

Aus dem Institut für Virologie  
des Universitätsklinikum des Saarlandes  
Homburg/Saar

**Das Cytomegalovirus Tegumentprotein pp65 ist ein  
potentielles Trägerprotein für Antigene**

Dissertation zur Erlangung  
des Grades eines Doktors der Medizin  
der medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes  
2007

vorgelegt von  
Conrad Julian Rhoikos Furtwängler  
geboren am 3. September 1977 in Samos

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
APC	Antigen Präsentierende Zelle
antpHD	Antennapedia Protein Homöodomäne
AS	Aminosäure
BCR	B-Zellrezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Cluster of Differentiation
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt
Da	Dalton
DC	Dendritische Zellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
ER	Endoplasmatisches Reticulum
FACS	Fluoreszenz Aktivierter Zell Sortierer
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HCMV	Humanes Zytomegalie-Virus
HCV	Hepatitis C-Virus
HIV	Humanes Immundefizit Virus
IL	Interleukin
INF- $\gamma$	Interferon-gamma
LPS	Lipopolysaccharid
MHC I/II	Major Histocompatibility Complex I/II
min	Minuten
ml	Milliliter
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal

μl	Mikroliter
g	Gramm
OVA	Ovalbuminantigen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PTD	Proteintransduktionsdomäne
s	Sekunden
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
SF	<i>Spodoptera frugiperda</i>
Tab.	Tabelle
TAP	Transporter associated with Antigen Presentation
TAT	Transactivator of Transcription
TCR	T-Zellrezeptor
V	Volt
vgl.	vergleiche

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>Abkürzungen</b>	II
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	IV
<b>1. Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>3</b>
<b>2. Einleitung</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Das Immunsystem</b>	<b>5</b>
2.1.1 T-Zellen und die adaptive Immunantwort	7
2.1.1.1 Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von T-Zell-Antigenen	7
2.1.1.1.1 Im Kontext von MHC II-Molekülen präsentierte antigene Peptide sind meist extrazellulären Ursprungs	8
2.1.1.1.2 Im Kontext von MHC I-Molekülen präsentierte Antigene sind meist endogenen Ursprungs	8
2.1.1.1.3 Kreuzpräsentation exogenen Antigens im Kontext von MHC I-Molekülen	9
2.1.1.2 CD4 <sup>+</sup> T-Helferzellen sind entscheidend für die Induktion humoraler und zellulärer adaptiver Immunantworten	11
2.1.1.3 Naive CD8 <sup>+</sup> T-Zellen können sich zu CD8 <sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen differenzieren	11
2.1.1.4 Die Induktion der adaptiven Immunantwort durch T-Zellen - Von der naiven T-Zelle bis zur T-Gedächtniszelle	12
<b>2.2 Protein-Transduktionsdomänen und translokatorische Proteine können rezeptorunabhängig in Zellen internalisieren</b>	<b>13</b>
2.2.1 PTD und translokatorische Proteine können eine effiziente Aufnahme und Prozessierung von Antigenen im MHC I-Weg vermitteln	14
2.2.2 Das HCMV Tegumentprotein pp65 kommt als translokatorisches Protein in Frage	14

<b>2.3</b>	<b>Ziele dieser Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>3.</b>	<b>Materialien</b>	<b>17</b>
3.1	Chemikalien	17
3.2	Membranen, Papiere und Filme	18
3.3	Puffer und Medien	18
3.4	Molekulargewichtsmarker	19
3.5	Antikörper	19
3.6	Antigene	20
3.7	Zelllinien	20
3.8	Vektoren	20
3.9	Kits	22
3.10	Geräte und Computeranwendungen	22
3.11	Datenverarbeitung und Anwendungsprogramme (Software)	23
<b>4.</b>	<b>Methoden</b>	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Kultivierung eukaryontischer Zellen</b>	<b>24</b>
4.1.1	Kultivierung von Insektenzellen	24
<b>4.2</b>	<b>Expression und Aufreinigung von Proteinen in Insektenzellen</b>	<b>24</b>
4.2.1	Lipofektion mit dem „Bakulo-Gold“-Vektor	24
4.2.2	Infektion von SF158-Insektenzellen mit dem Bakulovirus	25
4.2.3	Zellernte und Aufreinigung	25
4.2.4	Proteinkonzentrationsbestimmung	26
<b>4.3</b>	<b>Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)</b>	<b>26</b>
<b>4.4</b>	<b>Proteintransfer durch Semi-Dry Western-Blot</b>	<b>28</b>
<b>4.5</b>	<b>Immunologischer Nachweis von Proteinen</b>	<b>30</b>
4.5.1	Nachweis von Proteinen mit der „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Reaktion	30
<b>4.6</b>	<b>Ex-Vivo-Stimulationsmessung von T- Gedächtniszellen aus Vollblut: Vollblutassay</b>	<b>31</b>
4.6.1	Aktivierung der T-Gedächtniszellen im Vollblut	31
4.6.2	Färbung der T-Gedächtniszellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern	32
<b>4.7</b>	<b>Aufnahme von Proteinen durch Jurkat-T-Zellen bei 4°C und bei 37°C</b>	<b>33</b>

<b>4.8</b>	<b>Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)</b>	<b>34</b>
4.8.1	Auswertung der FACS-Daten	34
<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Expression der pp65-, PTD- und EGFP-Fusionsproteine in SF 158 Zellen</b>	<b>38</b>
5.1.1	Vergleich der Proteinlösungen auf ihren EGFP- und pp65-Gehalt mittels Western Blot Analysen	39
5.1.2	Vergleich der Proteinlösungen auf ihre pp65-Konzentration mittels Western-Blot Analysen	40
<b>5.2</b>	<b>Optimierung der Stimulation von HCMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen aus Vollblut</b>	<b>42</b>
5.2.1	Höhere Antigenkonzentration und RPMI 1640 als Medium verbessern die Stimulation HCMV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen	42
5.2.2	Zur Stimulation HCMV-spezifischer CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen genügen 4,4nM pp65, antpHD-pp65 und tatPTD-pp65	44
<b>5.3</b>	<b>Rekombinantes, in SF158 Zellen exprimiertes pp65 stimuliert CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen genauso effektiv wie HCMV-Fibroblastenlysat</b>	<b>47</b>
<b>5.4</b>	<b>pp65-EGFP wird effizienter als tatPTD-EGFP oder antpHD-EGFP in Jurkat T-Zellen aufgenommen</b>	<b>50</b>
<b>5.5</b>	<b>Rekombinantes pp65 stimuliert HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen genauso effizient wie tatPTD-pp65 und antpHD-pp65</b>	<b>53</b>
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>56</b>
<b>6.1</b>	<b>In Insektenzelllinien exprimiertes, rekombinantes pp65 stimuliert CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zuverlässig und in gleichem Umfang wie ein HCMV-Fibroblastenlysat</b>	<b>57</b>
<b>6.2</b>	<b>Die Aufnahme von pp65-EGFP in Jurkat T-Zellen ist effizient, energieabhängig und wahrscheinlich rezeptorabhängig</b>	<b>59</b>

<b>6.3</b>	<b>Rekombinantes pp65 wird effektiv in den MHC I-Präsentationsweg gebracht und könnte als Trägerprotein für Fremdantigen dienen</b>	<b>60</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>VIII</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>XIX</b>
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>XX</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>XXII</b>

## 1. Zusammenfassung

Die Induktion einer spezifischen, zellulären Immunantwort ist in der Abwehr intrazellulärer, vor allem viraler, Infektionen von zentraler Bedeutung. Hierzu muss lösliches Erregerantigen im Kontext mit „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) I auf spezialisierten Zellen, wie dendritischen Zellen, kreuzpräsentiert werden. Translokatorische Proteine und Proteintransduktionsdomänen (PTD) können wegen ihres hohen Anteils an kationischen Aminosäuren eine verbesserte Aufnahme in Zellen vermitteln und eine verbesserte MHC I-vermittelte Immunantwort induzieren. Das HCMV-Tegumentprotein pp65 verfügt mit seinem „Nuclear Localisation Signal“ (NLS) über eine Region mit einem hohen Anteil an kationischen Aminosäuren. Außerdem kann pp65 aus Virionen eine HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort ohne *de novo* Synthese induzieren. Pp65 könnte folglich über ähnliche Eigenschaften wie translokatorische Proteine verfügen. Es sollte daher untersucht werden ob rekombinant in Insektenzellen exprimiertes pp65 potentiell als Antigencarrier für Proteinantigene im Kreuzpräsentationsweg in Frage kommen könnte.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, (1) dass rekombinant in Insektenzellen exprimiertes pp65 in der Lage ist sowohl CD8<sup>+</sup>, als auch CD4<sup>+</sup> HCMV spezifische T-Gedächtniszellen im Ex-Vivo-Vollblut-Stimulationsassay zu stimulieren. Rekombinantes pp65 stimulierte im Vergleich zu HCMV-Fibroblastenlysat umfassend CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen, während CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen durch rekombinantes pp65 weniger effizient stimuliert wurden. (2) Weiterhin wurde gezeigt, dass mit pp65 fusioniertes Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) hoch effizient in Jurkat T-Zellen aufgenommen wird. Seine Aufnahmeeffizienz übertraf die des mit etablierten Transduktionsdomänen fusionierten EGFP. Es wurde weiterhin festgestellt, dass die Aufnahmeeffizienz bei 37°C gegenüber der Aufnahmeeffizienz bei 4°C zunahm. Dies spricht für einen energieabhängigen Prozess. (3) Rekombinantes pp65 stimulierte CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in gleichem Umfang wie mit tatPTD oder antpHD fusioniertes pp65.

Rekombinant in Insektenzellen exprimiertes pp65 verfügt über eine hohe Aufnahmeeffizienz und wird zuverlässig im Kontext mit MHC I kreuzpräsentiert. Rekombinantes pp65 könnte also durch N- oder C-terminale Fusion mit Antigenen als immunogenes Trägerprotein in der Erzeugung von Vakzinen dienen. In den folgenden Arbeiten müsste nun *in vivo* die Nützlichkeit von rekombinantem pp65 in der Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort untersucht werden.

## Summary:

### **The Human Cytomegalovirus' tegument-protein pp65 is a potential carrier-protein for antigens**

The induction of a specific, cellular immunologic response is of outstanding importance for the defence against intracellular, e.g. viral infection. To achieve it, a soluble antigen must be cross-presented in context with the major histocompatibility complex I (MHC I). Because of their high proportion of cationic amino acids, translocatory proteins and protein transduction domains (PTD) are able to procure improved access to the cytosol and thus facilitate MHC I-mediated immunologic responses. A region with a high proportion of cationic amino acids is found in the pp65's nuclear localisation signal (NLS). Pp65 is an HCMV tegument-protein, able to induce specific CD8<sup>+</sup>-T cell response without *de novo* synthesis. In consequence pp65 could have similar features as PTDs. Therefore we wanted to analyse whether recombinant pp65, expressed in insect-cells, shows such features and thus could potentially be used as antigen-carrier to the cross-presentation-pathway.

It could be shown, (1) that recombinant pp65, expressed in insect-cells, was able to stimulate both HCMV-specific CD8<sup>+</sup>- and CD4<sup>+</sup>-T memory cells in an ex-vivo-stimulation-assay. Compared to HCMV-fibroblast-lysates, recombinant pp65 stimulated efficiently CD8<sup>+</sup>-T memory cells. In contrast recombinant pp65 stimulated CD4<sup>+</sup>-T memory cells not as efficient as the HCMV-fibroblast-lysate did. (2) Furthermore, enhanced green fluorescent protein (EGFP) fused to pp65 was efficiently taken up by Jurkat-T cells. It was even more efficiently taken up than EGFP fused with conventional PTDs. Interestingly the efficiency of uptake was increasing at 37°C compared to 4°C, thus suggesting an energy-dependent process. (3) Recombinant pp65 is as efficient as pp65 fused with tatPTD or antpHD in stimulating CD8<sup>+</sup>- and CD4<sup>+</sup>-T memory cells.

Recombinant pp65, expressed in insect-cells, is efficiently taken up and is reliably cross-presented in context with MHC I-proteins. Hence recombinant pp65 could be interesting as an immunogenic carrier-protein in the production of vaccines when fused with other antigens. Subsequent work should therefore test the utility of recombinant pp65 in inducing antigen-specific immune response *in vivo*.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Der Mensch verfügt über ein im Laufe der Evolution entwickeltes Verteidigungssystem gegen exogene Substanzen und potentielle Pathogene wie Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten. Dieses Verteidigungssystem ist in der Lage Fremdstanz von körpereigener Substanz zu unterscheiden, so dass es im Normalfall zu keinen Reaktionen gegen physiologische, körpereigene Strukturen kommt („immunologische Toleranz“). Die Gesamtheit der an diesen Funktionen beteiligten Organe, Zellen und Strukturen wird als Immunsystem bezeichnet.

Die Immunabwehr exogener Erreger wird durch das angeborene und das erworbene Immunsystem geleistet. Das angeborene Immunsystem agiert schnell und relativ unspezifisch. Es umfasst als erste Faktoren physikalische und chemische Barrieren, die einen andauernden passiven Schutz darstellen. Neben diesen Faktoren verfügt das angeborene Immunsystem auch über spezialisierte Zellen wie Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Sie sind zur Phagozytose befähigt, und können dadurch auch partikuläre Fremdstanz eliminiieren. Schließlich können, beispielsweise bei viralen Infektionen, Natürliche Killerzellen (NK Zellen) durch Viren infizierte Zellen unspezifisch erkennen und abtöten. Das angeborenen Immunsystem kann so als erstes auf eindringende Pathogene reagieren und deren Ausbreitung verhindern, bis die adaptive Immunantwort einsetzt.

Zu Beginn der adaptiven, erworbenen Immunantwort steht die Aufnahme und Prozessierung eines als körperfremd erkannten Stoffs (Antigen) durch antigenpräsentierende Zellen (APC). Zu den APC zählen Dendritische Zellen (DC), Makrophagen und B-Zellen. Sie wandern nach Aufnahme des Antigens in die sekundären lymphatischen Organe, wie Lymphknoten und Milz. Dort präsentieren sie Teile des prozessierten Antigens im Kontext mit MHC I- und MHC II-Molekülen naiven  $CD8^+$  bzw.  $CD4^+$  T-Zellen.  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen

werden als zellulärer Arm des adaptiven Immunsystems bezeichnet, und können über ihren T-Zell-Rezeptor Antigen im Kontext mit MHC spezifisch erkennen. Man unterscheidet zwischen  $CD8^+$  zytotoxischen T-Zellen (CTL) und  $CD4^+$  T-Helfer“-zellen (Th-Zellen). CTL können Zielzellen durch antigenspezifische Rezeptorbindung und Ausschütten von lytischen Granula zerstören. Th-Zellen unterstützen durch die Produktion von Zytokinen andere Zellen bei deren Differenzierung und Funktion. Neben CTL und Th-Zellen gibt es noch regulatorisch wirksame T-Zellen (Treg), die in der Lage sind, die Effektorfunktion obiger T-Zellen zu dämpfen.

Der zelluläre Arm des adaptiven Immunsystems steht in enger Kooperation mit dem humoralen Arm. Zu dem humoralen Arm gehören die durch differenzierte B-Zellen (Plasmazellen) produzierten, spezifischen Antikörper (Immunglobuline (Ig)). B-Zellen erkennen sowohl zellassozierte als auch lösliche Antigene spezifisch über ihren B-Zell-Rezeptor (BCR). Der Kontakt mit einem spezifischen Antigen führt zur Aktivierung der B-Zelle und zur darauffolgenden Differenzierung in eine Antikörper-sezernierende Plasmazelle. Antikörper können körperfremde Partikel opsonieren, d.h. sie für Zellen des Immunsystems mit zytotoxischer oder phagozytotischer Aktivität markieren. Sie können außerdem über Komplementaktivierung zur Lyse von Pathogenen beitragen und als neutralisierende Antikörper durch Bindung an Viren deren Infektiosität hemmen. Die Differenzierung von B Zellen geschieht in Abhängigkeit von T- Helferzell-Unterstützung. Dies verdeutlicht die Zusammenarbeit des humoralen und des zellulären Arms des adaptiven Immunsystems. Darüber hinaus kooperiert das adaptive Immunsystem auch mit dem angeborenen Immunsystem. Zum Beispiel können NK-Zellen des angeborenen Immunsystems antikörperabhängig zytotoxisch wirken. Durch das Ineinandergreifen von angeborenem und adaptivem Immunsystem kann die Infektion meist kontrolliert und das Pathogen eliminiert werden. Gleichzeitig entwickeln sich dauerhafte T- und B-Gedächtniszellen. Gedächtniszellen können deutlich effizienter und zügiger als naive T- oder B-Zellen auf eine erneute Infektion durch den gleichen Erreger reagieren (Janeway et al. 2001).

### 2.1.1 T-Zellen und die adaptive Immunantwort

T-Zellen können anhand der Expression der unterschiedlichen Oberflächenmoleküle CD4 und CD8 in zwei Gruppen unterteilt werden. CD4 und CD8 sind T-Zellrezeptor (TCR)-assoziierte Korezeptormoleküle. Sie sind in der Lage, an konstanten Regionen der MHC II- bzw. MHC I-Moleküle zu binden. Im Kontext von MHC I-Molekülen präsentierte antigene Peptide werden durch CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkannt. Zur Präsentation durch MHC I-Moleküle sind fast alle kernhaltigen Körperzellen und antigenpräsentierenden Zellen (APC) befähigt. Eine adaptive Immunantwort wird jedoch nur durch Präsentation über aktivierte APC induziert. Im Kontext mit MHC II-Molekülen präsentierte Peptide werden durch CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten erkannt. MHC II-Moleküle werden anders als MHC I-Moleküle nur von professionellen APC z.B. DC, B-Zellen, Makrophagen und aktivierten T-Zellen exprimiert (Janeway et al. 2001). Die Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von Antigenen und die darauf folgende antigenspezifische Stimulation und Funktion der T-Zellen inklusive ihrer Effektorfunktion sind komplexe Vorgänge, die im Weiteren beschrieben werden.

#### 2.1.1.1 Aufnahme, Prozessierung und Präsentation von T-Zell-Antigenen

Antigene Peptide, die im Kontext von MHC I-Molekülen präsentiert werden können, sind vorwiegend intrazellulären Ursprungs. Einige spezialisierte Zellen sind jedoch in der Lage, Antigene extrazellulären Ursprungs im Kontext von MHC I zu präsentieren. Dieser Prozess wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Kreuzpräsentation konnte *in vitro* bisher für Makrophagen (Ramirez & Sigal 2002), B-Zellen (Ke & Kapp 1996), Monozyten, Keratinozyten (Neijssen et al. 2005), Endothelzellen (Limmer et al. 2000) und DC (Huang et al. 1994) gezeigt werden. Im Kontext von MHC II-Molekülen präsentierte antigene Peptide sind hingegen überwiegend extrazellulären Ursprungs. Die Wege von Produktion oder Aufnahme eines Antigens bis zur Präsentation des antigenen Peptids im Kontext von MHC I- und MHC II-Molekülen unterscheiden sich.

### **2.1.1.1.1 Im Kontext von MHC II-Molekülen präsentierte antigene Peptide sind meist extrazellulären Ursprungs**

MHC II-Moleküle werden nach ihrer Synthese an den Ribosomen des Endoplasmatische Retikulum (ER) durch eine invariante Kette vor Beladung durch endogene Peptide geschützt. Die unbeladenen MHC II-Moleküle werden über den Golgi-Apparat zu den Lysosomen transportiert. Diese verschmelzen dann mit den Endosomen zu Endolysosomen. In den Endosomen befinden sich endozytierte, extrazelluläre Antigene. In den Endolysosomen werden durch hydrolytische Spaltung die aufgenommenen Antigene zu kleineren, antigenen Peptiden abgebaut und die invariante Kette des MHC II-Moleküls abgespalten. Nun können die endozytierten und prozessierten Antigene spezifisch an MHC II-Molekülen binden und MHC II-Peptid-Moleküle bilden. Schließlich werden die MHC II-Peptid-Moleküle wieder an die Oberfläche transportiert, wo sie von  $CD4^+$  T-Zellen über den TCR antigenspezifisch erkannt werden können (Cresswell 1994).

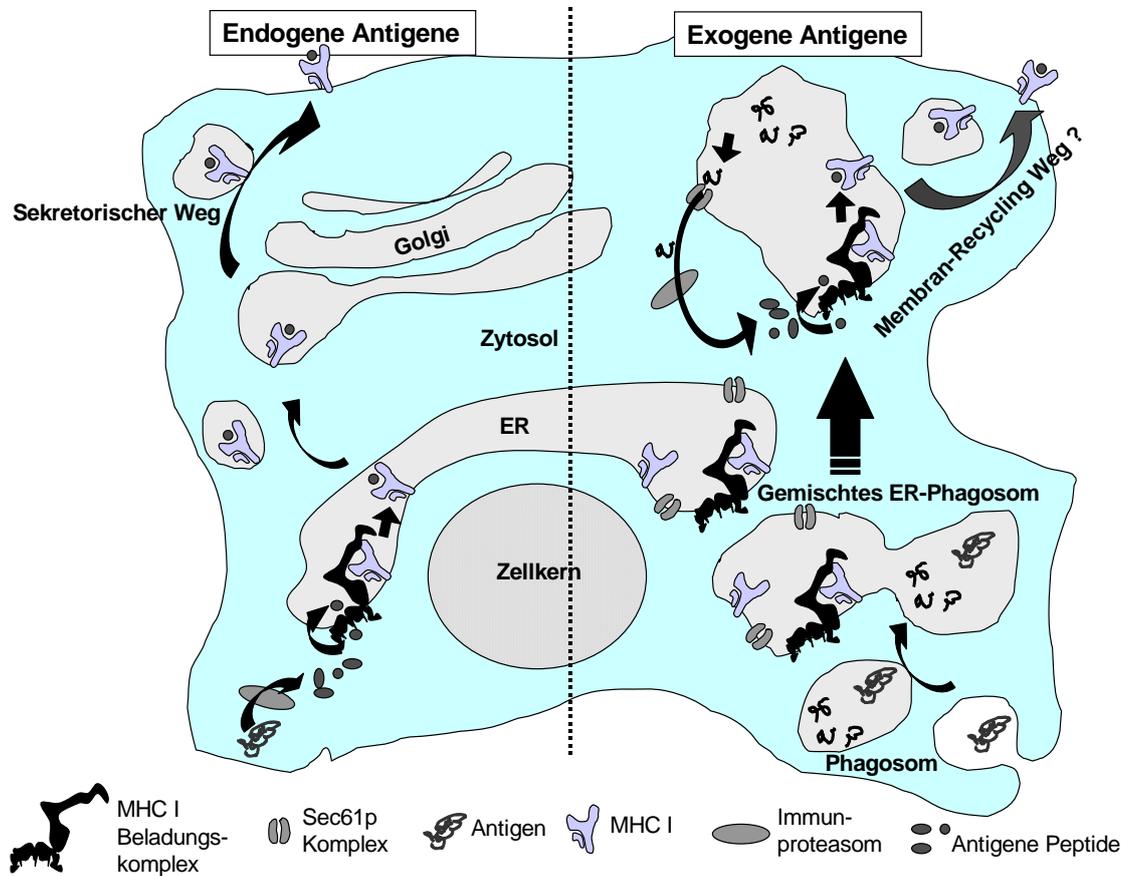
### **2.1.1.1.2 Im Kontext von MHC I-Molekülen präsentierte Antigene sind meist endogenen Ursprungs**

Im Zytosol liegen vorwiegend zelleigene Proteine vor. Sie können durch Proteasomen zu Peptiden gespalten werden. Diese Peptide können dann durch Transporterproteine „Transporter associated with Antigen Presentation“ (TAP) in das ER transportiert werden, wo Aminopeptidasen die Peptide auf 7-9 Aminosäuren Endlänge spalten können. Nun können diese Peptide an die MHC I-Moleküle binden (Serwold et al. 2002). Die MHC I-Peptid-Moleküle gelangen anschließend über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, wo sie von  $CD8^+$  T-Zellen über den TCR antigenspezifisch erkannt werden können (Haemels et al. 1995, Rock et al. 2002, Ackermann A. & Cresswell P. 2004, Abb. 2.1).

### 2.1.1.1.3 Kreuzpräsentation exogenen Antigens im Kontext von MHC I-Molekülen

Antigene exogenen Ursprungs können, genauso wie Antigene endogenen Ursprungs, im Kontext von MHC I präsentiert werden. Dies bezeichnet man als Kreuzpräsentation. Für eine Reihe von Antigenen ist die Kreuzpräsentation im Kontext mit MHC I nachgewiesen worden. Hierzu gehören sowohl Antigene von lebenden Zellen, als auch von Zellen in Apoptose (Albert et al. 1998, Harshyne et al. 2001). Immunkomplexe und lösliche Antigene (Li et al 2001) werden ebenfalls kreuzpräsentiert. Die Prozessierung exogener partikulärer Antigene im MHC I-Präsentationsweg konnte aufgeklärt werden. Für lösliche Antigene weisen erste Ergebnisse auf einen vergleichbaren Mechanismus hin (Ackermann et al. 2004): Nach der Antigen-Aufnahme durch Phagozytose fusioniert die Membran des frühen Phagosoms mit der Membran des ER. Daraus resultiert ein frühes gemischtes ER-Phagosom (Guermontprez et al. 2003, Abb. 2.1), das im Lumen und in seiner Membran über ER-typische Proteine verfügt. Hierzu gehören ER-Aminopeptidasen, Disulfid-Isomerasen und ER-Transportermoleküle, wie TAP und Sec61, sowie Moleküle des MHC I-Lade-Komplexes: Calreticulin und Tapasin (Houde et al. 2003). Die Fusion des gemischten ER-Phagosoms mit späten Lysosomen ermöglicht anschließend durch lysosomale Hydrolasen und ER-Disulfid-Peptidasen die Spaltung der aufgenommenen Proteine in Polypeptide. Diese werden wahrscheinlich durch das Sec61 Transportmolekül in das Zytosol transportiert (Houde et al. 2003, Fonteneau et al. 2003), wo sie polyubiquitinyliert werden. Die Polypeptide sind nun ein Substrat für den proteasomalen Abbau in kleinere Peptide, die dann über TAP direkt in das gemischte ER-Phagosom zurücktransportiert werden (Ackermann & Cresswell 2004; Abb. 2.1). Die Peptide werden dort von der ER-Aminopeptidase verkürzt und durch den MHC I-Lade-Komplex auf MHC I geladen. Auf welchem Weg das MHC I-Peptid-Molekül anschließend an die Zelloberfläche gelangt, ist noch nicht aufgeklärt. Da der Transportweg nicht durch Brefeldin A gehemmt werden kann, ist ein Transport über den sekretorischen ER-Golgi-Weg ausgeschlossen. Ein Transport an die Zelloberfläche im Kontext des Membran-Recyclings wird diskutiert, ist aber noch nicht geklärt (Guermontprez et al. 2003, Ackermann et al. 2004). Alternativ können exogene Antigene über einen anderen Mechanismus

prozessiert werden. Hierbei werden sie ohne Umweg über das Zytosol direkt in den gemischten ER-Phagosomen gespalten und binden dort anschließend an MHC I-Moleküle (Lizee et al. 2003).



**Abb. 2.1 Klassische Präsentation und Kreuzpräsentation von Antigenen über den MHC I Weg.** Nach proteolytischer Spaltung werden in der Zelle vorliegende, endogene Antigene durch den aus TAP 1 und 2, Calreticulin, Tapasin und Erp57 bestehenden MHC I Beladungskomplex ins Endoplasmatische Reticulum (ER) transportiert und auf spezifische MHC I Komplexe geladen. Der anschließende Transport an die Zelloberfläche erfolgt über den Golgiapparat durch den sekretorischen Weg. In spezialisierten Zellen, wie DC und Makrophagen, können Exogene Antigene über ER-vermittelte Phagozytose in ein gemischtes ER-Phagosom aufgenommen werden. Nachdem sie dort hydrolytisch gespalten worden sind, können sie wahrscheinlich mit Hilfe des Sec61-Komplex in das Zytosol translozieren. Hier werden sie von Immunproteasomen weitergespalten und anschließend durch den MHC I Beladungskomplex wieder in das gemischte ER-Phagosom transloziert und auf MHC I geladen. Der darauf folgende Transport an die Zelloberfläche ist noch nicht aufgeklärt. Er erfolgt aber unabhängig vom Golgiapparat.

### **2.1.1.2 CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sind entscheidend für die Induktion humoraler und zellulärer adaptiver Immunantworten**

Im Kontext von MHC II-Molekülen präsentierte Antigene können spezifische CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen aktivieren. Die aktivierten T-Helferzellen unterstützen daraufhin durch die Ausschüttung von Zytokinen und Bindung von Membranmolekülen andere Zellen des Immunsystems wie z.B. B-Zellen und CTL bei ihrer Differenzierung und Funktion. Anhand der durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen sezernierten Zytokine können drei Subpopulationen unterschieden werden. Th1-Zellen sind an der Aktivierung des zellulären Arms der adaptiven Immunantwort beteiligt, während Th2 für die Aktivierung des humoralen Arms benötigt werden (de Jong et al. 2005). Treg-Zellen (Th3) hemmen die Proliferation von Th1- und Th2-Zellen und helfen daher bei der Etablierung von Immuntoleranz (Jonuleit & Schmitt 2003). CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind von zentraler Bedeutung für die Funktion des Immunsystems. Dies zeigt sich exemplarisch bei einer Infektion durch das humane Zytomegalievirus (HCMV). Eine zur Kontrolle der Infektion notwendige CTL-Antwort wird nur mit Hilfe von CD4<sup>+</sup> T-Zellen erlangt (Li et al. 1994). Auch führt der deutliche Verlust an funktionierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Verlauf einer Infektion mit humanen Immundefizienz-Viren (HIV) zu dem Vollbild des Acquired Immunodeficiency Syndrom (AIDS).

### **2.1.1.3 Naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen können sich zu CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen differenzieren**

Im Kontext von MHC I-Molekülen präsentierte Antigene können von spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen mittels ihres TCR erkannt werden. Erkennen naive CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf APC ein im Kontext von MHC I-Molekülen präsentiertes Peptid, können sie zu zytotoxischen T-Zellen (CTL) differenzieren. CTL können über spezifische Bindung an MHC I-Peptid-Moleküle infizierte Zellen erkennen und abtöten. Dadurch können die CTL die intrazelluläre Vermehrung von Pathogenen verhindern. Zur Lyse infizierter Zellen produzieren CTL eine Reihe in Granula gespeicherter Effektormoleküle, wie Perforin, Granulysin und

Granzyme. Sie werden nach spezifischer Bindung über den TCR in den Spalt zwischen Zielzelle und CTL sezerniert und führen zur Lyse der infizierten Zelle. CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten sind daher für die Kontrolle viraler Infektionen von zentraler Bedeutung. Zum Beispiel kann HCMV zwar durch CTL nicht komplett eliminiert werden, sie kontrollieren allerdings die latente Infektion (Reusser et al. 1991, Walter et al. 1995). Auch bei der Infektion durch HIV sind CTL für die Kontrolle der Virämie entscheidend. Eine geringe Viruslast und ein längeres Überleben korrelieren mit einer hohen CTL Antwort (Musey et al. 1997, Greenough et al. 1997).

#### **2.1.1.4 Die Induktion der adaptiven Immunantwort durch T-Zellen - Von der naiven T-Zelle bis zur T-Gedächtniszelle**

Die primäre adaptive Immunantwort von T-Zellen auf einen spezifischen Antigenstimulus umfasst mehrere Phasen. Initial binden naive T-Zellen in peripheren lymphatischen Organen antigenspezifisch an APC und werden stimuliert. Zusätzlich zu dem primären Stimulationssignal über den TCR ist eine über CD28 vermittelte Kostimulation notwendig. Fehlt die Kostimulation führt dies zu einem anergen Zustand der T-Zelle (Bachmann et al. 1999). Nach Aktivierung der naiven T-Zellen folgt eine Phase der klonalen Expansion und der Differenzierung zu CD4<sup>+</sup> Th-Zellen, beziehungsweise CD8<sup>+</sup> CTL. Die T-Zelle durchläuft während der Expansion mindestens sieben bis zehn Zellteilungen und differenziert sich zu einer Effektor- oder Gedächtniszelle (Kaech & Ahmed, 2001). Die Effektorzellen können z.B. eine akute virale Infektion in den meisten Fällen innerhalb von sieben bis zehn Tagen kontrollieren und den viralen Erreger eliminieren. In der folgenden Kontraktionsphase sterben über 90 % der Effektorzellen ab, während die langlebigen Gedächtniszellen persistieren. Sie bilden fortan das immunologische Gedächtnis. Im Falle einer Zweitexposition mit Antigen reagieren und proliferieren sie deutlich schneller als naive T-Zellen (Kaech & Ahmed, 2001; Sprent & Surh 2001).

## 2.2 Protein-Transduktionsdomänen und translokatorische Proteine können rezeptorunabhängig in Zellen internalisieren

Protein-Transduktionsdomänen (PTD) sind Oligopeptidsequenzen innerhalb viraler und zellulärer Proteine mit vorwiegend kationischen Aminosäuren wie Lysin, Arginin oder Histidin (Vives et al. 1997, Derossi et al. 1994). Diese kationischen Aminosäuren stehen hierbei in der Sekundärstruktur im räumlichen Wechsel zu ungeladenen Aminosäuren und bedingen dadurch einen hohen isoelektrischen Punkt der Peptidsequenz (Ho et al. 2001). Zu den PTDs zählen beispielsweise die Transduktionsdomäne tatPTD des „transactivator of transcription“-Proteins TAT von HIV (Vives et al. 1997) und die Transduktionsdomäne AntpHD des Antennapedia Proteins Antp von *Drosophila melanogaster* (Derossi et al. 1994). Translokatorische Proteine sind hingegen verhältnismäßig kleine Proteine, wie beispielsweise das 22 kDa große Tegumentprotein VP22 vom Herpes Simplex Virus Typ I (HSV-1). Translokatorische Proteine weisen ebenfalls Regionen mit hohem isoelektrischen Punkt auf (Elliott & Meredith, 1992). PTDs und translokatorische Proteine sind in der Lage in die unterschiedlichsten Zelltypen zu internalisieren. Sie können außerdem auch fusionierte Peptide, Proteine oder DNA in Zellen einschleusen (Schultze-Redelmeier et al. 1996, Schwarze et al. 1999, Cao G. et al. 2002, Hung et al. 2002, Wang & Fu et al. 2002). Hierzu binden sowohl PTDs, als auch PTD-Fusionskonstrukte wahrscheinlich an Glykosaminoglykane (z.B. Dextran- und Heparansulfat) auf der Zellmembran (Console et al. 2003, Mai et al. 2002). Der sich daran anschließende Internalisierungsprozess ist in allen Details noch nicht verstanden.

### **2.2.1 PTD und translokatorische Proteine können eine effiziente Aufnahme und Prozessierung von Antigenen im MHC I Weg vermitteln**

Der Mechanismus der Kreuzpräsentation legt nahe, dass eine effiziente Aufnahme antigener Peptide in spezialisierte APC die Effizienz der Kreuzpräsentation steigert. PTDs und translokatorische Proteine können an sie gebundene Peptide effektiv in Zellen schleusen. Sie sind daher interessanten Kandidaten für Protein-Vakzinierungs-Strategien. An PTDs oder translokatorische Proteine fusionierte Antigene wurden bereits erfolgreich zu einer *in vivo* Stimulierung von antigenspezifischen CTL eingesetzt. Beispielsweise wurde tatPTD-gekoppeltes Antigen sowohl zur Induktion als auch zur Stimulation antigenspezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgreich eingesetzt. Während Ovalbuminantigen (OVA) normalerweise nur über MHC II präsentiert wird, löst tatPTD-gekoppeltes OVA in Mäusen eine MHC I-abhängige CTL-Antwort aus (Kim et al. 1997). Ebenfalls war die Induktion einer CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort durch Impfung mit autologen DC nach Inkubation mit tatPTD-gekoppeltem Antigenepitop bei Mäusen erfolgreich (Tanaka et al. 2003, Wang et al. 2002).

### **2.2.2. Das HCMV Tegumentprotein pp65 kommt als translokatorisches Protein in Frage**

Eine effiziente Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch an PTDs oder translokatorische Proteine gekoppelte antigene Peptide ist *in vivo* problematisch, da sie nur bei hohen Proteinkonzentrationen effizient aufgenommen werden (Nagahara et al. 1998, Peitz et al. 2002). Daher müssen neue, effizientere translokatorische Proteine identifiziert werden, welche die Proteinaufnahme und die Kreuzpräsentation steigern. Das Phosphoprotein pp65 des Humanen Cytomegalovirus (HCMV) könnte ein solches translokatorisches Protein sein. Als Tegumentprotein wird pp65 erst in der Spätphase des Replikationszyklus gebildet. Zu diesem Zeitpunkt greifen HCMV-Proteine bereits supprimierend in die immunstimulatorischen Prozesse infizierter Zellen ein (Miller et al. 1999, Warren et al. 1994). Die Präsentation von endogen exprimiertem pp65 in HCMV-

infizierten Zellen ist daher ineffizient. Außerdem wurde festgestellt, dass endogen exprimiertes pp65 die Expression IFN- $\alpha$ -induzierter Proteine hemmt. Dadurch könnte eine effektive Antigenpräsentation verhindert werden (Browne & Shenk 2003). Die HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort richtet sich jedoch in erheblichem Masse gegen pp65 (Beninga et al. 1995, Wills et al. 1996). Folglich kann angenommen werden, dass pp65 auf anderen Wegen als durch *de novo* Synthese in den MHC I Weg gelangt (Riddell et al. 1991, McLaughlin-Taylor et al. 1994, Beninga et al. 1995, Wills et al. 1996, Khattab et al. 1997, Gyulai et al. 2000). Dies belegt auch die Beobachtung, dass pp65 *in vitro* aus kokultivierten und HCMV-infizierten Fibroblasten von nicht-infizierten DC kreuzpräsentiert werden kann (Tabi et al. 2001). Es wurde außerdem gezeigt, dass pp65 ohne *de novo* Synthese aus Virionen in das Zytoplasma gelangen kann und dann im Kontext von MHC I-Molekülen präsentiert wird (Riddell et al. 1991). Dies spricht auch *in vivo* für eine Aufnahme und Prozessierung von pp65 im MHC I Präsentationsweg durch APC. Bislang wurde weder *in vitro* noch *in vivo* geklärt, ob dafür Virionen oder deren Komponenten erforderlich sind. Wie in anderen translokatorischen Proteinen gibt es auch bei pp65 Abschnitte mit einem hohen Anteil an kationischen Aminosäuren. Es handelt sich hierbei um das zweigeteilte nukleäre Lokalisationssignal (NLS) des Proteins von AS 538 bis 561 (Gallina et al. 1996). Das NLS könnte eine effizient Aufnahme durch APC vermitteln. Ob es einen effizienten Transport von pp65 und mit pp65 fusionierten Proteinen in APC vermitteln kann, muss noch geklärt werden.

### 2.3 Ziele dieser Arbeit

Einer der größten Erfolge der modernen Impfmedizin ist die 1977 von der WHO offiziell festgestellte Ausrottung der Pocken. Seitdem wurden weiterhin verschiedenste Impfstoffe gegen virale und bakterielle Erreger bzw. deren Toxine entwickelt. Ihnen stehen aber eine große Anzahl pathogener Keime von klinischer Relevanz gegenüber, für die es bisher noch keine zuverlässige Vakzine gibt. Hierzu zählen unter anderem das Hepatitis C Virus und das Humane Immundefizienzvirus. Zur Bekämpfung dieser Erreger scheinen virusspezifische CTL eine entscheidende Rolle zu spielen. Daher ist die Induktion entsprechender

zellulärer Immunantworten ein besonderes Anliegen der heutigen Impfstoffforschung. In diesem Kontext sind translokatorische Proteine aufgrund ihrer Kreuzpräsentationsfähigkeit als potentielle Antigencarrier interessant.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das HCMV-Tegumentprotein pp65 Eigenschaften aufweist, die es als Trägersystem für Proteinantigene qualifizieren. Es sollten folgende Themenbereiche bearbeitet werden:

- 1) Es sollte gezeigt werden, dass rekombinant exprimiertes pp65 in der Lage ist HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen im Vergleich zu virionhaltigem HCMV-Fibroblastenlysat effizient zu stimulieren.
- 2) Weiterhin sollte die effiziente Aufnahme von rekombinantem pp65 in Zellen im Vergleich zu etablierten PTDs gezeigt werden.
- 3) Rekombinantes pp65 und mit tatPTD oder antpHD fusioniertes pp65 sollten bezüglich der spezifischen Stimulation von HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen gegenübergestellt werden.

### 3 Materialien

#### 3.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva (Heidelberg, D)
Agarose	Gibco BRL™ Lifetechnologies
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva
Ampicillin (Binotal™)	Bayer (Leverkusen, D)
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
Bovines Serumalbumin (BSA)	New England Biolabs (Beverly, USA)
Chloroform	Merck (Darmstadt, D)
Coomassie Brilliant Blue™ R-250	Serva
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
Entwickler	ADEFECO Chemie GmbH
Essigsäure	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Serva
Ethidiumbromid	Sigma Chemie (St.Louis, USA)
Fixierer	ADEFECO Chemie GmbH
Fötales Kälberserum (FCS)	Viralex (Linz, A) oder Biochrom KG (Berlin, D)
Glyzerin	Serva
Glycin	Serva
Isopropanol	Merck
Magermilchpulver	Glücksklee (Hamburg, D)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Serva
Natriumjodid	Sigma Chemie
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Phenol	Merck
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Serva
Triton™ X-100	Serva

Tween 20

Serva

### 3.2 Membranen, Papiere und Filme

Nytran-M (Schleicher & Schuell, Dassel, D): Nitrozellulosemembran

Whatman Limited (Springfield, Maidstone, USA): Saugfähiges Filterpapier

ECL-Hyperfilm (Pharmacia Biotech, Amersham, UK): Blaulichtsensitiver Film

Sterilfilter 0,2 µm Porengröße (Schleicher & Schuell, Dassel, D):

Schraubsterilfilter

### 3.3 Puffer und Medien

<b>TE-Puffer</b>	Tris-HCL (pH 8,0)	0,01 M
	EDTA	0,001 M
<b>PBS-Puffer</b>	NaCl	0,14 M
	KCl	0,25 M
	MgCl <sub>2</sub>	0,5 mM
	CaCl <sub>2</sub>	0,001 M
	Na/K-Phosphat	0,01 M
	pH 7,5 (NaOH)	
<b>PBS-Puffer (ohne Mg<sup>2+</sup> und Ca<sup>2+</sup>)</b>	NaCl	8 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g
	KCl	0,2 g
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub> pH 7,4 (HCl)	1000 ml

**RPMI 1640** mit Glutamin (BioWhittaker Europe)

Zuzüglich 10% (v/v) fötales Kälberserum (Lifetechnology)

2,5 U/ml Penicillin und 2,5 µg/ml Streptavidin (Biochrom KG, Berlin)

**TC100** (Gibco BRL™ Lifetechnologies)

Zuzüglich 10% (v/v) fötales Kälberserum (Viralex oder Biochrom KG, Berlin)

2,5 U/ml Penicillin und 2,5 µg/ml Streptavidin (Biochrom KG, Berlin)

Spezielle Puffer werden bei den zugehörigen Methoden aufgeführt

### 3.4 Molekulargewichtsmarker

**Protein-Molekulargewichtsmarker (BioRad Rainbow-Marker)**

### 3.5 Antikörper

**Anti-pp65:**

NCL-CMVpp65 Klon 2 (IgG1 κ) und Klon 6 (IgG1 κ) von Novo Castra (Newcastle, UK)

**Anti-EGFP:**

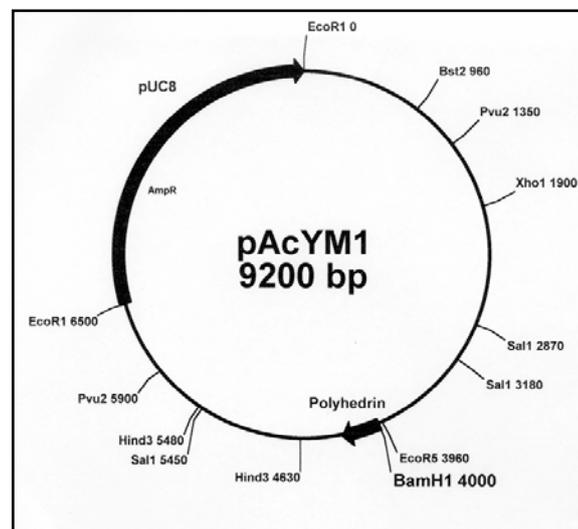
Klon 7.1 und 13.1 von Roche (Basel, CH)

**Fluoreszenzmarkierte Antikörper** die im Vollblutassay eingesetzt wurden:

Anti-CD4-PerCP	Becton Dickinson, 347324
Anti-CD8-PerCP	Becton Dickinson, 347314
Anti-IFN-γ-FITC	Pharmingen, 18904A
Anti-CD69d-PE	Becton Dickinson



Durch homologe Rekombination mit dem Baculo-Gold-Vektor™ (Pharming) entstehen rekombinante *Autographa californica* „multiple nuclear polyhedrosis“ Viren (rAcMNPV), die *in vitro* Insektenzellen infizieren können. Das unter der Kontrolle des Polyhedrinpromotors stehende Proteinprodukt kann dann in großen Mengen dargestellt werden. Der pAcYM1 Vektor zeigt durch eine günstiger gelegene Deletion (+1 bis +173) des Polyhedringens im Vergleich zu dem Vektor pAc373 (Deletion: -7 bis +166) bei manchen Genen eine bessere Expression. (MATSUURA et al., 1987). Eine Übersicht der zur Expression rekombinanter Proteine verwendeten rAcMNPV ist in Tabelle 3.1 dargestellt.



**Abb 3.1.** Der Vektor pAcYM1. Er dient nach homologer Rekombination mit dem Baculo-Gold-Vektor von Pharmingen zur Erzeugung rekombinanter *Autographa californica*-Polyhedrosis-Viren. Die Vermehrung in Bakterien wird durch ein Fragment aus pUC8 ermöglicht, das einen „ori“ und ein Ampicillinresistenzgen enthält.

**Tab. 3.1** Verwendete rAcMNPV: Alle rekombinanten Viren wurden der Virensammlung des Instituts für Virologie des Universitätsklinikums des Saarlandes entnommen.

Bezeichnung	Rekombinantes Protein
AcpP-P	pp65
AcpP-TP	tatPTD-pp65
AcpP-AP	antpHD-pp65
AcpP-EGFP	EGFP
AcpP-PEGFP	pp65-EGFP

Fortsetzung Tabelle 3.1	
AcpP-TEGFP	tatPTD-EGFP
AcpP-AEGFP	antpHD-EGFP

### 3.9 Kits

ECL Western blotting detection	Amersham Pharmacia Biotech
Detergenz	(Amersham, UK)
Bakulo Gold Vector Kit	Pharmigen

### 3.10 Geräte und Diverses

#### Zentrifugen:

Sigma MK 202  
 Eppendorf Centrifuge 5417 R  
 Heraeus Megafuge 1.0 R  
 Heraeus Biofuge Pico

#### FACS:

FACScan™ Becton & Dickenson	Durchflusszytometer
Apple® Power Mac G3	Hardware zur Steuerung, Speicherung und Verarbeitung der Messdaten des FACScan™
CellQuest™ Becton & Dickenson	Software zur Steuerung, Speicherung und Verarbeitung der Messdaten des FACScan™

#### Mikroskop:

Olympus M 021

**Proteinlösung:**

121nM GST-HIS-EGFP, Institut für Virologie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Röhrchen:**

Sarstedt Monovetten mit Heparin  
Braun Perfusor Spritze 50ml  
Greiner 50 und 15 ml Schraubröhrchen  
FACS-Röhrchen, Greiner

**Elektrophorese Kammern:**

BioRad Sub-Cell® GT  
BioRad SDS-PAGE Kammer  
Pharmacia Biotech Semidryblot-Kammer

alle alimentiert mit BioRad PowerPac 300

**Diverses:**

Pipetten, Brutschränke, Sterilbänke, Eppendorfgefäße, Glasgefäße (Schott), Heizblöcke, Wasserbäder, Ultraschallbad, Vortex, Zellkulturflaschen 182 cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup> und 25 cm<sup>2</sup> (Greiner und Costar®), Rubber Cellscrapper (Greiner)

**3.11 Datenverarbeitung und Anwendungsprogramme (Software)**

Microsoft® Office 2000™Premium

Microsoft® Office 97™

Microsoft® Excel™

Cell Quest™, Beckton & Dickenson

Vilber Lourmat BIOID V6.31-Protein-Quantifizierungs-Programm

## 4. Methoden

### 4.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

#### 4.1.1 Kultivierung von Insektenzellen

(SUMMERS & SMITH, 1987)

Die Insektenzelllinie SF 158 (*Spodoptera frugiperda*) wurde als Adhäsionskultur in TC 100 Medium mit 10% fötalem Kälberserum (ohne Lipopolysaccharid), 2,5 U/ml Penicillin und 2,5 µg/ml Streptomycin in einem auf 27°C temperierten Brutschrank bei Raumluftverhältnissen kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden die Monolayer mittels eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst und in neuen Flaschen und frischem Medium im Verhältnis 1:3 oder 1:4 subkultiviert.

### 4.2 Expression und Aufreinigung von rekombinanten Proteinen in Insektenzellen

#### 4.2.1 Lipofektion mit dem "Bakulo-Gold"-Vektor

Zur Herstellung replikationsfähiger Viren wurden der Bakulo-Gold-Vektor (Pharming) und die rekombinanten Expressionsvektoren des *Autographa californica*-Bakulovirus durch Lipofektion in SF158-Insektenzellen transfiziert. Die entstandenen rekombinanten Bakuloviren sind replikationsfähig und veranlassen die Wirtszelle zur Expression des rekombinanten Proteins, das unter der Kontrolle des starken viruseigenen Polyhedrinpromotors steht.

<b>Vektormix:</b>	Expressionsvektor-DNA	0,5-1 µg
	Goldvektor (Pharming)	2 µl
	H <sub>2</sub> O bidest.	ad 20 µl

<b>Lipofectin-Lösung:</b>	Lipofectin	13,4 µl
	H <sub>2</sub> O bidest.	6,6 µl

Die Insektenzellen wurden in einer 1:2 Verdünnung in 6-Loch-Platten (ca.  $1,5 \times 10^6$  je Loch) für mindestens eine Stunde kultiviert, mit TC-100-Medium ohne FCS und Antibiotikum gewaschen und dann mit 1 ml TC-100-Medium ohne FCS und Antibiotikum überschichtet. Der Vektormix und die Lipofectin-Lösung wurden zusammengegeben, für 15 min bei RT inkubiert und im Anschluss zu den Insektenzellen gegeben. Nach 24 h Inkubation in einer sterilen feuchten Kammer bei 27°C wurden die Lipofektionsansätze mit je 2 ml TC100-Medium mit 2,5 U Penicillin, 2,5 µg/ml Streptavidin und 10% FCS ohne LPS aufgefüllt. Die Zellernte erfolgte nach 4-5 Tagen, nachdem sich Zellklumpen gebildet hatten. Der sterilfiltrierte Überstand diente zur Infektion einer 25 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit  $5 \times 10^5$  SF158-Zellen. Nach ca. zwei Tagen lösten sich die infizierten Zellen vom Flaschenboden ab und konnten lysiert werden.

#### **4.2.2 Infektion von SF158-Insektenzellen mit dem Bakulovirus**

(SUMMERS & SMITH,1987)

$10^6$  Zellen/ml der SF 158-Zellen wurden am Tag der Infektion 1:2 verdünnt und subkultiviert. Nach der Adhäsion der Zellen an den Kulturflaschenboden wurde das Medium abpipettiert und die Zellen mit Virusstock überschichtet, so dass sie mit einer dünnen Schicht Virusüberstand bedeckt waren. Nach einer Stunde Inkubation bei 27°C wurde Medium aufgefüllt, so dass die Zelldichte  $5 \times 10^5$  Zellen/ml betrug. Nach weiteren 37-48 h erfolgte dann die Zellernte. Neue Virusstocks wurden aus dem sterilfiltrierten Überstand der infizierten Insektenzellen gewonnen und bei 4°C gelagert. Längere Lagerung erfolgte durch Einfrieren kleiner Aliquots der Überstände bei -70°C in Medium.

#### **4.2.3 Zellernte und Aufreinigung**

(modifiziert nach SUMMERS & SMITH, 1987)

Die Insektenzellen wurden mit einem Zellschaber vom Kulturschalenboden abgekratzt, in PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>, ohne Ca<sup>2+</sup>) gewaschen und abzentrifugiert (1600

rpm, 6 min, Heraeus Megafuge 1.0 R) und mit dreimaligen Wechsel zwischen 42°C-Wasserbad und flüssigem Stickstoff ("Frier-und-Tau-Schritte") aufgeschlossen. Nach weiterem Aufschließen im Ultraschallbad für 10 min wurden die Zelltrümmer bei 1600 rpm für 6 min (Heraeus Megafuge 1.0 R) abzentrifugiert. Der Überstand mit den rekombinanten Proteinen wurde bei -70°C gelagert.

#### 4.2.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Konzentrationsbestimmung wurden 10 µl eines Proteinextraktes in 500 µl 0,1 M NaOH verdünnt und gut gemischt. Der Proteingehalt errechnete sich nach dem Messen der OD280 nach folgender Formel:

$$6,4 / OD280 = x \mu\text{l, die } 15 \mu\text{g Protein enthalten}$$

#### 4.3 Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

(LAEMMLI, 1970; MANIATIS et al., 1989)

##### Laufpuffer:

25 mM	Tris/HCl
0,1% (w/v)	SDS
0,192 M	Glycin

##### 2xProbenpuffer:

20%	Glycerol
4%	SDS
10 %	Mercaptoethanol
0,125%	Tris (pH 6,8 mit HCl)
	in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

**Trenngel (10 %):**

1,25 ml	Trenngelstock (1,5 M Tris, 0,4% SDS (w/v), pH 8,8)
1,66 ml	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
2,03 ml	H <sub>2</sub> O bidest.
50 µl	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
5 µl	TEMED

**Sammelgel:**

1,25 ml	Sammelgelstock (0,5 M Tris, 0,4% SDS (w/v), pH 6,8)
660 µl	Acrylamid/Bisacrylamid (30%)
3,06 ml	H <sub>2</sub> O bidest.
25 µl	10% (w/v) Ammoniumpersulfat
5 µl	TEMED

Proteine lassen sich aufgrund ihres Molekulargewichts, ihrer Struktur und Gesamtladung mit Hilfe der Polyacrylamidgelelektrophorese auftrennen. Vor dem Auftrennen wurden die Proteine mit 2xProbenpuffer versetzt und bei 94°C denaturiert. Durch das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfat (SDS) und Mercaptoethanol werden Disulfidbrücken in den Proteinen reduziert. SDS ist ein negativ geladenes Detergenz. Es bindet nicht-kovalent an die hydrophoben Regionen des Proteins und hebt fast alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen auf. SDS bindet an die Proteine in einem konstanten Masse/Ladungs-Verhältnis und überdeckt mit seiner stark negativen Ladung die Eigenladung des Proteins. Dadurch ist die Bewegung der Proteine im elektrischen Feld eine lineare Funktion des Logarithmus ihres Molekulargewichts. Die Auftrennungseigenschaften und Porengröße des Polyacrylamidgels hängen von der Acryl- b.z.w. von der Bisacrylamidkonzentration ab. In der sogenannten diskontinuierlichen Gelelektrophorese besteht die Gelmatrix aus zwei Teilen. In dem großporigen Sammelgel geringer Ionenstärke werden die Proben fokussiert, so daß sie gleichzeitig in das nachfolgende Trenngel eintreten. Hier findet die eigentliche Auftrennung bei hoher Ionenstärke mit Molekularsiebeffekt statt.

Beim Gießen des Gels wird Acrylamid mit N',N'-Methyl-Bisacrylamid quervernetzt. Die Polymerisation wurde durch Zugabe von Ammoniumpersulfat (10% APS (w/v)) und Tetramethylethylendiamin (TEMED) gestartet und katalysiert. Die Glasplatten wurden mit Ethanol fettfrei gemacht und gesäubert, die Teflonspacer eingesetzt, das Gel in die Kammerhalter eingeschraubt und in die Gießapparatur gespannt. Dann wurde das Trenngel bis 2 cm unter den Rand in den entstandenen Zwischenraum gefüllt und mit Wasser überschichtet, damit eine möglichst gleichmäßige Polymerisationsfront gewährleistet war. Auf das auspolymerisierte Trenngel (Dauer der Polymerisation: 1/2 h ) konnte nach Abgießen des Wassers das Sammelgel geschichtet werden, in das man einen Teflonkamm einsetzt. Nach Polymerisation des Sammelgels konnte das Gel zur Elektrophorese eingesetzt werden.

Zur Elektrophorese wurde das Gel senkrecht in eine Laufkammer gespannt und das Pufferreservoir so weit mit Laufpuffer gefüllt, bis der Puffer oben und unten mit dem Gel in Kontakt stand. Dadurch wurde ein Stromfluß von der oberen zur unteren Elektrode durch Gel und Puffer gewährleistet. In die Geltaschen wurden dann 20-30 µl der Proteinlösungen (bis zu 15 µg Protein) eingefüllt. Auf einer Bahn wurden 10 µl Marker aufgetragen. Bei maximaler Stromstärke wurde eine Spannung von 100 V eingestellt und nach Erreichen der Trenngelschicht auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese wurde nach ca. 1 h gestoppt, wenn das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht hatte. Das Gel wurde dann zwischen den Glasplatten herausgenommen, das Sammelgel mit dem Skalpell abgetrennt und verworfen und das Trenngel entweder für Western Blotting eingesetzt oder direkt mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

#### 4.4 Proteintransfer durch Semi-Dry Western-Blot

(modifiziert nach TOWBIN et al., 1979; BURNETTE, 1981)

<b>Transferpuffer:</b>	Tris-HCl	25 mM
	Glyzerin	192 mM
	Methanol	20% (v/v)
	in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	

---

<b>PonceauS:</b>	Ponceau	2%
	Essigsäure	2,5%
	in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	
<b>Blockingpuffer:</b>	Magermilchpulver 5% (w/v)	
	in PBS	

Nach der Auftrennung durch SDS-PAGE können Proteine mit dieser Methode elektrophoretisch aus dem Trenngel auf eine Membran (z.B. Nitrozellulosemembran) übertragen werden. Die Proteine binden bei niedriger Ionenstärke über hydrophobe Wechselwirkungen an die Membran. Da die Immunreaktivität trotz Immobilisierung weitgehend erhalten bleibt, können die Proteine immunologisch durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Der Ausdruck "Semi-Dry Blot" bezieht sich auf die Wahl einer speziell konzipierten Blot-Apparatur, die mit sehr wenig Transferpuffer auskommt. Dieses Verfahren ist im Gegensatz zum herkömmlichen "Naß-Blot" Pufferlösung sparend.

Für den Proteintransfer auf eine Nitrozellulosemembran wurde das Gel und die Membran zunächst für kurze Zeit in Transferpuffer äquilibriert. Dann erfolgte der Aufbau des "Blot-sandwiches" direkt auf der Anode der Blotkammer. Da der Transfer von der Kathode zur Anode erfolgt, hatte das "Blot-Sandwich" folgenden Aufbau:

Kathodenplatte

6x3MM Whatman-Papier (getränkt in Transferpuffer)

Trenngel

Membran

6x3MM Whatman-Papier (getränkt in Transferpuffer)

Anodenplatte

Der Transfer erfolgte bei 10 V angelegter Spannung für 45 Minuten. Nach dem gelungenen Transfer konnte man die immobilisierten Proteine durch Färben in PonceauS und abschließendem Abspülen mit Wasser sichtbar machen. Die

Markerspur wurde mit einem Skalpell abgeschnitten und zum Vergleich aufbewahrt. Die Membran wurde dann sofort in 5%ige PBS-Milch überführt und für 30 Minuten auf dem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzublocken. Danach konnte eine immunologische Färbung durchgeführt werden.

## **4.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen**

Die auf der Membran immobilisierten Proteine wurden mit einem spezifischen Erstantikörper inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem enzymgekoppelten Zweitantikörper der eine Licht- oder Farbreaktion katalysierte.

### **4.5.1 Nachweis von Proteinen mit der „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Reaktion**

Die ECL-Reaktion stellt eine Nachweismethode für Peroxidase-gekoppelte Antikörperbindung im Western Blot dar. Die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase oxidiert Luminol in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid. Das dabei angeregte Luminol fällt unter Lichtemission in den Grundzustand zurück. Das Licht ist visuell durch Auflegen eines grünlichtempfindlichen Films nachweisbar. Die benötigten Substanzen sind im ECL-Kit (Amersham Pharmacia Biotech) vorhanden.

Die Membran wurde nach dem Blocken in PBS-Milch unter Zugabe der 1:1000 verdünnten Erstantikörperlösung luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und entweder 1-2h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C auf dem Taumler inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran dreimal kurz in PBS-Puffer mit 0,1% Tween-20 und anschließend nur mit PBS-Puffer gewaschen, um unspezifische Bindungen wieder zu lösen. Die Inkubation mit dem 1:1000 verdünnten Zweitantikörper erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBS-Puffer gewaschen. Das ECL-Kit enthält zwei Lösungen, die die Lichtemission ermöglichen, wenn sie zusammen auf die Membran gegeben werden. Durch Auflegen, anschließender Entwicklung und Fixierung eines grünlichtempfindlichen Filmes (ECL-Hyperfilm, Amersham) in der

Dunkelkammer wurde die Lichtreaktion dokumentiert und mit einem Fluoreszenzimager quantifiziert.

#### **4.6 Ex-Vivo-Stimulationsmessung von T- Gedächtniszellen aus Vollblut: Vollblutassay**

(modifiziert nach Suni et al. 1998; Becton Dickinson™)

Der Vollblutassay dient zum quantitativen Nachweis antigenspezifischer, zytokinproduzierender T-Gedächtniszellen direkt aus Vollblut. Dazu wurde venöses Blut mit einem Antigen und kostimulierenden Antikörpern (anti-CD28 und anti-CD49d) für zwei Stunden inkubiert. Um die Zytokinsekretion zu verhindern, wurde dann Brefeldin A zugefügt. Nach weiteren vier Stunden Inkubation wurde EDTA zugegeben, um die Aktivierung zu beenden. Durch die Zugabe der "BD™ FACS-Lysing Solution" wurden schließlich simultan die Erythrozyten lysiert und die Leukozyten fixiert. Durch Saponinzugabe wurden die Zellen permeabilisiert. Nach einem Waschriff konnten die Zellen dann mit Antikörpern gegen Oberflächenantigene und intrazellulär gelegene Zytokine gefärbt werden. Nach Waschen und Fixieren wurden die Zellen mittels Durchflußzytometrie analysiert.

##### **4.6.1 Aktivierung der T-Gedächtniszellen im Vollblut**

Das aus einer Armvene entnommene Blut wurde mit Natrium-Heparin versetzt, da EDTA als Antikoagulant die Aktivierbarkeit der Lymphozyten beeinträchtigt. Um eine vollständige Aktivierung der Lymphozyten zu erreichen, wurde das Antigen mit den kostimulierenden Antikörpern anti-CD28 und anti-CD49d (Klon L293 und Klon L25.3 BD™ Heidelberg, Deutschland) mit einer Endkonzentration von 1µg/ml eingesetzt und in das Vollblut gegeben. Pro Stimulationsansatz wurden 450µl Vollblut eingesetzt. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation in 15 ml-Polypropylenröhrchen mit lose aufliegendem Deckel bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Danach wurde 10µg/ml BrefeldinA zugesetzt. Dadurch wurde der Golgi-Apparat der Zellen gehemmt und eine Zytokinsekretion verhindert. Nach weiteren vier

Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Stimulierung mit 2mM EDTA abgestoppt und die Zellen von der Plastikoberfläche gelöst. Hierzu wurden die Zellen nach der EDTA-Zugabe mindestens 10s durchmischt. Nach zehninütiger Inkubation bei Raumtemperatur, wurde nach erneutem Durchmischen "BD™ FACS-Lysing Solution" (9 ml/ ml Vollblut) zugegeben. Diese diente zur Lyse der Erythrozyten und Fixierung der Leukozyten bei Raumtemperatur für 10 min. Nach Waschen mit FACS-Puffer wurden die Zellen abzentrifugiert (1200rpm, Heraeus Megafuge 1.0R).

#### 4.6.2 Färbung der T-Gedächtniszellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern

##### **Kostimulierende Antikörper:**

anti-CD28/anti-CD49d 1:10-Verdünnung in sterilem PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>, ohne Ca<sup>2+</sup>); Lagerung bei 4°C

##### **BrefeldinA-Lösung:**

5mg BFA /1ml DMSO (Lagerung bei -20°C) werden direkt vor Gebrauch 1:10 in sterilem PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>, ohne Ca<sup>2+</sup>) verdünnt

##### **EDTA-Lösung:**

20mM EDTA in sterilem PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>, ohne Ca<sup>2+</sup>) pH 7,2-7,4 (NaOH)

##### **FACS Lysing Solution (10x):**

Die Lösung enthält Diethylenglykol und Formaldehyd, vor Gebrauch muss sie 1:10 mit FACS Puffer verdünnt werden

##### **FACS-Puffer:**

5% FCS (v/v)  
0,07% NaN<sub>3</sub>(w/v)  
0,5% BSA (w/v)  
in sterilem PBS (ohne Mg<sup>2+</sup>, ohne Ca<sup>2+</sup>)

##### **Saponin-Lösung:**

0,1% Saponin(w/v) in FACS-Puffer

**Fixierlösung „FACS-Fix“:**

8,5 g NaCl

10 g Paraformaldehyd (1%)

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> ad 1000ml, pH 7,4 (NaOH)

Als Stimulationsmarker von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten dienten IFN- $\gamma$ - und CD69-Expression. Die IFN- $\gamma$  wird von antigenspezifisch stimulierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen exprimiert. CD69 ist ein früher Stimulationsmarker, der von vielen antigenreaktiven Zellen exprimiert wird, neben T-Zellen auch von NK-Zellen, Makrophagen und B-Zellen. Eine gleichzeitige Färbung von IFN- $\gamma$  und CD69 erhöht somit die Spezifität des Vollblutassays. Pro Stimulationsansatz wurden zwei Dreifachfärbungen durchgeführt. Die fixierten Leukozyten wurden mit 2ml 0,1% Saponinlösung für 10 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach Waschen in FACS-Puffer wurden die Antikörper im Überschuss zugegeben: anti-CD4 oder anti-CD8 (Klon SK3 oder SK1, PerCP-markiert, Becton Dickinson™), anti-IFN- $\gamma$  (Klon 4S.B3, FITC-markiert, Pharmingen) und anti-CD69 (Klon L78, PE-markiert, Becton Dickinson™). Die Zellen wurden für 30 min im Dunkeln gefärbt, anschließend mit 3ml FACS-Puffer gewaschen und abzentrifugiert (1200rpm, Heraeus). Nach Fixieren der Zellen in 100-200 $\mu$ l Fixierlösung konnten sie im FACScan (Becton Dickinson™) analysiert werden.

**4.7 Aufnahme von Proteinen durch Jurkat-T-Zellen bei 4°C und bei 37°C**

Zur Analyse der Aufnahme von Versuchsproteinen durch Jurkat T-Zellen wurden je 100 $\mu$ l einer 5x10<sup>6</sup> Jurkat T-Zellen/ml Suspension (1640 RPMI mit 10%FCS und Penicillin und Streptomycin) auf Versuchsröhrchen verteilt. Der Versuch wurde sowohl bei Körpertemperatur (37°C) als auch bei 4°C durchgeführt. Die Ansätze der 4°C Versuchsgruppe wurden zum Abkühlen kurz auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Versuchsprotein in entsprechender Temperatur zugegeben und die Ansätze mit einem Vortex gründlich gemischt. Zur Inkubation wurden die Ansätze für 60 min in den 4°C-Kühlschrank oder 37°C-Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Ansätze durch dreifaches Spülen und

Abzentrifugieren gewaschen und von überschüssigem Protein gereinigt. Die Analyse der Aufnahme erfolgte dann durchflußzytometrisch. Als Reporter der Aufnahme diente die Eigenfluoreszenz des EGFP-Fusionsteils des Proteins.

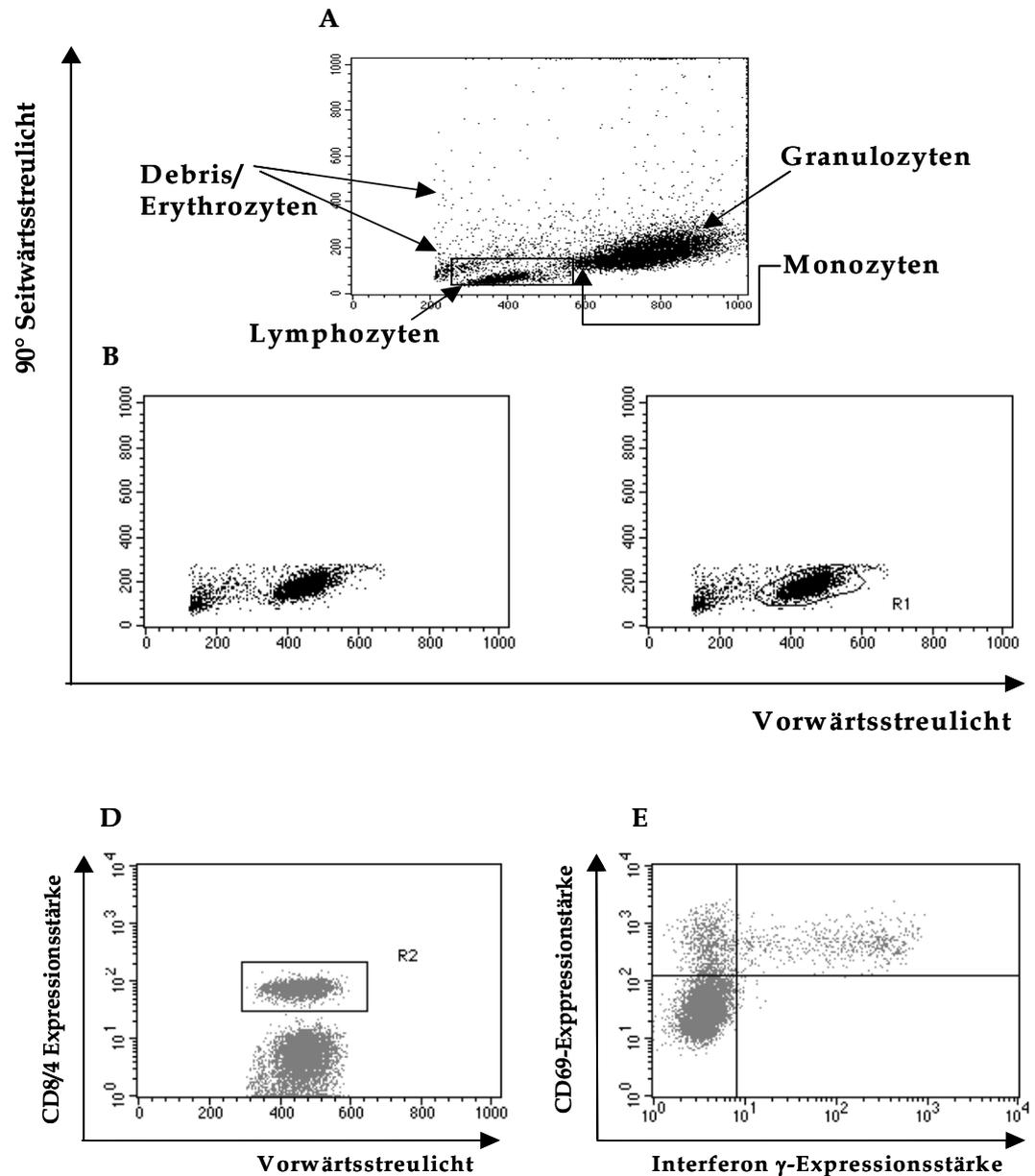
#### 4.8 Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)

Die Durchflußzytometrie bzw. FACS-Analyse ("fluorescence activated cell sorting") ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften. Während des Messvorgangs werden die Zellen durch Überdruck in einem dünnen Rohr stark beschleunigt, so dass sie beim Eintreten in die Messkammer vereinzelt und am Messpunkt fokussiert werden (*hydrodynamische Fokussierung*). Durch gleichzeitige Messung des Vorwärts- und des 90°-Seitwärtsstreulichtes wird die relative Zellgröße und die relative Granularität von jeder Zelle einzeln bestimmt, die beide direkt mit der Streulichtintensität korrelieren. Werden die zu untersuchenden Zellen mit Fluoreszenzfarbstoff-konjugierten Primär- oder Sekundärantikörpern markiert, erfolgt durch einen Argon-Laser, der Licht mit einer Wellenlänge von 488nm generiert, eine Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe. Das emittierte Licht kann über ein optisches System gemessen werden. Zur Beurteilung der Ergebnisse wurde das Histogramm bzw. das Punkt-Wolkendiagramm der Fluoreszenzen 1 (FL1) für FITC (Fluorescein-isothiocyanat) oder EGFP (enhanced green fluorescent protein), Fluoreszenz 2 (FL2) für PE (Phycoerythrin) und Fluoreszenz 3 (FL3) für PE-Cy5 (Phycoerythrin mit kovalent gebundenem Cyanin 5) verwendet. Die Messung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des CellQuest™ Programms Version Mac AppR 3.0.1. am FACScan (Becton Dickinson).

##### 4.8.1 Auswertung der FACS-Daten

Die Blutzellen gliedern sich beim Auftragen von Vorwärtsstreulicht gegen Seitwärtsstreulicht im Punkt-Wolken-Diagramm in klar abgrenzbare Populationen aus Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten (vgl. Abb. 4.1). Zelldebris und Erythrozyten lassen sich ob ihrer starken Seitwärtsstreuung bei geringer

Vorwärtsstreuung leicht abgrenzen. Das so gewonnene Übersichtsbild würde jedoch das Maß an verarbeitbarer Information überschreiten, weshalb man den auszuzählenden Bereich auf das für Lymphozyten zu erwartende Streulichtmuster eingrenzt. Ein um diese Population gelegter Rahmen definiert ihn. Hier erfasste Zellen können nun anhand der gebundenen und spezifisch fluoreszierenden Antikörper in weitere Populationen differenziert werden. Ein CD8 oder CD4 Antikörper (vgl. 2.6.) ermöglicht es die unterschiedlichen T-Lymphozyten-Populationen abzugrenzen (R2) und alle in dem Bereich von R2 enthaltene Zellen auf ihre Zytokin- und Oberflächenproteinexpression zu untersuchen. Um eine aussagekräftige Menge zu erhalten, wurden bei Stimulationsversuchen mindestens 25.000 Zellen in diesem Bereich analysiert, bei Aufnahmeversuchen mindestens 10.000 Zellen.



**Abb. 4.1. FACS Auswertung:** Die Gesamtheit der Messergebnisse (A) kann entsprechend ihrer Eigenschaften (Größe/Vorwärtsstreulicht und Granularität/Seitwärtsstreulicht) den verschiedenen Blutzellgruppen zugeordnet werden. Der für die Untersuchung von Lymphozyten interessante Bereich (B) wird detailliert ausgezählt. Die genauere Eingrenzung kann dann mit einem flexiblen Auswahlrahmen R1 (C) geschehen. Innerhalb dieser Population lassen sich dann jeweils  $CD8^+/CD4^+$  Zellen von den Restlichen durch die Detektion der spezifische Fluoreszenz in einem weiteren Auswahlrahmen R2 abtrennen (D). Diese  $CD8^+$  oder  $CD4^+$  Lymphozyten können schließlich weitergehend auf unterschiedliche Fluoreszenzen untersucht werden (E). Anti-IFN- $\gamma$  und anti-CD69 positive, also frisch stimulierte Zellen befinden sich hier im oberen rechten Quadranten und werden ausgezählt.

## 5. Ergebnisse

Die Immunität gegen einen spezifischen Erreger wird durch eine Kombination aus zellulärer und humoraler Immunantwort vermittelt. Bei Vakzinen auf Proteinbasis werden die immunogenen Peptide vorwiegend im Kontext mit MHC II-Molekülen präsentiert. Dadurch werden überwiegend Th2-vermittelte, humorale Immunantworten induziert. Eine effiziente Präsentation von exogenen antigenen Peptiden im Kontext von MHC I-Molekülen verbessert hingegen die Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, und somit die Effizienz des zellulären Arms der Immunantwort. Eine verbesserte Präsentation von exogenen Antigenen im Kontext von MHC I-Molekülen ist daher für die Entwicklung effektiver Proteinimpfstoffe relevant.

Ein erster zentraler Schritt in der („Kreuz-“) Präsentation eines exogenen, antigenen Peptids im Kontext von MHC I-Molekülen ist die Aufnahme des Antigens in spezialisierte APC. Translokatorische Proteine und „Protein-Transduktions-Domänen“ (PTD) können wegen ihres hohen isoelektrischen Punktes eine effiziente Aufnahme in die Zellen vermitteln. An sie gekoppelte Immunogene konnten erfolgreich im Kontext von MHC I-Molekülen präsentiert werden (Schultze-Redelmeier et al. 1996, Pietersz et al. 2001). Ein mögliches translokatorisches Protein stellt das Tegumentprotein pp65 des HCMV dar (Schmolke et al. 1995, Gallina et al. 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass pp65 ohne *de novo* Synthese alleine durch Freisetzung des Virions über MHC I kreuzpräsentiert werden kann (Tabi et al. 2001). Allerdings ist die Präsentation von pp65 im Kontext von MHC I durch HCMV-infizierte DCs ineffizient (Arrode et al. 2002). Es erscheint daher wahrscheinlich, dass pp65 effizient durch nicht-HCMV-infizierte DC aufgenommen und kreuzpräsentiert wird. Pp65 verfügt mit seinem kationischen NLS potentiell über translokatorische Eigenschaften, die eine verbesserte Aufnahme in Zellen vermitteln können (siehe auch 2.2.2). Es ist bisher jedoch nicht geklärt, ob dies auch unabhängig von Virionen geschehen kann. Es sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden ob ein pp65-EGFP Fusionsprotein effizient aufgenommen wird. Die Aufnahmeeffizienz der pp65-Fusionsproteine sollte mit der Aufnahmeeffizienz etablierter Transduktions-

domänen verglichen werden. Die Eigenfluoreszenz des fusionierten EGFP sollte hierbei als Reporter dienen. Es sollte dann untersucht werden, ob rekombinantes pp65 alleine in der Lage ist HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zu stimulieren. Eine mittels Durchflußzytometrie messbare Stimulation von HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen durch rekombinantes pp65 müsste möglich sein, da pp65 ein immundominantes Antigen in der HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellantwort ist (Riddell et al. 1991, McLaughlin-Taylor et al. 1994, Beninga et al. 1995, Wills et al. 1996, Khattab et al. 1997, Gyulai et al. 2000) und 70-90% aller HCMV-spezifischen CTL aktivieren kann (Wills et al. 1996). Schließlich sollte untersucht werden, ob die Fusion von pp65 mit den etablierten Proteintransduktionsdomänen (PTD) tatPTD oder antpHD eine Steigerung der pp65-spezifische T-Gedächtniszellantwort auslösen kann.

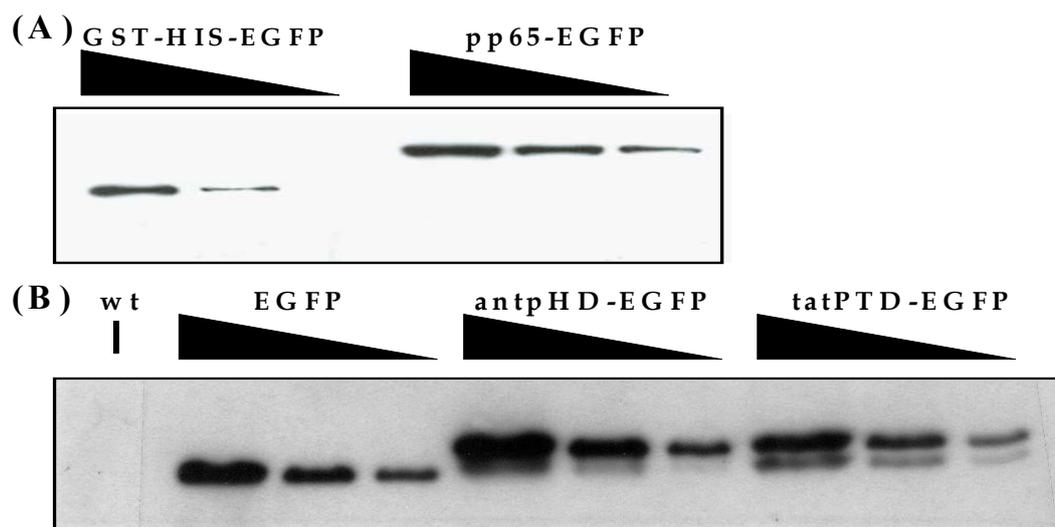
### **5.1 Expression der pp65-, PTD- und EGFP-Fusionsproteine in SF158 Zellen**

Die für die Aufnahme- und Stimulationsversuche (Vergl. 4.6 und 4.7) notwendigen Fusionsproteine sollten in Zellkulturen von *Spodoptera frugiperda* (SF158) exprimiert werden. Um dies zu ermöglichen wurden die rAcMNPV-Expressionsvektoren für pp65-EGFP, tatPTD-EGFP, antpHD-EGFP, EGFP, pp65, tatPTD-pp65 und antpHD-pp65 durch Lipofektion zusammen mit dem Baculo-Gold™ Vektor in SF158 Zellen transfiziert (Alle Vektorkonstrukte wurden freundlicherweise von Dr. Nicoletta Scheller, Institut für Virologie, Universität des Saarlandes, zur Verfügung gestellt). Die hierbei durch homologe Rekombination entstandenen Viren sind zur autonomen Vermehrung und zur Expression von Proteinen in SF158 Zellkulturen befähigt. Die sterilfiltrierten Überstände solcher Ansätze wurden nach Expansion durch Aussähen auf SF158 Zellkulturen zur Infektion von 300ml SF158 Zellen genutzt (s.a. 4.2). 54h post infectionem erfolgte die Zellernte und Lyse unter sterilen Bedingungen. Die Lysate wurden in RPMI 1640 oder PBS aufgenommen. Um eine homogene Proteinlösung zu erhalten wurden sie in einem Gefäß gesammelt und gemischt. Anschließend wurden sie aliquotiert und bei -70°C gelagert. In Western-Blot

Analysen konnten die Fusionsproteine nachgewiesen und deren Konzentrationen bestimmt werden (5.1.1 ff.).

### 5.1.1 Vergleich der Proteinlösungen auf ihren EGFP- und pp65-Gehalt mittels Western Blot Analysen

Zum Abgleichen der Konzentrationen wurden jeweils drei Verdünnungsstufen der Proteinstammlösungen von EGFP, pp65-EGFP, tatPTD-EGFP, antpHD-EGFP im Western Blot analysiert. Zur Detektion von EGFP wurde ein anti-EGFP-Antikörper (Roche) und ein anti-Maus-Fc-Antikörper eingesetzt. Die Fluoreszenz der antikörpermarkierten Proteine wurde zur Bestimmung der relativen Proteinkonzentration mit Hilfe des Vilber Lourmat BIOID V6.31-Protein-Quantifizierungs-Programms genutzt (Abb. 5.1). Als Vergleichslösung diente eine EGFP Lösung mit bekannter Stoffmengenkonzentration von 121 nM (Institut für Virologie, Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg). Tabelle 5.1 gibt die Konzentrationen der EGFP-Fusionsproteine wieder. In den nachfolgenden Experimenten wurden von den einzelnen rekombinanten Proteinen Verdünnungen in gewünschter Stoffmengenkonzentration aus diesen Stammlösungen hergestellt.



**Abb. 5.1 Quantifizierung der EGFP-Fusionsproteine:** In Western-Blot Analysen wurden pp65-EGFP (A), tatPTD-EGFP (B), EGFP (B) und antpHD-EGFP (B) in drei Verdünnungsstufen (100%, 50% und 25%) mit Antikörper gegen EGFP und einem Peroxidase-gekoppeltem Zweitantikörper detektiert. Die Stoffmengenkonzentrationen wurde anhand der Vergleichslösung GST-HIS-EGFP (121 nM) (A) densitometrisch bestimmt.

**Tab. 5.1** **EGFP-Stoffmengenkonzentration der Stammlösungen.**

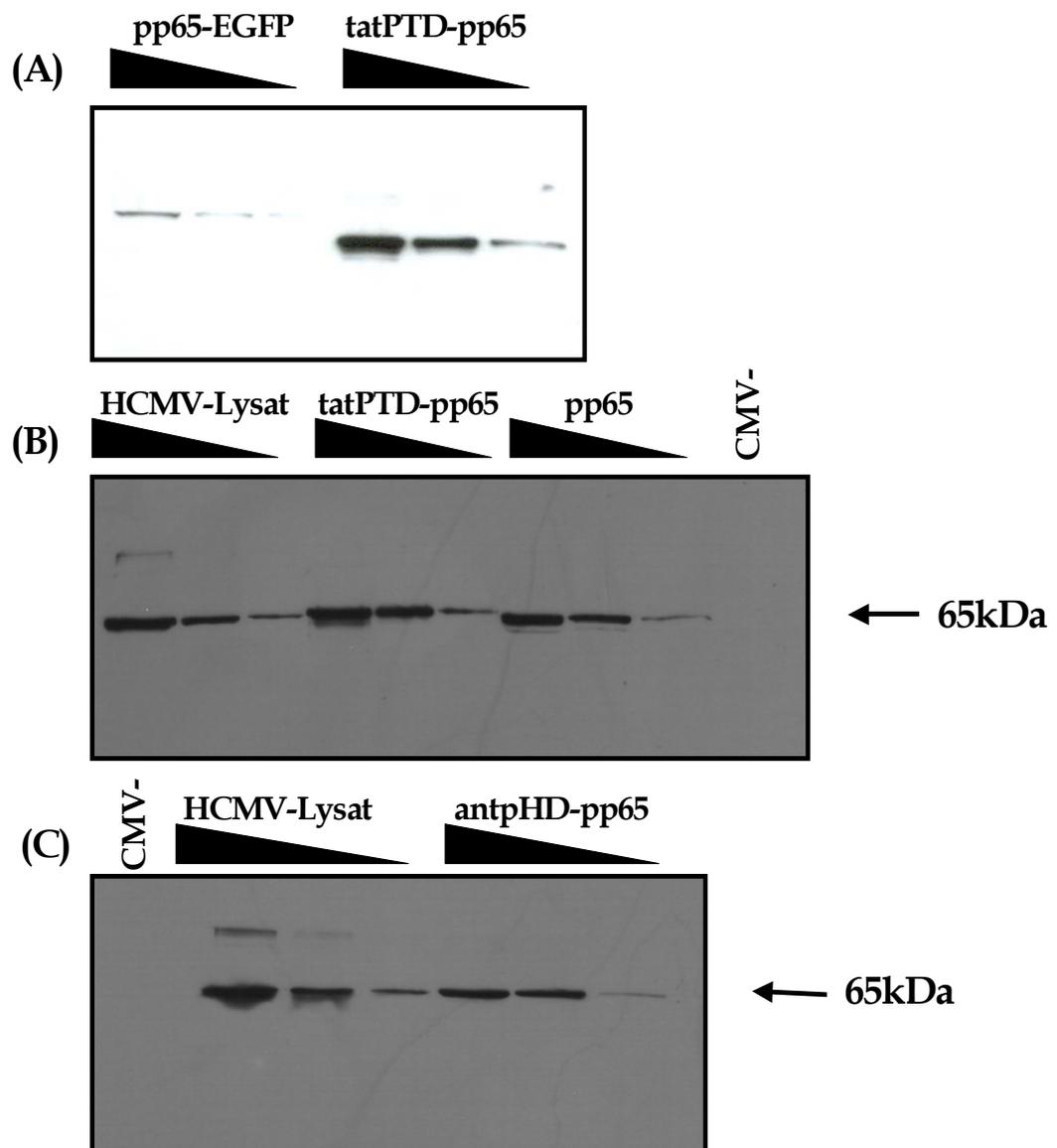
Rekombinantes Protein	nM
EGFP	219
pp65-EGFP	8
tatPTD-EGFP	313
antpHD-EGFP	99

### 5.1.2 Vergleich der Proteinlösungen auf ihre pp65-Konzentration mittels Western-Blot Analysen

Zum Abgleichen der Konzentration wurden jeweils drei Verdünnungsstufen der Proteinstammlösung von pp65, tatPTDpp65, antpHDpp65 und kommerziellem HCMV-Fibroblastenlysat im Western Blot analysiert. Zur Detektion von pp65 wurde ein anti-pp65-Antikörper (NovoCastra) und ein Peroxidase-gekoppelter anti-Maus-Fc-Antikörper eingesetzt. Die Fluoreszenz der markierten Proteine wurde zur densitometrischen Bestimmung der relativen Proteinkonzentration mit Hilfe des Vilber Lourmat BIOID V6.31-Protein-Quantifizierungs-Programmes genutzt (Abb. 5.2). Tabelle 5.2 gibt die Konzentrationen der pp65-Fusionsproteine wieder. Die pp65-Fusionsproteine wurden in entsprechenden Verdünnungen dieser Stammlösungen in den weiteren Versuchen eingesetzt.

**Tab. 5.2** **pp65-Stoffmengenkonzentration der Stammlösungen.**

Rekombinantes Protein	nM
pp65	546
antpHDpp65	293
tatPTDpp65	1845
pp65 in HCMV-Lysat	85



**Abb. 5.2 Quantifizierung der pp65-Stoffmenge der pp65-Fusionsproteinlösungen und des kommerziellen HCMV-Lysats.**

Das pp65 des HCMV-Fibroblastenlysats (B,C), pp65-EGFP (A), tatPTD-pp65 (B), pp65 (B) und antpHD-pp65 (C) wurden in Western Blot Analysen in drei Verdünnungsstufen (100%, 50% und 25%) mittels eines anti-pp65 Antikörpers und eines Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers detektiert. Die Stoffmengenkonzentrationen wurden im densitometrischen Abgleich zu 8nM pp65-EGFP (A) bestimmt.

## 5.2 Optimierung der Stimulation von HCMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen aus Vollblut

In einem zur Stimulation von HCMV-spezifischen T-Gedächtniszellen optimierten Ex-Vivo-Stimulationsassays sollte untersucht werden, ob rekombinantes pp65 zu einer effizienten Stimulation HCMV-spezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen führen kann. Außerdem sollte untersucht werden, welchen Einfluss mit pp65 fusionierte PTDs auf die Präsentation von pp65 im MHC I- und MHC II-Weg haben. Die rekombinanten in Insektenzellen exprimierten Antigene tatPTD-pp65, antpHD-pp65 und pp65 (Siehe 5.1) sollten hierzu in einem Ex-Vivo-Stimulationsassay gegenübergestellt werden (Siehe 4.8). Im Ex-Vivo-Stimulationsassay wurden 450 µl heparinisiertes Vollblut eines Probanden mit den kostimulierenden Antikörpern anti-CD28 und anti-CD49d (Endkonzentration: 1 µg/ml) und dem Immunogen für vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Zellen fixiert, gewaschen und mit anti-Interferon-γ-, anti-CD69- und wahlweise anti-CD4- oder anti-CD8-Antikörper gefärbt. Die Auswertung erfolgte schließlich durchflußzytometrisch.

Zunächst sollte nun ein geeignetes Medium und eine geeignete Antigenkonzentration zur optimierten Stimulation von HCMV-spezifischen T-Gedächtniszellen bestimmt werden.

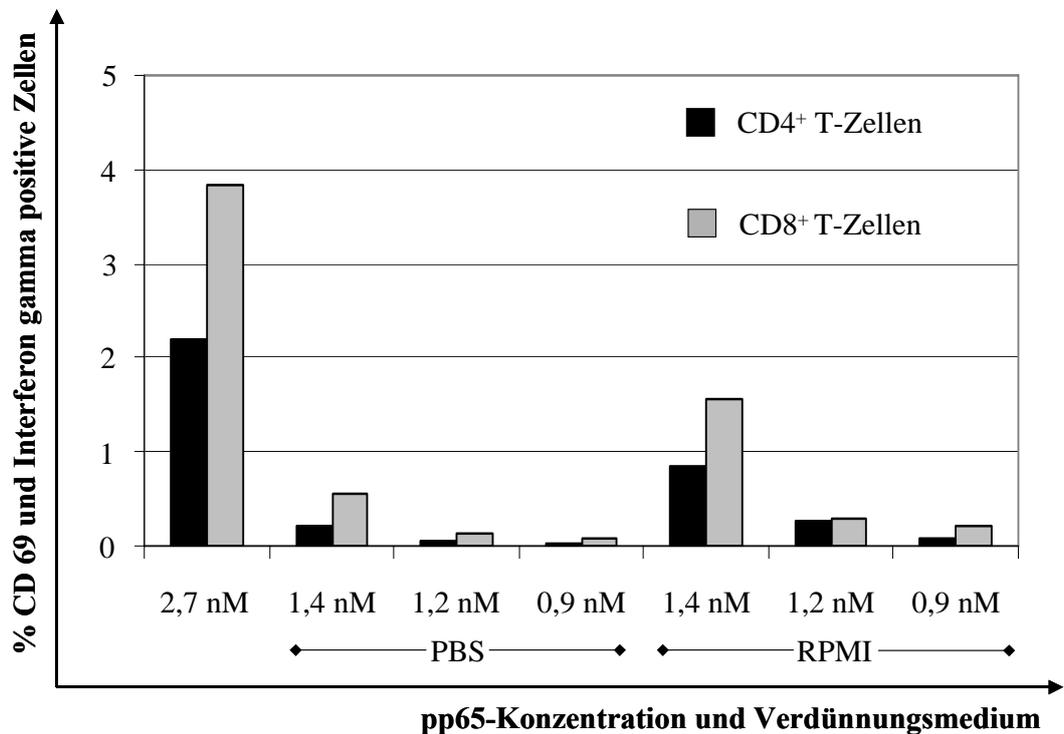
### 5.2.1 Höhere Antigenkonzentration und RPMI 1640 als Medium verbessern die Stimulation HCMV-spezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen

Um den Einfluss des Mediums und der Antigenkonzentration auf die HCMV-spezifische Stimulation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zu untersuchen, wurde Blut von einem HCMV-positiven<sup>1</sup> Probanden entnommen und mit kommerziellem, pp65-haltigem HCMV-Fibroblastenlysat (Bio Whittaker) in unterschiedlichen Konzentrationsstufen *ex vivo* stimuliert. Das kommerzielle HCMV-Fibroblastenlysat mit der pp65-Endkonzentration 2,7 nM wurde hierzu mit

---

<sup>1</sup> Bei allen untersuchten Probanden wurde der HCMV-Status durch serologische Untersuchung (IgG-Antikörper-Test, Abbot Diagnostics) verifiziert.

RPMI 1640 oder PBS auf die pp65-Endkonzentrationen 1,4nM, 1,2nM und 0,9nM verdünnt.



**Abb. 5.3 Titration von HCMV-Antigen zur optimierten Stimulation von T-Zellpopulationen eines HCMV-positiven Probanden.** 450 $\mu$ l Vollblut eines HCMV-positiven Probanden wurden mit kommerziellem HCMV-Fibroblastenlysat stimuliert. Die pp65-Endkonzentrationen in Ansätzen mit kommerziellem HCMV-Fibroblastenlysat betrug unverdünnt 2,7 nM. Die pp65-Endkonzentration wurde wahlweise durch Zugabe von RPMI 1640 und PBS auf 1,4 nM, 1,2 nM und 0,9 nM verdünnt. Der Anteil stimulierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen ist in Abhängigkeit der Antigenkonzentration und des eingesetzten Mediums aufgetragen.

Das in RPMI 1640 gelöste HCMV-Antigen führte bei allen pp65-Konzentrationsstufen zu einer besseren Stimulation als das in PBS gelöste Antigen. Die Frequenz stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen war in den Ansätzen mit RPMI 1640 um bis zu 540% und die Frequenz stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen um bis zu 285% größer als in den gleichkonzentrierten Ansätzen mit PBS. Die effizienteste Stimulation wurde mit unverdünntem HCMV-Fibroblastenlysat erreicht (2,2% CD4<sup>+</sup> T-Zellen/ 3,8% CD8<sup>+</sup> T-Zellen; Abb. 5.3). Bei sinkender Antigenkonzentration sank sowohl in den Ansätzen mit PBS als auch in den Ansätzen mit RPMI 1640 die Frequenz stimulierter T-Gedächtniszellen. Für die nachfolgenden Versuche wurden daher die rekombinant in Insektenzelllinien hergestellten Antigene konzentriert und in RPMI 1640 gelöst eingesetzt.

### 5.2.2 Zur Stimulation HCMV-spezifischer CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen genügen 4,4nM pp65, antpHD-pp65 und tatPTD-pp65

Ziel des Versuchs war es, zu bestimmen, bei welcher Antigenkonzentration sowohl pp65, als auch antpHD- und tatPTD-pp65 eine zuverlässige Stimulation HCMV-spezifischer T-Gedächtniszellen erreicht. Neben drei HCMV-positiven Probanden (Abb. 5.4, Tab. 5.3) wurde bei zwei HCMV-negativen Probanden die Frequenz der stimulierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen gemessen (Abb. 5.4). Als Medienkontrolle wurde RPMI 1640 ohne Antigen eingesetzt, als Expressionssystemkontrolle diente das Lysat von Wildtypvirus *Autographa californica* Polyhedrosisvirus-infizierten SF158 Zellen. Pp65 wurde in den Endkonzentrationen 2,2nM, 4,4nM, 8,8nM, 22nM und 44nM, TatPTD-pp65 in den Endkonzentrationen 4,8nM, 9,6nM, 19nM, 48nM und 91nM und antpHD-pp65 in den Endkonzentrationen 1,1nM, 2,2nM, 4,4nM, 11nM und 22nM zur Stimulation eingesetzt. Es wurden jeweils vier der fünf Antigenkonzentrationsstufen pro Proband eingesetzt. In drei Ansätzen erreichten die ausgezählten Zellen nicht die minimal erforderliche Anzahl auswertbarer Zellen (s.a. 4.8.1). Sie wurden nicht zur Auswertung herangezogen.

Bei beiden HCMV-seronegativen Probanden stimulierten pp65, antpHD-pp65, tatPTD-pp65 weder CD4<sup>+</sup> noch CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 5.4). Die Stimulation der drei HCMV-seropositiven Probanden durch pp65, antpHD-pp65 und tatPTD-pp65 erreichte eine Frequenz von 0,1% bis 0,6% stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Tab. 5.3). Die Frequenz stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen war bei allen drei Probanden vergleichbar und stieg auch bei deutlich höheren Antigenkonzentrationen nicht weiter an. Bei einem Probanden war die Frequenz stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen in allen drei höchstkonzentrierten Ansätzen am niedrigsten. Bereits 4,4nM pp65, antpHD-pp65 und 4,8nM tatPTD-pp65 konnten HCMV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zuverlässig stimuliert werden.

Bezüglich der Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zeigte sich, dass eine deutlichen Variabilität sowohl zwischen den drei eingesetzten Immunogenen pp65, tatPTD-pp65 und antpHD-pp65, als auch interindividuell bestand

(Abb.5.4). Bereits mit den niedrigsten eingesetzten Endkonzentrationen von 2,2nM pp65, 1,1nM antpHD-pp65 und 4,8nM tatPTD-pp65 konnten HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen messbar stimuliert werden. Bei einem Probanden stagnierte allerdings zwischen den beiden höchsten Konzentrationsstufen von tatPTD-pp65 und pp65 die Frequenz der stimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 5.4). Die Frequenz stimulierter HCMV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen nahm mit steigender Antigenkonzentration von pp65 und tatPTD-pp65 meist zu. Bei Stimulation mit 11nM und 22nM antpHD-pp65-Endkonzentration fiel oder stagnierte hingegen bei allen drei Probanden die Frequenz stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Bei Stimulation mit 4,4nM antpHD-pp65 wurde bei zwei Probanden die maximale Stimulation erreicht. Da auch pp65 und tatPTD-pp65 bei einer Endkonzentration von 4,4nM respektive 4,8nM HCMV-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zuverlässig stimulierten, wurde in den folgenden Stimulationsversuchen 4,4 nM Antigen eingesetzt.

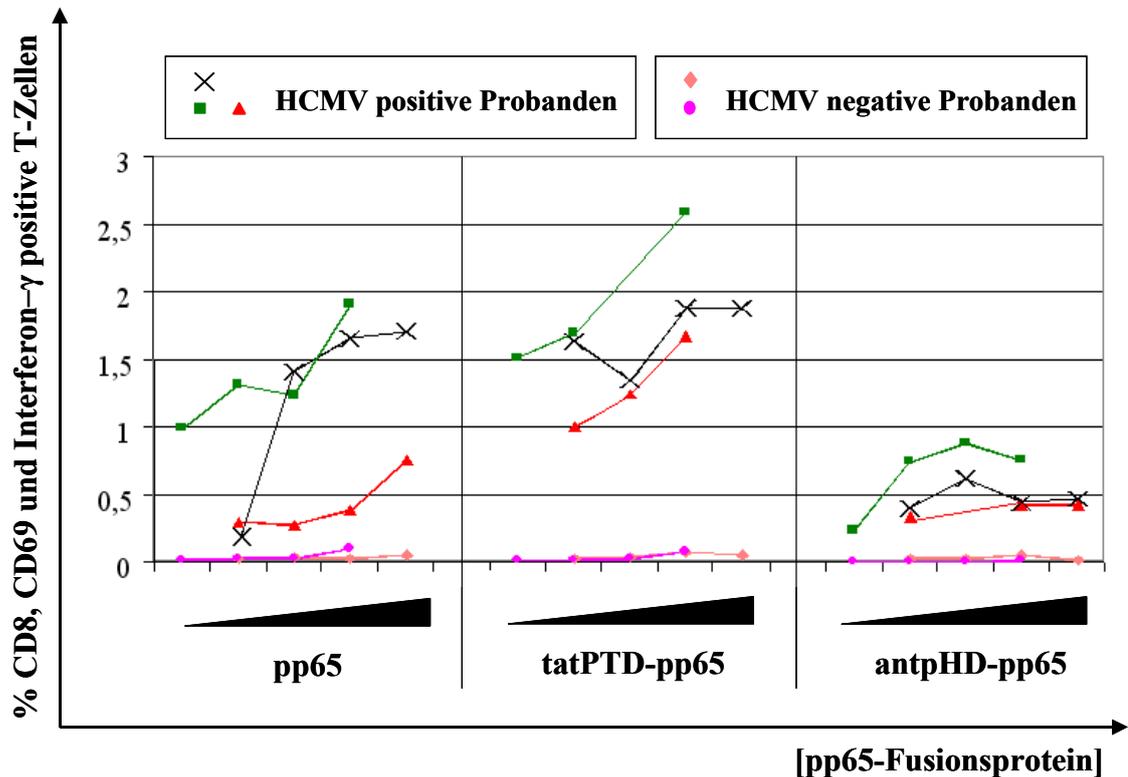


Abb. 5.4 Antigenlösung einer Konzentration von 4,4/4,8nM stimuliert zuverlässig CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. Es sollte eine Antigenendkonzentration bestimmt werden, bei der es zu einer zuverlässigen Stimulation HCMV-spezifischer T-Gedächtniszellen kommt. Hierzu wurden pp65 (2,2 - 44 nM), tatPTD-pp65 (4,8 - 91nM) und antpHD-pp65 (1,1 - 22nM) zur Stimulation im Ex-Vivo-Stimulationsassay eingesetzt. Es wurden drei HCMV-positive Probanden und zwei HCMV-negative Probanden stimuliert. Die Frequenz stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist in Abhängigkeit von Proband, eingesetztem Antigen und Antigenendkonzentration als verbundene Punktlinie dargestellt.

Tab. 5.3 Titration der Stimulation von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch pp65-Fusionsproteine.

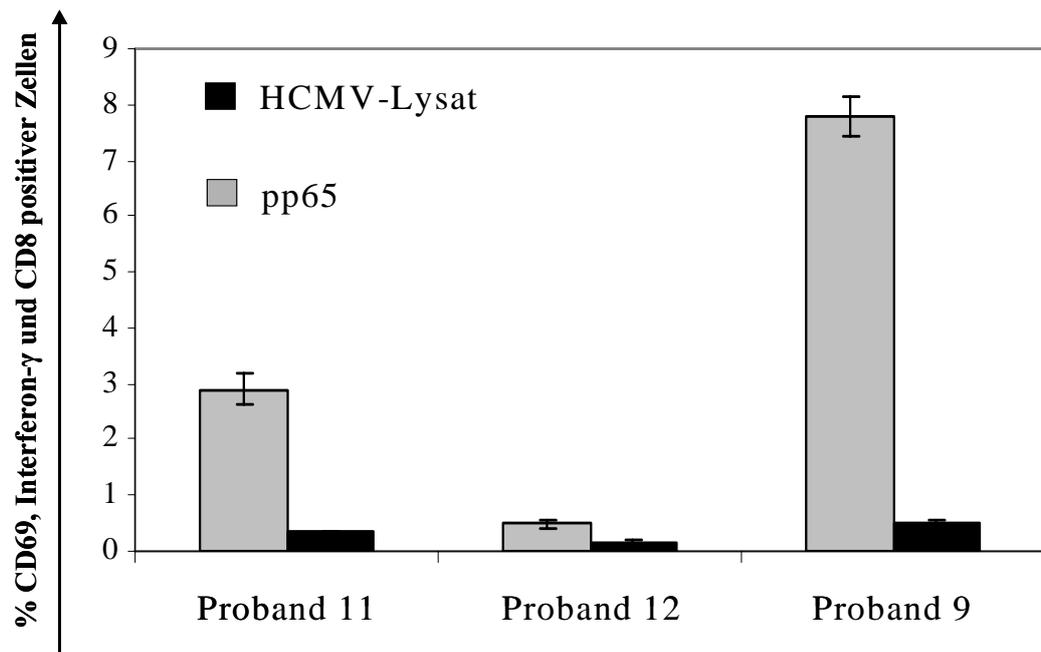
Antigen	[nM]	Frequenz stimulierter CD8 <sup>+</sup> T-Zellen [%]			Frequenz stimulierter CD4 <sup>+</sup> T-Zellen [%]		
		■	▲	x	■	▲	x
pp65	2,2	1,0	-	-	0,1	-	-
	4,4	1,3	0,3	0,2	0,2	0,5	0,1
	8,8	1,2	0,3	1,4	0,1	0,6	0,2
	22	1,9	0,4	1,7	0,2	0,5	0,1
	44	-	0,8	1,7	-	0,3	0,1
tatPTD-pp65	4,8	1,5	-	-	0,1	-	-
	9,6	1,7	1,0	1,6	0,1	0,6	0,3
	19	-	1,2	1,4	0,1	0,5	0,1
	48	2,6	1,7	1,9	0,1	0,5	0,1
	91	-	-	1,9	-	0,3	0,2
antpHD-pp65	1,1	0,2	-	-	0,1	-	-
	2,2	0,7	0,4	0,3	0,2	0,4	0,1
	4,4	0,9	0,6	-	0,1	0,5	0,1
	11	0,8	0,5	0,4	0,1	0,4	0,1
	22	-	0,5	0,4	-	0,4	0,1

### 5.3 **Rekombinantes, in SF158 Zellen exprimiertes pp65 stimuliert CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen genauso effektiv wie HCMV-Fibroblastenlysat**

Ein mögliches translokatorisches Protein stellt das Tegumentprotein pp65 des HCMV dar (Siehe 2.2.2). Als ein immundominantes Antigen des HCMV spielt es eine zentrale Rolle in der HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T Zell-Antwort (Riddell et al. 1991, McLaughlin-Taylor et al. 1994, Beninga et al. 1995, Wills et al. 1996, Kern et al. 1997, Gyulai et al. 2000). Es konnte bereits gezeigt werden, dass pp65 ohne *de novo* Synthese alleine durch Freisetzung des Virions über MHC I kreuzpräsentiert werden kann (Tabi et al. 2001). Es ist bisher allerdings nicht geklärt, ob dies auch unabhängig von Virionen geschehen kann. In diesem Versuch sollte daher untersucht werden, ob rekombinantes, in Insektenzelllinien exprimiertes pp65 im Vergleich zu virionhaltigem HCMV-Antigen in der Lage ist sowohl HCMV-spezifischer CD4<sup>+</sup>, als auch CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zu stimulieren. In einem Ex-Vivo-Stimulationsassay (Siehe 4.8) wurde daher ein kommerzielles HCMV-Fibroblastenlysat (Bio Whittaker) dem rekombinanten pp65 gegenübergestellt.

Vollblut dreier HCMV-seropositiver Probanden wurden mit rekombinantem pp65 oder mit kommerziellem HCMV-Lysat einer pp65-Konzentration von 4,4nM (Vgl. 5.1.2) stimuliert. Für beide Immunogene wurden je Proband drei verschiedene Ansätze gemessen. Als Medienkontrolle wurde RPMI 1640 ohne Antigen eingesetzt, als Expressionssystemkontrolle des rekombinanten pp65 diente das Lysat von Wildtypvirus *Autographa californica* Polyhedrosisvirus infizierten SF158 Zellen. Nicht-infiziertes Fibroblastenlysat diente als Expressionssystemkontrolle des kommerziellen HCMV-Fibroblastenlysats.

Rekombinantes pp65 konnte bei allen drei Probanden zuverlässig HCMV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen stimulieren. Allerdings stimuliert das Virionen enthaltende, kommerzielle HCMV-Fibroblastenlysat CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen bei allen drei Probanden effizienter als rekombinantes pp65 (Abb. 5.5, Tab 5.3). pp65 stimulierte nur einen relativen Anteil von 7-29% der von kommerziellem HCMV-Fibroblastenlysat stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen.

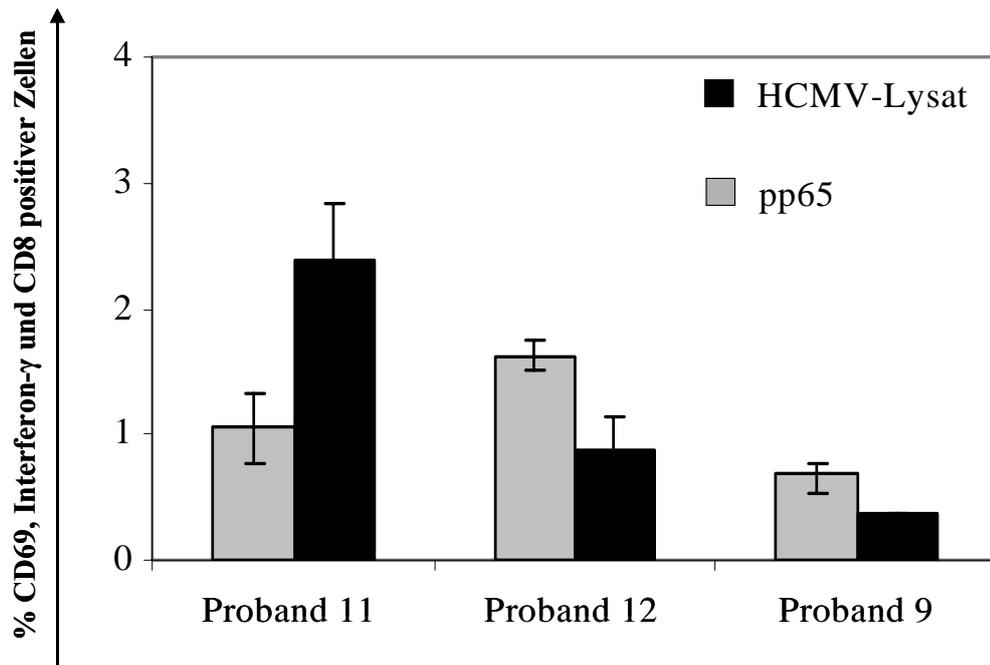


**Abb. 5.5** Rekombinantes pp65 stimuliert verglichen mit kommerziellem HCMV-Fibroblastenlysat einen geringeren Anteil der HCMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. Im Ex-Vivo-Stimulationsassay wurde die HCMV-spezifische Stimulation der CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen dreier Probanden durch HCMV-Fibroblastenlysat oder rekombinantes pp65 gemessen. Die Frequenz stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist als Balken für beide Antigene in Abhängigkeit des Probanden dargestellt.

**Tab. 5.3** Stimulation der HCMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen durch HCMV-Fibroblastenlysat oder rekombinantes pp65. Frequenz der Interferon-γ und CD69 positiven Lymphozyten an allen Zellen im CD4<sup>+</sup> Lymphozyten Gate. Je Antigen wurden drei Ansätze gemessen. Angegeben ist der Mittelwerte der drei Ansätze und das Verhältnis der Frequenzen der durch pp65 oder HCMV-Fibroblastenlysat stimulierten Zellen.

	HCMV	pp65	pp65/HCMV
Proband 9	7,71%	0,51%	7%
Proband 11	2,9%	0,33%	11%
Proband 12	0,49%	0,14%	29%

Im Gegensatz hierzu (Vgl. Abb.5.5) werden HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen von rekombinantem pp65 effizient stimuliert (Abb. 5.6, Tab 5.4). Rekombinantes pp65 übertraf HCMV-Fibroblastenlysat sogar bei einem Probanden um das zweifache. Lösliches, rekombinantes pp65 stimuliert HCMV-spezifische T-Gedächtniszellen also unabhängig von Virionen zuverlässig. HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen werden von rekombinantem pp65 ebenso effektiv wie von virionhaltiges HCMV-Fibroblastenlysat stimuliert.



**Abb. 5.6** Verglichen mit HCMV-Fibroblastenlysat stimuliert rekombinantes pp65 effizient CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. Im Ex-Vivo-Stimulationsassay wurde die Stimulation HCMV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen dreier Probanden durch HCMV-Fibroblastenlysat oder rekombinantes pp65 gemessen. Je Antigen wurden drei Ansätze gemessen. Der Mittelwert der Frequenzen stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist als Balken für beide Antigene in Abhängigkeit des Probanden dargestellt.

**Tab. 5.4** Stimulation der HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen durch HCMV-Fibroblastenlysat oder rekombinantes pp65. Frequenz der Interferon-γ und CD69 positiven Lymphozyten an allen Zellen im CD8<sup>+</sup> Lymphozyten Gate. Je Antigen wurden drei Ansätze gemessen. Angegeben ist der Mittelwerte der drei Ansätze und das Verhältnis der Frequenzen der durch pp65 oder HCMV-Fibroblastenlysat stimulierten Zellen.

	HCMV	pp65	pp65/HCMV
Proband 9	0,68%	0,37%	54%
Proband 11	1,05%	2,37%	225%
Proband 12	1,6%	0,87%	54%

#### 5.4 pp65-EGFP wird effizienter als tatPTD-EGFP oder antpHD-EGFP in Jurkat T-Zellen aufgenommen

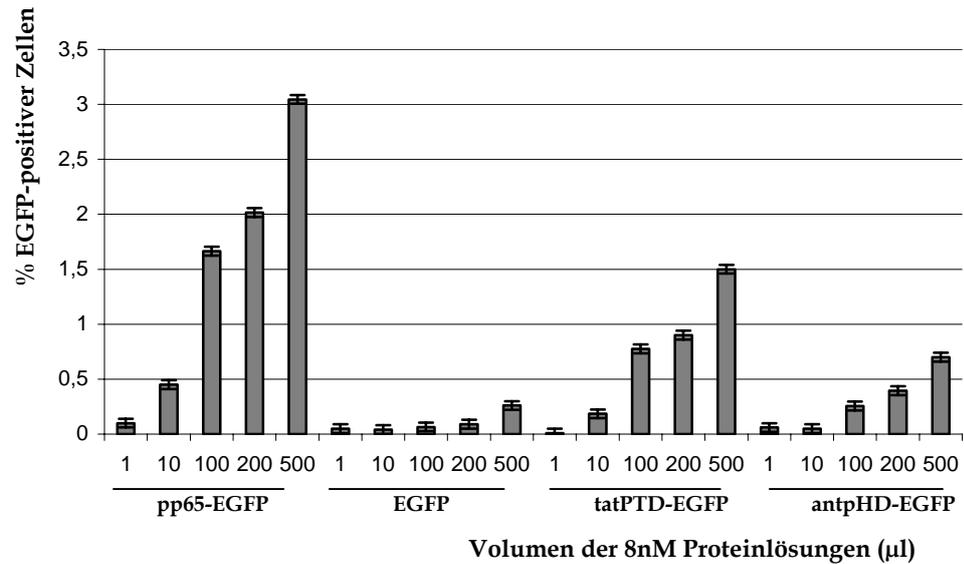
Die effiziente Aufnahme eines Antigens in spezialisierte APC ist ein zentraler Schritt in der Kreuzpräsentation eines exogenen antigenen Peptids im Kontext von MHC I-Molekülen. Translokatorische Proteine und „Protein-Transduktions-Domänen“ (PTD) können eine effiziente, rezeptorunabhängige Aufnahme in humane Zellen vermitteln (Vives et al. 1997 (1+2), Derossi et al. 1996, Schultze-Redelmeier et al. 1996, Pietersz et al. 2001). Mit ihrem polykationischen NLS stellt das Tegumentprotein pp65 des HCMV ein potentielles translokatorisches Protein dar (Schmolke et al. 1995, Gallina et al. 1996). Es sollte daher in diesem Versuch untersucht werden, ob pp65 im Vergleich zu den etablierten PTDs antpHD und tatPTD effektiv aufgenommen wird. Ansätze zu  $5 \times 10^5$  Jurkat T-Zellen in Suspension (RPMI 1640 mit 10% FCS und Penicillin-Streptomycin) wurden hierzu mit 1, 10, 100, 200 oder 500  $\mu\text{l}$  der 8nM Proteinlösungen für eine Stunde inkubiert. Vor der Messung im FACScan<sup>TM</sup> wurden die Zellen durch drei Spül- und Zentrifugierschritte gewaschen und von überschüssigem Protein gereinigt. Um die Genauigkeit der Messung zu verbessern, wurden jeweils zwei gleiche Ansätze gemessen und gemittelt. Zur Zählung der Zellen, die EGFP oder Fusionsprotein positiv sind, wurde die Fluoreszenz des EGFP genutzt (Vgl. 4.7 und 4.8). Um zwischen aktiver Aufnahme durch Endozytose und passiver Aufnahme zu unterscheiden, wurde der Versuch sowohl bei 4°C als auch bei 37°C durchgeführt, da bei einer Versuchstemperatur von 4°C aktive Transportprozesse zum Erliegen kommen. Ein Transport in das Zellinnere findet bei dieser Temperatur energieunabhängig statt (Pastan I.H. und Willingham M.C. 1981). Als Mediumkontrolle wurde RPMI 1640 ohne rekombinante Proteine eingesetzt.

Bei beiden Temperaturen war der Anteil EGFP-positiver Zellen in den Ansätzen mit pp65-EGFP am größten und übertraf den Anteil der EGFP-positiven Zellen der Ansätze mit EGFP, tatPTD-EGFP und antpHD-EGFP. Bei 4°C erreichte pp65-EGFP bei allen eingesetzten Volumina den größten prozentualen Anteil von bis zu 3,1% EGFP-positiver Zellen (Abb. 5.7). Es wurden zweifach so viele EGFP-positive Zellen gemessen wie in den Ansätzen mit tatPTD-EGFP (bis zu 1,5%) und vierfach so viele wie in den Ansätzen mit antpHD-EGFP (bis zu 0,7%).

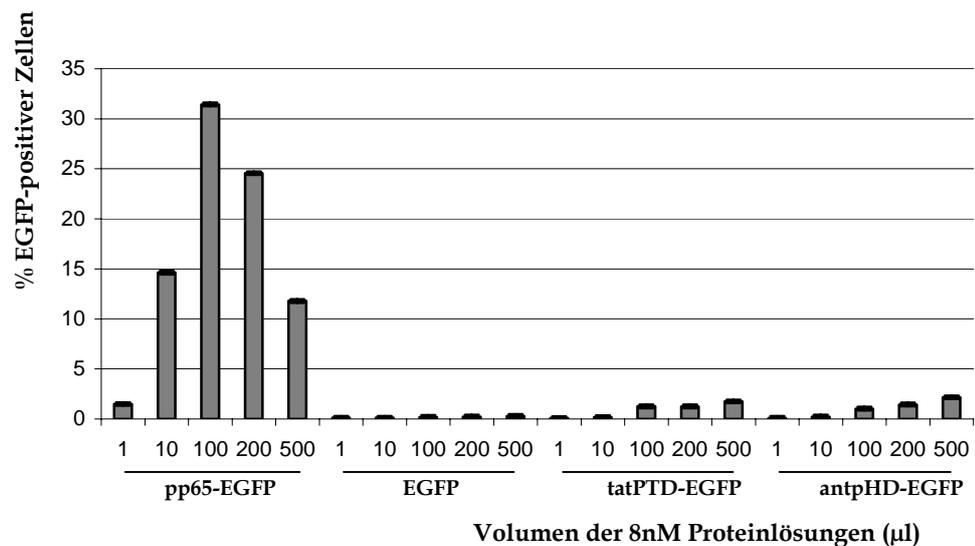
Bei tatPTD-EGFP, antpHD-EGFP und pp65-EGFP zeigte sich ein zunehmender Anteil EGFP-positiver Jurkat T-Zellen mit steigender Proteinkonzentration. Bei Transduktionsdomänen- oder pp65-gekoppeltem EGFP wurden auch bei 4°C EGFP-positive Jurkat T-Zellen gemessen. Hingegen wurde ungekoppeltes EGFP selbst bei 500µl 8nM Lösung nur in 0,3% der Zellen nachgewiesen. Bei 37°C Versuchstemperatur und 100µl 8nM Proteinlösung wurde pp65-EGFP in maximal 31% der Jurkat T-Zellen nachgewiesen (vergl. Abb.5.7). Pp65-EGFP wurde somit achtzehnfach so häufig nachgewiesen wie tatPTD-EGFP (1,8% bei 500µl 8nM Lösung) und vierzehnfach so häufig wie antpHD-EGFP (2,2% bei 500µl 8nM Lösung). Während für tatPTD-EGFP, antpHD-EGFP und EGFP mit steigender Proteinmenge eine steigenden Anzahl fluoreszenzpositiver Zellen zu messen war, erreichte pp65-EGFP bei 100µl 8nM Lösung bereits die größte Anzahl EGFP-positiver Zellen. Diese fiel mit weiter steigendem Volumen wieder ab (Abb. 5.7).

Die eingesetzten Transduktionsdomänen tatPTD und antpHD führten gegenüber ungekoppeltem EGFP zu einer Steigerung des Anteils der EGFP-positiven Jurkat-T-Zellen. EGFP konnte aber bei Weitem nicht in allen Zellen nachgewiesen werden. An pp65 fusioniertes EGFP führte auch im Vergleich zu dem an tatPTD oder antpHD fusioniertem EGFP zu einer deutlichen Zunahme der EGFP-positiven Jurkat T-Zellen, sowohl bei 4°C als auch bei 37°C.

## Versuchstemperatur: 4°C



## Versuchstemperatur: 37°C



**Abb. 5.7 pp65-EGFP wird durch Jurkat T-Zellen effizienter aufgenommen als tatPTD-EGFP, antpHD-EGFP und EGFP.** Bei diesem Versuch wurden jeweils 2 Ansätze zu je 100µl mit  $5 \times 10^5$  Jurkat T-Zellen mit 1, 10, 100, 200 und 500µl von 8nM EGFP/EGFP-Fusionsproteinen für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze von freiem Protein gereinigt und die Anzahl EGFP-positiver Zellen im FACS gemessen. Die Fluoreszenz des EGFP diente als Marker der Aufnahme. Die Exposition erfolgte für eine Gruppe bei 37°C und für die andere bei 4°C. Bei 4°C kommen aktive Transportprozesse vollständig zum Erliegen. Der Anteil EGFP-positiver Zellen ist als Balken in Abhängigkeit des eingesetzten 8nM Lösungsvolumens und EGFP-Fusionsproteins aufgetragen.

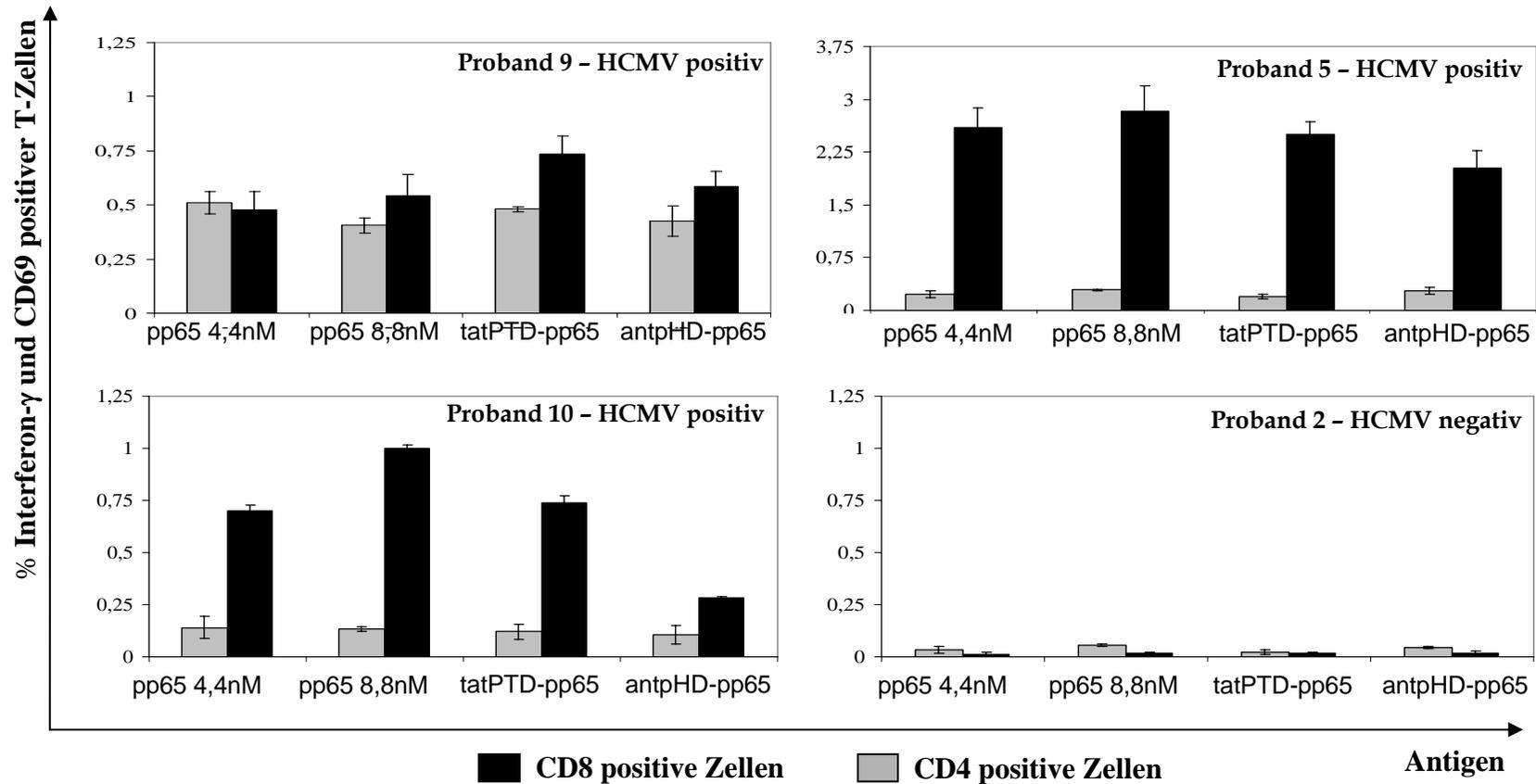
### 5.5 **Rekombinantes pp65 stimuliert HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen genauso effizient wie tatPTD-pp65 und antpHD-pp65**

Epitope von Impfstoffen auf Proteinbasis werden vorwiegend im Kontext von MHC II-Molekülen präsentiert, wodurch vor allem humorale Immunantworten induziert werden. Eine CTL-Antwort kann eher durch Kopplung an PTDs oder translokatorische Proteine hervorgerufen werden, da derartige Immunogene im MHC I-Kontext kreuzpräsentiert werden. Für antpHD und tatPTD konnte bereits eine verbesserte Präsentation von an sie fusioniertem Antigen im Kontext von MHC I gezeigt werden (Schultze-Redelmeier et al. 1996, Pietersz et al. 2001). Rekombinantes, in SF158 Insektenzellen exprimiertes pp65 wird effizient von Jurkat T-Zellen aufgenommen (Siehe 5.4) und kann zuverlässig HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen stimulieren (Siehe 5.3). In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob sich die N-terminale Fusion von pp65 an tatPTD oder antpHD positiv auf die Effizienz der Präsentation des pp65 im Kontext von MHC I auswirkt. Die in SF158 Insektenzellen exprimierten Fusionsproteine tatPTD-pp65 und antpHD-pp65 wurden hierzu im Ex-Vivo-Stimulationsassay (Siehe 4.8) dem einfach- (4,4nM) und doppelkonzentrierten (8,8nM) pp65 gegenübergestellt. Es wurden Vollblutversuchsansätze von drei HCMV-seropositiven und einem HCMV-seronegativen Probanden mit pp65, tatPTD-pp65 und antpHD-pp65 stimuliert. Je Antigen und Konzentration wurden drei gleiche Versuchsansätze gemessen und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet (Abb. 5.8). RPMI 1640 diente als Mediumskontrolle und *Autographa californica* Polyhedrosisvirus Wildtyp-Lysat als Expressionssystemkontrolle. Die Resultate sind in der Tabelle 5.5 und Abbildung 5.8 wiedergegeben.

Rekombinantes pp65 stimulierte HCMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen genauso effizient wie tatPTD-pp65 und antpHD-pp65. Die maximale Differenz der stimulierten Zellen betrug nur 20 aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen auf 25.000 ausgezählte CD4<sup>+</sup> T-Zellen und lag somit im Bereich des Messfehlers. Die Stimulation HCMV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen war bei allen HCMV-seropositiven Probanden ebenfalls zuverlässig, schwankte aber interindividuell deutlich. Rekombinantes pp65 stimulierte zwar bei einem Probanden auch in doppelter Konzentration weniger CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen als tatPTD-pp65 und antpHD-pp65. Bei einem anderen Probanden hingegen stimulierte es gleichviel und bei einem weiteren mehr CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen als tatPTD-pp65. AntpHD-pp65 wurde sogar bei beiden anderen Probanden von rekombinatem pp65 in der Stimulation der HCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen übertroffen. 4,4nM rekombinantes pp65 stimulierte HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen somit ebenso effizient wie 4,4nM tatPTD-pp65 oder antpHD-pp65.

**Tabelle 5.5** Prozentualer Anteil der durch 4,4nM pp65 (1x), tatPTD-pp65 oder antpHD-pp65 sowie 8,8nM pp65 (2x) stimulierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Gezeigt sind die Messungen der HCMV-seropositiven Probanden 5, 9 und 10.

	Proband 9		Proband 5		Proband 10	
	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>
pp65 (4,4nM)	0,51%	0,48%	0,23%	2,6%	0,14%	0,7%
pp65 (8,8nM)	0,41%	0,54%	0,29%	2,8%	0,13%	1%
tatPTD-pp65	0,48%	0,73%	0,20%	2,5%	0,12%	0,74%
antpHD-pp65	0,43%	0,58%	0,28%	2,0%	0,11%	0,28%



**Abb. 5.8 Pp65 stimuliert CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen ebenso effizient wie tatPTD-pp65 und antpHD-pp65.** Es sollte untersucht werden, ob die N-terminale Fusion einer etablierten Transduktionsdomäne an pp65 die Effizienz der Stimulation HCMV-spezifischer T-Gedächtniszellen verbessert. Hierzu wurden 450 $\mu$ l Vollblut dreier HCMV-seropositiver und eines HCMV-negativen Probanden mit 4,4nM pp65, tatPTD-pp65, antpHD-pp65 und 8,8nM pp65 im Ex-Vivo-Stimulationsassay stimuliert. Je Antigen und Konzentrationsstufe wurden drei Ansätze gemessen. Der gemittelte Anteil stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen und der gemittelte Anteil der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sind als Balken in Abhängigkeit des Antigens aufgetragen. Der Fehlerbalken gibt die Standardabweichungen wieder. Jede der vier Tafeln zeigt die Daten eines Probanden.

## 6. Diskussion

Die aktive Impfung ist eine gute und sichere Methode zur primären Prävention von Infektionskrankheiten. Ein erfolgreicher Impfstoff kann sogar zur weltweiten Ausrottung einer Infektionserkrankung führen, was am Beispiel der Pocken im Jahre 1977 gelungen ist. Erfolgreiche Impfstoffe existieren heute beispielsweise gegen die Hepatitis A und B Viren, Windpocken, Masern, Mumps und Röteln. Darüber hinaus gibt es einige Erreger gegen die noch kein effektiver Impfstoff zur Verfügung steht. Zu diesen Erregern zählen zum Beispiel HIV und HCV.

Eine gute zelluläre T-Zellantwort ist in der Immunität gegen intrazelluläre Erreger, vor allem Viren, von zentraler Bedeutung. Während inaktivierte Pathogene oder Peptidantigene meist nur schwache zelluläre T-Zellantworten induzieren, erreichen Lebendvakzine häufig eine gute zelluläre T-Zellantwort (Leclerc 2003). Um eine spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zu induzieren, ist die effektive (Kreuz-)Präsentation von Antigenen im Kontext von MHC I notwendig (De Jong et al. 2005). Ein Impfstoff sollte also eine effiziente Präsentation von Antigenen im Kontext mit MHC I ermöglichen. Proteinantigene werden allerdings vorwiegend im Kontext mit MHC II präsentiert und induzieren meist eine Th2-dominierte, humorale Immunantwort (De Jong et al. 2005). Für an Proteintransduktionsdomänen (PTD) oder translokatorische Proteine wie tatPTD und antpHD gebundene Proteinantigene konnte bereits gezeigt werden, dass sie im Kontext mit MHC I präsentiert werden und eine gute CTL-Antwort induzieren können (Kim et al. 1997, Wang et al. 2002, Tanaka et al. 2003). PTD und translokatorische Proteine verfügen über polykationische Aminosäuresequenzen, die für eine verbesserte Aufnahme in Zellen entscheidend sind (Ho et al. 2001). Das HCMV-Tegumentprotein pp65 verfügt mit seinem zweigeteiltem NLS potentiell über ähnliche Eigenschaften (Gallina et al. 1996). Es konnte bereits gezeigt werden, dass pp65 aus Virionen ohne *de novo* Synthese im Kontext mit MHC I präsentiert werden kann (Riddell et al. 1991, Tabi et al. 2001). Bisher wurde allerdings weder *in vivo* noch *in vitro* gezeigt, dass rekombinant gewonnenes pp65 alleine in der Lage ist, ohne Virionen- oder anderen HCMV-Komponenten CD8<sup>+</sup> T-Zellen spezifisch zu stimulieren.

Ziel dieser Arbeit war es, pp65 auf Eigenschaften zu untersuchen, die es als Trägersystem für Proteinantigene im Kreuzpräsentationsweg qualifizieren könnten. Zunächst sollte gezeigt werden, dass rekombinant in Insektenzelllinien exprimiertes pp65 im Vergleich zu einem kommerziellen HCMV-Fibroblastenlysat effizient HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen stimulieren kann. Weiterhin sollte die Effizienz der Aufnahme von pp65 im Vergleich zu den etablierten Proteintransduktionsdomänen tatPTD und antpHD untersucht werden. Schließlich sollte der Einfluss der mit pp65 fusionierten Transduktionsdomänen tatPTD oder antpHD auf die Präsentation von pp65 im MHC I- und MHC II-Weg untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich pp65 sowohl als T-Zellimmunogen als auch als Trägerprotein für andere Immunogene eignet und damit für die Entwicklung von Impfstoffen sehr interessante Eigenschaften besitzt: (1) Rekombinant in SF158 Insektenzellen exprimiertes pp65 stimuliert effizient HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. (2) An pp65 fusioniertes EGFP wird effizienter als mit tatPTD oder antpHD fusioniertes EGFP in Jurkat T-Zellen aufgenommen. (3) Rekombinantes pp65 stimuliert ebenso effizient wie an tatPTD oder antpHD fusioniertes pp65 HCMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen.

### **6.1 In Insektenzelllinien exprimiertes, rekombinantes pp65 stimuliert CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen zuverlässig und in gleichem Umfang wie ein HCMV-Fibroblastenlysat**

Die Dominanz des pp65 in der HCMV-spezifischen Immunantwort ist wiederholt sowohl für CD4<sup>+</sup> T-Zellepitope, als auch für CD8<sup>+</sup> T-Zellepitope gezeigt worden (Riddell et al. 1991, McLaughlin-Taylor et al. 1994, Beninga et al. 1995, Wills et al. 1996, Khattab et al. 1997, Gyulai et al. 2000). Neben pp65 können auch andere HCMV-Antigene wie IE1, pp150 und gB eine spezifische, zelluläre Immunantwort auslösen (Kern et al. 1999, Beninga et al. 1995). In dieser Arbeit stimulierte rekombinantes pp65 zuverlässig CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen. Allerdings übertraf der Anteil der durch ein kommerzielles HCMV-Fibroblastenlysat stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen bei allen drei Probanden den Anteil der durch rekombinantes pp65 stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen um das bis zu

Fünzfach (s.a. 5.3). Der größere Anteil durch HCMV-Fibroblastenlysate stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen lässt sich durch die Fülle anderer, im kommerziellen HCMV-Fibroblastenlysate ebenfalls vorhandene HCMV-Antigene erklären. Eine Immundominanz des pp65 in der HCMV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellantwort ließ sich somit nicht bestätigen (Beninga et al. 1995). Allerdings zeigten auch bei Beninga et al. (1995) zwei von fünf Probanden auf Stimulation mit gB eine stärkere CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation als auf Stimulation mit pp65.

Die HCMV-spezifische Stimulation der CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen war in der vorliegenden Arbeit hingegen bei zwei Probanden vergleichbar und bei einem Probanden durch rekombinantes pp65 besser als durch das kommerzielle HCMV-Fibroblastenlysate (vgl. 5.3). Dies bestätigt die Immundominanz des pp65 in der CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort (Wills et al. 1996., Khattab et al. 1997), und spricht für eine effiziente Präsentation des rekombinanten pp65 im Kontext mit MHC I. In der Stimulation mit HCMV-Fibroblastenlysate könnten allerdings mitaufgenommene HCMV-Proteine die effektive Präsentation von Antigen im Kontext mit MHC I behindern. HCMV-Proteine können eine Retention des MHC I im ER verursachen, den Peptidantigentransport mittels TAP blockieren, die Antigenerkennung auf der Zelloberfläche behindern und auch eine Translokation des MHC I zurück auf die Zytosolseite des Beladungskompartiments verursachen (Gilbert et al. 1993, Yamashita et al. 1993, Warren et al. 1993, Reddehase 2002). Diese als „Immunescape“ bezeichneten Mechanismen könnten ein Grund für die im Vergleich zu rekombinantem pp65 schlechtere Stimulationseffizienz des HCMV-Fibroblastenlysats sein. Rekombinant in SF158 Zellen exprimiertes pp65 ist hingegen frei von weiteren HCMV-Proteinen, die einen solchen „Immunescape“ verursachen könnten. Daher ist es als CD8 T-Zellimmunogen vielversprechend.

## 6.2 Die Aufnahme von pp65-EGFP in Jurkat T-Zellen ist effizient, energieabhängig und wahrscheinlich rezeptorabhängig

Die effiziente Aufnahme von exogenem Antigen in spezialisierte APC ist die Voraussetzung für eine Präsentation von Epitopen im Kontext mit MHC I und II. Für die Transduktionsdomänen antpHD und tatPTD wurde auf verschiedenste Weise *in vivo* und *in vitro* eine schnelle, unspezifische und rezeptorunabhängige Aufnahme in Zellen gezeigt. So konnten nach 24h sowohl in der FACS-Analyse als auch in der Fluoreszenzmikroskopie bei bis zu 90% aller Zellen ein an Transduktionsdomänen gekoppeltes Protein nachgewiesen werden (Vives et al. 1997(1), Derossi et al. 1994). Wiederholt konnte *in vivo* und *in vitro* die verbesserte Aufnahme von funktionellen, mit einer Transduktionsdomäne fusionierten Proteinen bestätigt werden (Fawell et al. 1994, Schwarze et al. 1999, Alblas et al. 2001, Caron et al. 2001, Embury et al. 2001, Peitz et al. 2002, Cao et al. 2002). Eine im Vergleich zu freiem Markerprotein EGFP effizientere Aufnahme von funktionellem, mit einer Transduktionsdomäne fusioniertem Protein bestätigte sich auch in unseren Versuchen für an tatPTD oder antpHD fusioniertes EGFP. Die Transduktionsdomänen antpHD und tatPTD können unspezifisch und rezeptorunabhängig durch ionische Wechselwirkungen ihrer polykationischen Region mit der Zellmembran (Mann et al. 1991, Vives et al. 1997(2), Ho et al. 2001, Drin et al. 2001, Christiaens et al. 2002) und mit Dextran- und Heparansulfaten (Console et al. 2003) aufgenommen werden. Eine Aufnahme über Rezeptoren zeigt jedoch in der Regel eine höhere Effizienz als eine rezeptorunabhängige Aufnahme (Arora & Lepla 1994). Es erscheint daher plausibel, dass die Aufnahme des pp65-EGFP rezeptorvermittelt ist, da sie um das 15-fache effizienter ist als die rezeptorunabhängige Aufnahme von tatPTD-/antpHD-EGFP. Eine rezeptorabhängige Aufnahme würde allerdings eine unterschiedliche Aufnahmeeffizienz des pp65 in unterschiedliche Zellen implizieren und wäre in weiteren Aufnahmeversuchen zu untersuchen. Insbesondere die Untersuchung der Aufnahme und Kreuzpräsentation von pp65 durch DCs sollte untersucht werden, da aktivierte DCs für die Induktion einer zellulären Immunantwort von zentraler Bedeutung sind (Jung et al. 2002).

In dieser Arbeit zeigte die Aufnahme des tatPTD, antpHD und pp65 gekoppelten EGFPs die Eigenschaft eines energieabhängigen Prozesses. Zwar konnten bei 4°C Versuchstemperatur EGFP-positive Zellen gemessen werden, obwohl bei dieser Temperatur energieabhängige Transportprozesse zum Erliegen kommen (Pastan & Willingham 1981). Bei 37°C nahmen jedoch deutlich mehr Jurkat-T-Zellen tatPTD-, antpHD- und pp65-EGFP auf als bei 4°C. Dies belegt die Energieabhängigkeit der Aufnahme des pp65-EGFP, wie sie bereits für die Transduktionsdomänen tatPTD, antpHD gezeigt wurde (Mann et al. 1991, Fawell et al. 1994, Richard et al. 2003). Richard et al. (2003) konnten darüber hinaus zeigen, dass tatPTD durch Endozytose aufgenommen wird. Ob dies auch für pp65 zutrifft, könnte in einem Fluorescein-Kolokalisationsversuch untersucht werden.

### **6.3 Rekombinantes pp65 wird effektiv in den MHC I-Präsentationsweg gebracht und könnte als Trägerprotein für Fremdantigen dienen**

In der Stimulation von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen aus Vollblut durch rekombinantes pp65 und mit Transduktionsdomänen fusioniertes pp65 konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Unterschied bezüglich der Stimulation der pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup> oder CD4<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen beobachtet werden (vgl. 5.5). Pp65 und seine Fusionskonstrukte konnten zuverlässig CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Gedächtniszellen stimulieren, wobei der Anteil stimulierter CD8<sup>+</sup> T-Zellen (max. 2,8%) bei allen drei Probanden und Konstrukten den der CD4<sup>+</sup> T-Zellen übertraf (max. 0,5%). Die in dieser Arbeit gezeigten Resultate (vgl. 5.3 und 5.5) unterstreichen die Bedeutung des pp65 für die Stimulation HCMV-spezifischer CTL (Wills et al. 1996) und sprechen für eine effektive Präsentation der Fusionskonstrukte und des rekombinanten pp65 im MHC I-Weg. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte die effiziente Aufnahme des pp65 durch wahrscheinlich rezeptorvermittelte Endozytose sein (vgl. 5.4., Richard et al. 2003). Sie würde es pp65 ermöglichen, direkt in den MHC I-Kreuzpräsentationsweg zu gelangen. Nach ER-vermittelter Endozytose würde sich das rezeptorgebundene pp65 in räumliche Nähe zu den in der Membran befindlichen MHC I-Antigen-Prozessierungsenzymen befinden. Es könnte daher effizient in das Zytosol transloziert, dort gespalten und nach dem Rücktransport in

das Endosom-ER-Kompartiment auf MHC I geladen werden (Houde et al. 2003, und Guermonprez et al. 2003). Eine rezeptorunabhängige Aufnahme des pp65 an einer zufälligen Stelle direkt in das Zytosol, wie sie für Transduktionsdomänen angenommen wird (Mann et al. 1991, Derossi et al. 1994, Vives et al. 1997, Ho et al. 2001, Drin et al. 2001, Christiaens et al. 2002), wäre hingegen für die Effizienz der Präsentation von pp65 über MHC I eher kontraproduktiv. Zytoplasmapeptidasen würden wegen ihrer hohen Aktivität pp65 schneller abbauen, als dass pp65-Epitope über die wesentlich langsameren TAP und den MHC I-Beladungskomplex auf MHC I geladen werden könnten (Reits et al. 2003).

Mit pp65 fusionierte antigene Peptide könnten von der effizienten Einschleusung des pp65 in den MHC I Präsentationsweg profitieren. Daher könnte pp65 potentiell als immunogenes Trägerprotein in Vakzinen dienen. Mit tatPTD oder antpHD fusioniertes pp65 wurde ebenso effizient über MHC I präsentiert wie freies pp65. Diese mit pp65 fusionierten Peptide haben in dieser Arbeit eine Präsentation von pp65-Epitopen über MHC I nicht behindert. Dies spricht dafür, dass analog zu tatPTD und antpHD (Chauhan et al. 2007), mit pp65 fusionierte antigene Peptide auf diesem Weg verbessert über MHC I präsentiert werden könnten. Da die Induktion einer zellulären Immunantwort von der Präsentation der Peptidantigene im Kontext mit MHC I auf DCs abhängt (Jung et al. 2005), müsste nun zunächst die Aufnahme und Kreuzpräsentation von pp65-Antigen Fusionsproteinen *in vitro* gezeigt werden. In einem weiteren Schritt wäre dann zu untersuchen, ob pp65-fusionierte antigene Peptide in der Lage sind *in vivo*, z.B. im Mausmodell, eine CD8<sup>+</sup> T-Zellantwort zu induzieren. Hierzu könnte z.B. OVA dienen, das normalerweise nur eine MHC II-abhängige Immunantwort induziert (Kim et al. 1997). Sollten diese Versuche positiv ausfallen, wären die Grundsteine für ein vielversprechendes immunogenes Trägersystem zur Erzeugung menschlicher Impfstoffe etabliert.

## Literaturverzeichnis

- 1) **Ackerman A.L. & Cresswell P.** (2004) Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *NATURE IMMUNOLOGY* 5: 678-684
- 2) **Ackerman A.L.**, Kyritsis C., Tampé R., and Creswell P. (2004)(2) Access of soluble antigens to the endoplasmatic reticulum can explain cross-presentation by dendritic cells. *NATURE IMMUNOLOGY* 6: 107-113
- 3) **Albert M. L.**, Pearce S. F., Francisco L. M., Sauter B., Roy P., Silverstein R. L. & Bhardwaj N. (1998). Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alphavbeta5 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. EXP. MED.* 188: 1359-1368
- 4) **Alblas J.**, Ulfman L., Hordijk P., and Koenderman L. (2001) Activation of RhoA and Rock Are Essential for Detachment of Migrating Leukocytes. *MOL. BIOL. CELL* 12: 2137-2145
- 5) **Arrode, G.**, Boccaccio, C., Abastado, J. P. & Davrinche, C. (2002). Cross-presentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8+ T cells is regulated by virus-induced, soluble-mediator-dependent maturation of dendritic cells. *J. VIROL.* 76: 142-150.
- 6) **Arora, N. & Leppla, S. H.** (1994). Fusions of anthrax toxin lethal factor with shiga toxin and diphtheria toxin enzymatic domains are toxic to mammalian cells. *INFECT IMMUN* 62: 4955-4961.
- 7) **Bachmann M. F.**, Barner M., Viola A. & Kopf M. (1999). Distinct kinetics of cytokine production and cytolysis in effector and memory T cells after viral infection. *EUR. J. IMMUNOL.* 29: 291-299.
- 8) **Babbitt B.**, Allen P.M., Matsueda G., Haber E., and Unanue E.R. (1985). Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules. *NATURE* 317: 359-361.
- 9) **Bartenschlager R.**, Frese M. & Pietschmann T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *ADV. VIRUS RES.* 63: 71-180.
- 10) **Beninga J.**, Kropff B., and Mach M. (1995) Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J.GEN.VIROL.* 76: 153-160

- 11) **Braciale T.J.**, Morrison L.A., Sweetser M.T., Sambrook J., Gething M.J. and Braciale V.L. (1987). Antigen presentation pathways to class I and class II MHC-restricted T lymphocytes. *IMMUNOL. REV.* 98: 95-114.
- 12) **Brode S. & Macary P. A.** (2004). Cross-presentation: dendritic cells and macrophages bite off more than they can chew! *IMMUNOL.* 112: 345-351
- 13) **Browne E. P. & Shenk T.** (2003). Human cytomegalovirus UL83-coded pp65 virion protein inhibits antiviral gene expression in infected cells. *P.N.A.S.* 100: 11439-11444.
- 14) **Cao G.**, Pei W., Ge H., Liang Q., Luo Y., Sharp F.R., Lu A., Ran R., Graham S.H., and Chen J. (2002) In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J. NEUROSCI.* 22: 5423-5431
- 15) **Caron N.J.**, Torrente Y., Camirand G., Bujold M., Chapdelaine P., Leriche K., Bresolin N. and Trembley J.P. (2001) Intracellular Delivery of a Tat-eGFP Fusion Protein into Muscle Cells. *MOL. THER.* 3: 310-318
- 16) **Chauhan A**, Tikoo A, Kapur AK, Singh M (2007) The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. *J. CONTROL RELEASE* 117: 148-162
- 17) **Christiaens B.**, Symoens S., Vanderheyden S., Engelborghs Y., Joliot A., Prochiantz A., Vanderkerckhove J., Rosseneu M., and Vanloo B. (2002) Tryptophan fluorescence study of the interaction of penetratin peptides with model membranes. *EUR. J. BIOCHEM.* 269: 2918-2926
- 18) **Console S.**, Marty C., Garcia-Echeverria C., Schwendener R., and Ballmer-Hofer K. (2003) Antennapedia and HIV Transactivator of Transcription (TAT) “Protein Transduction Domains” Promote Endocytosis of High Molecular Weight Cargo upon Binding to Cell Surface Glycosaminoglycans. *J.BIOL.CHEM.* 278: 35109-35114
- 19) **Cresswell P.** (1994). Assembly, transport and function of MHC class II molecules. *ANNU. REV. IMMUNOL.* 12: 259-293.
- 20) **De Jong E.C.**, Smits H.H. & Kapsenberg M.L. (2005). Dendritic cell-mediated T cell polarization. *SPRINGER SEMIN. IMMUNOPATHOL.* 26: 289-307

- 21) **Derossi D.**, Calvet S., Trembleau A., Brunissen A., Chassaing G. and Prochiantz A. (1996). Cell internalization of the Third Helix of the Antennapedia Homeodomain is receptor-independent. *J. BIOL. CHEM.* 304: 18188-18193.
- 22) **Derossi D.**, Joliot A., Chassaing G. and Prochiantz A. (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J. BIOL. CHEM.* 269: 10444-10450
- 23) **Drin G.**, Mazel M., Clair P., Mathieu D., Kaczorek M., and Temsamani J. (2001) Physico-chemical requirements for cellular uptake of pAntp peptide. *EUR. J. BIOCHEM.* 268: 1304-1314
- 24) **Eggers M.**, Bogner E., Agricola B., Kern H.F., and Radsak K. (1992) Inhibition of human cytomegalovirus by brefeldin A. *J. GEN. VIROL.* 73: 2679-2692
- 25) **Elliott G. D. & Meredith D. M.** (1992). The herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 is encoded by gene UL49. *J. GEN. VIROL.* 73: 723-726.
- 26) **Embury J.**, Klein D., Pileggi A., Ribeiro M., Jayaraman S., Molano R.D., Fraker C., Kenyon N., Ricordi C., Inverardi L. and Pastori R.L. (2001) Proteins linked to a Protein Transduction Domain Efficiently Transduce Pancreatic Islets Cells. *DIABETES* 50: 1706-1711
- 27) **Fawell S.**, Serry J., Daikh Y., Moore C., Chen L.L., Pepinsky B., and Barsoum J. (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *P.N.A.S.* 91: 664- 668
- 28) **Fonteneau J. F.**, Kavanagh, D. G., Lirvall, M., Sanders, C., Cover, T. L., Bhardwaj, N. & Larsson, M. (2003). Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells. *BLOOD* 102: 4448-4455
- 29) **Gallina A.**, Percivalle E., Simoncini L., Revello M.G., Gerna G., Milanesi G. (1996) Human Cytomegalovirus pp65 Lower Matrix Phosphoprotein Harbours Two Transplantable Nuclear Localization Signals. *J. GEN.VIROL.* 77:1151-1157

- 30) **Gilbert M.J.**, Riddell S.R., Cheng-Rong L., and Greenberg P.D. (1993) Selective Interference with Class I Major Histocompatibility Complex Presentation of the Major Immediate-Early Protein following Infection with Human Cytomegalovirus. *J. VIROL.* 67: 3461-3469
- 31) **Gotch F.**, Rothbard J., Howland K. Townsend A. and McMichael A. (1987). Cytotoxic T lymphocytes recognize a fragment of influenza virus matrix protein in association with HLA-A2. *NATURE* 326: 881-882
- 32) **Guermonez P.**, Saveanu L., Kleijmeer M., Davoust J., van Endert P. & Amigorena S. (2003) ER-Phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *NATURE* 425: 397-402
- 33) **Gyulai Z.**, Endresz V., Burian K., Pincus S., Toldy J., Cox W.I., MERIC C., Plotkin S., Gönczöl E., and Berencsi K. (2000) Cytotoxic T Lymphocyte (CTL) Responses to Human Cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in Healthy Individuals: Reevaluation of Prevalence of IE1-Specific CTLs. *J.O.INF.DIS.* 181: 1537-1546
- 34) **Harshyne L. A.**, Watkins S. C., Gambotto A. & Barratt-Boyes S. M. (2001). Dendritic cells acquire antigens from live cells for cross-presentation to CTL. *J. IMMUNOL.* 166: 3717-3723.
- 35) **Haemels M.T.** and Ploegh H. (1995). Generation, translocation and presentation of MHC class I restricted peptides. *ANNU. REV. BIOCHEM.* 64: 463-491.
- 36) **Heath, W.R.** & Carbone, F.R. (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *ANNU. REV. IMMUNOL.* 19: 47-64.
- 37) **Ho A.**, Schwarze S.R., Mermelstein S.J., Waksman G. and Dowdy S.F.(2001) Synthetic Protein Transduction Domains: Enhanced Transductional Potential in Vitro and in Vivo. *CANCER RESEARCH* 61:474-477
- 38) **Holtappels R.**, Podlech J., Pahl-Seibert M.F., Jülch M., Thomas D., Simon C.O., Wagner M., and Reddehase M.J. (2004) Cytomegalovirus Misleads Its host by Priming of CD8 T Cells Specific for an Epitope Not Presented in Infected Tissues. *J. EXP. MED.* 199: 131-136

- 39) **Houde M.**, Bertholet S., Gagnon E., Brunet S., Goyette G., Laplante A., Princiotta M.F., Thibault P., Sacks D. & Desjardins M. (2003) Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation. *NATURE* 425: 402-406
- 40) **Huang J. H.**, Getty R. R., Chisari F. V., Fowler P., Greenspan N. S. & Tykocinski M. L. (1994). Protein transfer of preformed MHC-peptide complexes sensitizes target cells to T cell cytolysis. *IMMUNITY* 1, 607-613
- 41) **Hung C. F.**, He L., Juang J., Lin T. J., Ling M. & Wu T. C. (2002). Improving DNA vaccine potency by linking Marek's disease virus type 1 VP22 to an antigen. *J. VIROL.* 76: 2676-2682
- 42) **Ish-Horowicz D.** and Burke J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. *NUCLEIC ACIDS RES.* 9: 2989-2998.
- 43) **Janeway, C.**; Travers, P.; Walport, M. & Shlomchik, M. (2001). Immunobiology; The immune system in health and disease. 5<sup>th</sup> EDITION; GARLAND PUBLISHING; NEW YORK
- 44) **Jonuleit H. & Schmitt E.** (2003). The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J. IMMUNOL.* 171, 6323-6327.
- 45) **Jung S.**, Unutmaz D., Wong P., Sano G., De los Santos K., Sparwasser T., Wu S., Vuthoori S., Ko K., Zavala F., Pamer E.G., Littman D.R., Lang R.A.(2002). In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. *IMMUNITY* 17: 211-220.
- 46) **Kaech S. M. & Ahmed R.** (2001). Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *NAT. IMMUNOL.* 2: 415-422.
- 47) **Kas-Deelen A.M.**, The T.H., Blom N., van der Strate B.W.A., De Maar E.F., Smit J., van Son W.J., Harmsen M.C. (2001) Uptake of pp65 in in vitro Generated pp65-Positive Polymorphonuclear Cells Mediated by Phagocytosis and Cell Fusion? *INTERVIROL.* 44: 8-13
- 48) **Ke Y. & Kapp J. A.** (1996). Exogenous antigens gain access to the major histocompatibility complex class I processing pathway in B cells by receptor-mediated uptake. *J. EXP. MED.* 184: 1179-1184

- 49) **Kern F.**, Surel I.P., Faulhaber N., Frömmel C., Schneider-Mergener J., Schönemann C., Reinke P. and Volk H.-D. (1999). Target Structures of the CD8+-T-Cell Response to Human Cytomegalovirus: the 72-Kilodalton Major Immediate-Early Protein Revisited. *J. VIROL.* 73:8179-8184.
- 50) **Khattab B. A-M.**, Lindenmeier W., Frank R., and Link H. (1997) Three T-Cell Epitopes Within the C-Terminal 265 Amino Acids of the Matrix Protein pp65 of Human Cytomegalovirus Recognized by Human Lymphocytes. *J.MED.VIROL.* 52: 68-76
- 51) **Kim D.T.**, Mitchell D.J., Brockstedt D.G. Fong L., Nolan G.P., Fathman C.G., Engleman E.G. and Rothbard J.B. (1997). Introduction of Soluble Proteins into the MHC Class I Pathway by Conjugation to an HIV tat Peptide. *J. IMMUNOL.* 159: 1666-1668.
- 52) **Kost T. A.**, Condreay J. P. & Jarvis D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *NAT. BIOTECHNOL.* 23: 567-575.
- 53) **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. *PNAS USA* 90: 4942-4946
- 54) **Krech U.** (1973) Complement fixing antibodies against CMV in different parts of the world. *BULL. WHO* 49: 103-106
- 55) **Kushner S.R.** (1978). An improved method for transformation of Escherichia coli with Coli-derived plasmids. *GENETIC ENGINEERING (Boyer and Nicosia, eds.), North Holland, New York: 17-23*
- 56) **Laus R.**, Graddis T.J., Hakim I. and Vidovic D. (2000). Enhanced major histocompatibility complex I-dependent presentation of antigens modified with cationic and fusogenic peptides. *NAT. BIOTECHNOL.* 18: 1269-1272.
- 57) **Leclerc C.** (2003). New approaches in vaccine development. *COMP. IMMUNOL. MICROBIOL. INFECT. DIS.* 26: 329-341.
- 58) **Levy D. N.**, Aldrovandi G. M., Kutsch O. & Shaw G. M. (2004). Dynamics of HIV-1 recombination in its natural target cells. *P. N. A. S.* 101: 4204-4209.

- 59) **Li M.**, Davey G. M., Sutherland R. M., Kurts C., Lew A. M., Hirst C., Carbone F. R. & Heath W. R. (2001). Cell-associated ovalbumin is cross-presented much more efficiently than soluble ovalbumin in vivo. *J. IMMUNOL.* 166: 6099-6103
- 60) **Limmer A.**, Ohl J., Kurts C., Ljunggren H. G., Reiss Y., Groettrup M., Momburg F., Arnold B. & Knolle P. A. (2000). Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8<sup>+</sup> T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. *NAT. MED.* 6: 1348-1354
- 61) **Lizee G.**, Basha G., Tiong J., Julien J. P., Tian M., Biron K. E. & Jefferies W. A. (2003). Control of dendritic cell cross-presentation by the major histocompatibility complex class I cytoplasmic domain. *NAT. IMMUNOL.* 4: 1065-1073
- 62) **Lundberg M.** and Johansson M. (2002) Positively Charged DNA-Binding Proteins Cause Apparent Cell Membrane Translocation. *BIOS. A. BIOPHYS. RESEARCH COMMUNICATIONS* 291: 367-371
- 63) **Mai J. C.**, Shen H., Watkins S. C., Cheng T. & Robbins P. D. (2002). Efficiency of protein transduction is cell type-dependent and is enhanced by dextran sulfate. *J. BIOL. CHEM.* 277: 33208-33218
- 64) **Maniatis T.**, Sambrook J. and Fritsch E.F. (1989). Molecular cloning, a laboratory manual. 2nd edition, Cold Spring Harbor, *LABORATORY PRESS*: 1-3
- 65) **Mann D.A.**, Frankel A.D. (1991). Endocytosis and targeting of exogenous HIV-1 Tat protein. *EMBO J.* 10: 1733-1739
- 66) **McLaughlin-Taylor E.**, Pande H., Forman S., Tanamachi B., Li C., Zaia J., Greenberg P., and Riddell S. (1994) Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8<sup>+</sup> virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. MED. VIROL.* 43:103-110
- 67) **Miller D.**, Zhang Y., Rahill B.M., Waldmann W.J., Sedmak D.D. (1999) HCMV inhibits IFN- $\alpha$ -stimulated antiviral and immunoregulatory responses by blocking multiple levels of IFN- $\alpha$  signal transduction. *J. IMMUNOL.* 162: 6107-6133.

- 68) **Musey L.**, Hughes J., Schacker T., Shea T., Corey L. & McElrath M.J. (1997). Cytotoxic T-cell responses, viral load and disease progression in early human immunodeficiency virus type 1 infections. *N.ENGL.J.MED* 337: 1267-1274.
- 69) **Nagahara H.**, Vocero-Akbani A.M., Snyder E.L., Ho A., Latham D.G., Lissy N.A., Becker-Hapak M., Ezhevsky S.A. and Dowdy S.F. (1998) Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *NAT.MED.* 12: 1449-1452
- 70) **Neijssen J.**, Herberts C., Drijfhout J. W., Reits E., Janssen L. & Neefjes J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *NATURE* 434: 83-88
- 71) **Pastan I.H.**, and Willingham M.C. (1981) Journey to the Center of the Cell: Role of the Receptosome. *SCIENCE* 214: 504-509
- 72) **Peitz M.**, Pfannkuche K., Rajewsky K., and Edenhofer F. (2002) Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: A tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *P. N. A. S.* 99: 4489-4494
- 73) **Pepperl S.**, Münster J., Mach M., Harris J.R., and Plachter B. (2000) Dense Bodies of Human Cytomegalovirus Induce both Humoral and Cellular Immune Responses in the Absence if Viral Gene Expression. *J.VIROL.* 74: 6132-6146
- 74) **Pietersz G. A.**, Li W. & Apostolopoulos V. (2001). A 16-mer peptide (RQIKIWFQNRRMKWKK) from antennapedia preferentially targets the Class I pathway. *VACCINE* 19: 1397-1405.
- 75) **Rahemetulla A.**, Fung-Leung W.P., Schilham M.W. et al. (1991) Normal development of CD8+ cells but markedly decreased helper cell activity in mice lacking CD4. *NATURE* 353: 180-184
- 76) **Ramirez M. C. & Sigal L. J.** (2002). Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells. *J. IMMUNOL.* 169: 6733-6742
- 77) **Reddehase M.J.**, Mutter W., Munch K., Buhring H.J., and Koszinowski U.H. (1987) CD8-positive cytotoxic T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J. VIROL.* 61: 3102-3108

- 78) **Reddehase M.J.** (2002) Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *NAT. REV. IMMUNOL.* 2: 831-844
- 79) **Reits E.**, Griekspoor A., Neijssen J., Groothuis T., Jalink K., van Veelen P., Janssen (2003) Peptide Diffusion, Protection and Degradation in Nuclear and Cytoplasmic Compartments before Antigen Presentation by MHC class I. *IMMUNITY* 18: 97-108
- 80) **Reusser P.**, Riddell S. R., Meyers J.D. & Greenberg P.D. (1991). Cytotoxic T-Lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *BLOOD* 78: 1373-1380
- 81) **Richard J.P.**, Melikov K., Vives E., Ramos C., Verbeure B., Gait M.J., Chernomordik L.V., Lebleu B. (2003) Cell-penetrating peptides: A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J.BIOL.CHEM.* 278: 585-590
- 82) **Riddell S.R.**, Rabin M., Gabelle A.P., Britt W.J., and Greenberg P.D. (1991) Class I MHC restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with HCMV does not require endogenous viral gene expression. *J. IMMUNOLOGY* 146: 2795-2804
- 83) **Rock K.L.** , York I.A., Saric T. and Goldberg A.L. (2002) Protein degradation and the generation of MHC class I-presented peptides. *ADV. IMMUNOL.* 80: 1-70
- 84) **Schmolke S.**, Kern H. F., Drescher P., Jahn G. & Plachter B. (1995). The dominant phosphoprotein pp65 (UL83) of human cytomegalovirus is dispensable for growth in cell culture. *J. VIROL* 69: 5959-5968.
- 85) **Schultze-Redelmeier M-P.**, Gournier H., Garcia-Pos F., Moussa M., Joliot A.H., Volovitch M., Prochiantz A. and Lemonnier F.A. (1996). Introduction of Exogenous Antigens into the MHC Class I Processing and Presentation pathway by Drosophila Antennapedia Homeodomain Primes Cytotoxic T Cells In Vivo. *J. IMMUNOL.* 157: 650-655.
- 86) **Schwarze S.R.**, Ho A., Vocero-Akbani A. and Dowdy S.F. (1999). In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into the Mouse. *SCIENCE* 285: 1569-1572.

- 87) **Schwarze S.R.**, Hruska K.A. and Dowdy S.F. (2000) Protein transduction: unrestricted delivery into cell? *TRENDS CELL BIOL.* 10: 290-295.
- 88) **Serwold T.**, Gonzalez F., Kim J., Jacob R. and Shastri N. (2002) ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmatic reticulum. *NATURE* 419: 480-483
- 89) **Sprent J. & Surh C. D.** (2001). Generation and maintenance of memory T cells. *CURR. OPIN. IMMUNOL.* 13: 248-254.
- 90) **Suni M.**, Picker L. and Maino V.C. (1998). Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J. IMMUNOL. METHODS* 212: 89-98
- 91) **Tabi Z.**, Mouftafts M., and Borysiewicz L.K. (2001) Human Cytomegalovirus pp65 – and Immediate Early 1 Antigen-Specific HLA Class I-Restricted Cytotoxic T Cell Responses Induced by Cross-Presentation of Viral Antigens. *J. IMMUNOL.* 166: 5695-5703
- 92) **Tanaka Y.**, Dowdy S.F. , Linehan D.C., Eberlein T.J. and Goedegebuure P.S. (2003) Induction of Antigen-Specific CTL by Recombinant HIV Trans-Activating Fusion Protein-Pulsed Human Monocyte-Derived Dendritic Cells *J. IMMUNOL.* 170: 1291-1298
- 93) **Towbin H.**, Staehelin T. and Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; Procedure and some applications. *P.N.A S.* 76: 4350-4354.
- 94) **Vives E.**, Brodin P. and Lebleu B. (1997(1)). A Truncated HIV-1 Tat Protein Basic Domain Rapidly translocates through the Plasma Membrane ad Accumulates in the Cell Nucleus. *J. BIOL. CHEM.* 272: 16010-16017.
- 95) **Vives E.**, Garnier C., Prevot P., Lebleu B. (1997(2)). Structure Activity Relationship Study of the Plasma Membrane Translocating Potential of a Short Peptide from HIV- 1 Tat Protein. *LETT. PEPTIDE SCI.* 4: 429-436
- 96) **Walter E.A.**, Greenberg P.D., Gilbert M.J., Finch R.J., Watanabe K.S., Thomas E.D., Riddell S.R. (1995) Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogenic bone marrow by transfer of T cell clones from the donor. *N. ENGL.J.MED.* 333:1038-1044

- 97) **Wang H.Y. & Fu T.**, Wang G., Zeng G., Perry-Lalley D.M., Yang J.C., Restifo N.P., Hwu P. and Wang R.-F. (2002) Induction of CD 4<sup>+</sup> T-cell-dependent antitumor immunity by TAT-mediated tumor antigen delivery into dendritic cells. *J.CLIN.INVEST.* 109: 1463-1470
- 98) **Warren A.P.**, DuCroq D.H., Lehner P.J., Borysiewicz L.K. (1994) Human Cytomegalovirus-infected Cells have unstable Assembly of Major Histocompatibility Complex Class I Complexes and are resistant to Lysis by Cytotoxic T Lymphocytes. *J. VIROL.* 68: 2822-2829
- 99) **Wills M.R.**, Carmichael A.J., Mynard K., Jin X., Weekes M.P., Plachter B. and Sissons J.G. (1996). The human cytotoxic T-Lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J. VIROL.* 70: 7569-7579.
- 100) **Yamashita Y.**, Shimokata K., Mizyno S., et al. (1993) Down Regulation of the Surface Expression of Class I MHC Antigens by Human Cytomegalovirus. *VIROLOGY* 193: 727-736

## **Danksagung**

Danke! Danke, liebe Nicoletta für Deine Geduld auch bei wiederholten Fragen und spitzfindigen Diskussionen, für die hervorragende Einführung in die experimentelle Forschung und andauernde Unterstützung bei meinen nicht seltenen Problemen. Danke! Mein Dank gilt natürlich auch Prof. Andreas Meyerhans für seinen Einsatz und Rückhalt in der Umsetzung der Arbeit und seinen wertvollen Tipps in der Ausarbeitung. Danke! Tja und dann natürlich auch Danke an alle Freunde, Kollegen und Kolleginnen des virologischen Instituts. Danke! Meinen Eltern gilt ein genereller Dank und ein spezieller für ihren Einsatz, Unterstützung und Geduld in meiner Ausbildung. Danke! Außerdem gilt mein besonderer Dank meiner geliebten Frau Eva, die mich beim Schreiben der Arbeit immer wieder fundamental unterstützt hat.

P.S. Danke alle denen, die ich hier unberechtigter und unerhörter Weise nicht erwähnt habe.

## Veröffentlichungen:

### Veröffentlichung im Rahmen der Doktorarbeit:

Scheller N., **Furtwängler R.**, Sester U., Maier R., Breinig T., Meyerhans A.: Human cytomegalovirus protein pp65: an efficient protein carrier system into human dendritic cells. *GENE THERAPY: Angenommen zur Veröffentlichung*

### Weitere Veröffentlichungen:

**Furtwängler, R.**, Schenk, J.-P., Reinhard, H., Leuschner, I., Rübe, C., Von Schweinitz, D., Graf, N. (2005) Nephroblastom - Wilms-Tumor. Genetik, radiologische Diagnostik und Therapiekonzept - Eine Übersicht. *ONKOLOGE 11: 1077-1089*

**Furtwaengler, R.**, Reinhard, H., Leuschner, I., Schenk, J.P., Goebel, U., Claviez, A., Kulozik, A., Zoubek, A., Von Schweinitz, D., Graf, N. (2006). Mesoblastic nephroma - A report from the Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH). *CANCER 106: 2275-2283*

Selle, B., **Furtwängler, R.**, Graf, N., Kaatsch, P., Bruder, E., Leuschner, I. (2006) Population-based study of renal cell carcinoma in children in Germany, 1980-2005: More frequently localized tumors and underlying disorders compared with adult counterparts. *CANCER 107: 2906-2914*

Reinhard, H., **Furtwängler, R.**, Siemer, S., Wullich, B., Graf, N. (2007) Wilms-Tumor bei Erwachsenen. *UROLOGE [A] 46: 748-753*

Reinhard, H., **Furtwängler, R.**, Graf, N. (2007) Wilms-tumor - Update 2007. *UROLOGE [A] 46: 143-145*

Luithle, T., Szavay, P., **Furtwängler, R.**, Graf, N., Fuchs, J. (2007) Treatment of Cystic Nephroma and Cystic Partially Differentiated Nephroblastoma-A Report From the SIOP/GPOH Study Group. *J. O. UROLOGY 177: 294-296*

Schenk, J.-P., Schrader, C., **Furtwängler, R.**, Ko, H.S., Leuschner, I., Graf, N., Troeger, J. (2005) MRT-morphologie und Staging des Kongenitalen Mesoblastischen Nephroms: Auswertung einer Fallsammlung mit 20 Patienten. *RÖFO 177: 1373-1379*

Gottschling, S., Meyer, S., Reinhard, H., **Furtwängler, R.**, Klotz, D., Graf, N. (2006) Intraindividual propofol dosage variability in children undergoing repetitive procedural sedations. *PED. HEM. ONC. 23: 571-578.*

Szavay, P., Luithle, T., Graf, N., **Furtwängler, R.**, Fuchs, J. (2006) Primary hepatic metastases in nephroblastoma - A report of the SIOP/GPOH Study. *J.O. PED. SURG. 41: 168-172.*

Schenk, J.-P., Schrader, C., Zieger, B., **Furtwängler, R.**, Leuschner, I., Ley, S., Graf, N., Troeger, J. (2006) Referenzradiologie des Nephroblastoms: Diagnosegenauigkeit und Bedeutung für die präoperative Chemotherapie. *RÖFO* 178: 38-45

Schenk, J.-P., Güther, P., Schrader, C., Ley, S., **Furtwängler, R.**, Leuschner, I., Edelhäuser, M., Graf, N., Tröger, J. (2005) Kindliche Nierentumoren - Relevanz der Bildgebung. *RADIOLOGE* 45: 1112-1123.

Schenk, J.P., Engelmann, D., Zieger, B., Semler, O., Wühl, E., **Furtwängler, R.**, Graf, N., Tröger, J. (2005) Bildgebende Differenzierung des Rhabdoidtumors vom Nephroblastom und Mesoblastischen Nephrom. *UROLOGE [A]* 44: 155-161

## Curriculum Vitae

### PERSÖNLICHE INFORMATION

---

- Name: Rhoikos Conrad Julian Furtwängler
- Familienstand: verheiratet, 2 Kinder
- Staatsangehörigkeit: deutsch
- Geburtsdatum: 03.09.1977
- Geburtsort: Samos (Griechenland)

### SCHULBILDUNG

---

- 1983 bis 1987 Grundschule Heiligenwald
- 1987 bis 1990 Deutsch Französisches Gymnasium Saarbrücken
- 1990 bis 1996 Stiftsschule Kloster Einsiedeln
- 1996 Eidgenössische Maturität Typus Be (Abitur)

### STUDIUM

---

- 1996 bis 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes in Saarbrücken und Homburg
- 1998 Ärztliche Vorprüfung (Note: gut)
- 1998 bis 1999 Studium an der Universität Perugia (Italien)
- 2000 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfungen (Note: sehr gut)
- 2000 bis 2001 Studium an der Universität Kopenhagen (Dänemark)
- Seit 2001 Anfertigung der Dissertation - Institut für Virologie
- 2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfungen (Note: sehr gut)
- 2002 bis 2003 Praktisches Jahr (Lausanne und Homburg)
- 28.10.2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfungen (Note: sehr gut)

### BERUFLICHE TÄTIGKEIT

---

- 2004 bis 2006 Ärztlicher Studienkoordinator der SIOP 2001/  
GPOH Nephroblastomstudie
- Seit 2004 Assistenzarzt der Universitätskinderkliniken  
Homburg