

Aus der Klinik für Gynäkologie mit Schwerpunkt Gynäkologische Onkologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Entwicklung eines hochsensitiven Zytotoxizitätsassays
zum Nachweis von Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

– Universitätsmedizin Berlin

von Jonas Stanke

aus Berlin

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. Andreas Kaufmann
 2. Prof. Dr. Walter Wörner
 3. Prof. Dr. Ingeborg Zehbe

Datum der Promotion: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Effektorfunktion zytotoxischer CD8 ⁺ T-Zellen.....	3
2.2	Experimentelle Methoden zum Nachweis von CTL.....	3
2.3	Zielstellung	3
3	Methodik.....	5
3.1	Untersuchungsmaterial und Zelllinien.....	5
3.2	Modellantigene und Peptide	5
3.3	Isolierung von Zellen.....	5
3.4	Generierung autologer Zellen für die Antigenpräsentation	5
3.5	<i>In-vitro</i> -Generierung humaner antigenspezifischer CTL-Linien.....	6
3.6	Induktion tumorantigenspezifischer T-Zellen im Tiermodell.....	6
3.7	Design und Generierung eukaryontischer Expressionsvektoren für die Plasmidtransfektionsfluorolyse.....	6
3.8	Transfektion eukaryontischer Zellen	6
3.9	Generierung stabil HLA-A2 exprimierender K562-Zellen	7
3.10	Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer CTL durch intrazelluläre Zytokinfärbung	7
3.11	Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer CTL durch Tetramerfärbung.....	7
3.12	Nachweis der CTL-Aktivität durch ⁵¹ Chrom-Freisetzungstest.....	7
3.13	Durchflusszytometrischer Nachweis der CTL-Funktion.....	8
3.14	Statistische Analysen.....	8
4	Ergebnisse.....	9
4.1	Entwicklung einer durchflusszytometrischen Methode zur Detektion geringer Frequenzen funktioneller epitopspezifischer CTL	9
4.2	Modulares Vektorsystem als Basis für zytometrische Methoden zum Nachweis gesamtantigenspezifischer CTL-Funktion.....	10
4.3	Optimierung einer therapeutischen Vakzinierung für das humane Papillomvirus durch Kombination mit Immunmodulatoren im Mausmodell	14
5	Diskussion	16
6	Literaturverzeichnis	20
7	Anteilsklärung	24
8	Eigene Publikationen.....	25

9	Lebenslauf	26
10	Selbstständigkeitserklärung	27
11	Danksagung	28

Abkürzungen

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
B-LCL	B-lymphoblastoide Zelllinie (<i>engl.: B-Lymphoblastic Cell Line</i>)
CFSE	Carboxyfluoreszeinsuccinimidylester
CMTMR	Chlormethylbenzoylaminotetramethylrhodamin
CMVpp65	Phosphoprotein 65(kDa) des Zytomegalievirus (<i>engl.: Cytomegalovirus</i>)
CRA	⁵¹ Chrom-Freisetzungstest (<i>engl.: ⁵¹Chromium-Release Assay</i>)
CTL	zytotoxische CD8 ⁺ T-Zelle (<i>engl.: Cytotoxic T Lymphocyte</i>)
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
FR	Dimethyldodecylaminooxidsuccinimidylester (<i>engl.: Far Red</i>)
GFP	grün fluoreszierendes Protein
HIV	humanes Immundefizienzvirus
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPV	humanes Papillomvirus
IFN	Interferon
IMP-1	Matrixprotein M1 des Influenzavirus A
K562-A2	HLA-A2 exprimierende humane Zelllinie K562
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>engl.: Major Histocompatibility Complex</i>)
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (<i>engl.: Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PTF	Plasmidtransfektionsfluorolyse-Test
RFP	rot fluoreszierendes Protein
Treg	regulatorische FOXP3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zelle
VITAL-FR	VITAL-FR-Test
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>engl.: Yellow Fluorescent Protein</i>)

1 Zusammenfassung

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL) erkennen spezifische Peptide intrazellulär prozessierter Antigene im Kontext bestimmter Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I (MHC-Klasse I) bzw. humaner Leukozytenantigene der Klasse I (HLA-A,B,C) und können diese Zellen lysieren. Damit stellen CTL wesentliche Effektoren zur Eliminierung z.B. virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen dar, deren Präsenz Aufschluss über ein aktuelles Immungeschehen oder das Immunpotential liefert. Die funktionelle Charakterisierung meist sehr geringer CTL-Frequenzen im peripheren Blut oder im Gewebe für diagnostische und wissenschaftliche Fragestellungen erfordert sensitive und flexible Methoden, die bisher nicht zur Verfügung standen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden der VITAL-FR-Test (VITAL-FR) und der Plasmidtransfektionsfluorolyse-Test (PTF), zwei durchflusszytometrische Messsysteme für den experimentellen Nachweis und die Quantifizierung der CTL-Funktion, entwickelt. Die Sensitivität, Spezifität und Reproduzierbarkeit beider Methoden wurde mit Hilfe immundominanter HLA-A2-restringierter Epitope aus dem Phosphoprotein des humanen Zytomegalievirus (CMVpp65)₄₉₅₋₅₀₃ und dem Matrixprotein-1 des humanen Influenzavirus (IMP-1)₅₈₋₆₆ validiert, für Zielzellen mit definierter Expression von HLA-A2 (K562-A2) sowie für autologe B-lymphoblastoide Zelllinien (B-LCL) und mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (PBMC) optimiert und für den Nachweis spezifischer CTL gegen virale und tumorassoziierte Antigene getestet.

Der VITAL-FR gestattet die sensitive Erfassung der funktionellen CTL-Reaktivität auf definierte Peptidepitope mit bekanntem MHC-Klasse I-Kontext für die Präsentation. Das Verhältnis zweier unterschiedlich fluoreszenzgefärbter und mit verschiedenen synthetischen Peptiden beladener Zielzellpopulationen wird nach Inkubation mit Effektorzellen in der Durchflusszytometrie analysiert. Im Vergleich zum klassischen radioaktiven ⁵¹Chrom-Freisetzungstest erwies sich der VITAL-FR als bis zu 30fach sensitiver. Unter optimalen Bedingungen gelang der reproduzierbare Nachweis von mindestens drei spezifischen CTL. Die Kombination zweier in ihrer Emission gut abgrenzbarer Zellfarbstoffe ($\Delta\lambda_{em}$: 90 nm), eine geringe initiale Zielzellzahl (10^3) sowie die gleichzeitige und lange Inkubation der CTL mit Zielzellen die mit einem spezifischen Antigen und Kontrollzielzellen die mit einem spezifischen Kontrollpeptid beladen wurden über 72 h waren die Voraussetzung für die hohe Sensitivität des VITAL-FR.

Bei vielen klinisch relevanten Antigenen sind die für die spezifische CTL-Aktivierung verantwortlichen Peptidepitope und entsprechende MHC-Klasse I-Restriktionen nicht bekannt. Die Transfektion von in dieser Arbeit entwickelten modularen Vektoren in Zielzellen sind Grundlage für den PTF, der den funktionellen Nachweis CTL-vermittelter Reaktivität auf Gesamtantigene erlaubt. Eine Kenntnis zugrunde liegender Bindungsaffinitäten prozessierter Epitope, oder der individuellen, autologen MHC-Klasse I-Muster ist nicht nötig. Das Vektorsystem kombiniert die rekombinante Ubiquitinierung

für eine effiziente proteasomale Prozessierung exprimierter Gesamtantigene und dadurch die erhöhte Präsentation auf MHC-Klasse I-Molekülen, mit einer gleichzeitigen Expression durchflusszytometrisch detektierbarer Fluoreszenzreporterproteine in potentiellen Zielzellen. Im Vergleich zu exogen mit CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid beladenen Zielzellen wurden die durch intrazelluläre Expression und Prozessierung des gesamten CMVpp65-Proteins beladenen Zielzellen bereits durch fünffach weniger epitopspezifische CTL vergleichbar lysiert. Die Quantifizierung IMP-1- und CMVpp65-spezifischer CTL-Funktion in dem PTF korrelierte zu den indirekten Nachweisverfahren über HLA-A2-Tetramere und der Produktion von Interferon- γ . Die Besonderheit, dass potentielle Zielzellen gleichzeitig ein Reporterprotein und ein definiertes, prozessiertes Gesamtantigen exprimieren, gestattete die simultane Erfassung antigenspezifischer CTL für unterschiedliche Antigene innerhalb einer Effektorpopulation. In seiner Anwendung lieferte der PTF einen wichtigen Beitrag zur Bewertung der durch eine Tumorstoffimpfung induzierten CTL-Reaktivität im Mausmodell.

Mit der Entwicklung des VITAL-FR und des PTF stehen zwei neue Methoden für den funktionellen und sensitiven Nachweis der CTL-vermittelten Effektorfunktion gegen definierte Einzelpeptide oder komplexe Gesamtantigene zur Verfügung. Diese Methoden schaffen die Voraussetzung für ein effektives *Immuno-Monitoring* sowie für die Identifizierung und Charakterisierung neuer MHC-Klasse I-vermittelter Immunreaktionen.

2 Einleitung

2.1 Effektorfunktion zytotoxischer CD8⁺ T-Zellen

Die durch zytotoxische CD8⁺ T-Zellen (CTL) vermittelte zelluläre Immunantwort richtet sich gegen Körperzellen, die fremde Antigene oder Epitope auf ihrer Oberfläche präsentieren. Solche Antigene stammen z.B. von intrazellulär persistierenden Viren oder Bakterien oder sind Folge somatischer Mutationen wie bei Tumoren [1,2,3]. CTL erkennen über spezifische T-Zellrezeptoren derartige definierte Peptidepitope aus intrazellulär prozessierten Antigenen, im Kontext von Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC-Klasse I) bzw. beim Menschen von humanen Leukozytenantigenen der Klasse I (HLA-A,B,C) auf antigenpräsentierenden Zellen [4,5,6]. Die CTL üben ihre Effektorfunktion über die Produktion von Zytokinen wie Interferon (IFN)- γ sowie über die zytolytische Wirkung von Perforin und Granzymen aus [7,8].

2.2 Experimentelle Methoden zum Nachweis von CTL

Etablierte Methoden zur Detektion CTL-vermittelter Immunreaktivität weisen indirekte Parameter oder direkt die zytolytische Funktion nach.

Indirekte Nachweise erfassen spezifisch aktivierte CTL über die Expression von IFN- γ , Perforin, Fas-Ligand (CD95L) oder 4-1BB (CD137) mit antikörperbasierten Methoden wie dem *Enzyme-Linked Immuno Spot* oder in der Durchflusszytometrie [9,10,11]. Fluorochromgekoppelte, peptidbeladene MHC-Klasse I/HLA-A,B,C-Tetramere erlauben die Detektion einzelner spezifischer CTL über die Bindungsaffinität des T-Zellrezeptors [12,13]. Diese Surrogatparameter-Methoden ermöglichen den Nachweis geringer Mengen antigenspezifischer CTL, erlauben jedoch keine Aussage über deren tatsächliche zytolytische Funktionalität [14].

Direkte Nachweismethoden der CTL-vermittelten spezifischen Lyse der Zielzellen durch den klassischen ⁵¹Chrom-Freisetzungstest (CRA), die Bestimmung freigesetzter Lactatdehydrogenase und bisherige durchflusszytometrische Methoden auf der Basis chemisch gefärbter und mit exogenen Peptiden beladener Zielzellen sind in der Regel weniger sensitiv als die indirekten, über Surrogatparameter quantifizierenden Methoden und erfordern entsprechend viele Effektorzellen für einen zuverlässigen Nachweis [15,16,17].

2.3 Zielstellung

Die Funktion spezifischer CTL ist als kritischer Faktor für die Kontrolle viraler und bakterieller Infektionen sowie der Tumorentstehung beschrieben [18,19]. Da ihre Frequenz sehr gering sein kann und Probenmaterial aus Patienten häufig limitiert ist, stellen eine geringe Sensitivität und der erhebliche experimentelle Aufwand entscheidende Einschränkungen beim Nachweis dieser Effektorzellen dar. Die besondere Bedeutung der zellulären Immunantwort und die Entwicklung therapeutischer Vakzine zur Induktion spezifischer CTL erfordern neue effiziente und sensitive Technologien in der klinischen Diagnostik und in experimentellen Systemen. Die Detektion, Charakterisierung und

Verlaufsüberwachung der CTL-Funktion auch bei bisher immunologisch uncharakterisierten immunrelevanten Antigenen und bei unbekannter individueller MHC-Klasse I/HLA-A,B,C-Ausstattung ist notwendig.

Innerhalb der hier vorgelegten Arbeit sollten sensitive Nachweissysteme zur Erfassung der epitop- und gesamtantigenspezifischen CTL-vermittelten Reaktivität entwickelt und deren Anwendung für unterschiedliche virale und tumorassoziierte Antigene demonstriert werden.

3 Methodik

3.1 Untersuchungsmaterial und Zelllinien

Für die Untersuchungen mit peripherem Blut des Menschen wurden *Buffy Coats* vom Deutschen Roten Kreuz (Berlin) bezogen. Die Tierversuche wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Projektnummer G0189/05) genehmigt. Folgende Zelllinien wurden in den Experimenten verwendet: K562 (humane, erythroleukämische Zelllinie mit Deletion des HLA-A,B,C-Lokus; Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ; Braunschweig), ACC 10) [20]; B95-8 (lymphoblastoide Epstein-Barr-Virus sezernierende Primatenzelllinie; DSMZ, ACC 100) [21]; T2 (humane Hybridomzelllinie mit einem Defekt im Antigenpeptid-Transporter; *American Type Culture Collection* (ATCC; Bethesda, USA), CRL-1992) [22]; C3 (murine epitheliale durch das humane Papillomvirus (HPV)16 immortalisierte Zelllinie, freundlicherweise von Jan ter Schegget (Medizinische Universität Leiden, Niederlande) zur Verfügung gestellt [23]; TC1 (murine epitheliale HPV16-E6/7 exprimierende Zelllinie; ATCC, CRL-2785) [24] und EL-4 (murine lymphoblastoide Zelllinie; ATCC, TIB-39) [25]. Alle gentechnischen Arbeiten wurden in der Gentechnischen Anlage Nr. 614/04 der Sicherheitsstufe 2 in der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

3.2 Modellantigene und Peptide

Die folgenden im Kontext von HLA-A2 immundominanten Epitope wurden als Peptide von der Firma Biosyntan (Berlin) synthetisiert: CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃ aus dem Phosphoprotein 65 des Zytomegalievirus (CMVpp65): ACN52454.1) [26]; IMP-1₅₈₋₆₆ aus dem Matrixprotein-1 des Influenzavirus A (IMP-1) [27]; HIVpol₅₁₀₋₅₁₈ aus dem Polyprotein des humanen Immundefizienz-Virus (HIV) [28] und HPV16E7₁₁₋₂₀ aus dem E7-Protein aus HPV16 [29].

Zur Generierung der Stimulations- und Detektionsplasmide wurden die DNA-Sequenzen des CMVpp65-Gesamtantigens (NCBI accession: ACN52454.1), des IMP-1-Gesamtantigens (NCBI accession: M63527) und des HPV16 E7-Gesamtantigens (NCBI accession: NC001526.1) verwendet.

3.3 Isolierung von Zellen

Humane mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC) wurden durch Dichtegradientenzentrifugation isoliert (beschrieben in [30]). Die murinen Milzen wurden den Versuchstieren entnommen und mit Hilfe des gentleMACS-Cell-Dissociator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) aufgearbeitet (beschrieben in [31]).

3.4 Generierung autologer Zellen für die Antigenpräsentation

Dendritische Zellen wurden durch Kultur von PMBC in Gegenwart von Granulozyten/Makrophagenkoloniestimulierendem Faktor und Interleukin-4 gewonnen und autologe B-lymphoblastoide Zelllinien (B-LCL) durch Transformation von B-Zellen mit dem Epstein-Barr-Virus (beschrieben in [30]).

3.5 In-vitro-Generierung humaner antigenspezifischer CTL-Linien

Humane antigenspezifische CTL-Linien wurden *in vitro* durch Kultur von PBMC in Gegenwart von spezifisch antigenbeladenen oder antigenexprimierenden Stimulatorzellen generiert (beschrieben in [31,32]). Bei Verwendung von PBMC als antigenexprimierende Stimulatorzellen wurden diese mit dem CD86 kodierenden Plasmid pCD86 kotransfiziert (beschrieben in [32]). Die Expression von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Zytokinen wurde nach Färbung mit direkt markierten spezifischen Antikörpern durchflusszytometrisch analysiert (beschrieben in [30]).

3.6 Induktion tumorantigenspezifischer T-Zellen im Tiermodell

Zur Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen erhielten Mäuse des Stammes C57Bl/6 (Charles River, Sulzfeld) eine Injektion 1×10^{10} infektiöser Partikel (IP) des Ad-p14 oder des Kontrollvirus Ad-lacZ intramuskulär in den rechten Oberschenkel (beschrieben in [31]).

3.7 Design und Generierung eukaryontischer Expressionsvektoren für die Plasmidtransfektionsfluorolyse

Die Einzelelemente der modularen Detektionsvektoren für den PTF wurden mittels Klonierung nach Standard-Polymerasekettenreaktion zusammengesetzt. Die DNA-Sequenzen des Ubiquitins und der selbstspaltenden 2A-Sequenz des *Thosea-asigna*-Virus wurden mit Hilfe der Software jcat (www.jcat.de) für den humanen Organismus kodonoptimiert und durch Eurofins (Hamburg) synthetisiert. Zusätzlich wurde in die Ubiquitinsequenz eine C-terminale Punktmutation (G76A) eingeführt, um eine irreversible Konjugation mit dem Antigen zu gewährleisten (siehe Abb. 4 in [32]). Das grün fluoreszierende AcGFP wurde aus dem GreenTM Plasmid (GFP; Lonza, Basel, Schweiz), das rot fluoreszierende dsRed (RFP) und das gelb fluoreszierende Yellow (YFP) aus den Plasmiden pDsRed-Express2-N1 bzw. pZsYellow1-N1 (Clontech, Mountain View, USA) gewonnen. Alle Stimulations- und Detektionsvektoren mit der selbstspaltenden 2A-Sequenz sowie das Plasmid mit der Sequenz für kostimulatorisches, humanes CD86 wurden auf der Grundlage des Vektors pmaxCloningTM (Lonza) erstellt. Die 2-Promotorkonstrukte wurden auf der Grundlage des Vektors pVITRO2-hygro-mcs (Invivogen, San Diego, USA) zusammengesetzt, wobei die humane Hygromycinresistenz durch Deletion der *Internal Ribosomal Entry Site* und Einführung einer PolyA-Sequenz beseitigt wurde.

3.8 Transfektion eukaryontischer Zellen

Die Generierung von Stimulator- und Zielzellen, die spezifische Gesamtantigene exprimieren, erfolgte durch Nukleofektion mittels Amaxa (Lonza) oder der ELPorator1000-Technik [33] (Tab. 1).

Tabelle 1: Nukleofektionsbedingungen für die verwendeten Zellen

Technologie	Zellen	Puffer	Elektrische Bedingungen
Amaxa I	B-LCL	T	Programm U01
	dendritische Zellen	<i>Dendritic Cell</i>	Programm U02
	K562/K562-A2	V	Programm T16
	EL-4	V	Programm C09
ELPorator1000	PBMC	90 mM Phosphatpuffer, pH 7,2, 10 mM MgCl ₂ 50 mM Glukose	Rechteckimpuls: 800 V, 400 µs

3.9 Generierung stabil HLA-A2 exprimierender K562-Zellen

Eine freundlicherweise von Wolfgang Herr (Medizinische Universität Mainz) zur Verfügung gestellte cDNA des humanen HLA-A*0201-Allels (HLA-A2) wurde in den Vektor pVITRO2-mcs2 (Invivogen) unter Kontrolle eines Ferritin-Promotors kloniert. Transfizierte K562-Zellen wurden mit 200 µg/ml Hygromycin selektioniert und stabil exprimierende K562-A2-Zellen wurden mittels anti-HLA-A2-Antikörper (Klon HB82) gekoppelter magnetischer *Beads* (Miltenyi Biotech) daraus angereichert (beschrieben in [30]).

3.10 Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer CTL durch intrazelluläre Zytokin-färbung

Für den Nachweis der antigenspezifischen IFN- γ -Produktion von CTL wurden peptid- oder antigenbeladene Stimulatorzellen mit CD8⁺ T-Zellen im Verhältnis 1:10 gemischt und für einen Zeitraum von 16 h kultiviert. Zur intrazellulären Anreicherung der Zytokine wurde dem Ansatz nach 2 h Inkubationszeit Brefeldin A zugesetzt. Die Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit spezifischen Antikörpern für die Zelloberflächenmoleküle CD8 und CD4 sowie für intrazelluläres IFN- γ gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht (beschrieben in [31]).

3.11 Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer CTL durch Tetramerfärbung

Zur Identifizierung und Quantifizierung IMP-1₅₈₋₆₆ und CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃ epitopspezifischer CTL wurden Tetramerfärbungen in Kombination mit CD8-spezifischem Antikörper durchgeführt (beschrieben in [30]). Die verwendeten Tetramere wurden freundlicherweise von Stefan Stevanovic (Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt.

3.12 Nachweis der CTL-Aktivität durch ⁵¹Chrom-Freisetzungstest

Im Chromfreisetzungstest wurde die Lyse radioaktiv markierter Zielzellen durch CTL über in den Kulturüberstand freigesetztes, radioaktiv markiertes Chrom bestimmt [30]. Dazu wurden Zielzellen mit Na₂[⁵¹Cr]O₄ (300 mCi, 2 h) beladen und anschließend mit einer titrierten Anzahl von T-Zellen 4 h inkubiert. Die γ -Strahlung in den Zellkulturüberständen wurde innerhalb einer Minute bestimmt (LKB Wallac, Bromma, Schweden). Der Anteil spezifisch freigesetzten Chroms wurde wie folgt berechnet: Prozentzahl spezifischer Chromfreisetzung = (experimentelle Freisetzung-spontane

Freisetzung) x 100% / (maximale Freisetzung-spontane Freisetzung). Die maximale Freisetzung wurde aus dem Überstand von Zielzellen nach Zugabe von 1% Triton X-100 bestimmt.

3.13 Durchflusszytometrischer Nachweis der CTL-Funktion

Sowohl der VITAL-FR als auch der PTF erfassen die CTL-vermittelte Lyse spezifischer Zielzellen im Verhältnis zu einer Kontrollzellpopulation (beschrieben in [31]). Im VITAL-FR erfolgte die Abgrenzung der Zellpopulationen über Beladung mit grün fluoreszierendem Carboxyfluoreszeinsuccinimidylester (CFSE; λ_{em} : 520 nm) und Beladung mit rot fluoreszierendem Dimethyldodecylaminooxidsuccinimidylester (Far Red; λ_{em} : 610 nm) (Abb. 1A); in dem PTF über intrazellulär exprimiertes GFP (λ_{em} : 505 nm) und rot fluoreszierendes RFP (λ_{em} : 591 nm) (Abb. 1B). Die Auswertung von VITAL-FR und PTF zur Ermittlung der spezifischen Lyse von Zielzellen erfolgte durch den Bezug auf einen entsprechenden Kontrollansatz ohne Effektorzellen (Abb. 1C).

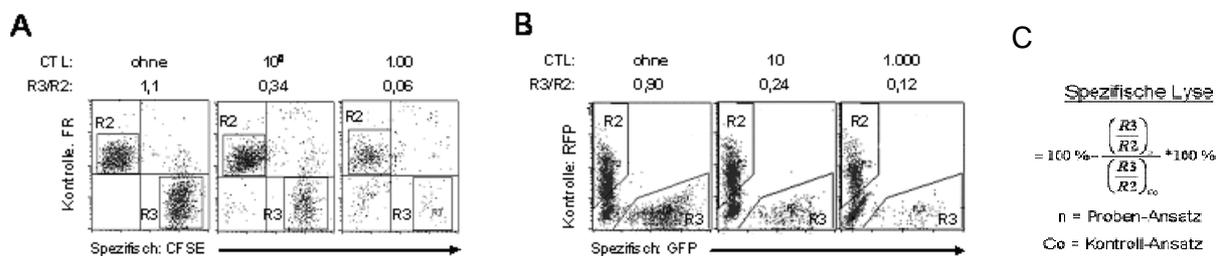


Abbildung 1: Durchflusszytometrischer Nachweis der CTL-vermittelten Lyse fluoreszierender Zielzellen. (A) Zielzellen wurden jeweils mit CFSE und relevantem Peptidepitop bzw. Far Red (FR) und irrelevantem Peptidepitop gefärbt und beladen. Jeweils 10^3 Zellen beider Populationen wurden gemischt und mit einer aufsteigenden Menge CTL versetzt. Nach 48-72 h Inkubation wurden die verbleibenden Zielzellen der Populationen R2 (FR⁺) und R3 (CFSE⁺) durchflusszytometrisch erfasst. (B) Zielzellen wurden jeweils mit Koexpressionsvektoren transfiziert, die für ein spezifisches ubiquitiniertes Gesamtantigen in Kombination mit GFP bzw. für ein Kontrollantigen zusammen mit RFP kodieren und wie unter (A) beschrieben durchflusszytometrisch analysiert. (C) Die CTL-vermittelte Lyse der spezifischen Zielzellen (n) wurde über das Verhältnis von R3 und R2 im Bezug zur Kontrolle (Co) ohne zugesetzte CTL errechnet.

3.14 Statistische Analysen

Die Daten wurden mit den Tabellenkalkulationsprogrammen Excel™ (Microsoft, München) und SPSS Software für Windows (Version 15; SPSS Institute, Chicago, USA) ausgewertet (siehe [30]).

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung einer durchflusszytometrischen Methode zur Detektion geringer Frequenzen funktioneller epitopspezifischer CTL

Der direkte Nachweis der CTL-Effektorfunktion aus klinischem Probenmaterial wird oftmals durch die geringe Frequenz isolierter spezifischer Effektorzellen verhindert. In der wissenschaftlichen Forschung werden zudem sensitive Methoden benötigt, die eine praktische Überprüfung theoretisch vorhergesagter immunogener CTL-Epitope gewährleisten. Zu diesem Zweck wurde der VITAL-FR [30] auf der Grundlage der VITAL-Methode [15] entwickelt.

In der VITAL-Methode nach Hermans *et al.* wird die Lyse fluoreszenzgefärbter, peptidbeladener Zielzellen nach vierstündiger Inkubation mit der Effektorzellpopulation detektiert. Während in der VITAL-Methode ein Teil der Zielzellpopulation mit dem orangeroten Fluoreszenzfarbstoff Chlormethylbenzoylamino-tetramethylrhodamin (CMTMR; λ_{em} : 565 nm) gefärbt und deren MHC-Klasse I-Moleküle mit einem irrelevanten Peptid exogen beladen werden, wird der andere Teil der Zielzellpopulation mit CFSE ($\Delta\lambda_{em}$: 45 nm) gefärbt und mit dem relevanten immunogenen Peptid beladen [15]. Der Austausch des Zellfarbstoffs CMTMR durch Far Red, der eine hohe zelluläre Persistenz und eine geringe Zytotoxizität aufweist [34], führte im VITAL-FR zu einer stärkeren spektralen Abgrenzung zu CFSE ($\Delta\lambda_{em}$: 90 nm) während der zytometrischen Erfassung der Zielzellen. Zusammen mit einer Reduktion der initial eingesetzten Zielzellen konnte eine Ausdehnung der Koinkubationszeit auf 72 h ermöglicht werden. Wie erwartet, erhöhte sich die spezifische Zielzellyse. Die Kinetik der CTL-vermittelten spezifischen Lyse humaner autologer B-LCL und humaner T2-Zellen als Zielzellen, die mit dem immundominanten CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid beladen waren, zeigte im VITAL-FR einen signifikanten Anstieg der spezifisch lysierten Zielzellen während der 72 h Koinkubation bei Einsatz kleiner Zahlen CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer Effektoren ($n \leq 10$) (siehe Abb. 2 in [30]).

Mit dem VITAL-FR konnte die signifikante spezifische zytotoxische Lyse unterschiedlicher Zielzellen dosisabhängig von der CTL-Anzahl nachgewiesen werden. Während sich eine signifikante Lyse bei Verwendung der etablierten humanen HLA-A2⁺ Zelllinie T2 bereits bei Zugabe von 1-3 spezifischen CTL nachweisen ließ, zeigte die K562-A2-Zelllinie sowie die das gesamte HLA-A,B,C-Spektrum des Spenders repräsentierenden autologen HLA-A2⁺ B-LCL eine vergleichbare Lyse durch 10-30 spezifische Effektorzellen (siehe Abb. 4B in [30]).

Die Validierung der Sensitivität des VITAL-FR durch Ermittlung der spezifischen Lyse von mit CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃ bzw. IMP-1₅₈₋₆₆ beladenen T2-Zielzellen in Abhängigkeit von der Anzahl zugesetzter spezifischer Effektorzellen ergab eine ca. 10-30-fach höhere Sensitivität des VITAL-FR (1-10 CTL) im Vergleich zum klassischen CRA (30-100 CTL) (siehe Abb. 2 in [30]). Dieser Vorteil wurde noch deutlicher bei Betrachtung der durchschnittlichen halbmaximalen Lyse, die durch den CRA im Median mit 325 CTL bzw. durch den VITAL-FR mit 7 CTL erreicht wurde (siehe Abb. 5 in [30]). Die hohe

Sensitivität und die dem Versuchsprinzip zugrunde liegende interne Kontrolle des VITAL-FR ermöglichten im Vergleich zum CRA eine Reduzierung der eingesetzten Effektorzellzahlen um den Faktor 30-100 (siehe Abb. 5 und Tabelle 1 in [30]). Eine weitere Reduktion der Menge eingesetzter Zielzellen führte zu einer höheren Sensitivität, wobei sich der beste Kompromiss zwischen Sensitivität und Reproduzierbarkeit, bei einer Zellzahl von jeweils 10^3 mit CFSE bzw. Far Red gefärbten peptidbeladenen Zielzellen ergab.

Die ausgedehnte Inkubationszeit, die kleine Zahl initial eingesetzter Zielzellen in Kombination mit der geringen spektralen Überlappung von CFSE und Far Red bestimmten die Sensitivität des VITAL-FR, der für den Nachweis spezifischer CTL-Reaktivität bei bekanntem MHC-Klasse I-Kontext für immundominante Epitope entwickelt wurde [30].

4.2 Modulares Vektorsystem als Basis für zytometrische Methoden zum Nachweis gesamtantigenspezifischer CTL-Funktion

Die Messung des CTL-vermittelten Immunstatus von Patienten bezüglich krankheitsassoziierter Antigenepitope setzt in dem hochsensitiven VITAL-FR die Kenntnis der HLA-A,B,C-Moleküle des zu testenden Individuums voraus. Gleichmaßen müssen hier für die Anwendung Kenntnisse der im Vorfeld zu synthetisierenden HLA-assoziierten minimalen T-Zellepitope vorhanden sein. Daher wurde eine neue sensitive Methode auf der Grundlage universell transfizierbarer Plasmidkonstrukte für die intrazelluläre Expression proteasomal degradiert Antigenen und durchflusszytometrisch erfassbarer Fluoreszenzfarbstoffe in Zielzellen entwickelt. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind Grundlage eines Patentes [31] sowie eines Manuskriptes, die der vorliegenden Arbeit beigelegt sind. Die Publikation ist gegenwärtig in Revision bei der Zeitschrift PLoS ONE.

Diese als PTF bezeichnete Methode nutzt den natürlichen Weg eines intrazellulär exprimierten und prozessierten Gesamtantigens zur Induktion und Quantifizierung einer MHC-Klasse I-assoziierten Immunantwort und ist somit ohne Kenntnis des HLA-Haplotyps des Patienten oder immundominanter Epitope des Antigenen durchführbar. Abhängig von der Wahl der Zielzellen sollte die Methode die Beantwortung von Fragestellungen möglich machen, die dem VITAL-FR nicht zugänglich waren. Diese beinhalteten die Untersuchung polyspezifischer CTL-Reaktivitäten gegen aus Gesamtantigenen prozessierte Epitope im Kontext einzelner definierter MHC-Klasse I-Moleküle oder der gesamten autologen MHC-Klasse I-Strukturen.

Die Expression von direkt fusioniertem, ubiquitiniertem Antigen mit einem N-terminalen Fluoreszenzmarker in Zielzellen zeigte eine massive Degradation eines fluoreszierenden Reporterproteins und verhinderte so die anschließende zytometrische Detektion antigenexprimierender Zielzellen (siehe Abb. 8 in [32]). Während die Expressionsstärke von ubiquitiniertem Antigen und Reporterprotein bei Koexpression mit zwei unabhängigen Promotoren in humanen und Maus-Zelllinien vergleichbar war,

exprimierten primäre autologe PBMC und B-LCL beide Proteine asynchron (unveröffentlichte Daten). Zusätzlich zu diesen 2-Promotorkonstrukten wurden Koexpressionskonstrukte geschaffen, bei denen ubiquitiniertes Antigen und Reporterprotein von einem Promotor ausgehend exprimiert werden und über eine zwischengeschaltete 2A-Sequenz translational entkoppelt wurden (siehe Abb. 1 und 2 in [32]). Mit diesen 2A-Konstrukten konnte in der humanen K562-A2-Zelllinie als auch in frisch isolierten humanen PBMC und in B-LCL sowie in murinen EL-4-Zellen eine hohe Expression von Antigen und Marker erreicht werden (siehe Tab. 1 in [32]). Die Genexpressionseffizienz und Synchronität von zu prozessierendem Antigen und Reporterprotein wurde somit von der Art der Vektorelemente, deren Anordnung sowie von der Art der Zielzellen beeinflusst.

Mit K562-A2 und EL-4 als Zielzelllinien konnte die CTL-vermittelte Reaktivität im PTF erfolgreich nachgewiesen werden (siehe Abb. 13,14 und 16 in [32]). Eine signifikante Zielzelllyse autologer B-LCL und PBMC erfolgte bereits durch 10-30 CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifische CTL. Bereits 3-10 CTL reichten aus, um die signifikante Lyse transfizierter K562-A2-Zellen nachzuweisen (siehe Abb. 13 in [32]). Für den Unterschied zwischen der Expression des transfizierten Gesamtantigens zur Beladung mit Peptidpitopen für die Effektorfunktion epitopspezifischer CTL auf Zielzellen wurden K562-A2-Zellen mit dem Vektor für das CMVpp65-Gesamtantigen transfiziert bzw. mit dem immunodominanten synthetischen Minimalepitop CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃ beladen. Diese Zellen wurden 72 h mit HLA-A2-restringierten CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischen CTL inkubiert. Bei Verwendung mit dem Gesamtantigen transfizierter K562-A2-Zellen reichten bereits 1/5-1/10 der antigenspezifischen Effektoren aus, um eine vergleichbare Lyse wie bei Peptidpitop-beladenen Zielzellen herbeizuführen (siehe Abb. 14 in [32]).

Ein weiteres Indiz für die verbesserte Peptidpräsentation ubiquitiniertes transfizierter Antigenkonstrukte wurde mittels der Untersuchung der T-Zellstimulation gefunden. Dendritische Zellen wurden mit einem Vektor für das ubiquitinierte CMVpp65-Gesamtantigen transfiziert und zur einmaligen Stimulation autologer HLA-A2⁺ PBMC verwendet. Es wurde eine deutlich höhere Frequenz CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-spezifischer CTL induziert (15,3-34,4%; n = 3) als durch die mit synthetischem Peptid exogen beladenen dendritischen Zellen (1,1-1,5%; n = 3) (siehe Abb. 7 in [32]).

Diese Ergebnisse waren der Ausgangspunkt für die Validierung des PTF. Dazu wurden zunächst frisch isolierte PBMC aus HLA-A2⁺ CMV⁺ Spendern mit einem Vektor für das ubiquitinierte CMVpp65-Gesamtantigen und einem für das kostimulatorische Oberflächenmolekül CD86 kotransfiziert und diese PBMC als Stimulatorzellen für autologe Gedächtnis-T-Zellen verwendet. Die spezifische Reaktivität der CTL wurde anschließend über die IFN- γ -Produktion, durch Färbung mit HLA-A2/CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Tetrameren und über die funktionelle Lyse in dem PTF untersucht. Die Zielzellen wurden mit 2A-Konstrukten transfiziert, die für 275 Aminosäurereste des N-Terminus von CMVpp65 (CMVpp65₁₋₂₇₅), 285 Aminosäurereste des C-Terminus von CMVpp65 (CMVpp65₂₇₆₋₅₆₁) oder für das CMVpp65-Gesamtprotein jeweils in Kombination mit einem fluorogenen Reporterprotein kodierten. Das immunodominante HLA-A2-restringierte Epitop CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃ liegt im C-terminalen Bereich des

Antigens. Daher zeigte sich bei Stimulation mit dem C-terminalen CMVpp65₂₇₆₋₅₆₁-Protein oder dem CMVpp65-Gesamtprotein transfizierten K562-A2-Zielzellen eine deutliche IFN- γ -Produktion (Abb. 2A). Die Dominanz des HLA-A2/CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Epitops und die unterschiedliche Stärke der über IFN- γ -Produktion ermittelten Antworten für die unterschiedlichen Spender wurden über die Färbung mit dem HLA-A2/CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Tetramer bestätigt (Abb. 2B). Bezüglich des N-terminalen CMVpp65₁₋₂₇₅-Proteins konnte bei Spender 2 eine IFN- γ -Produktion durch CTL (0,2%) nachgewiesen werden. Die parallele Messung der funktionellen CMVpp65-spezifischen CTL-Reaktivität mit K562-A2-Zielzellen im PTF korrelierte bei beiden Spendern mit IFN- γ -Produktion und Tetramer-Färbung (Abb. 2C). Bereits 5-8 IFN- γ -produzierende CTL lysierten eine signifikante Anzahl von Zielzellen, die nach Transfektion C-terminale CMVpp65₂₇₆₋₅₆₁-Protein oder das CMVpp65-Gesamtprotein exprimierten. Die beim Spender 2 über die IFN- γ -Produktion nachgewiesene schwache Reaktivität gegen das N-terminale CMVpp65₁₋₂₇₅-Protein korrelierte zu einer funktionellen HLA-A2-restringierten CTL-Antwort gegen diesen N-terminalen Antigenbereich im PTF bei 6-20 IFN γ^+ CTL. Diese Ergebnisse zeigten die Validität des PTF und erbrachten Hinweise auf mögliche weitere, subdominante HLA-A2-restringierte CTL-Epitope. Die Verwendung autologer PBMC als Zielzellen ermöglichte die Erfassung der CTL-vermittelten funktionellen CMVpp65-Reaktivität über sämtliche HLA-A,B,C-Restriktionen des jeweiligen Spenders. Bei beiden Spendern wurde eine deutliche CTL-Reaktivität gegen das C-terminale CMVpp65₂₇₆₋₅₆₁-Protein bestätigt, sowie bei Spender 2 eine Reaktivität auch gegen das N-terminale CMVpp65₁₋₂₇₅-Protein (Abb. 2D). Zusammenfassend zeigte dies, dass der PTF eine CTL-vermittelte Immunantwort über die zytolytische Funktion der Effektoren verlässlich quantifizieren kann.

Die Besonderheit durchflusszytometrischer Methoden zur Erfassung der CTL-Aktivität, nämlich dass Effektorzellen und verschieden fluorochrommarkierte Zielzellen in einem Koinkubationsansatz differenziert dargestellt werden, erlaubte eine Erweiterung des PTF. Durch Herstellung weiterer Detektionsvektoren, die als Fluorochrom die Gensequenz des gelben Fluoreszenzfarbstoffes YFP (λ_{em} : 539 nm) einschlossen, konnte eine scharfe durchflusszytometrische Abgrenzung zu den Fluoreszenzen von GFP (λ_{em} : 505 nm) und RFP (λ_{em} : 591 nm) erreicht werden (siehe Abb. 11 und 12 in [32]). So ermöglichte z.B. eine simultane Messung spezifischer IMP-1- und CMVpp65-Reaktivitäten einen direkten Vergleich verschiedener CTL-vermittelter Immunkompetenzen innerhalb einer Effektorpopulation (unveröffentlichten Daten).

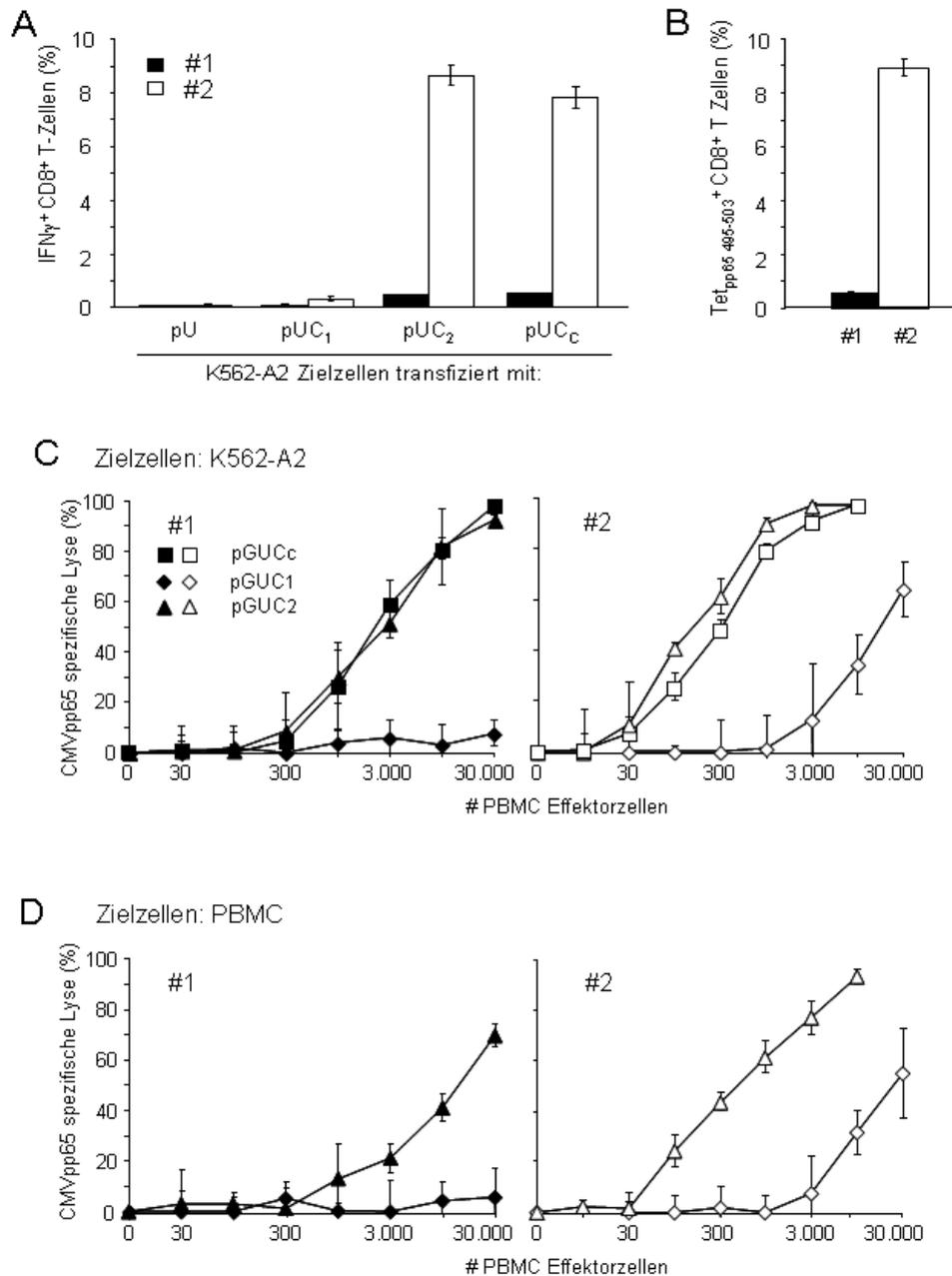


Abb. 2. Korrelation der IFN- γ Produktion CMVpp65 vorstimulierter PBMC und der Lyse CMVpp65-exprimierender K562-A2 Zellen und autologer PBMC-Zielzellen in dem PTF. PBMC der HLA-A2⁺ Spender 1 (#1) und 2 (#2) wurden für die Expression eines ubiquitinierten CMVpp65-Gesamtproteins transfiziert und 7 Tage mit frisch isolierten autologen PBMC kokultiviert. Mittelwerte \pm Standardabweichung aus Triplikatbestimmungen, mit PBMC der HLA-A2⁺ CMV⁺ Spender. (A) Die Zellen wurden nach Restimulation mit K562-A2-Zellen, die für die Expression des CMVpp65-Gesamtproteins (pUC_c), des CMVpp65₁₋₂₇₅-Fragmentes (pUC₁), oder des CMVpp65₂₇₆₋₅₆₁-Fragmentes (pUC₂) transfiziert waren, restimuliert. Die Frequenz der IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen wurde nach intrazellulärer Färbung durchflusszytometrisch analysiert. (B) HLA-A2/CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Tetramer⁺ CTL wurden direkt aus der Kokultur bestimmt. Zur Generierung CMVpp65-exprimierender Zielzellen wurden (C) K562-A2 oder (D) frisch isolierte autologe PBMC mit Plasmiden, die für ubiquitinierte CMVpp65-Fragmente in Kombination mit GFP kodieren, transfiziert. Kontrollzielzellen wurden mit Plasmiden, welche für RFP kodieren, transfiziert. Die durchflusszytometrische Analyse der Zielzellpopulationen erfolgte nach einer Koinkubation von 72 h.

4.3 Optimierung einer therapeutischen Vakzinierung für das humane Papillomvirus durch Kombination mit Immunmodulatoren im Mausmodell

Die zelluläre Immunantwort der adenoviralen therapeutischen Vakzine Adp14 [31], welche sich gegen die Onkogene E6 und E7 der Genotypen HPV16 und HPV18 richtet, wurde einzeln und in Kombination mit potentiellen Immunmodulatoren in *in-vivo*-Modellen mit der murinen epithelialen durch HPV16 immortalisierten Zelllinie C3 sowie der murinen epithelialen HPV16-E6/7 exprimierenden Zelllinie TC-1, die in C57BL/6-Mäusen solide Tumoren bilden, getestet. Das Ziel war, die Wirksamkeit einer Impfung zu verbessern. Die Gruppe der potentiellen Immunmodulatoren umfasste i) den synthetischen Toll-like-Rezeptor-Aktivator Imiquimod, ii) das Zytokin IFN- α , iii) DTA-1, ein den Glukokortikoid-induzierten Tumornekrosefaktor-Rezeptor bindenden agonistischen Antikörper sowie iv) einen CD4⁺ T-Zellen depletierenden Antikörper [31].

Eine prophylaktische Applikation der Adp14-Vakzine vor Transplantation der C3- und TC1-Tumorzellen verhinderte das Anwachsen beider Tumorzelllinien vollständig. Bei der therapeutischen Adp14-Vakzinierung tumortragender transplantierte Mäuse regredierten C3-Tumore vollständig während die TC1-Tumore in 9 von 10 Mäusen nach temporärer Regression wieder auswuchsen (siehe Abb. 2 und 3 in [31]). Koapplikation von Imiquimod (0/5), anti-CD4-Antikörper (2/10) oder IFN- α (4/10) führte in einem Teil der Mäuse zur partiellen Regression, während die zusätzliche Applikation des agonistischen DTA-1-Antikörpers eine vollständige Regression aller TC1-Tumore bewirkte (siehe Abb. 4 in [31]). Der Einfluss von DTA-1 auf Adp14-induzierte CTL, die reaktiv gegen das HPV16E7-Gesamtantigen waren, sollte untersucht werden. Dazu wurden EL-4-Zellen, die mit einem Stimulationsvektor für ein ubiquitiniertes HPV16E7-Onkogen transfiziert wurden [32], zur Restimulation der Maus-Milzzellen verwendet. Splenozyten aus Mäusen, die mit der HPV-Vakzine Adp14 geimpft waren, zeigten eine hohe Frequenz IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen, die bei Kombination mit DTA-1 zusätzlich erhöht war (siehe Abb. 5 in [31]).

Um die Nützlichkeit des PTF in Vakzinierungsstudien zu testen, wurden HPV-spezifische CTL-Antworten damit untersucht ([32] und Abb. 3). Im Gegensatz dazu zeigten die Milzzellen der Adp14-vakzinierten Mäuse eine ausgeprägte IFN- γ -Expression (Abb. 3A). Lediglich 3-10 HPV16E7-reaktive IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen Effektorzellen bewirkten eine signifikante Lyse der EL-4-Zielzellen im PTF (Abb. 3B). In Milzzellkulturen aus Mäusen, die mit der Kontrollvakzine AdLacZ behandelten waren, waren keine IFN- γ -produzierenden CTL und entsprechend auch keine spezifische Lyse im PTF messbar. Somit erlaubte der PTF eine verlässliche Bestimmung einer spezifisch induzierten CTL-Aktivität ohne vorherige Kenntnis der zugrundeliegenden MHC-Klasse I-Restriktionen bei Vakzinierungsexperimenten im Mausmodell.

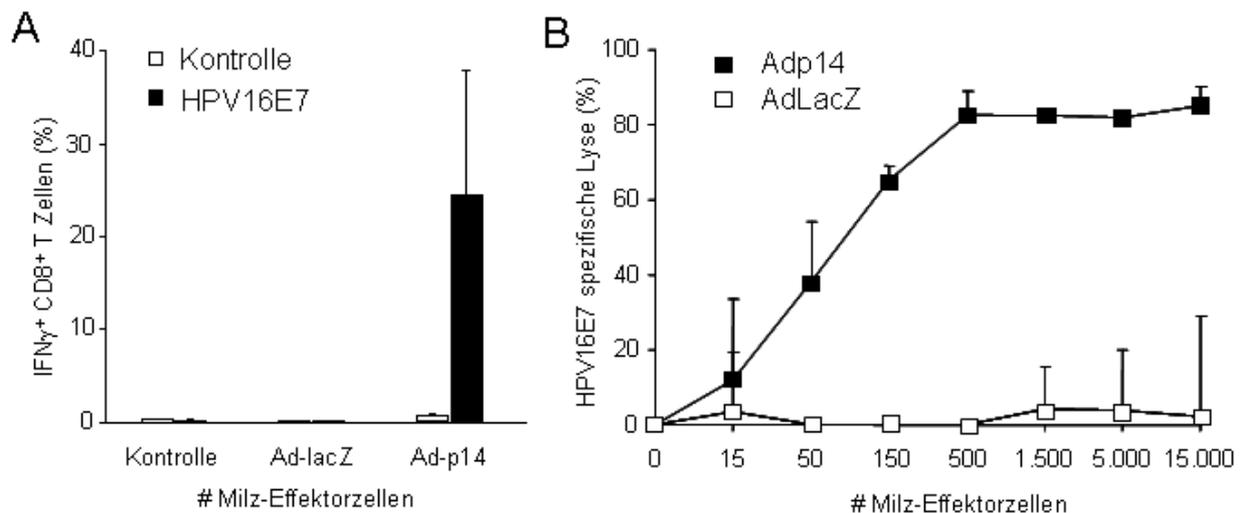


Abb. 3: Nachweis einer Adp14 Vakzine-induzierten HPV16E7-spezifischen CTL Antwort im Mausmodell. Mononukleäre Zellen wurden 12 Tage nach Immunisierung mit der therapeutischen HPV-Vakzine Adp14 oder der Kontrollvakzine AdLacZ aus den Milzen der Mäuse isoliert. Milzzellen unbehandelter Mäuse dienten als Kontrolle. Diese Zellen wurden 7 Tage mit HPV16E7-transfizierten EL-4-Zellen *in vitro* kokultiviert. (Mittelwert \pm Standardabweichung, 5 Mäuse pro Gruppe) (A) HPV16E7-spezifische $\text{IFN-}\gamma^+$ CD8^+ CTL wurden mittels intrazellulärer $\text{IFN-}\gamma$ -Färbung durchflusszytometrisch analysiert. (B) EL-4-Zellen wurden für die Expression von HPV16E7 in Kombination mit GFP transfiziert. Kontrollzielzellen wurden mit dem Expressionsvektor für RFP transfiziert. Isolierte Milzzellen Adp14- oder AdLacZ-immunisierten Mäuse wurden titriert und mit den transfizierten EL-4-Zellen im PTF inkubiert. Die antigenspezifische zytotoxische Aktivität wurde über das Verhältnis der spezifischen und der Kontrollzielzellen nach 48 h in Relation zu Zielzellkulturen ohne Effektorzellen bestimmt.

5 Diskussion

Die in dieser Promotionsarbeit dargestellten wissenschaftlichen Methodenentwicklungen hatten zum Ziel, den hochsensitiven Nachweis und die funktionelle Charakterisierung von CTL zu ermöglichen. Die aus der VITAL-Methode [15] weiterentwickelte Methode des VITAL-FR erlaubte einen solchen Nachweis der CTL-Effektorfunktion für definierte Peptidepitope. Dabei konnte durch Einführung des Zellfarbstoffs Far Red eine deutliche spektrale Abgrenzung zu dem Zellfarbstoff CFSE ($\Delta\lambda_{em}$: 90 nm) während der durchflusszytometrischen Erfassung der Zielzellen erreicht werden [35,36]. In Verbindung mit der geringen Zytotoxizität [34] und der Persistenz des Farbstoffs [37] wurde dadurch eine Ausdehnung der Koinkubationszeit von Effektorzellen und Zielzellen auf über 72 h ermöglicht.

Zur Validierung der Sensitivität und der Spezifität des VITAL-FR wurde die CTL-vermittelte Lyse in Korrelation zu der Anzahl eingesetzter epitopspezifischer CTL im Kontext definierter MHC-Klasse I-Moleküle gemessen. Aufgrund der hohen HLA-A2-Prävalenz in der kaukasischen Bevölkerung von ca. 45% [38] und der starken viralen Durchseuchung mit Influenza- und Zytomegalieviren, wurden hochkonservierte immunodominante HLA-A*0201-restringierte Epitope aus IMP-1 (Peptidsequenz: GILGFVFTL) und CMVpp65 (Peptidsequenz: NLVPMVATV) [26,27] zur Validierung der Methoden ausgewählt. Wie die Kinetik und die spezifische CTL-vermittelte Lyse in Abhängigkeit von der eingesetzten Zielzellzahl zeigten, steht die hohe Sensitivität des VITAL-FR im Zusammenhang mit der ausgedehnten Koinkubationszeit und der geringen Anzahl initial eingesetzter Zielzellen. Eine Reduktion der Zahl an Zielzellen auf 10^3 in Verbindung mit einer Ausdehnung der Inkubationszeit auf 72 h ermöglichte bei Verwendung humaner HLA-A2⁺ T2-Zielzellen den signifikanten Nachweis von 1-3 spezifischen CTL. Bei Verwendung von autologen B-LCL oder der Zelllinie K562-A2 als Zielzellen wurde mit 10-30 CTL ein signifikanter Nachweis erreicht (siehe Abb. 3B in [30]). Dies könnte u.a. auf einen höheren Umsatz der HLA-A,B,C-Moleküle auf der Zelloberfläche oder auf die Präsentation endogener Peptide, die mit exogen aufgetragenen Epitopen konkurrieren, zurückzuführen sein [39,40]. Im Vergleich zum klassischen CRA [41] hatte der VITAL-FR eine 10-30fach niedrigere signifikante Nachweisgrenze für spezifische CTL. Deren zytolytische Aktivität erreichte ihren halbmaximalen Wert bereits bei einer 100fach niedrigeren CTL-Anzahl und zeigte ein signifikant höheres Plateau bei maximaler Lyse der Zielzellen. Die Koinkubation bis zu 72 h im VITAL-FR führte zu einer Proliferation der (Kontroll-)Zielzellen um den Faktor 5-8. Dies ermöglichte den initialen Einsatz von einer sehr geringen Menge an Zielzellen (10^3) und erlaubte die Wiederfindung relevanter Zellzahlen bei der durchflusszytometrischen Messung am Endzeitpunkt der Koinkubation (siehe zusätzliche Abb. 2 in [30]). Demgegenüber ist eine Ausdehnung der Koinkubationszeit im CRA zur Verbesserung der Sensitivität aufgrund der ⁵¹Cr-Freisetzung durch Radiolyse der Zielzellen [42] nur sehr begrenzt möglich. Anders als der CRA erfordert der VITAL-FR keinen zusätzlichen Kontrollansatz, da sich die mit spezifischem Antigen beladenen Zellen und die Kontrollzellen im selben Ansatz befinden. Das und die hohe Sensitivität bewirken, dass für den VITAL-FR im Vergleich zum CRA zur Detektion einer signifikanten

Lyse 1/100 der Menge spezifischer CTL erforderlich sind (siehe Abb. 5 in [30];). Mit dieser Weiterentwicklung steht eine hochsensitive Methode zur Verfügung, die die funktionelle Erfassung und Charakterisierung von zytotoxischen T-Zellantworten auf der Basis vorher definierter Einzelepitope aus begrenztem Untersuchungsmaterial gestattet.

Bei der Entwicklung des PTF war das Ziel die Erfassung polyspezifischer CTL-Reaktivitäten bei unbekanntem zugrundeliegendem MHC-Klasse I-Spektrum. Die Ubiquitinierung von Antigenen ist eine kritische Voraussetzung für die effiziente proteasomale Prozessierung, Präsentation und CTL-Induktion [43]. Die Expression ubiquitininfundierter Antigene durch antigenpräsentierende Zellen in der Vakzinierung und T-Zellstimulation führte zu einer deutlich verstärkten Induktion antigenspezifischer T-Zellen [44,45]. Mittels ektopischer Expression eines ubiquitinierten Antigens in Kombination mit einem Fluoreszenzreporterprotein wurden Zielzellen generiert, die das ektopisch exprimierte Gesamtantigen verstärkt degradierten, präsentierten und gleichzeitig durchflusszytometrisch erfassbar wurden [32]. Ein dafür konstruierter Expressionsvektor musste folgende Eigenschaften in sich vereinen: (i) universelle Verwendbarkeit in einer Vielzahl potentieller Zielzellen, (ii) korrelierte, gleich starke Expression von Reporterprotein und Antigen und (iii) effektive Degradation des rekombinanten Antigens bei gleichzeitigem Erhalt des fluoreszierenden Reporterproteins. Das zu diesem Zweck zunächst generierte bicistronische 2-Promotorkonstrukt auf Grundlage zweier unterschiedlicher Ferritin-Promotoren zeigte eine starke und ausgewogene Expression in den getesteten humanen K562-A2- und Maus EL-4 Zelllinien [32]. In primären humanen PBMC und autologen B-LCL waren lediglich geringe Expressionsstärken des Reporterproteins messbar. Weitere 2-Promotorkonstrukte auf der Grundlage der Kombination anderer starker Promotoren lieferte unausgewogene Expressionsstärken als Folge von Promotorinterferenzen (Daten nicht gezeigt) [46]. Daher wurden Vektoren mit der virusentlehnten „selbstspaltenden 2A-Sequenz“ [47,48] in Kombination mit dem konstitutiv hoch exprimierendem Promotor des *Immediate Early*-Proteins-1 aus dem CMV [49] generiert. Die optimierten Konstrukte [32], die eine aus dem *Thosea-asigna*-Virus abgeleitete 2A-Sequenz beinhalteten erwiesen sich als universelle Detektionsvektoren, da die „selbstspaltende 2A-Sequenz“ eine nahezu vollständige Abtrennung des Reporterproteins vom Ubiquitin-Degradationssignal sowohl in der Zelllinie K562-A2 als auch in B-LCL und frisch isolierten PBMC zeigte. Die Verwendung von Zielzellen, die rekombinante mono-ubiquitinierte Antigene exprimieren, erniedrigte die Nachweisgrenze der antigenspezifischen CTL-Reaktivität im Vergleich zu nativ exprimierten Antigenen signifikant (unveröffentlichte Daten). Diese Beobachtung deckt sich mit Feststellungen anderer Arbeitsgruppen, die eine verstärkte Zielzelllyse bei Expression ubiquitininfundierter Antigene in CRA-basierenden Systemen nachweisen konnten [50,51].

Durch Transfektion des optimierten universell exprimierbaren Konstruktes für ein ubiquitiniertes CMVpp65-Gesamtantigen in Kombination mit einem stabilen GFP gelang es aus Zellen der Zelllinie K562-A2, aus B-LCL und aus frisch isolierten PBMC exzellente antigenpräsentierenden Zielzellen zu generieren ([32] und Abb. 2). Dies ist von besonderer Bedeutung, da die Wahl der Zielzellen

entscheidend für die Fragestellung ist, die mit dem PTF verfolgt wird. Werden im PTF Zelllinien verwendet, die wie K562-A2 nur ein definiertes HLA-A,B,C-Molekül exprimieren, kann dies insbesondere zur Aufklärung z.B. der HLA-A2-Assoziation von Epitopen eines zu untersuchenden Gesamtantigens dienen. Durch die intrazelluläre Prozessierung, die durch das Ubiquitin auf dem natürlichen Weg für die Präsentation auf MHC-Klasse I-Molekülen erfolgt, könnten auch schlecht bindende und damit für eine externe Beladung nicht effiziente Epitope für die funktionelle CTL-Analyse zugänglich gemacht werden. Die unmittelbar in großen Mengen zur Verfügung stehenden autologen PBMC ermöglichen hingegen ein übergreifendes *Monitoring* von Immunantworten und dienen der Beantwortung von Fragestellungen, bei denen der genaue MHC Klasse I/HLA-A,B,C-Kontext zunächst irrelevant, die Beschreibung antigenspezifischer CTL diagnostisch aber erforderlich ist. Autologe B-LCL stellen diesbezüglich weitere potentielle Zielzellen dar, weisen aber Nachteile aufgrund der mehrwöchigen Generationsdauer [52], der uneinheitlichen Transfizierbarkeit [53] und des viralen EBV-Hintergrunds [54] auf.

Die hohe Effizienz der endogenen Antigenbeladung mittels Transfektion der Zielzellen für den PTF konnte im Vergleich zu exogen mit CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid beladenen K562-A2-Zellen gezeigt werden. Bei Verwendung von Zielzellen die das immundominante CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Epitop aus dem gesamten 561 Aminosäureresten umfassenden CMVpp65-Gesamtantigen prozessierten, waren für eine signifikante Lyse im Vergleich zu CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Epitop beladenen Zielzellen lediglich 1/5 der Menge epitopspezifischer Effektorzellen erforderlich [32]. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Transfektion zur intrazellulären Produktion und Prozessierung des Antigens im Gegensatz zur externen Peptidbeladung auch bei einem hohen Umsatz der HLA-A,B,C-Moleküle der Zielzellen die fortwährende Präsentation der Epitope gewährleistet.

Zur Evaluierung des PTF wurde dieser mit der Produktion von pro-inflammatorischem IFN- γ [8] und der HLA-A2-Tetramerfärbung [55] verglichen, die jedoch die zytotoxische Wirkung nicht direkt nachweisen. Hier zeigte sich eine starke Korrelation der quantifizierten funktionellen CTL-vermittelte Lyse mit den Surrogatparametern IFN- γ -Expression und Tetramerbindung bei den verwendeten Gesamtantigenen CMVpp65 und IMP-1. Die ausgeprägte Reaktivität der mit dem CMVpp65-Gesamtantigen vorstimulierten Effektorzellen gegenüber den HLA-A2⁺ Zielzellen, die den C-terminalen Bereich des CMVpp65 exprimierten, bestätigte die immundominante Stellung des CMVpp65₄₉₅₋₅₀₃-Peptid innerhalb des Gesamtantigens. Interessanterweise wurde in dem PTF sowohl mit autologen PBMC, die das gesamte HLA-A,B,C-Spektrum des Spenders darstellen, als auch mit K562-A2 Zielzellen eine signifikante CTL-vermittelte Antwort gegenüber dem N-terminalen Bereich von CMVpp65 erfasst, für den keine immundominanten Epitope beschrieben sind. Dies unterstreicht die Bedeutung des PTF für funktionelle Untersuchungen auf zusätzliche subdominante Epitope, welche an der Kontrolle viraler Infektionen beteiligt sind, sich aber mit herkömmlichen Methoden nur schwer charakterisieren lassen [56].

Die Kombination unterschiedlicher Antigene mit zusätzlichen Fluoreszenzreportern in einem Ansatz für die Durchflusszytometrie ermöglichte zudem die scharfe Abgrenzung verschiedenartiger Zielzellen sowie die simultane Erfassung von CTL-Reaktivitäten gegen mehrere Antigene [32]. Diese Erweiterung trägt zusätzlich dazu bei, den Aufwand sowie die Menge des benötigten Patientenmaterials bei klinischen Testungen zu reduzieren. Gleichmaßen könnte diese in wissenschaftlichen Fragestellungen genutzt werden, um die Immunogenität unabhängiger Antigene bzw. von Varianten eines Antigens [57,58] über einen direkten Vergleich der entsprechenden CTL-Reaktivitäten in definiertem MHC-Klasse I-Kontext zu charakterisieren. Hier wäre beispielsweise ein Ansatz denkbar, in dem die relative Reaktivität gesamtantigenspezifischer Effektorzellen gegen Zielzellen, die ein definiertes MHC-Klasse I-Molekül und unterschiedliche Gesamtantigen-Varianten exprimieren, dargestellt wird. Weiterhin könnte der MHC-Klasse I-Kontext intrazellulär prozessierter und präsentierter immunodominanter Epitope untersucht werden, indem die relative Reaktivität gesamtantigenspezifischer Effektorzellen gegen Zielzellen die unterschiedliche MHC-Klasse I-Moleküle und gleiche Antigene exprimieren untersucht wird (siehe Abb. 13 in [32]). Die Anwendbarkeit des PTF ist nicht auf klinische und wissenschaftliche Fragestellungen mit menschlichem Untersuchungsmaterial beschränkt. Exemplarisch wurde ein sensitiver funktioneller Nachweis einer vakzineinduzierten CTL-Reaktivität für eine therapeutische HPV-Tumorvakzine im Mausmodell gezeigt ([31,32] und Abb. 3). Die Transfektion von Expressionskonstrukten, die für große antigene Bereiche oder für Gesamtantigene kodieren, nutzt in Verbindung mit einer effizienten proteasomalen Prozessierung die gleichen Mechanismen wie natürlich infizierte Zielzellen. Immunogene Epitope sowie deren MHC-Klasse I-Restriktionen müssen also vor der Antigenitätstestung nicht bekannt sein. Damit ermöglicht der PTF eine effektive Identifizierung von Proteindomänen die CTL-Epitope enthalten sowie ein sensitives funktionelles *Monitoring* antigenassoziierter CTL-Antworten nach Infektion oder Vakzinierung. Die simultane, aber funktionell entkoppelte Expression eines degradierbaren Antigens mit einem stabilen Fluoreszenzmarker über 2-Promotorkonstrukte oder 2A-Konstrukte in den Zielzellen für den PTF gewährleistet die eindeutige Identifizierung antigenexprimierender Zielzellen über die Korrelation zur durchflusszytometrisch erfassten Fluoreszenzstärke. Das ist eine Eigenschaft, über die beladungsbasierte Nachweissysteme aufgrund unterschiedlicher antigen- und zielzellabhängiger Beladungseffizienzen nicht verfügen [59,60]. Die Möglichkeit zur Untersuchung der Korrelation von Antigenexpressionsstärke und der resultierenden Zielzellyse [61] könnte mit Hilfe des PTF weitere interessante Einblicke in die Kinetik der CTL-vermittelten Immunität eröffnen.

Mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit entwickelten Methoden VITAL-FR [20] und PTF [32] stehen somit zwei neue sensitive und funktionelle Nachweissysteme zur Verfügung, die einander ergänzen. In Kombination mit etablierten Nachweissystemen, die CTL-bezogene Surrogatparameter erfassen, können diese zwei neu entwickelten Methoden zusätzliche Aussagen über regulatorische und immunmodulatorische Effekte durch CTL liefern.

6 Literaturverzeichnis

1. Hamai A, Benlalam H, Meslin F, Hasmim M, Carre T, et al. (2010) Immune surveillance of human cancer: if the cytotoxic T-lymphocytes play the music, does the tumoral system call the tune? *Tissue Antigens* 75: 1-8.
2. Oykman P, Mody CH (2010) Direct microbicidal activity of cytotoxic T-lymphocytes. *J Biomed Biotechnol* 2010: 249482.
3. Walker DH, Olano JP, Feng HM (2001) Critical role of cytotoxic T lymphocytes in immune clearance of rickettsial infection. *Infect Immun* 69: 1841-1846.
4. Gaczynska M, Rock KL, Goldberg AL (1993) Role of proteasomes in antigen presentation. *Enzyme Protein* 47: 354-369.
5. Zinkernagel RM, Doherty PC (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701-702.
6. Yewdell JW, Bennink JR (1992) Cell biology of antigen processing and presentation to major histocompatibility complex class I molecule-restricted T lymphocytes. *Adv Immunol* 52: 1-123.
7. Trapani JA, Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2: 735-747.
8. Shafer-Weaver K, Sayers T, Strobl S, Derby E, Ulderich T, et al. (2003) The Granzyme B ELISPOT assay: an alternative to the ⁵¹Cr-release assay for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *J Transl Med* 1: 14.
9. Ghanekar SA, Nomura LE, Suni MA, Picker LJ, Maecker HT, et al. (2001) Gamma interferon expression in CD8(+) T cells is a marker for circulating cytotoxic T lymphocytes that recognize an HLA A2-restricted epitope of human cytomegalovirus phosphoprotein pp65. *Clin Diagn Lab Immunol* 8: 628-631.
10. Malyguine A, Strobl S, Zaritskaya L, Baseler M, Shafer-Weaver K (2007) New approaches for monitoring CTL activity in clinical trials. *Adv Exp Med Biol* 601: 273-284.
11. Schoenborn JR, Wilson CB (2007) Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96: 41-101.
12. Xu XN, Screaton GR (2002) MHC/peptide tetramer-based studies of T cell function. *J Immunol Methods* 268: 21-28.
13. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, et al. (1996) Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274: 94-96.
14. Zehbe I, Kaufmann AM, Schmidt M, Hohn H, Maeurer MJ (2007) Human papillomavirus 16 E6-specific CD45RA+ CCR7+ high avidity CD8+ T cells fail to control tumor growth despite interferon-gamma production in patients with cervical cancer. *J Immunother* 30: 523-532.
15. Hermans IF, Silk JD, Yang J, Palmowski MJ, Gileadi U, et al. (2004) The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *J Immunol Methods* 285: 25-40.
16. Korzeniewski C, Callewaert DM (1983) An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 64: 313-320.
17. Michel N, Ohlschlager P, Osen W, Freyschmidt EJ, Guthohrlein H, et al. (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: 290-299.
18. Dalgleish A, Pandha H (2007) Tumor antigens as surrogate markers and targets for therapy and vaccines. *Adv Cancer Res* 96: 175-190.

19. Rosenberg SA, Spiess P, Lafreniere R (1986) A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes. *Science* 233: 1318-1321.
20. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, Ralph P, Zeuthen J, et al. (1976) Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 18: 421-431.
21. Miller G, Lipman M (1973) Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70: 190-194.
22. Salter RD, Cresswell P (1986) Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid. *EMBO J* 5: 943-949.
23. Feltkamp MC, Smits HL, Vierboom MP, Minnaar RP, de Jongh BM, et al. (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: 2242-2249.
24. Lin KY, Guarnieri FG, Staveley-O'Carroll KF, Levitsky HI, August JT, et al. (1996) Treatment of established tumors with a novel vaccine that enhances major histocompatibility class II presentation of tumor antigen. *Cancer Res* 56: 21-26.
25. Herberman RB (1972) Serological analysis of cell surface antigens of tumors induced by murine leukemia virus. *J Natl Cancer Inst* 48: 265-271.
26. Moss P, Khan N (2004) CD8(+) T-cell immunity to cytomegalovirus. *Hum Immunol* 65: 456-464.
27. Rimmelzwaan GF, Kreijtz JH, Bodewes R, Fouchier RA, Osterhaus AD (2009) Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable. *Vaccine* 27: 6363-6365.
28. Herr W, Protzer U, Lohse AW, Gerken G, Meyer zum Buschenfelde KH, et al. (1998) Quantification of CD8+ T lymphocytes responsive to human immunodeficiency virus (HIV) peptide antigens in HIV-infected patients and seronegative persons at high risk for recent HIV exposure. *J Infect Dis* 178: 260-265.
29. Rensing ME, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, et al. (1995) Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A*0201-binding peptides. *J Immunol* 154: 5934-5943.
30. Stanke J, Hoffmann C, Erben U, von Keyserling H, Stevanovic S, et al. (2010) A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8+ T cells by their cytolytic function. *J Immunol Methods* 360: 56-65.
31. Hoffmann C, Stanke J, Kaufmann AM, Loddenkemper C, Schneider A, et al. (2010) Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing tumors in mice. *J Immunother* 33: 136-145.
32. Stanke J, Hoffmann C, Kaufmann AM (2011) Module-based Vector useful in assessment of antigen-specific T cell functions. *PATENT COOPERATION TREATY (PCT) PCT/EP2010/005736*.
33. Stroh T, Erben U, Kuhl AA, Zeitz M, Siegmund B (2010) Combined pulse electroporation--a novel strategy for highly efficient transfection of human and mouse cells. *PLoS One* 5: e9488.
34. He L, Hakimi J, Salha D, Miron I, Dunn P, et al. (2005) A sensitive flow cytometry-based cytotoxic T-lymphocyte assay through detection of cleaved caspase 3 in target cells. *J Immunol Methods* 304: 43-59.
35. Brehm MA, Daniels KA, Ortaldo JR, Welsh RM (2005) Rapid conversion of effector mechanisms from NK to T cells during virus-induced lysis of allogeneic implants in vivo. *J Immunol* 174: 6663-6671.

36. Ingulli E (2007) Tracing tolerance and immunity in vivo by CFSE-labeling of administered cells. *Methods Mol Biol* 380: 365-376.
37. Wang LX, Li R, Yang G, Lim M, O'Hara A, et al. (2005) Interleukin-7-dependent expansion and persistence of melanoma-specific T cells in lymphodepleted mice lead to tumor regression and editing. *Cancer Res* 65: 10569-10577.
38. Kiewe P, Mansmann V, Scheibenbogen C, Buhr HJ, Thiel E, et al. (2008) HLA-A2 expression, stage, and survival in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 23: 767-772.
39. Britten CM, Meyer RG, Kreer T, Drexler I, Wolfel T, et al. (2002) The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8(+) T lymphocytes in IFN-gamma ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 259: 95-110.
40. Purner MB, Berens RL, Krug EC, Curiel TJ (1994) Epstein-Barr virus-transformed B cells, a potentially convenient source of autologous antigen-presenting cells for the propagation of certain human cytotoxic T lymphocytes. *Clin Diagn Lab Immunol* 1: 696-700.
41. Brunner KT, Mauel J, Cerottini JC, Chapuis B (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14: 181-196.
42. Dunkley M, Miller RG, Shortman K (1974) A modified 51Cr release assay for cytotoxic lymphocytes. *J Immunol Methods* 6: 39-51.
43. Michalek MT, Grant EP, Gramm C, Goldberg AL, Rock KL (1993) A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 363: 552-554.
44. Dobano C, Rogers WO, Gowda K, Doolan DL (2007) Targeting antigen to MHC Class I and Class II antigen presentation pathways for malaria DNA vaccines. *Immunol Lett* 111: 92-102.
45. Zhang M, Obata C, Hisaeda H, Ishii K, Murata S, et al. (2005) A novel DNA vaccine based on ubiquitin-proteasome pathway targeting 'self'-antigens expressed in melanoma/melanocyte. *Gene Ther* 12: 1049-1057.
46. Curtin JA, Dane AP, Swanson A, Alexander IE, Ginn SL (2008) Bidirectional promoter interference between two widely used internal heterologous promoters in a late-generation lentiviral construct. *Gene Ther* 15: 384-390.
47. de Felipe P (2004) Skipping the co-expression problem: the new 2A "CHYSEL" technology. *Genet Vaccines Ther* 2: 13.
48. Kaji K, Norrby K, Paca A, Mileikovsky M, Mohseni P, et al. (2009) Virus-free induction of pluripotency and subsequent excision of reprogramming factors. *Nature* 458: 771-775.
49. Zarrin AA, Malkin L, Fong I, Luk KD, Ghose A, et al. (1999) Comparison of CMV, RSV, SV40 viral and λ 1 cellular promoters in B and T lymphoid and non-lymphoid cell lines. *Biochim Biophys Acta* 1446: 135-139.
50. Rodriguez F, An LL, Harkins S, Zhang J, Yokoyama M, et al. (1998) DNA immunization with minigenes: low frequency of memory cytotoxic T lymphocytes and inefficient antiviral protection are rectified by ubiquitination. *J Virol* 72: 5174-5181.
51. Tellam J, Sherritt M, Thomson S, Tellam R, Moss DJ, et al. (2001) Targeting of EBNA1 for rapid intracellular degradation overrides the inhibitory effects of the Gly-Ala repeat domain and restores CD8+ T cell recognition. *J Biol Chem* 276: 33353-33360.
52. Pelloquin F, Lamelin JP, Lenoir GM (1986) Human B lymphocytes immortalization by Epstein-Barr virus in the presence of cyclosporin A. *In Vitro Cell Dev Biol* 22: 689-694.
53. Gershan JA, Johnson BD, Weber J, Schauer DW, Natalia N, et al. (2005) Immediate transfection of patient-derived leukemia: a novel source for generating cell-based vaccines. *Genet Vaccines Ther* 3: 4.

54. Rickinson AB, Moss DJ, Allen DJ, Wallace LE, Rowe M, et al. (1981) Reactivation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells by in vitro stimulation with the autologous lymphoblastoid cell line. *Int J Cancer* 27: 593-601.
55. Zaritskaya L, Shafer-Weaver KA, Gregory MK, Strobl SL, Baseler M, et al. (2009) Application of a flow cytometric cytotoxicity assay for monitoring cancer vaccine trials. *J Immunother* 32: 186-194.
56. McMahan RH, McWilliams JA, Jordan KR, Dow SW, Wilson DB, et al. (2006) Relating TCR-peptide-MHC affinity to immunogenicity for the design of tumor vaccines. *J Clin Invest* 116: 2543-2551.
57. Fryer HR, Frater J, Duda A, Roberts MG, Phillips RE, et al. (2010) Modelling the evolution and spread of HIV immune escape mutants. *PLoS Pathog* 6: e1001196.
58. Zehbe I, Mytilineos J, Wikstrom I, Henriksen R, Edler L, et al. (2003) Association between human papillomavirus 16 E6 variants and human leukocyte antigen class I polymorphism in cervical cancer of Swedish women. *Hum Immunol* 64: 538-542.
59. Burgdorf S, Kautz A, Bohnert V, Knolle PA, Kurts C (2007) Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science* 316: 612-616.
60. Lizee G, Basha G, Jefferies WA (2005) Tails of wonder: endocytic-sorting motifs key for exogenous antigen presentation. *Trends Immunol* 26: 141-149.
61. Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, Nolte-'t Hoen E, Lim SG, et al. (2007) The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 81: 2940-2949.

7 Anteilserklärung

Jonas Stanke hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Publikation 1: Stanke J, Hoffmann C, Erben U, von Keyserling H, Stevanovic S, Cichon G, Schneider A, Kaufmann AM. A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8+ T cells by their cytolytic function. *J Immunol Methods* 360: 56-65 (2010).

Anteil: 80 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus PBMC. Generierung dendritischer Zellen und autologer B-LCL. Generierung humaner antigenspezifischer CTL. Generierung stabil HLA-A2 exprimierender K562-Zellen. Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer CTL durch Tetramerfärbung. Nachweis der CTL-Aktivität durch 51Chrom-Freisetzungstest. Durchflusszytometrischer Nachweis der CTL-Funktion im VITAL-FR. Datenauswertung, graphische Darstellung und Statistik. Ausarbeitung des Manuskripts.

Publikation 2: Stanke J, Hoffmann C, Kaufmann AM (2011) Module-based Vector useful in assessment of antigen-specific T cell functions. Patent Cooperation Treaty (PCT) PCT/EP2010/005736 (2011).

Anteil: 70 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Konzeption und Generierung der DNA-Expressionskonstrukte für die antigenspezifische Stimulation und zum Nachweis der antigenspezifischen CTL-Reaktivität. Isolierung humaner mononukleärer Zellen aus PBMC. Generierung von DC und autologen B-LCL. Generierung humaner antigenspezifischer CTL-Linien. Generierung stabil HLA-A2 exprimierender K562-Zellen. Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer CTL durch Tetramerfärbung und intrazelluläre Zytokinfärbung. Durchflusszytometrischer Nachweis der CTL-Funktion im PTF. Datenauswertung, graphische Darstellung und Statistik. Ausarbeitung der Patentschrift

Publikation 3: Hoffmann C, Stanke J, Kaufmann AM, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing tumors in mice. *J Immunother* 33: 136-145 (2010).

Anteil: 20 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Bestimmung der Frequenz antigenspezifischer CTL durch intrazelluläre Zytokinfärbungen. Mitwirkung an tierexperimentellen Arbeiten insbesondere der Vakzinierung von Versuchstieren, der Kontrolle des Tumorwachstums und der Isolation der Milzzellen.

8 Eigene Publikationen

Originalarbeiten als Grundlage der Promotion

Stanke J, Hoffmann C, Erben U, von Keyserling H, Stevanovic S, Cichon G, Schneider A, Kaufmann AM. (2010) A flow cytometry-based assay to assess minute frequencies of CD8⁺ T cells by their cytolytic function. *J Immunol Methods* 360: 56-65.

Impact Factor 2,3

Hoffmann C, **Stanke J**, Kaufmann AM, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. (2010) Combining T-cell vaccination and application of agonistic anti-GITR mAb (DTA-1) induces complete eradication of HPV oncogene expressing tumors in mice. *J Immunother* 33: 136-145.

Impact Factor 3,6

Stanke J, Hoffmann C, Kaufmann AM (2011) Module-based Vector useful in assessment of antigen-specific T cell functions. Patent Cooperation Treaty (PCT) PCT/EP2010/005736.

Eingereichte Publikation (unveröffentlichte Daten)

Stanke J, Hoffmann C, Erben U, Stroh T, Cichon G, Schneider S, Kaufmann AM. Plasmid transfection fluorolysis: a sensitive method assessing MHC/HLA class I-restricted cell mediated cytotoxicity to full-length antigens. *PLoS ONE* (in revision).

Originalpublikationen (andere)

Loddenkemper C, Hoffmann C, **Stanke J**, Nagorsen D, Baron U, Olek S, Huehn J, Ritz JP, Stein H, Kaufmann AM, Schneider A, Cichon G. (2009) Regulatory (FOXP3⁺) T cells as target for immune therapy of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer. *Cancer Sci* 100: 1112-1117.

Hoffmann C, Bachran C, **Stanke J**, Elezkurtaj S, Kaufmann AM, Fuchs H, Loddenkemper C, Schneider A, Cichon G. (2010) Creation and characterization of a xenograft model for human cervical cancer. *Gynecol Oncol* 118: 76-80.

von Keyserling H, Bergmann T, Schuetz M, Schiller U, **Stanke J**, et al. (2011) Analysis of 4 Single-Nucleotide Polymorphisms in Relation to Cervical Dysplasia and Cancer Development Using a High-Throughput Ligation-Detection Reaction Procedure. *Int J Gynecol Cancer*.

Kunert N, Marhold J, **Stanke J**, Stach D, Lyko F. (2003) A Dnmt2-like protein mediates DNA methylation in *Drosophila*. *Development* 130: 5083-5090.

9 Lebenslauf

Ein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, Jonas Stanke, dass die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Entwicklung eines hochsensitiven Zytotoxizitätsassays zum Nachweis von Immunantworten gegen tumorassoziierte Antigene“ von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritte verfasst wurde, dass die Dissertation auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig anentsprechender Stelle in der Arbeit angegeben sind.

Berlin, den 01.08.2012

11 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dr. Andreas M. Kaufmann für die Vergabe des interessanten Themas, seine engagierte Betreuung, sowie seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft während dieser Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich Dr. Günter Cichon für dessen Unterstützung sowie für die Möglichkeit an seinen interessanten Forschungsbereichen mitzuwirken zu dürfen.

Für die gute Zusammenarbeit, die vielen netten Stunden und für die hilfreiche Unterstützung danke ich Ursula Kastner, Martina Seipel, Christiane Fangerau und Helmut von Keyserling, Thosten Stroh sowie der gesamten Arbeitsgruppe der Gastroenterologie.

Mein besonderer Dank gilt Corinna Hoffmann und Dr. Ulrike Erben, die ich für ihre großartige fachliche und persönliche Unterstützung sowie für Ihre Hilfsbereitschaft sehr schätzen gelernt habe.

Letztlich danke ich meiner Familie, ganz besonders meinen lieben Eltern Ulla und Lutz für ihre stetige rückhaltlose Unterstützung. Mein größter Dank gilt meiner wunderbaren Frau Tanja für Ihre fast schon übermenschliche Unterstützung die sie mir fortwährend in allen Bereichen gegeben hat und dafür, dass sie die Vielzahl von Entbehrungen die auch für Sie während der Zeit dieser Doktorarbeit entstanden sind immer als vollkommen selbstverständlich hinnahm.