eine Tumorphrotektion und -regression in Mäusen zur Folge. Diesen präklinischen Untersuchungen folgte eine klinische Studie I/II (siehe Tabelle 4), deren Auswertung zwar noch nicht abgeschlossen ist, die aber von den bisher vorliegenden Ergebnissen zeigte, dass die Immunogenität von CVLPs beim Menschen noch verbessert werden muss. In der vorliegenden Arbeit wurde daher versucht, die Immunogenität von CVLPs im Maus-Modell zu modulieren, um somit möglicherweise auch Verbesserungsansätze für die Anwendung beim Menschen zu schaffen. Dazu wurden Dendritischen Zellen aus Knochenmark (BMDCs, siehe E.1.1) generiert und mit CVLPs entweder als Immunkomplexe (CVLP-ICs) (siehe E.1.2) oder in Kombination mit CpG ODNs (siehe E.1.3) beladen. Zudem wurden CVLP-beladene BMDCs zur Steigerung der Immunogenität durch Sorbitol hyperosmotischem Stress ausgesetzt, eine Methode, die in der vorliegenden Arbeit erstmalig beschrieben wird (siehe E.1.4).

Die Immunogenität der CVLPs wurde *in vitro* und *in vivo* mit vier verschiedenen Methoden analysiert: (i) Aktivierung und Reifung von BMDCs, (ii) *in vitro cross* Präsentation (Antigenpräsentation über MHC Klasse I Moleküle), (iii) *in vitro Priming* L1-spezifischer ZTLs und (iv) *in vivo Priming* von E7- bzw. L1-spezifischer ZTL-Antwort.

1.1 BMDCs als ‚nature’s adjuvants‘

BMDCs wurden in der vorliegenden Arbeit aus zwei unterschiedlichen Gründen verwendet, welche aber miteinander gekoppelt waren. Zum einen sollten an ihnen die Immunogenität der CVLPs (CVLP-ICs, ± CpG ODNs, ±Sorbitol) untersucht werden. Zum anderen sollten die BMDCs selbst als ‚nature’s adjuvants‘ (Schuler, Schuler-Thurner, and Steinman, 2003) bei der Immunisierung eingesetzt werden. Adjuvantien spielen eine große Rolle bei der Festlegung der Quantität und Qualität der Immunantwort. So induziert z.B. Aluminiumhydroxid, das einzige beim Menschen zugelassene Adjuvans, eine T_H2 und humorale Immunantwort, aber keine T_H1 Antwort bzw. ZTLs. Für CVLPs konnte im Maus-Modell zwar gezeigt werden, dass sie auch ohne Adjuvans ausreichend immunogen sind, um eine ZTL Antwort zu induzieren

(Schafer et al., 1999); die klinische Studie (siehe Tabelle 4) zeigte allerdings, dass die Immunogenität von CVLPs für eine erfolgreiche Anwendung beim Menschen verbessert werden muss. In den in der vorliegenden Arbeit präsentierten Experimenten konnte die Immunogenität der CVLPs mit BMDCs als Adjuvans gesteigert werden. Durch die Beladung der BMDCs mit CVLP-ICs (siehe E.1.2.4) oder in Kombination mit CpG ODNs (siehe E.1.3) bzw. Sorbitol (siehe E.1.4) und anschließender Injektion in die Mäuse konnten ZTLs gegenüber einer direkten Injektion des Antigens mit erheblich höherer Effizienz induziert werden. Diese Beobachtung stimmt mit Befunden zu anderen auf BMDCs beladene Antigene überein. (Herrera, Brett, and Lechler, 2002; Hamilton and Harty, 2002). Es existiert eine Vielzahl von Publikationen, die anhand von Tiermodellen zeigen, dass DCs beladen mit Tumor-assoziierten Antigenen fähig sind, das Wachstum der entsprechenden Tumoren zu verhindern. Bei diesen Experimenten waren DCs anderen Vakzinierungsstrategien überlegen (Gilboa, 1999).

Die Immunisierung mit *ex vivo* Antigen-beladenen DCs hat gegenüber der direkten Injektion eines Antigens entscheidende Vorteile: (i) BMDCs nehmen durch die höhere Konzentration *in vitro* mehr Antigen auf, (ii) nach der Aufnahme wird das Antigen *in vitro* prozessiert und präsentiert, wodurch die BMDCs schon zum Zeitpunkt der Injektion *Signal 1* geben können, (iii) BMDCs können z.T. durch die Antigenaufnahme selbst zur Reifung induziert werden und exprimieren zum Zeitpunkt der Verabreichung kostimulatorische Moleküle (*Signal 2*), Moleküle, die sie zur Wanderung befähigen (z.B. ICAM-1) und schütten Zytokine aus (*Signal 3*) (Blankenstein and Schuler, 2002). *Ex vivo* beladene und durch direkte Injektion des Antigens beladene DCs wandern zu lymphoiden Organen (Banchereau and Steinman, 1998) und formen dort mit naiven T-Zellen Immunologische Synapsen (Bromley et al., 2001), wodurch die T-Zellen stimuliert werden, differenzieren und als Antwort auf IL-2 (von T-Zellen ausgeschüttet) proliferieren (Lanzavecchia and Sallusto, 2001).

Auch beim Menschen wurden DCs erfolgreich als ‚*nature’s adjuvants*‘ eingesetzt (Nestle et al., 1998) (Thurner et al., 1999; Dhodapkar et al., 2000; Kugler et al., 2000; Jonuleit et al., 2001). Um die Befunde der vorliegenden Arbeit auch auf das humane System übertragen zu können, müssten einige Parameter abgeklärt werden. So muss beispielsweise bestimmt werden, welche DC-Untergruppe (Interstitiale DCs oder Plasmazytoide DCs) verwendet werden muss, wie viele und wie oft *ex vivo* beladene DCs injiziert werden müssen und welches der optimale Reifestatus der DCs ist. Auch wenn diese Art der Vakzinierung gegenüber der direkten Injektion von Antigenen sehr aufwendig ist, stellt sie eine der vielversprechendsten Optionen dar, um eine effiziente ZTL Antwort zu induzieren.

1.2 CVLPs als Immunkomplexe

Regnault et al. zeigten, dass die Antigenaufnahme von DCs über Fc γ -Rezeptoren sehr effizient verläuft. Durch die Beteiligung der Fc γ -Rezeptoren (Fc γ Rs) wird eine effiziente MHC Klasse I und II-restringente Antigenpräsentation und gleichzeitig die Reifung der DCs ausgelöst (Regnault et al., 1999). Daher wurden in der vorliegenden Arbeit CVLPs mit spezifischen Antikörpern komplexiert, um so eine effiziente Aufnahme zu ermöglichen, um DCs zu aktivieren, *cross* Präsentation und letztendlich *cross Priming* von ZTLs auszulösen.

Wie auch in den oben erwähnten Publikation wurde auch in der vorliegenden Arbeit ein direkter Beweis, dass CVLPs tatsächlich mit dem polyklonalen bzw. mit dem monoklonalen Antikörpern komplexiert vorlagen, nicht erbracht. Zwar wurden einige Experimente durchgeführt, die den Nachweis von CVLP-ICs durch Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose oder *Capture* ELISA hätten erbringen sollen; sie verliefen allerdings aufgrund vieler Kreuzreaktionen und unspezifischen Bindungen nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Eine Möglichkeit wäre jedoch, durch Saccharose-Gradientenzentrifugation CVLPs und ungebundene Antikörper von den CVLP-ICs zu trennen. Das Vorliegen von CVLP-ICs konnte daher nur indirekt aufgrund der unterschiedlichen Antigenpräsentation von BMDCs nachgewiesen werden. Während geringe Konzentrationen an CVLPs nicht mehr präsentiert wurden, ist dies bei CVLP-ICs der Fall. Allerdings müsste man durch die Verwendung von CVLPs zusammen mit dem Fab'-Fragmenten des polyklonalen Serums bzw. der monoklonalen Antikörper oder mit einem für CVLP-unspezifischen Antikörper beweisen, dass die Eigenschaften der verwendeten CVLP-ICs tatsächlich auf der Komplexierung bzw. auf den Fc-Teilen der komplexierten Antikörper und nicht nur auf der ‚Bedeckung‘ der CVLPs bzw. auf der bloßen Existenz der Antikörper beruhen. Da die Immunkomplexierung der CVLPs interessanterweise nicht zu einem einheitlichen Ergebnis führte, wurden die einzelnen Befunde im Vergleich zu den Ergebnissen der CVLPs genau analysiert und werden im Folgenden dargestellt (siehe E.1.2.1-1.2.4).

1.2.1. Bindung von CVLP-ICs an BMDCs

Wie auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind Fc γ Rs III/II (CD16/CD32) auf der immortalisierten DC-Zell-Linie JAWS II und auf primären DCs (BMDCs), stark exprimiert. CVLP-ICs wie auch CVLPs konnten an BMDCs über Fc γ Rs III/II (CD16/CD32) binden. Ob durch die IgG-Komplexierung eine verstärkte Bindung der CVLPs an die Rezeptoren vermittelt werden konnte, und ob diese durch die Verwendung eines polyklonalen Serums bzw. IgG2a Antikörpern unterschiedlich ausfiel, ließ sich mit dem durchgeführten Experiment nicht direkt nachweisen. Denn durch die Komplexierung der CVLPs wurden vermutlich Bindungsstellen für die Antikörper verdeckt, welche in der anschließende Durchflusszytometrie-

Analyse eingesetzt wurden. Somit konnten wahrscheinlich weniger Antikörper an CVLP-ICs als an CVLPs binden. Vermutet wird allerdings, dass durch die IgG2a-Komplexierung mehr CVLPs an BMDCs binden konnten als ohne Antikörper, da die mit IgG2a komplexierten CVLPs trotz der verdeckten Detektionsstellen im gleichen Experiment sogar eine etwas stärkere Geometrische Mittlere Fluoreszenz erreichten (siehe Abbildung 25b). Die Bindung der CVLPs, die mit dem polyklonalen Serum komplexiert wurden, konnten hier nicht in den Vergleich mit einbezogen werden. Um diese Bindungsunterschiede tatsächlich zu beweisen, müsste man CVLPs so anfärben, dass die Antikörper-Komplexierung keine Auswirkungen auf die Detektion gebundener CVLP-ICs hat. Eine Möglichkeit wäre daher, in CVLPs Fluoreszenzfarbstoffe einzuschließen wie es kürzlich für HPV 16 VLPs gezeigt wurde (Bergsdorf et al., 2003). So könnten auch CVLPs und CVLP-ICs intrazellulär nachgewiesen werden, was zusätzlich eine Aufnahme in die Zellen beweisen würde.

Zur Komplexierung der CVLPs wurden in der vorliegenden Arbeit zum einen ein polyklonales Serum verwendet, welches neben IgM größtenteils den IgG-Subtyp IgG2b enthält, die bevorzugt an die murinen FcγRs III und II bindet. Diese Rezeptoren besitzen eine niedrige Affinität (ca. 10^6 M^{-1}), weshalb nur multimere IgGs an sie binden (Ravetch and Kinet, 1991) (siehe Tabelle 13). Zum anderen wurde ein monoklonaler IgG2a Antikörper verwendet, der ebenfalls an FcγRs III und II, aber mit hoher Spezifität auch an FcγR I (CD64) bindet, welches ein hochaffiner Rezeptor (ca. 10^8 M^{-1}) ist, der auch monomere IgGs binden kann (Ravetch and Kinet, 1991) (siehe Tabelle 13).

Tabelle 13: Übersicht der murinen IgG Subtypen und ihrer murinen FcγRs
(in Anlehnung an (Ravetch and Kinet, 1991))

	FcγR I (CD64)	FcγR II (CD32)	FcγR III (CD16)
IgG1	+/-	+	+
IgG2a	+++ (Monomer/Multimer)	++	++
IgG2b	++	+++ (Multimer)	+++ (Multimer)

Der für die Blockierung der Bindung verwendete Antikörper anti-Maus CD16/CD32 2.4G2 kann nicht zwischen den beiden murinen FcγRs III und II differenzieren, reagiert daher mit beiden spezifisch und ist in der Lage, eine Bindung an diese Rezeptoren zu blocken (Unkeless, 1979; Ravetch et al., 1986). Allerdings wurde auch gezeigt, dass dieser CD16/CD32-spezifische Antikörper über seinen Fc-Teil an den FcγR I bindet und somit auch hier möglicherweise die Bindung von anderen Antikörpern verhindern kann (Unkeless, 1979). Dies erklärt warum in der vorliegenden Arbeit auch die Bindung von CVLPs, komplexiert mit IgG2a, nahezu komplett inhibiert werden konnte, obwohl IgG2a an FcγRs I, II und III bindet, hier aber primär nur die Bindung an die FcγRs III/II geblockt worden war. Auffällig war, dass die Bindung von IgG2a komplexierten CVLPs stärker durch die Blockierung der FcγRs III/II reduziert wurde als die Bindung von

CVLPs, die mit polyklonalem Serum komplexiert worden waren. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die im Serum neben den IgG2b Antikörpern auch vorhandenen IgM Antikörper ebenfalls eine Bindung der CVLPs an BMDCs vermitteln. Während in der Vergangenheit über die Bindung von IgG vermittelten Immunkomplexen an Fc γ Rs und die Fc γ Rs selbst viel erforscht worden ist, ist über die Funktion von IgM Antikörpern und deren Rezeptor wenig bekannt. Shibuya et al. identifizierten einen Fc Rezeptor, Fc α / μ R, der IgA und IgM Antikörpern bindet und auf B-Zellen, Makrophagen (Shibuya et al., 2000) und womöglich auch auf DCs exprimiert ist. Dieser Rezeptor vermittelt die Endozytose von mit IgM komplexierten Mikropartikeln und *Staphylococcus aureus* Bakterien. Ein Teil der CVLPs könnte somit womöglich auch über IgM Komplexierung an DCs vermittelt worden sein, die sich nicht durch die Blockierung der Fc γ Rs III/II beeinflussen lässt.

Eine Bindung von unkomplexierten VLPs an humane wie auch murine Dendritische Zellen über Fc γ R III (CD16) wurde auch von Da Silva et al. nachgewiesen. Die Autoren beschrieben eine 33 %ige Reduktion der VLP-Bindung an DCs von Fc γ R III Knockout Mäusen (Da Silva et al., 2001b). Natürlich ist durch eine Bindung der CVLPs und CVLP-ICs an BMDCs nicht gleichzeitig deren Aufnahme in die Zellen gezeigt, dafür müssten die Antigene auch intrazellulär nachgewiesen werden.

1.2.2. Induktion der Reifung von BMDCs durch CVLP-ICs

Immunkomplexe binden nicht nur über Fc γ Rs an DCs, verursachen damit eine Quervernetzung der Rezeptoren und werden von DCs Fc γ -Rs aufgenommen, sondern sie lösen auch über Fc γ Rs eine Reifung der DCs aus (Ravetch, 1994; Regnault et al., 1999). In dieser Arbeit wurde die Induktion der BMDC-Reifung durch CVLPs alleine (wie auch schon für VLPs gezeigt (Lenz et al., 2001)) ebenso ausgelöst wie durch CVLP-ICs. Dabei war auffällig, dass im Vergleich zu der Expression der Aktivierungsmarker von CVLP-beladenen BMDCs durch die Komplexierung der CVLPs mit dem polyklonalen Serum die Expression der Aktivierungsmarker etwas schwächer bzw. durch die Komplexierung mit IgG2a Antikörpern stärker verlief. Eine mögliche Ursache dafür ist die Bindung an unterschiedliche Fc γ -Rezeptor-Typen vermittelt durch IgG2b bzw. IgG2a (siehe oben). Wie zuvor schon erwähnt sind in dem polyklonalen Serum auch IgM Antikörper vorhanden, die möglicherweise ebenfalls eine Bindung an FcRs vermitteln könnten. Ob eine solche Bindung eine Reifung der DCs zur Folge hat, ist nicht bekannt. Jedoch ergab sich durch die *in vitro* Untersuchungen von Radhakrishnan et al. ein Hinweis darauf, dass IgM Antikörper in der Modulation der Immunantwort eine Rolle spielen könnten. Diese Autoren zeigen, dass Antigenpeptid-beladene BMDCs, die mit einem humanen IgM Antikörper behandelt wurden, eine starke Auswirkung auf die Immunantwort von CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen hatte (Radhakrishnan et al., 2003). Als Ligand dieses IgM Antikörpers wurde B7-DC (ein kostimulatorisches Molekül auf DCs) identifiziert.

Denaturierte CVLPs konnten keine Aktivierung auslösen, was zeigt, dass die native Kapsidstruktur der Partikel nötig ist, um eine Reifung der DCs zu induzieren. Anders als bei den Untersuchungen von Regnault et al. mit Ovalbumin konnte hier auch das unkomplexierte Antigen, die CVLPs, eine Reifung der BMDCs induzieren, was sicherlich ebenfalls auf die virale Kapsidstruktur und deren Bindung an FcγRs zurückzuführen ist. Um zu überprüfen, ob die Aktivierung der DCs durch CVLPs bzw. deren CVLP-ICs tatsächlich über FcγRs vermittelt wird, könnte die Aktivierung von BMDCs aus Fcγ-R I und III defizienten Mäusen untersucht werden.

1.2.3. MHC Klasse I Antigenpräsentation von CVLP-ICs beladenen BMDCs (*cross* Präsentation)

Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass durch CVLPs wie auch durch CVLP-ICs BMDCs zur Reifung induziert wurden und so die Zellen im Falle eines Immunisierungsszenarios *Signal 2* liefern konnten, wurde im nächsten Schritt die Voraussetzung für *Signal 1* überprüft, nämlich die *cross* Präsentation der Antigene. Für den indirekten Präsentationsnachweis via MHC Klasse I Moleküle war zunächst der Zytotoxizitätstest (Cr^{51} *release assay*) die Methode der Wahl, er stellte sich aber aufgrund der zahlreichen Arten von Zielzellen, die alle chromiert werden mussten, als nicht praktikabel für die gewünschte Versuchsanordnung heraus (Daten nicht gezeigt). Mittels intrazellulärer IFN γ Färbung von E7 bzw. L1-spezifischen ZTLs konnte die *cross* Präsentation des E7/L1-Epitops von CVLP und CVLP-ICs beladenen BMDCs erfolgreich, spezifisch und effizient nachgewiesen werden. Bei einer therapeutischen Immunisierung spielt natürlich der Nachweis einer E7-spezifischen ZTL-Antwort eine größere Rolle als der des L1-Epitops, da E7 (wie auch E6) konstitutiv in Zellen von HPV-assoziierten Zervixkarzinomen und CINs exprimiert wird und somit das relevante Tumorantigen darstellt. Der Nachweis des E7-Epitops war aber nur möglich, wenn die verwendeten CVLPs das murine H-2D^b-restringente E7-Epitop (⁴⁹RAHYNIVTF⁵⁷) (Feltkamp et al., 1993) trugen (HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ CVLPs). Aufgrund der schlechten Produktion von diesen HPV16L1ΔCE7₁₋₆₀ Partikeln wurden CVLPs ohne dieses Epitop (HPV16L1ΔCE7₁₋₅₅ CVLPs) verwendet, die in größeren Mengen aufgereinigt werden konnten. In diesen Experimenten fungierte das H-2D^b-restringente L1-Epitop (¹⁶⁵AGVDNRECI¹⁷³) als Modellantigen.

Beide Antigen-Formationen, CVLPs und CVLP-ICs, wurden in BMDCs in den MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg eingeschleust und an E7 bzw. L1-spezifischen ZTLs präsentiert. CVLPs wie auch CVLP-ICs wurden zwar beide bei einer Konzentration von 0,006-4000 ng pro 2,5x10⁴ BMDCs (0,075-50 μg/ml) *cross* präsentiert, allerdings war die Effizienz der Präsentation der BMDCs von CVLPs bzw. CVLP-ICs je nach Konzentration unterschiedlich. So sank die Fähigkeit ZTLs zu aktivieren mit abnehmender CVLP-Konzentration, während sie mit abnehmender CVLP-IC-Konzentration zunahm. Dabei konnten geringe CVLP-IC-Konzentrationen eine ZTL-Antwort induzieren, während die gleiche

Konzentration an CVLPs alleine zu keiner ZTL-Antwort führte. Diese Befunde der unterschiedlichen Antigenpräsentation von CVLP-ICs- und CVLP-beladenen BMDCs werden im Folgenden näher analysiert (siehe E.1.2.3.1 und E.1.2.3.2).

Die Daten der konzentrationsabhängigen Antigenpräsentation durch BMDCs stimmen weitgehend mit den *in vitro* Studien von Rodriguez et al. und Regnault et al. überein, die zeigen konnten, dass BMDCs für eine MHC Klasse I abhängige Antigenpräsentation mit 100 mal weniger OVA-ICs beladen werden müssen als mit löslichem OVA Protein (Rodriguez et al., 1999; Regnault et al., 1999). Allerdings gibt es auch auffällende Unterschiede in den verwendeten Antigenkonzentrationen zu dieser Arbeit von Regnault et al., in der das lösliche OVA Protein nur bei einer nicht-physiologischen Konzentration von 1-3 mg/ml erfolgreich von DCs *cross* präsentiert wurde (Regnault et al., 1999). Der große Konzentrationsunterschied zwischen dem unkomplexierten OVA Protein und den unkomplexierten CVLPs beruht höchstwahrscheinlich auf der Tatsache, dass CVLPs über eine Clathrin-abhängige, Rezeptor-vermittelte Endozytose effizient in BMDCs gelangen (Day, Lowy, and Schiller, 2003), während lösliches OVA Protein über Makropinozytose in BMDCs aufgenommen werden muss. Weitere Übereinstimmungen und Abweichungen der Rodriguez et al., Regnault et al. und der vorliegenden Arbeit werden im Folgenden diskutiert.

1.2.3.1. Antigenpräsentations-Profil der CVLP-ICs

Trotz ähnlicher Induktion der Reifung der BMDCs durch CVLPs und CVLP-ICs (siehe Abbildung 25a und b) gab es große Unterschiede in der Fähigkeit zur Antigenpräsentation über MHC Klasse I und zur Induktion einer ZTL-Antwort. Während bei CVLP-ICs eine Antigenpräsentation noch bei 6 pg pro $2,5 \times 10^4$ BMDCs (75 pg/ml) vorhanden war, was vier CVLP Molekülen pro BMDCs entspricht, konnte eine ähnlich starke Antigenpräsentation erst ab der 3000 fachen Menge an CVLPs erreicht werden. Die Fc γ -R vermittelte Aufnahme und Präsentation der CVLP-ICs verlief somit bei geringen Konzentrationen effizienter als die Aufnahme und Präsentation der CVLPs. Mögliche Gründe für diese verstärkte Antigenpräsentation geringer Mengen an CVLP-ICs könnten entweder eine effizientere Bindung der CVLP-ICs an BMDCs und damit die bessere Aufnahme in die Zelle oder die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren und somit die Expression von Genprodukten sein, die bei der Induktion der ZTL-Antwort eine wichtige Rolle spielen.

Bei steigender CVLP-ICs Konzentration sank die Fähigkeit der BMDCs eine ZTL-Antwort zu induzieren. Ein Grund dafür könnten freie Antikörper gewesen sein, die sich nicht an der Komplexierung der CVLPs beteiligen und deren Konzentration mit der CVLP-ICs Konzentration anstieg. Diese monomeren Antikörper könnten an FcRs gebunden und diese für eine effiziente Aufnahme der CVLP-ICs blockiert haben. Prädestiniert dafür wären IgG2a Antikörper, da diese auch als Monomere an den hochaffinen Fc γ R I binden und so die Bindung der CVLP-ICs an diesen Rezeptor verhindern können. Eine Bindung von freien IgG2b Antikörpern (im polyklonalen Serum) an die Fc γ Rs III und II war eher unwahrscheinlich, da es sich um

niedrigaffine Rezeptoren handelt, an die IgG2b nur als Multimer (also als Immunkomplex) binden kann. Trotzdem konnte eine verminderte Induktion der ZTL-Antwort bei hohen Konzentrationen auch der mit dem polyklonalen Serum komplexierten CVLP-ICs festgestellt werden. Möglicherweise könnten aber in diesem Fall unkomplexierte IgM Antikörper die Bindung, Aufnahme und Präsentation der CVLP-ICs beeinflusst haben. Zwar konnten Shibuya et al. zeigen, dass Antigene, die mit IgM komplexiert waren, in Zellen über den Fc α / μ Rezeptor aufgenommen, nicht aber dass sie auch dadurch in den MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg eingeschleust werden und eine ZTL-Antwort induzieren können (Shibuya et al., 2000). Um den potentiellen Einfluss der IgM Antikörper zu überprüfen, sollte das polyklonale Serum durch Immunpräzipitation mit Protein A-Sepharose von IgM Antikörpern getrennt werden. Zusätzlich könnte man BMDCs mit CVLPs bzw. CVLP-ICs mit unspezifischen Antikörpern beladen, um die Rolle freier Antikörper zu untersuchen. Eine weitere Erklärung für die abnehmende Antigenpräsentation bei steigenden CVLP-ICs Konzentrationen könnte sein, dass CVLP-ICs bei höheren Konzentrationen nicht mehr als monomere Immunkomplexe existieren, sondern dass viele CVLP-ICs durch die ‚räumliche Nähe‘ immer größere, miteinander vernetzte Aggregate bilden, die durch die BMDCs nicht mehr aufgenommen werden können (siehe Abbildung 42). Für diese Hypothese spricht die Tatsache, dass CVLP-ICs auch bei niedriger Konzentration nicht von BMDCs präsentiert werden konnten, wenn sie aus einer Verdünnung von hoch konzentrierten CVLP-ICs stammten (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall wären die großen Immunkomplex-Aggregate bei hoher Konzentration gebildet und dann als Aggregate verdünnt worden. Da aber bei den vorgestellten Experimenten CVLPs wie auch die Antikörper vor der Komplexierung separat verdünnt wurden, könnten sich bei niedriger Konzentration CVLP-ICs Monomere bilden, die sehr gut von BMDCs aufgenommen werden konnten.

Bei der Effizienz der MHC Klasse I Antigenpräsentation von niedrig konzentrierten CVLP-ICs war die Anzahl der Antikörper Moleküle, mit denen die CVLPs komplexiert waren (1-670 Moleküle IgG2a pro CVLP), ein entscheidender Faktor. Eine niedrige wie auch sehr hohe Anzahl an Antikörper Molekülen pro CVLP führten zu einer effizienten Präsentation. Waren die CVLPs mit einer mittleren Anzahl von Antikörper Molekülen komplexiert (etwa 80 Moleküle pro Partikel), sank die Antigenpräsentation. Diese Tatsache beruht - wie oben schon erwähnt - möglicherweise auf der ‚Immunkomplex-Form‘ (siehe Abbildung 42), die sich aufgrund der unterschiedlichen Anzahl an IgG Molekülen, die pro CVLP zur Verfügung stehen, ausbildet: (i) Bei einer niedrigen Anzahl an IgG2a Molekülen liegen die CVLP als Monomere, komplexiert mit sehr wenigen Antikörper vor und binden so möglicherweise bevorzugt an FcR I, werden präsentiert und induzieren gleichzeitig eine Reifung der BMDCs. (ii) Eine mittlere Anzahl an IgG2a Molekülen führt dazu, dass die CVLPs als Multimere vorliegen, die komplexiert durch quervernetzende Antikörper möglicherweise noch an BMDCs binden und diese noch zur Reifung induzieren, nicht aber von ihnen aufgenommen werden können. Möglich wäre auch, dass die riesigen Aggregate aus quervernetzten CVLP-ICs zwar in die Zelle aufgenommen werden können, aber nicht mehr effizient in das Zytoplasma

entlassen werden können (sofern sie diesen Weg überhaupt in Anspruch nehmen), da sie sehr stark degradiert werden müssen, um in das Zytoplasma zu gelangen (Rodriguez et al., 1999). (iii) Bei einer hohen Anzahl an IgG2a Molekülen liegen die CVLPs als Monomere, komplexiert mit sehr vielen Antikörpern vor, die aufgrund der kompletten Bedeckung der CVLPs keine Quervernetzung zulassen. Diese CVLP-ICs könnten sehr gut sowohl an niedrigaffine als auch hochaffine Fc γ Rs binden, womit sie bei niedrigen Konzentrationen ($\leq 30\text{pg}$, siehe Abbildung 29c) gegenüber (i) einen Vorteil besäßen. Sie könnten eine Reifung der BMDCs induzieren und würden von ihnen effizient *cross* präsentiert werden. Um die Hypothese des Vorliegens von drei verschiedenen CVLP-ICs Formen zu bestätigen, könnte eine Saccharose-Gradientenzentrifugation durchgeführt werden, durch die sich die unterschiedlichen ICs entsprechend ihres Sedimentationskoeffizienten auftrennen würden.

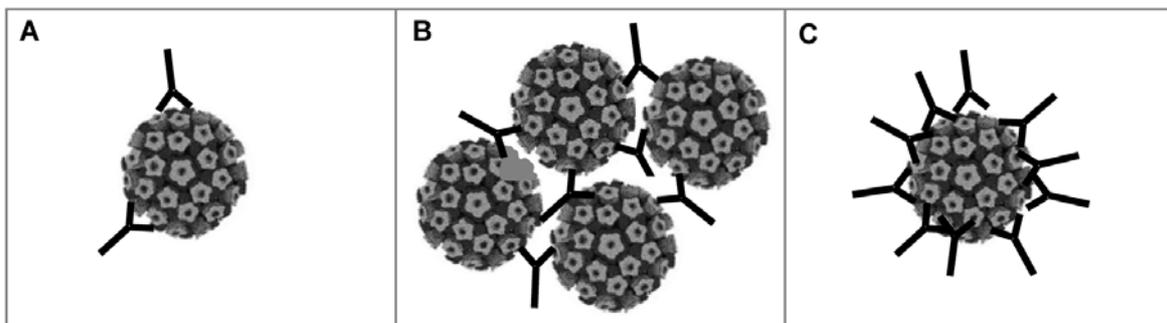


Abbildung 42: Modell der CVLP-ICs Bildung bei unterschiedlicher Anzahl an verfügbaren IgG2a Antikörper Molekülen

(A) Eine geringe Anzahl an Antikörpern bildet CVLP-IC Monomere, die bevorzugt an den hochaffinen Fc γ R I binden wodurch die Induktion zur Reifung der BMDCs, Antigenaufnahme und -präsentation vermittelt werden. (B) Bei steigender Anzahl der IgG2a Antikörper werden durch Quervernetzung CVLP-IC Aggregate gebildet, die zwar an Fc γ Rs I, II und III binden können, möglicherweise noch eine Reifung der BMDCs induzieren, nicht aber von ihnen aufgenommen/degradiert werden können. (C) Bei hoher Anzahl von IgG2a Molekülen werden CVLP-ICs Monomere gebildet, die komplett von Antikörpern bedeckt sind und sowohl an Fc γ Rs I, II, III binden und dadurch eine Reifung der BMDCs induzieren als auch von BMDCs aufgenommen und präsentiert werden.

1.2.3.2. Antigenpräsentations-Profil der CVLPs

Auch bei der Beladung der BMDCs mit CVLPs ohne Antikörper, d.h. ohne die Möglichkeit der Aggregatbildung bzw. der Blockierung von Fc γ Rs wurde bei steigender Antigenkonzentration und nach Erreichen des Plateaus ($> 400\text{ng}$) eine Abnahme der Antigenpräsentation bzw. ZTL-Antwort beobachtet. Diese Sättigung könnte eine Folge der limitierten Bindungsmöglichkeit der CVLPs an die BMDCs sein, da bei einer Konzentration von mehr als $400\text{ ng CVLPs pro } 2,5 \times 10^4 \text{ BMDCs}$ über $2,7 \times 10^5 \text{ CVLPs pro Zelle}$ anfallen. Ein anderer möglicher limitierender Faktor könnte auch die Prozessierung innerhalb der Zelle sein. D.h. selbst bei ‚kompletter‘ Antigenaufnahme könnte die Fähigkeit, die CVLPs in den MHC Klasse I Weg einzuschleusen limitiert sein. Beides könnte durch den Einschluss eines Fluoreszenzfarbstoffs (Bergsdorf et al., 2003) in die CVLPs belegt werden. Würde die Sättigung auf einer limitierten Bindungsmöglichkeit

beruhen, wären viele CVLPs auch extrazellulär und nicht an BMDCs gebunden nachweisbar. Wäre eine limitierte Prozessierung der Grund für eine Sättigung, wäre die Mehrheit der CVLPs intrazellulär nachzuweisen. Trotzdem erklären beide Hypothesen nicht, warum die Aktivierung von ZTLs durch BMDCs, die mit mehr als 4000 ng CVLPs pro $2,5 \times 10^4$ BMDCs beladen wurden, sogar sinkt bzw. bei 8000 ng pro $2,5 \times 10^4$ BMDCs (100 $\mu\text{g/ml}$) nahezu nicht mehr nachweisbar ist. In ähnlichen *in vitro* Studien von Rodriguez et al. war auffällig, dass es zu keinem Plateau bzw. Abfall der ZTL Antwort mit vergleichbaren Konzentrationen an löslichem OVA Protein kam (Rodriguez et al., 1999). Die ZTL-Antwort stieg sogar noch bei 10 mg/ml (pro 5×10^4 BMDCs) OVA an. Die Autoren erhielten allerdings ein konvexes ZTL-Antwort Profil (Anstieg, Gipfel, Abnahme der ZTL-Antwort bei steigenden Antigenkonzentration), wenn sie BMDCs mit OVA-ICs (0-3 $\mu\text{g/ml}$) beluden, wobei der Gipfel bei 0,3 $\mu\text{g/ml}$ erreicht war, was einer Anzahl von ca. $5,3 \times 10^{13}$ OVA-IC Molekülen pro ml entspricht (wurde von den Autoren nicht weiter diskutiert). In dieser Arbeit wurde der Gipfel bzw. das Plateau der ZTL-Antwort mit 400 ng CVLPs pro $2,5 \times 10^4$ BMDCs bzw. 5 $\mu\text{g/ml}$ erreicht, was einer CVLP Anzahl von ca. $1,4 \times 10^{11}$ Partikeln pro ml entspricht. Die Interpretation dieses Vergleichs könnte sein, dass nicht die Antigenaufnahme den limitierende Faktor darstellt, da verglichen mit CVLP-Molekülen die 3000-fache Menge an OVA-Molekülen in die Zelle aufgenommen werden muss, um den Gipfel des ZTL-Antwort Profils zu erreichen. Geht man aber davon aus, dass ein Partikel 360 Epitope für E7- bzw. L1-spezifische ZTLs trägt, so stehen bei 5 $\mu\text{g/ml}$ CVLPs ca. 5×10^{13} E7 bzw. L1-Epitope pro ml zur Verfügung. Dies entspricht der Anzahl an OVA-Epitope (ein Epitop pro OVA-Molekül, da OVA ein Monomer ist) die bei einer Beladung von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ OVA-ICs der Rodriguez et al. Arbeit den ZTLs präsentiert werden können. Zwar wurden in den verschiedenen Studien eine unterschiedliche Anzahl von BMDCs (Rodriguez et al.: 5×10^4 BMDCs) und ein anderes Antigen verwendet, dessen K^b -restringentes Epitop von ZTLs einer anderen Spezifität erkannt wird, aber die Dosierung der Antigene scheint bei beiden Experimenten ein entscheidender Faktor zu sein. Es ist möglich, dass die hohe Antigenkonzentration zu einer, Apoptose der ZTLs führt, ausgelöst durch die starke Stimulation der Antigenpräsentation und das im Medium vorhandene IL-2 bzw. das bis zur Monensin-Zugabe (siehe C.0) von den ZTLs ausgeschüttete IL-2. Die Kombination aus beidem kann bei T-Lymphozyten zu einer FasL (FasL bzw. CD95L) und $\text{TNF}\alpha$ induzierten Apoptose führen (Critchfield et al., 1994; Alexander-Miller et al., 1996; Lenardo et al., 1999). Nach sechs Stunden Inkubation der ZTLs mit den CVLP-beladenen BMDCs könnte im Falle einer induzierten Apoptose die Anzahl an ZTLs drastisch sinken. Ob dies in den hier beschriebenen Experimenten tatsächlich der Grund für die Abnahme von $\text{IFN}\gamma$ und CD8 doppelt positiven Zellen ist, bleibt zu überprüfen.

Die einzelnen Experimente variierten teilweise in ihrem Anteil an CD8 und $\text{IFN}\gamma$ doppelt positiven Zellen, was möglicherweise auf den Zustand der BMDCs und ZTLs und der Art der ZTLs (E7 oder L1-spezifisch) zurückzuführen ist. Zudem differierten die Wachstumseigenschaften der BMDCs von Präparation zu Präparation und die der ZTLs von Restimulation zu Restimulation. Ebenso wurden für die einzelnen

Versuche unterschiedliche Präparationen von CVLPs verwendet, die damit trotz Konzentrationsbestimmungen einen variablen Parameter darstellten. Die Profile der Experimente stimmten jedoch weitgehend überein.

1.2.4. **Priming von ZTLs durch CVLP-ICs beladene BMDCs**

Die Fähigkeit von CVLPs bzw. CVLP-ICs beladenen BMDCs *in vitro* naive CD8⁺ T-Zellen zu *primen* spiegelte das Ergebnis der MHC Klasse I Antigenpräsentation wider: BMDCs beladen mit hohen Konzentrationen an CVLPs bzw. mit niedriger CVLP-ICs Konzentration konnten erfolgreich naive T-Zellen *primen*. Dabei verlief das *Priming* mit den CVLP-ICs beladenen BMDCs sogar effizienter. Da sich in diesem Experiment aber auch CD4⁺ T-Zellen, die eine Helferfunktion ausüben können, unter den *naiven* T-Zellen befanden, kann deren Beteiligung bei diesem *in vitro* *Priming* nicht ausgeschlossen werden.

Nach den *in vitro* Studien schloss sich der Vergleich zwischen CVLP-ICs bzw. CVLPs durch die Immunisierung *in vivo* an. Die Komplexierung der CVLPs führte zu einer sehr guten ZTL-Antwort, die sich nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ von der durch CVLPs induzierten ZTL-Antwort unterschied. Beide Antigen-Formationen führten zu einem *Priming* von ZTLs, deren T-Zell-Rezeptor (TZR) Epitope der RMA-E7 Zellen (Transfektanten) erkannten. Aber nur ZTLs von Mäusen, die entweder direkt mit CVLP-ICs oder mit durch CVLP-ICs beladenen BMDCs immunisiert wurden, konnten auch die E7₄₉₋₅₇ Peptid beladenen RMA-S Zellen erkennen. Peptid E7₄₉₋₅₇ ist ein subdominantes Epitop des HPV16 E7 Proteins (Feltkamp et al., 1995). Das dominante Epitop von E7, welches höchstwahrscheinlich auch von RMA-E7 Zellen präsentiert wird, da es sich hierbei um Zellen handelt, die das Volllänge-Protein E7 exprimieren, ist nicht bekannt, jedoch könnte durch die Immunisierung der CVLP-ICs möglicherweise eine ZTL-Antwort auch gegen dieses dominante Epitop *geprimt* worden sein.

Die Immunkomplexierung der CVLPs führte (aufgrund des gewählten Verhältnisses von CVLP und AK) hier wie auch in weiteren Experimenten höchstwahrscheinlich zu einer Bildung von CVLP-IC Monomeren (siehe Abbildung 42), die sowohl *in vivo* an DCs als auch *in vitro* an BMDCs, mit welchen die Mäuse immunisiert wurden, sehr gut *cross* präsentiert wurden und somit eine ZTL-Antwort *primen* konnten. Auch hier spiegelten sich die durch *in vitro* *cross* Präsentation erhaltenen Daten wider (siehe Abbildung 33). Wurden BMDCs *ex vivo* mit einer geringen Konzentration an CVLP-ICs beladen und dann den Mäusen verabreicht, induzierte dies eine sehr gute ZTL-Antwort wie sie durch die gleiche geringe Menge an unkomplexierten CVLPs, die auf BMDCs geladen wurden, nicht erreicht werden konnte. Die gleiche niedrige Konzentration an CVLP-ICs direkt in die Mäuse injiziert konnte keine ZTL-Antwort induzieren, während eine hohe Konzentration an CVLP-ICs direkt in die Tiere injiziert in zwei von drei Experimenten eine stärkere Immunantwort induzierte als unkomplexierte CVLPs. Demnach führte auch hier die Immunkomplexierung zu einer Steigerung der Immunogenität der CVLPs.

Die in der Literatur existierenden Aussagen über die Immunogenität von IgG-komplexierten Antigenen *in vivo* sind sehr unterschiedlich. Zum einen konnte die ZTL-Antwort in Mäusen gesteigert werden (OVA-ICs im Vergleich zu löslichem OVA-Protein) (Schoorhuis et al., 2002). Zum anderen zeigten Da Silva et al., dass präexistierende, neutralisierende Antikörper die Immunogenität von HPV16 L1/L2-E7 CVLPs vermindert (Da Silva et al., 2001a). Die Autoren induzierten zunächst in den Tieren VLP (L1)-spezifische Antikörper (ohne eine Immunantwort gegen E7 zu *primen*) und immunisierten sie dann mit 50 µg CVLPs. In diesem Fall bildeten sich Immunkomplexe erst *in vivo*, nach der Injektion der CVLPs. Dadurch wurden zwar immer noch E7-spezifische ZTLs induziert, allerdings neun Mal weniger als ohne präexistierende Antikörper. Auch die Effizienz der Tumorprotektion sank durch die *in vivo* CVLP-ICs Bildung (Faktor 3,7). Die Autoren spekulierten, dass durch die Immunkomplexierung die ursprünglich immunogenen CVLPs zu Makrophagen gelenkt und von ihnen aufgenommen wurden und somit keine ZTL-Antwort mehr *primen* konnten.

Wie lassen sich nun die Unterschiede der Ergebnisse von Da Silva et al. (Da Silva et al., 2001a) und dieser Arbeit erklären? Wie hier gezeigt werden konnte, spielen die CVLP:Antikörper Verhältnisse bei der Ausbildung von Immunkomplexen eine große Rolle für die Immunogenität der CVLP-ICs. Welche Immunkomplex-Form sich bei den Experimenten von Da Silva et al. *in vivo* gebildet haben mögen, ist schwer kalkulierbar, da zwar die Menge an injizierten CVLPs (zehn Mal mehr als in dieser Arbeit) und auch die Antikörper Titer bekannt sind, nicht aber das Volumen, in welchem sich die Immunkomplexbildung abspielt. Auch hier könnten IgM Antikörper eine Rolle spielen. Zwar beträgt die Halbwertszeit von IgMs 10 Tage (Janeway, 1997), dennoch wäre wahrscheinlich auch ein Viertel des IgM Anfangstiters ausreichend (Da Silva et al. immunisierten CVLPs 21 Tage nach der VLP-Injektion), um die Immunogenität der ICs zu beeinflussen. Möglicherweise kam es bei den Experimenten bei Da Silva et al. zu quervernetzten IC-Aggregaten, die nicht mehr von den DCs aufgenommen werden konnten. Demnach müsste eine sehr gute ZTL-Antwort induziert werden, wenn ein hoher Titer an VLP-spezifischer Antikörper in den Mäusen vorhanden ist (wie bei Da Silva et al.) und danach aber mit CVLPs in sehr geringer Konzentration immunisiert wird.

Zwar lassen sich auf keinen Fall Daten des Maus-Modells direkt auf die Situation beim Menschen übertragen, aber auch in der klinischen Studie an CIN Patientinnen (siehe Tabelle 4) könnten präexistierende Antikörper, IgGs wie auch IgMs durch die zweifache Immunisierung der Patientinnen eine Rolle gespielt haben. Zusätzlich zeigt der Vergleich der Mindestmenge an CVLPs, die in Mäusen eine ZTL-Antwort induzieren kann und der in der klinischen Studie verwendeten CVLP Menge einen gravierenden Unterschied. Den Patientinnen hätten bei einem durchschnittlichen Gewicht von 60 kg und in Anlehnung an das Maus-Modell mindestens 3 mg CVLPs injiziert werden müssen, um eine effiziente ZTL-Antwort zu induzieren.

1.3 CVLPs in Kombination mit CpG ODN

CpG-reiche Oligonukleotide (CpG ODNs) induzieren über den *Toll-like* Rezeptor 9 (TLR-9) (Hemmi et al., 2000) die Expression kostimulatorischer Moleküle und Zytokine von DCs und fungieren somit *in vivo* als Adjuvans, welches die T_H1 Immunantwort unterstützt und somit zu einer effektiven ZTL-Antwort führt (Weiner et al., 1997; Akira, Takeda, and Kaisho, 2001). In dieser Arbeit konnte die Immunogenität der CVLPs durch CpG ODNs um ein Vielfaches gesteigert werden. Die von CVLPs induzierte Reifung der BMDCs wurde durch Zugabe von CpG um Faktor drei verbessert. Ebenso wurde die Antigenpräsentation der CVLPs durch CpG ODNs bis zu Faktor vier gesteigert. Die ZTL-Antwort konnte sowohl *in vitro* (bis zu Faktor neun) als auch *in vivo* (bis zu Faktor zehn) gesteigert werden. Wurden Mäuse mit BMDCs immunisiert, die zuvor mit CVLPs und CpG ODNs beladen worden waren, wurde die durch direkte Injektion der CVLPs mit CpG ODNs erhaltenen ZTL-Antwort nochmals um Faktor drei gesteigert.

Für die effiziente Immunogenität der CVLPs war der Zeitpunkt der CpG ODNs Zugabe ein entscheidender Faktor. Wurden die CpG ODNs vor bzw. zusammen mit CVLPs auf BMDCs beladen, so sank die Antigenpräsentation der BMDCs drastisch. Wurden die BMDCs aber zunächst mit CVLPs und nach vier Stunden mit CpG ODNs beladen, konnte die Antigenpräsentation gesteigert werden. Auch *ex vivo* gleichzeitig mit CVLPs und CpG ODNs beladene BMDCs konnten *in vivo* keine ZTL-Antwort induzieren, während BMDCs, welche zunächst mit CVLPs und danach mit CpG ODNs beladen worden waren, die ZTL-Antwort - wie oben erwähnt - sogar steigern konnten. Ferner konnte bei der CVLP-vermittelten Induktion der Reifung von BMDCs beobachtet werden, dass mit zunehmender CpG ODNs Konzentration (gleichzeitig verabreicht) das Verhältnis der Steigerung (Steigerungsfaktor ohne CVLPs/Steigerungsfaktor mit CVLPs) abnahm, während dieses Verhältnis bei zunehmender LPS Konzentration anstieg. Daraus wurde geschlossen, dass CVLPs und CpG ODNs möglicherweise den gleichen Aufnahme- bzw. Aktivierungsweg in BMDCs nutzen und somit ab einer bestimmten CpG ODNs Konzentration die Aufnahme oder Antigenpräsentation der CVLPs inhibiert wird. Würde eine Blockierung schon bei der Aufnahme in die Zelle erfolgen, so müssten CpG ODNs das Potential besitzen, die Bindung der CVLPs zu verhindern. Dies könnte entweder durch Blockade des CVLP-Rezeptors/Rezeptorkomplex* oder durch das Anhaften an die CVLPs und daraus resultierender Bedeckung von deren Rezeptorbindungsstellen geschehen (siehe Abbildung 43). Möglicherweise sind auch vier Stunden nach ihrer Zugabe noch ausreichend Moleküle von CpG ODNs vorhanden, um eine Aufnahme der CVLPs zu verhindern. Nach den Daten von Zhou et al. müsste die Aufnahme der CVLPs in die Zellen nach vier Stunden abgeschlossen sein (Zhou et al., 1995a), so dass die CpG ODNs-Zugabe nach dieser Zeit keinen negativen Einfluss mehr auf die CVLP-Aufnahme haben dürfte.

* Für Papillomviren existieren potentielle Rezeptorkandidaten wie α -6-Integrin [Evander, 1997 #245] [McMillan, 1999 #246], Heparin-Sulfat bzw. Zelloberflächen Glykosaminoglykan (GAG) [Joyce, 1999 #247] [Giroglou, 2001 #248] [Combata, 2001 #249] [Bousarghin, 2003 #251] und Fc γ R I (CD16), dem eine Rolle in einem Rezeptorkomplex zugesprochen wird [Da Silva, 2001 #166].

Dies würde erklären, warum die Beladung der BMDCs in dieser Reihenfolge und unter dieser zeitlicher Berücksichtigung zu einer gesteigerten Reifung von und Antigenpräsentation durch BMDCs führte.

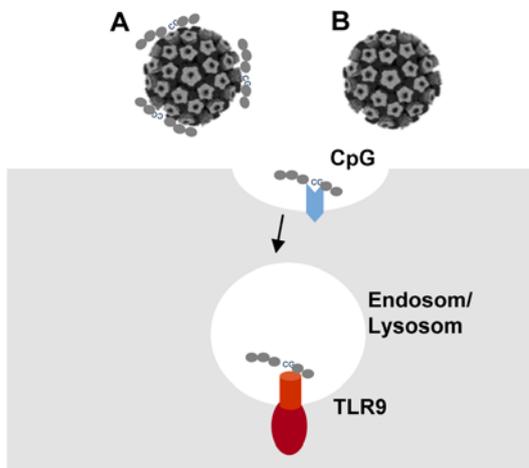


Abbildung 43: Modell der möglicher Inhibition der CVLP-Aufnahme durch CpG ODNs

ODNs könnten die Bindung der CVLPs an BMDCs auf zwei Arten inhibieren: (A) CpG ODNs bedecken wichtige Bindungsstellen der CVLPs, so dass sie nicht mehr an ihre Rezeptoren binden können, (B) CpG ODNs und CVLPs nutzen den selben Rezeptor bzw. Komponenten eines Rezeptorkomplex, um in die Zelle einzudringen. Gebundene CpG ODNs inhibieren so die Aufnahme von CVLPs und lösen gleichzeitig über den TLR9 die beschriebene Signaltransduktionskaskade aus, die die Transkription von Genen zur Folge hat, die für die Reifung der BMDCs essentiell sind (vergleiche Abbildung 7). TLR9: Toll-like receptor 9; (nach Hacker, Redecke, and Hacker, 2002)

Zur Überprüfung der Hypothese einer Konkurrenz zwischen CVLPs und CpG ODNs könnte man die Bindungskapazität von CVLPs an BMDCs analysieren, die gleichzeitig bzw. zuvor mit CpG ODNs beladen worden sind. Eine andere Erklärung für die verminderte Antigenpräsentation bei gleichzeitiger Zugabe von CpG ODNs und CVLPs wäre, dass sich CpG ODNs und CVLPs nach ihrer unabhängigen Aufnahme bei der Aktivierungs- und Prozessierung negativ beeinflussen. Zum Beispiel konnten ORFs von Poxviren identifiziert werden, die eine Ähnlichkeit mit der *Toll*-IL-1 Rezeptor (TIR) Domäne besitzen (A.3.3) und u.a. die TLR4 übermittelte Signaltransduktion supprimieren können (Bowie et al., 2000). Weder das HPV16 Hauptkapsidprotein L1 noch E7 beinhalten in ihrer Sequenz Abschnitte, die der TIR-Domäne ähneln wie im Rahmen dieser Arbeit mittels Sequenzvergleich nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise könnten jedoch CVLPs durch das Binden an TLR9 die Aktivierung der BMDCs durch CpG ODNs reduzieren. Im Gegenzug könnten CpG ODNs bei gleichzeitiger oder vorheriger Beladung indirekt in den MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg der CVLPs eingreifen. Lenz et al. zeigten, dass die Reifung von DCs (induziert durch LPS bzw. $\text{TNF}\alpha$ Zugabe) die Bindung von VLPs (gemessen 24 Stunden nach Induktion der Reifung) negativ beeinflusst (Lenz et al., 2003). Es bleibt nachzuweisen, ob die BMDCs in den hier diskutierten Experimenten durch den CpG ODNs Kontakt so schnell reiften, dass die Bindung der CVLPs bei gleichzeitiger bzw. um vier Stunden versetzter Zugabe von CpG ODNs um ca. 50 % reduziert wurde.

CpG ODNs eignen sich nach den Befunden der vorliegenden Arbeit, die Immunogenität von CVLPs zu steigern. Bei der *ex vivo* Beladung ist für die Steigerung der Effizienz der Immunogenität der CVLPs darauf zu achten, dass CpG ODNs erst nach der CVLP-Aufnahme zugegeben werden.

1.4 Sorbitol-Behandlung CVLP-beladener BMDCs

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass hyperosmotischer Stress in BMDCs ebenfalls zu einer Steigerung der Immunogenität der CVLPs führte. CVLP-beladene BMDCs, die mit Sorbitol behandelt wurden, wurden - im Vergleich zu BMDCs ohne Sorbitol - stärker zur Reifung und damit zur Expression kostimulatorischer Signale induziert. Dieser additive Effekt setzte sich auch in der Antigenpräsentation fort. Durch CVLP-beladene BMDCs, die vor der Injektion in Mäuse mit Sorbitol behandelt wurden, konnte die ZTL-Antwort um den Faktor fünf gesteigert werden (mit CpG ODNs Faktor drei). Eine Sorbitol-Behandlung alleine konnte in den BMDCs nur eine schwache Reifung induzieren, die deutlich unter derjenigen der CVLP-induzierten Reifung lag. Zudem war die Sorbitol-Behandlung effizienter, wenn sie ca. eine halbe Stunde vor der Überprüfung der Reifung bzw. Antigenpräsentation der BMDCs durchgeführt wurde. Demnach müssen die Vorgänge, die zu dieser Steigerung führten, im Vergleich zu einer Reifeinduktion durch CVLPs (24-48 Stunden) relativ schnell ablaufen. Möglich wäre, dass durch CVLPs eine Expression von kostimulatorischen Moleküle in den BMDCs schon ausreichend induziert wurde, dass die Moleküle aber noch teilweise intrazellulär vorliegen und erst durch den hyperosmotische Stimulus an die Zelloberfläche transportiert werden (ähnlich wie MHC Klasse II Moleküle (vergleiche Abbildung 5)). Wie in Keratinozyten könnte auch in BMDCs durch den hyperosmotischen Stress die MAPK p38 aktiviert worden sein (siehe A.17) (Alonso, persönliche Mitteilung; Cheng et al., 2002), die selbst wiederum eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren aktiviert. Neben der Produktion von Zytokinen könnten auch kostimulatorische Signale als Folge der Aktivierung exprimiert werden. Wie in der Einleitung schon erwähnt, hat die Aktivierung der MAPK p38 in Keratinozyten auch eine Aktivierung des EGFR zur Folge (Alonso, persönliche Mitteilung), möglicherweise gibt es ähnliche Aktivierungen auch in BMDCs, die wiederum mit der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen assoziiert ist. *Downstream* gelegene Substrate von p38 MAPK sind auch in die Produktion von $\text{INF}\gamma$ involviert (Servant, Grandvaux, and Hiscott, 2002). Daher könnte vermutet werden, dass bei der Überprüfung der Antigenpräsentation mittels intrazellulärer $\text{INF}\gamma$ Färbung solche T-Zellen erfasst wurden, die durch das Sorbitol zur unspezifischen $\text{INF}\gamma$ -Produktion stimuliert worden waren. Kontrollen zeigten allerdings, dass dies nicht der Fall war (PBS-beladene BMDCs produzierten kein $\text{INF}\gamma$).

Bei Literaturrecherchen konnten keine Einträge bezüglich einer Steigerung der ZTL-Antwort durch die Verwendung von Sorbitol (o.ä. Zuckeralkoholen)-behandelten und Antigen-beladenen BMDCs gefunden werden. Moore et al. nutzten allerdings in ihren Experimenten osmotische Lyse von Pinosomen aus, um lösliches OVA Protein in den MHC Klasse I Präsentationsweg in Zellen einzuschleusen (Moore, Carbone, and Bevan, 1988). Die Autoren inkubierten die Zellen zusammen mit dem Antigen und 500 mM Saccharose, nach der Aufnahme wurden die Zellen ohne Saccharose weiter inkubiert. Die folgende Lyse der OVA-geladenen Pinosomen ermöglichte es dem Antigen, in das Zytoplasma und von dort in den MHC Klasse I

Antigenpräsentationsweg zu gelangen. In dieser Arbeit kann die gesteigerte Immunogenität der CVLPs nicht auf der Lyse von CVLP-haltigen Vesikeln beruhen, da zwischen Antigenaufnahme und Sorbitol-Behandlung 48 Stunden lagen und die Zellen danach nicht mehr unter hypo-osmotischen Bedingungen (ohne Sorbitol) inkubiert wurden.

2. Nachweismethoden Antigen-spezifischer ZTLs

In dieser Arbeit wurden zum Nachweis Antigen-spezifischer ZTLs unterschiedliche Methoden verwendet: MHC-I Tetramer Färbung, IFN γ -EliSpot, intrazelluläre IFN γ Färbung und Zytotoxizitätstest (Cr⁵¹ *release assay*). Diese Nachweismethoden wurden in unserem Labor miteinander verglichen, da sie sich sowohl in ihrer Sensitivität als auch in ihrer qualitativen Aussage unterscheiden (siehe auch C.48; Michel et al., 2002; Freyschmidt und Michel, 2003). Die Ergebnisse zeigten, dass die qualitative Aussage der einzelnen Methoden gut miteinander korrelierte, obwohl die MHC-I Tetramer Färbung nur die Spezifität des TZR berücksichtigt, während die intrazelluläre IFN γ Färbung und der IFN γ -EliSpot zusätzlich zur TZR-Spezifität die anschließende Aktivierung der ZTLs nachweist und der Zytotoxizitätstest (Cr⁵¹ *release assay*) TZR-Spezifität, Aktivierung und zytotoxische Funktion der T-Zellen (Lyse der Antigen-präsentierenden Zelle) belegt. Allerdings unterschieden sich die Methoden in ihrer Sensitivität. Als besonders sensitiv bei *ex vivo* Daten erwiesen sich die MHC-I Tetramer Färbung und der IFN γ -EliSpot. Letztere Nachweismethode wurde in der vorliegenden Arbeit bevorzugt, da sie zusätzlich zum Spezifitätsnachweis auch einen Funktionalitätsnachweis erbringen konnte. Zudem standen nur MHC-I-E7₄₉₋₅₇ Tetramere zur Verfügung während die Mehrheit der Immunisierungsversuche mit HPV16L1 Δ C E7₁₋₅₅ CVLPs durchgeführt wurde. Die intrazelluläre IFN γ Färbung hatte sich zwar als weniger sensitiv erwiesen, jedoch konnten durch diese Methode unter den Milzzellen durch die Verwendung von Peptid-beladenen Zellen und Transfektanten T-Zellen mit potentieller unterschiedlicher Spezifität (siehe D.1.2.4.) nachgewiesen werden, eine Option die bei MHC-I Tetramer Färbung oder IFN γ -EliSpot nicht möglich ist. Eine Quantifizierung der Daten erwies sich mit dem Zytotoxizitätstest (Cr⁵¹ *release assay*) als schwierig, viel eher war eine positiv/negativ Aussage möglich, nicht aber, ob verschiedene Immunisierungen unterschiedlich effizient verlaufen waren. Zusätzlich zeigte sich diese Methode als nicht sehr sensitiv, da der Zytotoxizitätstest erst nach oft mehrmaligem Restimulieren der T-Zellen erfolgreich durchgeführt werden konnte, was aber die Gefahr eines *in vitro* Primings naiver T-Zellen in Kultur mit sich brachte.

3. MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg von CVLPs und CVLP-ICs

MHC Klasse I und MHC Klasse II- assoziierte Antigenpräsentation ist generell durch zwei verschiedene Wege gesteuert. Der ‚klassische‘ MHC Klasse II Antigenpräsentationsweg beinhaltet die Aufnahme von exogenen Antigenen über Endozytose (Rezeptor-vermittelt oder unspezifisch) oder Phagozytose in Endosomen, deren Ansäuerung letztendlich zur proteolytischen Degradation des Antigens führt. Diese Endosome fusionieren mit Lysosomen, welche via Golgi-Komplex vom ER kommen und neu synthetisierte MHC Klasse II Moleküle tragen. In den durch die Fusion entstandenen Endolysosomen bzw. dem *MHC class II containing compartment* (MIIC) binden die Antigenpeptide an die MHC Klasse II Moleküle, deren Peptidbindungsstelle nun freigelegt sind (durch Spaltung der invarianten Kette und Freisetzung von CLIP (Romagnoli and Germain, 1994)) (Cresswell, 1994). Die MHC Klasse II-Antigenpeptid-Komplexe werden danach an die Oberfläche transportiert und interagieren dort mit den TZR von CD4⁺ T-Zellen.

Im ‚klassischen‘ MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg werden endogene Antigene (z.B. virale Proteine) im Zytoplasma (Proteasom-abhängig) zu Oligopeptiden degradiert und mittels TAP in das ER geschleust, wo sie an neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle binden. Die so stabilisierten Antigenpeptid-MHC Klasse I Moleküle werden dann via Golgi-Komplex an die Zelloberfläche transportiert und werden dort von CD8⁺ T-Zellen (ZTLs) erkannt (Rock, 1996). Der ‚klassische‘ MHC Klasse I Antigenpräsentationsweg kann durch den Verlust der TAP-Funktionalität oder die Behandlung der Zellen mit Proteasom-Inhibitoren oder Brefeldin A (BFA) blockiert werden (Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995) (siehe auch A.3.5). Diese beiden ‚klassischen‘ Antigenpräsentationswege sind - wie zuvor schon erwähnt - nicht komplett voneinander getrennt, denn exogene Antigene können unter bestimmten Bedingungen ebenfalls in den MHC Klasse I Weg eingeschleust und so *cross* präsentiert werden und folglich ZTLs *primen* (*cross Priming*) (siehe Abbildung 44) (Bevan, 1987; Carbone et al., 1989; Kovacsovic-Bankowski and Rock, 1995; Albert, Sauter, and Bhardwaj, 1998; Rodriguez et al., 1999).

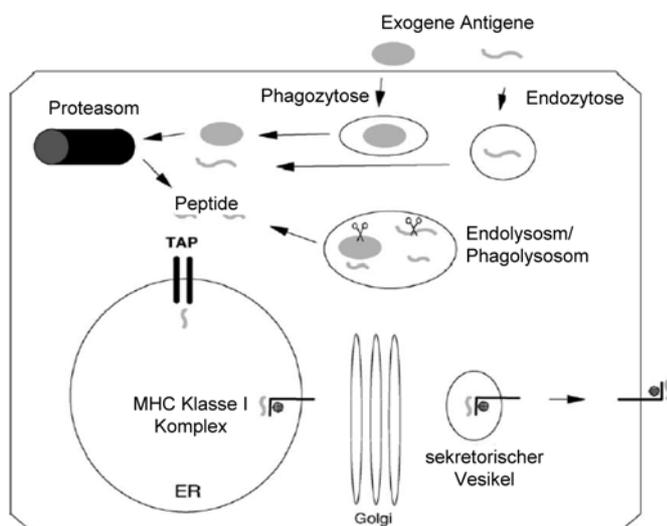


Abbildung 44: Cross Präsentation: Einschleusen von exogenen Antigenen in den ‚klassischen‘ MHC Klasse I Präsentationsweg
Exogene Antigene werden mittels Phagozytose/ Endozytose in DCs aufgenommen und entweder in das Zytoplasma entlassen und dort durch den Proteasom-Komplex degradiert oder sie werden in Endolysosomen/Phagolysosomen degradiert und dann als Antigenpeptide in das Zytoplasma freigegeben. Die Antigenpeptide werden mittels TAP in das ER geschleust und dort auf neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle geladen, die ihren Weg über den Golgi-Komplex an die Zelloberfläche antreten. (nach [Gromme, 2002])

In dieser Arbeit wurden sowohl CVLPs als auch deren Immunkomplexe erfolgreich von BMDCs *cross* präsentiert, was zu einem *cross Priming* von ZTLs *in vitro* und *in vivo* führte. Im Gegensatz zu CVLPs waren CVLP-ICS auch in sehr geringen Konzentrationen noch immunogen. Es sollte daher untersucht werden, ob diese Tatsache womöglich auf einem unterschiedlichen Antigenpräsentationsweg beruht, was sich auch zunächst bei einem der ersten Experimente angedeutet hatte. Weitere Analysen ergaben allerdings, dass sich die Präsentationswege beider Antigen-Formationen nicht unterschieden: Sie waren zwar BFA sensitiv, was zunächst auf eine ‚klassische‘ MHC Klasse Präsentation hinwies, aber nicht TAP-abhängig, was einen ‚klassischen‘ MHC Klasse I Präsentationsweg ausschloss.

Auch anderen Antigenen konnte nachgewiesen werden, dass sie TAP-unabhängig *cross* präsentiert werden wie z.B. Sendai Virus Antigen (Zhou et al., 1995b; Liu et al., 1997), das Glyko- und Nukleoprotein des Lymphozytären Choriomeningitis Virus (LCMV) (Bachmann et al., 1995) bzw. Influenzavirus Antigen (Sigal and Rock, 2000) und das Nukleoprotein des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) (Bachmann et al., 1995), sowie rekombinantes *E. coli* (Campbell, Serwold, and Shastri, 2000). Dieser alternative Präsentationsweg (siehe Abbildung 45) beinhaltet die Prozessierung von Peptiden in einem endosomalen Kompartiment bzw. Phagolysosom (Schirmbeck and Reimann, 1994; Martinez-Kinader et al., 1995; Schirmbeck, Melber, and Reimann, 1995; Liu et al., 1997), die dann zum einen wieder an die Zelloberfläche transportiert werden und extrazellulär an Antigenpeptid-empfindliche MHC Klasse I Moleküle auf der Zelloberfläche binden (Pfeifer et al., 1993; Harding and Song, 1994; Song and Harding, 1996).

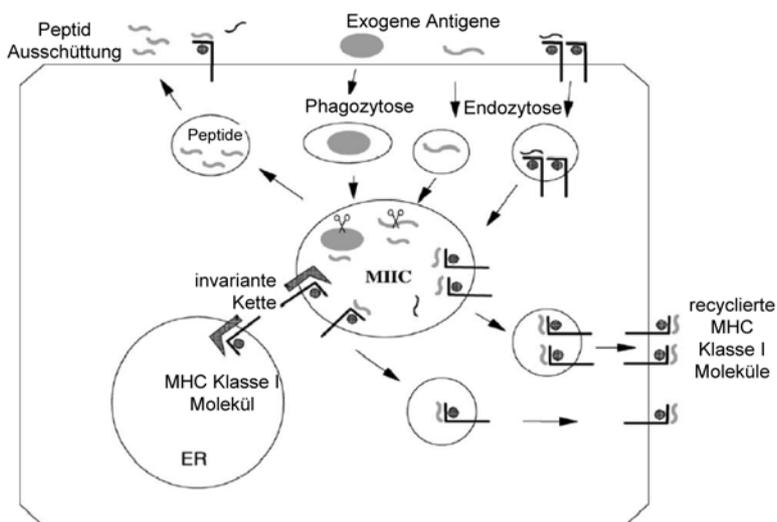


Abbildung 45: Cross Präsentation: Einschleusen von exogenen Antigenen in einen alternativen MHC Klasse I Präsentationsweg (post Golgi-Beladung)

Exogene Antigene werden mittels Phagozytose/Endozytose in DCs aufgenommen und in spezialisierten endozytischen Kompartimenten (MIIC) degradiert. Die Antigenpeptide können dann entweder durch Exozytose ausgeschüttet werden und binden extrazellulär an MHC Klasse I Moleküle (Peptidaustausch). Zusätzlich können Antigenpeptide in den MIIC an MHC Klasse I Moleküle binden, die entweder diese Kompartimente durch Assoziation mit der invarianten Kette erreichen (neu synthetisierte MHC I) oder durch Endozytose in Vesikel aufgenommen wurden, welche mit den MIIC fusionieren (Peptidaustausch mit ‚recyclierten‘ MHC I). MIIC: MHC II Kompartiment; ER: Endoplasmatisches Reticulum (nach Gromme and Neefjes, 2002)

In anderen Studien konnte aber gezeigt werden, dass Antigenpeptide TAP-unabhängig *cross* präsentiert werden, obwohl sie nicht extrazellulär auf MHC Klasse I Moleküle geladen werden (Kovacovics-Bankowski et al., 1993; Kovacovics-Bankowski and Rock, 1995; De Bruijn, Jackson, and Peterson, 1995; Schirmbeck and Reimann, 1996; Albert, Sauter, and Bhardwaj, 1998). Für diese Befunde gibt es

unterschiedliche Modelle des Antigenpräsentationswegs (siehe Abbildung 45): (i) die Beladung könnte sofort in den endosomalen Kompartimenten stattfinden, welche neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle durch einen direkten Transport vom ER via Golgi-Komplex erreichen würden (De Bruijn, Jackson, and Peterson, 1995), (ii) die Beladung könnte in den endosomalen Kompartimenten auf MHC Klasse I Moleküle stattfinden, die von der Zelloberfläche internalisiert wurden. Dabei werden die schon gebundenen Peptide der MHC Klasse I Moleküle pH-abhängig gegen die ‚neuen‘ Antigenpeptide ausgetauscht und danach als ‚recycelte‘ Antigenpeptid-MHC Klasse I-Komplex wieder an die Zelloberfläche transportiert (Gromme et al., 1999).

Nach den hier präsentierten Ergebnissen kann eine extrazelluläre Beladung der CVLP-Antigenpeptide ausgeschlossen werden, da diese auch hätte stattfinden müssen, wenn die BMDCs mit BFA behandelt worden waren (vergleiche Abbildung 45). Denn die E7₄₉₋₅₇ Peptide, welche in einem Kontrollversuch auf BFA behandelte RMA-S Zellen geladenen worden waren, konnten unverändert präsentiert werden. Ebenfalls ausgeschlossen ist eine Präsentation als ‚recycelte‘ Antigenpeptid-MHC Klasse I-Komplex, da diese nicht BFA-sensitiv ablaufen würde. Möglicherweise werden die von den CVLPs stammenden Antigenepitope in den endolysosomalen Kompartimenten degradiert und dort auf neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle geladen, deren Präsenz wahrscheinlich von einem funktionellen ER-Golgi-Transport abhängt (also BFA-sensitiv ist), und so TAP-unabhängig an der Zelloberfläche präsentiert (siehe Abbildung 46).

Diese Hypothese könnte möglicherweise mit der Verwendung von Chloroquin überprüft werden, da dieses Reagenz die endosomale Ansäuerung inhibiert und somit die Beladung auf MHC Klasse I Moleküle in MIIC verhindert (Ziegler and Unanue, 1982). Allerdings ist auch das Sinken des pH-Wertes in den Endosomen für die Entkomplexierung von ICs verantwortlich, welches wahrscheinlich die Voraussetzung für einen Austritt der Antigene in das Zytoplasma ist (Rodriguez et al., 1999). Es ist also fraglich, ob Chloroquin im Falle der CVLP-ICs Aufschluss über diese Frage geben kann. Die TAP-unabhängige MHC Klasse I Antigenpräsentation wird meist als weniger effizient beschrieben als die TAP-abhängige Antigenpräsentation (Campbell, Serwold, and Shastri, 2000; Sigal and Rock, 2000). In dieser Arbeit wurden CVLPs wie auch CVLP-ICs mit gleicher Effizienz von BMDCs und TAP^{-/-} BMDCs präsentiert. Diese Eigenschaft ist entweder Folge einer Antigenpräsentation, die auch in BMDCs mit funktionellem TAP TAP-unabhängig abläuft oder auf einer tatsächlich gleichen Effizienz der beiden Antigenpräsentationswege, TAP-abhängig/unabhängig, beruht.

Möglicherweise unterliegt die TAP-unabhängige, jedoch BFA-sensitive MHC Klasse I Antigenpräsentation von CVLPs und CVLP-ICs einem völlig anderen Mechanismus, der bis auf die TAP-Nutzung alle anderen Wegpunkte einer ‚klassischen‘ MHC Klasse I Präsentation von exogenen Antigenen einschließt: der Weg vom Endosom in das Zytoplasma (Rodriguez et al., 1999), Degradation durch das Proteasom (Rock et al., 1994), nach dem Eintritt in das ER Beladung auf nascente MHC Klasse I Moleküle und anschließender Transport

der Antigen-MHC Klasse-I-Komplexe via Golgi-Komplex an die Zelloberfläche. Ein solcher Weg hängt allerdings von einem TAP-unabhängigen Transport der CVLP-Epitope in das ER ab (Abbildung 46).

Müller et al. konnten zeigen, dass L1 und E7 nach Aufnahme von CVLPs in Affennieren-Epithelzellen, also keine APCs, zunächst im Zytoplasma und danach im ER lokalisiert ist (Müller et al., 1997). Somit nutzen CVLPs wahrscheinlich einen effektiven Endosom-Zytosol-Weg, der nicht wie im Falle der OVA-ICs (Rodriguez et al., 1999) auf APC beschränkt zu sein scheint. Nach den Befunden von Müller et al. könnten sich auch in BMDCs L1 und E7 bzw. deren Peptide nach CVLP- bzw. CVLP-IC-Beladung im ER befinden, eine Voraussetzung, um dort auf nascente MHC Klasse I Moleküle geladen zu werden und ihren Weg über den Golgi-Komplex an die Zelloberfläche anzutreten. Zwar zeigten Müller et al. nicht die ER-Lokalisation von L1 bzw. E7 in TAP^{-/-} Zellen, da aber in der vorliegenden Arbeit die Antigenpräsentation von CVLPs TAP-unabhängig und mit gleicher Effizienz in normalen bzw. TAP^{-/-} BMDCs verlief, ist davon auszugehen, dass die L1 und E7 Proteine bzw. bestimmte Peptide TAP-unabhängig in das ER gelangen. Dieser Antigenpräsentationsweg könnte von der Prozessierung der Proteine im Zytoplasma abhängig sein, was sich durch die Verwendung unterschiedlicher Substanzen (z.B. Peptidaldehyde), welche die Proteasomen inhibieren, überprüfen ließe (Rock et al., 1994). Möglicherweise würden aber CVLPs wie auch CVLP-ICs schon teilweise in den Endolysosomen gespalten werden, dann ohne Proteasom-Teilnahme in das ER eintreten und von den dortigen Proteasen zu den Antigenepitopen degradiert werden.

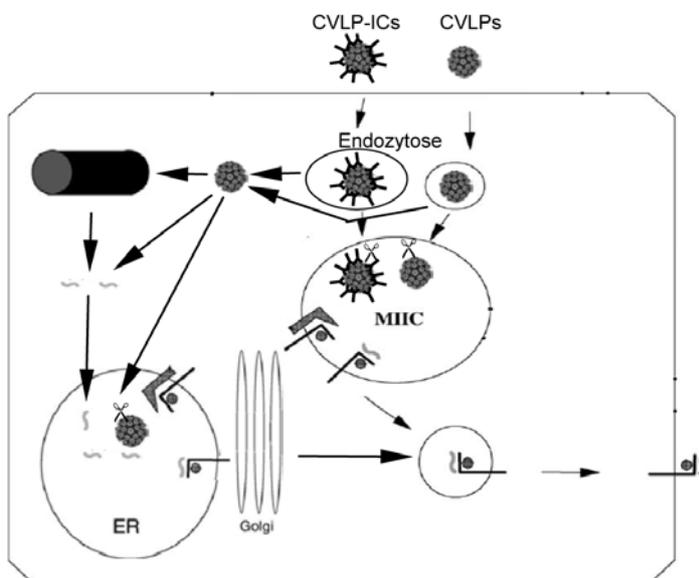


Abbildung 46: Modell für die Cross Präsentation von CVLPs und CVLP-ICs

CVLPs/CVLP-ICs werden durch Endozytose aufgenommen und entweder in MIIC degradiert und dort auf MHC Klasse I Moleküle geladen, die dieses Kompartiment durch Assoziation mit der invarianten Kette erreichen (neu synthetisierte MHC) oder sie werden in das Zytoplasma freigesetzt. Dort werden sie möglicherweise vom Proteasom-Komplex degradiert und gelangen als Antigenpeptide TAP-unabhängig in das ER. Alternativ könnten die CVLPs auch direkt oder teilweise degradiert in das ER gelangen und dort vollständig degradiert werden. Im ER werden die Antigenpeptide auf neu synthetisierte MHC Klasse I Moleküle geladen und werden über den Golgi-Komplex an die Zelloberfläche transportiert. MIIC: MHC II Kompartiment; ER: Endoplasmatisches Reticulum (nach Gromme and Neefjes, 2002 modifiziert)

Es existieren einige gut definierte Peptidtypen, die TAP-unabhängig in das ER gelangen können: (i) Peptide, die von natürlichen, hydrophoben Signalsequenzen stammen und damit einen direkten Eintritt in das ER ermöglichen (Henderson et al., 1992; Wei and Cresswell, 1992), (ii) Peptide, die künstlich mit dem N-Terminus einer Signalsequenz von sekretorischen Proteinen verknüpft wurden (‘Trojanische Antigene’) und dann z.B. im ER durch Proteasen getrimmt werden (Anderson et al., 1991; Bacik et al., 1994; Yewdell et al.,

1998; Lu et al., 2001) und (iii) Peptide von Transmembran-Proteinen (Lee et al., 1996; Hammond et al., 1993). Das L1 bzw. E7 Protein von HPV16 besitzt keine Sequenzen, die mit denen von Signalsequenzen bzw. Translokationssequenzen (Anderson et al., 1991; Wei and Cresswell, 1992; Lu et al., 2001) übereinstimmen, allerdings gibt es eine direkte Übereinstimmung von 36 % zwischen den AS 68-78 von L1 und dem Signalpeptid von IP-30 (Wei and Cresswell, 1992) wie durch AS-Sequenzanalyse nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Werden bei diesem Vergleich auch die Ladungen der AS berücksichtigt, steigt die Ähnlichkeit der beiden Sequenzen auf 73 %. Bacik et al. zeigten allerdings, dass die alleinige Existenz hydrophober Aminosäuren möglicherweise nicht für einen erfolgreichen ER-Transport ausreicht (Bacik et al., 1994). Ob also diese L1-Sequenz (AS 68-78) fähig ist, um ein L1₁₆₅₋₁₇₃-Epitop 165-173 bzw. E7₄₉₋₅₇-Epitop enthaltende Polypeptid TAP-unabhängig in das ER zu transportieren bleibt fraglich. Das L1₁₆₅₋₁₇₃ bzw. das E7₄₉₋₅₇ Epitop selbst beinhaltet zwar auch hydrophobe AS (4/9 bzw. 5/9), allerdings würden diese nicht ausreichen, um ein Verhalten als Transmembran-Protein zu erklären.

Gagnon et al. entdeckten, dass in Makrophagen eine ER-vermittelte Phagozytose stattfindet, die neben der Aufnahme von intrazellulären Pathogenen (wie *Leishmania donovani* und *Salmonella typhimurium*) auch die Aufnahme von Latex Kügelchen über FcRs vermitteln kann (Gagnon et al., 2002). Bei dieser Aufnahme in die Zelle bindet das extrazelluläre Antigen an die Zelloberfläche und wird von der Zellmembran teilweise umschlossen. Anschließend fusioniert das ER mit der Plasmamembran an der Stelle des Umschließens und öffnet sich somit für das extrazelluläre Antigen, welches dann in das ER aufgenommen wird. Ein solcher Mechanismus wurde für BMDCs bzw. für die Endozytose von extrazellulären Antigenen noch nicht gezeigt. Würde aber beides stattfinden, könnten so CVLPs bzw. CVLP-ICs direkt in das ER gelangen. Diese Hypothese birgt viele Widersprüche, da zum einen HPV16 VLPs über Clathrin-vermittelte Endozytose und nicht Phagozytose in BMDCs aufgenommen werden (Day, Lowy, and Schiller, 2003), und zum anderen CVLPs nach Zelleintritt zunächst im Zytoplasma, genauer in perinuklearen Mustern und danach im ER gesichtet werden (Muller et al., 1997).

Um den ungewöhnlichen (TAP-unabhängigen und doch BFA-sensitiven) Antigenpräsentationsweg der CVLPs und CVLP-ICs weiter zu klären, sind noch einige Analysen (s. oben) notwendig. Da aber beide Antigen-Formationen den gleichen Präsentationsweg zu gehen scheinen, ist dieser entweder schon durch eine gemeinsame Zellaufnahme gesteuert - dagegen spricht, dass die Antigenpräsentation anderer ICs komplett TAP-abhängig verläuft (Rafiq, Bergtold, and Clynes, 2002) - oder durch die Formation und Eigenschaften der CVLPs selbst bestimmt. Die Tatsache, dass CVLP-ICs bei geringer Konzentration effizienter ZTLs *primen* können als CVLPs alleine, kann nach den bisherigen Befunden nicht auf deren unterschiedlichen Präsentationsweg zurückgeführt werden.

4. Immunogenität von HPV16 L1 Kapsomeren

CVLPs wurden entwickelt (Muller et al., 1997), um eine prophylaktische und therapeutische Vakzinierung zu kombinieren. Die Herstellung von CVLPs in Insektenzellen mittels rekombinanter Bakuloviren und anschließender Aufreinigung ist relativ zeitaufwendig und Material-verbrauchend. Die Produktion der Untereinheit von VLPs und CVLPs, die Kapsomere, ist im Vergleich einfacher, da Kapsomere durch die Expression des Hauptstrukturproteins L1 als GST-Fusionsprotein in Bakterien hergestellt werden können. Die Untersuchung der *in vivo* Immunogenität von Kapsomeren zeigte, dass sie hohe Antikörpertiter erzeugen können (Rose et al., 1998), die im Falle des *canine oral papillomavirus* (COPV) eine Infektion verhindern (Yuan et al., 2001). In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Immunisierung von Mäusen mit HPV16 L1 Kapsomeren eine Induktion von ZTLs und Tumorregression zur Folge hatte (Ohlschlager et al., 2003). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte *in vitro* Immunogenität zeigte, dass Kapsomere wie CVLPs BMDCs zur Reifung induzieren als auch von BMDCs präsentiert werden. Zwar war im Vergleich die Reifeinduktion bei BMDCs durch CVLPs stärker, dies aber war mit großer Wahrscheinlichkeit auf die Verwendung einer geringeren Menge an Kapsomeren, die teilweise degradiert waren (HPLC Untersuchung, Daten nicht gezeigt), zurückzuführen. Demnach reicht die pentamere Struktur der Kapsomere aus, um eine Immunantwort zu induzieren, die mit denen von CVLPs vergleichbar sind. Aggregate von Monomeren, die keine pentameren Strukturen bilden (fälschlicherweise bei Lenz et al. als Kapsomere bezeichnet), sind dazu nicht in der Lage (Lenz et al., 2001).

Kapsomere besitzen offensichtlich alle immunogenen Eigenschaften von CVLPs, sind aber im Vergleich einfacher herzustellen und sind deshalb möglicherweise im Hinblick auf eine potentielle prophylaktische und therapeutische Vakzine attraktiver.

F. Zusammenfassung

High-risk Papillomviren des Menschen (z.B. HPV16) stellen das ätiologische Agens von Gebärmutterhalskrebs (Zervixkarzinom) und dessen Vorstufen dar. Das Zervixkarzinom ist weltweit der dritt häufigsten Krebs bei Frauen. Trotz chirurgischer Entfernung des Tumors und einer anschließenden Kombination aus Strahlen- und Chemotherapie entwickeln 35% der Patientinnen Rezidive, für die heute keine effektive Therapie existiert. In der Pathogenese von HPV-assoziierten zervikalen Läsionen spielt die zelluläre Immunantwort eine große Rolle, was die Möglichkeit einer therapeutischen Vakzinierung bietet, welche die Progression von HPV-assoziierten Läsionen verhindern und eine Regression der Läsionen bedingen sollte.

Einen potentiellen therapeutischen Impfstoff stellen HPV16 chimäre *virus-like particles* (CVLPs) dar, bestehend aus dem C-terminalen verkürzten Hauptkapsidprotein L1 und Teilen des E7 Proteins (HPV16L1ΔCE7). E7 ist in Zervixkarzinomzellen konstitutiv exprimiert und wird deshalb als potentielles Tumorantigen angesehen. CVLPs erwiesen sich in präklinischen Studien als immunogen, doch eine noch nicht abgeschlossene klinische Studie zeigte, dass die Immunogenität von CVLPs beim Menschen noch verbessert werden muß. In dieser Arbeit sollte daher die Immunogenität von CVLPs im Maus-Modell moduliert werden, um so möglicherweise auch Verbesserungsansätze für die Anwendung beim Menschen zu schaffen. Dazu wurden Dendritische Zellen (DCs) aus dem Knochenmark der Mäuse (BMDCs) präpariert und mit CVLPs entweder als Immunkomplexe (CVLP-ICs) oder in Kombination mit unmethylierten Cytidin-Phosphat-Guanosin Oligodinukleotiden (CpG ODNs) beladen. Zudem wurden CVLP-beladene BMDCs durch Sorbitol hyperosmotischem Streß ausgesetzt, eine Methode, die in dieser Arbeit erstmalig beschrieben wird.

Obwohl CVLP-ICs ähnlich wie CVLPs BMDCs zur Reifung induzieren konnten, stellten sie sich im Gegensatz zu CVLPs sowohl bei der *cross* Präsentation wie auch bei der Generierung von zytotoxischen T-Lymphozyten auch bei geringen Mengen als sehr immunogen heraus. Dieser Unterschied beruht nicht auf der Nutzung unterschiedlicher MHC Klasse I Präsentationswege, da beide Antigene in einen gemeinsamen, ungewöhnlichen Weg eingeschleust wurden, welcher *transporter of antigen presentation* (TAP)-unabhängig, jedoch Brefeldin A-sensitiv war. CpG ODNs konnten die Immunogenität der CVLPs verbessern, allerdings nur dann, wenn sie vier Stunden nach CVLP-Beladung auf BMDCs geladen wurden. Die Sorbitol-Behandlung führte bei CVLP-beladenen BMDCs ebenfalls zu einer Steigerung der Immunogenität. BMDCs erwiesen sich nicht nur als Bestandteil der Methoden zur Überprüfung der Immunogenität als sehr effizient, sondern auch als ‚*nature’s adjuvans*‘ und führten so ebenfalls zu einer Verbesserung der Immunogenität der CVLPs. Dabei wurden Mäuse mit BMDCs immunisiert, die *ex vivo* mit CVLPs, CVLP-ICs bzw. CVLPs in Kombination mit CpG ODNs beladen wurden bzw. mit CVLPs beladen und dann mit Sorbitol behandelt wurden.

Die hier im Maus-Modell gezeigten Strategien zur Verbesserung der Immunogenität von CVLPs könnten möglicherweise auch beim Menschen Anwendung finden und so eine effektive therapeutische Vakzinierung gegen das Zervixkarzinom und seine Vorstufen darstellen.

G. Abkürzungen und Symbole

7-AAD	7-Amino-Actinomycin D
A	Alanin
Abb.	Abbildung
ad	zu
Ag	Antigen
AIDS	Erworbenes Immunschwäche-Syndrom (<i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
AK	Antikörper
AP	assoziiertes Protein
APC	Antigen-präsentierende Zellen (<i>antigen presenting cells</i>)
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin 5'-Triphosphat
ATV	Angewandte Tumorstudiologie
β	Beta
B-(Zellen)	vom Knochenmark-stammende (Zellen) (<i>bone marrow derived</i>)
BAK	bcl-2 homologer Antagonist/Killer
BFA	Brefeldin A
bidest.	bidestilliert
BLNK	B-Zell Verbindungs-Protein (<i>B cell linker protein</i>)
BMDC	aus dem Knochenmark stammende Dendritische Zellen (<i>bone marrow derived dendritic cells</i>)
BP	<i>Basenpaar</i> (base pair)
BPV	bovines Papillomvirus (-viren)
BSA	Rinder-Serumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
Btk	Bruton's Tyrosinkinase
bzw.	beziehungsweise
$^{\circ}$ C	Grad Celsius
C	Cystein (Aminosäure)
C	Cytosin (Nukleotid)
ca.	zirka
CCR	Chemokinrezeptoren
CD	Humane Leukozyten Differenzierungs-Antigene
CD8(4) ⁺	CD8(4) positiv
Ci	Curie
Con A	Concanavalin A
COPV	Hündisches orales Papillomvirus (<i>canine oral Papillomvirus</i>)
CpG ODNs	Cytidin-Phosphat-Guanosin Oligodinukleotide
Cpm	Radioaktive Zerfälle pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CsCl	Cäsiumchlorid
CTL	zytotoxische T-Lymphozyten (<i>cytotoxic T lymphocytes</i>)
CVLP-IC	CVLP-Immunkomplexe
CVLPs	chimäre Virus-ähnliche Partikel (<i>chimeric papillomavirus like particles</i>)
D	Aspartat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (<i>delayed-type hypersensitivity</i>)

-/-	dedefizient
η	Brechungsindex (Eta)
ε	Extinktionsfaktor (Epsilon)
ε	Bezeichnung eines FcR
E	Effektorzelle (im Zytotoxizitätstest)
E	Glutamat (AS)
E	früh (<i>early</i>)
E. coli	Escherichia coli
ECL	verstärkte Chemolumineszenz (<i>enhanced chemoluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
EGFR	Epidermaler Wachstums-Faktor (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
ELISA	Enzym-verknüpfte Immun-Sorptions-Untersuchung (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
EliSpot	Enzym-verknüpfter ImmunSpot (<i>Enzyme-linked ImmunoSpot</i>)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERK	Extrazelluläres Signal-regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
EV	Epidermodysplasia verruciformis
Exp.	Experiment
F	Phenylalanin
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FasL	Fas Ligand (CD95L)
Fc γ Rs	Fc γ -Rezeptoren
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
FSC	'Vorwärtsstreuung' (<i>forwardscatter</i>)
g	Erdbeschleunigung
G	Glycin (Aminosäure)
G	Guanin (Nukleotid)
GM-CSF	Granulozyten-Macrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
GMF	Geometrischen Mittleren Fluoreszenz
GST	Glutathion-S-Transferase
H	Histidin
HB-EGF	Heparin-bindender Wachstums-Faktor-ähnlicher Wachstums-Faktor (<i>heparin-binding epidermal growth factor-like growth factors</i>)
HD	Heidelberg
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
HK	hohe Konzentration
HLA	Histokompatibilitätsgene
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (<i>high-performance liquid chromatography</i>)
HPV	humanpathogenes Papillomvirus (-viren)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish-Peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein (<i>heatshock protein</i>)
I	Isoleucin
ICAM	intrazelluläres Adhensionsmolekül (<i>intracellular adhesion molecule</i>)
ICs	Immunkomplexe (<i>immune complexes</i>)
IFN γ	Interferon γ
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B-kinase
IL	Interleukin
IMDM	Iscoves modifiziertes Dulbeccos Medium (<i>iscove's modified Dulbecco's medium</i>)

IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-Galaktose
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
ITAM	Immunrezeptor-Tyrosin-basierendes Aktivierungsmotiv (<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>)
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
kompl.	komplett
kPa	Kilo Pascal
λ	Emissionsspektrum (Lamda)
L	Liter
L (1 oder 2)	spät (<i>late</i>)
LB	Luria-Bertani
LCMV	Lymphozytäres Choriomeningitis Virus
LCR	lange Kontrollregion (<i>Long control region</i>)
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
μg	Mikrogramm (10 ⁻⁶ Gramm)
μl	Mikroliter
M	molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase</i>)
MAPKAP-K	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase</i>)
max.	maximal
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
Min	Minute
MKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Kinase (<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>)
ml	Milliliter
MLTK	Kinasen von gemischter Abstammung-ähnliche Mitogen-aktivierte Proteinkinase Triplekinase (<i>Mixed-lineage kinases-like mitogen activated protein kinase triplekinase</i>)
mM	mikromolar
MyD88	Myeolider Differenzierungsfaktor 88
n	Nano (10 ⁻⁹)
N	Asparagin
NFκB	nuklearer Faktor-κB (<i>nuclear factor-κB</i>)
ng	Nanogramm
NK	niedrige Konzentration
nM	nanomolar
nm	Nanometer
NP40	Nonidet P40
o.ä.	oder ähnliche(s)
OD	Optische Dichte
ODNs	Oligodeoxyribonukleotide
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
OVA	Ovalbumin
p	Pico (10 ⁻¹²)
p	Protein
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PE	R-Phycoerythrin

pg	Pikkogramm
pH	„ <i>pondus Hydrogenii</i> “ (negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
PIP2	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Polypropylen
pRB	Retinoblastom Protein
PSI	Pfund pro Quadratzoll (<i>pounds per square inch</i>)
PTK	Protein-Tyrosinkinasen
PV	Papillomavirus
ρ	Dichte (Rho)
R	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roosevelt park memorial institute
RT	Raumtemperatur
SAP	Streptavidin-alkaline Phosphatase
s.c.	subkutan
s.S.	siehe Seite
Sek	Sekunde
SF	Steigerungsfaktor
SSC	‘Randstreuung’ (<i>sidescatter</i>)
Stk.	Stück
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodiumdodecylsulfate</i>)
T	Threonin
T	Triangulationszahl
T	Zielzelle (<i>target cell</i> (im Zytotoxizitätstest))
T(-Zellen)	Thymus(-Zellen)
TAP	Transporter der Antigenpräsentation (<i>transporter of antigen presentation</i>)
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
T _H	T-Helfer(zellen)
TIR	<i>Toll</i> -IL-1 Rezeptor
TLR	„Abgabe/Gebühr“-ähnlicher Rezeptor (<i>toll-like receptor</i>)
TMB	Tetramethylbenzidin
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF6	Tumor-Nekrose-Faktor Rezeptor-assoziiierter Faktor
TRAIL	TNF-verwandter Apoptose-induzierender Ligand (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor
ü.N.	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
URR	stromaufwärts gelegende regulatorische Region (<i>upstream regulatory region</i>)
UV	ultraviolett
V	Valin
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
VE	vollentsalzt
VLPs	Virus-ähnliche Partikel (<i>virus-like particles</i>)
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
W	Watt
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZTL(s)	Zytotoxische T-Lymphozyten

H. Medizinische Fachbegriffe

Adjuvans.....	eine die immunogene (sensibilisierende) Wirkung eines Antigens verstärkende Substanz
Cervix.....	Gebärmutterhals
Condyloma acuminata.....	Anogenitale Feigwarze
Dysplasie.....	Fehlgestaltung, Fehlbildung als Folge gestörter formaler (= morphologischer) Gewebs- u. Organentwicklung
Epidermodysplasia verruciformis (EV)....	Hautverhornung mit Bildung verschmelzender warzenartiger Papeln, v.a. an Gliedmaßen, Hals, Gesicht; Induktion durch humanpathogene Papillomviren; maligne Entartung möglich.
Femur.....	Oberschenkel
in vitro.....	außerhalb des Organismus, im ‚Reagenzglas/Zellkultur‘
in vivo.....	im lebenden Organismus
intraepithelialen.....	im Epithelverband
Läsion.....	umschriebene Störung einer Funktion oder des Gewebegefüges im lebenden Organismus
Neoplasie.....	Neubildung von Körpergeweben (z.B. Regeneration, aber auch als Vorstufe eines malignen Tumors)
Papillom.....	aus gefäßhaltigem Bindegewebe bestehende u. mit Epithel bekleidete, meist gutartige Haut- bzw. Schleimhautwucherung
Retinoblastom.....	seltener, im Säuglings- oder Kleinkindalter auftretender maligner Tumor aus embryonalen Netzhautelementen
Rezidiv.....	‚Rückfall‘ einer Krankheit, ihr Wiederauftreten nach völliger Abheilung. Als Tumor-R. das R. nach zunächst (scheinbar völlig) erfolgreicher Operation oder Strahlentherapie.
Stratum basale.....	Unterste Schicht der Epidermis
Stratum corneum.....	die Hornschicht der Epidermis als oberste Hautschicht
Stratum granulosum.....	dem <i>Stratum spinosum</i> der Epidermis aufliegende, körnig erscheinende Schicht als Hautschicht, in der die Verhornung der Zellen beginnt
Stratum granulosum.....	dem <i>Stratum spinosum</i> der Epidermis aufliegende, körnig erscheinende Schicht als Hautschicht, in der die Verhornung der Zellen beginnt
Stratum spinosum.....	die dem <i>Stratum basale</i> aufliegende ‚Stachelzellschicht‘ der Epidermis; Schichten polygonaler, mit Desmosomen versehener Zellen; unterste Schicht dient der Zellvermehrung
subkutan.....	Unter die/der Haut
Tibia.....	Schiebein
Vulvakarzinom.....	Plattenepithelkarzinom v.a. an Schamlippen, Klitoris, Harnröhre etc.
zervikal.....	den Gebärmutterhals betreffend
Zervixkarzinom.....	Gebärmutterhalskrebs

I. Literatur

- AICHELE, P., KYBURZ, D., OHASHI, P. S., ODERMATT, B., ZINKERNAGEL, R. M., HENGARTNER, H., and PIRCHER, H. (1994). Peptide-induced T-cell tolerance to prevent autoimmune diabetes in a transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(2), 444-8.
- AKIRA, S., TAKEDA, K., and KAISHO, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* **2**(8), 675-80.
- ALBERT, M. L., SAUTER, B., and BHARDWAJ, N. (1998). Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**(6671), 86-9.
- ALEXANDER-MILLER, M. A., LEGGATT, G. R., SARIN, A., and BERZOFSKY, J. A. (1996). Role of antigen, CD8, and cytotoxic T lymphocyte (CTL) avidity in high dose antigen induction of apoptosis of effector CTL. *J Exp Med* **184**(2), 485-92.
- ANDERSON, K., CRESSWELL, P., GAMMON, M., HERMES, J., WILLIAMSON, A., and ZWEERINK, H. (1991). Endogenously synthesized peptide with an endoplasmic reticulum signal sequence sensitizes antigen processing mutant cells to class I-restricted cell-mediated lysis. *J Exp Med* **174**(2), 489-92.
- ARROYO, M., BAGCHI, S., and RAYCHAUDHURI, P. (1993). Association of the human papillomavirus type 16 E7 protein with the S-phase-specific E2F-cyclin A complex. *Mol Cell Biol* **13**(10), 6537-46.
- BACHMANN, M. F., OXENIUS, A., PIRCHER, H., HENGARTNER, H., ASHTON-RICHARDT, P. A., TONEGAWA, S., and ZINKERNAGEL, R. M. (1995). TAP1-independent loading of class I molecules by exogenous viral proteins. *Eur J Immunol* **25**(6), 1739-43.
- BACIK, I., COX, J. H., ANDERSON, R., YEWDELL, J. W., and BENNINK, J. R. (1994). TAP (transporter associated with antigen processing)-independent presentation of endogenously synthesized peptides is enhanced by endoplasmic reticulum insertion sequences located at the amino- but not carboxyl-terminus of the peptide. *J Immunol* **152**(2), 381-7.
- BAGCHI, S., RAYCHAUDHURI, P., and NEVINS, J. R. (1990). Adenovirus E1A proteins can dissociate heteromeric complexes involving the E2F transcription factor: a novel mechanism for E1A trans-activation. *Cell* **62**(4), 659-69.
- BAKER, T. S., NEWCOMB, W. W., OLSON, N. H., COWSERT, L. M., OLSON, C., and BROWN, J. C. (1991). Structures of bovine and human papillomaviruses. Analysis by cryoelectron microscopy and three-dimensional image reconstruction. *Biophys J* **60**(6), 1445-56.
- BAL, V., MCINDOE, A., DENTON, G., HUDSON, D., LOMBARDI, G., LAMB, J., and LECHLER, R. (1990). Antigen presentation by keratinocytes induces tolerance in human T cells. *Eur J Immunol* **20**(9), 1893-7.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B., and PALUCKA, K. (2000). Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811.
- BANCHEREAU, J., and STEINMAN, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**(6673), 245-52.
- BANDARA, L. R., and LA THANGUE, N. B. (1991). Adenovirus E1a prevents the retinoblastoma gene product from complexing with a cellular transcription factor. *Nature* **351**(6326), 494-7.
- BARBOSA, M. S., VASS, W. C., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1991). In vitro biological activities of the E6 and E7 genes vary among human papillomaviruses of different oncogenic potential. *J Virol* **65**(1), 292-8.
- BERGSDORF, C., BEYER, C., UMANSKY, V., WERR, M., and SAPP, M. (2003). Highly efficient transport of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester into COS7 cells using human papillomavirus-like particles. *FEBS Lett* **536**(1-3), 120-4.
- BERNARD, B. A., BAILLY, C., LENOIR, M. C., DARMON, M., THIERRY, F., and YANIV, M. (1989). The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol* **63**(10), 4317-24.

- BEVAN, M. J. (1976). Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* **143**(5), 1283-8.
- BEVAN, M. J. (1987). Antigen recognition. Class discrimination in the world of immunology. *Nature* **325**(6101), 192-4.
- BLANKENSTEIN, T., and SCHULER, T. (2002). Cross-priming versus cross-tolerance: are two signals enough? *Trends Immunol* **23**(4), 171-3.
- BOSCH, F. X., MUNOZ, N., DE SANJOSE, S., NAVARRO, C., MOREO, P., ASCUNCE, N., GONZALEZ, L. C., TAFUR, L., GILI, M., LARRANAGA, I., and ET AL. (1993). Human papillomavirus and cervical intraepithelial neoplasia grade III/carcinoma in situ: a case-control study in Spain and Colombia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **2**(5), 415-22.
- BOWIE, A., KISS-TOTH, E., SYMONS, J. A., SMITH, G. L., DOWER, S. K., and O'NEILL, L. A. (2000). A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18), 10162-7.
- BOYER, S. N., WAZER, D. E., and BAND, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* **56**(20), 4620-4.
- BROMLEY, S. K., BURACK, W. R., JOHNSON, K. G., SOMERSALO, K., SIMS, T. N., SUMEN, C., DAVIS, M. M., SHAW, A. S., ALLEN, P. M., and DUSTIN, M. L. (2001). The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* **19**, 375-96.
- BURKHARDT, A., WILLINGHAM, M., GAY, C., JEANG, K. T., and SCHLEGEL, R. (1989). The E5 oncoprotein of bovine papillomavirus is oriented asymmetrically in Golgi and plasma membranes. *Virology* **170**(1), 334-9.
- CAMPBELL, D. J., SERWOLD, T., and SHASTRI, N. (2000). Bacterial proteins can be processed by macrophages in a transporter associated with antigen processing-independent, cysteine protease-dependent manner for presentation by MHC class I molecules. *J Immunol* **164**(1), 168-75.
- CARBONE, F. R., HOSKEN, N. A., MOORE, M. W., and BEVAN, M. J. (1989). Class I MHC-restricted cytotoxic responses to soluble protein antigen. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **54**(Pt 1), 551-5.
- CHENG, H., KARTENBECK, J., KABSCH, K., MAO, X., MARQUES, M., and ALONSO, A. (2002). Stress kinase p38 mediates EGFR transactivation by hyperosmolar concentrations of sorbitol. *J Cell Physiol* **192**(2), 234-43.
- CHIANG, C. M., USTAV, M., STENLUND, A., HO, T. F., BROKER, T. R., and CHOW, L. T. (1992). Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13), 5799-803.
- CHRISTENSEN, N. D., HOPFL, R., DIANGELO, S. L., CLADEL, N. M., PATRICK, S. D., WELSH, P. A., BUDGEON, L. R., REED, C. A., and KREIDER, J. W. (1994). Assembled baculovirus-expressed human papillomavirus type 11 L1 capsid protein virus-like particles are recognized by neutralizing monoclonal antibodies and induce high titres of neutralizing antibodies. *J Gen Virol* **75**(Pt 9), 2271-6.
- CHU, N. R., WU, H. B., WU, T., BOUX, L. J., SIEGEL, M. I., and MIZZEN, L. A. (2000). Immunotherapy of a human papillomavirus (HPV) type 16 E7-expressing tumour by administration of fusion protein comprising Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin (BCG) hsp65 and HPV16 E7. *Clin Exp Immunol* **121**(2), 216-25.
- CHU, R. S., TARGONI, O. S., KRIEG, A. M., LEHMANN, P. V., and HARDING, C. V. (1997). CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* **186**(10), 1623-31.
- CONNOR, M. E., and STERN, P. L. (1990). Loss of MHC class-I expression in cervical carcinomas. *Int J Cancer* **46**(6), 1029-34.
- CONRAD, M., BUBB, V. J., and SCHLEGEL, R. (1993). The human papillomavirus type 6 and 16 E5 proteins are membrane-associated proteins which associate with the 16-kilodalton pore-forming protein. *J Virol* **67**(10), 6170-8.

- CONTRERAS, D. N., KRAMMER, P. H., POTKUL, R. K., BU, P., ROSSI, J. L., KAUFMANN, A. M., GISSMANN, L., and QIAO, L. (2000). Cervical cancer cells induce apoptosis of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunother* **23**(1), 67-74.
- CRESSWELL, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* **12**, 259-93.
- CRIFE, T. P., HAUGEN, T. H., TURK, J. P., TABATABAI, F., SCHMID, P. G., 3RD, DURST, M., GISSMANN, L., ROMAN, A., and TUREK, L. P. (1987). Transcriptional regulation of the human papillomavirus-16 E6-E7 promoter by a keratinocyte-dependent enhancer, and by viral E2 trans-activator and repressor gene products: implications for cervical carcinogenesis. *Embo J* **6**(12), 3745-53.
- CRITCHFIELD, J. M., RACKE, M. K., ZUNIGA-PFLUCKER, J. C., CANNELLA, B., RAINE, C. S., GOVERMAN, J., and LENARDO, M. J. (1994). T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **263**(5150), 1139-43.
- CULLEN, A. P., REID, R., CAMPION, M., and LORINCZ, A. T. (1991). Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* **65**(2), 606-12.
- DA SILVA, D. M., PASTRANA, D. V., SCHILLER, J. T., and KAST, W. M. (2001a). Effect of preexisting neutralizing antibodies on the anti-tumor immune response induced by chimeric human papillomavirus virus-like particle vaccines. *Virology* **290**(2), 350-60.
- DA SILVA, D. M., VELDEERS, M. P., NIELAND, J. D., SCHILLER, J. T., NICKOLOFF, B. J., and KAST, W. M. (2001b). Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int Immunol* **13**(5), 633-41.
- DAY, P. M., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (2003). Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology* **307**(1), 1-11.
- DE BRUIJN, M. L., JACKSON, M. R., and PETERSON, P. A. (1995). Phagocyte-induced antigen-specific activation of unprimed CD8+ T cells in vitro. *Eur J Immunol* **25**(5), 1274-85.
- DE GRUIJL, T. D., BONTKES, H. J., WALBOOMERS, J. M., STUKART, M. J., ROBBESOM, A. A., VON BLOMBERG-VAN DER FLIER, B. M., HERBRINK, P., REMMINK, A. J., VERHEIJEN, R. H., HELMERHORST, T. J., MEIJER, C. J., and SCHEPER, R. J. (1996). Analysis of IgG reactivity against Human Papillomavirus type-16 E7 in patients with cervical intraepithelial neoplasia indicates an association with clearance of viral infection: results of a prospective study. *Int J Cancer* **68**(6), 731-8.
- DE VILLIERS, E. (1997). Papillomavirus and HPV typing. *Clin Dermatol* **15**, 199-206.
- DEL VECCHIO, A. M., ROMANCZUK, H., HOWLEY, P. M., and BAKER, C. C. (1992). Transient replication of human papillomavirus DNAs. *J Virol* **66**(10), 5949-58.
- DHODAPKAR, M. V., KRASOVSKY, J., STEINMAN, R. M., and BHARDWAJ, N. (2000). Mature dendritic cells boost functionally superior CD8(+) T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest* **105**(6), R9-R14.
- DURST, M., KLEINHEINZ, A., HOTZ, M., and GISSMAN, L. (1985). The physical state of human papillomavirus type 16 DNA in benign and malignant genital tumours. *J Gen Virol* **66**(Pt 7), 1515-22.
- DYSON, N., HOWLEY, P. M., MUNGER, K., and HARLOW, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* **243**(4893), 934-7.
- DYSON, N., GUIDA, P., MUNGER, K., and HARLOW, E. (1992). Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *J Virol* **66**(12), 6893-902.
- EVANS, E. M., MAN, S., EVANS, A. S., and BORYSIEWICZ, L. K. (1997). Infiltration of cervical cancer tissue with human papillomavirus-specific cytotoxic T-lymphocytes. *Cancer Res* **57**(14), 2943-50.
- FAUSCH, S. C., DA SILVA, D. M., RUDOLF, M. P., and KAST, W. M. (2002). Human papillomavirus virus-like particles do not activate Langerhans cells: a possible immune escape mechanism used by human papillomaviruses. *J Immunol* **169**(6), 3242-9.

- FELTKAMP, M. C., SMITS, H. L., VIERBOOM, M. P., MINNAAR, R. P., DE JONGH, B. M., DRIJFHOUT, J. W., TER SCHEGGET, J., MELIEF, C. J., and KAST, W. M. (1993). Vaccination with cytotoxic T lymphocyte epitope-containing peptide protects against a tumor induced by human papillomavirus type 16-transformed cells. *Eur J Immunol* **23**(9), 2242-9.
- FELTKAMP, M. C., VREUGDENHIL, G. R., VIERBOOM, M. P., RAS, E., VAN DER BURG, S. H., TER SCHEGGET, J., MELIEF, C. J., and KAST, W. M. (1995). Cytotoxic T lymphocytes raised against a subdominant epitope offered as a synthetic peptide eradicate human papillomavirus type 16-induced tumors. *Eur J Immunol* **25**(9), 2638-42.
- FERNANDO, G. J., MURRAY, B., ZHOU, J., and FRAZER, I. H. (1999). Expression, purification and immunological characterization of the transforming protein E7, from cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *Clin Exp Immunol* **115**(3), 397-403.
- FIDLER, I. J. (1975). Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* **35**(1), 218-24.
- FIELDS B.N., K. D. M., HOWLEY P.M. (1996). "Fields Virology." third ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, PA.
- FLORES, E. R., ALLEN-HOFFMANN, B. L., LEE, D., and LAMBERT, P. F. (2000). The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* **74**(14), 6622-31.
- FRANCIS, D. A., SCHMID, S. I., and HOWLEY, P. M. (2000). Repression of the integrated papillomavirus E6/E7 promoter is required for growth suppression of cervical cancer cells. *J Virol* **74**(6), 2679-86.
- FRATTINI, M. G., and LAIMINS, L. A. (1994). Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(26), 12398-402.
- FRAZER IH TR, F. G., MALCOLM K, HERD, K, MCFADYN S, COOPER PD, WARD B. (1999). "Safety and immunogenicity of HPV16 E7/Algammulin. In: Vaccines for Human Papillomavirus Infection and Anogenital Disease." 14 vols., Austin, Landes.
- FREYSCHMIDT, E.-J. UND MICHEL. N. (2003). Nachweis antigen-spezifischer zytotoxischer T-Zellen. *Modern Aspects of Immunology Journal (Immunologie Aktuell)* **3**(1), Labbook Article.
- FUJIWARA, T., ODA, K., YOKOTA, S., TAKATSUKI, A., and IKEHARA, Y. (1988). Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **263**(34), 18545-52.
- FUNK, J. O., WAGA, S., HARRY, J. B., ESPLING, E., STILLMAN, B., and 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**(16), 2090-100.
- GAGNON, E., DUCLOS, S., RONDEAU, C., CHEVET, E., CAMERON, P. H., STEELE-MORTIMER, O., PAIEMENT, J., BERGERON, J. J., and DESJARDINS, M. (2002). Endoplasmic reticulum-mediated phagocytosis is a mechanism of entry into macrophages. *Cell* **110**(1), 119-31.
- GAJEWSKI, T. F., JOYCE, J., and FITCH, F. W. (1989). Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma. *J Immunol* **143**(1), 15-22.
- GARRIDO, F., RUIZ-CABELLO, F., CABRERA, T., PEREZ-VILLAR, J. J., LOPEZ-BOTET, M., DUGGAN-KEEN, M., and STERN, P. L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* **18**(2), 89-95.
- GENTHER, S. M., STERLING, S., DUENSING, S., MUNGER, K., SATTLER, C., and LAMBERT, P. F. (2003). Quantitative role of the human papillomavirus type 16 E5 gene during the productive stage of the viral life cycle. *J Virol* **77**(5), 2832-42.
- GILBOA, E. (1999). The makings of a tumor rejection antigen. *Immunity* **11**(3), 263-70.
- GILLIS, S., and SMITH, K. A. (1977). Long term culture of tumour-specific cytotoxic T cells. *Nature* **268**(5616), 154-6.

- GISSMANN, L., OSEN, W., MULLER, M., and JOCHMUS, I. (2001). Therapeutic vaccines for human papillomaviruses. *Intervirology* **44**(2-3), 167-75.
- GOLDSTONE SE, T. J., NEEFE JR. (2000). *18th International Papillomavirus Conference, Barcelona, Spain.*
- GREENSTONE, H. L., NIELAND, J. D., DE VISSER, K. E., DE BRUIJN, M. L., KIRNBAUER, R., RODEN, R. B., LOWY, D. R., KAST, W. M., and SCHILLER, J. T. (1998). Chimeric papillomavirus virus-like particles elicit antitumor immunity against the E7 oncoprotein in an HPV16 tumor model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(4), 1800-5.
- GROMME, M., and NEEFJES, J. (2002). Antigen degradation or presentation by MHC class I molecules via classical and non-classical pathways. *Mol Immunol* **39**(3-4), 181-202.
- GROMME, M., UYTDEHAAG, F. G., JANSSEN, H., CALAFAT, J., VAN BINNENDIJK, R. S., KENTER, M. J., TULP, A., VERWOERD, D., and NEEFJES, J. (1999). Recycling MHC class I molecules and endosomal peptide loading. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(18), 10326-31.
- GROSS, G., VON KROGH, G, AND BARRASSO, R. (1997). Genitoanal Lesions. In "Human Papillomavirus Infections in Dermatovenerology" (G. G. a. G. v. Krogh, Ed.), pp. 389-416, Boca Raton, FL: CRC Press.
- HACKER, G., REDECKE, V., and HACKER, H. (2002). Activation of the immune system by bacterial CpG-DNA. *Immunology* **105**(3), 245-51.
- HALPERN, M. D., KURLANDER, R. J., and PISETSKY, D. S. (1996). Bacterial DNA induces murine interferon-gamma production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha. *Cell Immunol* **167**(1), 72-8.
- HAMILTON, S. E., and HARTY, J. T. (2002). Quantitation of CD8+ T cell expansion, memory, and protective immunity after immunization with peptide-coated dendritic cells. *J Immunol* **169**(9), 4936-44.
- HAMMOND, S. A., BOLLINGER, R. C., TOBERY, T. W., and SILICIANO, R. F. (1993). Transporter-independent processing of HIV-1 envelope protein for recognition by CD8+ T cells. *Nature* **364**(6433), 158-61.
- HARDING, C. V., and SONG, R. (1994). Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules. *J Immunol* **153**(11), 4925-33.
- HARTMANN, G., WEINER, G. J., and KRIEG, A. M. (1999). CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(16), 9305-10.
- HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K., and AKIRA, S. (2000). A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408**(6813), 740-5.
- HENDERSON, R. A., MICHEL, H., SAKAGUCHI, K., SHABANOWITZ, J., APPELLA, E., HUNT, D. F., and ENGELHARD, V. H. (1992). HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: a second pathway of antigen presentation. *Science* **255**(5049), 1264-6.
- HERRERA, O. B., BRETT, S., and LECHLER, R. I. (2002). Infection of mouse bone marrow-derived dendritic cells with recombinant adenovirus vectors leads to presentation of encoded antigen by both MHC class I and class II molecules-potential benefits in vaccine design. *Vaccine* **21**(3-4), 231-42.
- HEUFLER, C., KOCH, F., STANZL, U., TOPAR, G., WYSOCKA, M., TRINCHIERI, G., ENK, A., STEINMAN, R. M., ROMANI, N., and SCHULER, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* **26**(3), 659-68.
- HILDERS, C. G., RAS, L., VAN EENDENBURG, J. D., NOOYEN, Y., and FLEUREN, G. J. (1994). Isolation and characterization of tumor-infiltrating lymphocytes from cervical carcinoma. *Int J Cancer* **57**(6), 805-13.
- HOPFL, R., HEIM, K., CHRISTENSEN, N., ZUMBACH, K., WIELAND, U., VOLGGER, B., WIDSCHWENDTER, A., HAIMBUCHNER, S., MULLER-HOLZNER, E., PAWLITA, M., PFISTER, H., and FRITSCH, P. (2000). Spontaneous regression of CIN and delayed-type hypersensitivity to HPV- 16 oncoprotein E7. *Lancet* **356**(9246), 1985-6.
- HOWLEY, P. M. (1996). "Papillomavirinae: The Viruses and their Replikation.". Raven Press, New York, NY.

- HWANG, E. S., NOTTOLI, T., and DIMAIO, D. (1995). The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology* **211**(1), 227-33.
- INABA, K., INABA, M., NAITO, M., and STEINMAN, R. M. (1993). Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* **178**(2), 479-88.
- JAKOB, T., WALKER, P. S., KRIEG, A. M., UDEY, M. C., and VOGEL, J. C. (1998). Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* **161**(6), 3042-9.
- JANEWAY CH. A., T. P. (1997). "Immunologie." 2. ed. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- JIANG, W., SWIGGARD, W. J., HEUFLER, C., PENG, M., MIRZA, A., STEINMAN, R. M., and NUSSENZWEIG, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**(6527), 151-5.
- JOCHMUS-KUDIENKA, I., SCHNEIDER, A., BRAUN, R., KIMMIG, R., KOLDOVSKY, U., SCHNEWEIS, K. E., SEEDORF, K., and GISSMANN, L. (1989). Antibodies against the human papillomavirus type 16 early proteins in human sera: correlation of anti-E7 reactivity with cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* **81**(22), 1698-704.
- JONES, D. L., ALANI, R. M., and MUNGER, K. (1997). The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev* **11**(16), 2101-11.
- JONULEIT, H., GIESECKE-TUETTENBERG, A., TUTING, T., THURNER-SCHULER, B., STUGE, T. B., PARAGNIK, L., KANDEMIR, A., LEE, P. P., SCHULER, G., KNOP, J., and ENK, A. H. (2001). A comparison of two types of dendritic cell as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* **93**(2), 243-51.
- KABSCH, K., and ALONSO, A. (2002). The human papillomavirus type 16 E5 protein impairs TRAIL- and FasL-mediated apoptosis in HaCaT cells by different mechanisms. *J Virol* **76**(23), 12162-72.
- KAISHO, T., and AKIRA, S. (2002). Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta* **1589**(1), 1-13.
- KEATING, P. J., CROMME, F. V., DUGGAN-KEEN, M., SNIJDERS, P. J., WALBOOMERS, J. M., HUNTER, R. D., DYER, P. A., and 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**(2), 405-11.
- KIRNBAUER, R., HUBBERT, N. L., WHEELER, C. M., BECKER, T. M., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1994). A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. *J Natl Cancer Inst* **86**(7), 494-9.
- KLINGELHUTZ, A. J., FOSTER, S. A., and MCDUGALL, J. K. (1996). Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* **380**(6569), 79-82.
- KOUTSKY, L. A., AULT, K. A., WHEELER, C. M., BROWN, D. R., BARR, E., ALVAREZ, F. B., CHIACCHIERINI, L. M., and JANSEN, K. U. (2002). A controlled trial of a human papillomavirus type 16 vaccine. *N Engl J Med* **347**(21), 1645-51.
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M., CLARK, K., BENACERRAF, B., and ROCK, K. L. (1993). Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(11), 4942-6.
- KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M., and ROCK, K. L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* **267**(5195), 243-6.
- KRIEG, A. M., YI, A. K., MATSON, S., WALDSCHMIDT, T. J., BISHOP, G. A., TEASDALE, R., KORETZKY, G. A., and KLINMAN, D. M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* **374**(6522), 546-9.

- KRUG, A., TOWAROWSKI, A., BRITTSCH, S., ROTHENFUSSER, S., HORNING, V., BALS, R., GIESE, T., ENGELMANN, H., ENDRES, S., KRIEG, A. M., and HARTMANN, G. (2001). Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol* **31**(10), 3026-37.
- KUGLER, A., STUHLER, G., WALDEN, P., ZOLLER, G., ZOBYWALSKI, A., BROSSART, P., TREFZER, U., ULLRICH, S., MULLER, C. A., BECKER, V., GROSS, A. J., HEMMERLEIN, B., KANZ, L., MULLER, G. A., and RINGERT, R. H. (2000). Regression of human metastatic renal cell carcinoma after vaccination with tumor cell-dendritic cell hybrids. *Nat Med* **6**(3), 332-6.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(259), 680-5.
- LAGA, M., ICENOGLU, J. P., MARSELLA, R., MANOKA, A. T., NZILA, N., RYDER, R. W., VERMUND, S. H., HEYWARD, W. L., NELSON, A., and REEVES, W. C. (1992). Genital papillomavirus infection and cervical dysplasia--opportunistic complications of HIV infection. *Int J Cancer* **50**(1), 45-8.
- LANZAVECCHIA, A., and SALLUSTO, F. (2001). Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* **106**(3), 263-6.
- LE CANN, P., COURSAGET, P., LOCHMANN, S., and TOUZE, A. (1994). Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol Lett* **117**(3), 269-74.
- LEE, S. P., THOMAS, W. A., BLAKE, N. W., and RICKINSON, A. B. (1996). Transporter (TAP)-independent processing of a multiple membrane-spanning protein, the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2. *Eur J Immunol* **26**(8), 1875-83.
- LEHTINEN, M., PAWLITA, M., ZUMBACH, K., LIE, K., HAKAMA, M., JELLUM, E., KOSKELA, P., LUOSTARINEN, T., PAAVONEN, J., PUKKALA, E., SIGSTAD, E., THORESEN, S., and DILLNER, J. (2003). Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. *Am J Obstet Gynecol* **188**(1), 49-55.
- LENARDO, M., CHAN, K. M., HORNING, F., MCFARLAND, H., SIEGEL, R., WANG, J., and ZHENG, L. (1999). Mature T lymphocyte apoptosis--immune regulation in a dynamic and unpredictable antigenic environment. *Annu Rev Immunol* **17**, 221-53.
- LENZ, P., DAY, P. M., PANG, Y. Y., FRYE, S. A., JENSEN, P. N., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (2001). Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* **166**(9), 5346-55.
- LENZ, P., THOMPSON, C. D., DAY, P. M., BACOT, S. M., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (2003). Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clin Immunol* **106**(3), 231-7.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., DONALDSON, J. G., SCHWEIZER, A., BERGER, E. G., HAURI, H. P., YUAN, L. C., and KLAUSNER, R. D. (1990). Microtubule-dependent retrograde transport of proteins into the ER in the presence of brefeldin A suggests an ER recycling pathway. *Cell* **60**(5), 821-36.
- LIU, T., CHAMBERS, B., DIEHL, A. D., VAN KAER, L., JONDAL, M., and LJUNGGREN, H. G. (1997). TAP peptide transporter-independent presentation of heat-killed Sendai virus antigen on MHC class I molecules by splenic antigen-presenting cells. *J Immunol* **159**(11), 5364-71.
- LJUNGGREN, H. G., and KARRE, K. (1985). Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J Exp Med* **162**(6), 1745-59.
- LJUNGGREN, H. G., STAM, N. J., OHLEN, C., NEEFJES, J. J., HOGLUND, P., HEEMELS, M. T., BASTIN, J., SCHUMACHER, T. N., TOWNSEND, A., KARRE, K., and ET AL. (1990). Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* **346**(6283), 476-80.
- LU, J., WETTSTEIN, P. J., HIGASHIMOTO, Y., APPELLA, E., and CELIS, E. (2001). TAP-independent presentation of CTL epitopes by Trojan antigens. *J Immunol* **166**(12), 7063-71.
- LUTZ, M. B., KUKUTSCH, N., OGIWIE, A. L., ROSSNER, S., KOCH, F., ROMANI, N., and SCHULER, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* **223**(1), 77-92.

- MAIMAN, M., FRUCHTER, R. G., SERUR, E., REMY, J. C., FEUER, G., and BOYCE, J. (1990). Human immunodeficiency virus infection and cervical neoplasia. *Gynecol Oncol* **38**(3), 377-82.
- MARTINEZ-KINADER, B., LIPFORD, G. B., WAGNER, H., and HEEG, K. (1995). Sensitization of MHC class I-restricted T cells to exogenous proteins: evidence for an alternative class I-restricted antigen presentation pathway. *Immunology* **86**(2), 287-95.
- MATZINGER, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* **12**, 991-1045.
- MCLEAN, C. S., CHURCHER, M. J., MEINKE, J., SMITH, G. L., HIGGINS, G., STANLEY, M., and MINSON, A. C. (1990). Production and characterisation of a monoclonal antibody to human papillomavirus type 16 using recombinant vaccinia virus. *J Clin Pathol* **43**(6), 488-92.
- MESCHEDÉ, W., ZUMBACH, K., BRASPENNING, J., SCHEFFNER, M., BENITEZ-BRIBIESCA, L., LUANDE, J., GISSMANN, L., and PAWLITA, M. (1998). Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* **36**(2), 475-80.
- MICHEL, N., OHLSCHLAGER, P., OSEN, W., FREYSCHMIDT, E. J., GUTHOHRLEIN, H., KAUFMANN, A. M., MULLER, M., and GISSMANN, L. (2002). T Cell Response to Human Papillomavirus 16 E7 in Mice: Comparison of Cr Release Assay, Intracellular IFN-gamma Production, ELISPOT and Tetramer Staining. *Intervirolgy* **45**(4-6), 290-9.
- MISUMI, Y., MIKI, K., TAKATSUKI, A., TAMURA, G., and IKEHARA, Y. (1986). Novel blockade by brefeldin A of intracellular transport of secretory proteins in cultured rat hepatocytes. *J Biol Chem* **261**(24), 11398-403.
- MOHR, I. J., CLARK, R., SUN, S., ANDROPHY, E. J., MACPHERSON, P., and BOTCHAN, M. R. (1990). Targeting the E1 replication protein to the papillomavirus origin of replication by complex formation with the E2 transactivator. *Science* **250**(4988), 1694-9.
- MOLL, H., FUCHS, H., BLANK, C., and ROLLINGHOFF, M. (1993). Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**(7), 1595-601.
- MOORE, M. W., CARBONE, F. R., and BEVAN, M. J. (1988). Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation. *Cell* **54**(6), 777-85.
- MULLER, M., VISCIDI, R. P., SUN, Y., GUERRERO, E., HILL, P. M., SHAH, F., BOSCH, F. X., MUNOZ, N., GISSMANN, L., and SHAH, K. V. (1992). Antibodies to HPV-16 E6 and E7 proteins as markers for HPV-16-associated invasive cervical cancer. *Virology* **187**(2), 508-14.
- MULLER, M., ZHOU, J., REED, T. D., RITTMULLER, C., BURGER, A., GABELSBERGER, J., BRASPENNING, J., and GISSMANN, L. (1997). Chimeric papillomavirus-like particles. *Virology* **234**(1), 93-111.
- NAKAGAWA, M., STITES, D. P., PALEFSKY, J. M., KNEASS, Z., and MOSCICKI, A. B. (1999). CD4-positive and CD8-positive cytotoxic T lymphocytes contribute to human papillomavirus type 16 E6 and E7 responses. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**(4), 494-8.
- NASIELL, K., ROGER, V., and NASIELL, M. (1986). Behavior of mild cervical dysplasia during long-term follow-up. *Obstet Gynecol* **67**(5), 665-9.
- NESTLE, F. O., ALIJAGIC, S., GILLIET, M., SUN, Y., GRABBE, S., DUMMER, R., BURG, G., and SCHADENDORF, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* **4**(3), 328-32.
- NIELAND, J. D., DA SILVA, D. M., VELDEERS, M. P., DE VISSER, K. E., SCHILLER, J. T., MULLER, M., and KAST, W. M. (1999). Chimeric papillomavirus virus-like particles induce a murine self-antigen-specific protective and therapeutic antitumor immune response. *J Cell Biochem* **73**(2), 145-52.
- NIMAKO, M., FIANDER, A. N., WILKINSON, G. W., BORYSIEWICZ, L. K., and MAN, S. (1997). Human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocytes in patients with cervical intraepithelial neoplasia grade III. *Cancer Res* **57**(21), 4855-61.

- NONNENMACHER, B., HUBBERT, N. L., KIRNBAUER, R., SHAH, K. V., MUNOZ, N., BOSCH, F. X., DE SANJOSE, S., VISCIDI, R., LOWY, D. R., and SCHILLER, J. T. (1995). Serologic response to human papillomavirus type 16 (HPV-16) virus-like particles in HPV-16 DNA-positive invasive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia grade III patients and controls from Colombia and Spain. *J Infect Dis* **172**(1), 19-24.
- ODA, H., KUMAR, S., and HOWLEY, P. M. (1999). Regulation of the Src family tyrosine kinase Blk through E6AP-mediated ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(17), 9557-62.
- OHLSCHLAGER, P., OSEN, W., DELL, K., FAATH, S., GARCEA, R. L., JOCHMUS, I., MULLER, M., PAWLITA, M., SCHAFER, K., SEHR, P., STAIB, C., SUTTER, G., and GISSMANN, L. (2003). Human papillomavirus type 16 I1 capsomeres induce I1-specific cytotoxic T lymphocytes and tumor regression in C57BL/6 mice. *J Virol* **77**(8), 4635-45.
- O'NEILL, L. (2000). The Toll/interleukin-1 receptor domain: a molecular switch for inflammation and host defence. *Biochem Soc Trans* **28**(5), 557-63.
- PAMER, E., and CRESSWELL, P. (1998). Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* **16**, 323-58.
- PECORARO, G., MORGAN, D., and DEFENDI, V. (1989). Differential effects of human papillomavirus type 6, 16, and 18 DNAs on immortalization and transformation of human cervical epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(2), 563-7.
- PENG, S., FRAZER, I. H., FERNANDO, G. J., and ZHOU, J. (1998). Papillomavirus virus-like particles can deliver defined CTL epitopes to the MHC class I pathway. *Virology* **240**(1), 147-57.
- PFEIFER, J. D., WICK, M. J., ROBERTS, R. L., FINDLAY, K., NORMARK, S. J., and HARDING, C. V. (1993). Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells. *Nature* **361**(6410), 359-62.
- PFISTER, H., and ZUR HAUSEN, H. (1978). Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **166**(1-4), 13-9.
- PLUMMER, M., and FRANCESCHI, S. (2002). Strategies for HPV prevention. *Virus Res* **89**(2), 285-93.
- RADHAKRISHNAN, S., NGUYEN, L. T., CIRIC, B., URE, D. R., ZHOU, B., TAMADA, K., DONG, H., TSENG, S. Y., SHIN, T., PARDOLL, D. M., CHEN, L., KYLE, R. A., RODRIGUEZ, M., and PEASE, L. R. (2003). Naturally occurring human IgM antibody that binds B7-DC and potentiates T cell stimulation by dendritic cells. *J Immunol* **170**(4), 1830-8.
- RAFIQ, K., BERGTOLD, A., and CLYNES, R. (2002). Immune complex-mediated antigen presentation induces tumor immunity. *J Clin Invest* **110**(1), 71-9.
- RAVETCH, J. V. (1994). Fc receptors: rubor redux. *Cell* **78**(4), 553-60.
- RAVETCH, J. V., and BOLLAND, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **19**, 275-90.
- RAVETCH, J. V., and KINET, J. P. (1991). Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **9**, 457-92.
- RAVETCH, J. V., LUSTER, A. D., WEINSHANK, R., KOCHAN, J., PAVLOVEC, A., PORTNOY, D. A., HULMES, J., PAN, Y. C., and UNKELESS, J. C. (1986). Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* **234**(4777), 718-25.
- REGNAULT, A., LANKAR, D., LACABANNE, V., RODRIGUEZ, A., THERY, C., RESCIGNO, M., SAITO, T., VERBEEK, S., BONNEROT, C., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., and AMIGORENA, S. (1999). Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med* **189**(2), 371-80.
- RESSING, M. E., DE JONG, J. H., BRANDT, R. M., DRIJFHOUT, J. W., BENCKHUIJSEN, W. E., SCHREUDER, G. M., OFFRINGA, R., KAST, W. M., and MELIEF, C. J. (1999). Differential binding of viral peptides to HLA-A2 alleles. Implications for human papillomavirus type 16 E7 peptide-based vaccination against cervical carcinoma. *Eur J Immunol* **29**(4), 1292-303.

- RESSING, M. E., SETTE, A., BRANDT, R. M., RUPPERT, J., WENTWORTH, P. A., HARTMAN, M., OSEROFF, C., GREY, H. M., MELIEF, C. J., and 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**(11), 5934-43.
- RESSING, M. E., VAN DRIEL, W. J., BRANDT, R. M., KENTER, G. G., DE JONG, J. H., BAUKNECHT, T., FLEUREN, G. J., HOOGHERHOUT, P., OFFRINGA, R., SETTE, A., CELIS, E., GREY, H., TRIMBOS, B. J., KAST, W. M., and MELIEF, C. J. (2000). Detection of T helper responses, but not of human papillomavirus-specific cytotoxic T lymphocyte responses, after peptide vaccination of patients with cervical carcinoma. *J Immunother* **23**(2), 255-66.
- RESSING, M. E., VAN DRIEL, W. J., CELIS, E., SETTE, A., BRANDT, M. P., HARTMAN, M., ANHOLTS, J. D., SCHREUDER, G. M., TER HARMSSEL, W. B., FLEUREN, G. J., TRIMBOS, B. J., KAST, W. M., and 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**(3), 582-8.
- ROBERTS, S., ASHMOLE, I., JOHNSON, G. D., KREIDER, J. W., and GALLIMORE, P. H. (1993). Cutaneous and mucosal human papillomavirus E4 proteins form intermediate filament-like structures in epithelial cells. *Virology* **197**(1), 176-87.
- ROCK, K. L. (1996). A new foreign policy: MHC class I molecules monitor the outside world. *Immunol Today* **17**(3), 131-7.
- ROCK, K. L., GRAMM, C., ROTHSTEIN, L., CLARK, K., STEIN, R., DICK, L., HWANG, D., and GOLDBERG, A. L. (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* **78**(5), 761-71.
- RODRIGUEZ, A., REGNAULT, A., KLEIJMEER, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., and AMIGORENA, S. (1999). Selective transport of internalized antigens to the cytosol for MHC class I presentation in dendritic cells. *Nat Cell Biol* **1**(6), 362-8.
- RODRIGUEZ, I., KASZKIN, M., HOLLOSCHI, A., KABSCH, K., MARQUES, M. M., MAO, X., and ALONSO, A. (2002). Hyperosmotic stress induces phosphorylation of cytosolic phospholipase A(2) in HaCaT cells by an epidermal growth factor receptor-mediated process. *Cell Signal* **14**(10), 839-48.
- ROMAGNOLI, P., and GERMAIN, R. N. (1994). The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J Exp Med* **180**(3), 1107-13.
- ROMAN, M., MARTIN-OROZCO, E., GOODMAN, J. S., NGUYEN, M. D., SATO, Y., RONAGHY, A., KORNBLUTH, R. S., RICHMAN, D. D., CARSON, D. A., and RAZ, E. (1997). Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med* **3**(8), 849-54.
- ROMANCZUK, H., and HOWLEY, P. M. (1992). Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(7), 3159-63.
- RONCO, L. V., KARPOVA, A. Y., VIDAL, M., and HOWLEY, P. M. (1998). Human papillomavirus 16 E6 oncoprotein binds to interferon regulatory factor-3 and inhibits its transcriptional activity. *Genes Dev* **12**(13), 2061-72.
- ROSE, R. C., WHITE, W. I., LI, M., SUZICH, J. A., LANE, C., and GARCEA, R. L. (1998). Human papillomavirus type 11 recombinant L1 capsomeres induce virus-neutralizing antibodies. *J Virol* **72**(7), 6151-4.
- ROWSON, K. E., and MAHY, B. W. (1967). Human papova (wart) virus. *Bacteriol Rev* **31**(2), 110-31.
- RUDLINGER, R., SMITH, I. W., BUNNEY, M. H., and HUNTER, J. A. (1986). Human papillomavirus infections in a group of renal transplant recipients. *Br J Dermatol* **115**(6), 681-92.
- SALLUSTO, F., CELLA, M., DANIELI, C., and LANZAVECCHIA, A. (1995). Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**(2), 389-400.

- SALLUSTO, F., and 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**(4), 1109-18.
- SCHAFFER, K., MULLER, M., FAATH, S., HENN, A., OSEN, W., ZENTGRAF, H., BENNER, A., GISSMANN, L., and JOCHMUS, I. (1999). Immune response to human papillomavirus 16 L1E7 chimeric virus-like particles: induction of cytotoxic T cells and specific tumor protection. *Int J Cancer* **81**(6), 881-8.
- SCHEFFNER, M., WERNES, B. A., HUIBREGTSE, J. M., LEVINE, A. J., and HOWLEY, P. M. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* **63**(6), 1129-36.
- SCHIRMBECK, R., MELBER, K., and REIMANN, J. (1995). Hepatitis B virus small surface antigen particles are processed in a novel endosomal pathway for major histocompatibility complex class I- restricted epitope presentation. *Eur J Immunol* **25**(4), 1063-70.
- SCHIRMBECK, R., and REIMANN, J. (1994). Peptide transporter-independent, stress protein-mediated endosomal processing of endogenous protein antigens for major histocompatibility complex class I presentation. *Eur J Immunol* **24**(7), 1478-86.
- SCHIRMBECK, R., and REIMANN, J. (1996). 'Empty' Ld molecules capture peptides from endocytosed hepatitis B surface antigen particles for major histocompatibility complex class I- restricted presentation. *Eur J Immunol* **26**(12), 2812-22.
- SCHULER, G., SCHULER-THURNER, B., and STEINMAN, R. M. (2003). The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* **15**(2), 138-47.
- SCHUURHUIS, D. H., IOAN-FACSINAY, A., NAGELKERKEN, B., VAN SCHIP, J. J., SEDLIK, C., MELIEF, C. J., VERBEEK, J. S., and OSSENDORP, F. (2002). Antigen-antibody immune complexes empower dendritic cells to efficiently prime specific CD8+ CTL responses in vivo. *J Immunol* **168**(5), 2240-6.
- SCHWARZ, E., FREESE, U. K., GISSMANN, L., MAYER, W., ROGGENBUCK, B., STREMLAU, A., and ZUR HAUSEN, H. (1985). Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* **314**(6006), 111-4.
- SEDLIK, C., ORBACH, D., VERON, P., SCHWEIGHOFFER, E., COLUCCI, F., GAMBERALE, R., IOAN-FACSINAY, A., VERBEEK, S., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., BONNEROT, C., TYBULEWICZ, V. L., DI SANTO, J., and AMIGORENA, S. (2003). A critical role for Syk protein tyrosine kinase in Fc receptor-mediated antigen presentation and induction of dendritic cell maturation. *J Immunol* **170**(2), 846-52.
- SERVANT, M. J., GRANDVAUX, N., and HISCOTT, J. (2002). Multiple signaling pathways leading to the activation of interferon regulatory factor 3. *Biochem Pharmacol* **64**(5-6), 985-92.
- SHIBUYA, A., SAKAMOTO, N., SHIMIZU, Y., SHIBUYA, K., OSAWA, M., HIROYAMA, T., EYRE, H. J., SUTHERLAND, G. R., ENDO, Y., FUJITA, T., MIYABAYASHI, T., SAKANO, S., TSUJI, T., NAKAYAMA, E., PHILLIPS, J. H., LANIER, L. L., and NAKAUCHI, H. (2000). Fc alpha/mu receptor mediates endocytosis of IgM-coated microbes. *Nat Immunol* **1**(5), 441-6.
- SHIN, S. Y., YOKOYAMA, T., TAKENOCHI, T., and MUNEKATA, E. (2003). The chemical synthesis and binding affinity to the EGF receptor of the EGF-like domain of heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF). *J Pept Sci* **9**(4), 244-50.
- SIGAL, L. J., and ROCK, K. L. (2000). Bone marrow-derived antigen-presenting cells are required for the generation of cytotoxic T lymphocyte responses to viruses and use transporter associated with antigen presentation (TAP)-dependent and - independent pathways of antigen presentation. *J Exp Med* **192**(8), 1143-50.
- SONG, R., and HARDING, C. V. (1996). Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J Immunol* **156**(11), 4182-90.
- SPARWASSER, T., KOCH, E. S., VABULAS, R. M., HEEG, K., LIPFORD, G. B., ELLWART, J. W., and WAGNER, H. (1998). Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* **28**(6), 2045-54.

- SPEIDEL, K., OSEN, W., FAATH, S., HILGERT, I., OBST, R., BRASPENNING, J., MOMBURG, F., HAMMERLING, G. J., and RAMMENSEE, H. G. (1997). Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens in vivo: conditions, efficiency, and relation to antibody responses. *Eur J Immunol* **27**(9), 2391-9.
- STACEY, S. N., BARTHOLOMEW, J. S., GHOSH, A., STERN, P. L., MACKETT, M., and ARRAND, J. R. (1992). Expression of human papillomavirus type 16 E6 protein by recombinant baculovirus and use for detection of anti-E6 antibodies in human sera. *J Gen Virol* **73**(Pt 9), 2337-45.
- STEINMAN, R. M., and NUSSENZWEIG, M. C. (2002). Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(1), 351-8.
- STELLER, M. A., GURSKI, K. J., MURAKAMI, M., DANIEL, R. W., SHAH, K. V., CELIS, E., SETTE, A., TRIMBLE, E. L., PARK, R. C., and MARINCOLA, F. M. (1998). Cell-mediated immunological responses in cervical and vaginal cancer patients immunized with a lipidated epitope of human papillomavirus type 16 E7. *Clin Cancer Res* **4**(9), 2103-9.
- SVENSSON, M., STOCKINGER, B., and WICK, M. J. (1997). Bone marrow-derived dendritic cells can process bacteria for MHC-I and MHC-II presentation to T cells. *J Immunol* **158**(9), 4229-36.
- THOMAS, M., and BANKS, L. (1998). Inhibition of Bak-induced apoptosis by HPV-18 E6. *Oncogene* **17**(23), 2943-54.
- THOMAS, M., and BANKS, L. (1999). Human papillomavirus (HPV) E6 interactions with Bak are conserved amongst E6 proteins from high and low risk HPV types. *J Gen Virol* **80**(Pt 6), 1513-7.
- TURNER, B., HAENDLE, I., RODER, C., DIECKMANN, D., KEIKAVOUSSI, P., JONULEIT, H., BENDER, A., MACZEK, C., SCHREINER, D., VON DEN DRIESCH, P., BROCKER, E. B., STEINMAN, R. M., ENK, A., KAMPGEN, E., and SCHULER, G. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**(11), 1669-78.
- TOES, R. E., OFFRINGA, R., BLOM, R. J., MELIEF, C. J., and KAST, W. M. (1996). Peptide vaccination can lead to enhanced tumor growth through specific T-cell tolerance induction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15), 7855-60.
- UNKELESS, J. C. (1979). Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* **150**(3), 580-96.
- VAMBUTAS, A., DEVOTI, J., PINN, W., STEINBERG, B. M., and BONAGURA, V. R. (2001). Interaction of human papillomavirus type 11 E7 protein with TAP-1 results in the reduction of ATP-dependent peptide transport. *Clin Immunol* **101**(1), 94-9.
- VAN DRIEL, W. J., RESSING, M. E., KENTER, G. G., BRANDT, R. M., KRUL, E. J., VAN ROSSUM, A. B., SCHUURING, E., OFFRINGA, R., BAUKNECHT, T., TAMM-HERMELINK, A., VAN DAM, P. A., FLEUREN, G. J., KAST, W. M., MELIEF, C. J., and TRIMBOS, J. B. (1999). Vaccination with HPV16 peptides of patients with advanced cervical carcinoma: clinical evaluation of a phase I-II trial. *Eur J Cancer* **35**(6), 946-52.
- VAN DRIEL, W. J., TJONG, M. Y., HILDERS, C. G., TRIMBOS, B. J., and FLEUREN, G. J. (1996). Association of allele-specific HLA expression and histopathologic progression of cervical carcinoma. *Gynecol Oncol* **62**(1), 33-41.
- VAUGHN, J. L., GOODWIN, R. H., TOMPKINS, G. J., and MCCAWLEY, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* **13**(4), 213-7.
- 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., and MUNOZ, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* **189**(1), 12-9.
- WEI, M. L., and CRESSWELL, P. (1992). HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides. *Nature* **356**(6368), 443-6.
- WEINER, G. J., LIU, H. M., WOOLDRIDGE, J. E., DAHLE, C. E., and KRIEG, A. M. (1997). Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing the CpG motif are effective as immune adjuvants in tumor antigen immunization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(20), 10833-7.

- WERNES, B. A., LEVINE, A. J., and HOWLEY, P. M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* **248**(4951), 76-9.
- YARDEN, Y., and SLIWKOWSKI, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**(2), 127-37.
- YEWDELL, J. W., and BENNINK, J. R. (1989). Brefeldin A specifically inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Science* **244**(4908), 1072-5.
- YEWDELL, J. W., SNYDER, H. L., BACIK, I., ANTON, L. C., DENG, Y., BEHRENS, T. W., BACHI, T., and BENNINK, J. R. (1998). TAP-independent delivery of antigenic peptides to the endoplasmic reticulum: therapeutic potential and insights into TAP-dependent antigen processing. *J Immunother* **21**(2), 127-31.
- YORK, I. A., and ROCK, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* **14**, 369-96.
- YOUDE, S. J., DUNBAR, P. R., EVANS, E. M., FIANDER, A. N., BORYSIEWICZ, L. K., CERUNDOLO, V., and 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**(2), 365-71.
- YUAN, H., ESTES, P. A., CHEN, Y., NEWSOME, J., OLCESE, V. A., GARCEA, R. L., and SCHLEGEL, R. (2001). Immunization with a pentameric L1 fusion protein protects against papillomavirus infection. *J Virol* **75**(17), 7848-53.
- ZERFASS, K., SCHULZE, A., SPITKOVSKY, D., FRIEDMAN, V., HENGLEIN, B., and JANSEN-DURR, P. (1995). Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol* **69**(10), 6389-99.
- ZERFASS-THOME, K., ZWERSCHKE, W., MANNHARDT, B., TINDLE, R., BOTZ, J. W., and JANSEN-DURR, P. (1996). Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* **13**(11), 2323-30.
- ZHAO, K. N., SUN, X. Y., FRAZER, I. H., and ZHOU, J. (1998). DNA packaging by L1 and L2 capsid proteins of bovine papillomavirus type 1. *Virology* **243**(2), 482-91.
- ZHOU, J., GISSMANN, L., ZENTGRAF, H., MULLER, H., PICKEN, M., and MULLER, M. (1995a). Early phase in the infection of cultured cells with papillomavirus virions. *Virology* **214**(1), 167-76.
- ZHOU, J., SUN, X. Y., LOUIS, K., and FRAZER, I. H. (1994). Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *J Virol* **68**(2), 619-25.
- ZHOU, X., LIU, T., FRANKSSON, L., LEDERER, E., LJUNGGREN, H. G., and JONDAL, M. (1995b). Characterization of TAP-independent and brefeldin A-resistant presentation of Sendai virus antigen to CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol* **42**(1), 66-75.
- ZIEGLER, H. K., and UNANUE, E. R. (1982). Decrease in macrophage antigen catabolism caused by ammonia and chloroquine is associated with inhibition of antigen presentation to T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(1), 175-8.
- ZUR HAUSEN, H. (1996). Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* **1288**(2), F55-78.
- ZUR HAUSEN, H. (2000). Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst* **92**(9), 690-8.

J. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Genomaufbau von HPV16.....	2
Abbildung 2: Modelle des Papillomvirus-Kapsids.....	4
Abbildung 3: Infektionszyklus Humaner Papillomviren.....	5
Abbildung 4: T-Zell Priming.....	13
Abbildung 5: Reifung von Dendritischen Zellen.....	14
Abbildung 6: Modell der intrazellulären Signaltransduktionskaskade vermittelt durch Fc γ Rs III.....	15
Abbildung 7: Modell der TLR9-Signaltransduktionskaskade.....	16
Abbildung 8: Aktivierung von MAPK p38 durch hyperosmotischen Stress.....	17
Abbildung 9: Beispiel eines Pipettierschemas für die Beladung von BMDCs.....	45
Abbildung 10: Beispiel eines Pipettierschemas für eine intrazelluläre IFN γ	55
Abbildung 11: Beispiel eines Pipettierschemas für den Zytotoxizitätstest.....	58
Abbildung 12: Aufbau der Chimären Virus-ähnlichen Partikel.....	59
Abbildung 13: Antigen-Capture ELISA zur Analyse der CsCl-Fractionen.....	60
Abbildung 14: Analyse der CsCl-Fractionen durch Western Blot.....	60
Abbildung 15: Konzentrationsbestimmung der CsCl-Fractionen mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	61
Abbildung 16: Analyse der CsCl-Fractionen durch Elektronen-mikroskopie.....	61
Abbildung 17: Analyse der polyklonalen CVLP-spezifischen Mausseren mittels ELISA.....	63
Abbildung 18: Analyse der polyklonalen CVLP-spezifischen Mausseren mittels Western Blot.....	63
Abbildung 19: Typisierung monoklonaler L1-spezifischer Antikörper und des polyklonalen Mausserums B.....	64
Abbildung 20: Konzentrationsabschätzung der L1-spezifischen monoklonalen Antikörper und des polyklonalen Mausserums MS B.....	65
Abbildung 21: Morphologischer Vergleich von unreifen und reifen Dendritischen Zellen.....	68
Abbildung 22: Expression der Fc γ -Rezeptoren III/II (CD16/CD32).....	68
Abbildung 23: CVLP und CVLP-Immunkomplex Bindung an Dendritische Zellen.....	69
Abbildung 24: CVLP und CVLP-IC Bindung an DCs unter Fc γ -Rezeptoren III/II (CD16/CD32) Blockade.....	69
Abbildung 25a: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC.....	72
Abbildung 25b: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC.....	72
Abbildung 25c: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC.....	74
Abbildung 25d: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung von CVLPs und CVLP-IC.....	75
Abbildung 26a: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung mit CVLP in Kombination mit CpG und LPS.....	78
Abbildung 26b: Steigerung der Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung mit CVLP in Kombination mit CpG und LPS.....	79
Abbildung 27: Intrazelluläre IFN γ Färbung.....	81
Abbildung 28a: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs.....	82
Abbildung 28b: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs zu unterschiedlichen Zeitpunkten.....	82
Abbildung 28c: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs in Kombination mit CpG ODNs und Sorbitol-Behandlung.....	83
Abbildung 29a: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs und CVLP-Immunkomplexen.....	84
Abbildung 29b: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLPs und CVLP-Immunkomplexen.....	85
Abbildung 29c: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Beladung mit CVLP-Immunkomplexen.....	86
Abbildung 30: Zusammenfassung der MHC Klasse I Antigenpräsentations-Ergebnisse.....	87
Abbildung 31: Untersuchungen des MHC Klasse I Präsentationsweges von CVLPs und CVLP-ICs in TAP ^{-/-} BMDCs.....	89
Abbildung 32a: Brefeldin A Titration an RMA-E7 Zellen.....	90
Abbildung 32b: Untersuchungen des MHC Klasse I Präsentationsweges von CVLPs und CVLP-ICs in BMDCs unter der Verwendung von BFA.....	91
Abbildung 32c: Untersuchungen des MHC Klasse I Präsentationsweges von CVLPs und CVLP-ICs in BMDCs unter der Verwendung von BFA.....	91

Abbildung 33: In vitro Priming: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch CVLP-beladene BMDCs.....	93
Abbildung 34a: Intrazelluläre IFN γ Färbung.....	95
Abbildung 34b: IFN γ EliSpot.....	96
Abbildung 35: MHC-I-E7 ₄₉₋₅₇ -Tetramere.....	96
Abbildung 36a: HPLC Eluationsprofil der biotinylierten Monomere.....	97
Abbildung 36b: HPLC Eluationsprofil der MHC-I-Tetramere-PE.....	98
Abbildung 37a: In vivo Priming: Generierung E7-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs.....	99
Abbildung 37b: In vivo Priming: Generierung E7-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs (MHC-I-Tetramer Färbung).....	100
Abbildung 38a: In vivo Priming: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs (IFN γ -EliSpot).....	101
Abbildung 38b: In vivo Priming: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs (Zytotoxizitätstest (Cr ⁵¹ -release assay)).....	102
Abbildung 39: In vivo Priming: Generierung L1-spezifischer zytotoxischer T-Zellen durch Immunisierung von CVLP-beladenen BMDCs (IFN γ -EliSpot).....	103
Abbildung 40: Aktivierung unreifer BMDCs durch Beladung mit Kapsomeren.....	107
Abbildung 41: MHC Klasse I Antigenpräsentation von BMDCs nach Kapsomer-Beladung.....	108
Abbildung 42: Modell der CVLP-ICs Bildung bei unterschiedlicher Anzahl an verfügbaren IgG2a Antikörper Molekülen.....	117
Abbildung 43: Modell der möglicher Inhibition der CVLP-Aufnahme durch CpG ODNs.....	122
Abbildung 44: Cross Präsentation: Einschleusen von exogenen Antigenen in den ‚klassischen‘ MHC Klasse I Präsentationsweg.....	125
Abbildung 45: Cross Präsentation: Einschleusen von exogenen Antigenen in einen alternativen MHC Klasse I Präsentationsweg (post Golgi-Beladung).....	126
Abbildung 46: Modell für die Cross Präsentation von CVLPs und CVLP-ICs.....	128

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: HPV-Typen und ihr Krankheitsbild.....	1
Tabelle 2: Hauptfunktionen von HPV16 E1, E2 und E4.....	3
Tabelle 3: Hauptfunktionen von HPV16 E6 und E7.....	3
Tabelle 4: Klinische Phase I Studie CT 1006.....	11
Tabelle 5: Nachweismethoden Antigen-spezifischer T-Zellen aus Freyschmidt und Michel, 2003.....	48
Tabelle 6: Referenztable für Schwere und Leichte Kette und Antigen-Peptid.....	51
Tabelle 7: Typisierung monoklonaler L1-spezifischer Antikörper.....	64
Tabelle 8: Geschätzte Konzentrationen der Antikörper des polyklonalen Mausserums und der L1-spezifischen monoklonalen Antikörper.....	65
Tabelle 9: Zusammenfassung der BMDCs Aktivierungs-Experimente.....	77
Tabelle 10: Zusammenfassung der MHC Klasse I Antigenpräsentations-Ergebnisse.....	88
Tabelle 11: Zusammenfassung der in vitro Priming-Ergebnisse.....	94
Tabelle 12: Zusammenfassung der in vivo Priming Ergebnisse.....	105
Tabelle 13: Übersicht der murinen IgG Subtypen und ihrer murinen Fc γ Rs.....	112

ende