

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biochemische Pflanzenpathologie

Adoptive T-Zelltherapie der chronischen Hepatitis B

Karin Maria Krebs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. G. Multhoff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. J. Durner
2. Univ.-Prof. Dr. U. Protzer

Die Dissertation wurde am 01.06.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 12.12.2011 angenommen.

*Meinen Eltern
und Christian*

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Hepatitis B Virus	3
1.1.1 Partikel Aufbau	3
1.1.2 Genomorganisation	5
1.1.3 Replikationszyklus	6
1.1.4 Epidemiologie der HBV-Infektion	7
1.1.5 Rolle des Immunsystems im Infektionsverlauf	8
1.1.6 Prophylaxe und Therapie der HBV Infektion	11
1.2 Adoptive T-Zelltherapie	13
1.2.1 Zytotoxische T-Zellen	14
1.2.2 Transfer von T-Zellrezeptoren	15
1.2.3 Transfer von Chimären Antigen Rezeptoren	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	18
2 Ergebnisse	19
2.1 <i>In vivo</i> Evaluierung eines Chimären Antigen Rezeptors gegen die Hüllproteine des Hepatitis B Virus	19
2.1.1 Charakterisierung des murinisierten HBV-spezifischen CARs <i>in vitro</i>	19
2.1.1.1 Retrovirale Transduktion von murinen T-Zellen	20
2.1.1.2 Charakterisierung von HBV-met Zellen	21
2.1.1.3 Generierung einer S-exprimierenden Fibroblasten-Zelllinie	23
2.1.1.4 Ko-Kultur von CAR ⁺ T-Zellen mit murinen Zielzellen	23
2.1.1.5 Funktionalität des murinisierten S-CAR Konstruktes	24
2.1.1.6 Funktionalität von T-Zellen nach Stimulation	24
2.1.2 Charakterisierung des humanisierten CARs in murinen T-Zellen	26
2.1.2.1 Aktivierung von CAR ⁺ T-Zellen	26
2.1.2.2 Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren	27
2.1.2.3 Antigen-abhängige Proliferation von CAR ⁺ T-Zellen	29
2.1.2.4 Zytotoxizität von CAR ⁺ T-Zellen	30
2.1.3 Adoptiver Transfer von CAR⁺ T-Zellen in HBV-transgene Mäuse	32
2.1.3.1 Vergleich von IL2- und IL-12 Stimulation	32
2.1.3.2 Zirkulation transferierter Zellen	34

2.1.3.3	Einwanderung in die Leber	36
2.1.3.4	Histologie der Leber	36
2.1.3.5	Charakterisierung der Leber-Infiltrate	39
2.1.4	Effektorfunktionen von S-CAR⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	39
2.1.4.1	<i>In vivo</i> Zytotoxizität von transferierten Zellen	41
2.1.4.2	Expression pro-inflammatorischer Zytokine	42
2.1.4.3	S-CAR Zellen als Zytokin-produzierende Zellen	43
2.1.4.4	Phänotypische Charakterisierung transferierter Zellen nach 64 Tagen	45
2.1.4.5	Induktion von Antikörpern	48
2.1.5	Antiviraler Effekt von S-CAR⁺ T-Zellen <i>in vivo</i>	48
2.1.5.1	Effekt auf virale RNA und Proteine	49
2.1.5.2	Effekt auf virale DNA	50
2.2	Identifizierung von HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren	51
2.2.1	Immundominante HBV-Peptide	51
2.2.2	Gewinnung von natürlichen T-Zellrezeptoren	52
2.2.2.1	Stimulation und Sortierung	54
2.2.2.2	Screening von T-Zellklonen	55
2.2.2.3	Übersicht der gewonnenen Klone	56
2.2.3	Charakterisierung einer Auswahl von T-Zellklonen	58
2.2.3.1	Funktionelle Analysen	58
2.2.3.2	Analyse der T-Zellrezeptor-Ketten	60
2.2.4	Generierung eines Maus-Modells zur Evaluierung humaner HBV-spezifischer T-Zellklone	63
3	Diskussion	65
3.1	Evaluierung eines HBV-spezifischen Chimären Antigen Rezeptors im Maus-Modell	65
3.1.1	Charakterisierung des murinisierten CARs	65
3.1.2	Charakterisierung des humanisierten S-CARs in murinen T-Zellen	66
3.1.3	Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren	68
3.1.4	Vergleich der Konditionierung mit IL-2 oder IL-12	69
3.1.5	Transienter Leberschaden und Zellinfiltrate in der Leber	72
3.1.5.1	Leberinfiltrate	72
3.1.5.2	Transienter Leberschaden	73
3.1.5.3	IL-10 Expression	74

3.1.6	Antivirale Wirkung von S-CAR T-Zellen	75
3.1.6.1	Zytotoxizität	75
3.1.6.2	Antivirale Zytokine	76
3.1.7	Bewertung des HBV-spezifischen CARs und Ausblick	79
3.2	Identifizierung von HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren	83
3.2.1	Auswahl der HBV-Peptide	83
3.2.2	Gewinnung von T-Zellklonen	84
3.2.3	Charakterisierung der T-Zellklone	85
3.2.4	HBV-replizierende, HLA-A2 ⁺ Mäuse	88
3.2.5	Bewertung der HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren und Ausblick	89
3.3	Bewertung des adoptiven T-Zelltransfers als Immuntherapie- möglichkeit der chronischen Hepatitis B und Ausblick	91
4	Material und Methoden	95
4.1	Material	95
4.1.1	Geräte	95
4.1.2	Verbrauchsmaterial	95
4.1.3	Chemikalien / Reagenzien / Medienzusätze	96
4.1.4	Enzyme	97
4.1.5	Kits	97
4.1.6	Puffer und Lösungen	98
4.1.7	Zellen	99
4.1.8	Zellkulturmedien	99
4.1.9	Mäuse	101
4.1.10	Peptide	101
4.1.11	Streptamere	101
4.1.12	Antikörper	101
4.1.13	Plasmide	102
4.1.14	Primer	102
4.1.15	Sonstiges	103
4.2	Methoden	104
4.2.1	Allgemeine Zellkulturmethoden	104
4.2.2	Generierung einer murinen Zelllinie mit stabiler S-Expression	104

4.2.3	Bestimmung der β-Galaktosidase Aktivität	105
4.2.4	Retrovirale Transduktion	105
4.2.4.1	Transfektion der Verpackungszelllinie Plat-E	105
4.2.4.2	Aufreinigung von Maus-Splenozyten	105
4.2.4.3	Transduktion mit IL-2 Stimulation	106
4.2.4.4	Transduktion mit IL-12 Stimulation	106
4.2.5	Adoptiver T-Zelltransfer	107
4.2.5.1	Transfer von Zellen	107
4.2.5.2	Blut- und Serumanalyse	107
4.2.5.3	Organentnahme und -aufarbeitung	107
4.2.5.4	Gewebeschnitte	108
4.2.6	Generierung von humanen T-Zellklonen	108
4.2.6.1	Gewinnung von PBMC der Spender	108
4.2.6.2	Peptidbeladung von Zellen	109
4.2.6.3	Sortierung und Klonierung von T-Zellen	109
4.2.6.4	Unspezifische Stimulation von T-Zellen	109
4.2.7	Ko-Kulturen	110
4.2.7.1	Adhärente Zielzellen und HBsAg	110
4.2.7.2	XTT-Test	110
4.2.7.3	Chrom-Release-Assay	111
4.2.8	Durchflusszytometrie	111
4.2.8.1	Oberflächenfärbung	111
4.2.8.2	Streptamerfärbung (für Sortierung) von Zellen	112
4.2.8.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung	112
4.2.8.4	Proliferationstest mit BrdU	113
4.2.9	Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen	113
4.2.10	Generierung einer HBV- und HLA-A2-exprimierenden Mauslinie	113
4.2.11	Molekularbiologische Methoden	114
4.2.11.1	RNA-Isolation	114
4.2.11.2	cDNA-Synthese	114
4.2.11.3	PCR zur Analyse der TZR Ketten	115
4.2.11.4	Quantitative PCR	116
4.2.11.5	Phenol/Chloroform Extraktion von DNA	117
4.2.11.6	Gelelektrophorese und Gelextraktion	117
4.2.11.7	Sequenzierung	118
4.2.11.8	Klonierung der CAR-Konstrukte	118

4.2.11.9	Southern Blot	120
4.2.11.10	Protein-Detektion aus Zelllysaten	120
4.2.12	Statistik	121
5	Literaturverzeichnis	122
6	Abkürzungsverzeichnis	138
	Danksagung	139

Zusammenfassung

Weltweit sind 350 Millionen Menschen chronisch mit dem Hepatitis B Virus (HBV) infiziert. Die derzeitigen Therapien führen nicht zu einer Elimination der viralen, episomalen cccDNA (*covalently closed circular DNA*) und deshalb auch nicht zur Heilung des Patienten. Bei der Ausheilung der Infektion findet man im Gegensatz zu einem chronischen Krankheitsverlauf eine starke, polyklonale T-Zellantwort. Eine adoptive T-Zelltherapie, bei der die zytotoxischen T-Zellen des chronisch mit HBV infizierten Patienten mit einem HBV-spezifischen Rezeptor versehen und anschließend reinfundiert werden, stellt eine vielversprechende Möglichkeit dar, durch die HBV-Spezifität der T-Zellen die Virus-infizierten Zellen endgültig zu eliminieren.

Eine Möglichkeit, HBV-spezifische T-Zellen zu generieren, ist die Expression eines Chimären Antigen Rezeptors (CAR). Dieser besteht aus einer extrazellulären Antikörper-basierten Bindedomäne und einer intrazellulären CD28/CD3 ζ -Signaldomäne. Ein solcher CAR mit Spezifität gegen die S-Domäne der HBV-Hüllproteine (S-CAR), die sich auf der Zellmembran infizierter Zellen befinden, konnte in Vorarbeiten innerhalb der Arbeitsgruppe zu einer Erkennung HBV-positiver Zellen und deren Elimination führen.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Funktionalität des S-CARs zunächst *in vitro* in murinen Zellen zu charakterisieren und dann dessen Wirksamkeit *in vivo* in einem HBV-transgenen Mausmodell zu evaluieren. Ein zweites Ziel war es, aus akut HBV-infizierten Individuen, sowie aus Personen mit einer ausgeheilten HBV-Infektion, HBV-spezifische T-Zellen zu selektieren und zu klonieren. Aus diesen T-Zellen sollte die genetische Information für den jeweiligen T-Zellrezeptor gewonnen werden.

Nach retroviraler Transduktion muriner T-Zellen mit dem S-CAR Konstrukt zeigten die Zellen eine gute Expression des CARs auf der Zelloberfläche und erlangten HBV-spezifische Effektorfunktionen. Durch eine Ko-Kultur mit HBV-replizierenden Zellen oder durch Stimulation mit dem S-Antigen wurden die T-Zellen aktiviert, proliferierten stärker, sekretierten IFN- γ und mobilisierten zytolytische Granulae.

S-CAR modifizierte primäre murine T-Zellen wurden daraufhin adoptiv in HBVtg Mäuse transferiert. Durch eine vorherige Stimulation der Zellen mit IL-12 konnte das Überleben der transferierten Zellen und ihre Einwanderung in die Leber gegenüber einer IL-2 Stimulation deutlich gesteigert werden. Die Infiltrate in der Leber setzten sich hauptsächlich aus den transferierten CD8⁺ T-Zellen und endogenen Makrophagen zusammen.

In vivo konnte die antivirale Wirkung der S-CAR T-Zellen bestätigt werden. Zwölf Tage nach dem Transfer war die Viruslast im Serum um zwei Logstufen reduziert und zytoplasmatische Kapside, sowie die virale DNA in der Leber, dem Organ der HBV-Replikation, waren fast vollständig eliminiert. Als mögliche antivirale Mechanismen wurden die Sekretion von antiviral-wirksamen Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α , sowie die Induktion von Apoptose in HBV-replizierenden Hepatozyten identifiziert.

Eine weitere Möglichkeit der Redirektion von T-Zellen gegen virale Epitope stellt der Transfer natürlicher T-Zellrezeptoren (TZR) dar. Dafür wurden zunächst HLA-A2-restringierte, HBV-spezifische T-Zellen aus akut-infizierten Patienten oder ausgeheilten Spendern isoliert, durch limitierende Verdünnung vereinzelt und monoklonal expandiert. Die gewonnenen Klone wurden auf ihre HBV-Spezifität überprüft und die Sequenzen der verwendeten TZR-Ketten bestimmt.

Von insgesamt etwa 300 HBV-spezifischen Klonen wurden 100 Klone expandiert. Aus diesen Klonen wiederum wurden zehn Klone aus drei verschiedenen Spendern mit Spezifität für entweder das S20-, S172- oder C18-Peptid und mit unterschiedlichen T-Zellrezeptoren identifiziert.

Um nach einer retroviralen Transduktion der TZR-Ketten deren Funktionalität *in vivo* evaluieren zu können, wurde ein HBV/HHD Mausmodell generiert, das HBV repliziert und als MHC-I-Molekül nur das humane HLA-A2-Molekül verwenden kann.

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass murine T-Zellen durch Expression eines Chimären Antigen Rezeptors *in vitro* und *in vivo* antivirale Effektorfunktionen erlangen. Als Alternative zu den CAR wurden HBV-spezifische natürliche T-Zellrezeptoren identifiziert. Beide Arten von Rezeptor haben das Potential in einer adoptiven T-Zelltherapie der chronischen Hepatitis B eingesetzt zu werden und die ungenügende T-Zellantwort des Patienten zu verbessern.

1 Einleitung

1.1 Das Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus (HBV) wurde 1970 durch Elektronen-Mikroskopie als Erreger der „Serum-Hepatitis“ identifiziert (Dane et al., 1970). Es handelt sich um ein umhülltes, nicht-zytopathisches DNA-Virus, das aufgrund seines Lebertropismus der Familie *Hepadnaviridae* zugeordnet wird (Gust et al., 1986).

Nahe Verwandte des humanen HBV konnten in Primaten und Nagern gefunden werden, so z.B. HBVcpz in Schimpansen, *Pan troglodytes* (MacDonald et al., 2000), WMHBV in Wollaffen, *Lagothrix lagotricha* (Lanford et al., 1998) oder WHV in nordamerikanischen Waldmurmeltieren, *Marmota monax* (Summers et al., 1978). Die Sequenz-Homologie auf DNA-Ebene zwischen HBV und den Hepadnaviren der Nager beträgt etwa 87% und zu den ferner verwandten Avihepadnaviren, wie z.B. DHBV der Ente, *Anas domesticus* (Mason et al., 1980), nur 40% (Schaefer, 2007). Einige der tierischen Hepadnaviren wurden als Modell-Viren verwendet, um Mechanismen der HBV Replikation und Pathogenese aufzudecken.

Da HBV eine hohe Wirts- und Organspezifität zeigt, gibt es nur wenige Infektionsmodelle. Schimpansen können zwar mit dem humanen HBV infiziert werden, ethische und finanzielle Gründe sprechen jedoch gegen die experimentelle Verwendung. Nagetiere, die einfacher zu halten wären, sind dagegen nicht suszeptibel für HBV. Als Modell für eine chronische Hepatitis B gelten HBV-transgene (HBVtg) Mäuse, welche immuntolerant gegenüber HBV sind (Guidotti et al., 1995). Über eine Transduktion mit Adenoviren kann die Speziesbarriere überwunden und eine akute HBV-Infektion nachgestellt werden (Sprinzl et al., 2001).

In vitro konnten bisher nur Infektionen von primären Hepatozyten aus dem Menschen (Galle et al., 1994; Gripon et al., 1988) oder dem Spitzhörnchen *Tupaia belangeri* (Walter et al., 1996), sowie der humanen Hepatokarzinomzelllinie HepaRG (Gripon et al., 2002) gezeigt werden.

1.1.1 Partikelbau

Die Virionen des HBV bestehen aus einer Lipid-Doppelschicht und einem Kapsid, welches die virale Polymerase und die DNA enthält. Neben den Virionen werden auch nicht-infektiöse Subvirale Partikel (SVP) gebildet, die entweder eine sphärische oder filamentöse Form annehmen (Abb. 1.1a-d). Im Vergleich zu den infektiösen Viren werden die SVPs im bis zu 10.000-100.000-fachen Überschuss von der Zelle produziert und sekretiert (Ganem and Schneider, 2001). Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass sie dem Abfangen von

Antikörpern gegen das HBsAg dienen (Gerlich and Kann, 2005; Madalinski et al., 1991). In die Hülle sind drei Formen des Oberflächenproteins integriert, die gemeinsam als HBsAg bezeichnet werden (*Hepatitis B surface Antigen*). Sie besitzen den gleichen Carboxyterminus, aber unterschiedliche N-Termini und werden nach ihrer Größe S- (small), M- (middle) oder L- (large) Protein genannt (Abb. 1.1e). Im Bereich der S-Domäne gibt es eine immunogene Schleifenstruktur, gegen die schützende Antikörper generiert werden. Mit dieser „a-Determinante“ werden die Serotypen definiert (Bowden and Locarnini, 2006).

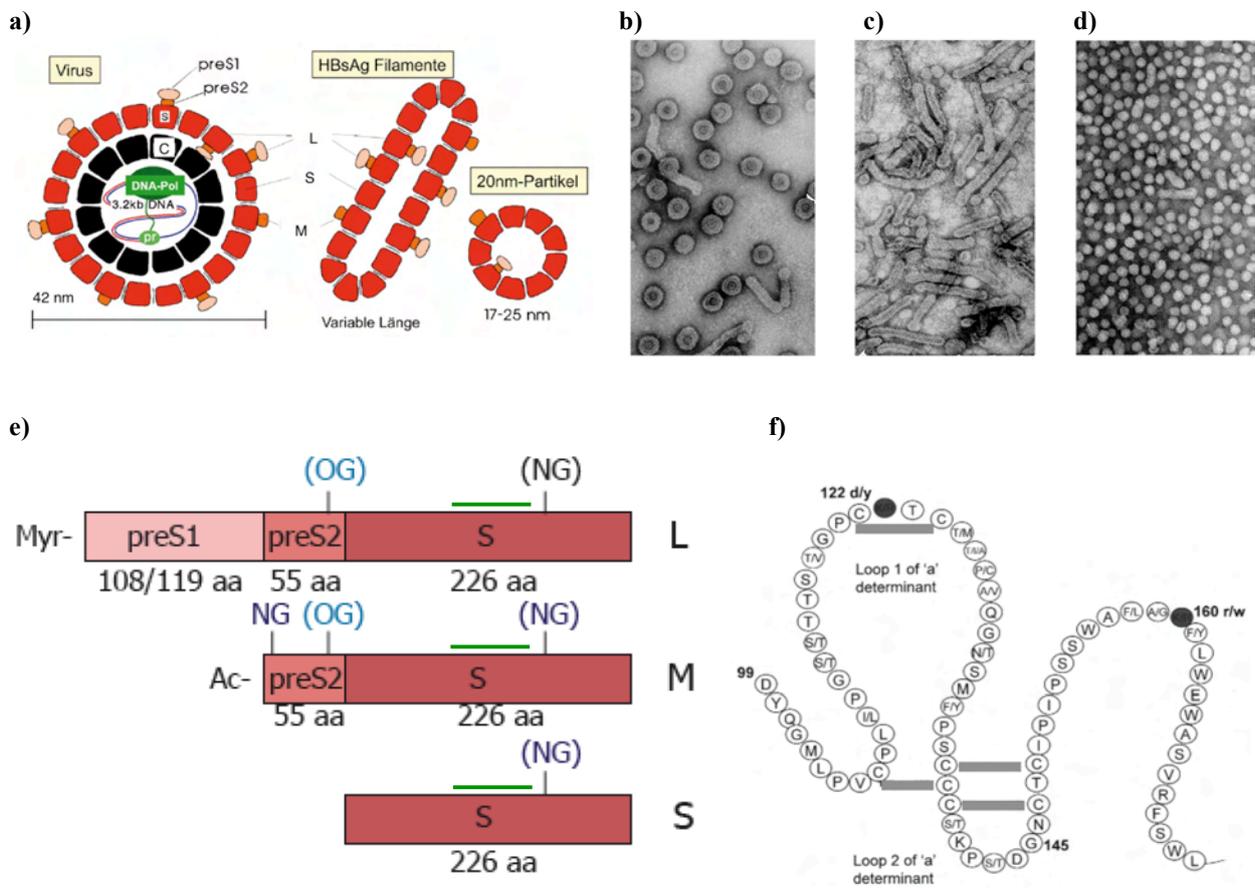


Abb. 1.1: Aufbau von Viruspartikeln und Hüllproteinen des Hepatitis B Virus a) Schematische Darstellung von Virion und Subviralen Partikeln. Die virale partiell-doppelsträngige DNA ist als Linie dargestellt. Mit der DNA ist die virale Polymerase (grün) mit Primer-Domäne (pr) und Reverse-Transkriptase-Domäne (RT) assoziiert. Das Nukleokapsid (schwarz) besteht aus 120 Dimeren des Core-Proteins (C). Die drei verschiedenen Hüllproteine sind rot dargestellt (Gerlich and Glebe, 2010). b-d) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von aufgereinigten Virionen (b), Filamenten (c) und Sphären (d) (Gerlich and Kann, 2005). e) Zusammensetzung der drei Hüllproteine. Myr = Myristoylierung, Ac = Acetylierung, NG/OG = N- und O-Glykosylierungsstellen, aa = Aminosäuren. Grüne Striche = Binderegion für den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chimären Antigen Rezeptor (Gückel, 2005), (modifiziert nach: Glebe and Urban, 2007). f) Immunogene „a-Determinante“ in der S-Domäne. Die Definition der Serotypen *adw*, *ayw*, *adr* und *ayr* erfolgt anhand von Mutationen an der Position 122 Lysin = *d*, Arginin = *y*; und an Position 160 Lysin = *w*, Arginin = *r*. Graue Striche = Cystein-Brücken (Bowden and Locarnini, 2006).

1.1.2 Genomorganisation

Das partiell-doppelsträngige DNA-Genom von HBV hat je nach Genotyp eine Länge von 3182-3248 Nukleotiden (Schaefer, 2007). Während der codierende Negativstrang in den Virionen vollständig vorliegt, ist der Positivstrang je nach Fortschritt der Polymerase 600 bis 2100 Nukleotide kürzer (Summers et al., 1975). Die beiden Enden des Negativstrangs sind nicht miteinander verbunden, da die virale Polymerase mit ihrer Primer-Domäne kovalent an den Phosphodiester des 5'-Endes bindet. Die DNA liegt somit im Virion in einer nicht verdrillten Form vor (rcDNA, *relaxed circular DNA*).

Das Genom enthält vier offene Leserahmen, die ganz oder teilweise überlappen (Schlicht and Schaller, 1989). Alle mRNAs schließen am 3'-Ende mit dem gleichen Polyadenylierungssignal ab (Abb. 1.2) (Cattaneo et al., 1984). Zwei der mRNAs codieren für zwei hier bisher nicht erwähnte Nicht-Strukturproteine: E und X. Das E-Protein wird im immunologischen Kontext als HBeAg bezeichnet (*Hepatitis B e Antigen*). Seine Nukleotidsequenz ist bis auf die vorgelagerte PräC-Region identisch mit der des Core-Proteins. HBeAg wird sekretiert und es wird angenommen, dass es immunregulatorische Eigenschaften besitzt (Milich and Liang, 2003). Dem X-Protein wird unter anderem eine *trans*-Aktivator Funktion sowie onkogenes Potential zugeschrieben. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass X für eine produktive HBV-Infektion essentiell ist (Lucifora und Arzberger et al., 2011).

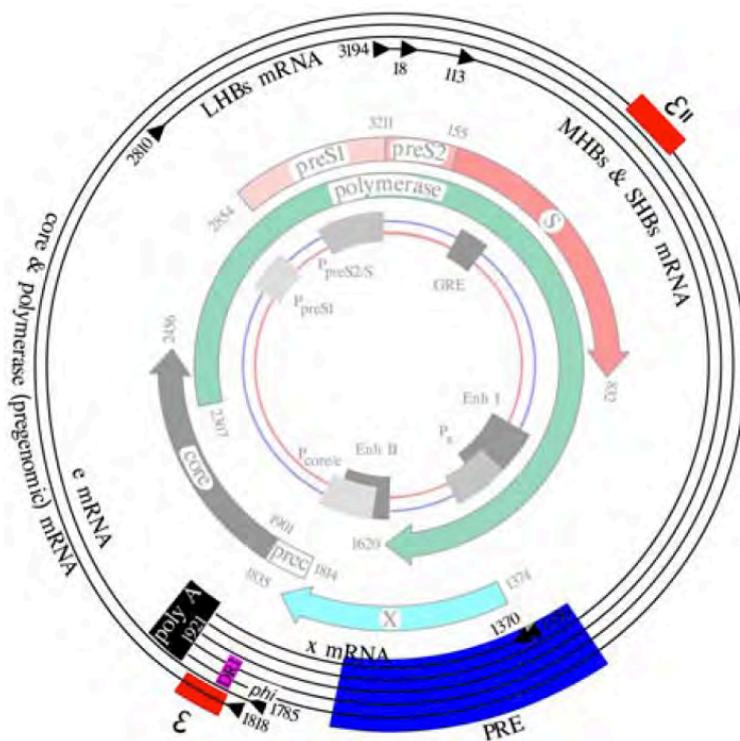


Abb. 1.2: HBV-mRNAs. Die mRNAs codieren, teilweise mit unterschiedlichen Start-Codons, wie folgt:
3,53kB: E (Yuh et al., 1992),
3,5kB: Core, Polymerase, prägenomische RNA,
2,4kB: L,
2,1kB: M und S,
0,8kB: X.
ε = Enkapsidierungssignal und Bindestelle für die Polymerase. PRE = *posttranscriptional regulatory element*. GRE = *Glucocorticoid-responsive element*. P = Promoter.
(Gerlich and Kann, 2005)

1.1.3 Replikationszyklus

Um in die Wirtszelle zu gelangen, binden die HBV-Virionen zunächst an Heparansulfat-Proteoglykane (Schulze et al., 2007). Es folgt die Bindung an einen weiteren Rezeptor, der bisher unbekannt ist. Die präS1-Domäne und ihre Myristoylierung sind für die Infektiosität essentiell (Bruss et al., 1996; Le Seyec et al., 1999). Aus Experimenten mit DHBV wurde geschlussfolgert, dass der Eintritt in die Zelle über Rezeptor-vermittelte Endozytose erfolgt (Kock et al., 1996). Nachdem die virale und endosomale Membran miteinander verschmolzen sind und so das Kapsid in das Zytoplasma entlassen wird, erfolgt sein Transport zum Kern, wo es wahrscheinlich am Kernporenkomplex das Genom freisetzt (Kann et al., 1999). Der inkomplette Positivstrang des Genoms wird von zellulären Enzymen vervollständigt, wodurch eine episomale Form der viralen DNA entsteht: die cccDNA (*c*ovalently *c*losed *c*ircular DNA). Sie dient als Matrize für die Transkription durch die zelluläre RNA Polymerase II. Die virale RNA ist wie die zelluläre RNA am 3'-Ende poly-adenyliert und trägt eine 5'-Cap-Struktur. Die Synthese der Membranproteine und des HBeAg erfolgt am rauhen ER. Die Core-Proteine assemblieren eigenständig erst zu Homodimeren und dann zu Kapsiden mit 90 oder 120 Dimeren (T=3- bzw. T=4-Symmetrie). Die Kapsidbildung und Verpackung der prägenomischen RNA und der viralen Polymerase wird initiiert, indem die Polymerase mit einem Proteinteil („Terminales

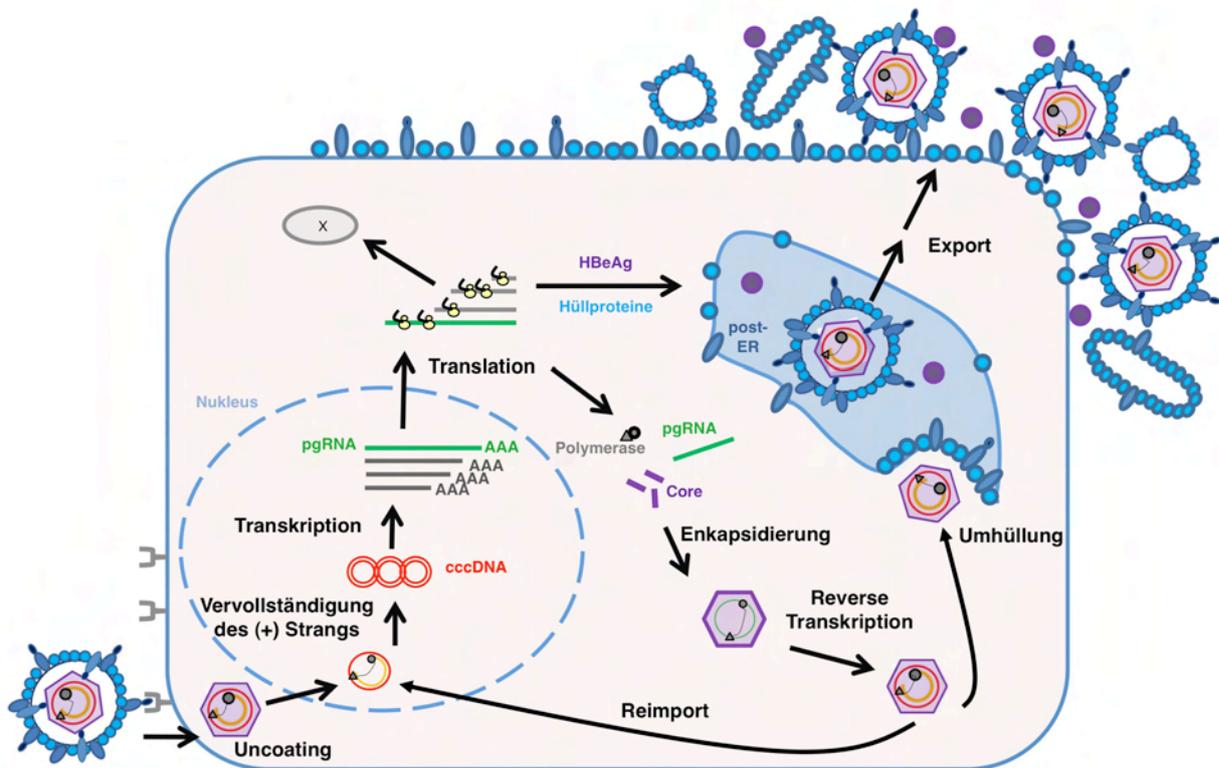


Abb. 1.3 Schematische Darstellung des Replikationszyklus von HBV. cccDNA= covalently closed circular DNA, pgRNA= prägenomische RNA, AAA= Poly-A Schwanz der RNA. Erläuterung siehe Text.

Protein“) an eine Haarnadel-Struktur in der RNA bindet (Verpackungssignal ϵ). Im entstandenen Nukleokapsid erfolgt die reverse Transkription der viralen RNA in DNA und die unvollständige Synthese des Positivstrangs. Das Nukleokapsid kann nun entweder zurück in den Kern transportiert werden, wo der Zyklus von neuem beginnt, oder es wird am post-ER/prä-Golgi Netzwerk über Kontakt zum L-Protein umhüllt (Beck and Nassal, 2007; Bruss, 2007). Die Partikel werden dann über das Membran-Netzwerk an die Zelloberfläche transportiert und dort freigelassen, ohne dabei die Wirtszelle zu zerstören. Die SVP werden über den gleichen Weg exozytiert (Abb. 1.3).

Es ist unwahrscheinlich, dass bei der starken Expression der Hüllproteine jedes dieser Moleküle in die Membran der Virionen und SVP eingebaut wird. Und so ist zu vermuten, dass über den Vesikeltransport zwischen ER und Zellmembran durch das Verschmelzen der Membranen auch unweigerlich Hüllproteine in die Zellmembran gelangen (Abb. 1.4).

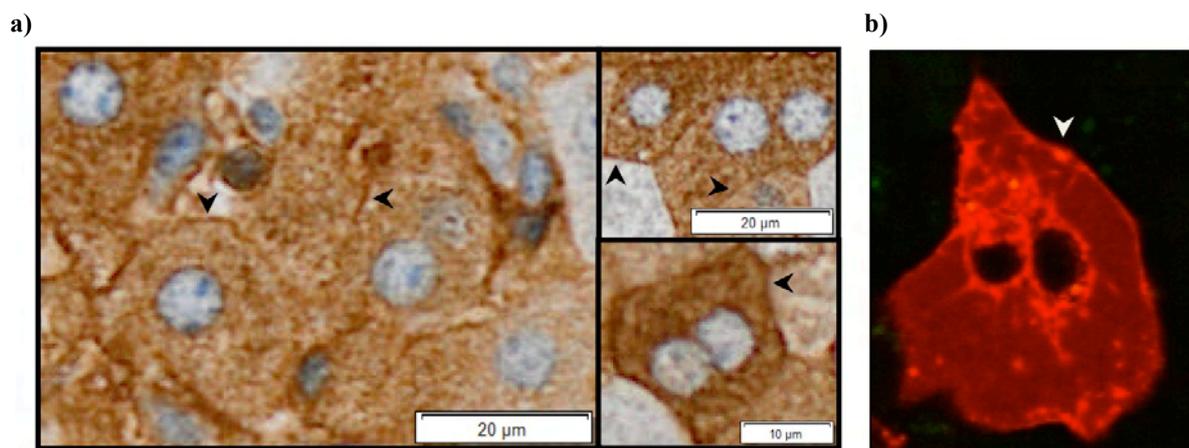


Abb. 1.4 Lokalisation des S-Proteins an der Zelloberfläche. Das S-Protein befindet sich im Zytoplasma und auf der Zelloberfläche (Pfeile). a) Färbung von S in der Leber einer HBVtg Maus (HBV1.3 xfs). b) Lebend-Zellaufnahme einer HepG2 Zelle, transfiziert mit einem mCherry-S Fusionsprotein.

1.1.4 Epidemiologie der HBV-Infektion

Fünf Prozent der Weltbevölkerung sind chronisch mit dem Hepatitis B Virus infiziert und jährlich sterben 0,5 bis 1,2 Millionen Menschen an den Folgeerkrankungen (Lavanchy, 2005). Die Übertragung erfolgt über Blut und andere Körperflüssigkeiten. In den Gebieten hoher Prävalenz, z.B. Schwarzafrika und Südostasien (Abb. 1.5a), erfolgt die Übertragung meist von der infizierten Mutter auf das Neugeborene, wobei die Chronifizierungsrate bei etwa 90 % liegt. In Deutschland liegt die Seroprävalenz für HBsAg bei 0,6 %. Allerdings weisen 7 % der deutschen Bevölkerung Antikörper gegen das Core-Protein auf. Diese müssen durch eine frühere

Infektion induziert worden sein, die wahrscheinlich aufgrund eines inapparenten Krankheitsverlaufs nicht gemeldet wurde. In 2009 wurden 1692 Fälle von akuter Hepatitis B an das RKI übermittelt, wovon eine Mehrzahl der Patienten männliche Erwachsene zwischen 25-49 Jahren waren. Der Übertragungsweg wurde – soweit bekannt – wie folgt angegeben: 41,4 % sexuelle Exposition, 6,6 % Wohngemeinschaft mit HBV-Träger, 6,4 % operativ-diagnostische Eingriffe, 2,2 % Erhalt von Blutprodukten und 1,6 % intravenöser Drogenmissbrauch (RKI, 2010).

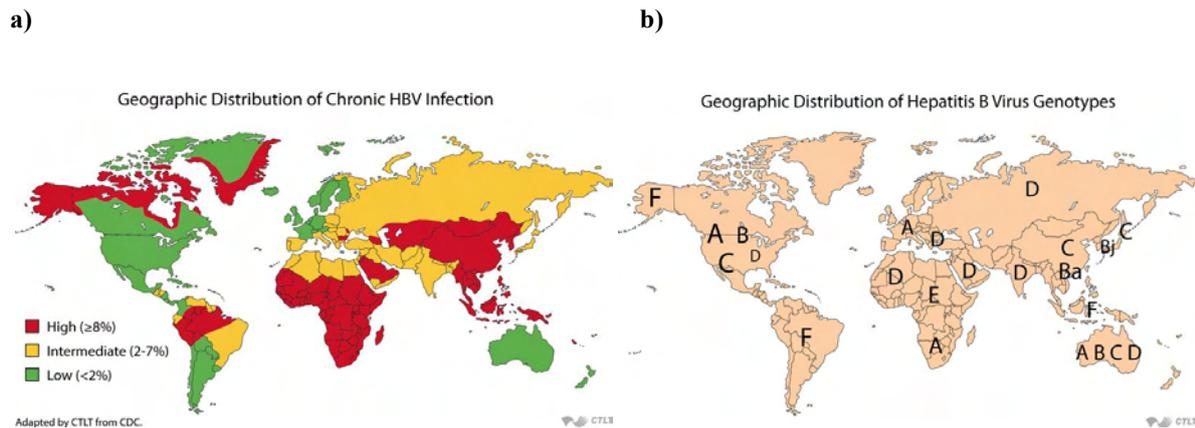


Abb. 1.5 Weltweite Verteilung von HBV. a) Prävalenz in einzelnen Staaten. Rot $\geq 8\%$, gelb 2-7 %, grün $\leq 2\%$. b) Vorkommen der verschiedenen HBV-Genotypen (JHSPH, 2011). In anderen Publikationen werden teilweise zusätzliche oder andere Angaben zur Genotypverteilung gemacht z.B.: B in Alaska, G und H in Mittelamerika, D im Mittelmeerraum, A in Indien und B und C in Indonesien (Schaefer, 2007).

Es gibt acht verschiedene Genotypen des HBV (A-H), deren Nukleotidsequenz sich per Definition zu mindestens 8 % unterscheidet (Schaefer, 2007). Abb. 1.5 b) zeigt die weltweite Verteilung der Genotypen. Zusätzlich werden, wie in Abb. 1 f) beschrieben, unabhängig von den Genotypen, auf diagnostischer Ebene die Serotypen unterschieden.

1.1.5 Rolle des Immunsystems im Infektionsverlauf

Die Inkubationszeit mit dem Hepatitis B Virus bis zum Einsetzen von Symptomen dauert etwa 40-120 Tage. Bei einem akuten Infektionsverlauf kommt es aufgrund der vom Immunsystem zerstörten Leberzellen zu einer Erhöhung der Leber-Transaminasen im Serum (z.B. ALT = Alanin Amino-transferase) (Abb. 1.6a). Ebenso kann der Patient ikterisch werden, d.h. im Serum ist ein erhöhter Bilirubin-Gehalt messbar. Die Krankheit gilt als ausgeheilt, wenn die ALT-Werte ein normales Niveau erreicht haben, virale Antigene nicht mehr nachweisbar sind, sowie Antikörper gegen das HBsAg detektiert werden (anti-HBs) (Wursthorn and Manns, 2009). Trotz Erfüllung dieser Kriterien kann es sein, dass keine sterilisierende Immunität besteht und das Virus unter Kontrolle des Immunsystems in geringen Mengen persistiert (Rehermann et al.,

1996a). Fällt diese Kontrolle weg, z.B. durch Immunsuppression bei Organtransplantation oder bei Krebstherapie, kann es zu einer Reaktivierung der Replikation kommen (Westhoff et al., 2003). In 0,1 % der akuten Infektionen entwickelt der Patient eine fulminante Hepatitis, die häufig durch Leberversagen fatal ist (Sprinzl and Galle, 2008).

Bei etwa 5-10 % der Infektionen mit HBV im Erwachsenenalter kommt es zur Chronizität. Die chronische Infektion verläuft inapparent oder mit unspezifischen Symptomen wie Schlappeheit und Oberbauchbeschwerden. Durch die permanente chronische Leberentzündung kommt es zu Folgeerkrankungen (Sprinzl and Galle, 2008; Wursthorn and Manns, 2009). In einer prospektiven Studie in Japan wurden 610 chronisch HBV-Infizierte beobachtet. Nach 5, 10 und 15 Jahren betrug die kumulative Progression zu einer Leberzirrhose 8%, 21% und 37% und zu einem Hepatozellulären Karzinom 2%, 5% und 19% (Ikeda et al., 1998).

Wie bereits erwähnt, kommt es bei der Infektion von Neugeborenen in etwa 90 % der Fälle zu einem chronischen Verlauf. Dieser ist gekennzeichnet durch eine jahrelange immuntolerante Phase, mit hoher Viruslast im Blut und niedrigen ALT-Werten (Abb. 1.6 b). Aus ungeklärten Gründen kann es einen Übergang zu einer immunaktiven Phase geben, in der die Viruslast sinkt und die Krankheitssymptome schwerwiegender werden. Ebenso kann ein Wechsel in eine immuninaktive Phase mit niedriger Virusreplikation folgen. Diese Phase wird oft durch den Verlust von HBeAg und dem Auftreten von Antikörpern gegen HBeAg eingeleitet (Rehermann and Nascimbeni, 2005).

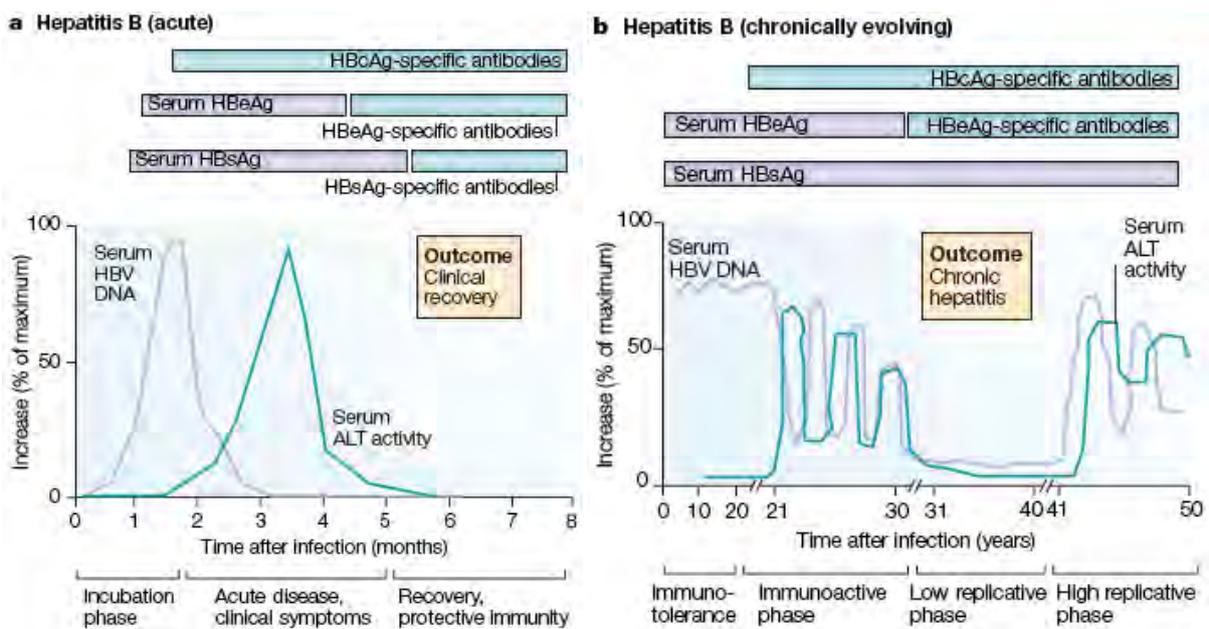


Abb. 1.6 Klinischer und virologischer Verlauf der HBV Infektion. Balken = Antigene und Antikörper im Serum. Violette Linie = HBV-DNA im Serum, blaue Linie = Alanin Aminotransferase im Serum. a) Typischer akuter Verlauf mit Ausheilung. b) Typischer chronischer Verlauf nach vertikaler Übertragung (Rehermann and Nascimbeni, 2005).

Die Immunantwort spielt eine wesentliche, wenn nicht sogar die entscheidende Rolle für den Ausgang einer Infektion mit HBV. Dies wird besonders bei Immunsuppression des Patienten deutlich, wodurch es zu der oben beschriebenen Reaktivierung der Replikation führen kann. In Versuchen mit Schimpansen konnte durch Depletion von entweder CD4⁺ oder CD8⁺ Zellen gezeigt werden, dass die zytotoxischen CD8⁺ Zellen von entscheidender Bedeutung sind und die virale DNA erst beseitigt wird, wenn die Anzahl der CD8⁺ Zellen nach etwa 20 Wochen wieder ihr normales Niveau erreicht hat. Zeitgleich kommt es auch zum Leberschaden und zur Produktion von IFN- γ (Thimme et al., 2003). Während eines akuten Infektionsverlaufs kann eine starke, polyklonale T-Zellantwort, die gegen verschiedene HBV-Epitope gerichtet ist, gemessen werden. Die chronische Infektion dagegen zeichnet sich höchstens durch schwache, oligospezifische T-Zellantworten aus (Boettler et al., 2006; Maini et al., 1999; Nayersina et al., 1993; Rehermann et al., 1995).

Es ist bisher nicht geklärt, warum die Infektion im Jugend- oder Erwachsenenalter in 5-10 % der Fälle einen chronischen Verlauf nimmt. Zwei Gründe werden derzeit hierfür diskutiert: Zum einen, ob es eine ungenügende Stimulation der naiven T-Zellen gibt, zum anderen, ob es zu einer Erschöpfung der antigen-spezifischen T-Zellen im Infektionsverlauf kommt. Hinweise darauf gibt es aus Arbeiten zu den inhibitorischen bzw. pro-apoptotischen Proteinen PD-1, CD244, CTLA-4 und Bim (Lopes et al., 2008; Maier et al., 2007; Raziorrouh et al., 2010; Schurich et al., 2011; Watanabe et al., 2010). Ebenso könnte die Kontrolle durch regulatorische T-Zellen eine Rolle spielen (Franzese et al., 2005; Stoop et al., 2005).

Bei einer perinatalen Infektion wird angenommen, dass aufgrund des noch nicht ausgereiften Immunsystems eine Toleranz gegen virale Antigene induziert wird. Das HBeAg kann bereits vor der Geburt die Plazenta passieren. Dadurch könnte es während der Reifung des Immunsystems nicht als Fremdartigen erkannt werden und so die Deletion von HBeAg-spezifischen und, aufgrund der Sequenzhomologie, gleichzeitig Core-spezifischen T-Zellen auslösen (Chen et al., 2004; Guidotti and Chisari, 2006).

Zur Induktion des angeborenen Immunsystems durch das Hepatitis B Virus gibt es wenige Studien. Eine Mikroarray-Analyse des Transkriptoms aus Leber-Biopsien infizierter Schimpansen ergab, dass Gene der angeborenen Immunantwort nicht hochreguliert waren (Wieland et al., 2004 - nicht editiert und überprüft). Allerdings wurde in dieser Untersuchung im Mikroarray ebenfalls keine Induktion von IFN- γ (Interferon γ) gemessen, obwohl dieses im selben Versuch mit einer anderen Methode eindeutig nachgewiesen worden war. Da in den Schimpansen die virale DNA bereits zurückging, bevor die adaptive Immunantwort messbar war (Thimme et al., 2003), liegt eine Beteiligung des angeborenen Immunsystems nahe. Eine Rolle

könnte hierbei IL-6 (Interleukin 6) spielen, welches wahrscheinlich durch die Erkennung von HBV durch Nichtparenchym-Zellen der Leber über TLR-2 (*toll like receptor 2*) induziert wird (Hosel et al., 2009). Die Wirkung von NK (Natürliche Killer) Zellen in der HBV Infektion ist unklar (Mondelli et al. 2010). Sie treten in der akuten Infektion erst nach dem Rückgang der viralen DNA auf (Dunn et al., 2009). In den hepatischen „Flares“, dem Aufflammen der Entzündung in der chronischen Infektion, korrelieren NK Zellen und Leberschaden (Dunn et al., 2007).

1.1.6 Prophylaxe und Therapie der HBV Infektion

1984 wurde rekombinant in Hefe hergestelltes HBsAg als Impfstoff erfolgreich in Schimpansen getestet (McAleer et al., 1984). Seit 1995 gibt es in Deutschland eine generelle Impfeempfehlung für Säuglinge, Kinder und Jugendliche, so dass 2008 90 % der Kinder bei der Schuleingangsuntersuchung eine vollständige Grundimmunisierung hatten (RKI, 2010). Trotz des vermeintlichen Schutzes besteht die Sorge, dass sich Mutationen in der α -Determinante des HBsAg durchsetzen, gegen die die Impf-induzierten Antikörper nicht schützen (Carman et al., 1990; Clements et al., 2010). Etwa 5 % der Geimpften sind sogenannte „non-responder“, die keinen protektiven Antikörpertiter von ≥ 10 IU/L anti-HBs entwickeln (Coates et al., 2001).

Neben der aktiven gibt es auch eine kostenintensive passive Immunisierung gegen HBV. Zur Postexpositionsprophylaxe oder zur Vorbeugung der perinatalen Infektion werden Immunglobuline aus hochtitrigen anti-HBs-Seren verabreicht (Cornberg et al., 2007).

Eine akute Hepatitis B beim Erwachsenen (ohne fulminanten Verlauf) wird aufgrund der hohen Spontanheilungsrate nicht therapiert. Eine Indikation zur antiviralen Behandlung besteht, wenn die Virämie 10^4 Viruskopien/ml überschreitet, die Leber-Transaminasen im Serum erhöht sind und/oder eine Fibrose in der Leber vorliegt.

Als Medikamente stehen Nukleotid- und Nukleosidanaloga, sowie (pegyliertes) Interferon α (IFN- α bzw. pegIFN- α) zur Verfügung. Letzteres wird dabei bevorzugt zu Therapiebeginn eingesetzt, da die Therapie kürzer ist und es auch zum Verlust des HBsAg kommen kann, was als dauerhafter Therapieerfolg gewertet wird (Cornberg et al., 2007). Eine Studie konnte zeigen, dass Patienten mit einer Infektion des Genotyps A besonders gut auf die Therapie mit pegIFN α ansprechen, was sich durch einen HBsAg-Verlust in 11-21% der Patienten zeigte. Für alle anderen Genotypen lag die Rate des dauerhaften Therapieerfolgs mit 0-2,6% (Lau et al., 2005) ungefähr auf dem Niveau der Spontanheilungsrate bei chronisch-Infizierten (Fattovich, 2003).

Nukleosidanaloga (Lamivudin, Telbivudin, Entecavir) und Nukleotidanaloga (Tenofovir, Adefovir) werden bevorzugt von der viralen Reversen Transkriptase eingebaut. Da sie keine 3'-

Hydroxylgruppe haben, können keine weiteren Nukleotide angebaut werden und es kommt zum Abbruch der DNA-Synthese. Dies führt in der Regel zu einer starken Reduzierung der Viruslast, einer Verbesserung der Leberhistologie und einer besseren Langzeitprognose bezüglich der Folgeerkrankungen der chronischen Hepatitis B (Tillmann, 2007).

Probleme der gängigen Therapien sind hohe Kosten, starke Nebenwirkungen gegen IFN- α , sowie das Auftreten von resistenten Viren. Durch Mutationen im aktiven Zentrum der Reversen Transkriptase kommt es beispielsweise nach 4 Jahren zu Medikamenten-Resistenzen in 71 % der Lamivudin- und 18 % der Adefovir-behandelten Patienten (Kwon and Lok, 2011). Dieses Phänomen wird durch eine geringe Therapie-Adhärenz begünstigt. Die Analoga müssen täglich für mehrere Jahre oder lebenslang genommen werden, was von ca. einem Drittel der Patienten nicht eingehalten wird, da sie bis zum Fortschreiten der Lebererkrankung keine Symptome zeigen (Pol and Sogni, 2010).

Festzuhalten ist, dass keine der Therapien zu einer Elimination des Virus führt und in der Regel keine protektiven Antikörper gegen HBsAg gebildet werden. Die episomale Form der viralen DNA, die cccDNA, ist nicht Angriffspunkt der Therapien, persistiert daher in infizierten Hepatozyten und dient weiterhin als Matrize für die Transkription (Dandri et al., 2000; Moraleda et al., 1997).

Bisher ist kein Zytokin-abhängiger Mechanismus bekannt, der die cccDNA angreift. In den infizierten Zellen befinden sich 5-50 Kopien der cccDNA. Die Halbwertszeit der cccDNA wurde anhand von Tiermodellen für DHBV auf 35-57 Tage (Kastenmuller et al., 2009) und für WHV auf 33-50 Tage (Zhu et al., 2001) geschätzt. In beiden Fällen persistierte die cccDNA unter antiviraler Therapie länger als 20 Wochen mit 1-10 Kopien/Zelle. Aufgrund der zusätzlichen Halbwertszeit der Teilung von Hepatozyten von > 6 Monaten, kann die Eliminierung der cccDNA in der akuten Infektion nur durch zytolytische Mechanismen erklärt werden. Die cccDNA kann dabei entweder durch die Lyse der infizierten Zelle eliminiert werden oder zusätzlich reduziert werden, indem sich eine benachbarte infizierte Zelle zur Leber-Regeneration teilt, und dabei die cccDNA auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt wird. (Mason et al., 2007).

Eine Immuntherapie, die die T-Zellantwort des Patienten moduliert, ist daher zurzeit die einzig vorstellbare Lösung, eine Eliminierung der cccDNA zu erreichen. Dies könnte beispielsweise über eine therapeutische Vakzinierung geschehen, bei der durch Kombination von immunogenen Substanzen oder Impfvektoren mit viralen Proteinen deren Aufnahme durch Antigen-präsentierende Zellen erhöht wird (Wood, 2011). Eine andere Möglichkeit stellt die adoptive T-Zelltherapie dar, bei der die T-Zellen des Patienten mit einem HBV-spezifischen Rezeptor versehen werden (Bohne and Protzer, 2007).

1.2 Adoptive T-Zelltherapie

Die adoptive T-Zelltherapie ist eine Form der Transfusionstherapie, bei der große Mengen an T-Zellen in den Patienten transfundiert werden, mit dem Ziel eine Tumorerkrankung oder virale Infektion zu eliminieren oder zumindest unter immunologische Kontrolle zu bringen (Varela-Rohena et al., 2008a).

Die ersten Erkenntnisse über diese Art von Therapie wurden bei Patienten gewonnen, die eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) bekommen hatten. Um das „Anwachsen“ der Spender-Zellen zu erleichtern oder um gleichzeitig die ursächliche maligne Erkrankung zu behandeln, werden die Patienten bestrahlt oder mit einer myeloablativen Chemotherapie behandelt. Ebenso werden zur Vorbeugung gegen eine „Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion“ (*Graft-versus-Host Disease*, GvHD) Immunsuppressiva verabreicht oder die T-Zellen des Spenders depletiert. Dies alles kann zur Folge haben, dass latente Viren, wie das Cytomegalovirus (CMV) oder Epstein-Barr-Virus (EBV), nicht mehr der Kontrolle des Immunsystems unterliegen und mit fataler Folge reaktivieren (Berger et al., 2009). Wurden CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellklone oder polyklonale T-Zelllinien des Spenders angereichert und kurz nach der HSZT transfundiert, so persistierten die transferierten funktionalen Zellen und konnten die virale Erkrankung kontrollieren (Einsele et al., 2002; Peggs et al., 2003; Walter et al., 1996).

Da spezifische T-Zellen in Tumorerkrankungen oder chronischen viralen Infektionen oft erschöpft oder gar nicht vorhanden sind, wurde das Konzept eines Rezeptor-Gentransfers entwickelt. Sowohl natürliche T-Zellrezeptoren als auch Chimäre Antigen Rezeptoren (CAR) können über viralen Gentransfer in beliebige T-Zellen eingebracht werden (Abb. 1.7). Nach dem Transfer mit beiden Arten von Rezeptoren konnten Remissionen von Tumoren beobachtet werden (Morgan et al., 2006; Pule et al., 2008).

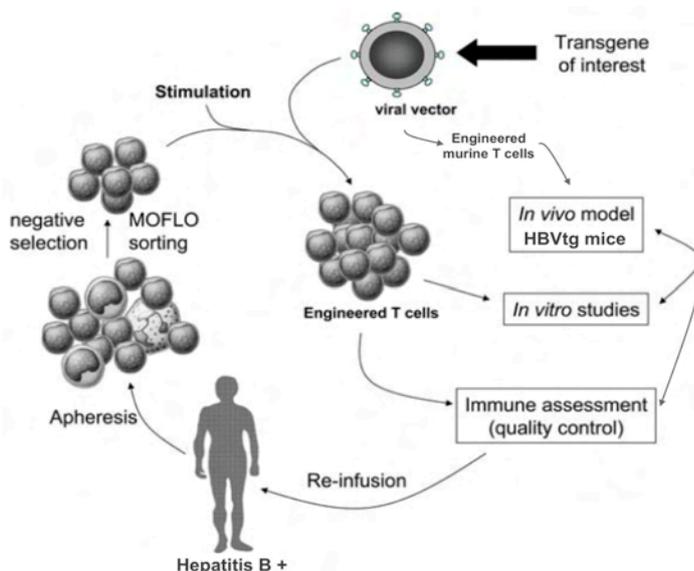


Abb. 1.7: Überblick über die Strategie bei einer T-Zelltherapie am Beispiel der chronischen Hepatitis B. Die mononukleären Zellen des Patienten werden über Leukapherese gewonnen und der gewünschte Zelltyp ggf. über ein Sortiergerät, z.B. MoFlo, isoliert. Die Zellen werden stimuliert und durch retrovirale Transduktion mit dem Gen für einen HBV-spezifischen T-Zellrezeptor oder CAR versehen. Die so generierten T-Zellen mit neuer Spezifität können *in vitro* oder analoge murine T-Zellen in HBVtg bzw. HBVtg/HLA-A2⁺ Mäusen evaluiert werden. Bei Erfolg kann die Prozedur mit größeren Mengen und unter GMP-Bedingungen (*Good Manufacturing Practice*) wiederholt werden und die modifizierten Zellen dem Patienten re-infundiert werden (modifiziert nach: Varela-Rohena et al., 2008).

1.2.1 Zytotoxische T-Zellen

T-Zellen sind als Teil des adaptiven Immunsystems unter Anderem für die Erkennung und Eliminierung von Zellen zuständig, die prozessierte Fremdantigene präsentieren. Sie entstehen aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark und differenzieren im Thymus (T).

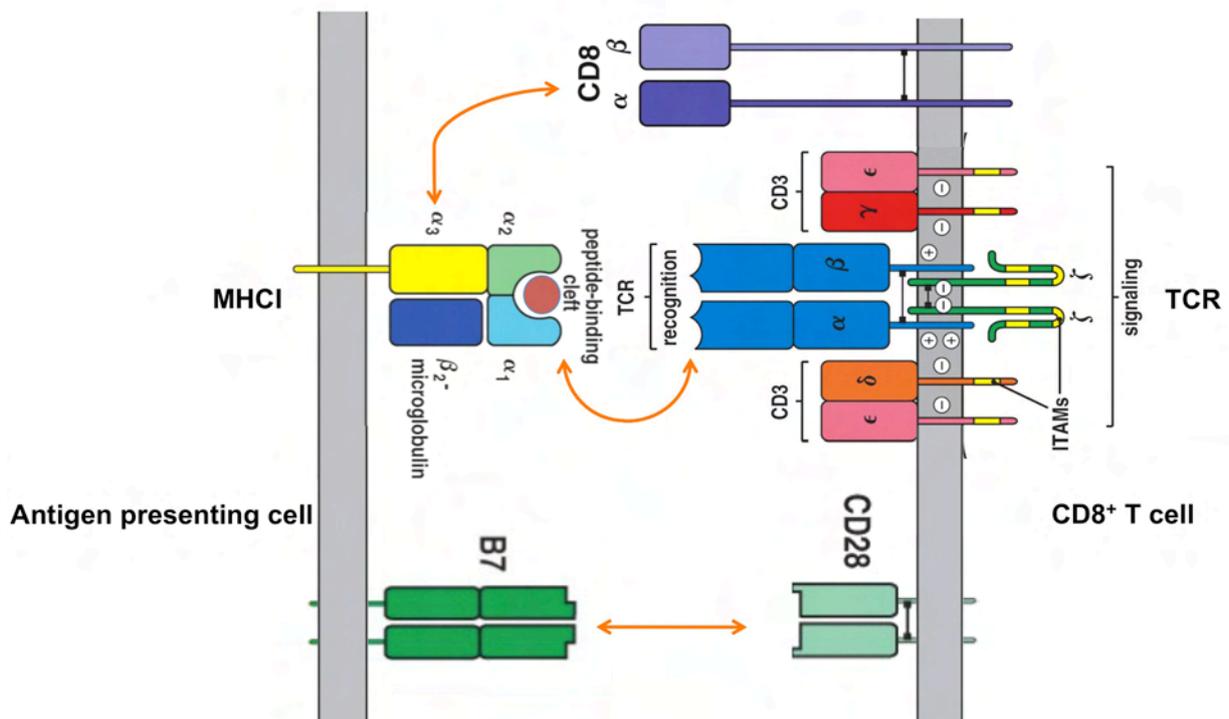


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Aktivierung einer CD8⁺ Zelle. Die T-Zellen zirkulieren zwischen Blut und peripheren Lymphorganen, wo sie ggf. auf ihr spezifisches Antigen treffen. Das MHC I-Molekül der Antigen-präsentierenden Zelle besteht aus einer in der Membran verankerten α -Kette mit drei Domänen und dem nicht kovalent assoziierten β -2-Mikroglobulin. Das TCR-Heterodimer aus α - und β -Kette ist mit mehreren CD3 Signalketten komplexiert, δ , γ und $2 \times \epsilon$ mit extrazellulären Teilen und einem ζ Homodimer intrazellulär. Erkennt der TCR sein entsprechendes Peptid im MHC Kontext, so wird in der T-Zelle durch Phosphorylierung der Tyrosine in den CD3-ITAM-Motiven (gelb) eine Signalkaskade ausgelöst. Das Signal wird durch die Bindung des Ko-Rezeptors CD8 an das MHC I-Molekül etwa 100fach verstärkt. Für eine Aktivierung der T-Zelle und ihre klonale Expansion ist die Kostimulation über B7 und CD28 unabdingbar (modifiziert nach: Janeway et al., 2005).

Zytotoxische CD8⁺ T-Zellen erkennen Peptide die auf MHC I-Molekülen präsentiert werden (Major Histocompatibility Complex, MHC). MHC I wird von allen Zellen außer den roten Blutkörperchen mit unterschiedlicher Intensität exprimiert. Proteine im Zytosol, somit auch virale Antigene, werden kontinuierlich vom Proteasom zu Peptiden prozessiert, die dann im ER auf MHC I-Moleküle geladen und an die Zelloberfläche gebracht werden. Alternativ können Antigene auch von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) über Endozytose aufgenommen und über einen bisher ungeklärten Mechanismus auf MHC I-Molekülen präsentiert

werden. Dieser Vorgang nennt sich Kreuz-Präsentation und ist vor allem für die antivirale Immunantwort wichtig, wenn die APC selbst nicht von dem Virus infiziert werden. Der Komplex aus MHC und Peptid kann von den entsprechenden spezifischen T-Zellrezeptoren (TZR) erkannt werden (Abb. 1.8). Die Erkennung durch den TZR wird nicht nur durch das präsentierte Peptid bestimmt, sondern auch durch den MHC-Haplotyp. Die unterschiedlichen MHC-Moleküle werden im Menschen mit Hilfe des HLA-Systems unterteilt (*human leukocyte antigen*), in der Maus mit dem H-2 System. Für die Ketten des menschlichen MHCI und MHCII gibt es jeweils drei Gene: HLA-A, HLA-B und HLA-C bzw. HLA-DR, HLA-DP und HLA-DQ. Allein für die MHCI-Gene gibt es 303, 559 bzw. 150 bekannte Allele, die beliebig miteinander kombiniert werden können, so dass eine Vielzahl verschieden zusammengesetzter MHC entstehen kann.

Aktiviert zytotoxische T-Zellen produzieren Zytokine, wie z.B. IL-2, welches (autokrin) zur Proliferation und Differenzierung anregt. Die Produktion von TNF- α , TNF- β und IFN- γ aktiviert wiederum Makrophagen. TNF- β kann für einige Zellen auch direkt zytotoxisch sein und IFN- γ hat direkte antivirale Wirkung.

Die zytotoxische Effektorfunktion der CD8⁺ Zellen kann über zwei Arten ausgeführt werden: die Freisetzung von lytischen Granulae mit Perforin und Granzymen, sowie die Interaktion von Fas-Rezeptor (FasR) und Fas-Ligand (FasL). Die Bindung von FasL an FasR auf der Zielzelle führt zur Aktivierung von Kaspasen und endet mit der Induktion der Apoptose, dem programmierten Zelltod. Die Ausschüttung von Perforin und Granzymen aus den lytischen Granulae führt ebenfalls zur Induktion von Apoptose: Perforin polymerisiert in der Zielzellmembran und bildet Poren, durch die die Granzyme (Proteasen, die Kaspasen schneiden) in die Zielzelle gelangen und dadurch eine Apoptose-Kaskade in Gang setzen (Abken, 2009).

1.2.2 Transfer von T-Zellrezeptoren

Bei einem T-Zelltransfer werden für eine (von mehreren) Transfusionen etwa 10^9 bis 10^{10} Effektor T-Zellen benötigt. Um diese hohe Zellzahl von Antigen-spezifischen T-Zelllinien oder sogar T-Zellklonen heranzuziehen, dauert es mehrere Wochen. Es kommt hinzu, dass autologe, spezifische T-Zellen gegen Tumorantigene oder Antigene chronischer Viruserkrankungen teilweise nicht isoliert werden können oder sie derart vom Immunsystem moduliert wurden, dass sie nicht mehr funktional sind und nicht mehr proliferieren (Berger et al., 2009; Varela-Rohena et al., 2008a). Außerdem kann es sein, dass die isolierten T-Zellen zwar funktional sind, aber ihr T-Zellrezeptor eine niedrige Avidität zum MHCI : Peptid Komplex aufweist. Es konnte gezeigt werden, dass hoch-avide T-Zellen ihre Zielzellen schneller lysieren und auch Zellen mit einer

geringeren Antigendichte besser erkennen (Derby et al., 2001; Knabel et al., 2002). Aus den genannten Gründen wurde ein Konzept entwickelt, das den Transfer von T-Zellrezeptoren mit definierter Spezifität verfolgt.

Die Spezifität von T-Zellrezeptoren für ihr Antigen wird ausschließlich durch die Kombination ihrer α - und β -Ketten bestimmt. Ähnlich wie bei Immunglobulinen haben beide Ketten einen konstanten und einen variablen Teil, der in der β -Kette aus den Segmenten V (*variable*), D (*diversity*) und J (*joining*) und in der α -Kette aus den Segmenten V und J zusammengesetzt ist (Abken, 2009). Eine detaillierte Beschreibung findet sich in Abb. 1.9. Die Gensequenzen, die für einen TZR mit gewünschter Spezifität codieren, können aus einem T-Zellklon isoliert werden. Nach Klonierung in virale Vektoren können sie in eine große Anzahl von T-Zellen des Patienten transduziert werden. Dabei ist zu beachten, dass der Spender, aus dem der TZR isoliert wurde, und der Patient das entsprechende gleiche HLA-I-Molekül haben müssen.

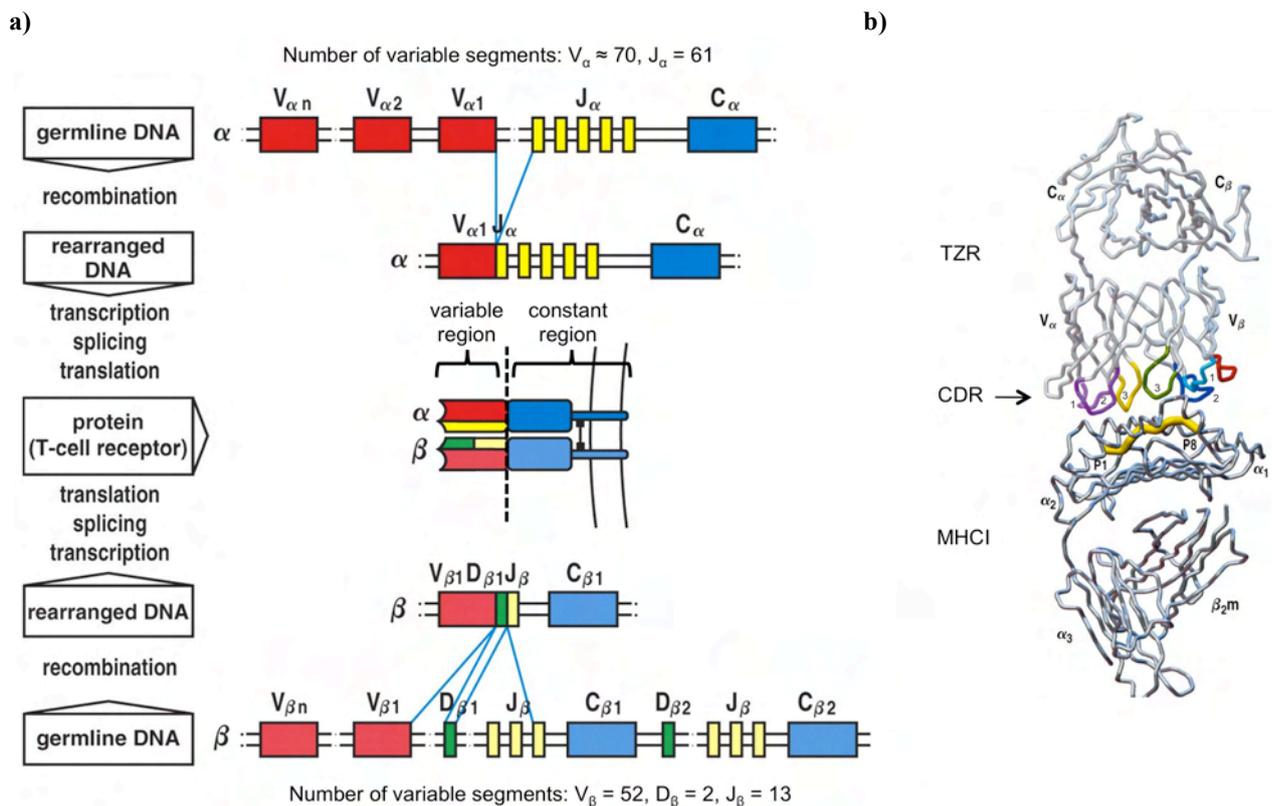


Abb. 1.9: T-Zellrezeptor Variabilität. a) Gen-Reorganisation der α - und β -Ketten. Die Segmente der TZR-Ketten werden durch somatische Rekombination während der T-Zellentwicklung zusammengesetzt. An den Verbindungsstellen der Segmente können zusätzlich beliebige Nukleotide inseriert werden. Die mRNA wird vor der Translation gespleißt. Durch die hohe Anzahl an verschiedenen Segmenten entsteht rechnerisch eine Diversität von 10^{18} verschiedenen TZR. b) Modell der TZR - MHC-Erkennung. Jeweils drei Schleifenstrukturen pro TZR-Kette bilden die Antigenbindestelle (CDR, *complementarity determining region*). Die CDR3 Regionen sind für die Spezifität des TZRs entscheidend, da sie den zentralen Teil des präsentierten Peptids (gelb) binden. Sie sind hypervariabel, da sie an der Nahtstelle von V- und J-Segment (α -Kette), bzw. an der Nahtstelle des V-Segment, das komplette D-Segment überspannend bis in das J-Segment (β -Kette) codiert werden. P1 und P2: Ankerpositionen des Peptids. Rot: Hypervariable Schleife HV4, Bindestelle für virale Superantigene (modifiziert nach: Janeway et al., 2005).

1.2.3 Transfer von Chimären Antigen Rezeptoren

T-Zellen können auch mit Chimären Antigen Rezeptoren (CAR) ausgestattet werden. Es handelt sich hierbei um eine einzige Polypeptidkette, die aus einer extrazellulären Antigen-Bindungs-Domäne und einer intrazellulären Signaldomäne zusammengesetzt ist (Abb. 1.10). Die Bindestelle besteht aus einem ScFv-Teil (*single chain variable fragment*), der aus einem Antikörper gewünschter Spezifität gentechnisch gewonnen wird. Die variable schwere und leichte Kette des Immunglobulins (V_H und V_L) werden dazu über einen flexiblen Peptidteil verknüpft ((Gly₄Ser)₃) (Abken, 2009). Für eine optimale Bindung an das Antigen und die Dimerisierung zweier CAR-Moleküle ist ein Abstandshalter zur Zellmembran nötig, der vom CH₂-CH₃-Fc (*Fragment, crystallizable*) Teil des Immunglobulins G abgeleitet ist (Hombach et al., 2010).

Die erste Generation der CAR hatte typischerweise nur eine intrazelluläre CD3 ζ -Signaldomäne. In der zweiten Generation wurden dem zytoplasmatischen Teil verschiedene ko-stimulatorische Domänen angehängt, z.B. CD28, 4-1BB oder ICOS, wodurch eine bessere Aktivierung der T-Zellen erreicht werden konnte (Kowolik et al., 2006; Maher et al., 2002). Mittlerweile werden in dritter Generation auch CAR getestet, die drei intrazelluläre Signaldomänen vereinen (Zhong et al., 2010). Derzeit laufen in den USA elf klinische Studien, in denen CAR-modifizierte T-Zellen in der Immuntherapie von malignen B-Zell-Erkrankungen eingesetzt werden (Kohn et al., 2011). Das Prinzip des CARs kann ebenso für die Bekämpfung viraler Erkrankungen eingesetzt werden.

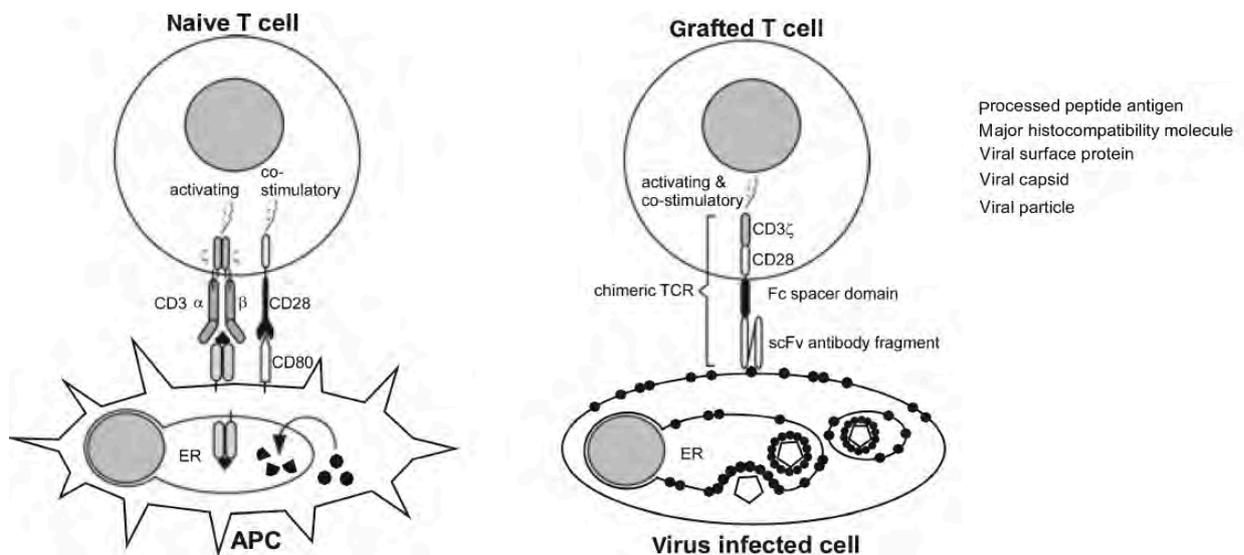


Abb. 1.10: Schematische Darstellung der Aktivierung über einen natürlichen T-Zellrezeptor oder über einen Chimären Antigen Rezeptor. Links: Der TZR erkennt ein Peptid, das von einer Antigen-präsentierenden Zelle (APC) präsentiert wird. Zur Aktivierung ist die Ko-Stimulation von CD28 mit CD80 (B7.1) notwendig. Rechts: Der CAR erkennt ein nicht-prozessiertes Epitop auf der Zelloberfläche einer infizierten Zelle. Die Bindung ist also unabhängig von MHC-Molekülen. Eine Ko-Stimulation ist nicht nötig (Bohne and Protzer, 2007).

Die Funktionalität eines CARs gegen die HBV-Hüllproteine konnte in humanen *in vitro* Systemen bereits bewiesen werden. Wurden humane T-Zellen mit dem CAR versehen, so produzierten sie bei Kontakt mit HBV-positiven Zielzellen Zytokine und töteten diese ab (Bohne et al., 2008). Das in diesem CAR eingesetzte ScFv-Fragment („C8“) wurde über ein „Phagen-Display“ mit PBMCs geimpfter Spender gewonnen (Kürschner, 2000). Es erkennt ein konformationelles Epitop aus der S-Domäne und somit alle drei Hüllproteine (Gückel, 2005).

Offene Fragen bezüglich der klinischen Anwendung eines HBV-spezifischen CARs beziehen sich hauptsächlich auf die Funktionalität und Persistenz transferierter T-Zellen unter den Bedingungen einer tolerogenen Umgebung in der Leber und der Gegenwart hoher Mengen an freien (sub-)viralen Partikeln im Blut (Protzer and Abken, 2010).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Der Krankheitsverlauf der chronischen Hepatitis B ist mit einer unzureichenden T-Zellantwort assoziiert. Antivirale Medikamente kontrollieren die Virus-Replikation posttranskriptional, führen aber nicht zu einer Elimination des Krankheitserregers. Die adoptive T-Zelltherapie mit Zellen, die künstlich mit einem HBV-spezifischen Rezeptor versehen werden, stellt einen innovativen Ansatz für eine Immuntherapie der chronischen Hepatitis B dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, T-Zellen gegen HBV-infizierte Zellen zu redigieren, und den Effekt einer adoptiven T-Zelltherapie gegen die Hepatitis B im Mausmodell zu untersuchen. Dazu sollten zunächst der in der Arbeitsgruppe entwickelte Chimäre Antigen Rezeptor (CAR) in murine T-Zellen eingebracht und seine Funktionalität *in vitro* überprüft werden. Dies erforderte die Optimierung der Stimulations- und Transduktionsprotokolle muriner Lymphozyten. Anschließend sollten funktionale, CAR-modifizierte T-Zellen adoptiv in HBV-transgene Mäuse transferiert und deren Funktionalität, Einwanderung in die Leber und antiviraler Effekt *in vivo* evaluiert werden.

Ein weiteres Ziel war es, aus akut HBV-infizierten Individuen, sowie aus Personen mit einer ausgeheilten HBV-Infektion, gegen HBV-Epitope gerichtete, HLA-A2 restringierte T-Zellen zu selektieren und zu klonieren. Aus diesen T-Zellen sollte die genetische Information für den jeweiligen T-Zellrezeptor gewonnen werden, um diese später über retrovirale Vektoren wieder in primäre T-Zellen einbringen zu können. Um auch diese Rezeptoren *in vivo* evaluieren zu können, sollte ein geeignetes Maus-Modell generiert werden.

2 Ergebnisse

Für die Entwicklung einer T-Zelltherapie der chronischen Hepatitis B wurden zwei Ansätze verfolgt. Zunächst werden die Ergebnisse aus der *in vivo* Evaluierung eines Chimären Antigen Rezeptors gegen die Hüllproteine von HBV dargestellt. Als alternativer Therapieansatz folgt die Identifizierung von natürlichen HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren.

2.1 *In vivo* Evaluierung eines Chimären Antigen Rezeptors gegen die Hüllproteine des Hepatitis B Virus

2.1.1 Charakterisierung des murinisierten HBV-spezifischen CARs *in vitro*

Die Funktionalität eines Chimären Antigen Rezeptors gegen die HBV-Hüllproteine (S-CAR) konnte in humanen *in vitro* Systemen bereits bewiesen werden (Bohne et al., 2008). Für den Einsatz eines HBV-spezifischen Rezeptors in der Klinik muss dessen Wirksamkeit zunächst *in vivo* belegt werden. Als Modell wurden HBV-transgene (HBVtg) Mäuse gewählt, da das Virus durch die ständige Transkription von dem genomischen HBV-Integrat quasi persistiert und die Mäuse ähnlich wie in einer chronischen Infektion eine Toleranz für die viralen Antigene entwickeln. Für den Einsatz im Mausmodell wurden der Fc-Abstandshalter, die Transmembrandomäne und die intrazellulären Signaldomänen murinisiert (Abb. 2.1) (Hohn, 2007). Als Grundlage hierfür diente ein murinisierte CAR, der in der Arbeitsgruppe von Hinrich Abken (Labor für Tumorgenetik, Uniklinik Köln) optimiert worden war (Chmielewski, 2007). Dieser erkennt den Tumormarker „Carcinoembryonales Antigen“ (CEA-CAR) und diente in den folgenden Versuchen als Negativkontrolle, da CEA nicht in den verwendeten Mäusen oder Zielzellen exprimiert wird.

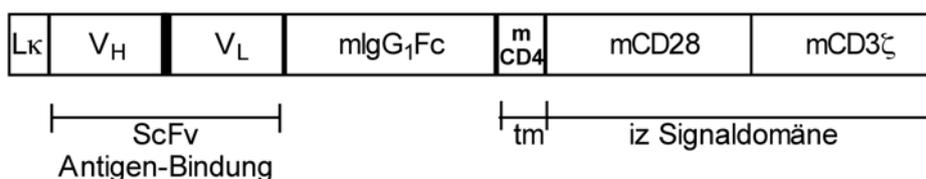


Abb. 2.1: Schematische Darstellung eines murinisierten CARs. Die Kappa-Leader Sequenz (L κ) führt zum Transport des CARs an die Zelloberfläche. Der vom murinen Immunglobulin G abgeleitete Abstandshalter (mIgG₁Fc) verbindet die schwere (V_H) und leichte (V_L) Kette des einkettigen Antikörperfragments (ScFv) mit der murinen CD4 Transmembrandomäne. Der intrazelluläre Teil besteht aus den murinen CD28 und CD3 ζ Signaldomänen.

2.1.1.1 Retrovirale Transduktion von murinen T-Zellen

Die Expressions-Kassette der CAR wurde durch retrovirale Transduktion in die murinen T-Zellen eingebracht. Dazu wurden zunächst die Splenozyten aufgereinigt und mit IL-2 und löslichen Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert (Abb. 2.2, links). Für die Produktion der Retroviren wurden die Plasmide mit der CAR-DNA in die Verpackungszelllinie Plat-E transfiziert. Diese Zellen produzieren stabil die retroviralen Strukturproteine Gag, Pol und Env des „Moloney Murinen Leukämievirus“ (MoMuLV) (Morita et al., 2000). Da sich vor der genetischen Information für den CAR ein Verpackungssignal für Retroviren befindet, wird diese RNA in der Zelllinie in die Viruspartikel verpackt und in den Überstand sekretiert. Dieser retrovirale Überstand wurde zu den stimulierten T-Zellen gegeben, so dass die Retroviren diese infizieren konnten. Die CAR-RNA wird von der viralen Reversen Transkriptase in DNA umgeschrieben und kann als Provirus stabil in das Wirtsgenom integrieren. Wird der CAR exprimiert, so kann er an der Zelloberfläche durch Antikörper gegen den Fc-Abstandshalter detektiert werden.

Im Zuge der Arbeit wurde auch ein alternatives Transduktionsprotokoll getestet (siehe 2.1.3.1), bei dem aus den Milzzellen erst die CD8⁺ Zellen isoliert und diese dann auf Antikörperbeschichteten Platten mit IL-12 stimuliert wurden (Abb. 2.2, rechts).

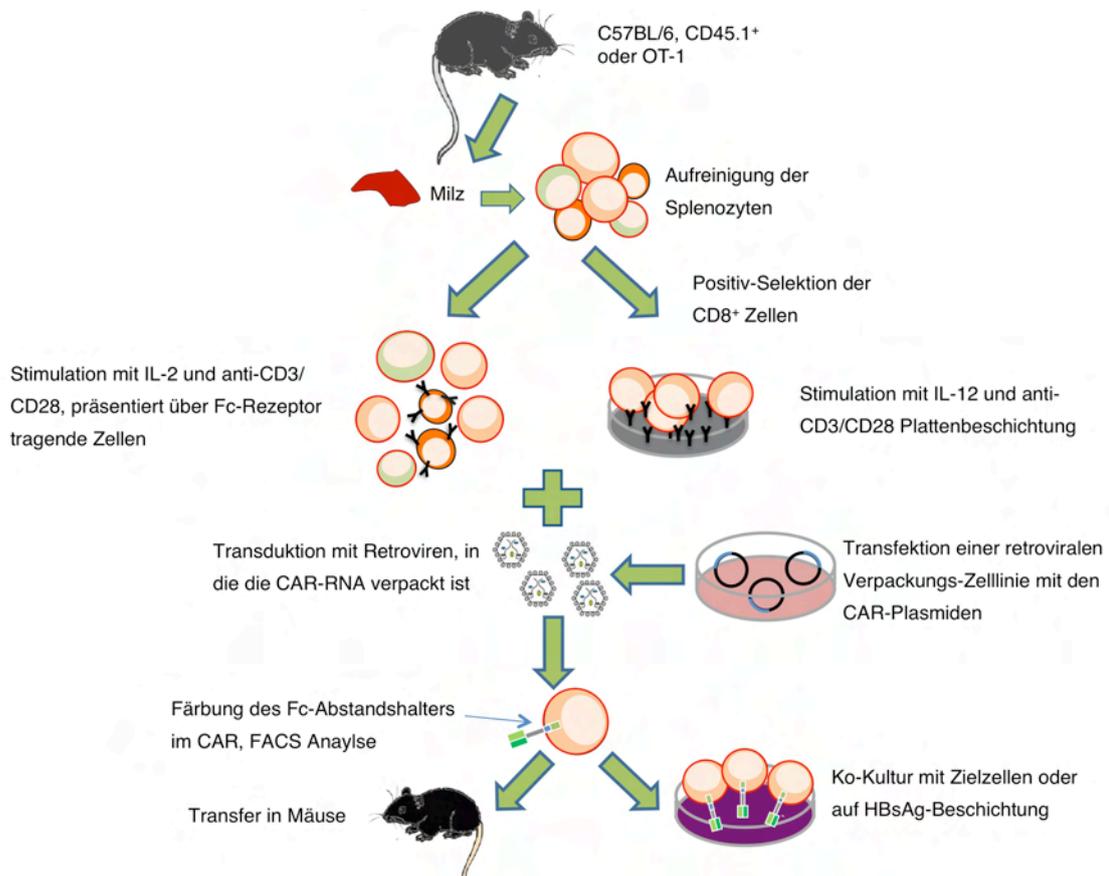


Abb. 2.2: Retrovirale Transduktion von murinen T-Zellen. Erläuterungen siehe Text.

Abb. 2.3 zeigt die mittels Durchflusszytometrie gemessene Effizienz der retroviralen Transduktion. Nach der Stimulation mit IL-2 proliferierten die CD8⁺ Zellen stark, so dass sie etwa zwei Drittel der Gesamtpopulation ausmachten. Die Hälfte der Zellen exprimierte den S-CAR und die Transduktionseffizienz war damit höher als die des CEA-CARs. Auch CD8⁻ Zellen die fast ausschließlich CD4⁺ Zellen waren (Daten nicht gezeigt) exprimierten die Rezeptoren.

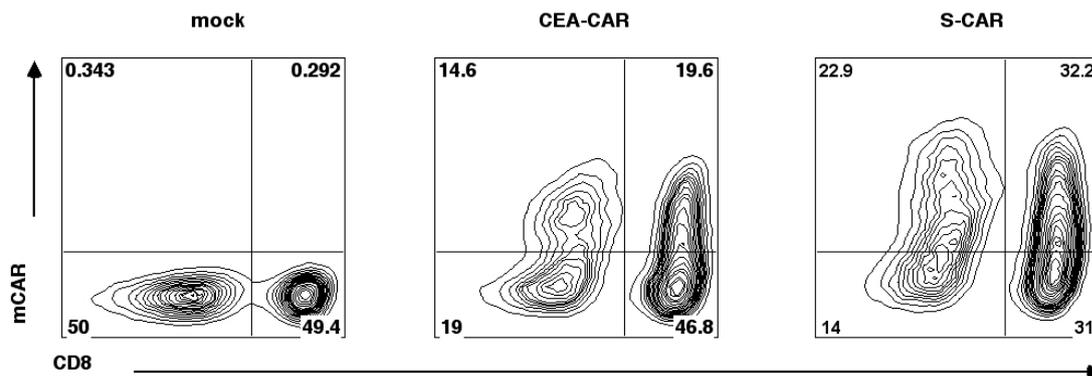


Abb. 2.3: Expression der murinisierten CARs (Durchflusszytometrie).

2.1.1.2 Charakterisierung von HBV-met Zellen

HBV-met ist eine murine Hepatozyten-Zelllinie, die sich differenzieren lässt und in der das Hepatitis B Virus repliziert. Die Zellen konnten nach Kreuzung von HBVtg Mäusen mit AT-cyto-MET Mäusen aus den Lebern der Nachkommen gewonnen werden (Pasquetto et al., 2002). Im AT-cyto-MET Mausstamm ist die extrazelluläre Domäne des *Hepatocyte growth factor receptors* (auch *mesenchymal-epithelial transition factor*) deletiert, wodurch die Hepatozyten immortalisiert werden (Amicone et al., 1995; Amicone et al., 1997).

Um zu überprüfen, ob sich HBV-met als Zielzellen in einer Ko-Kultur mit CAR-S T-Zellen eignen, wurde die Expression des HBV S-Proteins analysiert. Da für die Transkription der HBV-Proteine Transkriptionsfaktoren nötig sind, die nur in differenzierten Hepatozyten vorliegen (Quasdorff et al., 2008), wurden die HBV-met Zellen zunächst mit DMSO differenziert. Erst zehn Tage nach Differenzierung konnte im Western Blot von Zelllysaten eine gute Expression des HBsAg nachgewiesen werden (Abb. 2.4a).

Die Sekretion von HBsAg in den Überstand erreichte nach acht Tagen ein Niveau, welches in der humanen HBV-replizierenden Hepatomzelllinie HepG2.2.15 bereits nach vier Tagen Differenzierung erreicht wird (Daten nicht gezeigt). Wird das DMSO aus dem Medium entfernt, so nimmt die Produktion von HBsAg schnell ab (Abb. 2.4b).

Eine Immunfluoreszenz-Färbung des S-Proteins ergab, dass HBV in nur etwa 15 % der Hepatozyten replizierte (Abb. 2.4c).

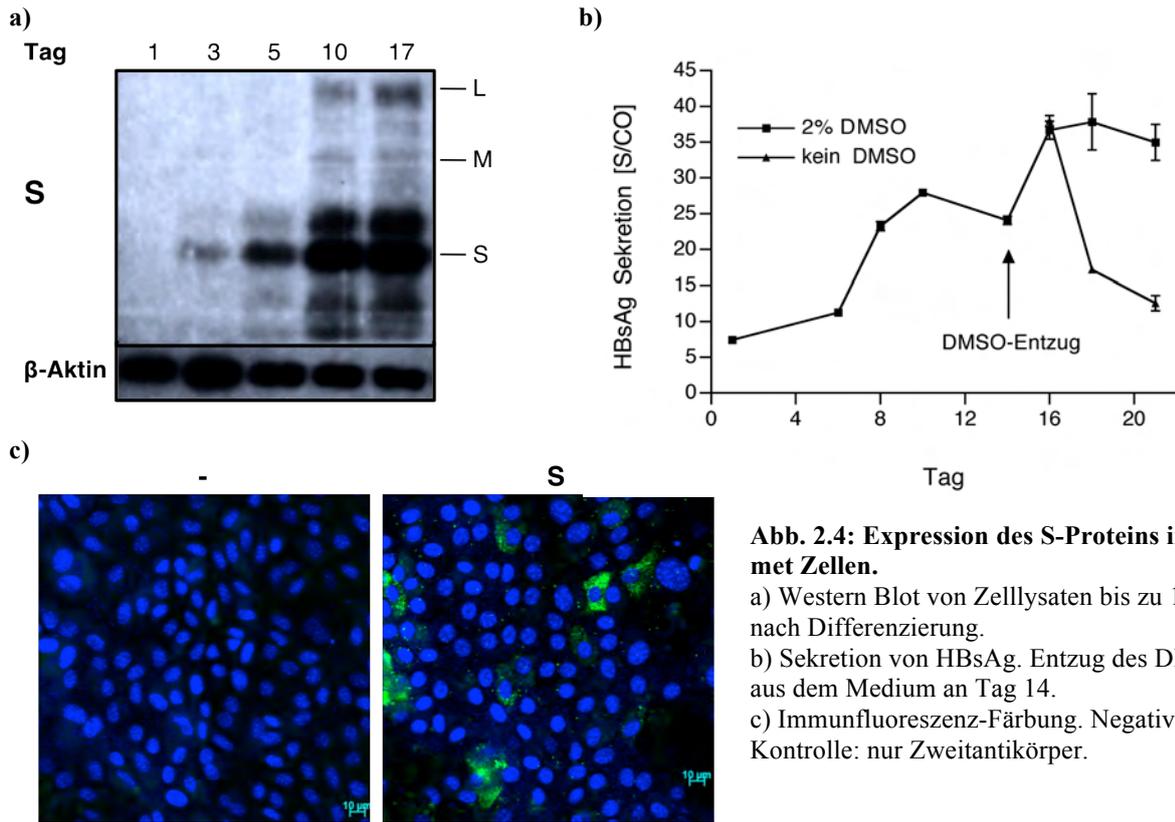


Abb. 2.4: Expression des S-Proteins in HBV-met Zellen.

a) Western Blot von Zelllysaten bis zu 17 Tage nach Differenzierung.
 b) Sekretion von HBsAg. Entzug des DMSO aus dem Medium an Tag 14.
 c) Immunfluoreszenz-Färbung. Negativ-Kontrolle: nur Zweitantikörper.

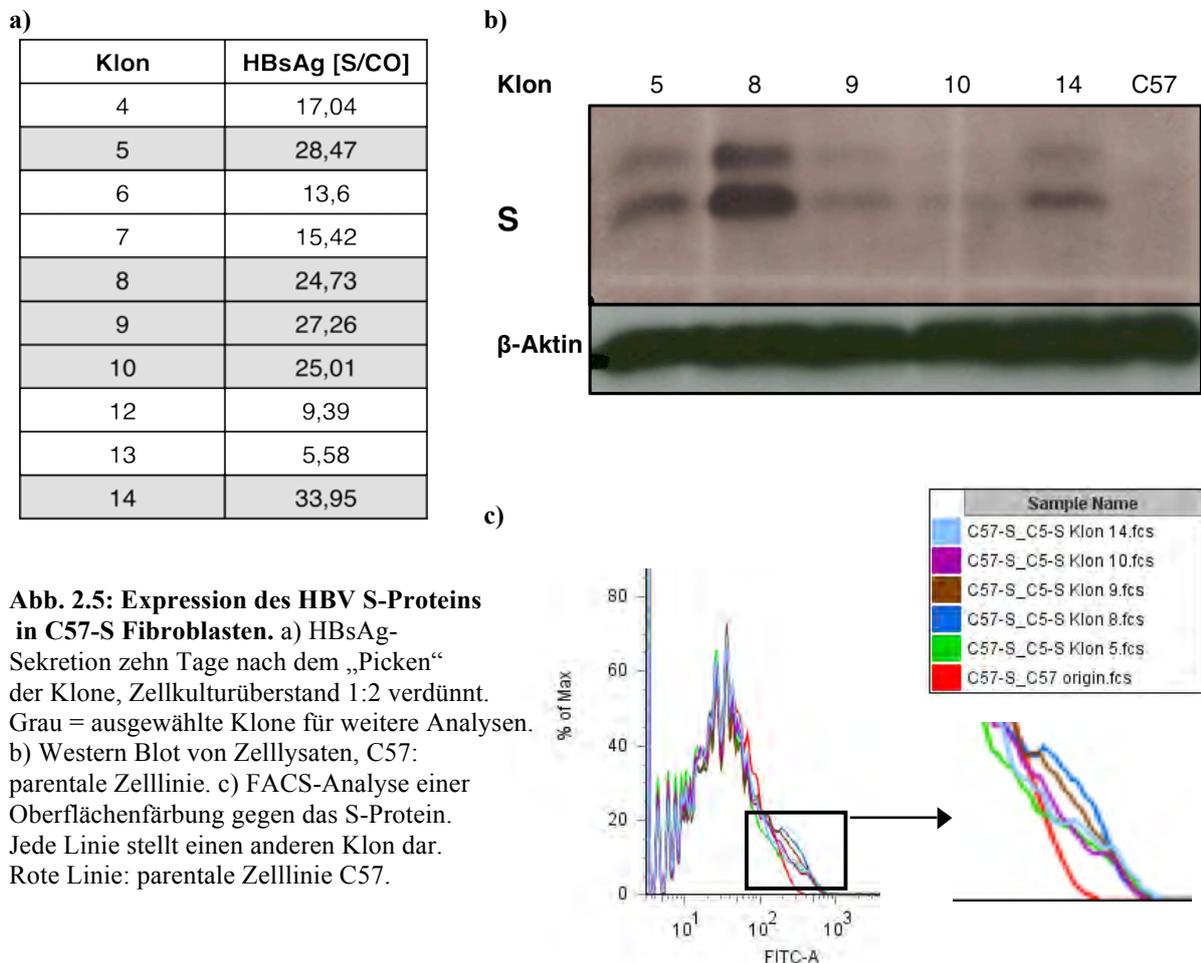


Abb. 2.5: Expression des HBV S-Proteins in C57-S Fibroblasten. a) HBsAg-Sekretion zehn Tage nach dem „Picken“ der Klone, Zellkulturüberstand 1:2 verdünnt. Grau = ausgewählte Klone für weitere Analysen. b) Western Blot von Zelllysaten, C57: parentale Zelllinie. c) FACS-Analyse einer Oberflächenfärbung gegen das S-Protein. Jede Linie stellt einen anderen Klon dar. Rote Linie: parentale Zelllinie C57.

2.1.1.3 Generierung einer S-exprimierenden Fibroblasten-Zelllinie

Als eine alternative Zelllinie wurde das S-Protein stabil in murine C57 Fibroblasten eingebracht. Dazu wurden das S-codierende Plasmid pMHS und ein Plasmid, das eine Neomycin-Resistenz trug, linearisiert und im Verhältnis 30:1 in C57 Zellen transfiziert. Nach Selektion mit Neomycin wurden resistente Klone isoliert und auf Sekretion des S-Proteins überprüft. Von 14 getesteten Klonen waren 10 positiv und die 5 Klone mit der höchsten Expression wurden jeweils weiter analysiert (Abb. 2.5a). Sowohl die Detektion des S-Proteins im Western Blot von Zelllysaten (Abb. 2.5b), als auch eine Färbung des S-Proteins auf der Zelloberfläche (Abb. 2.5c), war bei „C57-S“ Klon 8 am deutlichsten.

2.1.1.4 Ko-Kultur von CAR⁺ T-Zellen mit murinen Zielzellen

Die in 2.1.1.2 und 2.1.1.3 beschriebenen Zelllinien wurden als Zielzellen ($T = Targets$) in einer Ko-Kultur mit T-Zellen eingesetzt, die murinisierte CAR exprimierten ($E = Effectors$). Die Effektoren wurden in drei verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, während die Zahl der Zielzellen immer gleich gehalten wurde. 72 Stunden nach Beginn der Ko-Kultur wurde IFN- γ im Überstand als Marker für die Aktivierung der T-Zellen bestimmt. Mit beiden Zielzellen konnte keine spezifische Aktivierung über den murinisierten S-CAR erreicht werden. Bei einem Zellverhältnis von 3:1 produzierten die S-CAR transduzierten T-Zellen in Ko-Kultur mit C57-S Zellen ca. 30% mehr IFN- γ als die CEA-CAR⁺ T-Zellen, bzw. als bei Ko-Kultur mit C57 Zellen. Allerdings galt dies nicht für niedrigere E:T Verhältnisse (Abb. 2.6a). Auch durch die HBV-met Zellen konnte keine Zytokin-Ausschüttung ausgelöst werden. Nur die HBV-negative Kontroll-Zelllinie führte zu einer unspezifischen Aktivierung (Abb. 2.6b).

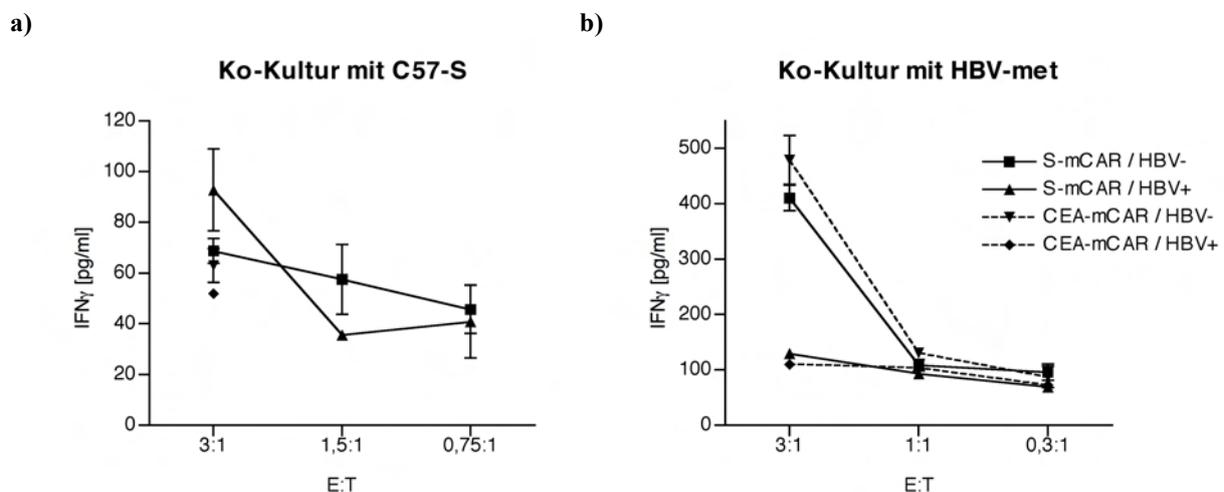


Abb. 2.6: Ko-Kultur von transduzierten T-Zellen mit murinen Zielzellen. Bestimmung von IFN- γ im Überstand mittels ELISA nach 72h Ko-Kultur. E:T= Ratio von Effektor- zu Zielzelle. a) HBV+ Zielzellen: C57-S, HBV- Zielzellen: C57. b) HBV+ Zielzellen: HBV-met, HBV- Zielzellen: HepG2.

2.1.1.5 Funktionalität des murinisierten S-CAR Konstruktes

Da die Zelllinien C57-S und HBV-met nicht die erwartete Aktivierung über den S-CAR auslösten, musste die Funktionalität des CARs überprüft werden. Hierzu wurden B3Z Zellen transduziert und nach einer FACS-Sortierung eine Reinheit von 87 % S-CAR⁺ Zellen erreicht (Abb. 2.7a). Bei der Zelllinie B3Z handelt es sich um ein T-Zell-Hybrid, das bei Aktivierung IL-2 und β -Galaktosidase exprimiert (Sanderson and Shastri, 1994).

3×10^5 S-CAR⁺ Zellen wurden für 48 Stunden auf HBsAg-beschichteten Zellkulturplatten inkubiert, wobei sich eine Aktivierung über den S-CAR („C8“) sowohl in Form von IL-2 Produktion als auch der β -Galaktosidase Aktivität zeigte (Abb. 2.7b).

In einer Immunfluoreszenz-Färbung konnte gezeigt werden, dass der S-CAR auf der Oberfläche der B3Z_C8 Zellen exprimiert wurde und gefärbte Subvirale Partikel (SVP) an ihn banden (Abb. 2.8). Somit konnte ein Fehler in der Antigenbindung oder der Signalweiterleitung des murinen S-CARs ausgeschlossen werden.

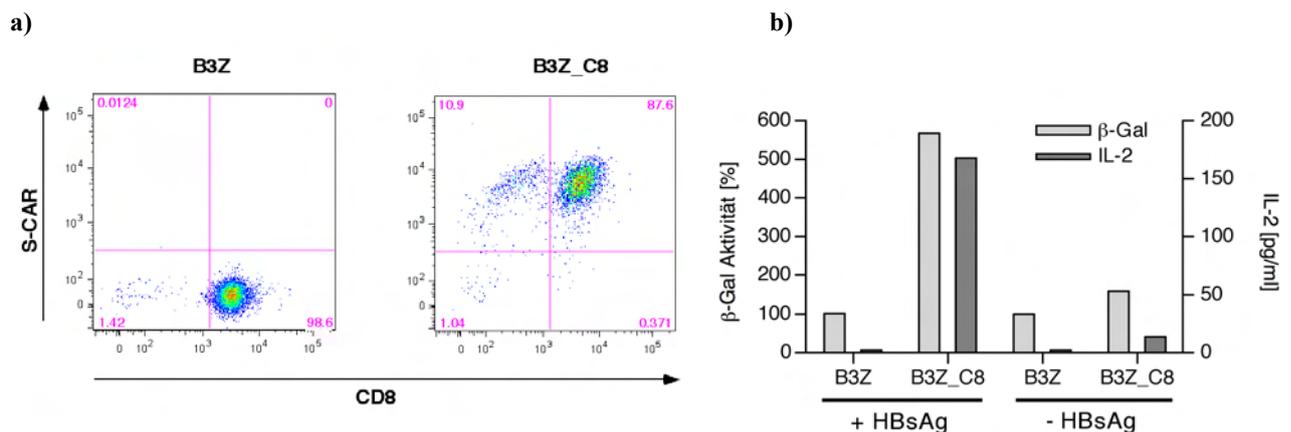


Abb. 2.7 Aktivierung über den murinisierten S-CAR. B3Z = T-Zell Hybrid, B3Z_C8 = stabile Expression des murinisierten S-CARs in B3Z Zellen. a) FACS-Analyse der S-CAR Expression nach Sortierung der S-CAR⁺ Zellen der B3Z_C8 Linie. b) Stimulierung des S-CARs durch HBsAg. IL-2 im Überstand nach 48h wurde mit einem ELISA bestimmt. Die β -Galaktosidase Aktivität wurde nach Lyse der Zellen und Zugabe des Substrats CPRG gemessen. Sie wurde zu der OD₅₇₀ der parentalen B3Z Zellen + HBsAg relativiert.

2.1.1.6 Funktionalität von T-Zellen nach Stimulation

Damit Retroviren in den Zellkern gelangen, dort stabil in das Wirtsgenom integrieren und hierdurch die Zellen transduzieren können, müssen sich die Wirtszellen in Teilung befinden. Dafür werden die T-Zellen vor und während der zwei Transduktionen unspezifisch mit IL-2 und Antikörpern gegen CD3 und CD28 stimuliert (2.1.1.1). Um auszuschließen, dass dieses Protokoll die primären Zellen überstimuliert und sie deshalb in den beschriebenen Ko-Kulturen (2.1.1.4) nicht mehr aktivierbar waren, wurde die Funktionalität des endogenen TZR nach Stimulation überprüft.

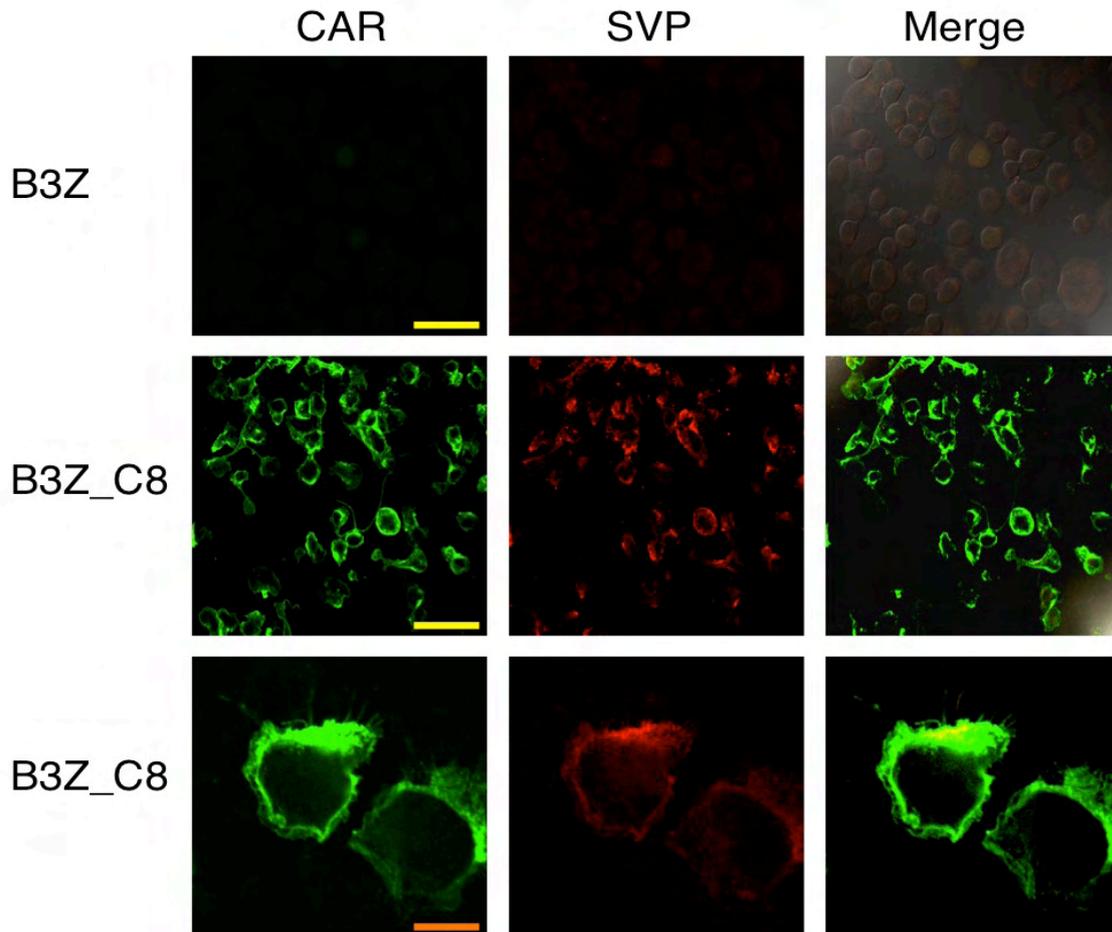


Abb. 2.8: Bindung von Subviralen Partikeln an den murinisierten S-CAR. B3Z = T-Zell Hybrid, B3Z_C8 = stabile Expression des murinisierten S-CARs. CAR = anti-mIgG Alexa488, SVP = Subvirale Partikel, direkt mit Alexa594 markiert. Gelber Balken = 75µm, oranger Balken = 10µm. Merge = Überlagerung der zwei Kanäle + Differenzialinterferenzkontrast.

Für diesen Versuch wurden T-Zellen aus transgenen OT-1 Mäusen gewonnen. Diese Mäuse exprimieren ausschließlich einen TZR, der das Peptid mit der Aminosäuresequenz SIINFEKL erkennt, wenn es auf dem murinen MHC-I des Typs H-2K^b präsentiert wird (Hogquist et al., 1994). Als Zielzellen in einer Ko-Kultur dienten C57 Zellen, deren H-2K^b zuvor mit dem SIINFEKL Peptid beladen worden waren. Verglichen wurden die zytotoxische Aktivität und die IFN- γ -Produktion der T-Zellen direkt nach der Aufarbeitung aus der Milz bzw. nach Transduktion, was eine 72-stündige Stimulation erfordert.

Bei einem vergleichbaren E:T Verhältnis (z.B. 3-1:1) war die zytotoxische Wirkung der stimulierten T-Zellen kaum geringer als die der nicht stimulierten T-Zellen (Abb. 2.9a). Auch wenn die IFN- γ -Sekretion nach der Stimulation nur noch halb so hoch war (Abb. 2.9b), lässt sich

sagen, dass die T-Zellen nach Stimulation noch aktivierbar waren und es nicht zu einer Überstimulation durch das verwendete Transduktionsprotokoll kam.

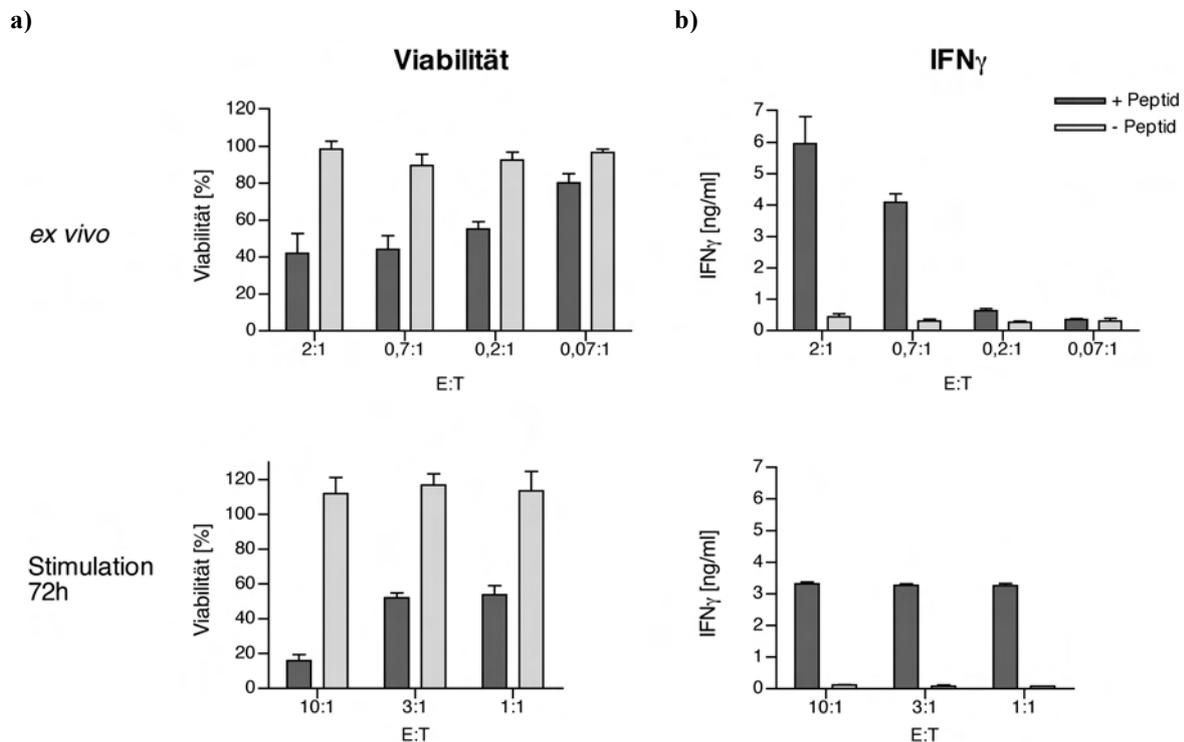


Abb. 2.9: Funktionalität von T-Zellen vor und nach der unspezifischen Stimulation. T-Zellen mit Spezifität für das Peptid SIINFEKL wurden mit Peptid-beladenen (dunkelgrau) oder unbeladenen (hellgrau) C57 Zellen kultiviert. Die T-Zellen wurden entweder direkt *ex vivo* in der Ko-Kultur eingesetzt (obere Reihe) oder erst dem dreitägigen Transduktionsprotokoll unterzogen (untere Reihe). a) Viabilität der Zielzellen wurde mit einem XTT-Test bestimmt. b) IFN- γ im Überstand wurde mittels ELISA gemessen.

2.1.2 Charakterisierung des humanisierten CARs in murinen T-Zellen

2.1.2.1 Aktivierung von CAR⁺ T-Zellen

Sowohl die Antigen-Bindung als auch die Signalweiterleitung im murinisierten CAR funktionierten und die Zellen wurden während der Transduktion nicht überstimuliert. Trotzdem fand keine Aktivierung der transduzierten T-Zellen statt. Im folgenden Versuch wurden aus diesem Grund der humanisierte CAR (Abb. 2.10) und HepG2.2.15 als Zielzellen eingesetzt. Dies ist eine stabil HBV-replizierende humane Hepatomzelllinie, die auf der parentalen Linie HepG2 beruht (Sells et al., 1987). Beide waren bereits in den Vorarbeiten zur Analyse des S-CARs in humanen T-Zellen verwendet worden (Bohne et al., 2008). Die Transduktionsrate des murinisierten und humanisierten S-CARs war vergleichbar. Der humanisierte CEA-CAR wurde nur halb so gut exprimiert wie der murinisierte CEA-CAR (Abb. 2.11).

Es stellte sich heraus, dass der humanisierte CAR nur zu einer Aktivierung der T-Zellen führte, wenn diese mit den HBV-positiven HepG2.2.15 kultiviert wurden, nicht aber mit den murinen HBV-met Zellen oder den HepG2 Zellen. Die Sekretion von IFN- γ betrug bei Kultivierung mit HepG2.2.15 etwa 3000 pg/ml, wurde die gleiche Anzahl von Effektoren nur mit dem Überstand der HepG2.2.15 Zellen inkubiert, so wurden durchschnittlich 436 pg/ml sezerniert (Daten nicht gezeigt). Durch den murinisierten CAR konnte auch mit den HepG2.2.15 Zellen kein IFN- γ induziert werden (Abb. 2.12b).

Dies bestätigt, dass HBV-met Zellen als Zielzellen in diesem Versuchsansatz nicht geeignet sind und legt die Vermutung nahe, dass der murinisierte S-CAR in primären T-Zellen, im Gegensatz zu dem immortalisierten T-Zell-Hybrid, nicht funktioniert. Aus diesem Ergebnis ergab sich, dass in allen folgenden Experimenten nur noch mit dem humanisierten CAR und den Zielzellen HepG2.2.15 gearbeitet wurde.

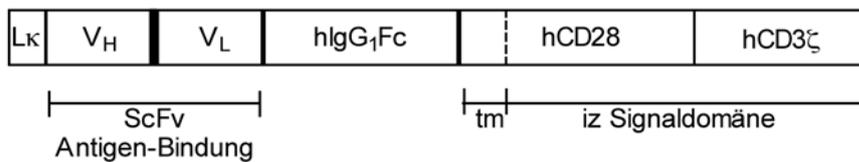


Abb. 2.10: Schematische Darstellung eines humanisierten CARs. Die Kappa-Leader Sequenz (L κ) führt zum Transport des CARs an die Zelloberfläche. Der vom humanen Immunglobulin G abgeleitete Abstandshalter (hIgG₁Fc) verbindet die schwere (V_H) und leichte (V_L) Kette des einkettigen Antikörperfragments (ScFv) mit den intrazellulären humanen CD28 und CD3 ζ Signaldomänen.

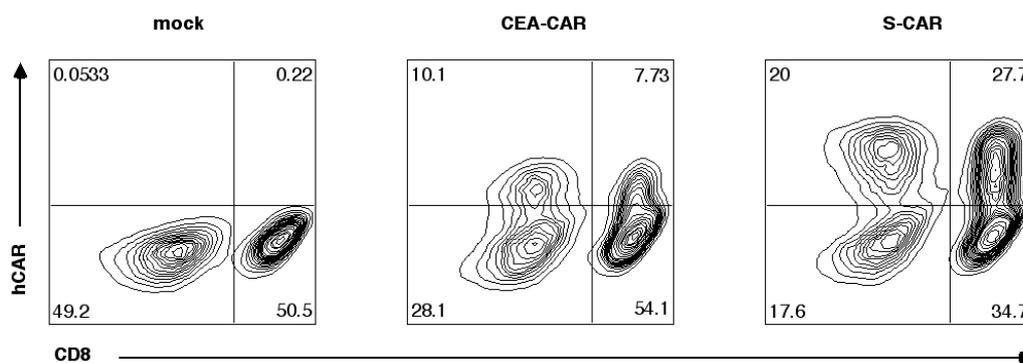


Abb. 2.11: Expression der humanisierten CARs in murinen T-Zellen (Durchflusszytometrie).

2.1.2.2 Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren

In den oben beschriebenen Experimenten wurden die Gene der chimären Rezeptoren über den retroviralen Vektor pBULLET in die T-Zellen eingebracht. Dabei wurde beobachtet, dass T-Zellen, die mit diesem Vektor transduziert worden waren, nach adoptivem Transfer in Mäuse das Transgen nur noch schwach exprimierten (persönliche Mitteilung Li-Rung Huang, IMMEI Bonn).

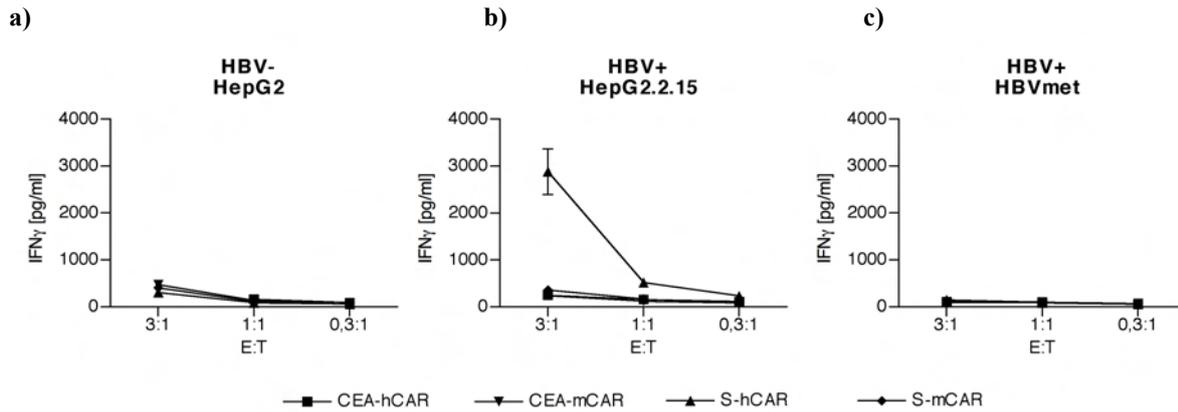


Abb. 2.12 Vergleich von murinisiertem und humanisiertem CAR in Ko-Kultur mit murinen und humanen Zielzellen. Bestimmung von IFN- γ im Überstand mittels ELISA nach 72h Ko-Kultur. E:T= Ratio von Effektor- zu Zielzelle. mCAR= murinisiertes CAR, hCAR= humanisiertes CAR. a) HBV- humane Zielzellen: HepG2. b) HBV+ humane Zielzellen: HepG2.2.15. c) HBV+ murine Zielzellen: HBV-met.

Aus diesem Grund wurden die CAR-Konstrukte in die alternativen Vektoren pMP71 (Engels et al., 2003) und pMSCV (Hawley et al., 1996) umklontiert und das Expressionsniveau verglichen. Für die Transduktion wurden beide in 2.1.1.1 beschriebenen Protokolle durchgeführt. Sowohl mit dem pBULLET als auch mit dem pMP71 Vektor konnte mit beiden Methoden eine gute Expression gleicher Intensität erzielt werden (X-Achse). Allerdings war die Transduktionsrate mit dem pMP71 Vektor bei IL-2 Stimulation höher als mit den anderen beiden Vektoren (Y-Achse) (Abb. 2.13, blaue und rote Linie). Die Expression des S-CARs und die Effizienz der Transduktion mit dem pMSCV Vektor war sowohl mit IL-2 als auch mit IL-12 Stimulation schlechter als die Vergleichsvektoren (Abb. 2.13, grüne Linie).

Wurden die IL-2 stimulierten Zellen auf HBsAg-beschichtete Platten gegeben, zeigte sich, dass bei gleicher Anzahl CAR-positiver Zellen die Aktivierung pMP71-transduzierter Zellen am höchsten war (Abb. 2.14a). In einer Ko-Kultur mit den IL-12 stimulierten Zellen war die Induktion von IFN- γ durch die beiden Vektoren identisch (Abb. 2.14b+c). Für die folgenden Experimente wurden die CAR-Konstrukte im Vektor pMP71 verwendet.

Es ist zu beachten, dass nach IL-12 Stimulation die spezifische IFN- γ -Ausschüttung bei einem E:T Verhältnis von 1:1 mit ca. 4000 pg/ml etwa 8 mal so hoch war wie nach IL-2 Stimulation (Abb. 2.12b vs. Abb. 2.14b). Ebenso war aber auch die unspezifische IFN- γ -Sekretion durch CEA-CAR-transduzierte Zellen oder auch die bei Ko-Kultur mit HBV-negativen Zielzellen erhöht (Abb. 2.12a vs. Abb. 2.14c).

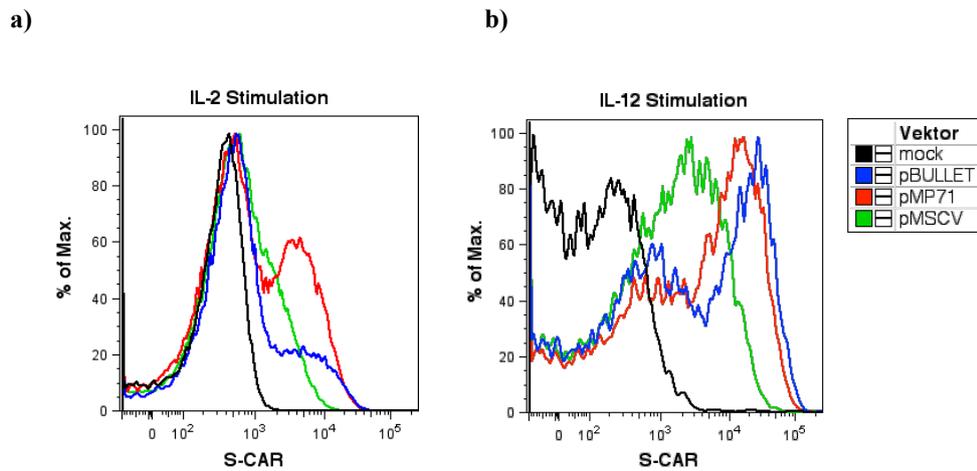


Abb. 2.13: Expression des S-CARs nach Transduktion mit verschiedenen retroviralen Vektoren. FACS-Analyse. A) IL-2 Stimulation oder B) IL-12 Stimulation während der Transduktion.

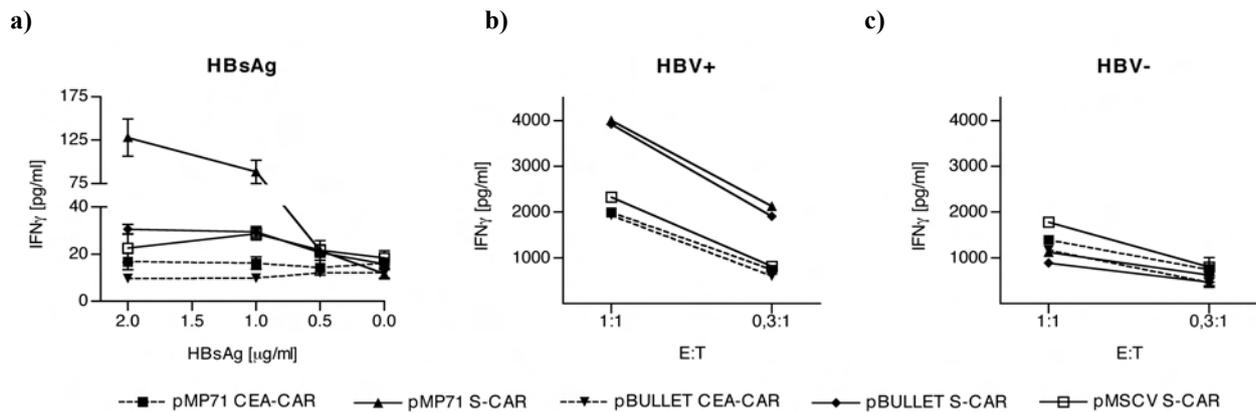


Abb. 2.14: Ko-Kultur nach Transduktion mit verschiedenen retroviralen Vektoren. Bestimmung von IFN-γ im Überstand mittels ELISA nach 72h Ko-Kultur. E:T= Ratio von Effektor- zu Zielzelle. a) Inkubation auf HBsAg Beschichtung mit abnehmender Konzentration. b) HBV+ Zielzellen: HepG2.2.15. c) HBV- Zielzellen: HepG2.

2.1.2.3 Antigen-abhängige Proliferation von CAR⁺ T-Zellen

Als ein weiterer Marker der Aktivierung transduzierten T-Zellen wurde deren Antigen-abhängige Proliferation untersucht. Während der Inkubation der T-Zellen mit dem Retrovirus werden nicht alle Zellen transduziert. Von einer Sortierung und somit Anreicherung der CAR⁺ Zellen wurde abgesehen, da es Bedenken gab, man könne durch die nötige Antikörper-Färbung des Rezeptors die Zellen unspezifisch stimulieren. In den Ko-Kulturen wurde also immer ein Gemisch aus transduzierten und nicht transduzierten Zellen eingesetzt.

HBV-negative oder HBV-replizierende Zellen wurden jeweils mit dem Gemisch aus CAR⁺ und CAR⁻ Zellen ko-kultiviert. Um die Antigen-abhängige Proliferation der transduzierten T-Zellen zu untersuchen, wurde dem Medium Bromdesoxyuridin (BrdU) zugefügt. BrdU ist ein Thymidin-Analogon, das während der DNA-Synthese in der S-Phase des Zellzyklus anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird. Mit spezifischen Antikörpern gegen BrdU können so proliferierende Zellen nachgewiesen werden. Die transduzierten T-Zellen, die den HBV-spezifischen CAR trugen, zeigten eine signifikante, 4-fach erhöhte Proliferation gegenüber nicht-transduzierten Zellen, wenn sie mit HBV-replizierenden Zellen inkubiert wurden. Etwa 5% der T-Zellen proliferierten unabhängig davon, ob sie den S-CAR exprimierten oder auf welcher Ziel-Zelllinie sie inkubiert wurden (Abb. 2.15).

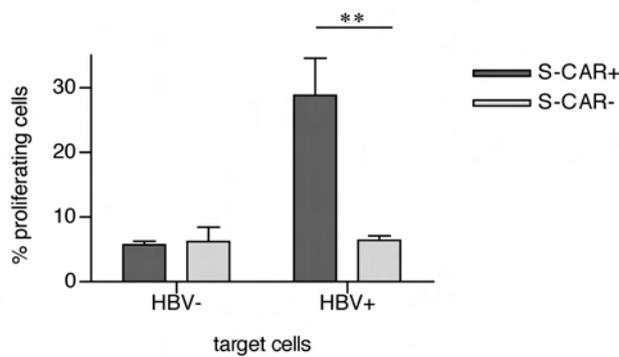


Abb. 2.15: Proliferation von S-CAR transduzierten Zellen. Die Zellen aus dem S-CAR Transduktionsansatz wurden für 72 h ohne unspezifische Stimuli wie IL-2 oder IL-12 mit HBV⁺ Zellen inkubiert. Der Ko-Kultur wurde für eine Stunde BrdU zugefügt, welches bei Proliferation in die DNA eingebaut wird. Dann wurden die nicht adhärennten T-Zellen abgewaschen, gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das Gating erfolgte auf CAR⁺ und CAR⁻ Zellen. Y-Achse: BrdU-inkorporierende Zellen.

2.1.2.4 Zytotoxizität von CAR⁺ T-Zellen

Induktion von Apoptose in der Wirtszelle ist ein Effektormechanismus, durch den intrazelluläre Krankheitserreger eliminiert werden können. Der programmierte Zelltod kann sowohl über die Interaktion von Fas-Rezeptor und Fas-Ligand, als auch über die Ausschüttung von Granulae, gefüllt mit Perforin und Granzymen, ausgelöst werden. Letzteres ist der häufiger verwendete Effektormechanismus für zytotoxische T-Zellen (Trapani and Smyth, 2002).

Wie bereits oben herausgestellt wurde, stand für die Charakterisierung muriner T-Zellen mit Spezifität für das HBV S-Protein keine geeignete murine Zielzelllinie zur Verfügung. Da das murine Effektormolekül Granzym B in humanen Zielzellen nur schwer eine Apoptose induzieren kann (Kaiserman et al., 2006), wurde zum Nachweis einer Perforin/Granzym Ausschüttung ein indirektes Nachweisverfahren angewendet. Kommt es zur Degranulation der Effektormoleküle, so gelangt das *lysosomal associated membrane glycoprotein 1* (LAMP-1, auch CD107a) aus der

Lipid-Doppelschicht der Granulae in die Zellmembran und ist dort detektierbar (Betts et al., 2003).

Es zeigte sich, dass nur in den S-CAR transduzierten Zellen durch Aktivierung mit HBsAg die Granulae mobilisiert wurden und LAMP-1 an die Zelloberfläche gelangte und die Zellen somit zytotoxisches Potential hatten.

Die Antigen-stimulierten S-CAR⁺ Zellen erschienen in der Durchflusszytometrie als Population mit unterschiedlich hohem Niveau der LAMP-1 Färbung (Abb. 2.16 rechts, rote Linie). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass nach der Degranulation Vesikel von der Zellmembran ins Endosom transportiert werden. Dabei gelangt der bereits gebundene anti-LAMP1 Antikörper auch in das Endosom und könnte dort durch Proteasen und einen niedrigen pH-Wert degradiert werden. Hinzu kommt, dass das Fluoreszenzsignal intrazellulär wahrscheinlich schwächer ist.

Eine spezifische Veränderung der FasL-Expression wurde nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

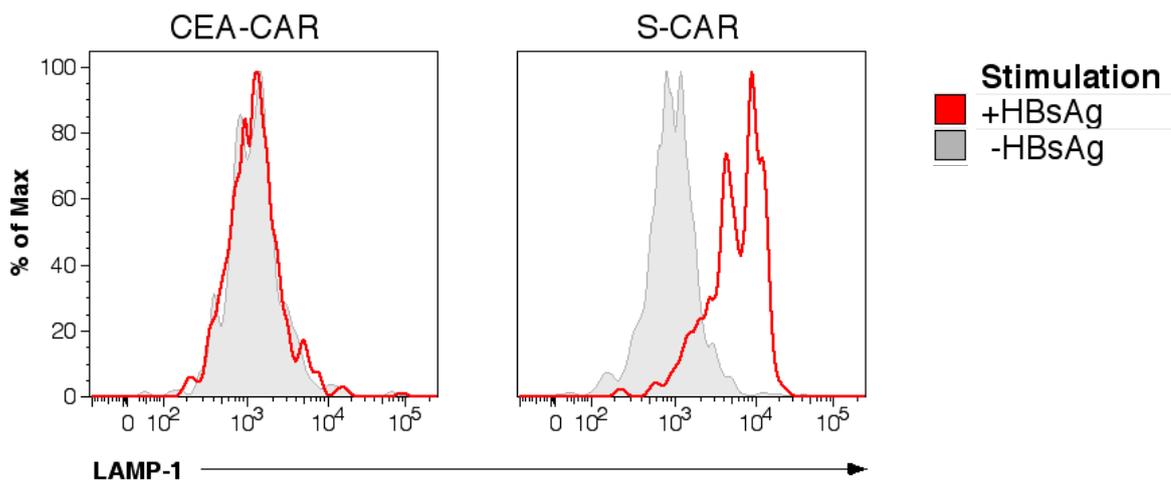


Abb. 2.16: Mobilisierung von LAMP-1 nach Inkubation von transduzierten Zellen mit HBsAg. T-Zellen wurden auf HBsAg-beschichteten (rot) oder unbeschichteten (grau) Platten im Beisein eines anti-LAMP-1-Alexa647 Antikörpers für 4 h inkubiert. Das Gating in der anschließenden FACS-Analyse erfolgte auf CD8⁺, CEA-CAR⁺ bzw. S-CAR⁺ Zellen.

2.1.3 Adoptiver Transfer von CAR⁺ T-Zellen in HBV-transgene Mäuse

2.1.3.1 Vergleich von IL2- und IL-12 Stimulation

Nachdem gezeigt werden konnte, dass murine T-Zellen, die einen HBV-spezifischen CAR exprimieren, alle Eigenschaften einer aktivierten Effektorzelle erfüllen (IFN- γ Produktion, Proliferation, zytotoxisches Potential), sollte ein optimales Protokoll für den adoptiven Transfer dieser Zellen gefunden werden. Die erwarteten Voraussetzungen für einen erfolgreichen T-Zelltransfer waren, dass die injizierten Zellen überleben und in die Leber gelangen würden, dem Organ der HBV-Replikation.

Anfänglich wurde mit einem gängigen IL-2 Stimulationsprotokoll gearbeitet. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit konnte innerhalb der Projektgruppe „Hepatitis und Hepatozelluläres Karzinom“ der „Helmholtz-Allianz Immuntherapie von Krebserkrankungen“ gezeigt werden, dass eine IL-12 Konditionierung während der Transduktion zu einer verstärkten Proliferation der T-Zellen *in vivo* führte (persönliche Mitteilung Li-Rung Huang, IMMEI, Bonn).

Ein wesentlicher Unterschied zwischen IL-2 und IL-12 Stimulationsprotokoll war, dass für die IL-12 Stimulation vorher eine Positivselektion von CD8⁺ Zellen stattfand. Dies sollte verhindern, dass CD8-negative Splenozyten durch Produktion anderer Zytokine die Wirkung des IL-12 negativ beeinflussen könnten.

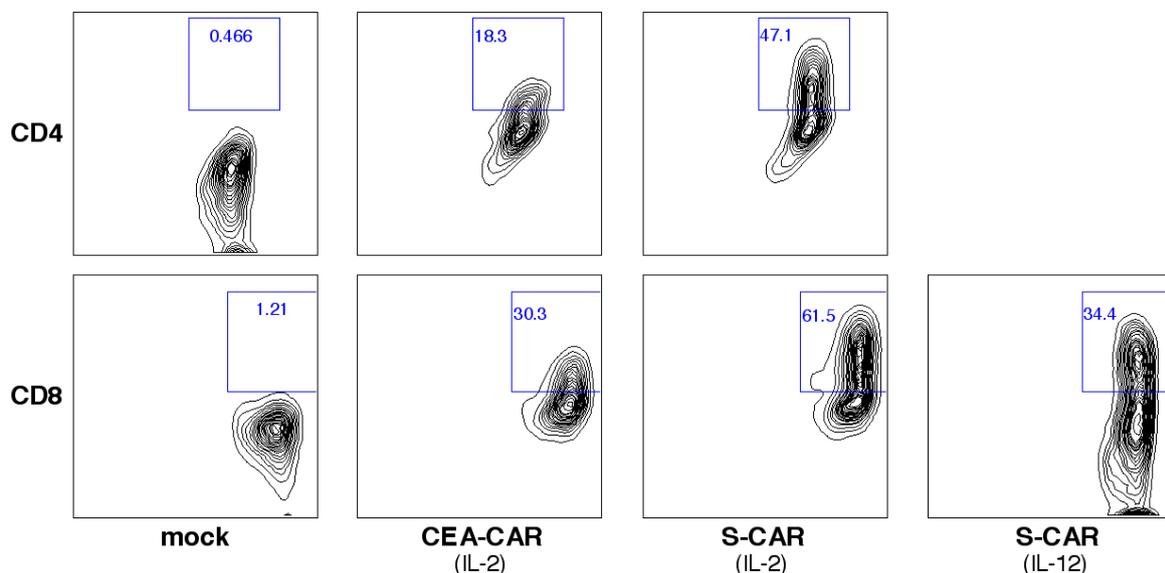


Abb. 2.17: Expression der CAR in verschiedenen Zelltypen. FACS-Analyse der Transduktionseffizienz vor dem adoptiven Transfer der Zellen zum Vergleich des IL-2- und IL-12-Stimulationsprotokolls.

Abb. 2.17 zeigt einen Vergleich der Transduktionsrate nach unterschiedlicher Stimulation. CD4⁺ Zellen ließen sich im Vergleich zu CD8⁺ Zellen weniger gut transduzieren. Dies ist

wahrscheinlich auf eine geringere Proliferation zurückzuführen. Nach drei Tagen IL-2 Stimulation waren von den Splenozyten ca. 17 % CD4⁺ und 66 % CD8⁺ (Daten nicht gezeigt). In diesem Versuch war die Transduktionseffizienz bei IL-12 Stimulation nur etwa halb so hoch wie bei IL-2 Stimulation. In anderen Experimenten waren die Transduktionsraten mit beiden Protokollen jedoch immer vergleichbar. Nach 3 Tagen war die Zahl der lebenden T-Zellen mit IL-12-Stimulation etwa 50% höher als mit IL-2 (Daten nicht gezeigt).

Beim adoptiven Transfer der transduzierten T-Zellen in HBVtg Mäuse wurde zunächst verglichen, nach welcher Stimulation mehr Zellen in die Leber einwanderten und ob ein antiviraler Effekt zu beobachten war. Um transferierte Zellen von den endogenen Zellen der Empfänger-Maus unterscheiden zu können, wurde ein kongenes Mausmodell benutzt. Bei CD45.1 und CD45.2 handelt es sich um zwei durch einen Polymorphismus entstandene Allele von CD45, einem Oberflächenmarker myeloider Zellen. Beide Varianten des Gens sind funktionell identisch und können durch Antikörper gezielt gefärbt und somit unterschieden werden (Komuro et al., 1975). Die HBVtg Mäuse waren CD45.2⁺, die Milzzellen für die Transduktion wurden aus CD45.1⁺ C57BL/6 Mäusen entnommen. Es wurden 3x10⁶ CAR⁺ Zellen pro Maus intraperitoneal injiziert, was je nach Transduktionseffizienz einer unterschiedlichen Gesamtzellzahl entsprach. Die Anzahl CAR⁺ Zellen wurde bei der IL-2 Stimulation auf CD4⁺ und CD8⁺ Zellen gemeinsam bezogen, da in den vorherigen humanen *in vitro* Studien beiden T-Zelltypen ein antiviraler Effekt zugeschrieben werden konnte (Bohne et al., 2008). Von den Gruppen bestehend aus 3-4 Tieren wurden am Tag 2 und 4 Blut entnommen und die Tiere am Tag 6 nach Transfer getötet. Zwei Versuchsgruppen erhielten jeweils S-CAR⁺ T-Zellen nach IL-2 oder IL-12 Stimulation; der dritten Gruppe wurden IL-2 stimulierte CEA-CAR⁺ T-Zellen injiziert.

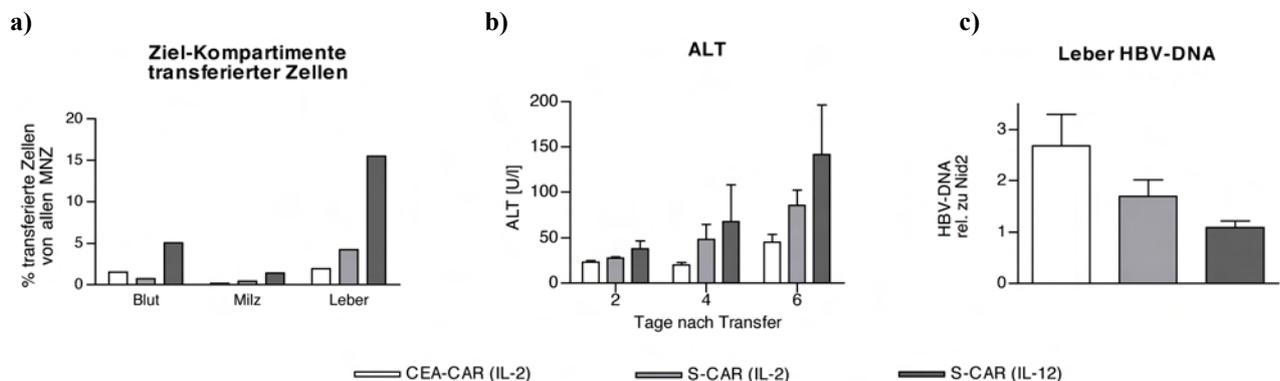


Abb. 2.18: Vergleich des adoptiven T-Zelltransfers von IL-2 oder IL-12 stimulierten Zellen. a) FACS-Analyse von Zellen in Blut, Milz und Leber. MNZ = Mononukleäre Zellen. Die Zellen wurden von 3-4 Tieren pro Gruppe gepoolt. b) ALT im Serum. In der gesunden Maus liegt der ALT-Wert bei bis zu 30 U/l. c) Quantitative PCR der HBV-DNA in der Leber, relativ zum single-copy Gen *Nid2*.

Die Analyse von Blut, Milz und Leber zeigte, dass sich nach 6 Tagen in der Versuchsgruppe, die IL-12 konditionierte S-CAR⁺ T-Zellen erhalten hatte, deutlich mehr transferierte Zellen in Leber und Blut wiederfanden: Im Blut waren es etwa 5 mal mehr Zellen als in den IL-2 behandelten Gruppen; in der Leber war die Zellzahl der CD45.1⁺ Zellen 5- bis 8-fach höher (Abb. 2.18a).

Als Maß für eine Schädigung der Leber wurde das Leberenzym ALT im Serum bestimmt. Die ALT-Werte der beiden S-CAR Gruppen stiegen stetig an und waren am Tag 6 bei der IL-12 Behandlung mit durchschnittlich 150 U/l am höchsten (Abb. 2.18b).

Die virale DNA in der Leber hatte am 6. Tag in der Gruppe der transferierten Zellen mit HBV-spezifischem CAR und IL-2 Behandlung etwa um die Hälfte abgenommen. Nach der IL-12 Vorbehandlung lag der antivirale Effekt bei ca. 70% (Abb. 2.18c).

Die für die Quantifizierung verwendeten HBV-Primer erkannten nicht nur die freie Virus-DNA in den Hepatozyten, sondern auch das HBV-Integrat im Genom der transgenen Mäuse. Somit müsste die gemessene HBV-DNA in heterozygoten HBVtg Mäusen 0,5-fach und in homozygoten Mäusen 1-fach relativ zum „single-copy Gen“ *Nid2* vorliegen. Da nach dem Embryotransfer dieser Mauslinie in den folgenden drei Generationen keine HBV⁻ Maus geboren wurde, ist laut Mendelscher Vererbungslehre davon auszugehen, dass die Tiere homozygot für das HBV-Transgen waren. Aufgrund dessen lässt sich sagen, dass die freie virale DNA in der IL-12 Gruppe vollständig eliminiert wurde.

IL-12 konditionierte Zellen waren den IL-2 konditionierten Zellen in den beiden untersuchten Kriterien – Einwanderung in die Leber und antiviraler Effekt – deutlich überlegen und die Zellen wurden fortan mit dem IL-12 Protokoll für einen adoptiven Transfer vorbereitet.

2.1.3.2 Zirkulation transferierter Zellen

Nachdem sich herausgestellt hatte, dass die IL-12 Stimulation der transferierten Zellen deren Überleben und Einwanderung in die Leber begünstigte, wurde ein Transfer mit weiteren Kontrollgruppen durchgeführt, die alle die IL-12 Vorbehandlung bekamen. Verglichen wurde der Transfer von T-Zellen mit dem CEA-CAR, dem S-CAR und einem S decoy-CAR. Das S decoy-CAR Konstrukt besitzt das identische Antikörperfragment wie der S-CAR, erkennt also die HBV Hüllproteine. Allerdings ist die intrazelluläre Signaldomäne von CD3 ζ und CD28 gegen die des „*nerve growth factor receptors*“ (NGFR) ausgetauscht (Abb. 2.19). Mit dieser Kontrolle sollte Folgendes ausgeschlossen werden:

1. Die Hüllproteine befinden sich nicht nur auf den Oberflächen der infizierten Zellen, sondern auch auf den SVP und Virionen im Blut. Da diese an den Rezeptor binden (Abb. 2.8) könnten sie

von den transduzierten T-Zellen abgefangen werden, HBsAg und Virus-DNA dadurch nicht mehr für die Analysen zugänglich sein und reduziert erscheinen.

2. Die Bindung des löslichen Antigens an die Antigenbindungsstelle des CARs und somit nahe der Zellmembran der T-Zelle löst bereits deren Aktivierung aus.

3. Die extrazellulären, humanen Teile des S-CARs, nämlich Antikörperfragment und Fc-Abstandshalter, lösen an sich eine Immunreaktion in den Empfängermäusen aus.



Abb. 2.19: Schematische Darstellung des S decoy-CARs. Der extrazelluläre Teil entspricht dem des S-CARs. Die Signaldomänen CD28 und CD3 ζ sind gegen den intrazellulären Teil des „nerve growth factor receptors“ (NGFR) ausgetauscht.

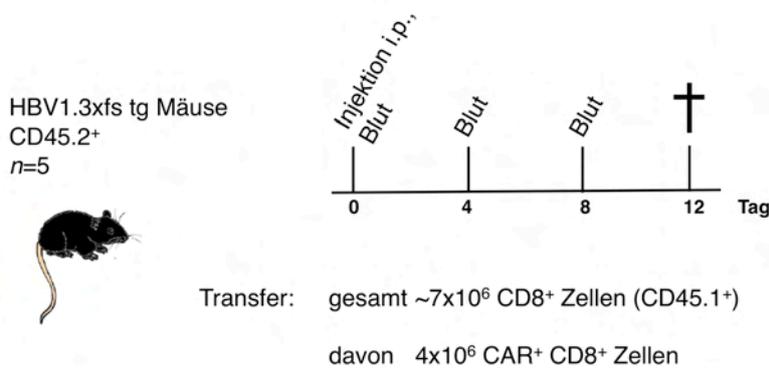


Abb. 2.20: Versuchsschema für den adoptiven T-Zelltransfer. i.p. = intraperitoneal, xfs = x frame shift.

Im folgenden Versuch wurden je 5 Tiere pro Gruppe mit diesmal 4×10^6 CAR⁺ CD8⁺ Zellen injiziert. Die Tiere wurden vor dem Transfer und an den Tagen 4 und 8 geblutet und am Tag 12 getötet (Abb. 2.20).

Die T-Zellen, die mit dem S-CAR transduziert worden waren, proliferierten zwischen Tag 4 und 8 stark, so dass sich ihre Zellzahl im Blut fast verdoppelte. Zwischen Tag 8 und 12 sanken sie dann parallel zu den Kontrollgruppen um ca. 25% ab (Abb. 2.21a). Es ist zu beachten, dass auf Grund der niedrigeren Transduktionseffizienz mit dem CEA-CAR eine 1,4-fach höhere Gesamtzellzahl als bei den anderen beiden Gruppen injiziert wurde.

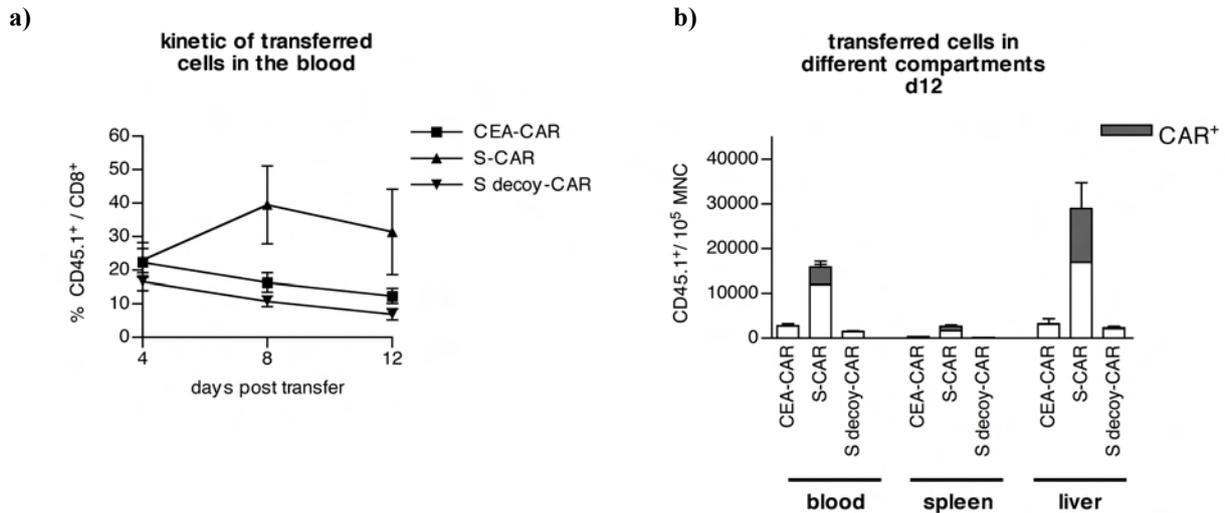


Abb. 2.21: Verteilung transferierter Zellen in Blut, Milz und Leber. Durchflusszytometrie. a) Transferierte Zellen pro CD8⁺ Zellen im Blut an den Tagen 4, 8 und 12 nach Transfer. b) Transferierte Zellen pro 10⁵ Mononukleäre Zellen (MNC) in verschiedenen Kompartimenten an Tag 12. In grau ist der Anteil der CAR⁺ Zellen angegeben.

2.1.3.3 Einwanderung in die Leber

In 2.1.3.1 wurde bereits gezeigt, dass in der Gruppe, die IL-12 stimulierte HBV-spezifische T-Zellen injiziert bekommen hatten, CD8⁺ Zellen vermehrt in die Leber einwanderten. Um herauszufinden, ob dieser Effekt nur abhängig vom IL-12 war oder auch Antigen-spezifisch sein könnte, wurden in diesem Versuch die Anreicherung transferierter Zellen in den verschiedenen Kompartimenten mit ebenfalls IL-12 stimulierten Kontrollgruppen verglichen.

12 Tage nach dem Transfer akkumulierten etwa 6 mal mehr HBV-spezifische als -unspezifische transferierte Zellen in der Leber. Dies lässt darauf schließen, dass die Einwanderung in die Leber aufgrund des dort vorhandenen Antigens auf den Hepatozyten erfolgte und nicht ausschließlich ein Effekt der IL-12-Konditionierung sein konnte. Nur etwa die Hälfte der CD45.1⁺ Zellen konnte mit einem CAR-spezifischen Antikörper gefärbt werden (Abb. 2.21b).

2.1.3.4 Histologie der Leber

Von den Lebern der Empfänger-Mäuse wurden PFA-fixierte Paraffin-Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. HE ist ein Färbefahrer, bei dem saure/basophile Strukturen, wie die DNA im Zellkern, bläulich erscheinen, und basische/azidophile Strukturen, wie zytoplasmatische Proteine, rötlich erscheinen.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie hatten nur indiziert, dass die transferierten Zellen aus der S-CAR Gruppe sich relativ zu den Kontrollgruppen und relativ zu den endogenen mononukleären Zellen in der Leber anhäuferten. Da die Leberstücke für die Zell-Aufreinigung nicht exakt gleich groß waren, konnte keine absolute Zahl infiltrierender Lymphozyten bestimmt

werden. In der HE-Färbung wurde in der S-CAR Gruppe eine massive Infiltration von Lymphozyten in die Leber sichtbar und der Verdacht wurde bestätigt, dass auch die absolute Zahl der Lymphozyten in der Leber gestiegen war (Abb. 2.22).

Eine generelle krankhafte Veränderung des Gewebes konnte bis auf die Entzündungsherde in diesem Bereich nicht festgestellt werden.

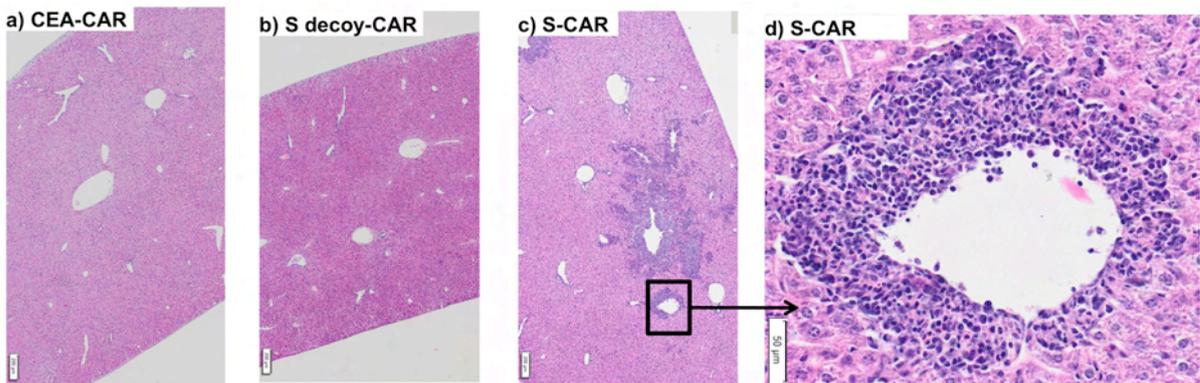


Abb. 2.22: Histologische Schnitte durch Lebergewebe. HE-Färbung von Formalin-fixierten Paraffin-Schnitten der Leber am Tag 12 nach dem Transfer. Weißer Balken = a-c) 200 μ m, d) 50 μ m.

In den beiden Tieren der S-CAR Gruppe mit den höchsten ALT-Werten am Tag 8 (2.1.4.1) waren augenscheinlich neben einer starken Vergrößerung der Milz auch farbliche Veränderungen der Leber zu erkennen (Abb. 2.23). Im Allgemeinen zeigten die Versuchstiere jedoch kein auffälliges Verhalten und nahmen auch nicht an Gewicht ab (Daten nicht gezeigt).

Bei einer gezielten histologischen Untersuchung aus diesen helleren Bereichen zeigten sich in der HE-Färbung nekrotische Areale (Abb. 2.24a). Zusätzlich wurden die Infiltrate aus diesen Bereichen genauer untersucht.

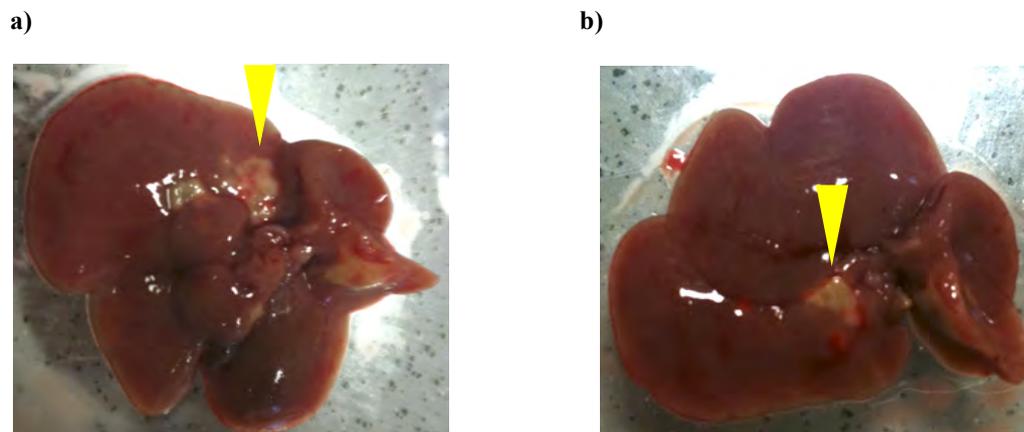


Abb. 2.23: Makroskopische Betrachtung der Leber HBV-transgener Mäuse nach Transfer von S-CAR⁺ Zellen. Lebern der Tiere mit den höchsten ALT-Werten am Tag 8 nach Transfer. Gelbe Pfeile: nekrotische Areale. ALT: a) 791 U/l. b) 591 U/l.

Viele der eingewanderten Zellen proliferierten (Abb. 2.24b) und bei dem Großteil der Zellen handelte es sich um CD3⁺ T-Zellen (Abb. 2.24c). Neben den Lymphozyten wurden auch vereinzelt Hepatozyten mit dem Proliferationsmarker Ki67 angefärbt, was auf einen Regenerationsprozess der Leber hindeutet (Abb. 2.24b).

Es ist auffällig, dass einige Zellen in der Leber eine sehr starke Akkumulation von HBsAg an der Oberfläche aufwiesen (Abb. 2.24d). Aufgrund der Zellgröße und der Tatsache, dass sich diese Zellen auch in den Gefäßen befanden (Abb. 2.24e+f), kann geschlossen werden, dass es sich hierbei um Lymphozyten handelt, die wahrscheinlich über den S-CAR HBV-Partikel gebunden haben.

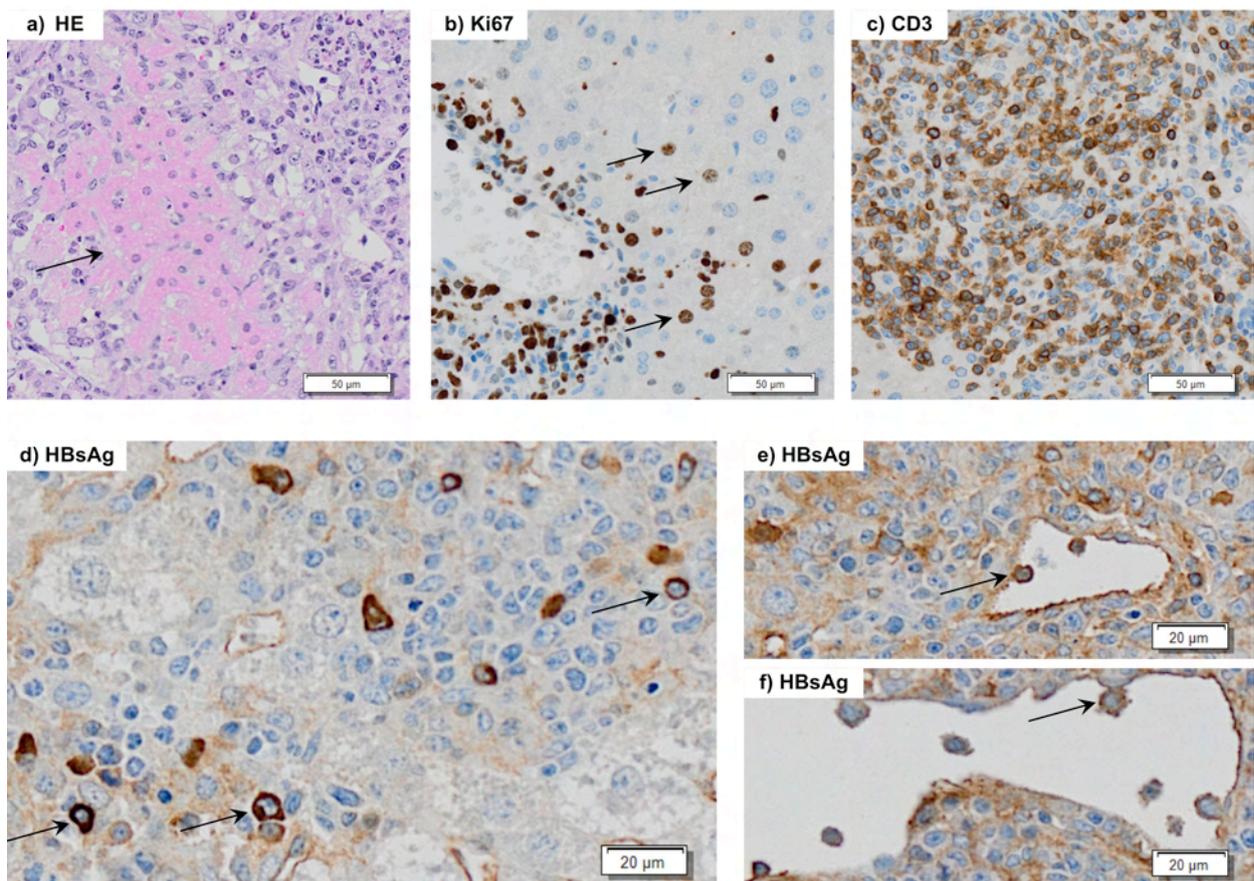


Abb. 2.24: Histologische Untersuchung eines farblich veränderten Bereichs der Leber nach Transfer von S-CAR⁺ T-Zellen. a) HE-Färbung. Pfeil: rosa Färbung eines nekrotischen Areals. b) Ki67. Proliferierende Zellen zeigen eine Färbung im Kern oder Zytoplasma. Ruhende Zellen in der G₀-Phase werden nicht gefärbt. Pfeile: Ki67⁺ Hepatozytenkerne. c) CD3. d-f) HBsAg. Fokussierung auf Zellen mit HBsAg Oberflächenfärbung in einem Infiltrat bzw. in Gefäßen.

2.1.3.5 Charakterisierung der Leber-Infiltrate

Die Histologie hatte gezeigt, dass ein Großteil der Zellen, die in die Leber infiltrierten, CD3⁺ Zellen waren. Es galt nun zu charakterisieren, welche Zelltypen noch einwanderten und wie sich die CD3⁺ Zellen zusammensetzten.

Es wurden gleichzeitig CD3⁺ Zellen und endogene Leukozyten (CD45.2⁺) gefärbt. Das Infiltrat setzte sich zu etwa gleichen Teilen aus beiden Zelltypen zusammen. Unter 10 % der Zellen waren doppelt positiv, was bedeutet, dass die infiltrierenden Lymphozyten fast ausschließlich transferierte Zellen waren (Abb. 2.25a).

Bei den CD45.2⁺ Zellen handelte es sich hauptsächlich um Makrophagen (> 80 %, Abb. 2.25b). Außerdem infiltrierten B-Zellen in die Leber (ca. 10 %), die auch vom Empfängertier stammen mussten, da nur CD8⁺ Zellen transferiert worden waren. Zwischen CD3⁺ Zellen und den B-Zellen gab es vereinzelt Zell-Zell-Kontakt (Abb. 2.25c).

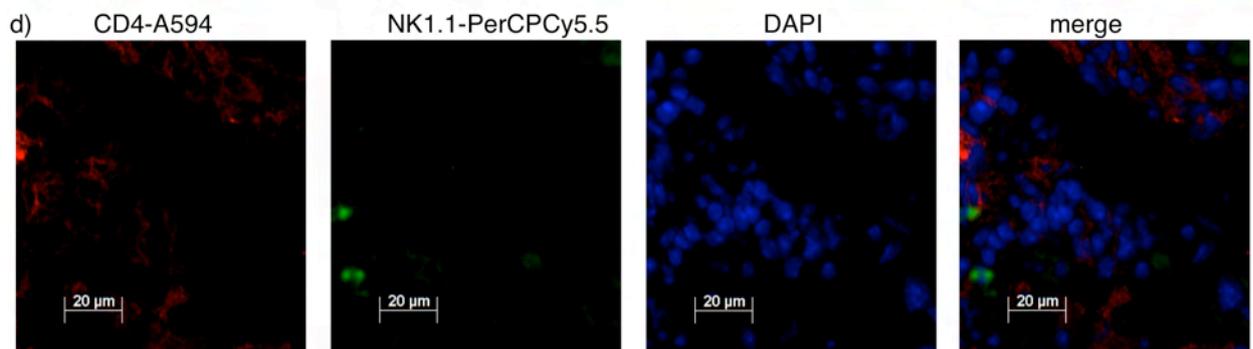
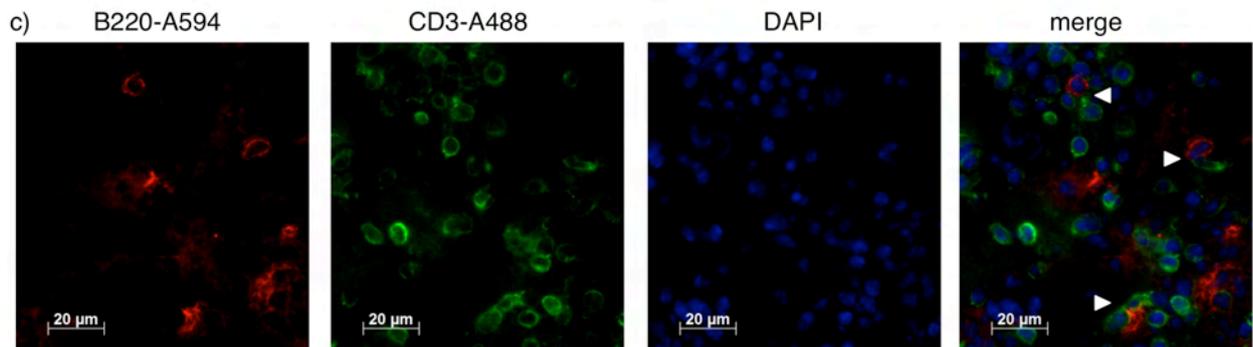
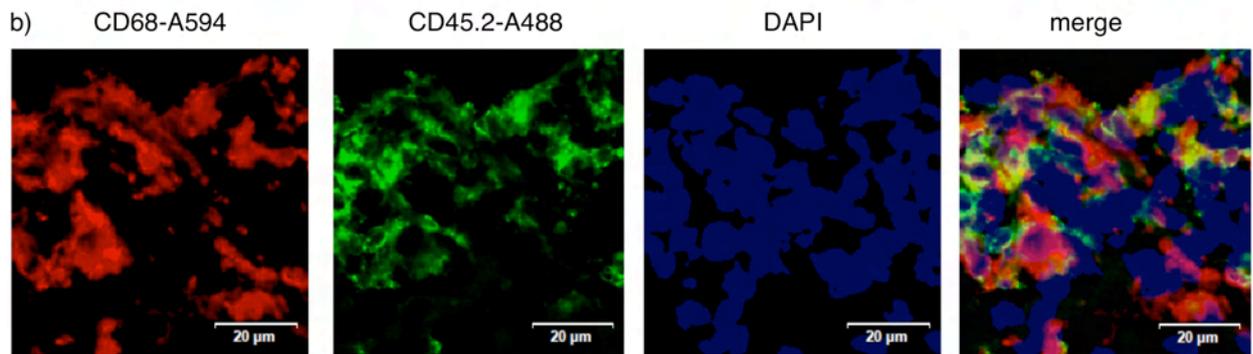
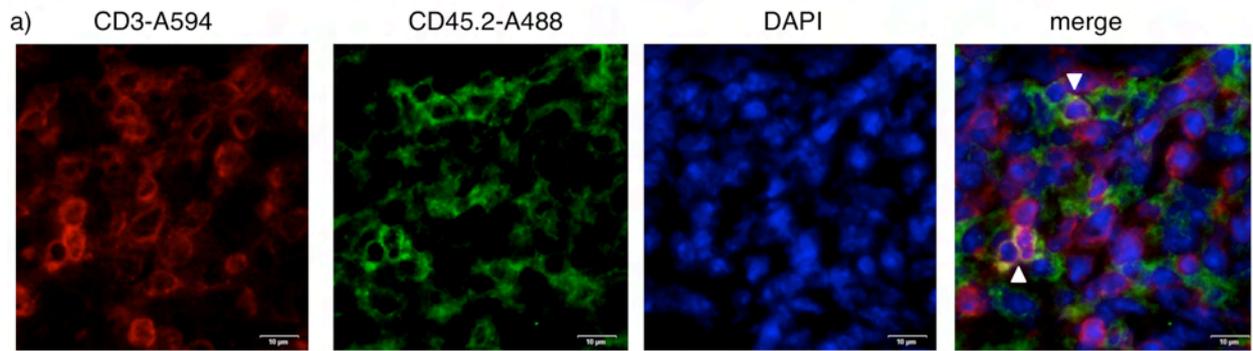
Von den in Abb. 2.25 d) dargestellten Zellen waren in einem Sichtfeld von etwa 100 Zellen drei NK-Zellen gefärbt worden. Etwa ¼ der Zellen war CD4⁺. Hierbei könnte es sich sowohl um endogene, als auch um transferierte Zellen handeln, da IL-12 stimulierte CD8⁺ Zellen teilweise einen CD8/CD4 doppelt-positiven Phänotyp haben (Daten nicht gezeigt).

Wie zu erwarten gewesen war, waren > 90 % der transferierten Zellen CD8⁺. Der Anteil der endogenen CD8⁺ Zellen betrug ca. 10 % (Abb. 2.25e, vergleiche hierzu auch Abb. 2.28). Dies ist besser in der Betrachtung der einzelnen Farbkanäle als in der Überlagerung zu erkennen, da die Intensität der Lichtsignale teilweise sehr unterschiedlich war.

In einigen Infiltraten exprimierte etwa die Hälfte der Lymphozyten den S-CAR (Abb. 2.25f-g). Diese Zellen erschienen allerdings nicht gleichzeitig CD8⁺, was auf ein Problem der parallelen Färbung beider Marker in Kryogewebe schließen lässt.

2.1.4 Effektorfunktionen von S-CAR⁺ T-Zellen *in vivo*

Ziel der Entwicklung einer Immuntherapie gegen HBV ist es, nicht wie in den aktuell angewendeten Therapien die Virusreplikation zu senken und so den Fortschritt der Krankheit lediglich aufzuhalten, sondern das Virus endgültig zu eliminieren. Dies kann entweder durch eine direkte Wirkung der transferierten T-Zellen geschehen oder möglicherweise indirekt, indem das Immunsystem des Patienten durch die Therapie verstärkt angeregt wird, das Virus selbst zu bekämpfen. Wie in 1.2.1 beschrieben, sind Zytotoxizität und die Ausschüttung von Zytokinen antivirale Effektormechanismen von T-Zellen.



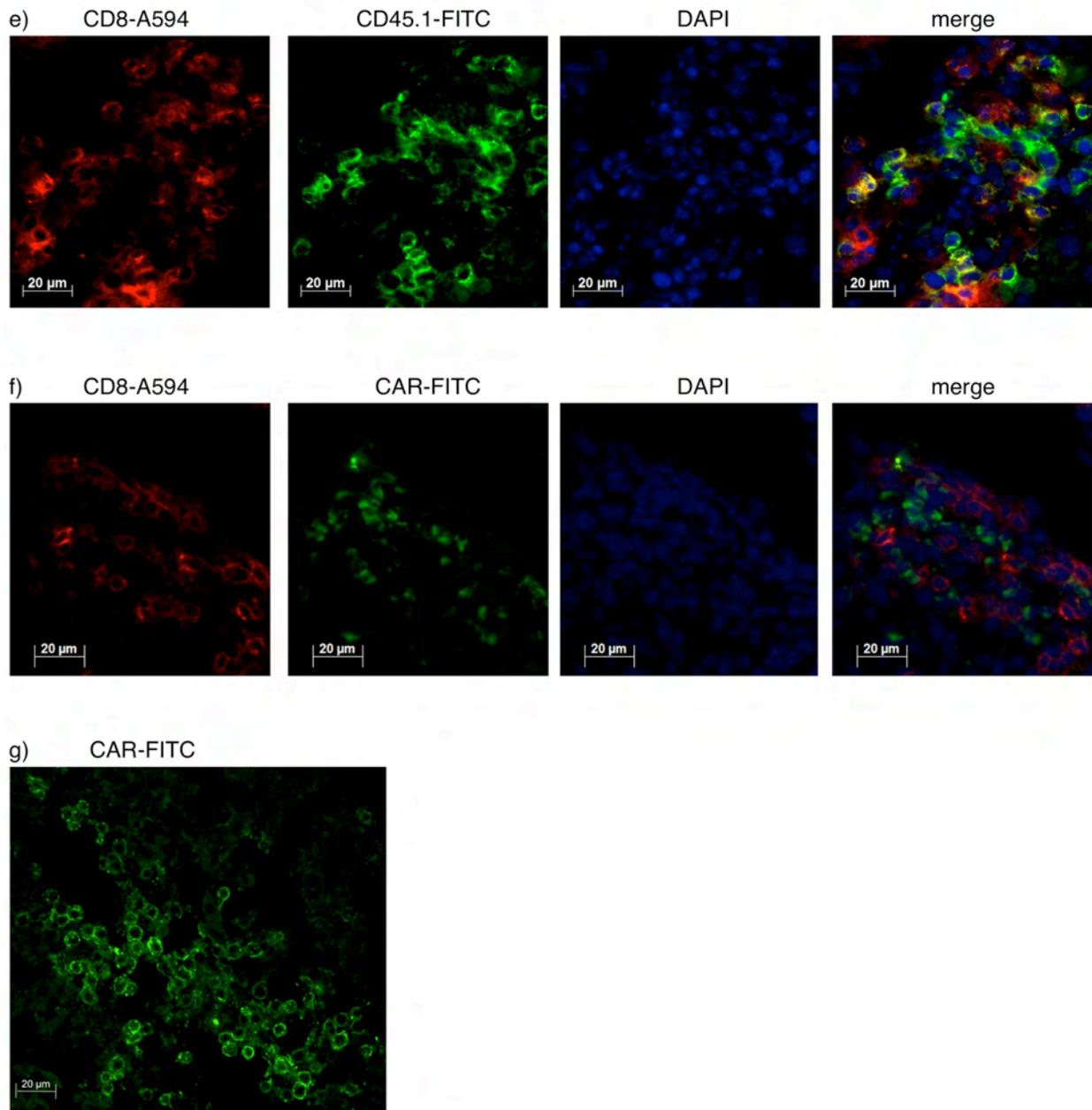


Abb. 2.25: Färbung verschiedener Zelltypen des Leberinfiltrats in Kryo-Schnitten. 20 µm Größenbalken. A594 = Alexa594, A488 = Alexa488, DAPI = Zellkerne, merge = Überlagerung der einzelnen Kanäle. a) CD3⁺ Zellen und CD45.2⁺ (endogene) Zellen. Pfeile: endogene CD3⁺ Zellen. b) Makrophagen und CD45.2⁺ Zellen. c) B-Zellen und CD3⁺ Zellen. Pfeile: Zellkontakt zwischen unterschiedlichen Zelltypen. d) CD4⁺ Zellen und NK-Zellen. e) CD8⁺ Zellen und CD45.1⁺ (transferierte) Zellen. f) CD8⁺ Zellen und CAR⁺ Zellen. g) CAR⁺ Zellen. Bei alleiniger Färbung des CARs ohne einen zweiten Antikörper (z.B. CD8) ist die Oberflächendistribution des CARs deutlicher zu erkennen.

2.1.4.1 *In vivo* Zytotoxizität von transferierten Zellen

Im Serum, das an den Tagen 4, 8 und 12 nach dem Transfer entnommen wurde, wurde die Freisetzung des Leberenzym ALT gemessen. Am Tag 8 waren die ALT-Werte im Serum der

Gruppe mit den transferten HBV-spezifischen T-Zellen im Durchschnitt um das 10-fache gestiegen, was auf eine Schädigung der Leber hinweist. Dieser Schaden war nur transient und nahm bereits zum Tag 12 wieder ab (Abb. 2.26a). In den Tieren mit den ALT-Werten von 791 bzw. 591 U/l betrug der Anteil transfrierter Zellen an allen CD8⁺ Zellen in der Leber 96 bzw. 84% (Daten nicht gezeigt).

Als möglicher Grund, warum der Leberschaden nur transient und nicht dauerhaft auftrat, wurde die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in der Leber am Tag 12 untersucht. Diese war in der S-CAR Gruppe etwa 8-fach höher als in den beiden Kontrollgruppen (Abb. 2.26b).

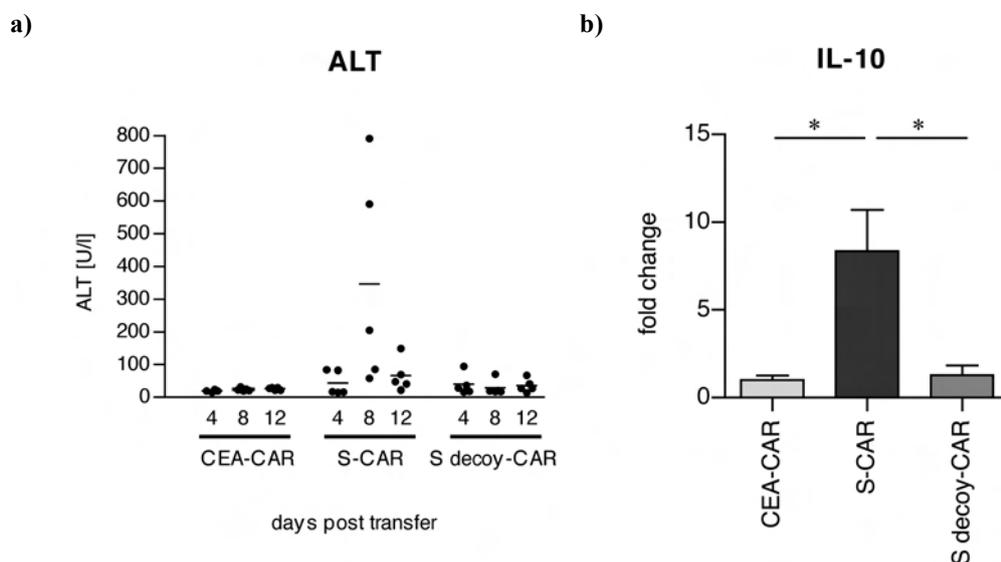


Abb. 2.26: Transienter Leberschaden nach adoptivem T-Zelltransfer. a) Freisetzung des Leberenzym ALT an den Tagen 4, 8 und 12 nach dem Transfer. b) Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 am Tag 12 in der Leber (relativ zu GAPDH und normalisiert zum Mittelwert der CEA-CAR Gruppe).

2.1.4.2 Expression pro-inflammatorischer Zytokine

Als Effektor-Zytokine einer antiviralen Immunantwort wurde die Expression von IFN- γ und TNF- α in der Leber bestimmt. Hierzu wurde aus einem Teil der Leber die gesamte RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR mit den entsprechenden spezifischen Primern durchgeführt. Sowohl die Produktion von IFN- γ als auch von TNF- α war in der Gruppe mit dem HBV-spezifischen CAR etwa 10-fach höher als in den Kontrollgruppen und damit signifikant gestiegen (Abb. 2.27).

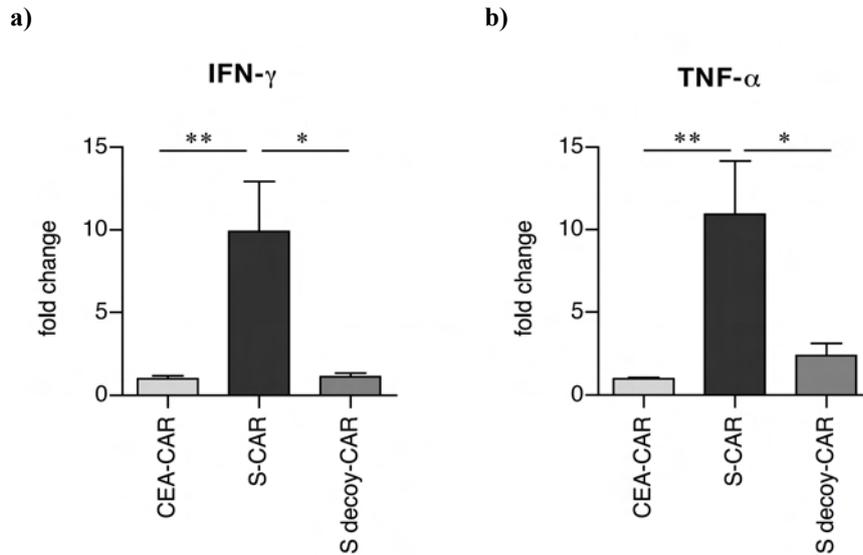


Abb. 2.27: Expression inflammatorischer Zytokine am Tag 12 in der Leber. Relativ zu GAPDH und normalisiert zum Mittelwert der CEA-CAR Gruppe. a) IFN- γ . b) TNF- α .

2.1.4.3 S-CAR Zellen als Zytokin-produzierende Zellen

Um zu verifizieren, dass die Zytokine (unter anderem) von den transferierten Zellen produziert wurden, wurden leberassoziierte Lymphozyten und Splenozyten *ex vivo* analysiert. In einem gemeinsamen Experiment mit der Doktorandin Nina Böttinger, zur Untersuchung der Persistenz transferierter Zellen, wurden Zellen am Tag 8 und 64 nach Transfer isoliert, auf HBsAg- oder unbeschichteten Platten stimuliert und nach ca. 30 Stunden die intrazellulären Zytokine gefärbt. Abb. 2.28 zeigt exemplarisch für eine Maus die Gating-Strategie der FACS-Analyse. Von den lebenden Zellen wurden, durch Gegenüberstellung von CD8⁺ und CD45.1⁺ Zellen, endogene von transferierten Zellen unterschieden. Letztere wurden weiterhin in CAR⁻ oder CAR⁺ Zellen unterteilt (Abb. 2.28 oben). Während sowohl die endogenen als auch die transferierten CAR⁻ T-Zellen keine Zytokine produzierten (1. und 2. Spalte), reagierten die S-CAR⁺ Zellen auf das HBsAg mit der Produktion von IFN- γ und/oder TNF- α (3. Spalte). Dies galt sowohl für die Zellen, die aus der Leber isoliert worden waren als auch aus der Milz zurückgewonnenen Zellen. In Abb. 2.29 ist das Ergebnis von 2-3 Mäusen pro Gruppe zusammengefasst. In der Leber produzierten nach Stimulation durch HBsAg mit ca. 13% etwas weniger S-CAR T-Zellen IFN- γ als in der Milz mit 20% am Tag 8. Allerdings war der Hintergrund durch unspezifische Stimulation mit fast 10% auch deutlich höher. Etwa 5% der Zellen waren in beiden Organen bifunktional (IFN- γ ⁺/TNF α ⁺). Es fällt auf, dass zwischen Tag 8 und 64 die Zahl der IFN- γ -produzierenden Zellen etwas abnimmt und die bifunktionalen Zellen fast verschwunden sind. Zu beiden Zeitpunkten befanden sich – den unspezifischen Hintergrund in der Milz abgezogen – in der Leber mindestens doppelt so viele mono- und bifunktionale TNF- α produzierende Zellen

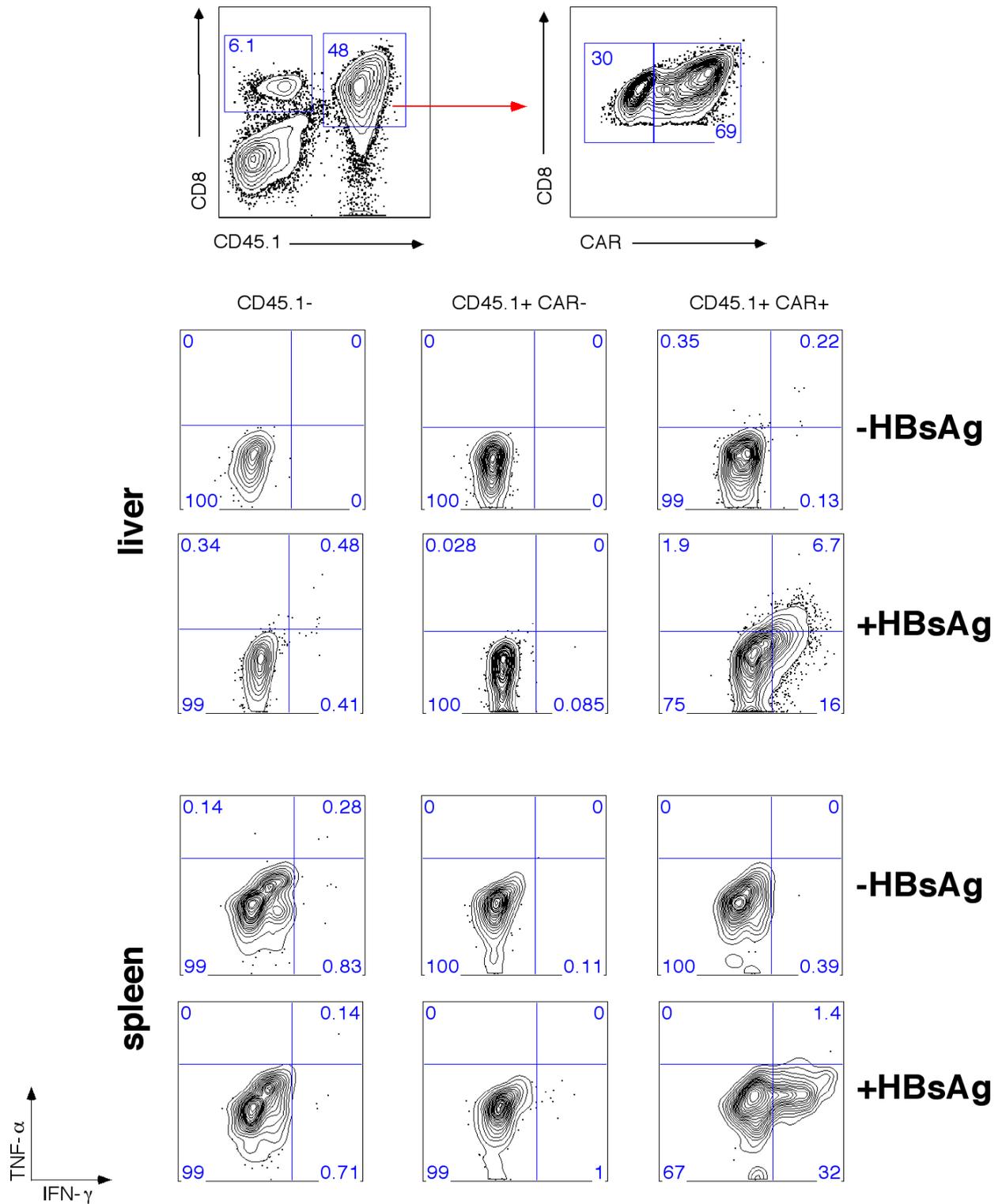


Abb. 2.28: Intrazelluläre Zytokinfärbung leberassoziierter Lymphozyten und Splenozyten nach Stimulation mit HBsAg. 8 Tage nach dem Transfer HBV-spezifischer CD8⁺ Zellen wurden die mononukleären Zellen aus Leber und Milz aufgereinigt und für 30 h auf HBsAg- oder unbeschichteten Platten inkubiert. Endogene CD8⁺ Zellen der Empfänger-Maus (CD45.1⁻), transferierte Zellen ohne Expression des Rezeptors (CD45.1⁺, CAR⁻) und transferierte Zellen mit CAR-Expression (CD45.1⁺, CAR⁺) wurden getrennt voneinander analysiert.

wie in der Milz. CEA-CAR T-Zellen aus der Milz 64 Tage nach Transfer produzierten keine Zytokine.

An Tag 64 wurde zusätzlich die Antwort auf das HBsAg verschiedener HBV-Serotypen verglichen. Dies ist von großer Bedeutung für die Einsetzbarkeit dieser T-Zelltherapie für ein breites Patientenspektrum. Die Zellen erkannten das HBsAg der beiden häufigsten Serotypen *adw* und *ayw*, wobei *adw* mehr Zellen zur Zytokin-Produktion anregte (Abb. 2.29). Die S-CAR T-Zellen sezernierten bei der Inkubation mit dem rekombinanten HBsAg des Serotyps *adw* mit 3000 pg/ml etwa doppelt so viel IFN- γ wie bei Inkubation mit *ayw* (persönliche Mitteilung N. Böttinger). Dies liegt vermutlich daran, dass das Antikörperfragment aus einem „Phage-Display“ mit dem Typ *adw* und PBMCs aus *adw*-geimpften Spendern gewonnen wurde (Kürschner, 2000). In der HBVtg Maus (und HepG2.2.15 Zellen) handelt es sich allerdings um den Serotyp *ayw*.

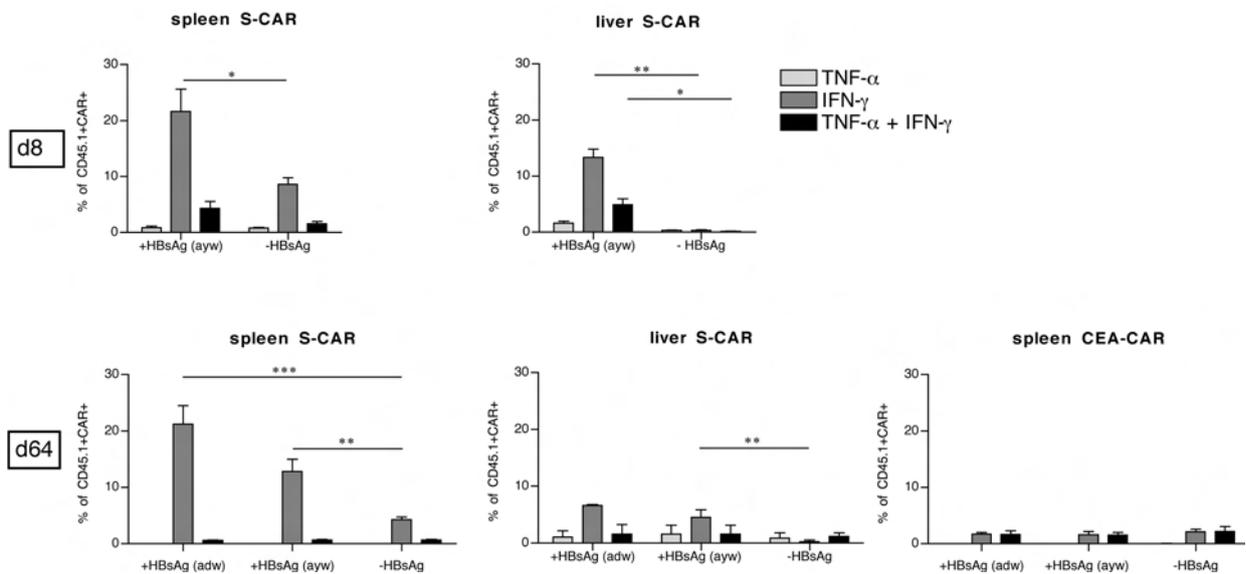


Abb. 2.29: Quantifizierung intrazellulärer Zytokine in CAR⁺ Zellen. Es ist das Ergebnis der intrazellulären Zytokinfärbung aus Abb. 2.28 für 2-3 Mäuse pro Gruppe zusammengefasst. Dargestellt sind nur die CAR⁺ Zellen (entspricht der rechten Spalte aus Abb. 2.28). Sind keine Balken zu sehen, so wurden keine entsprechenden Zellen detektiert.

2.1.4.4 Phänotypische Charakterisierung transferierter Zellen nach 64 Tagen

Nach dem Ergebnis, dass bis zu 20 % der S-CAR⁺ Zellen Antigen-spezifisch IFN- γ produzierten, ergab sich die Fragestellung, warum dies nicht alle Zellen taten. Als möglicher Grund wurde die Expression des Markers PD-1 in Betracht gezogen. In Zusammenhang mit der Produktion von Zytokinen ist dies ein Aktivierungsmarker, bei fehlender Zytokinproduktion ein Erschöpfungs-marker. Für die Analyse standen kryo-konservierte Milzzellen von Tag 64 nach dem Transfer zur Verfügung.

Unstimulierte und unspezifisch anti-CD3-stimulierte Zellen, die keinen CAR exprimierten, waren unabhängig von der Zytokinproduktion zu maximal 13 % PD-1⁺. Bei unspezifischer Stimulation mit anti-CD3 waren von den nicht mehr aktivierbaren CAR⁺ Zellen in der S-CAR Gruppe nur halb so viele Zellen PD-1⁺ wie in der CEA-Kontrollgruppe. Dies traf nicht auf eine Maus der S-CAR Gruppe zu, von der wahrscheinlich aufgrund einer stärkeren Entzündungsreaktion mehr Milzzellen zur Verfügung standen, so dass sie einzeln analysiert werden konnte. Von ihr konnten ca. 60 % der CAR⁺ Zellen nicht mehr unspezifisch stimuliert werden und 2/3 davon exprimierten den Erschöpfungsmarker. Dies könnte andeuten, dass die transferierten Zellen -- nachdem sie zu einer starken Inflammation im Empfängertier geführt haben -- funktional erschöpfen. Es ist darauf hinzuweisen, dass aufgrund der niedrigen Zahl an eingelesenen lebenden, CD8⁺ CD45.1⁺ CAR⁺ Zellen („Event count“), keine endgültige Aussage über den Erschöpfungszustand der Zellen getroffen werden kann.

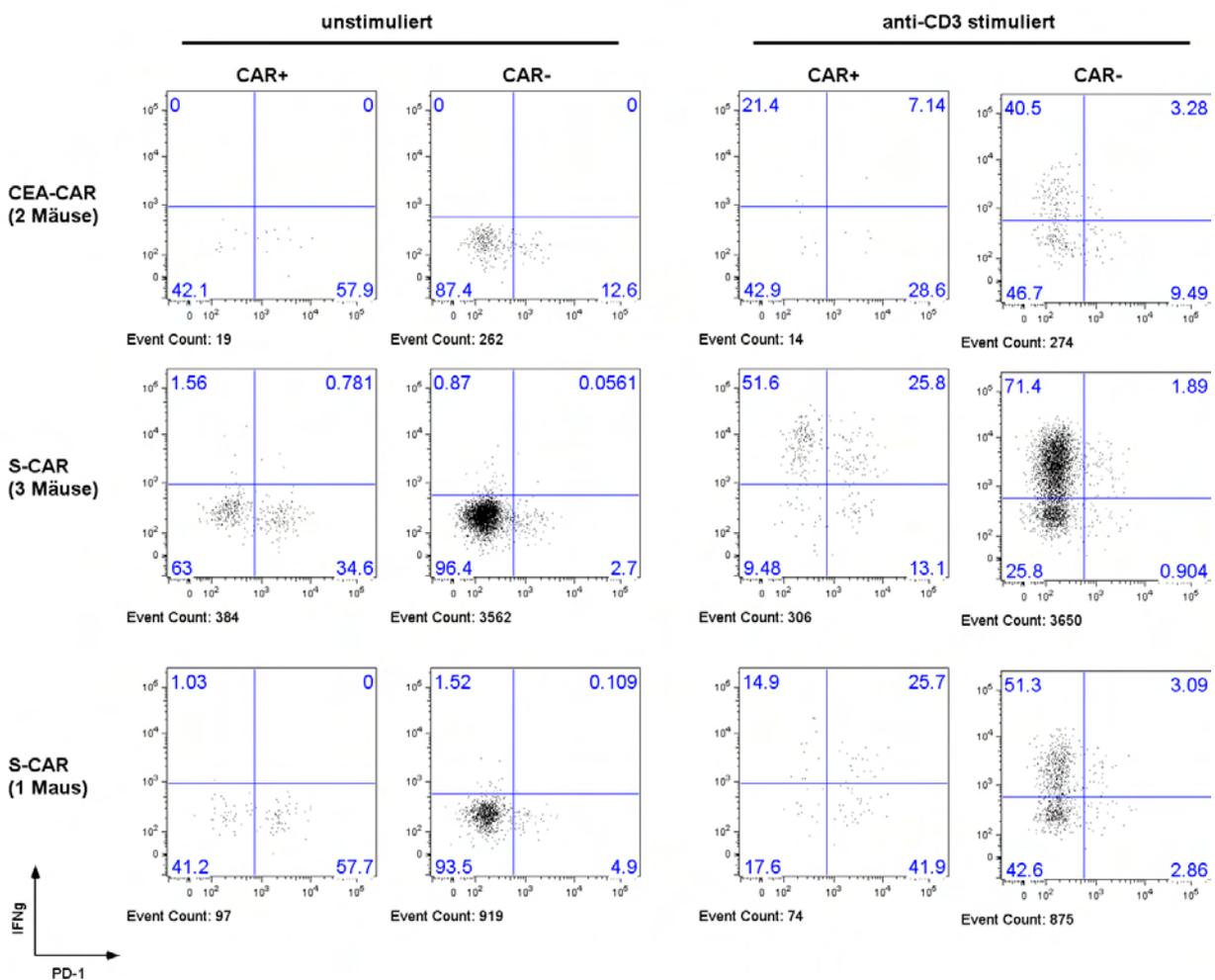


Abb. 2.30: PD-1 Expression nach unspezifischer Stimulation 64 Tage nach Transfer. Von den einzelnen Gruppen wurden aufgrund der wenigen zur Verfügung stehenden Zellen, die Milzzellen von 2 bzw. 3 Tieren gepoolt. Eine Maus, deren Zellen sich auch im S-CAR Pool befanden, konnte einzeln analysiert werden. Es wurde 5 Stunden mit anti-CD3 stimuliert und im Anschluß eine intrazelluläre Zytokinfärbung durchgeführt. Das Gating erfolgte auf lebende, transferierte CD8⁺ Zellen mit oder ohne CAR-Expression.

Ebenso wurde analysiert, ob es sich bei den Milzzellen um Effektor- oder Gedächtniszellen handelte. Die Diskriminierung erfolgt wie in Abb. 2.31 a) gezeigt über die Expression von CD62L (Einwanderung in die Lymphknoten) und CD127 (IL-7 Rezeptor). Am Tag 64 hatten in beiden Gruppen mehr als 50 % der Zellen Effektor-Status. Die Zahl an zentralen Gedächtniszellen war in der S-CAR Gruppe im Vergleich zu der CEA-Gruppe etwa dreimal so hoch (Abb. 2.31b). Da die Zellen vor dem Transfer und auch in der Maus Antigen-spezifisch stimuliert wurden, ist nicht davon auszugehen, dass es sich um naive T-Zellen handelte.

Es verblieben zwei Mäuse aus der S-CAR Gruppe, deren Blut-Lymphozyten am Tag 94 nach dem Transfer analysiert wurden. Diese Tiere wurden am Tag 94 nicht getötet, weil sie für ein Langzeitexperiment geplant gewesen waren. Wegen einer Parvovirus-Infektion in einem anderen Raum des Tierstalls mussten jedoch alle Tiere gekeult werden, so dass im Endeffekt von diesen beiden Tieren keine Milzzellen sondern nur die Blutzellen von Tag 94 für die Analyse zur Verfügung standen. In beiden Mäusen hatten sich zu diesem Zeitpunkt fast alle transferierten Zellen zu Gedächtniszellen entwickelt. In einer Maus betrug der Anteil der transferierten Zellen an allen PBMCs noch 11 % und in dieser Maus hatten 95 % der Zellen den Phänotyp von Gedächtniszellen, davon waren 1/3 Effektor-Gedächtniszellen (Abb. 2.31c+d). Es kann somit vermutet werden, dass auch bei transferierten Zellen die Expression von CD127 und CD62L ein längerfristigeres Überleben sichert.

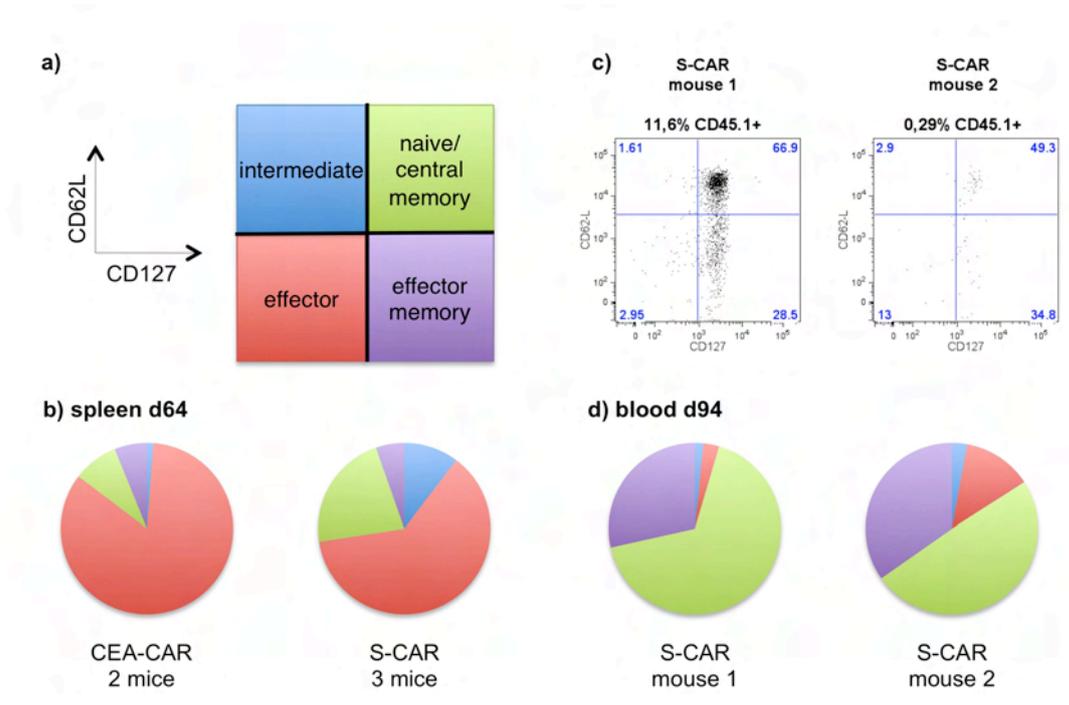


Abb. 2.31: Phänotypisierung Langzeit-zirkulierender transferierter Zellen. a) Einteilung der Zelltypen in Effektor- und Gedächtniszellen. b) CD8⁺CD45.1⁺ Zellen am Tag 64 in der Milz. c-d) CD8⁺CD45.1⁺ Zellen am Tag 94 im Blut. Da die Zellen für diese Färbung nicht stimuliert wurden, war eine Diskriminierung von CAR⁺ und CAR⁻ Zellen nicht mehr exakt möglich.

2.1.4.5 Induktion von Antikörpern

Bisher wurden nur antivirale Effektorfunktionen der exogenen Zellen betrachtet. Da in der Untersuchung der Zelltypen in den Leberinfiltraten aufgefallen war, dass vermehrt B-Zellen in die Leber einwanderten, die im Zell-Zell-Kontakt zu den CD3⁺ Zellen standen, wurde untersucht, ob eine Antikörper-Anwort induziert worden war. Tatsächlich bildeten drei Mäuse der S-CAR Gruppe und zwei Mäuse der S decoy-CAR Gruppe (Abb. 2.32a) Antikörper gegen HBcAg (virale Kapside aus dem Core-Protein). In der Kontrollgruppe waren diese Antikörper allerdings schon am Tag des Transfers vorhanden (Abb. 2.32b). Es kann geschlussfolgert werden, dass durch den Transfer von Zellen mit einem HBV-spezifischen Rezeptor und die anschließende Entzündungsreaktion, eine Immunreaktion gegen HBV in den Empfänger-mäusen ausgelöst wurde. Antikörper gegen das HBsAg konnten zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert werden. Eine Tetramerfärbung der Milzzellen zeigte, dass weder die transferierten noch die endogene Zellen am Tag 12 spezifisch für das immundominante Sxxx oder Cxx Peptid waren (Daten nicht gezeigt).

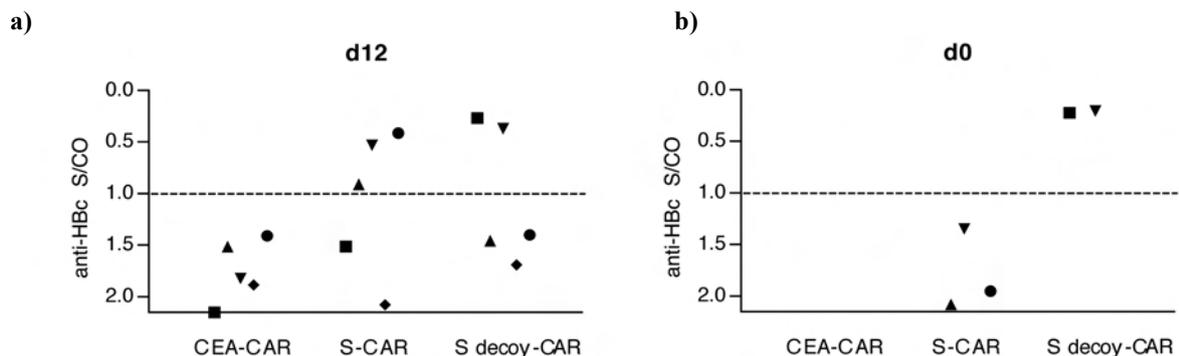


Abb. 2.32: Induktion von HBcAg-spezifischen Antikörpern. Gestrichelte Linie: Detektionslimit des ELISAs. a) Tag 12. b) Tag 0. Aus Kostengründen wurden von Tag 0 nur der Antikörper-Titer der Tiere bestimmt, die am Tag 12 anti-HBc positiv waren. Für die Analyse der Zeitpunkte 4 und 8 nach Transfer, stand nicht mehr genügend Serum zur Verfügung.

2.1.5 Antiviraler Effekt von S-CAR⁺ T-Zellen *in vivo*

Im Abschnitt 2.1.4 wurde aufgezeigt, dass T-Zellen, die einen HBV-spezifischen CAR exprimieren, nach dem Transfer in HBVtg Mäuse Effektorfunktionen ausführen. Es galt nun zu untersuchen, ob diese auch zu einer Eliminierung des Virus führen könnten. Eine Limitation des HBVtg Mausmodells ist es, dass es sich nicht um eine natürliche Infektion handelt, sondern um eine Integration des HBV-Genoms in das Genom der Maus. Der antivirale Effekt einer Therapie kann zwar auf Ebene der RNA, Proteine und gebildeten Viruspartikel untersucht werden, die Analyse wird aber durch die ständige Neuproduktion der viralen Transkripte erschwert.

2.1.5.1 Effekt auf virale RNA und Proteine

Die Behandlung mit S-CAR T-Zellen hatte nur einen geringen Effekt auf die sekretierten viralen Antigene und auf die virale RNA. Die prägenomische RNA, welche als Matrize für die Synthese neuer viraler DNA dient, sank durch die Gabe der HBV-spezifischen CD8⁺ Zellen verglichen mit den Kontrollgruppen signifikant um etwa die Hälfte ab (Abb. 2.33a).

Die viralen Antigene HBsAg und HBeAg wurden an den Tagen 0, 4, 8 und 12 aus dem Serum bestimmt. Die Messwerte der einzelnen Mäuse wurden jeweils relativ zu den Werten am Tag des Transfers gesetzt. Die Menge an HBsAg im Serum, welches hauptsächlich auf zirkulierende SVP zurückzuführen ist, änderte sich im Vergleich zwischen den Gruppen nicht (Abb. 2.33b). Während in den Kontrollgruppen die Werte für das HBeAg stetig bis auf 130 % des Wertes vor dem Transfer anstiegen, sank das Niveau in der S-CAR Gruppe kurzzeitig um etwa 10 % ab (Abb. 2.33c).

Zusätzlich wurde die Bildung viraler Kapside in der Leber untersucht. In den Kontrollbehandelten Tieren konnten um die Gefäße in etwa 10% der Zellen Kapside im Zytoplasma nachgewiesen werden (Abb. 2.33d+e). In der S-CAR Gruppe erschienen in der Färbung des Kapsids nur noch unter 1 % der Zellen schwach positiv (Abb. 2.33f).

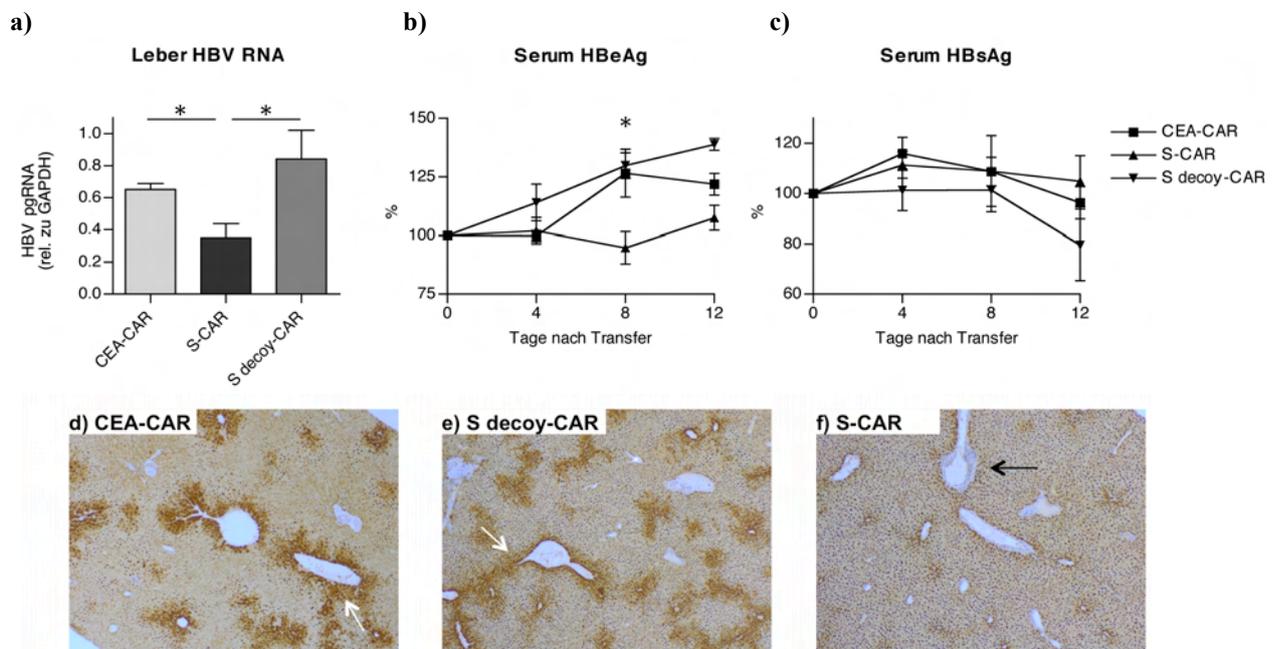


Abb. 2.33: Detektion von viraler RNA und Proteinen. a) Gesamt Leber-RNA wurde in cDNA umgeschrieben und eine quantitative PCR mit spezifischen Primern für die 3,5 kb RNA durchgeführt. Es wurde zur GAPDH-Expression relativiert. b+c) Messung der viralen Antigene im Serum mittels ELISA (Axsym). Die Werte wurden für jede Maus relativ zum Messwert an Tag 0 gesetzt. d-f) Histologische Analyse viraler Kapside in der Leber 12 Tage nach dem T-Zelltransfer. Es wurde ein Antikörper verwendet, der eine immunogene Struktur des assemblierten Kapsids, nicht aber das Core-Protein an sich, erkennt. Weiße Pfeile = bräunliche Färbung der Kapside. Schwarzer Pfeil = Lymphozyteninfiltrat.

2.1.5.2 Effekt auf virale DNA

Die Menge der viralen DNA in Leber und Blut wurde ebenfalls ermittelt. Im Blut liegt die DNA praktisch nur in den infektiösen Virionen vor. Im Verlauf der Therapie mit den S-CAR T-Zellen sank die Virämie stetig. 12 Tage nach Injektion der Zellen war die Viruslast um durchschnittlich 2 Logstufen reduziert (Abb. 2.34a). In der Maus mit den meisten Leber-infiltrierenden transferierten Zellen betrug der Titer sogar nur noch 0,04% im Vergleich zu Tag 0 (Daten nicht gezeigt).

Auch die Menge an HBV-DNA in der Leber nahm stark ab. Aus dem Lebergewebe von Tag 12 nach Transfer wurde die gesamte genomische DNA aufgereinigt. In einer quantitativen PCR wurde die Menge an HBV-DNA relativ zu *Nid2* bestimmt. In der S-CAR behandelten Gruppe befanden sich umgerechnet nur noch durchschnittlich 6 Kopien HBV-DNA pro Zelle, während es in den beiden Kontrollgruppen etwa 70 Kopien pro Zelle waren (Abb. 2.34b).

In einem Southern Blot, in dem 75µg der Gesamt-Leber-DNA aufgetragen und die HBV-DNA mit einer radioaktiv-markierten Sonde hybridisiert wurde, bestätigte sich das Ergebnis einer signifikanten Reduktion der viralen DNA nach S-CAR Behandlung (Abb. 2.34c).

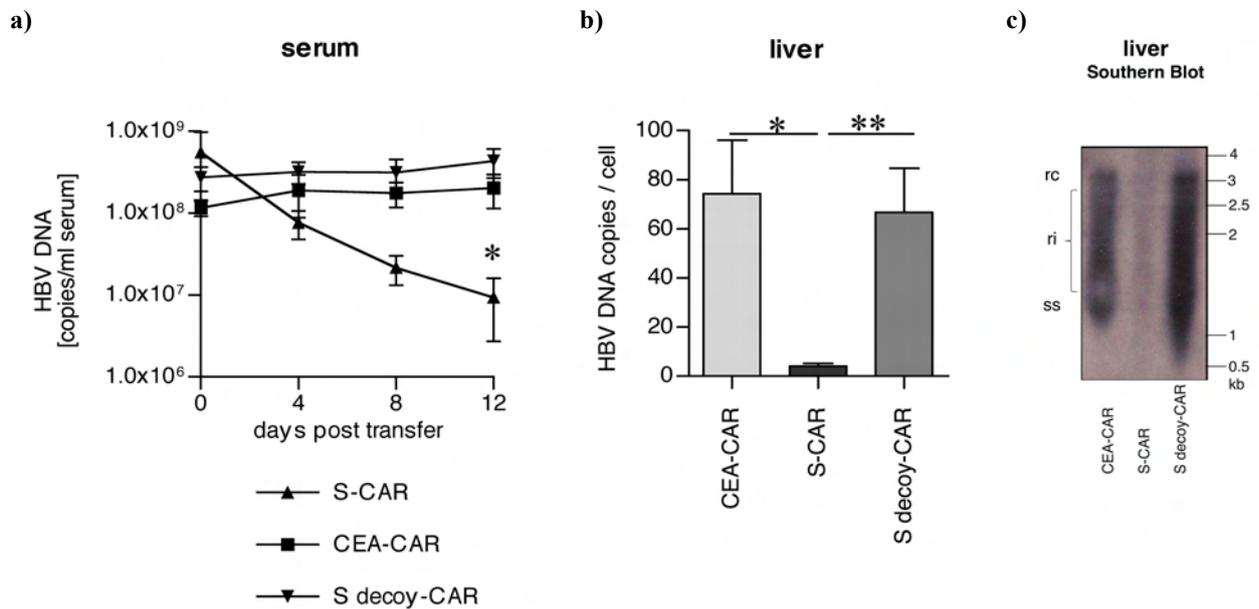


Abb. 2.34: Virale DNA in Serum und Leber nach adoptivem T-Zelltransfer. a) qPCR der DNA im Serum. b) qPCR der Gesamt-Leber-DNA am Tag 12 nach Transfer, relativ zum single-copy Gen *Nid2*. Die Zucht der Mäuse wurde erst mit dem Beginn der vorliegenden Arbeit im Institut für Virologie etabliert. Die Mäuse, die noch für den Versuch aus Abb. 2.18 c) verwendet wurden, entstammten der 1. und 2. Generation der Zucht. Es wurden Tiere mit einem hohen Virus-Titer weiter verpaart, so dass die Tiere zwei Generationen später, die für diesen Versuch verwendet wurden, bereits eine höhere Virusreplikation zeigten. c) Southern Blot von 75µg HindIII-verdauter Gesamt-Leber-DNA am Tag 12. Hybridisiert mit einer HBV-DNA Sonde. rc = relaxed circular, ri = *replicative intermediates*, ss = *single stranded*.

2.2 Identifizierung von HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren

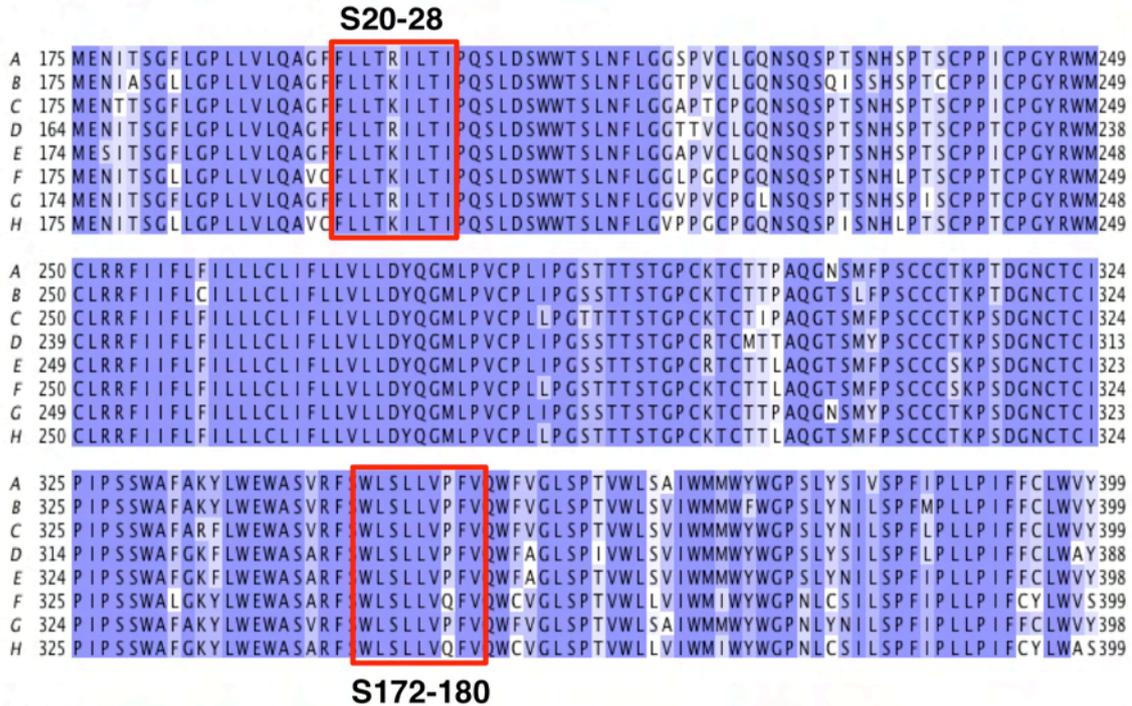
Als ein alternativer Ansatz für eine T-Zelltherapie der chronischen Hepatitis B wurden T-Zellrezeptoren mit Spezifität für HBV-Peptide identifiziert. Dies ist ein Prinzip, das zur Behandlung von Tumorerkrankungen bereits erfolgreich Anwendung findet (Morgan et al., 2006).

2.2.1 Immundominante HBV-Peptide

Für die Gewinnung von HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren wurden drei Peptide ausgewählt, die mit der Kontrolle des Virus im akuten Krankheitsverlauf in Verbindung gebracht werden. Dies sind aus dem Bereich des S-Proteins „FLLTRILTI“ an der Aminosäureposition 20-28 (S20), „WLSLLVPFV“ an Position 172-180 (S172) sowie das Peptid „FLPSDFFPSV“ an Position 18-27 des Core-Proteins (C18) (Desmond et al., 2008). Das Alignment der Proteinsequenzen der verschiedenen HBV Genotypen zeigt, dass es bei den Peptiden S20 und C18 zwischen den Genotypen A/D und B/C Unterschiede gibt (R→K bzw. V→I) (Abb. 2.35). Die Eigenschaften der Aminosäuren bleiben jedoch gleich: Arginin (R) und Lysin (K) sind beide polar und basisch, Valin (V) und Isoleucin (I) sind beide unpolar und neutral. Die für die Peptidbindung an das MHC-Molekül wichtige Ankerfunktion der zweiten Aminosäure Leucin ist in allen drei Peptiden konserviert.

Bei der Immundominanz von Peptiden spielt auch der Typ des präsentierenden MHC-Moleküls eine Rolle. In der vorliegenden Arbeit wurde aus zweierlei Gründen mit HLA-A2⁺ Spendermaterial gearbeitet. Erstens sind weltweit große Teile der Bevölkerung HLA-A2 positiv. Eine Suche in der Datenbank www.allelefrequencies.net ergab, dass beispielsweise in Deutschland 49,9%, in den USA 50,7% (Kaukasier) bzw. 26,7% (Afroamerikaner), in China 51,4% (Guangdong Region) oder in Südafrika 23% (Natal Zulu Region) Träger von HLA-A2 sind. Somit würde eine T-Zelltherapie basierend auf Erkennung von HLA-A2-präsentierten HBV-Peptiden ein breites Spektrum an Patienten erreichen können. Zweitens ist ein Großteil des zellulären Labormaterials HLA-A2⁺. So zum Beispiel Peptid-präsentierende T2 Zellen, HBV-replizierende Zielzellen oder ein neu generiertes HBV / HLA-A2⁺ Mausmodell.

a) S-Protein



b) Core-Protein



Abb. 2.35: Alignment der Protein-Sequenz verschiedener HBV Genotypen. Die in dieser Arbeit verwendeten Peptide sind rot markiert. a) S-Protein. b) Core-Protein.

2.2.2 Gewinnung von natürlichen T-Zellrezeptoren

Zur Gewinnung von T-Zellrezeptoren mit Spezifität für HBV-Peptide wurde, wie in Abb. 2.36 dargestellt, vorgegangen. Als Ausgangsmaterial waren Zellen aus Spendern optimal, die HLA-A2 positiv waren, sowie eine akute HBV-Infektion hatten oder ausgeheilt waren. Die mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) wurden über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt

und dann mit Peptid-beladenen T2 Zellen stimuliert. T2 Zellen sind TAP2-defizient und können somit endogen keine MHC-Moleküle beladen. Sie wurden vor der Stimulation zwei Stunden mit Peptid inkubiert und dann radioaktiv bestrahlt, um ihr Wachstum zu stoppen. Der Mechanismus der exogenen Peptid:MHC Beladung ist wissenschaftlich nicht geklärt. Folgende Alternativen der Stimulation wurden auch getestet: eine vorherige CD8⁺ Isolation aus den PBMC, unterschiedliche Peptidkonzentrationen, eine Wiederholung der T2 Stimulation nach sieben Tagen und eine Stimulation ohne T2 Zellen, in der das Peptid direkt zu den PBMC gegeben wurde (vergleiche 2.2.5).

Zwei Wochen nach der ersten Stimulation wurden die Zellen, die einen T-Zellrezeptor für das präsentierte Peptid exprimierten, über eine Streptamer-Färbung am Durchflusszytometer sortiert. Streptamere sind lösliche, reversible Peptid-MHC-Komplexe, die an einen Farbstoff gekoppelt sind (siehe 4.1.8.2). Die CD8⁺Streptamer⁺ sortierten Zellen wurden entweder als polyklonale Linie für weitere 14 Tage angereichert oder direkt vereinzelt. Durch limitierende Verdünnung wurden rechnerisch 0,3 sortierte Zellen pro Well in einer 96-Well Platte ausgesät. Hierdurch sollte gewährleistet werden, dass in einem Well tatsächlich ein Klon heranwächst und kein Gemisch aus mehreren Klonen. Zur unspezifischen Stimulation wurden bestrahlte LCL-Zellen

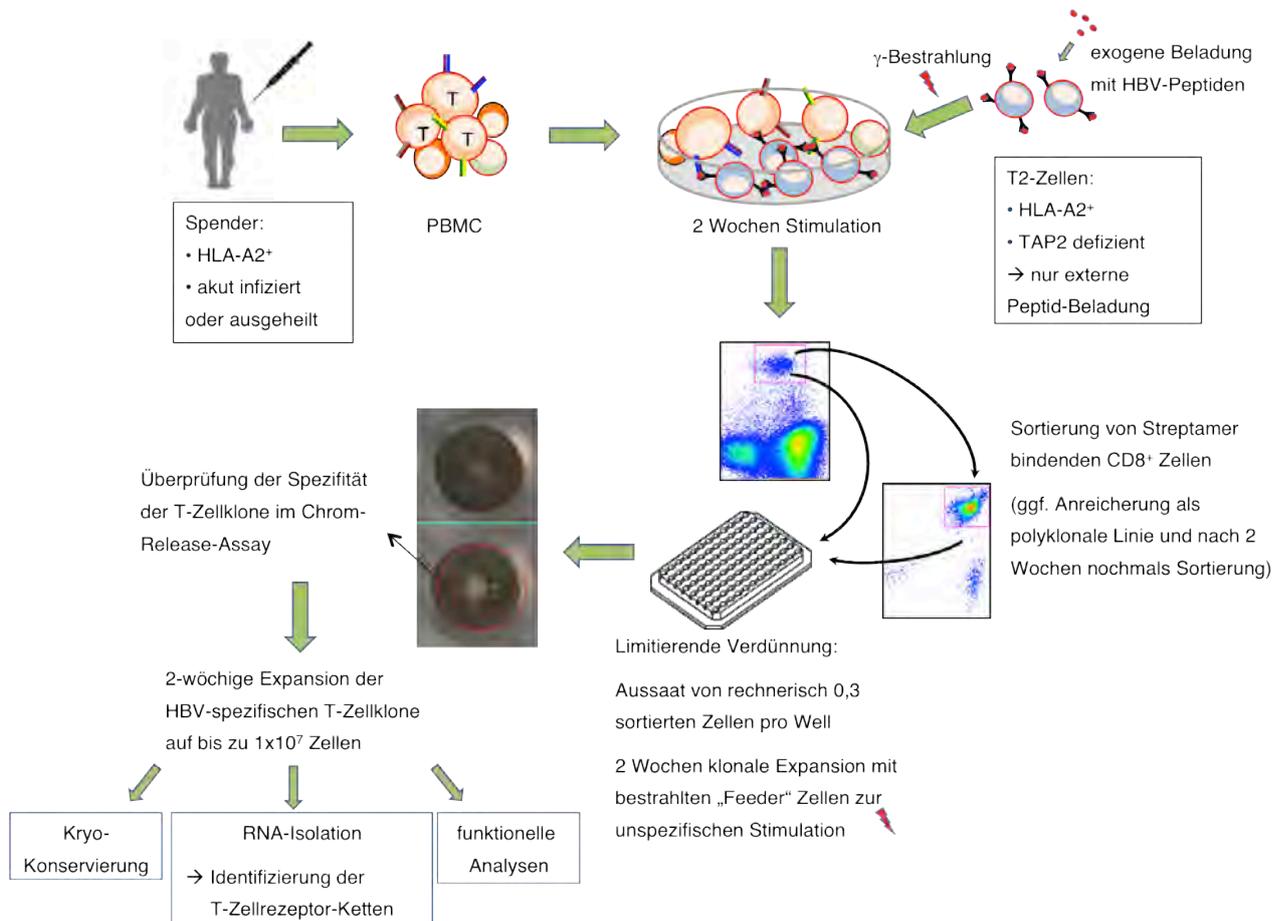


Abb. 2.36: Schema des Protokolls zur Gewinnung HBV-spezifischer T-Zellklone. Erläuterungen siehe Text.

und allogene PBMC (sogenannte „Feeder“ Zellen) zugegeben. Nach zwei Wochen konnten herangewachsene Klone durch augenscheinliche und mikroskopische Inspektion der Platten identifiziert werden. Etwa Teil des Klons wurde ohne genauere Bestimmung der Zellzahl auf die gewünschte Peptid-Spezifität überprüft. Der Rest der Zellen wurde durch erneute Stimulation mit Feeder Zellen in 12-Well-Platten expandiert. Nach weiteren zwei Wochen wurde nochmals eine Streptamer-Färbung durchgeführt, um die Reinheit des Klons zu bestätigen. Es standen nun genügend Zellen zur Verfügung, um einen Teil einzufrieren, RNA zu isolieren und weitergehende funktionelle Analysen durchzuführen.

2.2.2.1 Stimulation und Sortierung

Abb. 2.37 zeigt exemplarisch eine Streptamer-Färbung für die drei unterschiedlichen Peptid-Spezifitäten. 14 Tage nach dem Beginn der Stimulation konnten deutlich abgrenzbare Populationen mit Spezifität für das S172 und C18 Peptid sortiert werden. Die CD8-Expression war leicht herunter reguliert, was auf eine Aktivierung der Zellen hindeutet.

Obwohl sich am Tag 14 keine distinkte Population S20-spezifischer T-Zellen abzeichnete, konnten die Zellen durch eine relativ unpräzise Sortierung angereichert werden (2,15 % Streptamer⁺ Zellen am Tag 28). Konnte keine exakte Sortierung Streptamer-positiver Zellen durchgeführt werden, so war die Kultivierung vorerst als Linie und eine zweite Sortierung unerlässlich.

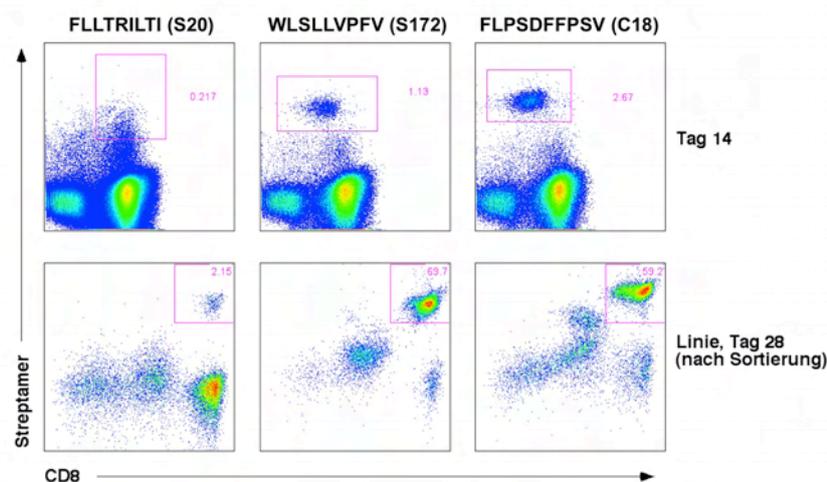


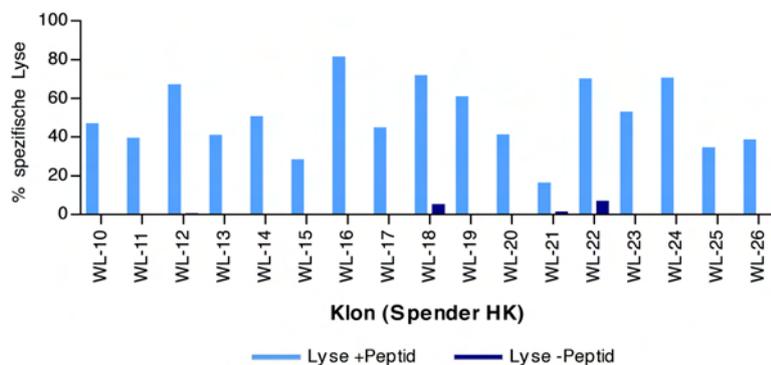
Abb. 2.37: Streptamer-Färbung für drei verschiedene HBV-Peptid-Spezifitäten. Oben: Färbung nach 14 Tagen Stimulation. Unten: Am Tag 14 sortierte Zellen, die weitere 14 Tage unspezifisch stimuliert wurden.

2.2.2.2 Screening von T-Zellklonen

Für das Anreichern von bis zu 1×10^7 monoklonalen Zellen benötigt man viel Humanserum und eine große Menge an Feeder Zellen. Da deren Bestand limitiert ist, wurde zunächst im Schnellverfahren die Spezifität der Klone überprüft. Hierfür wurden T2 Zellen mit dem entsprechenden Peptid beladen; unbeladene T2 Zellen dienten als Negativ-Kontrolle. Die Zellen wurden mit radioaktivem Natriumchromat inkubiert, welches sie dabei aufnehmen. Nach vier Stunden Ko-Kultur mit den Klonen wurde indirekt über die Freigabe des Chroms in den Überstand die spezifische Lyse der Zielzellen bestimmt. Von den Klonen wurde hierfür nur jeweils etwa 1/10 der Zellen aus einem Well pro beladene und unbeladene Zielzellen benötigt und es konnten bis zu 200 Klone gleichzeitig untersucht werden.

Abb. 2.38 zeigt exemplarisch das Ergebnis für 16 Klone aus dem Spender 1 mit Spezifität für S172. In diesem Versuch zeigten nur zwei Klone eine geringe unspezifische Lyse von unbeladenen T2-Zellen (WL-18, WL-22, dunkelblaue Balken). Klone, die nur eine sehr schwache Zytotoxizität gegenüber den Peptid-präsentierenden Zellen zeigten (z.B. WL-21), wurden verworfen. Zusätzlich wurde nachträglich aus dem Überstand von drei Ko-Kulturen mittels ELISA das produzierte IFN- γ als Aktivierungsmarker bestimmt. Mit dieser Art der Analyse können die Klone auf (un-)spezifische Zytokin-Sekretion untersucht werden (Abb. 2.38b, z.B. WL-14, dunkelroter Balken). Da der ELISA nicht im Radioaktiv-Labor durchgeführt werden kann und es mitunter mehrere Wochen dauert, bis die Überstände aus der Ko-Kultur abgeklungen sind, wurde diese Bestimmung in nachfolgenden Chrom-Release-Assays nicht mehr durchgeführt.

a)



b)

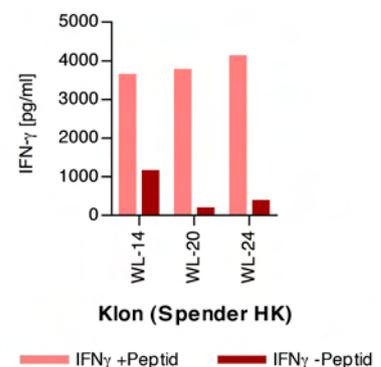


Abb. 2.38: Screening mehrerer T-Zellklone auf ihre spezifische Zytotoxizität (Chrom-Release-Assay). Die T2-Zielzellen wurden entweder mit dem Peptid S172 beladen oder nicht beladen. a) Spezifische Lyse: % der Maximallyse mit 1% Triton-X. Ist kein blauer Balken zu sehen, so war die Lyse durch den T-Zellklon geringer als die Spontanlyse der Zielzellen. b) IFN- γ im Überstand der Ko-Kultur wurde nur für die Proben WL-14, WL-20 und WL-24 bestimmt (ELISA).

Als eine weitere Möglichkeit, die tatsächliche HBV-Spezifität der Klone zu überprüfen, wurden sie in einer Ko-Kultur mit HBV-replizierenden HepG2.2.15 Zellen oder der parentalen Zelllinie HepG2 (HBV-) eingesetzt (Abb. 2.39). In einem XTT-Test wurde dann die Viabilität der Zielzellen (blau) und somit indirekt die Zytotoxizität des Klons überprüft. Zusätzlich konnte IFN- γ im Überstand bestimmt werden (rot).

Auch in diesem Auswahlverfahren ließen sich Klone identifizieren, die keine deutliche spezifische Lyse zeigten (Abb. 2.39, z.B. WL-12, WL-19) oder eine unspezifische Lyse der HBV-negativen Zielzellen (z.B. WL-2, WL-11). Die Bestimmung des IFN- γ erlaubt eine weitergehende Charakterisierung und zeigte, dass manche Klone bei ähnlicher Zytotoxizität wesentlich mehr IFN- γ produzieren als andere (vergleiche WL-15 und WL-16).

Mit beiden Verfahren konnte eine ähnlich Anzahl von Klonen identifiziert werden, deren Spezifität sich auch in einer anschließenden Streptamerfärbung noch einmal bestätigen ließ.

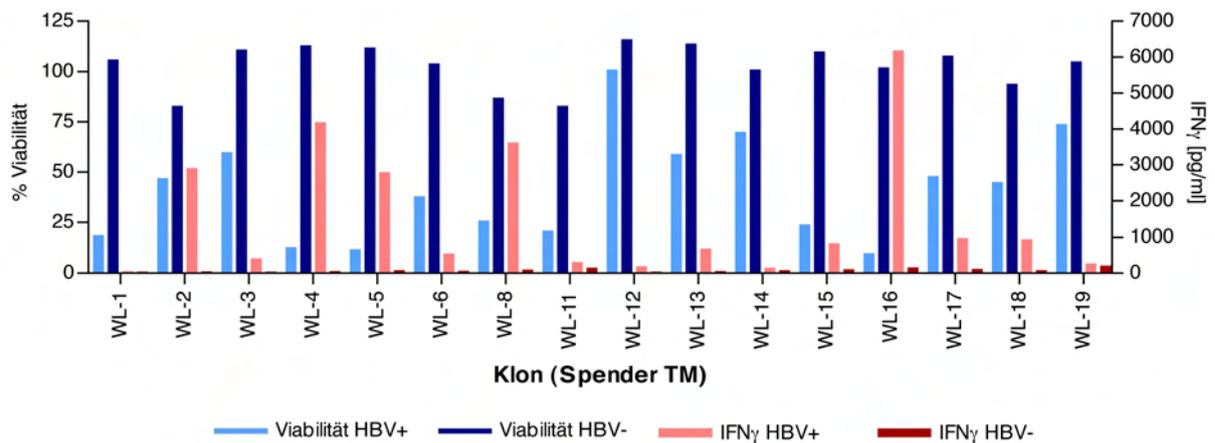


Abb. 2.39: Screening mehrerer T-Zellklone auf ihre spezifische Zytotoxizität (XTT-Test). Die T-Zellklone wurden 72 h mit HBV+ oder HBV- Zielzellen ko-kultiviert und im Anschluss wurde deren Viabilität mit einem XTT-Test bestimmt bzw. IFN- γ im Überstand gemessen.

2.2.2.3 Übersicht der gewonnenen Klone

Insgesamt wurden 100 HBV-spezifische T-Zellklone gewonnen, von denen RNA isoliert wurde und außerdem noch kryo-konservierte Zellen zur Verfügung stehen. Von etwa 250 weiteren Klonen steht nur RNA zur Verfügung (Daten nicht gezeigt).

Für das S20 Peptid konnte von drei Spendern insgesamt 15 T-Zellklone gewonnen werden. Hier brachte eine zweite Stimulation mit beladenen T2 Zellen an Tag 7 keinen Vorteil, sofern man dies innerhalb der Spender vergleichen kann (Abb. 2.40, Reihe 1-3). Mit Material des Spenders 3 wurde von Sarah Kutscher (Immunmonitoring Gruppe, Institut für Virologie) eine alternative Stimulation mit einem S-Peptid-Pool aus 54 15meren (11mer Überlapp) untersucht. Da dies nach

14 Tagen nicht zu der gewünschten Identifizierung HBV-spezifischer Zellen führte, wurde noch einmal spezifisch mit dem T2-präsentierten S20 Peptid stimuliert. Hieraus konnte ein Klon gewonnen werden (Reihe 4).

Mit dem S172 Peptid-beladenen Zellen wurden entweder komplett PBMCs oder aufgereinigte CD8⁺ Zellen stimuliert (Reihe 5-7). Mit der CD8-Aufreinigung konnten für den Spender 2 5 Klone (≈25 %) mehr gewonnen werden. Allerdings ist diese Stimulation durch das CD8-Aufreinigungskit teurer und es muss mehr Ausgangsmaterial zur Verfügung stehen.

Bei der Stimulation mit dem Peptid C18 wurden u.A. verschiedene Peptidmengen getestet. Eine Peptid-Konzentration von 1 nM während der Beladung der T2-Zellen lieferte letztendlich etwa dreimal so viele Klone wie die 1000-fache Konzentration mit 1 µM. Eine Präsentation über T2-Zellen im Gegensatz zur direkten Zugabe von Peptid war etwas effektiver und erbrachte 9 anstatt 6 Klone (Reihe 10-11).

Nur für das S172 Peptid konnte aus der limitierenden Verdünnung polyklonaler Linien deutlich mehr Klone gewonnen werden als bei einer direkten Klonierung nach der Sortierung (Reihe 5-7). Da von den einzelnen Spendern zu wenig PBMC zur Verfügung standen, konnte ein kategorischer Vergleich einzelner Stimulationsprotokolle nicht durchgeführt werden.

	Spender	Peptid	Position	1. Stimulation		2. Stimulation		Klonierung		Anzahl
				Konz.	Art	Konz.	Art	direkt	Linie	
1	1	FLLTRILTI	S20-28	1nM	1x10 ⁵ T2 : 2x10 ⁶ PBMC	100nM	d7, 1x10 ⁵ T2 : ≈2x10 ⁶ PBMC	-	X	1
2	2	FLLTRILTI	S20-28	1nM	1x10 ⁵ T2: 1,1x10 ⁶ PBMC	-	-	X	-	9
3								-	X	4
4	3	FLLTRILTI	S20-28	1:1000	S Peptid Pool zu 9x10 ⁵ PBMC	1µM	d14, 1x10 ⁴ T2 : ≈1x10 ⁵ PBMC	X	-	1
5	1	WLSLLVPFV	S172-180	1nM	1x10 ⁵ T2 : 2x10 ⁶ PBMC	100nM	d7, 1x10 ⁵ T2 : ≈2x10 ⁶ PBMC	X	-	1
6								-	X	17
7	2	WLSLLVPFV	S172-180	1nM	1x10 ⁵ T2: 1x10 ⁶ CD8 ⁺	100nM	d7, 1x10 ⁵ T2 : ≈2x10 ⁶ CD8 ⁺	-	X	23
8	1	FLPSDFFPSV	C18-27	1nM	1x10 ⁵ T2 : 2x10 ⁶ PBMC	100nM	d7, 1x10 ⁵ T2 : ≈2x10 ⁶ PBMC	X	-	2
9								-	X	3
10	2	FLPSDFFPSV	C18-27	1µM	Peptid zu 1,1x10 ⁶ PBMC	-	-	X	-	6
11	2	FLPSDFFPSV	C18-27	1µM	1x10 ⁵ T2: 1,1x10 ⁶ PBMC	-	-	X	-	9
12	2	FLPSDFFPSV	C18-27	1nM	1x10 ⁵ T2: 1,1x10 ⁶ PBMC	-	-	X	-	24

Abb. 2.40: Übersicht der gewonnen T-Zellklone. Von den dargestellten Klonen stehen RNA und kryokonservierte Zellen zur Verfügung. Rote Pfeile: Hier wurde nach der Sortierung erst eine polyklonale Linie angesetzt und diese zwei Wochen später erneut sortiert und durch limitierende Verdünnung vereinzelt.

2.2.3 Charakterisierung einer Auswahl von T-Zellklonen

2.2.3.1 Funktionelle Analysen

Das Ziel der Identifizierung mehrerer HBV-spezifischer T-Zellklone ist es, für eine spätere adoptive T-Zelltherapie ein Repertoire unterschiedlicher T-Zellrezeptoren mit optimalen Aviditäten zur Verfügung zu haben. Es wird angenommen, dass T-Zellen mit einer höheren Avidität der Bindung von Rezeptor an den MHC:Peptid Komplex ihre Zielzellen besser erkennen und lysieren können. Dies gilt sowohl für Tumorantigene (Kronig et al., 2009), als auch für Antigene intrazellulärer Erreger (persönliche Mitteilung Magdalena Nauerth, MIBI).

Für eine Einschätzung der Avidität der untersuchten Klone wurden T2-Zellen mit abnehmender Peptidkonzentration beladen und in einem Chrom-Release-Assay in einem Verhältnis von drei Effektoren pro einer Zielzelle eingesetzt. Die halbmaximale Lyse von ca. 40 % wurde bei allen getesteten Klonen bei einer Peptid-Konzentration von etwa 3 nM erreicht. Die beiden S172 spezifischen Klone WL-31 (akuter Patient) und WL-12 (ausgeheilter Spender) schienen etwas weniger avid zu sein als die C18- und S20-spezifischen Klone (Abb. 2.42).

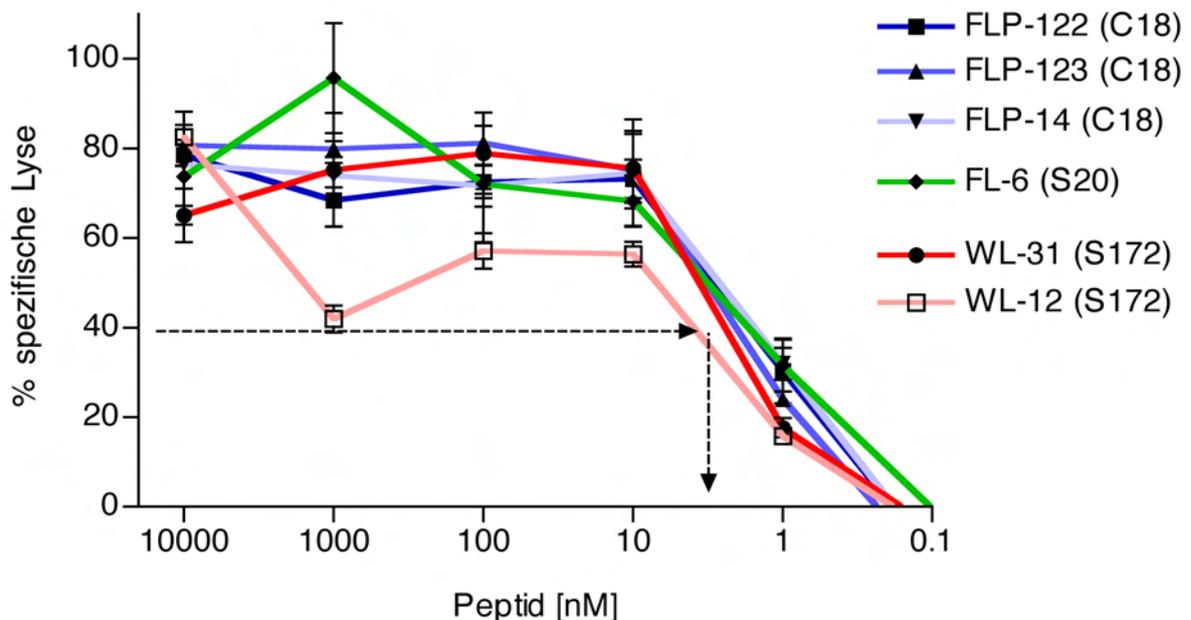


Abb. 2.41: Zytotoxizität verschiedener Klone bei sinkender Peptid-Konzentration. Blau/FLP = C18-spezifische Klone, grün/FL = S20-spezifischer Klon, rot/WL = S172-spezifische Klone. Die jeweiligen Peptide wurden vor der Beladung auf T2 Zielzellen titriert. Dargestellt ist die spezifische Lyse bei einem Effektor : Zielzell Verhältnis von 3:1. Die gestrichelten Linien deuten die Peptidkonzentration an, bei der die Hälfte der maximalen Lyse erreicht wurde.

Die drei C18-spezifischen Klone wurden erneut gegen verschiedene niedrige Peptid-Konzentrationen getestet. Es stellte sich heraus, dass die Avidität des Klons FLP-14 höher war als die der Klone FLP-122 und FLP-123 (Abb. 2.42a). Des Weiteren wurde eine 5-stündige Ko-Kultur mit beladenen T2-Zellen durchgeführt und im Anschluss mit einer intrazellulären Zytokinfärbung die Anzahl an IFN- γ und IL-2 produzierenden Zellen bestimmt. Auch in diesem Ansatz war Klon FLP-14 effektiver. Doppelt so viele Zellen produzierten INF- γ im Vergleich zu den Klonen FLP-122 und FLP-123 und auch die Produktion von IL-2 war deutlich höher (Abb. 2.42b). Die beiden schwächeren Klone verhielten sich in allen Vergleichen nahezu identisch. Eine genauere Bestimmung der Avidität ausgewählter Klone soll in Zusammenarbeit mit der AG Busch des Instituts für Mikrobiologie geschehen, die dafür neue, exaktere Tests etabliert hat.

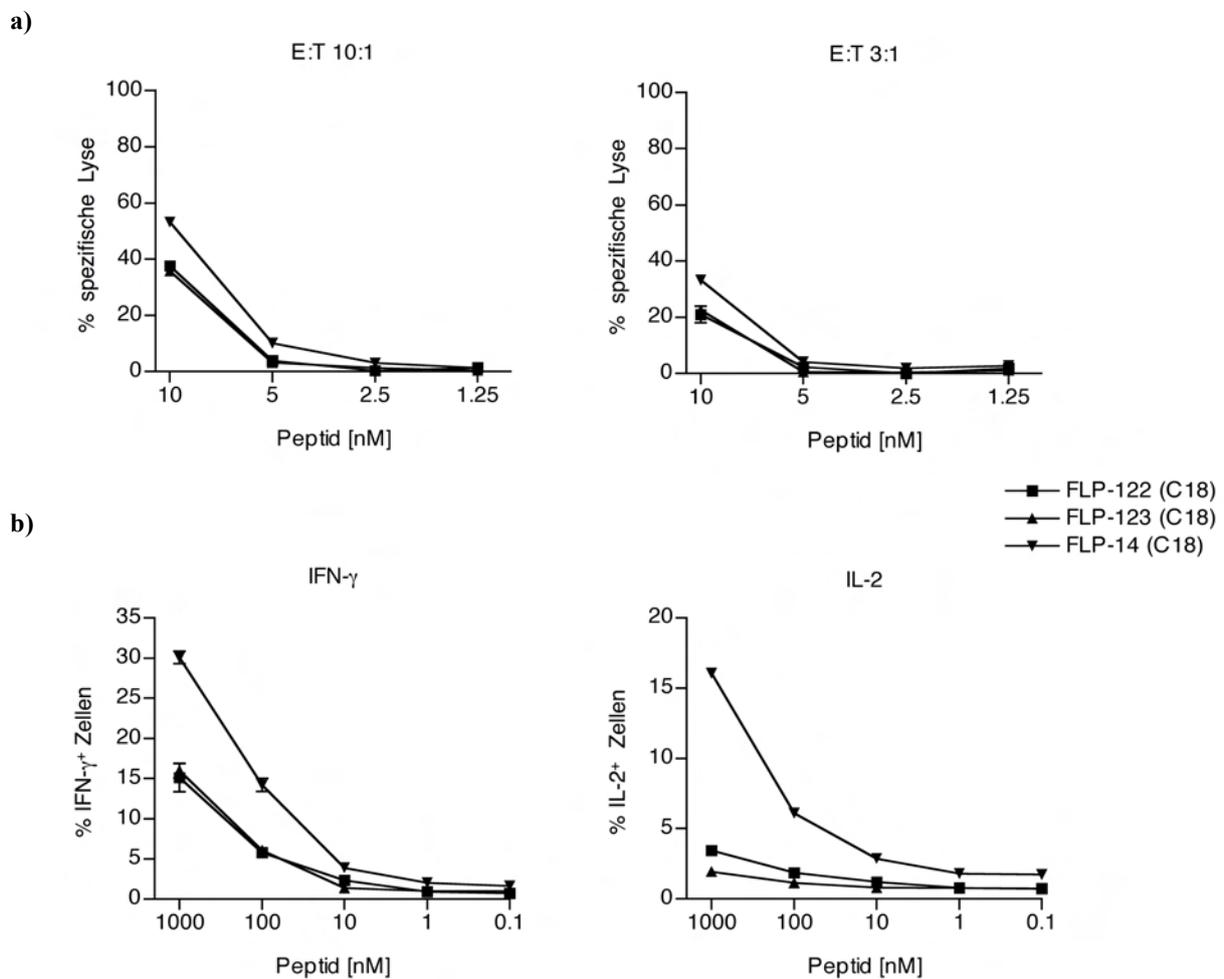


Abb. 2.42: Vergleich von drei C18-spezifischen T-Zellklonen. a) Spezifische Lyse bei Peptidbeladung im nanomolaren Bereich. Effektor- zu Zielzellverhältnis 10:1 bzw. 3:1. b) Intrazelluläre Zytokinfärbung nach Ko-Kultur mit Peptid-beladenen T2 Zellen.

2.2.3.2 Analyse der T-Zellrezeptor-Ketten

Die Idee eines T-Zellrezeptor Transfers ist es, T-Zellen aus dem Patienten zu isolieren, mit einem neuen Antigen-spezifischen Rezeptor zu versehen und wieder in den Patienten zu transferieren. Hierfür ist es zunächst nötig, die genetische Information für einen T-Zellrezeptor zu entschlüsseln. Wie bereits in 1.2.2 beschrieben, gibt es durch somatische Rekombination theoretisch ein Repertoire von 10^{18} unterschiedlichen Rezeptoren (Abken, 2009).

Hat man einen Klon mit der gewünschten Spezifität gewonnen, kann über eine RNA Isolation, cDNA Synthese, PCR und anschließende Sequenzierung identifiziert werden, welche Kombination von V-, (D-) und J-Region in den α - und β -Ketten des TZR zu eben dieser Spezifität geführt haben. Ein Primer der PCR liegt im konstanten Bereich der TZR Kette. Der andere Primer liegt im variablen Teil der TZR Kette, welcher vor der Sequenzierung nicht bekannt ist. Eine Möglichkeit ist es, viele voneinander unabhängige PCR durchzuführen und für jeden möglichen variablen Teil den dort ggf. bindenden Primer zu verwenden. In jeder PCR ist zusätzlich ein Primerpaar enthalten, welches als interne Kontrolle im konstanten Bereich bindet (Abb. 2.43, a+b). Eine andere Möglichkeit der PCR ist von Bernhard Frankenberger (Hämatologikum München) optimiert worden, in welcher degenerierte Primer an die meisten variablen Teile binden können und so die Zahl der Reaktionen auf eine (α -Kette) bzw. zwei (β -Kette) beschränkt wird (Abb. 2.43, c+d).

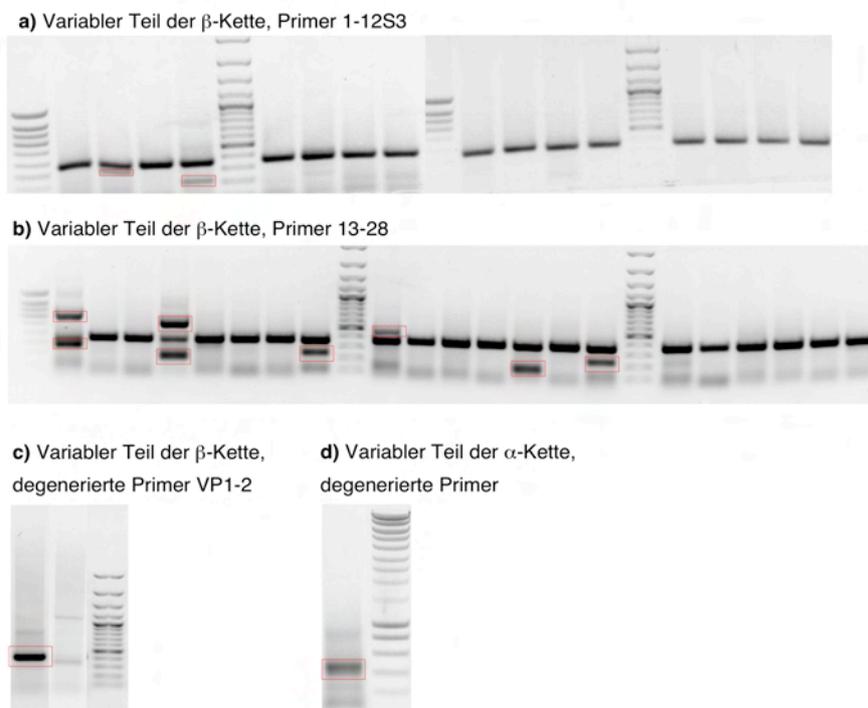


Abb. 2.43: Agarosegel der PCR-Analyse der T-Zellrezeptor-Ketten. a+b) Identifizierung des variablen Teils der β -Kette eines Klons. Es wurde für jedes mögliche variable Segment mindestens ein unterschiedlicher Primer und ein Kontroll-Primerpaar im konstanten Bereich der Kette benutzt. In manchen Fällen entstand ein drittes PCR-Produkt des variablen Primers und eines Kontrollprimers. c+d): Identifizierung der variablen Ketten-Segmente mit degenerierten Primern. Die rot-umrahmten Banden wurden jeweils ausgeschnitten, aufgereinigt und sequenziert.

Abb. 2.43 a) und b) stellen Beispiele für die PCR der β -Kette mit 37 unterschiedlichen Primern im variablen Bereich dar. Die rot umrandeten Banden der PCR wurden aufgereinigt und sequenziert. Mit der Sequenz wurde auf der Webseite <http://imgt.cines.fr> gegen das gesamte Repertoire humaner T-Zellrezeptoren eine BLAST-Suche durchgeführt. Es können hiermit nicht nur die kombinierten V-, D- und J-Regionen identifiziert, sondern auch die Aminosäuresequenz der CDR3-Region bestimmt werden, die für die Bindung an den Peptid : MHC Komplex am wichtigsten ist. Die Sequenzen, die aus den PCR mit vielen variablen Primern gewonnen wurden, stimmten mit denen der PCR mit degenerierten Primern überein.

Von den in 2.2.6 getesteten Klonen wurden mit dieser Methode bereits die Sequenzen der β - und α -Ketten bestimmt (Abb. 2.44). Es stellte sich heraus, dass FLP-122 und FLP-123 identische TZR-Ketten hatten und somit aus einer gemeinsamen Ursprungszelle entstanden sein mussten.

Clone	Patient	Peptide	Arden	V-GENE	score	identity %	J-GENE	score	identity %	D-GENE
G6	3	FLLTRILTI (S20)	β	8S1/2 TRBV12-3*01	884	97,84	TRBJ1-1*01	231	97,92	—
			α	?						
D1	2	FLLTRILTI (S20)	β	8S1/2 TRBV12-3*01	831	98,82	TRBJ1-1*01	231	97,92	TRBD1*01
			α	?						
FL6	1	FLLTRILTI (S20)	β	8S1/2 TRBV12-3*01	620	92,14	TRBJ2-1*01	208	93,62	—
			α	15S1 TRAV5*01	1168	98,34	TRAJ21*01	212	87,27	
WL12	2	WLSLLVPFV (S172)	β	6S3 TRBV7-6*01	669	95,83	TRBJ2-2*01	255	100,00	TRBD2*01
			α	2S1 TRAV12-2*01	891	94,85	TRAJ53*01	276	90,91	
WL31	1	WLSLLVPFV (S172)	β	13S1 TRBV6-5*01	636	95,00	TRBJ2-2*01	210	90,20	TRBD2*02
			α	19S1 TRAV41*01	1118	98,7	TRAJ42*01	240	92,31	
6C	2	FLPSDFFPSV (C18)	β	14S1 TRBV27*01	805	100,00	TRBJ2-1*01	223	94,00	TRBD1*01
			α	?						
7D	2	FLPSDFFPSV (C18)	β	15S1 TRBV24-1*01	805	100,00	TRBJ2-1*01	187	86,00	TRBD2*02
			α	?						
FLP122	1	FLPSDFFPSV (C18)	β	14S1 TRBV27*01	581	88,11	TRBJ2-7*01	217	95,74	TRBD2*02
			α	2S1 TRAV12-2*01	1096	96,15	TRAJ26*01	264	93,33	
FLP123	1	FLPSDFFPSV (C18)	β	14S1 TRBV27*01	577	88,11	TRBJ2-7*01	217	95,74	TRBD2*02
			α	2S1 TRAV12-2*01	1134	98,30	TRAJ26*01	273	95,00	
FLP14	1	FLPSDFFPSV (C18)	β	22S1 TRBV2*01	683	92,11	TRBJ2-7*01	181	87,23	TRBD1*01
			α	2S1 TRAV12-2*01	1294	98,5	TRAJ28*01	303	95,45	
FLP67	1	FLPSDFFPSV (C18)	β	1S1 TRBV9*01	840	95,58	TRBJ2-6*01	238	94,34	TRBD2*01
			α	?						

Abb. 2.44: Übersicht der identifizierten T-Zellrezeptor-Ketten. Die Namen der Gene sind nach der Nomenklatur von IMGT angegeben und für die Gene der variablen Segmente zusätzlich die entsprechende Bezeichnung nach Arden (Arden et al., 1995). Von den 6 funktionell analysierten Klonen aus Abb. 2.41 wurden bereits die Sequenzen beider Ketten identifiziert. Da die Klone FLP122 und FLP123 identische Sequenzen aufwiesen, wurde von weiteren Klonen vorerst nur die β -Kette sequenziert, um herauszufinden, wie viele Klone identisch waren.

Um vor weiteren funktionellen Analysen herauszufinden, um wie viele unterschiedliche Klone es sich tatsächlich handelte, wurden von weiteren Klonen vorerst nur die β -Ketten analysiert. Der Vergleich zeigte, dass für jede einzelne Peptidspezifität pro Spender maximal 3 unterschiedliche Klone isoliert worden waren (Abb. 2.45). Die identischen C18-spezifischen Klone 1 und 2 des Spenders 2 stammten aus dem Stimulationsansatz mit 1 nM bzw. 1 μ M Peptid.

Die Ketten einiger Klone konnten nicht sequenziert werden, da es sich um Mischsequenzen handelte. Dies lässt darauf schließen, dass die Zellen nicht monoklonal waren, sondern ein polyklonales Gemisch darstellten. Es wäre möglich, dass es sich hierbei nur um 2 Klone handelt, von denen einer identisch mit dem dominanten Klon diese Spezifität ist. In diesem Falle könnte durch eine Färbung des TZR (Streptamer) und der α - und β -Ketten des dominanten Klons, der nicht-dominante Klon am Sortiergerät isoliert werden.

Drei der unterschiedlichen Klone benutzten das gleiche V_α -Segment (2S1) und alle S20-spezifischen Klone der 3 Spender benutzten das V_β -8S1 Segment (Abb. 2.44). Interessanterweise war die V_β -CDR3-Region der Spender 3 und 2 bis auf 2 Aminosäuren identisch (Abb. 2.46).

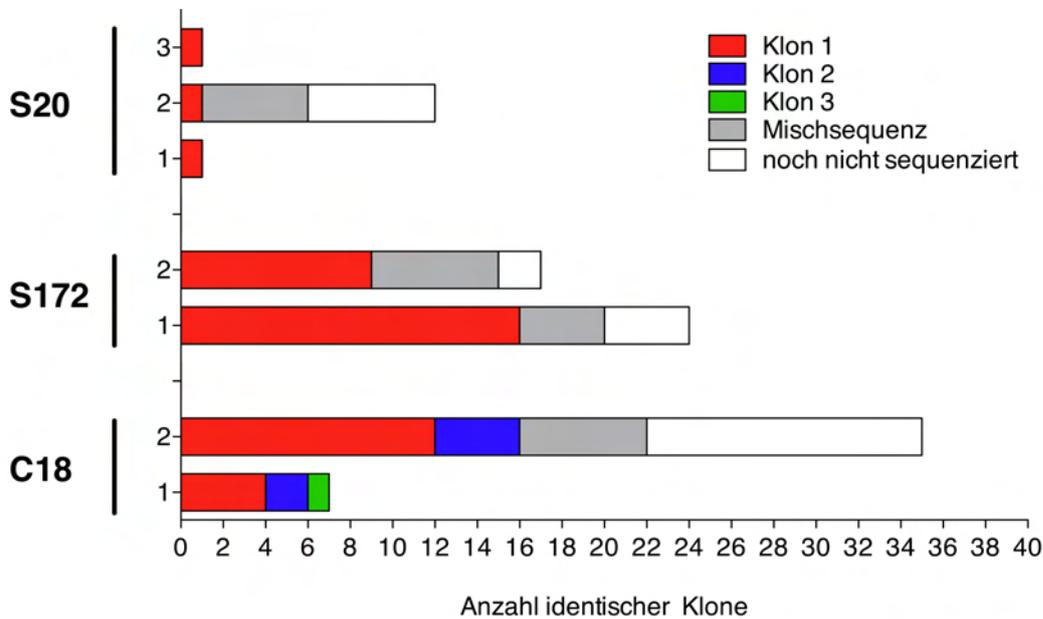


Abb. 2.45: Klonale Zusammensetzung der T-Zellklone. Die β -Ketten etwa $\frac{3}{4}$ der HBV-spezifischen T-Zellklone wurden sequenziert. Wiesen die Klone die gleichen Sequenzen auf, so wurden sie jeweils für den Spender (Y-Achse) und die Peptid-Spezifität als ein „Ursprungsklon“ zusammengefasst (Klon 1-3).

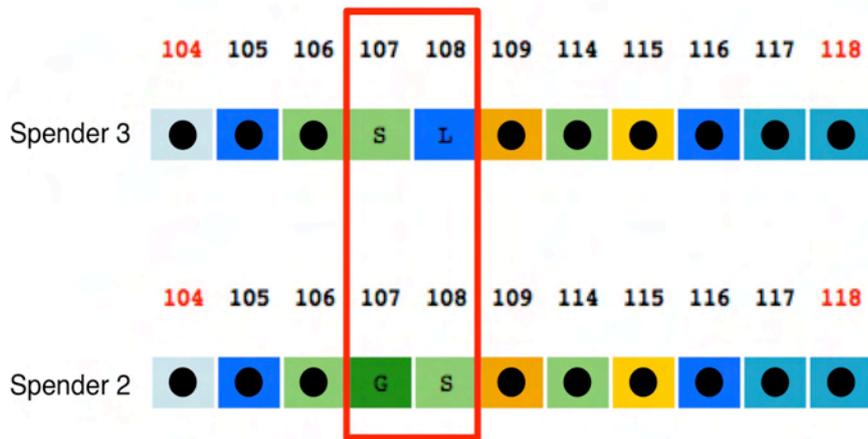


Abb. 2.46: Vergleich der Aminosäuresequenz der V β CDR3-Region von zwei S20-spezifischen Klonen. Oben: Spender 3, unten: Spender 2. Identische Aminosäuren sind durch einen schwarzen Punkt gekennzeichnet.

2.2.4 Generierung eines Maus-Modells zur Evaluierung humaner HBV-spezifischer T-Zellklone

Um die gewonnenen T-Zellrezeptoren *in vivo* evaluieren zu können, bedarf es eines Mausmodells, in dem HBV-Peptide auf dem humanen MHC-I Molekül HLA-A2 präsentiert werden. In bisherigen Studien wurden immuninkompetenten Mäusen humane HBV-Hepatomlinien injiziert und 15 Tage später TZR-transduzierte humane T-Zellen in den Tumor transferiert. Die Funktionalität der T-Zellen wurde über die Abnahme des Tumorgewichtes bestimmt (Gehring et al., 2010). Für eine Einschätzung, wie sich modifizierte T-Zellen mit einem HBV-spezifischen TZR im Patienten verhalten könnten, ist dieses Modell allerdings wenig geeignet.

Um dies in einem besseren Maus-Modell untersuchen zu können, wurden HBV transgene Mäuse mit HHD2-Mäusen verpaart. Letztere exprimieren das humane HLA-A2, während das dominante murine MHC-I-Molekül H-2D^b, sowie das murine β 2-Mikroglobulin ausgeknockt sind (Pascolo et al., 1997). Da in der F1-Generation alle Merkmale heterozygot vorlagen, wurden die Mäuse wahllos weiter verpaart und erst in der F2-Generation eine genetische Analyse vorgenommen. Dafür wurde aus einem Stück Schwanz die DNA isoliert und die Merkmale in einer PCR überprüft. Beim Gen HHD (HLA-A2) konnte nur festgestellt werden, ob das Allel phänotypisch positiv war, nicht aber, ob es homozygot oder heterozygot vorlag (Abb. 2.47 a). Das Gleiche galt für das HBV-Transgen, welches in einer qPCR zu dem single-copy Gen *Nid2* relativiert wurde. Leider war es nicht möglich, sicher zwischen Homo- und Heterozygotie zu unterscheiden, wenn sich in den Schwanzspitzen für die DNA-Isolierung noch etwas Blut mit HBV-Virionen befand (Daten nicht gezeigt).

Das Allel für das murine MHC-I H-2D^b sowie das murine β 2-Mikroglobulin müssen für eine gute Expression und optimale Peptid-Präsentation des humanen HLA-A2 Transgens homozygot negativ vorliegen. Dies kann über zwei bzw. eine PCR bestimmt werden (Abb. 2.47 b-d). Bei den weiteren Verpaarungen der Tiere wurde darauf geachtet, dass mindestens ein Merkmal von H-2D^b oder β 2-Mikroglobulin homozygot negativ und das andere zumindest heterozygot vorlag. In der 4. Generation hatten bereits einige Tiere den gewünschten Phänotyp (rote Kästen).

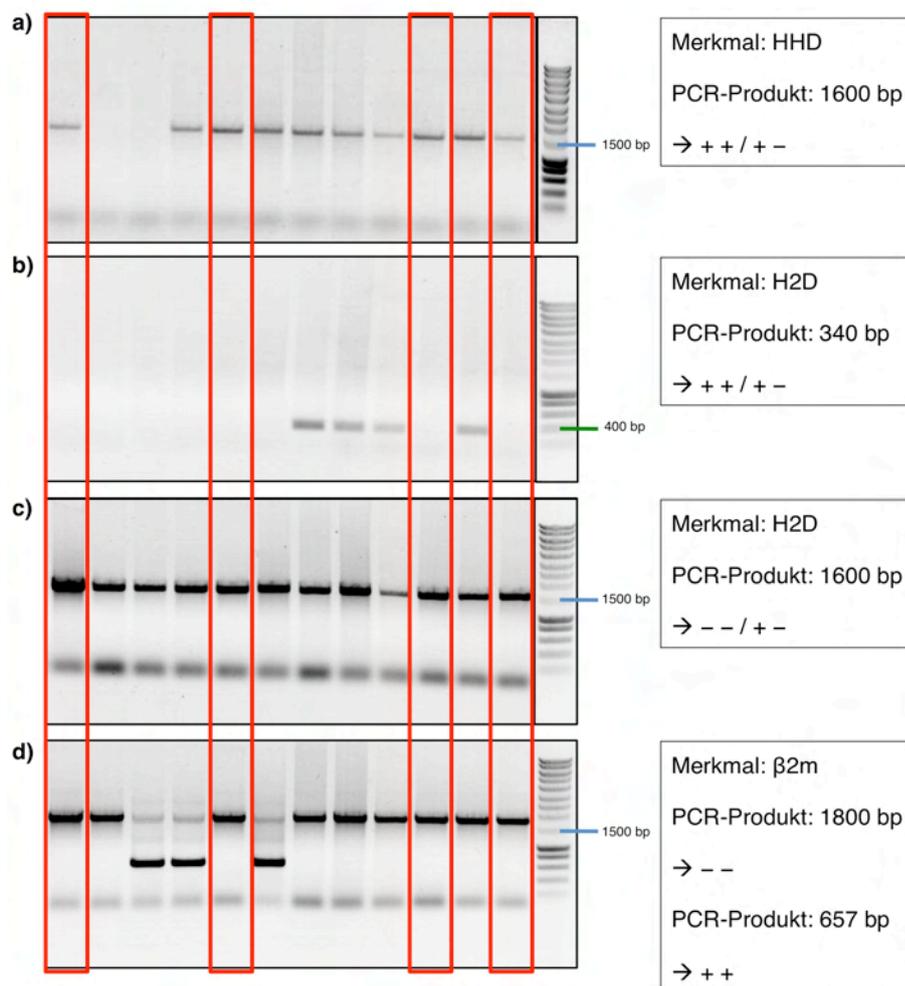


Abb. 2.47: Screening von Mäusen der Verpaarung HBV1.3/HHDII. Rechts sind jeweils die erwarteten Fragmentgrößen angegeben. Die roten Kästen zeigen die Mäuse an, die nach der Verpaarung die gewünschten Merkmale trugen. Weitere Erläuterungen siehe Text.

3 Diskussion

Derzeitige Medikamente zur Behandlung der chronischen Hepatitis B unterdrücken die Virus-Replikation, führen aber nicht zu dessen Elimination und somit auch nicht zur Heilung des Patienten. Bei einer Ausheilung einer akuten, aber auch einer chronischen Infektion, findet man eine starke, gegen mehrere Epitope gerichtete T-Zellantwort. Eine adoptive T-Zelltherapie mit HBV-spezifischen T-Zellen stellt somit eine Möglichkeit dar, das Defizit in der T-Zellantwort des chronischen Patienten zu überwinden.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einsatz von Chimären Antigen Rezeptoren (CAR) in HBV transgenen Mäusen untersucht, sowie HBV-spezifische T-Zellrezeptoren identifiziert werden.

3.1 Evaluierung eines HBV-spezifischen Chimären Antigen Rezeptors im Maus-Modell

3.1.1 Charakterisierung des murinisierten CARs

Der extrazelluläre Teil eines CARs besteht aus einem einkettigen Antikörperfragment, das ein definiertes Antigen erkennt, und einem Abstandshalter, der aus dem Fc-Teil des Immunglobulin G gewonnen wurde. Intrazellulär folgen CD28- und CD3 ζ -Signaldomänen, die bei Bindung des Antikörperfragments eine Aktivierung der T-Zelle einleiten. Die Expression des CARs in den T-Zellen wird über eine retrovirale Transduktion erreicht.

Der in dieser Arbeit verwendete CAR war bereits erfolgreich *in vitro* gegen humane HBV-replizierende Zellen eingesetzt worden (Bohne et al., 2008). Da die Wirksamkeit des CARs nun in Mäusen getestet werden sollte, wurden der humanisierte Abstandshalter und die Signaldomänen gegen die entsprechenden murinisierten Gegenstücke ausgetauscht (Chmielewski, 2007; Hohn, 2007). Der Grund hierfür war die Erwartung, dass erstens murine Signaldomänen in murinen Zellen eine bessere Aktivierung der Zellen auslösen würden, und zweitens das Potential der Antikörperbildung gegen den CAR vermindert werden würde. Eine klinische Studie hat gezeigt, dass selbst nach dem Transfer von T-Zellen mit einem humanisierten CAR nach durchschnittlich 9 Wochen in 6 von 7 Patienten Antikörper gegen den CAR nachweisbar waren (Lamers et al., 2011).

Der murinisierte S-CAR (gegen die HBV-Hüllproteine gerichtet) und der CEA-CAR (gegen Carcinoembryonales Antigen gerichtet, Negativkontrolle) wurden sowohl in CD4⁺ als auch in

CD8⁺ T-Zellen nach Transduktion gut exprimiert. Dennoch konnte nach Ko-Kultur mit murinen HBV⁺ bzw. S⁺ Zielzellen keine Aktivierung der T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 2.6).

In den selbst generierten Fibroblasten C57-S befand sich wahrscheinlich, trotz akzeptabler Sekretion von HBsAg, nicht genügend HBV S-Protein in der Zytoplasmamembran, um eine Aktivierung der T-Zellen auszulösen (Abb. 2.5).

Bei der anderen getesteten Zelllinie handelte es sich um die murinen immortalisierten Hepatozyten HBV-met (Pasquetto et al., 2002). Der Grund für die mangelnde Aktivierung durch HBV-met Zellen könnte ebenfalls in einer zu geringen Oberflächenexpression des S-Proteins liegen, oder aber auch an der Tatsache, dass nur etwa 15 % der Hepatozyten HBV replizierten (Abb. 2.4).

Eine Überstimulation der T-Zellen während der Transduktion konnte ausgeschlossen werden, da transduzierte Zellen über einen transgenen, natürlichen T-Zellrezeptor (OT-1) noch gut aktivierbar waren (Abb. 2.9).

Der murinisierte S-CAR wurde in einem T-Zell-Hybrid stabil exprimiert und es konnte die Bindung des Antikörperfragments an das S-Protein und schließlich die Aktivierung der Zellen gezeigt werden (Abb. 2.7). Dies bewies die Funktionalität des murinen Konstruktes. Unklar blieb, warum sich dies in primären Zellen nicht bestätigte. Wir vermuten, dass hier trotz recht guter Transduktionseffizienz ein gewisser Schwellenwert der CAR-Expression, der zur Aktivierung nötig ist, nicht erreicht wurde. Etwa 90 % der T-Zell-Hybrid Zellen exprimierten den S-CAR, worin deren gute Aktivierung begründet liegen könnte.

Abschließend kann nur zusammengefasst werden, dass der murinisierte S-CAR in primären Mauslymphozyten keine Funktion zeigte und auch keine geeignete murine Zelllinie zur Charakterisierung zur Verfügung stand. Dieser Problematik wollten wir aber nicht weiter nachgehen, da wir zeigen konnten, dass der humanisierte CAR in murinen Zellen eingesetzt werden kann und die relevante Fragestellung die praktische Anwendbarkeit des humanisierten CARs war.

3.1.2 Charakterisierung des humanisierten S-CARs in murinen T-Zellen

Die humanisierten CAR konnten in murinen T-Zellen ähnlich gut wie die murinisierten CAR exprimiert werden. Die T-Zellen, die mit dem HBV-spezifischen CAR transduziert worden waren, produzierten IFN- γ , wenn sie mit der humanen HBV-replizierenden Zelllinie HepG2.2.15 kultiviert wurden. Auf der Kontroll-Zelllinie HepG2 und den oben beschriebenen HBV-met Zellen fand keine Aktivierung statt (Abb. 2.12). Da der humanisierte S-CAR in Mauszellen funktional war, bestätigt dies die Vermutung, dass HBV-met als Zielzellen nicht geeignet sind.

In HepG2.2.15 Zellen gelangt wahrscheinlich mehr S Protein an die Zelloberfläche, da sie das HBV-Genom (Serotyp *ayw*) in vier Tandemkopien integriert haben und somit die Expression der HBV Proteine an sich höher ist (Sells et al., 1987).

Da der CAR ein konformationelles Epitop und nicht ein prozessiertes Peptid erkennt, besteht die Gefahr, dass allein durch die Bindung löslicher Viruspartikel eine Aktivierung der T-Zelle ausgelöst werden kann. Durch die bloße Zugabe des Medium-Überstandes der HepG2.2.15 Zellen, in dem sich eine große Menge an S-haltigen Partikeln befand, wurden die T-Zellen nicht stimuliert. Bei der Bindung des CARs an sein Antigen, die zu einer Aktivierung führt, spielt die sterische Konformation und die Länge des Abstandshalters eine wichtige Rolle (Kohn et al., 2011; Protzer and Abken, 2010). Es könnte sein, dass erst durch ein Cluster mehrerer CAR-Moleküle eine Aktivierung der Zelle erfolgt und dies aufgrund ihrer Größe und runden Form nicht geschieht, wenn SVP an die Zelle binden.

Die Aktivierung der T-Zellen über den S-CAR zeigte sich nicht nur in der Produktion von IFN- γ , sondern auch in der Proliferation, was durch den Einbau der Substanz BrdU in die DNA getestet wurde (Abb. 2.15). BrdU markiert allerdings nur die neu synthetisierte DNA. Es wurden somit nur die Zellen quantifiziert, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befanden. Es ist anzunehmen, dass die Zahl proliferierender Zellen, die sich gerade in einem anderen Stadium der Mitose befanden, noch größer war.

Eine weitere Effektorfunktion von CD8⁺ T-Zellen ist ihre Zytotoxizität. Wie oben beschrieben, konnte nur die humane Zelllinie HepG2.2.15 als Ziel für die murinen HBV-spezifischen T-Zellen eingesetzt werden. Es wurde keine Lyse der Zielzellen beobachtet. Hierfür könnten Limitationen des Testsystems verantwortlich sein:

1. Murines Granzym B kann zwar Apoptose in humanen Zellen auslösen, hierfür muss aber das Enzym in sehr hohen Konzentrationen in das Medium gegeben werden. Im Vergleich zu humanem Granzym B werden andere Substrate gespalten und die Induktion von Apoptose ist schwächer (Casciola-Rosen et al., 2007; Cullen et al., 2007; Kaiserman et al., 2006).
2. In der physiologischen Situation muss die Effektorzelle vor der Ausschüttung zytotoxischer Moleküle erst über Zell-Adhäsionsmoleküle an ihre Zielzelle binden. Dies hat zur Folge, dass Granzyme und Perforin nur lokal wirken können und benachbarte, nicht infizierte Zellen nicht mit abgetötet werden (Janeway et al., 2005). Es könnte sein, dass diese nötige Bindung von Effektor- und Zielzelle aufgrund der unterschiedlichen Adhäsionsmoleküle zwischen murinen und humanen Zellen nicht stattfinden kann.
3. Für den alternativen Weg der Apoptose-Induktion, der FasL/FasR-Bindung, konnte von anderen eine Interaktion von humanem FasR und murinem FasL gezeigt werden. Hierfür wurden

allerdings der humane FasR in murine Zellen und der murine FasL in Fibroblasten der Meerkatze eingebracht (Takahashi et al., 1994). Für humane Hepatom-Zellen, wie es HepG2.2.15 Zellen sind, wurde gezeigt, dass sie im Vergleich zu primären Zellen nicht sensitiv gegenüber der Fas-vermittelten Apoptose sind (Schulze-Bergkamen et al., 2003).

In dieser Arbeit konnte indirekt nachgewiesen werden, dass murine S-CAR CD8⁺ Zellen nach Kontakt mit HBV-replizierenden Zellen Effektormoleküle degranulieren und somit zytotoxisches Potential haben (Abb. 2.16). Die Expression des FasL der T-Zellen war bei Kultur mit HBV⁺ oder HBV⁻ Zielzellen identisch. Allerdings wurde dies nur nach IL-12 Stimulation getestet, welche per se schon die Expression des FasL hochreguliert (Gorelik et al., 2004; Lee et al., 2007; Wigginton et al., 2001).

Anhand von Ergebnissen aus einem Adenovirus-Infektionsmodell der Maus wurde geschlossen, dass Virus-infizierte Hepatozyten resistent gegenüber der Perforin-induzierten Apoptose seien (Kafrouni et al., 2001) und weiterhin spekuliert, dass dies auch für die HBV Infektion gelte (Bertoletti and Gehring, 2007). In einem Transfer-Experiment mit einem Perforin-defizienten HBV-spezifischen T-Zellklon konnte dies aber nicht nur widerlegt werden, sondern auch demonstriert werden, dass dies der Mechanismus ist, der maßgeblich für die Zerstörung der Hepatozyten verantwortlich ist (Guidotti et al., 1996).

Insgesamt erfüllten T-Zellen, die mit einem HBV-spezifischen CAR modifiziert und dann mit HBV⁺ Zellen kultiviert wurden, alle Merkmale einer aktivierten Effektor-T-Zelle: IFN- γ -Sekretion, Proliferation und Zytotoxizität.

3.1.3 Vergleich verschiedener retroviraler Vektoren

Das Transgen für den jeweiligen CAR wurde über retrovirale Transduktion in die T-Zellen eingebracht. Da der S-CAR in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Abken etabliert wurde (Bohne et al., 2008), wurde zunächst mit deren etabliertem retroviralem Vektor pBULLET gearbeitet (Willemsen et al., 2003). In ersten Transfer-Experimenten mit S-CAR transduzierten Zellen zeigte sich jedoch, dass die Expression des CARs, obwohl anfänglich ca. 40 %, zwei Tage nach Transfer nur noch 6 % betrug (persönliche Mitteilung L.-R. Huang, Bonn). Dieser Effekt könnte darauf zurückzuführen sein, dass im pBULLET Vektor das Transgen unter Kontrolle eines CMV-Promoters liegt (*Cytomegalovirus*), welcher *in vivo* durch Methylierung gedrosselt wird (Brooks et al., 2004).

Aus diesem Grund wurden die CAR-Transgene in den Vektor pMP71 umkloniert, mit dem die Transgen-Expression längere Zeit stabil blieb (Abb. 2.13). Die stabilere Expression kann dadurch erklärt werden, dass im pMP71 Vektor kein CMV-Promoter, sondern eine Sequenz in

der 5' LTR-Region (Long terminal repeat) als Promoter dient. Zusätzlich ist in diesem Vektor das PRE-Element des Woodchuck Hepatitis B Virus (WHV) integriert. Durch dieses posttranskriptionelle, regulatorische Element wird ungespleißte RNA stabilisiert und deren Export aus dem Kern erleichtert (Huang and Liang, 1993).

Alternativ wird für die Expression von chimären Rezeptoren in T-Zellen auch eine Transduktion mit Lentiviren – einer Gattung der Retroviren – oder die Elektroporation mit mRNA verwendet (Zhao et al., 2010). Die zurzeit laufenden klinischen Studien mit CAR werden zeigen, welche Art des Gen-Transfers am effizientesten und sichersten ist. Derzeit wird in sechs Studien gegen maligne B-Zell-Erkrankungen die Gentherapie mit klassischen retroviralen Vektoren, und in jeweils drei Studien der Gebrauch von lentiviraler Transduktion und mRNA Elektroporation erprobt (Almasbak et al., 2011; Kohn et al., 2011).

3.1.4 Vergleich der Konditionierung mit IL-2 oder IL-12

Vor dem adoptiven Transfer wurden die T-Zellen für drei Tage kultiviert. Die Stimulation erfolgte üblicherweise mit Antikörpern gegen CD3 und CD28, sowie mit IL-2. IL-2 ist ein Zytokin, das nach der Bindung des TZR und der Ko-Stimulation über CD28 von den aktivierten T-Zellen sezerniert wird und endokrin und autokrin die Proliferation und Differenzierung der T-Zellen anregt (Boyman et al., 2007; Janeway et al., 2005). In dieser Arbeit wurde die Konditionierung der Stimulation mit IL-2 oder IL-12 verglichen.

IL-12 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das aus den zwei heterogenen Untereinheiten p35 und p40 zusammengesetzt ist. Es wird von aktivierten Immunzellen, z.B. Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen, produziert und induziert eine Differenzierung der CD4⁺ Zellen zu T_H1 Zellen. In NK Zellen und CD8⁺ T-Zellen induziert IL-12 sehr effizient die Produktion von IFN- γ (Trinchieri, 2003). IL-12 fungiert für T-Zellen als „Aktivierungs-Signal 3“, ohne das die Effektorfunktionen nicht optimal entwickelt werden können und es nicht zu einer Ausbildung von Gedächtniszellen kommt (Curtsinger and Mescher, 2010).

Die Art der Stimulation während der retroviralen Transduktion, IL-2 oder IL-12, hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der CAR-exprimierenden Zellen (Abb. 2.17). Für die Effizienz der Transduktion ist entscheidend, dass die Zellen proliferieren, damit die retrovirale DNA in den Zellkern der infizierten Zellen gelangen können. Die Stärke der Proliferation durch IL-2 und IL-12 Stimulation ist vergleichbar (Curtsinger and Mescher, 2010). Da IL-12 per se die Produktion von IFN- γ anregt und die Rezeptor-induzierte Aktivierung über die Produktion von IFN- γ bestimmt wird, ist diese Art der Stimulation zur Charakterisierung eines Rezeptors *in vitro* nicht geeignet.

Vor der Stimulation mit IL-12 wurden aus Milzzellen die CD8⁺ Zellen positiv selektioniert. Der Grund hierfür war, dass sich durch die Wirkung von IL-12 auf andere Lymphozyten (v.a. CD4⁺ T-Zellen) das Zytokinmilieu nachteilig ändern könnte.

Es wurde gezeigt, dass CD4⁺ CAR-transduzierte Zellen auch Effektorfunktionen erlangen (Bohne et al., 2008), und dass bei einem gleichzeitigen Transfer von CAR⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in einem murinen Tumormodell das Überleben und der Effekt der transferierten Zellen deutlich besser waren, als wenn nur einer der beiden T-Zelltypen transferiert wurde (Moeller et al., 2005). Somit hätte es ein Vorteil der IL-2 Stimulation sein können, dass hier sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ Zellen transferiert werden.

Der Transfer der gleichen Anzahl von CAR⁺ Zellen mit IL-2 oder IL-12 Konditionierung in HBVtg Mäuse zeigte, dass sich nach IL-12 Stimulation in Blut, Milz und Leber etwa dreimal mehr transferierte Zellen befanden als nach IL-2 Stimulation (Abb. 2.18). Dies entspricht exakt dem Wert, der auch in einem anderen Transfermodell mit IL-12-„Priming“ beobachtet wurde (Chang et al., 2004). Auch die Hepatotoxizität und die Reduktion der viralen DNA in der Leber waren nach IL-12 Vorbehandlung gesteigert. Dieser Effekt könnte auf die insgesamt höhere Zahl transferierter S-CAR T-Zellen, die sich am Tag 6 in der Leber befanden, zurückzuführen sein.

Weiterhin konnte beim Vergleich der Wirkung von IL-12 Stimulation auf S-CAR oder Kontroll-CAR transduzierte Zellen beobachtet werden, dass sich am Tag 12 nach Transfer mehr HBV-spezifische T-Zellen in Blut bzw. noch deutlicher in der Leber wiederfanden (Abb. 2.21). Zum einen deutet dies auf eine starke Antigen-abhängige Proliferation und ein besseres Überleben an sich hin, zum anderen kann auch spekuliert werden, ob die hohe Zahl transferierter Zellen in der Leber auf ein gezieltes Einwandern in die Leber, dem Organ der HBV-Replikation, oder eine noch stärkere Proliferation an Ort und Stelle zurückzuführen ist.

Dass die IL-12 konditionierten Zellen *in vivo* durch Antigen-spezifische Stimulation stärker proliferierten und/oder besser überlebten, könnte in einer verminderten Sensitivität gegenüber der Induktion von Apoptose begründet sein. Anti-apoptotische Moleküle wie Bcl-3 (Valenzuela et al., 2005) und cFLIP (Lee et al., 2003) werden hochreguliert, während die Aktivierung von apoptotischen Caspasen reduziert ist (Chang et al., 2004; Lee et al., 2003; Palmer et al., 2001).

Für den Erfolg einer T-Zelltherapie ist es wichtig, dass die modifizierten Zellen lange genug überleben, um das Virus bzw. die Tumorerkrankung zu eliminieren. In einer Studie über einen T-Zelltransfer gegen metastatische Melanome zeigten nur jene Patienten eine komplettes oder teilweises Ansprechen auf die Therapie, in denen die transferierten Zellen auch noch einen Monat nach Transfer nachweisbar waren (Rosenberg et al., 2011).

Darüber hinaus wäre es wünschenswert, dass die transferierten Zellen als Gedächtniszellen persistieren, um so auf einen erneuten Antigenkontakt schnell reagieren zu können. Am Tag 94 nach dem Transfer zirkulierten die IL-12 stimulierten S-CAR CD8⁺ Zellen noch im Blut (Abb. 2.31). Ihr Phänotyp entsprach mit der Expression von CD127 (IL-7 Rezeptor) und größtenteils auch CD62L (Adhäsionsmolekül zur Einwanderung in die Lymphknoten) dem von Zentral- bzw. Effektor-Gedächtniszellen (Bachmann et al., 2005). Dies entspricht dem Erscheinungsbild Antigen-spezifischer T-Zellen nach dem Ausheilen einer LCMV-Infektion (Lymphozytäres Choriomeningitis Virus) im Mausmodell (Bachmann et al., 2005) und auch nach dem Ausheilen einer akuten HBV-Infektion (Boettler et al., 2006).

Da im HBVtg Mausmodell auch trotz der spezifischen T-Zellen die Virus-Antigene, ausgehend von dem genomischen HBV-Integrat, permanent exprimiert werden und dies einer persistierenden Infektion entspricht, wäre eigentlich keine so deutliche Differenzierung zu Gedächtniszellen erwartet worden (Bachmann et al., 2005). Daher ist noch in einem Zeitverlauf zu klären, in welchem Maße die IL-12 Konditionierung in unserem Modell zu einer unspezifischen Differenzierung zu Gedächtniszellen beiträgt. Es ist bereits gezeigt worden, dass IL-12 durch Regulierung von T-bet und Eomesodermin (Takemoto et al., 2006) „indirekt über das Effektor/Gedächtnis-Schicksal entscheiden kann“ (Arens and Schoenberger, 2010). Inwiefern diese Mechanismen der Homöostase direkt durch IL-12 oder durch ein Zusammenspiel mit IFN- γ (Badovinac et al., 2000; Refaeli et al., 2002) bedingt sind, ist bisher nicht bekannt (Chang et al., 2004; Takemoto et al., 2006).

Im HBVtg Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die systemische Gabe von IL-12 die Virus Replikation inhibiert (Cavanaugh et al., 1997). Außerdem können HBcAg-spezifische Lymphozyten aus chronisch-infizierten HBV-Patienten durch Stimulation mit Antigen und IL-12 wieder zur IFN- γ -Produktion angeregt werden (Suri et al., 2001; Szkaradkiewicz et al., 2005; Xiong et al., 2007). In Studien mit chronischen HBV-Patienten zeigte die Injektion von IL-12 jedoch geringe Effekte auf die Virämie (Carreno et al., 2000; Rigopoulou et al., 2005); auch in infizierten Schimpansen hatte eine gentherapeutische Immunisierung mit IL-12 keinerlei Wirkung (Shata et al., 2006).

Derzeit ist IL-12 für zahlreiche klinische Studien gegen Tumorerkrankungen oder als Impfadjuvanz für die systemische Gabe zugelassen (Del Vecchio et al., 2007). Es sollte somit kein Problem darstellen, IL-12 zur Stimulation vor einem adoptiven T-Zelltransfer in einer klinischen Studie zu testen.

3.1.5 Transienter Leberschaden und Zellinfiltrate in der Leber

3.1.5.1 Leberinfiltrate

Histologische Analysen der Lebern zeigten, dass in der Gruppe, die S-CAR T-Zellen injiziert bekommen hatten, im Gegensatz zu den beiden Kontrollgruppen massiv Immunzellen in die Leber einwanderten (Abb. 2.22). Durch weitere Färbungen konnte geschlussfolgert werden, dass es sich hierbei größtenteils um endogene Makrophagen und CD3⁺ Zellen handelte, von denen die meisten transferierte CD45.1⁺CD8⁺ Zellen waren (Abb. 2.25). Der S-CAR konnte nicht auf der Oberfläche all dieser Zellen gefärbt werden. Dies könnte mehrere Gründe haben:

1. Die Bindung von Subviralen Partikeln (SVP) an den CAR verhinderte die Bindung der Antikörper (Abb. 2.24).
2. Der CAR wurde ähnlich dem TZR nach der Aktivierung herunter reguliert.
3. Bei der retroviralen Infektion fand ein Transfer des CAR-Proteins statt und nach dieser Pseudotransduktion erschienen die Zellen zwar zunächst CAR⁺, da aber das CAR-Gen nicht in das Genom integriert wurde, fand keine *de novo* Proteinsynthese statt (Liu et al., 1996).
4. Durch das inflammatorische Zytokinmilieu proliferierten auch Antigen-unspezifische Zellen. Das erste Phänomen könnte beispielsweise durch eine quantitative RT-PCR für den S-CAR im Gewebe oder eine Quantifizierung mit Antikörpern gegen S im FACS ausgeschlossen werden.

Acht Tage nach adoptivem Transfer CAR-modifizierter Zellen konnte in der S-CAR Gruppe ein transienter Leberschaden festgestellt werden (Abb. 2.26). Anhand der Daten kann man nur mutmaßen, dass die transferierten Zellen direkt für die Zytotoxizität verantwortlich sind, da das Antigen-spezifische zytotoxische Potential der S-CAR T-Zellen bereits *in vitro* gezeigt worden war. Die Gruppe um F. Chisari hat gezeigt, dass nach dem Transfer eines S-spezifischen T-Zellklons alle transferierten Zellen zum Zeitpunkt des größten Leberschadens Granzym B⁺ waren (Isogawa et al., 2005), und dass nach Transfer eines Perforin-defizienten Klons kein Leberschaden auftrat (Guidotti et al., 1995).

Außerdem befanden sich neben den transferierten Zellen nur wenig andere mögliche zytotoxische Zellen in der Leber. Die CD8⁺ Zellen waren fast ausschließlich transferierte Zellen und die Zahl der NK Zellen (<10 %, Abb. 2.25) erschien niedrig in Anbetracht der Tatsache, dass normalerweise in der Maus-Leber 30 % aller Lymphozyten NKT Zellen sein sollen (Bendelac et al., 1997).

Um die Zellpopulation zu identifizieren, welche nach der Injektion von S-CAR T-Zellen für die Hepatotoxizität verantwortlich ist, könnten T-Zellen aus Perforin- oder FasL-defizienten Mäusen transduziert und injiziert werden. Außerdem wäre es hilfreich, in einem Zeitverlauf das Einwandern verschiedener Zelltyp mit dem Leberschaden korrelieren zu können. Dafür müssten

Tiere an mehreren Zeitpunkten getötet und die Leberinfiltrierenden mononukleären Zellen mit einer FACS-Analyse quantifiziert werden.

In chronisch-infizierten HBV-Patienten wurde anhand der Anzahl der T-Zellen einer einzigen Spezifität (C18-27) während eines transienten Leberschadens geschlussfolgert, dass deren Frequenz zu niedrig sei und deswegen sogenannte „Bystander“ Zellen für den Leberschaden verantwortlich sein müssen (Maini et al., 2000), z.B. NK Zellen (Dunn et al., 2007; Kennedy et al., 2008). Andere Daten belegen, dass HBV-spezifische T-Zellen im akuten Krankheitsverlauf gleichzeitig mit dem Leberschaden ansteigen oder beim Aufflammen der chronischen Entzündung gleichzeitig mit oder nach dem Leberschaden auftreten, falls diesem die Serokonversion von HBeAg zu anti-HBe folgt (Bertoletti et al., 2003; Maini et al., 2000; Maini et al., 1999; Penna et al., 1996; Webster et al., 2004; Webster et al., 2000).

3.1.5.2 Transienter Leberschaden

Die beobachtete Erhöhung der Lebertransaminasen im Serum war nur transient, d.h. sie war an den Tagen 4 und 12 mild und hatte am Tag 8 einen Höchstwert (Abb. 2.26). Dieser Verlauf ist auch von anderen Gruppen nach dem Transfer HBV-spezifischer T-Zellen in HBVtg Mäuse (Guidotti et al., 1996; Isogawa et al., 2005; Voehringer et al., 2000) oder nach der Transduktion von Hepatozyten mit Adeno-HBV beobachtet worden (von Freyend et al., 2010). Für das langsame Ansteigen des Leberschadens gibt es mehrere mögliche Erklärungen. So könnten die Effektorfunktionen sequentiell erfolgen und erst nach der Sekretion von IFN- γ die Degranulation von Perforin und Granzymen folgen (Isogawa et al., 2005). Oder es sind tatsächlich endogene Zellen für den Leberschaden verantwortlich und diese müssen erst durch IFN- γ und Chemokine wie CXCL9 und CXCL10 (Kimura et al., 2002) oder (Crg2)IP-10 und Mig rekrutiert werden (Kakimi et al., 2001). Am wahrscheinlichsten ist jedoch, dass die transferierten Zellen erst in der Leber proliferieren und der Leberschaden proportional zu der Zahl an Effektorzellen ansteigt (Isogawa et al., 2005).

Dadurch könnte auch der ebenso schnelle Rückgang der Lebertransaminasen im Serum erklärt werden. Die CD8⁺ T-Zellantwort gegen einige virale Pathogene kann in drei Phasen eingeteilt werden: Eine initiale Proliferation der Antigen-spezifischen Zellen bis zu 7-8 Tage nach dem ersten Antigenkontakt. Diese klonale Expansion ist gefolgt von einer Kontraktionsphase, in der 90-95% der Antigen-spezifischen Zellen durch Apoptose sterben (Hoshino et al., 1999). Der AICD (*activation induced cell death*) ist unabhängig von dem Ausmaß der vorausgehenden Expansion oder der Menge und Dauer der Antigenstimulation (Badovinac et al., 2002). Aus den überlebenden Zellen wird die Population der Gedächtniszellen etabliert (Arens and Schoenberger, 2010; Ganusov, 2007; Murali-Krishna et al., 1998). Durch eine *in vitro*

Stimulation mit IL-12 vor dem Transfer kann die Rate der sterbenden Zellen auf 80-85 % reduziert werden (Curtsinger and Mescher, 2010).

Passend zu diesem Schema konnte auch in der vorliegenden Arbeit im Blut bis Tag 8 ein Anstieg der Zahl der transferierten Zellen beobachtet werden (Abb. 2.21). Entsprechend der Kontraktionsphase sank die Zahl zwischen Tag 8 und 12 wieder. Ebenso könnte die Zellzahl in der Leber abgenommen haben und dadurch auch der Leberschaden. Dieses Phänomen konnte bereits beim Transfer eines HBV-spezifischen T-Zellklons beobachtet werden, dessen Zellzahl in der Leber nach Tag 7 um 90 % abfiel und gleichzeitig auch keine Schädigung der Leber mehr gemessen wurde, obwohl $\frac{3}{4}$ der verbleibenden 10 % Zellen noch Granzym B⁺ waren (Isogawa et al., 2005).

Der Gewebeschaden könnte auch ursächlich für die Induktion der Antikörper gegen die viralen Kapside sein (Abb. 2.32). Die Immunfluoreszenz zeigte, dass sich in den Lymphozyten-Infiltraten auch B-Zellen befanden, von denen ein Teil im Zell-Zell-Kontakt mit CD3⁺ Zellen stand. Werden infizierte Hepatozyten zerstört, so werden Kapside in das Serum freigesetzt, die an B-Zellrezeptoren binden und durch Endozytose aufgenommen werden. Da in zwei Mäusen einer Kontrollgruppe bereits am Tag 0 Antikörper messbar waren und die Antikörper in der S-CAR-Gruppe nach höchstens 12 Tagen induziert worden waren – was zeitlich für einen *Boost* spricht – , ist anzunehmen, dass bereits vorher anti-HBc unterhalb des Detektionslimits vorhanden waren und durch die freigelassenen Kapside ein *Boost* erfolgte.

3.1.5.3 IL-10 Expression

Am Tag 12 nach dem Transfer von CAR-modifizierten T-Zellen wurde in der S-CAR Gruppe eine 8-fache Erhöhung der IL-10 Expression in der Leber gemessen (Abb. 2.26). Das Zytokin IL-10 ist wichtig für die negative Regulierung der Immunantwort von Effektor T-Zellen und ihrer Proliferation und beugt einem zu starken Gewebeschaden, ausgelöst durch schädliches IFN- γ , Granzyme und Fas-vermittelte Apoptose, vor (Sanjabi et al., 2009). Die Hauptquellen für die Produktion von IL-10 sind T_H2 Zellen und regulatorische T-Zellen, aber auch CD8⁺ T-Zellen (Mosser and Zhang, 2008) und die leberansässigen Makrophagen, die Kupffer Zellen (Erhardt et al., 2007; Knolle et al., 1997) können IL-10 produzieren.

Bei einer Schädigung der Leber werden Glukokortikoide freigesetzt, die eine Bindung von STAT-3 an den IL-10 Promoter induzieren (Unterberger et al., 2008), und so die IL-10 Produktion verstärken (Swain et al., 1999). Durch seine anti-inflammatorische Wirkung trägt IL-10 im LCMV-Modell zur Viruspersistenz bei (Brooks et al., 2006) und es gibt Hinweise darauf,

dass dies auch bei HCV und HBV der Fall ist, dafür aber eine fortwährende Schädigung der Leber verhindert wird (Abel et al., 2006; Dunn et al., 2009; Hyodo et al., 2003).

Die Untersuchung des Zusammenhangs von IL-10 Produktion und des Rückgangs der Lebertransaminasen zwischen Tag 8 und 12 nach Transfer lag nicht im Rahmen dieser Arbeit. Die Korrelation beider Parameter konnte bereits in unserer Gruppe gezeigt werden (Chmielewski, 2007; von Freyend et al., 2010). Interessante Fragestellungen wären, ob durch Gabe eines anti-IL-10 Antikörpers (Louis et al., 1997a; Louis et al., 1997b) der Leberschaden länger bestehen bleibt oder hierfür doch nur die absolute Zahl Antigen-spezifischer Zellen in der Leber eine Rolle spielt.

Außerdem könnte untersucht werden, ob das IL-10 durch die endogenen oder die transferierten Zellen produziert wird. Es wurde gezeigt, dass IL-12 stimulierte Zellen IL-10 produzieren (Lee et al., 2007), und so durch einen negativen „feedback“ Mechanismus die eigene Aktivierung limitieren (Meyaard et al., 1996). Dies könnte durch die Transduktion und den Transfer von T-Zellen aus IL-10 GFP-Reporter Mäusen (Kamanaka et al., 2006) oder durch eine gezielte RNA-Aufreinigung aus einzelnen, sortierten Zellfraktionen aus der Leber geschehen.

3.1.6 Antivirale Wirkung von S-CAR T-Zellen

Der adoptive T-Zelltransfer von T-Zellen, die einen HBV-spezifischen CAR exprimierten, führte zu einer fast kompletten Elimination der viralen DNA und der Kapside aus dem Lebergewebe. Ebenso sank die Viruslast im Blut innerhalb von 12 Tagen um durchschnittlich 2 Logstufen (Abb. 2.34). CD8⁺ Zellen können ihre antivirale Effektorfunktion durch Ausschüttung antiviraler Zytokine oder durch die Induktion von Apoptose in der Zielzelle erfüllen.

3.1.6.1 Zytotoxizität

Wie oben bereits diskutiert, kam es nach dem Transfer von S-CAR T-Zellen zu einem transienten Leberschaden. Je mehr Lymphozyten in die Leber einwanderten, desto stärker wurde die virale DNA reduziert. Ob das Ausmaß des antiviralen Effekts durch die höhere Zytokinexpression oder durch die Zerstörung der HBV-replizierenden Zellen bedingt wird, kann hier nicht unterschieden werden. Andere Arbeiten an HBVtg Mäusen zeigten, dass nach Injektion HBV-spezifischer T-Zellklone die antivirale Wirkung nicht eingeschränkt war, wenn der Klon Perforin-defizient war, wohl aber, wenn Antikörper gegen IFN- γ und TNF- α mit injiziert wurden (Guidotti et al., 1999).

Es ist anzunehmen, dass entgegen des HBVtg Mausmodells – in dem keine episomale cccDNA gebildet wird – im akut infizierten Patienten die Zytotoxizität eine wesentlich größere Rolle bei

der Virusbekämpfung spielt. Bisher ist kein Zytokin-abhängiger Mechanismus bekannt, der die cccDNA angreift. Wie in 1.6 dargestellt, kann die cccDNA also aufgrund ihrer langen Halbwertszeit und der langsamen Erneuerungsrate der Hepatozyten (Halbwertszeit > 6 Monate) nur durch die Zerstörung von Hepatozyten eliminiert werden (Mason et al., 2007).

Es wurde postuliert, dass in einer akuten HBV-Infektion des Schimpansen eine Elimination des Virus ohne eine Zerstörung der Zellen abläuft (Guidotti et al., 1999). Bei einer exakten Betrachtung der Daten fällt auf, dass die Ergebnisse vielleicht nicht ganz korrekt analysiert und diskutiert wurden. Genau zu dem Zeitpunkt, an dem die ALT-Werte anfangen zu steigen, beginnt der Rückgang der Viruslast in Serum und Leber und erst zum Zeitpunkt des größten Leberschadens sind Kapsid⁺-Hepatozyten nicht mehr detektierbar und die virale DNA ist auf 1 % des Ausgangswertes gesunken. Im übrigen wird die Viruslast prozentual/linear anstatt – wie für Virustiter üblich – absolut/logarithmisch dargestellt (Guidotti et al., 1999), so dass keine Rückschlüsse auf eine vollständige Elimination des Virus gemacht werden können.

Webster et. al hatten die einmalige Gelegenheit, akut Infizierte bereits vor dem Eintreten von Symptomen zu überwachen. Auch hier zeigte sich, dass Leberschaden, Auftreten von HBV-spezifischen zytotoxischen T-Zellen und Rückgang der Viruslast zeitgleich erfolgen (Webster et al., 2000).

Auch in Ko-Kulturen von HBV⁺ Hepatomzellen mit T-Zellklonen gibt es eine negative Korrelation von Viruslast und Zytotoxizität (persönliche Mitteilung, R. Thimme, Freiburg).

Aus diesen Experimenten und der Tatsache, dass einzig die Zerstörung von infizierten Hepatozyten die cccDNA eliminieren kann, lässt sich schließen, dass die zytotoxische Immunantwort im Menschen einen wesentlichen Beitrag zur Bekämpfung des Virus leistet.

Aus diesem Grund, und der beobachteten Induktion von Antikörpern gegen das Kapsid, ist der kurzzeitige Leberschaden als positiv im Sinne der antiviralen Wirkung der Therapie zu bewerten.

3.1.6.2 Antivirale Zytokine

Die antivirale Wirkung HBV-spezifischer T-Zellklone nach Injektion ist eingeschränkt, wenn gleichzeitig Antikörper gegen IFN- γ und TNF- α injiziert werden. Die Gabe nur eines der beiden Antikörper führt zu einer nur noch partiellen antiviralen Wirkung des T-Zellklons und lässt den Schluss zu, dass beide Zytokine antivirale Mechanismen gegen HBV induzieren (Guidotti et al., 1996). Die virale DNA war in jenem Transfer-Modell bereits nach einem Tag nicht mehr in der Leber mittels Southern Blot detektierbar (Isogawa et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden die HBVtg Empfänger-Mäuse erst am Tag 12 geopfert, die virale DNA ließ sich aber aus dem Serum bestimmen und sie war nach 4 Tagen bereits auf 32 % des Ausgangswert gesunken, während Lebertransaminasen erst leicht erhöht waren (Abb. 2.34).

Die Expression von IFN- γ - und TNF- α in der Leber war am Tag 12 10-fach erhöht und als eine Quelle der Zytokinproduktion konnten S-CAR⁺ T-Zellen identifiziert werden (Abb. 2.27). Für die *ex vivo* Stimulation wurden HBsAg-beschichtete Platten verwendet, somit fand keine Peptidpräsentation über MHC statt und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass zusätzlich Peptid-spezifische T-Zellen, stimuliert über den natürlichen TZR, *in vivo* Zytokine sekretierten (Abb. 2.28). In einer Tetramerfärbung mit den beiden immundominanten HBV-Epitopen waren weder transferierte noch endogene Zellen positiv. Da die Immunfluoreszenz-Färbung des Lebergewebes gezeigt hatte, dass die T-Zellen fast ausschließlich transferierte Zellen waren, ist davon auszugehen, dass sie und nicht endogene Zellen ursächlich für die Zytokinexpression waren.

Am Tag 8 waren die S-CAR⁺ Zellen mit der Sekretion von IFN- γ und/oder TNF- α teilweise bifunktional, was im Allgemeinen mit einer besseren Viruskontrolle in Verbindung gebracht wird (Harari et al., 2006); am Tag 64 nach Transfer produzierten sie nur noch IFN- γ (Abb. 2.29). Unspezifisch stimuliert konnten im Allgemeinen nur 13 % der S-CAR⁺ Zellen kein IFN- γ produzieren und exprimierten gleichzeitig den Erschöpfungsmarker PD-1. In einer einzelnen Maus, die Zeichen einer vorangegangenen Entzündung zeigte, waren drei Mal so viele S-CAR⁺ Zellen IFN- γ /PD-1⁺ (Abb. 2.29). Ob die transferierten Antigen-spezifischen Zellen tatsächlich auf Dauer ähnlich wie in einer chronischen HBV-Infektion ihre Funktionalität verlieren (Boni et al., 2007; Fiscaro et al., 2010; Maier et al., 2007; Watanabe et al., 2010), müsste in einer Kinetik und über einen längeren Zeitraum und unter Einbeziehung weiterer Erschöpfungsmarker untersucht werden.

Im Folgenden soll diskutiert werden, welche bisher publizierten Zytokin-induzierten antiviralen Mechanismen die Reduktion der Viruslast bewirkten.

Nach dem Transfer von HBV-spezifischen S-CAR T-Zellen wurde beobachtet, dass die virale prägenomische RNA (pgRNA) in den Hepatozyten am Tag 12 reduziert, aber nicht eliminiert war. Die virale DNA war dagegen kaum noch vorhanden. Kapsid-Protein war nur noch nukleär und nicht mehr zytoplasmatisch lokalisiert. Das virale HBeAg war nur am Tag 8 signifikant reduziert, HBsAg blieb über die Versuchsdauer stabil (Abb. 2.33).

IFN- γ und IFN- α/β aktivieren (teilweise überlappend) Gene über die JAK-STAT Signalkaskade (Guidotti and Chisari, 2001). Die exakten intrazellulären antiviralen Mechanismen gegen HBV sind bislang unzureichend untersucht. Microarrays ergaben, dass die durch Interferone regulierten hepatozellulären Gene hauptsächlich Komponenten des Immunproteasoms und GTP-

bindende Proteine sind. Eine Änderung der Proteasom-Untereinheiten könnte die proteolytische Spezifität ändern und zu einer beschleunigten Degradierung von viralen Kapsidproteinen führen (Wieland et al., 2003). So könnte der Rückgang der Hepatozyten erklärt werden, die in der histologischen Untersuchung Kapside im Zytoplasma aufwiesen. GTP-bindende Proteine haben antivirale Wirkung gegen einige RNA-Viren, der Effekt auf HBV ist allerdings noch nicht geklärt (Wieland et al., 2003).

Berichte, dass die Produktion von Stickstoffmonoxid durch die induzierbare NO-Synthase größtenteils für den antiviralen Effekt zytotoxischer T-Zellen verantwortlich sei (Guidotti, 2002; Guidotti et al., 2000) konnte im Zellkultursystem nicht bestätigt werden (Proto et al., 2008). Auch eine Rolle der Deaminase APOBEC3G über die Deaminierung und dadurch Degradierung der viralen DNA wurde gezeigt (Rosler et al., 2004; Turelli et al., 2004). Dieses Enzym ist aber für die IFN-induzierte Blockierung der viralen DNA nicht essentiell (Proto et al., 2008; Turelli et al., 2008).

Weiterhin wurde vorgeschlagen, dass das La-Autoantigen, ein RNA-bindendes Protein, die Stabilität der HBV-RNA reduziert (Heise et al., 1999). Die Binderegion für das La-Autoantigen liegt in der Nukleotidregion 1275-1291 der viralen RNA (Heise et al., 1999) und somit in allen viralen Transkripten (außer der x-mRNA). Da HBsAg im Serum nicht reduziert erschien, kann die Beteiligung von La-Autoantigen ausgeschlossen werden.

Es ist kürzlich gezeigt worden, dass das IFN- α -induzierte Protein MyD88 die Degradierung viraler RNA beschleunigt. Für den Abbau ist die Region der Nukleotide 1804-2454 unerlässlich (Li et al., 2010), welche sich nur auf dem RNA-Transkript für pgRNA, Polymerase und Core-Protein, sowie der mRNA für HBeAg befindet. Die Strukturen, die für Kapsidbildung und die Reverse Transkription von RNA zu DNA nötig sind, würden also nicht mehr synthetisiert werden. Da das HBeAg im Serum nur transient sinkt, kann dieser Mechanismus nicht dauerhaft für den antiviralen Effekt verantwortlich sein. IFN- α wird nicht direkt von zytotoxischen T-Zellen induziert. Es wäre daher denkbar, dass entweder durch die beginnende Entzündungsreaktion nach dem Transfer auch das angeborene Immunsystem aktiviert wird oder, dass über IFN- γ oder TNF- α die gleiche oder eine ähnliche Signalkaskade ausgelöst wird. Auch Wieland et al. beobachteten eine IFN- α/β -induzierte Degradierung RNA-enthaltender Kapside (Wieland et al., 2000).

Aus alldem kann gefolgert werden, dass der zu Grunde liegende antivirale Mechanismus in unserem Modellsystem vermutlich nicht die virale RNA an sich betrifft, sondern entweder gezielt die pgRNA oder die Kapside degradiert werden. Die Reverse Transkription der viralen

pgRNA in DNA findet erst im Kapsid statt und das Verschwinden der DNA wäre eine Folge der Degradierung des Kapsids oder des pgRNA-Templates.

Durch Gabe von Zytokin-neutralisierenden Antikörpern wurde IFN- γ im murinen System als das wesentliche Effektormolekül in der antiviralen Wirkung zytotoxischer T-Zellen gegen HBV identifiziert (Cavanaugh et al., 1997). Die Rolle von TNF- α sollte jedoch nicht unterschätzt werden, da in HBV-Patienten mit immunologischer Kontrolle des Virus unter anti-TNF- α -Therapie (z.B. zur Behandlung rheumatoider Arthritis) HBV reaktivieren kann (Domm et al., 2008). Des Weiteren wurde festgestellt, dass es eine Verbindung zwischen einem Polymorphismus im TNF- α -Promoter und einem chronischen Krankheitsverlauf der HBV-Infektion gibt (Hohler et al., 1998). Ein antiviraler Mechanismus von TNF- α könnte beispielsweise die direkte oder indirekte Inhibierung des Core/Polymerase-Promoters sein (Romero and Lavine, 1996).

Eine weitere Möglichkeit, wie die Bildung von Kapsiden unterbunden werden könnte, wäre die Spaltung der viralen Strukturproteine. Dies könnte durch die von den zytotoxischen T-Zellen ausgeschütteten Granzyme geschehen, wie es bereits als antiviraler, nicht-zytolytischer Mechanismus gegen Adenoviren vorgeschlagen wurde (Andrade, 2010).

3.1.7 Bewertung des HBV-spezifischen CARs und Ausblick

Humane T-Zellen, die mit einem HBV-spezifischen CAR versehen werden, können infizierte Hepatozyten abtöten und eliminieren die episomale cccDNA des Virus (Bohne et al., 2008), was durch die derzeitigen Therapien nicht gelingt. Diese führen deswegen auch nicht zu einer Eradikation des Virus (Kwon and Lok, 2011). Kapside und virale DNA werden fast vollständig aus den Hepatozyten entfernt. Dies kann durch die Ausschüttung antiviraler Zytokine und/oder durch die Zerstörung HBV-replizierender Zellen erreicht werden. Der Beitrag der beiden Effektormechanismen im Mausmodell, könnte durch den Transfer CAR-transduzierter IFN- γ - oder TNF- α - bzw. Perforin- oder FasL-defizienter T-Zellen abgeschätzt werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der S-CAR auch *in vivo* zu einer starken Reduktion der Viruslast in Leber und Blut führt und somit seine Anwendung im Patienten sinnvoll erscheint. Einige Fragen, die sich für die Anwendung CAR-transduzierter T-Zellen in der HBV-Therapie stellen (Protzer and Abken, 2010), konnten beantwortet werden oder Hinweise zu ihrer Beantwortung gefunden werden:

Für den Erfolg einer Immuntherapie gegen die chronische Hepatitis B ist es essentiell, dass die Effektorfunktionen in der Leber ausgeübt werden, weil dort das HBV repliziert (Kakimi et al., 2002). S-CAR⁺ T-Zellen akkumulieren Antigen-spezifisch in der Leber, nachdem sie mit IL-12 vorbehandelt worden waren (vgl. 3.1.4). Damit ist eine wichtige Voraussetzung für den Erfolg der T-Zelltherapie geschaffen.

Nicht alle der transferierten Zellen, die den S-CAR exprimierten, produzierten nach Stimulation mit HBsAg oder mit Antikörpern gegen CD3 *ex vivo* IFN- γ . Ebenso ist die Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in der Leber erhöht. Würden die transferierten Zellen durch die tolerogene Umgebung in der Leber bald, ebenso wie die endogenen T-Zellen, erschöpfen, so könnten sie nicht mehr ihre Effektorfunktion ausüben und der Erfolg der T-Zelltherapie wäre in Gefahr. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass IL-10 und evtl. auch PD-1 beteiligt ist. Die Daten lassen aber wegen zu geringer Mäusezahlen & Zeitpunkte in diesem Versuch keine klare Aussage zu.

Die Rolle der immunsuppressiven Umgebung in der Leber könnte untersucht werden, indem zu mehreren Zeitpunkten nach Transfer Mäuse geopfert werden würden und die Expression von IL-10 in verschiedenen Zelltypen, sowie die Expression von Erschöpfungsmarkern wie z.B. PD-1, LAG-3, TIM-3 und CTLA-4 (Wherry, 2011) bestimmt werden würde. Diese Fragestellung wäre in dem Fall interessant, dass der antivirale Effekt der S-CAR T-Zellen in einem Langzeitexperiment nach Tag zwölf nicht mehr gegeben wäre. Sollte es tatsächlich zu einer Anergie der transferierten T-Zellen kommen, so könnte diese vielleicht durch die gleichzeitige Gabe von z.B. Antikörpern gegen IL-10 (Louis et al., 1997b) oder PD-1 verhindert werden (Callendret and Walker, 2011; Zhou et al., 2010).

In diesem Zusammenhang sollte auch, analog zur späteren Behandlungsweise des Patienten, getestet werden, ob es möglich ist, die (toleranten) T-Zellen der HBVtg Mäuse zu transduzieren, zu transferieren und einen antiviralen Effekt zu sehen. Bisher wurden für die Donor-Zellen CD45.1⁺ Mäuse verwendet, da diese in größerer Zahl zur Verfügung standen und die T-Zellen nach dem Transfer nachverfolgt werden können.

Falls es nach einem Transfer zu einer Reaktivierung des Antigens im Patienten kommt, wäre es wünschenswert, wenn sich die transferierten T-Zellen zu Gedächtniszellen entwickelt hätten, um möglichst schnell wieder Effektorfunktionen wieder ausüben zu können.

Transferierte, IL-12-behandelte S-CAR T-Zellen entwickeln sich zu Gedächtniszellen, obwohl das Antigen konstant exprimiert wird. Dies ist unerwartet, da beispielsweise in einem

chronischen LCMV-Infektionsmodell beobachtet wurde, dass die kontinuierliche Stimulation mit spezifischen Antigenen die Entwicklung von endogenen Gedächtnis-Zellen unterdrückt (Bachmann et al., 2005).

Um die Funktionalität dieser Gedächtnis-Zellen zu überprüfen und das Szenario nachzustellen, dass es im Patienten zu einer Virus-Inaktivierung kommt, könnten die CD45.1⁺ Zellen aus den HBVtg Empfängermausen aufgereinigt werden und in eine naive Maus injiziert werden. Nach einer gewissen Zeit ohne Antigen-Stimulus in dieser zweiten Empfängermaus könnten die Zellen dann erneut aufgereinigt und wieder in eine HBVtg Maus injiziert werden.

Die größte Gefahr beim Transfer CAR-modifizierter Zellen ist der sogenannte „on-target off-organ“ Effekt. Dabei wird das korrekte Antigen (hier die Hüllproteine) in einem anderen Kontext als der infizierten Zelle erkannt.

Beim Einsatz von CAR in klinischen Studien sind, im Gegensatz zu den TZR, bereits in zwei Fällen starke Nebenwirkungen mit Todesfolge aufgetreten. In einem Patienten kam es durch eine vorangegangene Lymphodepletion mit Cyclophosphamid zu einem Zytokinsturm und einer unkontrollierten Aktivierung der transferierten Zellen. In dem anderen Patienten war übersehen worden, dass das Zielantigen nicht nur im Tumor sondern ebenfalls schwach in der Lunge exprimiert wurde und es kam ebenfalls zu einem Zytokinsturm und einer starken pulmonaren Zytotoxizität (Büning et al., 2010).

Zirkulierendes, freies HBsAg bindet an den S-CAR auf der Oberfläche der transferierten T-Zellen, was zu einer generalisierten Zytokin-Ausschüttung nicht nur in der Leber führen könnte. Die Bindung an das Antikörper-Fragment des S-CARs allein ohne intrazelluläre Signaldomänen (S decoy-CAR) führt nicht zu einer Aktivierung der T-Zellen. Eine Induktion der IFN- γ Produktion durch SVP wurde von mir *in vitro* nicht beobachtet, jedoch von Felix Bohne im humanen System (Bohne et al., 2008).

Außerdem könnte ein weiteres Problem mit dem Antigen des S-CAR bestehen, da SVP auch an (nicht infizierte) Hepatozyten binden und aufgenommen werden können (Kraß, 2006). Ein solcher „on target off-organ“ Effekt konnte zumindest durch makroskopische Betrachtung nicht beobachtet werden, es sollten jedoch auch andere Organe histologisch auf eine Gewebsveränderung und die Einwanderung von Lymphozyten kontrolliert werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein *live cell imaging* System mit einem S-mCherry Fusionsprotein (AG Bruß, Institut für Virologie, vgl. Abb. 1.4) etabliert. Hiermit könnte analysiert werden, ob fluoreszierende SVP an verschiedenen humanen Zelltypen binden und ob diese dann von den humanen S-CAR T-Zellen erkannt und lysiert werden. Die Zellen, die nur

von außen Antigen binden, wären von den S-Protein produzierenden Zellen zu unterscheiden, da sie auch eine starke zytoplasmatische Expression des fluoreszierenden S-Proteins haben. Experimentell ließe sich die Induktion eines solchen „Zytokinsturms“ durch die Messung mehrerer inflammatorischer Zytokine in einem Zytokin-Bead-Array der Serumproben bestimmen.

Als Möglichkeit, einen solchen on-target off-organ Effekt im Patienten abzuwenden, werden sogenannte *suicide genes* in Betracht gezogen, durch die der Tod der transferierten Zellen ausgelöst werden kann (June, 2007). Durch die Gabe von Steroiden konnten in einem Patienten starke Nebenwirkungen durch die modifizierten Zellen gestoppt werden (Büning et al., 2010).

Eine wichtige Frage für den Erfolg einer CAR-Therapie im Patienten konnte mit dem verwendeten Maus-Modell nicht geklärt werden: Kann die Behandlung mit S-CAR T-Zellen zu einer Elimination der episomalen cccDNA führen und somit zu einer kompletten Genesung des Patienten? Diese Frage kann nur durch die Verwendung echter Infektionsmodelle beantwortet werden. Hier stehen Mäuse mit human/murin chimären Lebern, Murmeltiere und Schimpansen zur Verfügung.

Die Lebern von uPA-Mäusen (Dandri et al., 2001) und *Fah^{-/-}Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}*-Mäusen (Bissig et al., 2010) können mit humanen Hepatozyten repopuliert und mit HBV infiziert werden. Beide Systeme sind aber aufgrund der Immuninkompetenz der Mäuse recht artifiziell.

Auch Murmeltiere können mit einem Hepatitis B Virus, dem WHV, infiziert werden und entwickeln mit hoher Wahrscheinlichkeit eine chronische Hepatitis, wenn sie als Neugeborene infiziert werden (Cote et al., 2000). Es wäre sinnvoll zu testen, ob der S-CAR auch die Hüllproteine von WHV erkennt; die Sequenzhomologie zu HBV in der *a*-Determinante, in der das Epitop des S-CARs liegt, beträgt 61 %. Vielleicht wäre es auch möglich die WHV Virionen mit der *a*-Determinante (75 Aminosäuren) in der S-Domäne des HBV zu pseudotypisieren, ohne dass deren Infektiosität verloren geht. Dann könnten Murmeltieren mit dem chimären Virus infiziert und mit S-CAR transduzierten T-Zellen des selben Tieres behandelt werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei einer Sequenzabweichung von 9 % eine Sequenz von 170 Aminosäuren des S Antigens von WHV und GSHV (*ground squirrel hepatitis virus*) ausgetauscht werden können und die gebildeten Virionen infektiös sind (Seeger et al., 1987). Auch eine HBV L-Mutante kann mit dem WHV L-Protein transkomplementiert werden und bildet Virionen (Hourieux et al., 2002). Murmeltiere wären aus ethischer und finanzieller Sicht den Schimpansen vorzuziehen. Daher wäre es sinnvoll, genauer zu überprüfen, ob eine

Chimärisierung des WHV mit dem HBV S-Protein möglich wäre, ohne die überlappende Sequenz der Polymerase möglichst wenig zu ändern.

Die Übertragbarkeit des vorgestellten Therapieansatzes mit einem Chimären Antigen Rezeptor in die Klinik könnte am besten mit Vorversuchen an chronisch mit HBV infizierten Schimpansen gelingen, da sie mit dem humanen HBV infiziert wurden und somit der CAR sicher das Antigen erkenne würde. Die Tiere sind begrenzt in den USA verfügbar und eine entsprechende Anfrage zur Verwendung der Tiere in einem T-Zelltransfer Experiment wurde gestellt.

3.2 Identifizierung von HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren

3.2.1 Auswahl der HBV-Peptide

Für die Gewinnung der HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren wurden drei immundominante Peptide ausgewählt: S20 und S172 aus dem S-Protein (Nayersina et al., 1993) und C18 aus dem Core-Protein (Bertoletti et al., 1993). Auch wenn unter Therapie Virionen im Blut und Kapside in den Hepatozyten nicht mehr nachweisbar sind, wird in den meisten Fällen noch cccDNA in der Leber detektiert und bis zu 25 % der Hepatozyten sind in der histologischen Untersuchung HBsAg⁺ (Wursthorn et al., 2006). Dies lässt darauf schließen, dass das HBsAg am stärksten von der persistierenden cccDNA transkribiert wird und es somit die beste Zielstruktur ist, um Zellen, in denen keine Virus-Replikation mehr stattfindet, zu eliminieren.

Das Core-Peptid wurde gewählt, da es in der chronischen Infektion mit der Serokonversion von HBeAg⁺ zu anti-HBe in Verbindung gebracht wird (Maini et al., 2000).

Immundominante Epitope in der viralen Polymerase sind ebenfalls beschrieben worden (Rehermann et al., 1995). Dies liegt vermutlich daran, dass deutlich weniger Polymerase-Proteine als Hüll- und Core-Proteine translatiert werden. Dies wird auch zur Folge haben, dass weniger Polymerase-Epitope auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Transfer-Experimente in HBVtg Mäuse zeigten, dass die 20-fache Menge Polymerase-spezifischer T-Zellen im Vergleich zu S-spezifischen T-Zellen injiziert werden muss, um die gleiche antivirale Wirkung zu erzielen (Kakimi et al., 2002). Daher ist die Polymerase als Zielstruktur für eine T-Zelltherapie ungeeignet.

Ein TZR erkennt ein Peptid definierter Sequenz im Kontext mit einem bestimmten HLA-Molekül. Wird entweder Peptid oder HLA-Molekül nur leicht verändert, kann dies die Bindung des TZR beeinflussen.

Im Gegensatz zu den gewählten S-Peptiden gibt es im C18 Peptid an der letzten Aminosäureposition – einer Ankerposition für die Peptid-MHC-Bindung – einen Unterschied zwischen den Genotypen B/C und A/D. Die Änderung von Valin zu Isoleucin an dieser Position führt zu einer Reduktion der IC₅₀ der C18-HLA-A2 Bindung von 1 auf 11 nM (Bertoletti et al., 1994). Dies entspricht per Definition immer noch einer starken Bindekapazität und es kann davon ausgegangen werden, dass beide Peptid-Varianten von den gewonnenen T-Zellklonen erkannt werden können (stark: IC₅₀ <50 nM; intermediär: IC₅₀ 50-500 nM; schwach/negativ: IC₅₀ >500 nM) (Wentworth et al., 1996).

Ein größeres Problem für den Einsatz der TZR könnte eine mangelnde Peptiderkennung bei Präsentation auf verschiedenen HLA-A2-Subtypen darstellen. Obwohl z.B. C18 grundsätzlich eine starke Bindung an HLA-A*0201, -A*0202, -A*0203 und -A*0206 zeigt (Bertoni et al., 1997), konnten beispielsweise Peptid-beladene Zielzellen von einem C18-spezifischen T-Zellklon oder PBMCs aus HBV-Patienten nicht erkannt werden, wenn die Zielzellen einen anderen HLA-A2 Subtyp aufwiesen als die Effektorzellen. (Bertoletti et al., 1997; Tan et al., 2008b).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die verschiedenen Peptide jeweils mehrere TZR identifiziert. Da nicht alle dieser TZR wegen eines zu grossen Arbeitsaufwandes in der Klinik eingesetzt werden können, sollten die TZR nicht nur auf ihre Avidität selektiert werden, sondern auch so gewählt werden, dass sie Peptide mehrerer Genotypen erkennen, die auf möglichst vielen HLA-A2-Subtypen präsentiert werden können.

3.2.2 Gewinnung von T-Zellklonen

Um HBV-spezifische, natürliche TZR für eine adoptive T-Zelltherapie zu identifizieren, mussten zunächst HBV-spezifische T-Zellen sortiert und monoklonal expandiert werden. Dafür wurden T-Zellen aus akut HBV-infizierten oder ausgeheilten Patienten mit den oben beschriebenen Peptiden stimuliert. Es wurden verschiedene Arten der Stimulation an unterschiedlichen Spenderzellen getestet. Da nur wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung stand, konnte keine kategorische Optimierung des Protokolls erfolgen. Es kann dennoch anhand der jeweils gewonnenen Anzahl von Klonen Folgendes geschlossen werden:

1. Wird nach T-Zellen mit einer bestimmten Spezifität gesucht, sollte für die Stimulation das exakte Peptid verwendet werden und nicht ein Pool mehrerer Peptide. Die Vielzahl anderer Peptide könnte um die Bindung auf dem HLA-A2-Molekül konkurrieren. Außerdem entsprechen die Peptide des Pools aufgrund ihrer Länge und der Generierung nach einem Algorithmus nicht den genauen immundominanten Peptiden.

2. Das Peptid sollte vor der Stimulation auf Antigenpräsentierende Zellen geladen werden und nicht direkt zu den T-Zellen dazugegeben werden. Wird das Peptid nur in die Lösung gegeben, so wird es in geringerer Dichte von MHC:Peptid-Komplexen präsentiert und trotz der Kürze der Sequenz könnte es auch auf MHCII-Moleküle geladen werden und die gewünschte Stimulation der CD8⁺ T-Zellen wäre weniger effektiv. Zusätzlich könnte das Lösungsmittel des Peptids das Wachstum der T-Zellen hemmen.

3. Durch Stimulation mit niedrigeren Peptid-Konzentrationen können mehr Klone gewonnen werden. Dies könnte im Falle des ausgeheilten Spenders daran liegen, dass mehr hoch-afide T-Zellen zu Gedächtniszellen differenzierten.

Nach der Streptamersortierung und limitierenden Verdünnung von HBV-spezifischen T-Zellen wurden diese u.A. mit bestrahlten, EBV-immortalisierten B-Zellen („LCL“) kultiviert. Dies führt im Vergleich zu einem konventionellen Stimulationsprotokoll, das als Feeder Zellen nur autologe PBMC beinhaltet, zu einer besseren Expansion der sortierten Zellen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte an der oben beschriebenen anti-apoptotischen Wirkung von IL-12 liegen, welches von den LCL produziert wird (Kobayashi et al., 1989).

Ist ein Klon 14 Tage nach der limitierenden Verdünnung herangewachsen, ist es wichtig, vor der weiteren Expansion, aufgrund begrenzter Mengen an Humanserum und Feeder Zellen, zu wissen, ob der Klon HBV-spezifisch ist. Als Selektionsmethode wurde die Ko-Kultur mit Peptid-beladenen T2-Zielzellen in einem Chrom-Release-Assay oder mit HBV-replizierenden Hepatom-Zielzellen in einem XTT-Test verglichen. Nachteile des Letzteren im Vergleich zum Chrom-Release-Assay sind, dass jeweils $\frac{2}{3}$ statt $\frac{2}{5}$ des Klons eingesetzt werden müssen und dass die Lyse der Hepatozyten deutlich länger dauert als die der T2 Zellen. Die Ursache hierfür ist wahrscheinlich die niedrige MHC-I Expression auf Hepatozyten, die erst durch die Produktion von IFN- γ durch die T-Zellen gesteigert wird. Es könnte getestet werden, ob eine Vorbehandlung der Hepatomzellen mit IFN- γ und/oder die Beladung mit Peptid (Gehring et al., 2007), die nötige Zahl an Effektoren und die Dauer der Ko-Kultur derart reduzieren könnte, dass auf einen Chrom-Release Assay verzichtet werden kann.

3.2.3 Charakterisierung der T-Zellklone

Für alle drei Peptide konnten aus jeweils zwei oder drei verschiedenen Spendern spezifische T-Zellklone gewonnen werden. Die Avidität des TZRs einiger Klone wurde in einem Chrom-Release Assay verglichen. Die halbmaximale Lyse aller getesteter Klone war ähnlich und lag bei

1-3 nM. Dies entspricht einer hohen Avidität (Kronig et al., 2009). In einem ICS stellte sich heraus, dass einer der C18-spezifischen Klone deutlich mehr Zytokine sekretierte.

Insgesamt wurden mehr als 300 HBV-spezifische Klone isoliert, von denen 100 expandiert wurden und von denen neben RNA auch noch kryo-konservierte Zellen zur Verfügung stehen. Aus der Beobachtung, dass zwei der genauer untersuchten C18-Klone identische variable TZR-Ketten sowie CDR3 Regionen aufwiesen, entstand die Überlegung, um wie viele tatsächlich unterschiedliche Klone es sich handelte.

Bisher sind erst die β -Ketten von $\frac{3}{4}$ der Klone sequenziert, es deutet sich aber bereits an, dass die Klone aus jeweils einem Stimulationsansatz hauptsächlich aus einem „Ursprungsklon“ hervorgegangen sind. Somit wurde rückblickend viel Arbeit in die Kultivierung zahlreicher Klone investiert, die im Endeffekt die gleiche Sequenz tragen. Diese Klone wurden dennoch nicht umsonst kultiviert, da sie in Experimenten anderer Arbeitsgruppenmitglieder Verwendung finden (z.B. zur Untersuchung der Wirkung unterschiedlich konditionierter Makrophagen Überstände auf die T-Zellaktivität oder zur Etablierung eines neuartigen Zytotoxizitäts-Assays).

Die Zellen des ausgeheilten Spenders 2 wurden mit T2-Zellen stimuliert, die mit unterschiedlichen Konzentrationen des C18-Peptids beladen worden waren. Bei den Hauptklonen, die aus den beiden Stimulationsansätzen gewonnen wurden, handelt es sich um unterschiedliche Klone. Dies könnte beispielsweise dadurch zustande kommen, dass ein Klon aufgrund niedriger TZR-Avidität durch niedrige Peptidkonzentrationen nicht ausreichend stimuliert und zum Wachstum angeregt wird, durch hohe Konzentrationen aber umso mehr.

Einzig nach der Stimulation der Zellen aus einem akut-infizierten Spender mit C18 konnten drei unterschiedliche Klone gewonnen werden. So könnte angenommen werden, dass das Konzept der polyklonalen Immunantwort gegen HBV nur während der akuten Krankheitsphase zutrifft. Wahrscheinlicher ist, dass die Zellen im Patienten zwar polyklonal waren, aber ein Klon bereits im Patienten deutlich stärker proliferierte und so die Wahrscheinlichkeit erhöht war, dass dieser nach der limitierenden Verdünnung heranwächst.

Um dies quantitativ zu untersuchen, könnten Streptamer⁺ Zellen *ex vivo* sortiert werden und über eine Färbung der unterschiedlichen β -Ketten oder durch eine reverse Transkription der kompletten RNA, mehrere PCR mit allen Primern für die unterschiedlichen V_{β} -Segmente und eine anschließende Relativierung zu Aktin (Dou et al., 1998) oder eine DNA-Fragment-Analyse (Hohn et al., 2002)(Hohn et al., 2002)(Hohn et al., 2002), das V_{β} -Repertoire untersucht werden. Zusätzlich könnte als qualitativer Nachweis ein TZR „*Spectratyping*“ der Streptamer⁺ Population durchgeführt werden. Dies ist eine multiplex RT-PCR, die es erlaubt, die Längen der CDR3-Regionen in einer V_{β} -Familie zu untersuchen (Uko et al., 2001)(Uko et al., 2001)(Uko et al.,

2001). Ein Vergleich mit Streptamer⁺ Zellen nach zwei-wöchiger Stimulation würde Aufschluss darüber geben, wie viele unterschiedliche Klone vor Stimulation vorhanden sind und ob die Stimulation die Expansion nur einiger weniger Klone fördert.

Das Protokoll für die Gewinnung von T-Zellklonen wurde in der Arbeitsgruppe von A. Krackhardt (MedIII, MRI München) für die Isolierung von Tumor-spezifischen T-Zellen, die in sehr niedrigen Frequenzen vorkommen, etabliert. Für die Gewinnung HBV-spezifischer T-Zellen wäre es auch denkbar, Streptamer⁺ Zellen sofort *ex vivo* zu färben und durch limitierende Verdünnung zu vereinzeln, um so einer einseitigen Expansion während der Peptid-Stimulation zu entgehen. Die Frequenzen in PBMC ausgeheilter Patienten liegen bei durchschnittlich 1:35.000 Core-spezifischen Zellen (Penna et al., 1996) und etwa 1:70.000 S172-spezifischen Zellen (Rehermann et al., 1996b). Stünden 20 ml Blut ($\approx 2 \times 10^7$ PBMC) zur Verfügung, so könnten mit Streptameren unterschiedlicher Fluoreszenz-Markierung aus einer Probe theoretisch bereits 570 bzw. 285 HBV-spezifische T-Zellen sortiert werden. Während der akuten Phase sind die Frequenzen sogar noch höher (Tan et al., 2008a).

Denkbar wäre auch eine Sortierung der Zellen und eine anschließende Einzel-Zell-PCR (Ozawa et al., 2008). Diese Methode ist auch seit dem Ende der vorliegenden Arbeit im Institut für Mikrobiologie etabliert. Sie birgt den Vorteil, dass auch bei niedrigen T-Zellfrequenzen TZR identifiziert werden können, ohne dass die polyklonale Zusammensetzung der Population durch Stimulation verfälscht wird. Ein Nachteil der Methode ist es, dass Rückschlüsse über die Funktionalität des TZRs erst nach aufwändigen molekularen Klonierungsarbeiten und Transduktionen gezogen werden können.

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten V _{β} -Segmente der HBV-spezifischen TZR stimmen nur teilweise mit bereits beschriebenen Segmenten aus geimpften Individuen überein (Hohn et al., 2002) oder chronisch-Infizierten (Dou et al., 1998; Maru et al., 2003). Allerdings trifft dies nicht in Bezug auf die entsprechenden Peptid-Sequenzen zu.

Interessanterweise verwenden alle drei S-20 spezifischen Klone aus drei verschiedenen Spendern mit V β 8S1 die gleiche variable β -Kette. In zwei der Klone ist sogar die Sequenz der Peptid-bindenden CDR3-Region bis auf zwei Aminosäuren identisch. Es wäre spannend herauszufinden, ob diese TZR-Kette auch in Patienten gefunden werden können, die spontan oder nach IFN- α -Therapie ausheilen. Außerdem könnte durch Austausch der zwei Aminosäuren gezielt analysiert werden, ob ein TZR mit höherer Avidität, gegen verschiedene Peptid-Varianten oder HLA-A2 Subtypen gerichtet, generiert werden könnte (Varela-Rohena et al., 2008b). Die entsprechenden α -Ketten müssen noch sequenziert werden und es wird sich zeigen, ob sie auch

ähnlich sind und wohlmöglich untereinander ausgetauscht werden können, ohne dass der TZR seine Funktionalität verliert.

3.2.4 HBV-replizierende, HLA-A2⁺ Mäuse

Um die Wirksamkeit von T-Zellen, die mit einem natürlichen HBV-spezifischen TZR versehen wurden, *in vivo* evaluieren zu können, wurden HBVtg Mäuse mit HLA-A2tg Mäusen (HHDII) verpaart. In ihnen werden gleichzeitig das murine MHC-I-Molekül H-2D^b, sowie das β 2-Mikroglobulin nicht mehr exprimiert (Pascolo et al., 1997). Von der Gruppe um F. Chisari wurde in zahlreichen Versuchen der Transfer von HBV-spezifischen T-Zellklonen in HBVtg Mäuse untersucht, allerdings handelte es sich hierbei um murine T-Zellklone, die für einen Einsatz im Menschen nicht in Frage kommen (Guidotti et al., 1996; Isogawa et al., 2005). Der Transfer von HBV-TZR-transduzierten T-Zellen ist bereits beschrieben worden. In jenem Modell wurden jedoch nur Core-transfizierte humane Hepatomzellen in immuninkompetente Mäuse injiziert und somit konnte weder ein Effekt auf die virale Transkription noch die Immunreaktion des Empfängertieres untersucht werden (Gehring et al., 2010).

Unter der Hypothese, dass das murine Proteasom und die TAP-Moleküle Proteine anders prozessieren könnten und bestimmte Peptide deshalb schlechter präsentiert werden könnten, wurden Mäuse mit einigen viralen Antigenen geimpft. Nach Impfung zeigten die Milzzellen eine starke zytolytische Aktivität gegen das C18 und S172 Peptid (Wentworth et al., 1996) oder auch gegen das S20 Peptid (Loirat et al., 2003), was darauf schließen lässt, dass diese immun-dominanten Peptide auch auf Mauszellen gut präsentiert werden.

Vor dem adoptiven T-Zelltransfer in HBV/HHDII Mäuse sollten einige mögliche Nachteile des Mausmodells überprüft werden. Die Expression von MHC-I-Molekülen und die zelluläre Maschinerie der Peptid-Beladung ist in Hepatozyten reduziert (Holz et al., 2010). Sollte die Menge an präsentierten Peptid nicht zur Aktivierung ausreichen, könnten die Mäuse zum Beispiel durch systemische Gabe von IFN- γ oder IL-12 vorbehandelt werden.

Da die TZR-transduzierten T-Zellen im Gegensatz zum CAR keine direkt verknüpfte Ko-stimulatorische Domäne tragen, sollte überprüft werden, ob vor dem Transfer die Stimulation mit anti-CD28 (und anti-CD3, IL-12) während der Transduktion ausreicht oder zusätzlich ein Priming durch Antigenpräsentierende Zellen (z.B. Milzzellen MVA-S oder MVA-C infizierter Mäuse) notwendig ist. Vor der Einwanderung in die Leber sollten die transferierten Zellen bereits ein Ko-stimulatorisches Signal empfangen haben, damit sie nicht den gleichen tolerogenen Eigenschaften der Leber unterliegen wie die endogenen HBV-spezifischen Zellen (Thomson and Knolle, 2010).

Ein weiteres Problem könnte der Transfer von CD45.1⁺ CD8⁺ C57BL/6 Zellen darstellen. Die Empfängermaus könnte die transferierten Zellen aufgrund ihrer Expression des murinen MHC I und des β -2Mikroglobulins abstoßen. In diesem Falle müssten für den Transfer Zellen der HHD-Mäuse, oder noch besser der HBV/HHDII-Mäuse, transduziert werden.

3.2.5 Bewertung der HBV-spezifischen T-Zellrezeptoren und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden mindestens zehn unterschiedliche S- oder Core-spezifische T-Zellklone generiert und deren TZR-Ketten identifiziert. Die jeweiligen TZR-Ketten der Klone sollen in einem nächsten Schritt in den retroviralen Vektor pMP71 kloniert werden und danach verifiziert werden, dass nach Transduktion der TZR-Ketten T-Zellen HBV-Spezifität erlangen. Aviditätsstudien werden mit beladenen T2-Zellen und HBV-replizierenden Hepatom-Zelllinien wiederholt werden müssen, da die Rezeptoren unterschiedlich gut auf der Oberfläche der transduzierten Zellen exprimiert werden.

Die größten Probleme bei der Transduktion der TZR-Ketten in T-Zellen, sind das Erreichen einer stabilen Expression des eingebrachten TZRs und mögliche Fehlpaarungen mit den endogenen TZR-Ketten. Für eine Verbesserung der TZR-Expression und der korrekten Paarung der Ketten sind verschiedene Ansätze entwickelt worden, die auch für die Klonierung der HBV-spezifischen Rezeptoren Anwendung finden sollen:

1. Der Einbau eines 2A-Peptids erlaubt es, dass beide Ketten über nur einen Vektor in die T-Zelle eingebracht werden und α - und β -Kette im gleichen Verhältnis exprimiert werden. Während der Translation bewirkt das P2A einen Sprung des Ribosoms, so dass die Ketten als getrennte Proteine translatiert werden (Leisegang et al., 2008).
2. Die konstanten Teile können vollständig (Cohen et al., 2006) oder teilweise (Sommermeyer and Uckert, 2010) murinisiert werden, so dass die Wahrscheinlichkeit der Fehlpaarung mit den humanen endogenen Ketten reduziert wird.
3. Zusätzliche Di-Sulfidbrücken können die Paarung der exogenen TZR-Ketten verbessern (Cohen et al., 2007; Kuball et al., 2007).
4. Eine „Codon-Optimierung“ kann zu einer verbesserten Expression führen, in dem die Triplets der DNA so verändert werden, dass sie zwar noch für die gleiche Aminosäure codieren, aber tRNAs verwendet werden, die in der Zelle besser verfügbar sind (Scholten et al., 2006). Dieses Prinzip sollte im Übrigen auch für die Verbesserung der CAR-Expression angewendet werden.

Autoimmunreaktionen durch eine Fehlpaarung von exogenen und endogenen TZR-Ketten und eine so neu erworbene Spezifität des TZRs sind bisher nur im Mausmodell und nicht in klinischen Studien beobachtet worden (Brenner, 2010).

Trotzdem könnte in Anlehnung an Punkt 2 und 3 versucht werden, im konstanten (intrazellulären) Teil des TZR's Abschnitte der konstanten Bereiche aus den Immunglobulinen M oder E, die Di-Sulfidbrücken enthalten, einzubringen oder auszutauschen. Voraussetzung hierfür wäre es, dass die CD3 ζ Moleküle noch mit dem TZR assoziieren können (vergl. Abb. 1.8).

Es könnte auch probiert werden, die TZR-Ketten in NKT Zellen einzubringen. Diese exprimieren CD3 und die invarianten TZR-Ketten V α 24-J α 18 und V β 11 (Becker et al., 2010). Da eine Fehlpaarung nur mit diesen beiden Ketten erfolgen könnte, wären eventuell neue unerwünschte TZR-Spezifitäten besser abschätzbar und es wäre einfach die invarianten Ketten posttranskriptionell stillzulegen.

Das eventuelle Fehlen HBV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im Patienten könnte die Aktivität der CD8⁺ T-Zellen und die Produktion von Antikörpern beeinträchtigen (Tan et al., 2008a). In HBVtg Mäusen konnte durch den Transfer von HBV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen eine starke anti-HBs Antwort ausgelöst werden, die dazu führte, dass HBsAg im Serum nicht mehr nachweisbar war (Schirmbeck et al., 2000). Daher könnte es vielversprechend sein, ebenfalls HBV-spezifische CD4⁺ Klone zu gewinnen (Uko et al., 2001) und deren TZR-Ketten für einen T-Zelltransfer zu verwenden.

Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen T-Zellklone könnten auch dafür verwendet werden, die exakten antiviralen Mechanismen der sekretierten Zytokine aufzuschlüsseln. Ähnliche Versuche sind bereits unternommen worden, berücksichtigten allerdings nicht die virale cccDNA als Zielstruktur (Phillips et al., 2010; Suri et al., 2001), wie es mit den in der Arbeitsgruppe entwickelten HepG2H1.3 Zellen möglich wäre (Jost et al., 2007; Protzer et al., 2007).

Probleme beim Einsatz natürlicher TZR in der T-Zelltherapie ergeben sich aus der hohen MHC und TZR Diversität. Die in dieser Arbeit identifizierten TZR könnten nur in HLA-A2⁺ Patienten Anwendung finden. Um diese Therapie einem breiten Patientenspektrum zugänglich zu machen, müssten „TZR-Banken“ mit TZR verschiedener HLA-Restriktion angelegt werden. Sollte sich der TZR-Transfer als erfolgreich herausstellen, wäre dieser Aufwand gerechtfertigt. Streptamere für die Identifikation HBV-spezifischer T-Zellen können auch für andere MHCI-Typen angefertigt werden und für das in Ostasien dominante HLA-A24 sind bereits HBV-spezifische T-Zellepitope beschrieben (Sobao et al., 2001).

In diesem Zusammenhang wird die bereits oben beschriebene Avidität gegenüber leicht abweichenden Peptidsequenzen anderer HBV-Genotypen und die Erkennung des Peptids auf verschiedenen HLA-A2-Subtypen zu der Entscheidung beitragen, welche Rezeptoren optimiert

werden sollten und welche Rezeptoren im HBV-HLA-A2-transgenen Mausmodell auf ihre antivirale Wirkung *in vivo* überprüft werden sollten.

3.3 Bewertung des adoptiven T-Zelltransfers als Immuntherapiemöglichkeit der chronischen Hepatitis B und Ausblick

„Eine therapeutische Induktion einer CD8⁺ T-Zellantwort gegen HBV wird eine chronische Infektion nicht beenden, es sei denn die T-Zellen akkumulieren effizient in der Leber und zeigen eine relative hohe funktionale Avidität für ihr Antigen, welches in genügend Mengen exprimiert werden muss, um CD8⁺ T-Zell Effektormechanismen zu aktivieren, die in der Lage sind Virusinfizierte Zellen zu töten oder zu heilen“ (Kakimi et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein adoptiver T-Zelltransfer diese von F. Chisari postulierten Kriterien einer erfolgreichen Therapie erfüllt.

Generell müssten vor einem Transfer HBV-spezifischer T-Zellen in den Patienten – seien es CAR- oder TZR-transduzierte T-Zellen – weitere Überlegungen angestellt werden.

Allgemein stellt sich die Frage, ob es sinnvoll wäre, vor dem Transfer durch Bestrahlung oder Chemotherapie die Zahl endogener Immunzellen zu reduzieren, damit die transferierten Zellen keinem negativem Einfluss regulatorischer Zellen unterliegen und besser expandieren können. Andererseits könnte dann auch eine mögliche Regulation des Leberschadens entfallen (Büning et al., 2010). Da der Nutzen der teilweisen Deletion der Immunzellen wahrscheinlich geringer ist als die Gefahr von Nebenwirkungen durch die transferierten Zellen ist, sollte zunächst davon abgesehen werden.

Um das Überleben der transferierten Zellen zu verbessern, könnten von vornherein nur zentrale Gedächtniszellen aus dem Patienten mit dem jeweiligen Rezeptor transduziert werden, da diese *in vivo* länger persistieren (Berger et al., 2008). Da Gedächtniszellen aber per Definition eine Spezifität für ein Antigen haben, mit dem der Mensch in Kontakt kommen kann und welches immer noch im Körper persistieren könnte, bestünde eventuell die Gefahr, dass durch die starke Expansion der Zellen eine unkontrollierbare Immunreaktion gegen dieses Antigen ausgelöst werden könnte. Allerdings könnte dies auch dazu benutzt werden, transduzierte T-Zellen über den intrinsischen Rezeptor der Gedächtniszellen *in vivo* zu stimulieren und so zu expandieren (Pule et al., 2008; Rapoport et al., 2011).

Solche grundsätzlichen Fragestellungen des adoptiven T-Zelltransfers könnten unter Verwendung HBVtg Mäuse geklärt werden. Die meisten Arbeiten zur adoptiven T-Zelltherapie untersuchen die Behandlung von humanen Tumorantigenen. Dafür werden für die Experimente

nur immuninkompetente Mäuse verwendet, damit diesen humane Ziel- und Effektorzellen injiziert werden können. Das in dieser Arbeit verwendete System ist meines Wissens nach das einzige bisher beschriebene Mausmodell des adoptiven T-Zelltransfers, welches auf jegliche immunmodulatorische Vorbehandlung des Empfängertiers verzichtet. Daher könnte dieses Modell auch verwendet werden, um ganz grundsätzliche Fragestellungen, wie oben diskutiert, zu klären.

Die folgenden Überlegungen beziehen sich speziell auf die adoptive T-Zelltherapie der chronischen Hepatitis B.

Als Vorbehandlung des Patienten sollte die Viruslast weitestgehend durch Reverse Transkriptase Hemmer reduziert werden, damit die Zahl Antigen-positiver Zellen in der Leber möglichst gering ist. Nach einer 11-monatigen Kombinationstherapie mit pegIFN- α und Adefovir konnte die Zahl HBsAg⁺-Hepatozyten von durchschnittlich 36 % (Max.: 95 %) auf 14 % (Max: 50 %) gesenkt werden (Wursthorn et al., 2006). Bei einer Leber, die durch Chemotherapie, Steatose oder einer Hepatitis verletzt ist bzw. bei einer Fibrose können 40-70 % bzw. 30-60 % der Leber resektiert werden (Pawlik et al., 2008). Bei einer T-Zelltherapie sollte die Untergrenze gelten, dass maximal 30-40 % der Hepatozyten HBsAg⁺ sind und durch Zytotoxizität der transferierten T-Zellen möglicherweise zerstört werden könnten. Die Zahl der Antigen⁺ Zellen sollte vor der Therapie durch eine Leberbiopsie kontrolliert werden.

Die Kosten für die Produktion und Verwendung eines autologen, gen-modifizierten T-Zellprodukts würden laut dem T-Zelltherapie-Pionier S. Rosenberg, je nach Kosten für die Vektorproduktion, 15.000-25.000 \$ betragen (Kohn et al., 2011). Dies ist im Vergleich zu den derzeitigen Therapien – besonders im Hinblick darauf, dass eine komplette Heilung angestrebt wird und nicht jahrelang therapiert werden muss – kostengünstiger. Es werden folgende Kosten pro Jahr geschätzt (nur Medikation, Arztkosten nicht eingerechnet): pegIFN- α 32.800 \$, Lamivudin 2.300 \$, Adefovir 13.200 \$, Entecavir 10.600 \$, Telbivudin 11.400 \$ und Tenofovir 9.700 \$ ((Flepp, 2009), Werte zur Vergleichbarkeit von CHF in \$ umgerechnet und auf hundert gerundet).

Neben dem T-Zelltransfer sind auch andere Immuntherapien gegen die chronische Hepatitis B denkbar. Das Antikörperfragment könnte als bispezifischer Antikörper (BiTE, *Bispecific T-cell-engager*) fusioniert an anti-CD3 eingesetzt werden. Es handelt sich dabei um lösliche Moleküle, weshalb keine genetische Information in das Genom der T-Zelle integriert werden muss, was theoretisch die Gefahr der malignen Transformation birgt (Jena et al., 2010). Ebenso kann die

Gabe der BiTE bei Nebenwirkungen schneller beendet werden, während die transferrierten T-Zellen evtl. wochenlang persistieren.

Die Wirkung eines anti-S BiTEs könnte durch die hohe Zahl an zirkulierendem Antigen beeinträchtigt werden. Im Gegensatz zu einem Rezeptor, der mit der T-Zelle aktiv aus den Gefäßen in das Leberparenchym einwandert und welche sich dort vermehren kann, kann der BiTE nur eher passiv in die Leber gelangen. Die BiTE-Moleküle könnten vorher abgefangen werden: Pro Tag werden etwa 10^{11} Virionen mit je 210 S-Proteinen pro Partikel und 10^{14} SVP mit je 48 S-Proteinen pro Partikel neu gebildet (Dandri et al., 2008; Gilbert et al., 2005; Nowak et al., 1996), was einer Gesamtmenge von $4,8 \times 10^{16}$ S-Proteinen entspricht. Ein BiTE wiegt ca. 55 kDa (Rüttinger et al., 2008). Sollten alle freien S-Proteine abgesättigt werden, entspräche dies einer täglichen Dosis von 4,4 mg BiTE. Die Konzentrationen für einen zugelassenen BiTE beträgt maximal einmalig 150 µg und in einer klinischen Studie durchschnittlich 114 µg/d (Freitag et al., 2009). Außerdem könnten im Patient IgM Antikörper gegen den BiTE gebildet werden, die dann an den BiTE gebunden SVP miteinander vernetzen und ähnlich wie die beschriebenen HBV Immunkomplexe zu einer Glomerulonephritis führen (Chan, 2010).

Hier möchte ich festhalten, dass die Behandlung aufgrund der hohen Zahl zirkulierenden Antigens nicht mit bisherigen BiTE Therapien gegen Tumorantigene vergleichbar ist und ich vermag es nicht zu sagen, ob dies gesundheitliche und wirtschaftliche Risiken birgt.

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit der chronischen Hepatitis B stellt eine therapeutische Vakzinierung dar (Michel et al., 2011). In HBVtg Mäusen (Serotyp *ayw*) konnte durch eine Impfung mit dem HBsAg des heterologen Subtyps *adw* die Immuntoleranz, im Sinne von messbaren anti-HBs Antikörpern und einem Rückgang des HBsAg, gebrochen werden. HBV-spezifische T-Zellantworten wurden jedoch nur minimal beobachtet (Frequenz unter 0,01 % bzw. nur in einer von drei geimpften Mäusen) und über den Effekt auf die Viruslast wurde nichts berichtet ((Schirmbeck et al., 2003), persönliche Mitteilung C. Jäger, VIRO). Erfolgreiche Vakzinierungen in Gesunden konnten bisher nicht therapeutisch auf Patienten übertragen werden (Livingston et al., 1999; Michel et al., 2011). Dies könnte daran liegen, dass die HBV-spezifischen T-Zellen ihren Erschöpfungszustand nicht überwinden können oder nur niedrig-afide T-Zellen der Toleranz entkommen können (Sette et al., 2001). Eine therapeutische Vakzinierung könnte jedoch durch die Induktion von Antikörpern (und einer T-Helferzellantwort) eine sinnvolle Ergänzung zu einem adoptiven T-Zelltransfer darstellen (Rapoport et al., 2011).

Abschließend werden im Folgenden noch einmal die bedeutendsten Argumente für beide Rezeptoren zusammengefasst werden. Der Einsatz eines chimären oder natürlichen Rezeptors ist gleichermaßen denkbar.

Der bedeutendste Vorteil des CARs ist seine MHC-I-Unabhängigkeit. So könnte er unabhängig von den HLA-Molekülen und auch dem HBV-Genotypen des Patienten eingesetzt werden.

Ein Nachteil des CARs könnte seine Sensitivität bei geringen Antigenmengen sein. Wie in der vorliegenden Arbeit festgestellt, reicht die HBsAg-Menge auf der Zelloberfläche nicht immer für eine Aktivierung der T-Zellen aus (z.B. C57-S oder HBV-met Zellen). So könnte es sein, dass auch auf einigen Hepatozyten des Patienten die Menge an HBsAg nicht ausreichend ist. Ein natürlicher Rezeptor wäre aufgrund der Erkennung des intrazelluläre prozessierten Antigens sensitiver gegenüber Zellen, die wenig HBsAg exprimieren. Allerdings könnte hier wiederum die relativ niedrige MHC-I-Expression in der Leber (Gehring et al., 2007) begrenzend wirken. Die Kombination beider Rezeptoren könnten eine Lösung darstellen: S-CAR⁺ T-Zellen wandern in die Leber ein, reduzieren bereits die Viruslast und stimulieren durch ihre IFN- γ Sekretion die MHC-I-Expression der Hepatozyten. Es folgt ein Transfer TZR-transduzierter T-Zellen, die die restlichen, vom S-CAR nicht erkannten, infizierten Hepatozyten eliminieren.

Der größte Nachteil des CARs ist der theoretische on-target off-organ Effekt. Können diese Sicherheitsbedenken gegen den S-CAR in einem Versuch mit chronisch-infizierten Schimpansen ausgeräumt werden, wäre der CAR gegenüber dem TZR aufgrund der Anwendbarkeit für ein breites Patientenspektrum zu bevorzugen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller
Axsym	Abbott
Beta-counter Top Count NXT	Perkin Elmer
Brutschrank Cell 150	Heraeus
Einfrierhilfe	Nalgene
ELISA-Reader infinite F200	Tecan
FACSCantoII	BD
Fluoreszenz-Mikroskop CKX41	Olympus
Fluoreszenzmikroskop Axio Z1	Zeiss
Geldokumentation Fusion Fx7	Peqlab
Hybridisierungs-ofen	Thermo Scientific
Konfokales Mikroskop Fluoview FV101	Olympus
Konfokales Mikroskop SP5	Leica
Lightcycler 480	Roche
MoFlo	Beckman Coulter
Neubauer-Zählkammer	Brand
Reflotron Reflovet Plus	Roche
Slidescanner DotSlide BX51	Olympus
Thermocycler T300	Biometra
Tischzentrifuge 54173	Eppendorf
Ultrathorax T10 Basic	IKA
Zellkulturzentrifuge 4K15	Sigma

4.1.2 Verbrauchsmaterial

Produkt	Artikel-Nr.	Hersteller
Einmalpipetten Cellstar		Greiner
Filcons 30 µm		WIPAK
Film Kodak BioMax MS	Z363006-5061	Sigma
Filter 0,45 µm	83.1829	Sarstedt
Hybond XL Membran	RPN303S	GE Healthcare
Kanülen		Braun
Klonierungsringe	C3983a	Sigma
Kryogefäße		Greiner
Li-Heparin Röhrchen	02.1065	Sarstedt
LUMA-Platte96		Perkin Elmer
Platten für Retronectin-Beschichtung	659102	Greiner
PVDF Membran	RPN303F	GE Healthcare
Reaktionsgefäße 1,5 und 2 ml		Greiner und Eppendorf
Reaktionsgefäße 15 und 50 ml		BD

Spritzen		Braun
V-Bodenplatte		Roth
Zellkulturplatten, -schalen und -flaschen		TPP
Zellsieb 100 µm	352360	BD Falcon

4.1.3 Chemikalien / Reagenzien / Medienzusätze

Alle Chemikalien wurden, wenn hier nicht gesondert aufgeführt, bei der Firma Carl Roth bestellt.

Chemikalie / Reagenz / Zusatz	Artikel-Nr.	Hersteller
Agarose	35-1020	Peqlab
Ampicillin 50mg/ ml	K029.1	Roth
BFA	B7651	Sigma
Biotin	B4501	Sigma
Blasticidin 10mg/ml	A11139-03	Gibco
Brom-Chloro-Propan	B9673	Sigma
BSA	A1470	Sigma
Collagen R	47254	Serva
DMSO	D2650	Sigma
dNTPs 10 mM	18427-013	Invitrogen
EGF	354001	BD
EMA		Invitrogen
FCS	10270	Gibco
FCS für mTSM	3302-P271120	PAN Biotech
Ficoll LSM 1077	J15-004	PAA
Fugene 6	11 814 443 001	Roche
Gentamicin 40 mg/ml		Ratiopharm
Glutamin 200 mM	25030	Gibco
Heparin-Natrium 25000		Ratiopharm
Hepes 1M	15630	Gibco
Humanserum		Eigenproduktion „Serum-Pool-Aktion“
IGFII	407245	Calbiochem
IL-12		Eigenproduktion, Edgar Schmitt, Mainz
IL-15	200-15	Peptrotech
IL-2 (für murine Zellen)	202-IL	R&D Systems
IL-2 Proleukin (für humane Zellen)		Novartis
IL-7	200-07	Peptrotech
Ketamin	K4138	Sigma
Lachs Sperma	15632-011	Invitrogen
Linear Acrylamid	AM9520	Ambion
Lipofectamin 2000	11668-019	Invitrogen
Natrium-Pyruvat 100 mM	11360	Gibco
NEAA 100x	11140	Gibco
Neomycin (Geneticin)	10131	Gibco
PBS	10010	Gibco
Pen/Strep 10 ⁴ U bzw. 10 ⁴ mg/ml	15140	Gibco

Poly-L-Lysin	P4707	Sigma
Protaminsulfat	P3369	Sigma
Puromycin 10 mg/ml	ant-Pr-1	Invivogen
Radioaktives Cr51	Cr-RA-8	Hartmann Analytic
Radioaktives P32	SCP-205	Hartmann Analytic
Retronectin	T100B	Takara
RNase Inhibitor	03 335 339 001	Roche
Rompun 2 % Injektionslösung		Bayer
Tissue-Tek O.C.T.	4583	Sakura
Trizol	15596-026	Invitrogen
Trypanblau	15250	Gibco
Versen EDTA	15040	Gibco
β-Mercaptoethanol 50 mM	31350	Gibco

4.1.4 Enzyme

Die Enzyme *Sca I*, *Not I*, *EcoR I*, *Nco I*, *BamH I*, *Bgl II*, *Sal I* und *Nhe I* wurden von Fermentas mit einer Konzentration von 10 U/μl bezogen.

Enzym	Artikel-Nr.	Hersteller
AMV Reverse Transkriptase	11 495 062 001	Roche
Benzonase	D00086290	Novagen
DNase	04 716 728 001	Roche
<i>Hind</i> III 50 U/μl	ER0503	Fermentas
Phusion Polymerase	F-549-S	Finnzymes
Proteinase K	7528.2	Roth
RNase A	740505	Macherey-Nagel
SAP	EF0511	Fermentas
T4 DNA Ligase	EL0015	Fermentas
Trypsin	15400	Gibco

4.1.5 Kits

Kit	Artikel-Nr.	Hersteller
AMV RT	11 483 188 001	Roche
BrdU Kit	552598	BD
CD8a (Ly2) MicroBeads, mouse	130-049-401	Miltenyi
Cytofix-Cytoperm	554714	BD
Dynabeads untouched human CD8	113.48D	Invitrogen
Gel Extraction Kit	28706	Qiagen
Gelfiltration Illustra MicroSpin G-50	27-5330-01	GE Healthcare
High pure viral nucleic acid	11 858 874 001	Roche
Human IFN-γ ELISA	430103	BioLegend
Midiprep Plasmid DNA Endotoxin-free	PLED35-1KT	Sigma
Miniprep Plasmid DNA	K0503	Fermentas
mouse IFN-γ ELISA	88-7314	eBioscience
PCR Pure Taq	27-9557-02	GE Healthcare
Peqlab Gel Ex	12-2500-02	Peqlab
Puregene Tissue Kit	1042601	Qiagen

RediprimeII Labelling Kit	PRN1633	GE Healthcare
Superscript III	11752	Invitrogen
Sybr Green	04 8887 352 001	Roche
XTT	11 465 015 001	Roche

4.1.6 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Bestandteile	Endkonzentration
10xTBE	Tris Borsäure EDTA	890 mM 890 mM 20 mM
50xTAE	Tris Essigsäure EDTA pH 8,0	2 M 2 M 50 mM
SB Transferpuffer	NaCl NaOH	1 M 0,4 M
Church-Puffer	NaPO ₄ pH 7.2 EDTA BSA SDS	0,25 M 1 mM 1 % 7 %
TAC-Puffer	NH ₄ Cl Tris pH 7,65 beides autoklavieren und bei Bedarf 9/10 Ammoniumchlorid mit 1/10 Tris-Lösung frisch mischen	0,16 M 0,17 M
FACS-Puffer	PBS BSA	99,9 % 0,01 %
Lyse-Puffer	Tris-HCl Glycerol SDS	15 mM 2,5 % 10 %
	Complete Protease Inhibitor	1 Tablette
TBS-T	Tris NaCl Tween	50 mM 150 mM 0,05 %
Proteinase-K-Puffer	Tris pH 8,5 EDTA SDS NaCl	100 mM 5 mM 0,2 % 200 mM
20xSSPE	NaCl NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O Na ₂ EDTA	3 M 200 mM 200 mM
Waschpuffer 1 SB	2xSSPE	
Waschpuffer 2 SB	2xSSPE + 1 % SDS	
Waschpuffer 3 SB	0,1xSSPE	

Die β -Galaktosidase Reaktions- und Lysepuffer wurden freundlicherweise von Simone Backes zur Verfügung gestellt und können ihrer Dissertation auf S.50 entnommen werden (Backes, 2008).

4.1.7 Zellen

Zellen	Beschreibung	Medium	Quelle
Buffy coats	PBMC ohne Ficoll-Aufreinigung, negative Spender aus CMV-Immunmonitoring, immer frisch aufgetaut	hTZM	Christiane Frömmel, AG Neuenhan, MIBI
T2	T-B-Zell Hybridom, Tap-defizient	RPMI-Vollmedium	AG Krackhardt, MedIII, MRI München
C57	murine Fibroblasten	DMEM-Vollmedium	AG Protzer Laborbestand
C57-S	C57, stabil transfiziert mit HBV <i>S</i> und <i>X</i> unter dem MT Promoter	DMEM-Vollmedium + 800 µg/ml Neomycin	Eigenherstellung Karin Krebs
Plat-E	293T, stabil transfiziert mit MoMulv <i>gag</i> , <i>pol</i> und <i>env</i> unter dem EF1α Promoter	DMEM-Vollmedium + 1 µg/ml Puromycin + 10 µg/ml Blasticidin	AG Uckert, MDC Berlin
PBMC feeder Zellen	PBMC-Mischung aus je 3 gesunden Spendern, immer frisch aufgetaut	hTZM	Eigenherstellung „Serum-Pool-Aktion“, VIRO/AG Krackhardt
LCL	EBV-transformierte humane B-Zellen	RPMI-Vollmedium	Eigenherstellung Carolina Russo, VIRO
HepG2	humane Hepatom-Zelllinie	DMEM Vollmedium, bzw. Differenzierungs-Medium	AG Protzer Laborbestand
HepG2.2.15	stabil HBV-produzierende humane Hepatom-Zelllinie (beruht auf HepG2)	DMEM Vollmedium, bzw. Differenzierungs-Medium	AG Protzer Laborbestand
HBV-met	murine, HBV-transgene Hepatozyten-Zelllinie	RPMI-met	AG Protzer Laborbestand
B3Z	T-Zell Hybridom, TZR erkennt SIINFEKL auf H-2K ^b , <i>lacZ</i> Aktivierung durch NF-AT	RPMI Vollmedium	AG Uckert, MDC Berlin
B3Z_C8	B3Z, stabil transduziert mit murinisiertem S-CAR	RPMI Vollmedium	Eigenherstellung Karin Krebs
Stbl3	E.coli, chemisch-kompetent	LB	Invitrogen C7373-03

4.1.8 Zellkulturmedien

Medium	Zusatz	Menge
Einfriermedium	FCS	90 %
	DMSO	10 %
DMEM-Vollmedium	DMEM	500 ml
	FCS	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	NEAA	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
RPMI Vollmedium	RPMI	500 ml
	FCS	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml

	NEAA	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
Waschmedium	RPMI	500 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
mTZM	RPMI-dutch modified	500 ml
	FCS Pan Biotech	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	β-Mercaptoethanol	550 µl
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
hTZM	RPMI	500 ml
	Humanserum	50 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Glutamin	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
	Hepes	5,5 ml
	NEAA	5,5 ml
	Gentamicin	208 µl
RPMI-met	RPMI	100 ml
	FCS	10 ml
	Pen/Strep	1,1 ml
	Glutamin	1,1 ml
	EGF 50 µg/ml	110 µl
	IGFII 50 µg/ml	32 µl
	Insulin 1,4 mg/ml	78,6 µl
	DMSO	2,2 ml
	(nur für Differenzierung)	
Differenzierungsmedium	Williams	500 ml
	FCS	25 ml
	Pen/Strep	5,5 ml
	Natrium-Pyruvat	5,5 ml
	NEAA	5,5 ml
	DMSO	2,75 ml
SOC-Medium 500 ml	Hefe-Extrakt	2,5 g
	Trypton	10 g
	NaCl	0,29 g
	KCl	0,093 g
	MgCl ₂ x6H ₂ O	1,02 g
	MgSO ₄ x7H ₂ O	1,23 g
	Glucose	1,802 g
LB-Medium 1l	NaCl	10 g
	Hefe-Extrakt	5 g
	Trypton	10 g
AIM-V	31035	Gibco
DMEM	11960	Gibco
Opti-MEM	31985	Gibco
RPMI	21875	Gibco
RPMI-dutch modified	22409	Gibco
Williams	22551	Gibco

4.1.9 Mäuse

Maus (Bezeichnung laut Tierhaltung)	Beschreibung	Quelle
HHDII	humanes HLA-A2 Transgen, β 2m und H-2D ^b knockout	AG Drexler, VIRO
OT-1	Transgen für TZR, der SIINFEKL erkennt	AG Busch, MIBI
C57BL/6 CD45.1	„Black6“, Expression des kongenen Markers CD45.1	AG Busch, MIBI
HBV1.3tg hom C57BL/6	HBV-Transgen	AG Protzer, Tierstallbestand
HBV1.3 xfs	HBV-Transgen, frameshift im X-Protein	AG Protzer, Tierstallbestand; ehemals von Heinz Schaller Heidelberg
HBV1.3/HHDII	Kreuzung aus HBV1.3tg und HHDII	Eigenherstellung Karin Krebs

4.1.10 Peptide

Die Peptide S20-28 FLLTRILTI, S172-180 WLSLLVPFV C18-27 FLPSDFFPSV und OVA257-264 SIINFEKL wurden bei JPT Peptide Technologies in Berlin mit >80 % Reinheit (HPLC) bestellt.

4.1.11 Streptamere

Die MHC:Peptid Komplexe für die Streptamere wurden von Anna Hochholzer (AG Busch, MIBI) rückgefaltet. Die Faltung erfolgte mit humanem HLA-A2, humanem β -2-Mikroglobulin und StrepTag3.

4.1.12 Antikörper

Humane Antigene	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD3-FITC	UCHT1	1:200	eBioscience
CD8-APC	MEM-31	1:250	ImmunoTools
CD8-APC780	RPA-T8	1:250	eBioscience
CD8-PB	DK25	1:250	Dako
hIgG-FITC (Fab Fragment)	polyklonal	1:250	Sigma
hIgG-PE	polyklonal	1:200	eBioscience
HLA-A2-FITC	BB7.2	1:200	Labgen
IFN- γ -eFluor700	B27	1:200	BD
IL-2 APC	5344.111	5 μ l pro Test	BD
CD3	OKT-3	30ng/ml	eBioscience
Murine Antigene	Klon	Verdünnung	Hersteller
CD127-APC	A7R34	1:200	eBioscience
CD3 FITC	17A2	1:150	BD
CD4-eFluor450	RM4-5	1:200	eBioscience

CD45.1-APC	A20	1:250	eBioscience
CD45.1-FITC	A20	1:250	eBioscience
CD45.2-PE	104	1:250	eBioscience
CD62L-PeCy7	MEL-14	1:200	eBioscience
CD8-APC	5H10	1:200	Caltac
CD8-eFluor450	53-6.7	1:250	eBioscience
CD8-FITC	53-6.7	1:100	BD
Lamp1(CD107a)-APC	eBio1D4B	1:40	eBioscience
CD3	17A2	s. Methoden	eBioscience
CD28	37.N.51.1	s. Methoden	eBioscience
Sonstige Antigene	Klon	Verdünnung	Hersteller
HBsAg	Murex	1:50	Abbott
Core-Protein	H800	1:10000	Eigenherstellung Labor Heinz Schaller
HBVax (rabbit)	H651	1:200	Eigenherstellung Labor Heinz Schaller

4.1.13 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pMHS 177_1BZ	S+X ORF, MT-Promoter	AG Protzer
pSVNeo	Neomycin-Resistenzgen	AG Protzer
pCh9	HBV1.3 Überlängengenom	AG Protzer
pBULLET_mC8 (907.C8)	muriner S-CAR	AG Protzer, Gregor Hohn
pBULLET_mCEA (907.CEA)	muriner CEA-CAR	AG Abken, Köln
pBULLET_hC8 (607.C8)	humaner S-CAR	AG Protzer, Felix Bohne
pBULLET_hCEA (607.CEA)	humaner CEA-CAR	AG Abken, Köln
pBULLET_hC8 decoy	humaner S decoy-CAR	AG Abken, Köln
pMP71_GFP	GFP	AG Uckert, Berlin
pMP71_hC8	humaner S-CAR	AG Protzer, Karin Krebs
pMP71_hCEA	humaner CEA-CAR	AG Protzer, Karin Krebs
pMP71_hC8 decoy	humaner S decoy-CAR	AG Protzer, Karin Krebs
pMSCV_Her-2 (#745)	CAR gegen Her-2	AG Charo, Berlin
pMSCV_hC8	humaner S-CAR	AG Protzer, Karin Krebs

4.1.14 Primer

Die Primer für das Screening der HHD Mäuse wurden von Eurofins MWG Operon bezogen, alle anderen Primer wurden von Invitrogen synthetisiert.

Name	Sequenz 5' → 3'
CA1	AGACCTCATGTCTAGCACAG
CA2	GTGACACATTTGTTTGAGAATC
VPANHUM	TGAGTGTCCCPGAPGG2P
VP1	GCIITKTIYTGGTAYMGACA
VP2	CTITKTWTTGGTAYCIKACG
CP1	GCACCTCCTTCCCATTAC
P5' αST	CTGTGCTAGACATGAGGTCT

P3'αST	CTTGCCTCTGCCGTGAATGT
3'T-Cα	GGTGAATAGGCAGACAGACTTGTCAGTGGGA
P5'βST	AAGCAGAGATCTCCCACAC
P3'βST	GAGGTAAAGCCACAGTCTGCT
P-3CβII	GATGGCTCAAACACAGCGACCTC
mKappaL_Notl_sense	ATAGCGGCCGCTCCTCTAGACTGCCATGGATT
C8-hom2	CACAGATCTCCAGCGGCCGCAGAGGAG
5a19-Bgl II	TGTATCCGCGGCCGCTGGAGATCTGTG
p-fw HBV	TACTAGGAGGCTGTAGGCATA
p-rev HBV	GGAGACTCTAAGGCTTCCC
CD4+	AGCTCAACAATACTTTGACC
CD4-	CCCAGAAAGCCGAAGGA
CD8+	GGATTGGACTTCGCCTG
CD8-	CAAGTATGCTTTGTGTCAAAGA
IFNγ+	ATGGTGACATGAAAATCCTG
IFNγ-	GTGGACCACTCGGATGA
TNFα+	ACGTCGTAGCAAACCAC-
TNFα-	AGATAGCAAATCGGCTG
IL-10 +	GCTGGACAACATACTGC
IL-10 -	GCATCCTGAGGGTCTT
GAPDH+	ACCAACTGCTTAGCCC
GAPDH-	CCACGACGGACACATT
mNid2Fw	ATCCTACCGGGAAACAG
mNid2Rev	CCCAAGGTCTTCGTTGA
OPC30	AGGGGCCGGAGTATTGGGAC
SMO133	AACGATCACCATGTAAGAGTCAGT
SMO130	ATTGGGAGCGGGAAACACAG
SMO131	TCCGACCCCAAGTCACAG
SMO132	CAGCAGAAACATACAAGCTGTC
SMO126	GTCAGATATGTCCTTCAGCAAG
SMO124	GATGCTGATCACATGTCTCG

Die Sequenzen der Primer für die unterschiedlichen variablen Ketten können der Dissertation von Ingrid Schuster entnommen werden (Schuster, 2008).

4.1.15 Sonstiges

Produkt	Artikel-Nr.	Hersteller
HBsAg (ay)	Lot AY 15/17	Rhein Biotech
HBsAg (adw)	Lot 2006-01	Rhein Biotech
ALT-Streifen	10745138	Roche
Smart Ladder 1kb	1700-02	Eurogentec
Streptactin-PE		IBA

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine Zellkulturmethoden

Alle Zellkulturexperimente wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gehalten.

Adhärente Zellen wurden bei Konfluenz, etwa alle 3-4 Tage, mit Trypsin abgelöst und gesplittet. Suspensionszelllinien wurden bei Gelbfärbung des Mediums und/oder beim Auftreten von augenscheinlichen Proliferationsklümpchen gesplittet. Für die Differenzierung von Leberzelllinien, wurden Platten mit Kollagen (1:10) 30' bei 37 °C beschichtet.

Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden die Zellen (evtl. nach Vorverdünnung) 1:2 mit Trypanblau verdünnt. Die Zahl der Zellen in zwei Großquadraten wurde mit 10⁴ (und evtl. dem Faktor der Vorverdünnung) multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen bei 1500 rpm für 5' zentrifugiert, das Pellet in Einfriermedium resuspendiert und die Zellen 24 h in einer Einfrierhilfe bei -80 °C und danach in Flüssigstickstoff gelagert. Beim Auftauen wurden die Zellen schnell im Wasserbad erwärmt, dann mit 10 ml warmem Medium abzentrifugiert und in Kultur genommen. Primäre Lymphozyten wurden stattdessen zweimal mit 50 ml abzentrifugiert. Handelte es sich hierbei um Buffy Coats, wurden dem Auftaumedium zusätzlich 50 U/ml Benzonase zugesetzt.

4.2.2 Generierung einer murinen Zelllinie mit stabiler S-Expression

Da kein S-codierendes Plasmid mit Selektionsmarker vorhanden war, wurde ein Plasmid für eine Neomycin-Resistenz ko-transfiziert. Um die Wahrscheinlichkeit zu erhöhen, dass eine Zelle nicht nur das Selektionsplasmid sondern gleichzeitig auch das S-Plasmid aufnehmen würde, wurde letzteres in deutlichem Überschuss transfiziert.

Die Plasmide pMHS (20 µg) und psVNeo (0,7 µg) wurden gemeinsam mit 120 U *Sca* I für 5 h bei 37 °C verdaut. Dies diente der Linearisierung der Plasmide, da beide nur eine *Sca* I Schnittstelle im β-Laktamase Gen für die Ampicillin-Resistenz enthielten. Die verdaute DNA wurde mit einer NaAc/Ethanol Fällung aufgereinigt. 2 µg wurden mit 3 µl Fugene in ca. 50 % konfluente C57 Zellen nach Herstellerangaben transfiziert. Am nächsten Tag wurde zu den Zellen Medium mit 800 µg/ml Neomycin gegeben. Nachdem die meisten Zellen gestorben und entfernt worden waren, konnten einzelne überlebende Zellen mit Neomycin-Resistenz ausgemacht werden. Diese wurden markiert und, nachdem sie zu einem kleinen Zellhaufen gewachsen waren, mit Hilfe eines Klonierungsringes und Trypsin abgelöst und expandiert.

4.2.3 Bestimmung der β -Galaktosidase Aktivität

Die Zellen wurden mit EDTA abgelöst und 5' bei 350 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 μ l Lysepuffer resuspendiert und 5' bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das Lysat wurde in eine 96-Well-Platte gegeben und mit weiteren 100 μ l β -Galaktosidase Reaktionspuffer für 20' bei RT inkubiert. Anschließend konnte die Spaltung des enthaltenen Substrats Chlorophenolrot- β -D-Galactopyranosid photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt werden.

4.2.4 Retrovirale Transduktion

4.2.4.1 Transfektion der Verpackungszelllinie Plat-E

Zwei Tage vor Transfektion wurden 4×10^5 Plat-E Zellen in 2 ml Medium (ohne Antibiotika) in 6-Well-Platten ausgesät. Diese waren zuvor mit Poly-L-Lysin, 1:20 in PBS, für eine Stunde bei 37 °C beschichtet und anschließend einmal mit PBS gewaschen worden. Die Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben mit 4 μ g CAR-Plasmid DNA (Endotoxin-freie Präparation) und 10 μ l Lipofectamin pro Well. Am nächsten Morgen wurde das Medium entfernt und 2 ml Maus-T-Zellmedium (mTZM) aufgelegt (alternativ 1,5 ml, um den Virustiter zu erhöhen). Nach mindestens 24 h wurde dieser Überstand für die Transduktion verwendet und gegen frische 2 ml mTZM ausgetauscht. Nach weiteren 24 h wurde dieser Überstand für die 2. Transduktion verwendet.

Ein Well der transfizierten Plat-E Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen, 20' bei RT mit 4 % PFA fixiert und mit PBS gewaschen. Es folgte eine Färbung gegen den CAR mit α -hIgG-FITC, 1:500 in 1 ml PBS, für 30' bei RT. Die Zellen wurden danach 3x mit PBS gewaschen und die Transfektionseffizienz mit einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet. Um später eine hohe Transduktionsrate zu erreichen, sollten mindestens 85 % der Plat-E Zellen transfiziert sein.

4.2.4.2 Aufreinigung von Maus-Splenozyten

Für die Aufreinigung von Splenozyten dienten die Milzen von C57BL/6 oder OT-1 Mäusen. Diese wurde mit 3 ml mTZM in einer 3 cm Zellkulturschale in einem 100 μ m Zellsieb mit der geriffelten Seite eines Spritzenstempels zerrieben. Der Durchfluss wurde mit einer 20 G Kanüle zur weiteren Vereinzelung der Zellen einmal aufgezogen. Die Milzreste im Sieb wurden noch zwei weitere Male so behandelt. Dann wurden die gesammelten Milzzellen bei 180 x g, 6 °C für 8' zentrifugiert. Der Überstand wurde abgeschüttet und die Erythrozyten mit 3 ml TAC-Puffer für 2' im 37 °C Wasserbad lysiert. Die Reaktion wurde mit 25 ml mTZM gestoppt und erneut zentrifugiert. Die Zellen wurden in 10 ml mTZM resuspendiert und über ein angefeuchtetes

Zellsieb gegeben, um mögliche restliche Verklumpungen zu entfernen. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Zellen in 20 ml mTZM aufgenommen und gezählt. Das Medium zum Waschen war eiskalt und die Zellen wurden permanent auf Eis gehalten.

4.2.4.3 Transduktion mit IL-2 Stimulation

Für eine Transduktion mit IL-2 wurden die Milzzellen nach ihrer Aufreinigung auf 3×10^6 Zellen/ml eingestellt und über Nacht (ÜN) mit 10 ng/ml IL-2, 2 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-CD3}$ und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ $\alpha\text{-CD28}$ inkubiert.

Vor der Transduktion wurden 6-Well-Platten mit Retronektin beschichtet. Das Retronektin wurde 1:80 mit PBS verdünnt und mit 1 ml/Well für 2 h bei RT inkubiert. Danach wurde es abgenommen und zur nochmaligen Verwendung wieder eingefroren. Die Platten wurden mit 2 % BSA in PBS für 30' bei 37 °C geblockt und anschließend ggf. mit 0,025 M HEPES ÜN bei 4 °C gelagert.

Der Überstand der transfizierten Plat-E Zellen wurde mit einem 0,45 μm Filter von toten Zellen befreit und 3 ml davon pro Retronektin-beschichtetes Well aufgetragen. Die Milzzellen vom Vortrag wurden bei 180 x g bei RT 10' zentrifugiert, in frischem mTZM aufgenommen und auf 6×10^6 Zellen/ml eingestellt. Es wurden erneut IL-2, Antikörper (s.o.) und Protaminsulfat (PS) mit 4 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben (Volumen des Plat-E Überstands mit eingerechnet). Pro Well wurde 1 ml Zellen mit dem Plat-E Überstand bei 2000 rpm 2 h bei 32 °C spinokuliert. Am nächsten Tag wurde die Prozedur wiederholt. Dafür wurden von den bereits einmal transduzierten Zellen 3 ml entfernt und durch neuen Plat-E Überstand mit IL-2 und PS ersetzt.

4.2.4.4 Transduktion mit IL-12 Stimulation

Für die Transduktion mit IL-12 wurde nach der Aufreinigung der Milzzellen eine Positivselektion der CD8^+ Zellen nach Herstellerangaben durchgeführt. 1×10^6 CD8^+ Zellen wurden pro Well in 1,5 ml mTZM mit 5 ng/ml IL-12 ausgesät. Die 24-Well-Platten hierfür waren am Tag zuvor mit Antikörpern gegen CD3 und CD28 beschichtet worden (jeweils 10 $\mu\text{g/ml}$ bei RT ÜN, danach 3x mit PBS gewaschen). Einen Tag nach Aussaat der CD8^+ Zellen wurde 1 ml Medium pro Well entnommen und bei 37 °C gelagert. Zu den restlichen 0,5 ml wurden 1,5 ml Plat-E-Überstand mit 2 $\mu\text{g/ml}$ PS gegeben und wie oben spinokuliert. Danach wurden je 0,5 ml abgenommen und je 1 ml aufbewahrter Überstand auch mit PS versehen und zurückgegeben. Dies diente lediglich dem sparsamen Umgang mit IL-12. Am nächsten Tag wurde alles wiederholt, dabei aber 2 ml CD8^+ Überstand zwischengelagert.

4.2.5 Adoptiver T-Zelltransfer

4.2.5.1 Transfer von Zellen

Über drei Tage wurden die murinen T-Zellen wie oben beschrieben stimuliert und zweimal transduziert. Die Zellen eines Transduktionsansatzes wurden gepoolt, zentrifugiert, in eiskaltem PBS aufgenommen und bis zum Transfer auf Eis gehalten. Danach wurde eine Oberflächenfärbung des CARs durchgeführt und die Transduktionsrate mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Die Zellen wurden auf die gleiche Menge an CAR-positiven Zellen eingestellt und in einem Volumen von 400 µl pro Maus intraperitoneal injiziert.

4.2.5.2 Blut- und Serumanalyse

An verschiedenen Meßpunkten nach Transfer und am Endpunkt des Versuchs wurden Blut- bzw. Serum-Analysen durchgeführt. Im Versuchsverlauf wurden die Tiere dafür mit Ketavet/Rompun narkotisiert und hinter dem Auge mit einer Kapillare Blut entnommen. Zwei Tropfen wurden zu ca. 20 µl vorgelegtem Heparin gegeben. Die Erythrozyten wurden 10' bei RT mit TAC-Puffer lysiert. Dann wurden die Zellen bei 1500 rpm, 5' bei 4 °C zentrifugiert, einmal mit FACS-Puffer gewaschen und dann zur Färbung für die Durchflusszytometrie in eine V-Bodenplatte überführt. Etwa fünf weitere Tropfen Blut wurden mindestens 30' bei RT inkubiert und dann für 10' bei 5000 x g abgesetzt. Von dem Serum wurden 32 µl für die Messung des Leberenzym Alanin Amino Transferase (ALT) mit dem Tischanalysegerät Reflotron verwendet. Für die Bestimmung der HBV-Antigene HBsAg und HBeAg wurde das Serum mit PBS verdünnt und im diagnostischen Immunoassaysystem Axsym gemessen. Ebenfalls aus dieser Verdünnung wurde mit dem „High pure viral nucleic acid“ Kit die Virus-DNA isoliert und später in einer quantitativen PCR eingesetzt.

4.2.5.3 Organentnahme und -aufarbeitung

Bei Beendigung des Versuchs wurden die Tiere mit CO₂ getötet. Lunge, Niere und ein Teil von Milz und Leber wurden in Tissue-Tek auf Trockeneis gefroren und dann bei -80 °C gelagert. Die Leber wurde über die Pfortader mit PBS perfundiert und entnommen. Aus der Mitte des großen Leberlappens wurde ein Stück geschnitten und in 4 % PFA für Paraffinschnitte gelagert. Für folgende Analysen wurden weitere Leberstücke genommen und speziell behandelt: DNA-Extraktion in 1ml Proteinase K Puffer, RNA-Extraktion in 1ml Trizol, Kryoschnitte in Tissue-Tek und ein Rest für möglichen späteren Bedarf in Flüssigstickstoff schockgefroren und dann bei -80 °C gelagert. Etwa ein Drittel der Leber wurde für die Aufreinigung der leberassoziierten Lymphozyten (LAL) verwendet. Das Lebergewebe wurde wie für die Milz beschrieben

zerkleinert und dann die Lymphozyten mit einem Ficoll-Gradienten angereichert. Die Milzzellen und das Blut wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet.

4.2.5.4 Gewebeschnitte

Die Schnitte und Färbungen von Paraffin- und Kryogewebe wurden mit freundlicher Unterstützung von Irene Esposito (Institut für Pathologie, Helmholtz Zentrum München) bzw. Mathias Heikenwälder (Institut für Virologie, Helmholtz Zentrum München) zur Verfügung gestellt. Die Aufnahmen der Färbungen der Paraffinschnitte wurden am Olympus Slidescanner DotSlide BX51 gemacht. Die Immunfluoreszenz-Färbungen des Kryogewebes wurden am Zeiss Axio Z1 aufgenommen.

4.2.6 Generierung von humanen T-Zellklonen

4.2.6.1 Gewinnung von PBMC der Spender

Für die Generierung der später beschriebenen T-Zellklone standen Vollblut oder eingefrorene PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) verschiedener Spender zu Verfügung.

Der Spender 3 befand sich zum Zeitpunkt der Blutabnahme mit dem Verdacht auf eine akute Hepatitis B in der Leberambulanz des Klinikums Rechts der Isar in München. Nach letztem Stand von Januar 2011, vier Monate nach Blutentnahme, war seine Hepatitis noch nicht ausgeheilt, er hatte aber aufgrund niedriger Viruslast im Blut eine gute Prognose. Die peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) wurden von der Immunmonitoring Gruppe des Instituts aufgereinigt.

Kryo-konservierte PBMCs der Spenderin 1 wurden vom Uniklinikum Mainz über Dr. Martin Sprinzl zur Verfügung gestellt. Es ist nicht bekannt, ob Spenderin 1 zum Zeitpunkt der Entnahme an einer akuten Hepatitis B litt oder es sich eventuell um ein „Aufflammen“ der Entzündung in einer chronischen Infektion handelte. Spenderin 1 gilt mittlerweile als ausgeheilt.

Spender 2 erkrankte an einer akuten Hepatitis B, die seit ca. 25 Jahren ausgeheilt ist. Das Blut wurde mit Lithium-Heparin Röhrchen entnommen und 1:2 mit Medium verdünnt. Es wurden 30 ml verdünntes Blut auf 20 ml Ficoll aufgetragen und 20' bei 1200 x g und RT ohne Bremse zentrifugiert. Erythrozyten und Granulozyten sedimentieren dabei aufgrund ihrer Dichte, während die PBMCs als Schicht über dem Ficoll sichtbar werden. Die PBMCs wurden abpipettiert und zweimal mit 50 ml Medium erst für 10' bei 300 x g und dann bei 200 x g gewaschen. Die Zellen wurden gezählt, direkt in einer Stimulation eingesetzt oder noch eine Negativisolation der CD8⁺ Zellen mit Dynabeads nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.2.6.2 Peptidbeladung von Zellen

Um den humanen T-Zellen HBV-spezifische Peptide zu präsentieren, wurden T2 Zellen exogen mit Peptid beladen. T2 Zellen sind TAP-defizient und können keine endogenen Peptide präsentieren. Die Zellen wurden zweimal bei 1800 rpm und RT für 5' mit Waschmedium (WM) gewaschen und dann auf 2×10^6 /ml in AIM-V Medium eingestellt. Dann wurde beispielsweise für eine Peptidkonzentration von 1 μ M während der Beladung 1 μ l Peptid zu 1 ml Zellen gegeben (Peptidstock 1 μ g/ μ l, 1 M \approx 1000 g/ml, je nach Peptidsequenz). Die Zellen wurden in einer 24-Well-Platte 2 h bei 37 °C inkubiert und danach mit 35 Gy bestrahlt. Im Anschluß wurden die Zellen einmal gewaschen und in humanem T-Zell Medium (hTZM) auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Die CD8⁺ Zellen oder PBMCs aus den Spendern wurden dann mit 1×10^5 Peptid-beladenene T2-Zellen und 10 ng/ml IL-7 und IL-15 stimuliert. An den Folgetagen 1, 4, 8 und 11 wurde jeweils 50 U/ml IL-2 zugegeben und ggf. das Medium gewechselt. Die T2-Stimulation wurde teilweise wiederholt.

4.2.6.3 Sortierung und Klonierung von T-Zellen

Am Tag 13-15 nach der ersten Peptid-Stimulation wurden die HBV-spezifischen T-Zellen mit Streptameren gefärbt (siehe 4.2.8.2) und sortiert. Die Sortierung wurde am MoFlo im Institut für Mikrobiologie durchgeführt. Um eine Verstopfung des Geräts zu vermeiden, wurden die Zellen nach der Färbung durch ein Filcon gedrückt. Die Sortierung erfolgte in hTZM mit 10 μ M Biotin zur Ablösung des reversiblen Streptactins. Mit der vom Gerät angegebenen Zahl an sortierten Zellen wurde eine Verdünnung von 0,3-0,5 Zellen pro 100 μ l ausgerechnet und diese in 96-Well-Rundbodenplatten ausgesät. Da Zellen zum Wachsen Kontakt zu anderen Zellen brauchen, wurden bestrahlte $7,5 \times 10^4$ heterologe PBMCs zusammen mit 1×10^4 LCLs in weiteren 100 μ l/Well vorgelegt. Das Medium wurde mit 50 U/ml IL-2 und 30 ng/ml α -CD3 versetzt. Nach zwei Wochen Inkubation im Brutschrank konnten herangewachsene Zellklone mit bloßem Auge ausgemacht werden. Im Mikroskop betrachtet, zeichneten sich Klone im Gegensatz zu den Feeder Zellen durch einen scharfen Rand des Zellhaufens aus.

4.2.6.4 Unspezifische Stimulation von T-Zellen

Um Klone weiter zu expandieren, wurden sie im größeren Maßstab unspezifisch stimuliert. Die LCLs hierfür wurden zweimal mit kaltem WM gewaschen (1200 rpm, 10', 4 °C), in hTZM aufgenommen und mit 50 Gy bestrahlt. Die PBMCs stammten aus Buffy Coats nicht mehr benötigter Patientenproben des Immunmonitorings (MIBI) und aus unserem heterologen PBMC-

Pool. Sie wurden aufgetaut und mit 35 Gy bestrahlt. Jeder Klon wurde in ein Well einer 12-Well-Platte mit 5×10^6 PBMCs, 1×10^6 LCLs, 30 ng/ml α -CD3 und 4 ml hTZM gegeben. An den Folgetagen 1, 5, 8 und 11 wurden 50 U/ml IL-2 zugegeben, ggf. 2 ml Medium ausgewechselt oder der expandierte Klon auf zwei Wells aufgeteilt.

4.2.7 Ko-Kulturen

4.2.7.1 Adhärenz Zielzellen und HBsAg

Die Zielzellen waren zum Zeitpunkt der Ko-Kultur konfluent. Handelte es sich um HBV-replizierende Zellen, so wurden sie bereits seit ca. 10-14 Tagen mit Differenzierungsmedium behandelt, da nur differenzierte Hepatozyten eine gute HBV-Produktion zeigen. Das Medium wurde entfernt und die Effektor-Zellen in 200 μ l mTZM aufgelegt. Die Effektoren wurden dabei an die Zahl der CAR⁺ Zellen angeglichen. Je schlechter die Transduktionseffizienz war, desto höher war also die Gesamtzellzahl. 72 h nach Beginn der Ko-Kultur wurden 150 μ l Überstand für die Messung von Zytokinen im ELISA abgenommen (Durchführung nach Herstellerangaben) und 125 μ l XTT-Lösung aufgelegt (s.u.).

Adhärenz C57-Zellen wurden 1h mit SIINFEKL-Peptid im Medium inkubiert und danach zweimal mit Medium gewaschen.

Für eine HBsAg Beschichtung wurde das Antigen mit 5 μ g/ml in 100 μ l/Well entweder bei 37 °C für 1 h oder bei 4 °C ÜN auf den Platten inkubiert. Danach wurde 2x mit PBS gewaschen.

4.2.7.2 XTT-Test

Die HBV-replizierenden Hepatomzelllinien lassen sich schwer vereinzeln und nach dem Trypsinieren sinkt durch De-Differenzierung die HBV-Replikation der Zellen. Somit eignen sich diese Zellen nicht für einen Chrom-Release-Assay (persönliche Mitteilung Felix Bohne). Stattdessen wurde ein XTT-Test durchgeführt, um die Viabilität der Zielzellen zu bestimmen. Dies ist ein kolorimetrischer Test, bei dem das gelbe Tetrazolium Salz XTT von lebenden Zellen zum orangenen Formazan Salz gespalten wird. Als XTT-Lösung wurden pro Well 100 μ l DMEM ohne Phenolrot, 25 μ l XTT-Reagenz und 0,5 μ l Elektronenkoppler aufgelegt (modifiziert nach Herstellerangaben). Nach Inkubation bei 37 °C für etwa 2 h wurde die Umsetzung zu Formazan mit einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 650 nm bestimmt.

4.2.7.3 Chrom-Release-Assay

In einem Chrom-Release-Assay werden Zielzellen mit radioaktivem Natriumchromat inkubiert. Dieses wird von ihnen aufgenommen und ist im Überstand nachweisbar, wenn die Zielzellen lysiert werden. Für die Chromierung wurden 1×10^6 T2 Zellen in 10 ml WM bei 1400 rpm und RT 5' gewaschen. Das Pellet (Restvolumen 20 μ l) wurde erst in 10 μ l Peptidlösung und dann mit 30 μ l hTZM resuspendiert. Im Radioaktivlabor wurde das Chrom 1:4 mit hTZM vorverdünnt und davon 40 μ l pro Zielzell-Ansatz zugegeben. Die Peptidkonzentration von 1 mM (1 mg/ml) verringerte sich bei einer 1:10 Vorverdünnung des Stocks in hTZM, von 1 mM (1 mg/ml) auf 100 μ M, während der Chromierung durch die weitere 1:10 Verdünnung auf 10 μ M. Die Chromierung erfolgte für 1-1,5 h bei 37 °C. Anschließend wurde überschüssiges Chrom durch 3,5x Waschen bei 1500 rpm und 5°C für 7' entfernt. Die Zielzellen wurden mit 2×10^4 Zellen/100 μ l in hTZM aufgenommen. Die Effektorzellen wurden entsprechend dem gewünschten E:T Verhältnis (Effector to Target) mit hTZM eingestellt, z.B. 2×10^5 E/100 μ l für ein E:T von 10:1. Je 100 μ l von Ziel- und Effektorzellen wurden in 96-Well-Rundbodenplatten im Dreifachansatz für 4 h bei 37 °C inkubiert. Zur Bestimmung der Spontan- und Maximallyse wurden 100 μ l Medium bzw. 2 % Triton-X/Medium anstatt Effektorzellen zugegeben. Für die Messung der Chrom-Freisetzung wurden 30 μ l Überstand/Well auf LUMA-Platten gegeben, ÜN unter dem Abzug getrocknet und dann am Top Count NXT ausgelesen (Messeinheit: „counts“). Die spezifische Lyse berechnete sich wie folgt:

$$(\text{counts Ko-Kultur} - \text{counts Spontanlyse}) / (\text{counts Maximallyse} - \text{counts Spontanlyse}) \times 100.$$

4.2.8 Durchflusszytometrie

4.2.8.1 Oberflächenfärbung

Zur Färbung von Oberflächenproteinen wurden die Zellen in eine 96-Well-V-Bodenplatte überführt und bei 1400 rpm und 4 °C 3' abzentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde ausgeklopft und einmal mit FACS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Zellen in 50 μ l FACS-Puffer + Antikörper für 30' auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde 2,5x gewaschen, die Proben in 200-400 μ l FACS-Puffer aufgenommen und am BD FACSCantoII gemessen.

Für die Färbung von LAMP-1 wurde den Zellen bereits während der 4 h-Inkubation mit dem Antigen der Antikörper beigefügt. Die anderen Oberflächenproteine wurden im Anschluss wie oben beschrieben gefärbt.

4.2.8.2 Streptamerfärbung (für Sortierung) von Zellen

Die MHC:Peptid Komplexe für die Streptamerfärbung wurden von der AG Busch (MIBI) zur Verfügung gestellt. Für die Färbung von TZR wurde 1 µg MHC mit 5 µl Streptactin-PE in 50 µl FACS-Puffer gemischt und für 25' auf Eis im Dunkeln mit den Zellen inkubiert. Dies reicht für eine Färbung von bis zu 5×10^6 Zellen. Es folgte eine Färbung anderer Oberflächenmoleküle für 20'. Sollten die T-Zellen anschließend sortiert und weiter kultiviert werden, so wurden 0,4 µg MHC und 1 µl eines Streptactins benutzt, dessen Reversibilität vorher von der AG Busch überprüft worden war. Die Färbung wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt und die Zellen wie in 4.2.6.3 beschrieben sortiert.

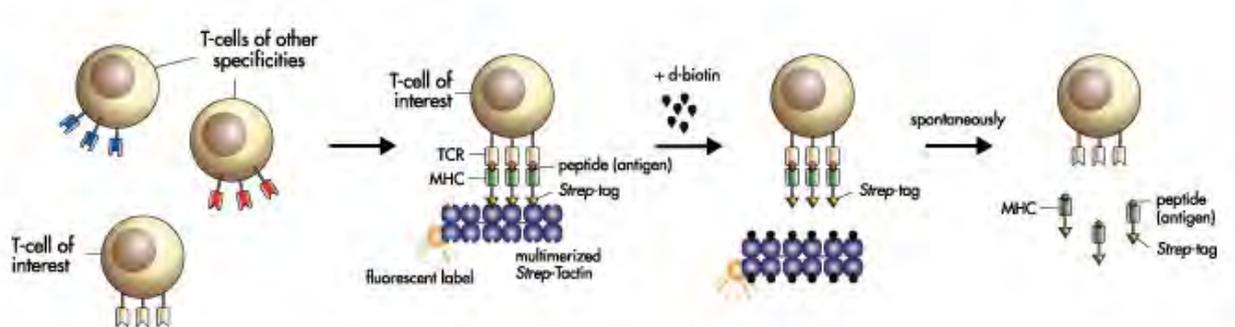


Abb. 4.1: Funktionsweise von Streptameren. Lösliche MHC-Moleküle, die das gewünschte Peptid präsentieren, binden über ihr Strep-Tag an Streptactin, welches mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Bindet eine T-Zelle mit Spezifität für das Peptid an diesen Komplex, so ist die Zelle damit farblich markiert und kann in der Durchflusszytometrie dargestellt und sortiert werden. Die sortierten Zellen werden vom Sortiergerät in Medium gegeben, welches Biotin enthält. Da die Affinität des Streptactins zum Biotin höher ist als zum Strep-Tag des MHCs löst es sich ab. Ohne das Rückgrat des Streptactins ist die Bindung der MHCs an den TZR zu schwach und sie dissoziieren ab. Diese Technologie ermöglicht es, durch die Reversibilität der Bindung, Zellen mit gewünschter TZR-Spezifität kurzzeitig anzufärben, ohne über die MHC-Bindung eine Aktivierung der T-Zelle auszulösen (www.streptamer.com).

4.2.8.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Um Zytokin-produzierende Zellen zu identifizieren, wurde eine intrazelluläre Färbung durchgeführt. 1 h nach Beginn der Stimulation bzw. Ko-Kultur wurde 2 µg/ml BFA zugegeben, um die Sekretion der Zytokine zu verhindern und so das Signal bei der Färbung zu verstärken. Nach 4 weiteren Stunden folgte die Färbung. Hier wurden die Zellen ggf. ÜN bei 4 °C gelagert. Nach 1x Waschen bei 1600 rpm, 4°C für 5' wurden die Zellen erst für 20' im Dunkeln und dann 10' unter einer Lampe mit 50 µl EMA inkubiert (1:1000, Stock 2 mg/ml). Es folgten 2,5x waschen, die Zugabe von 100 µl Cytofix/Cytoperm für 20' im Dunkeln, 3,5x waschen mit 1xPerm/Wash Lösung, 30' Inkubation mit Antikörpern im Dunkeln und 2,5x waschen mit FACS-Puffer.

Alle Schritte wurden auf Eis mit dem Cytofix/Cytoperm Kit von BD durchgeführt. Bei der intrazellulären Färbung von Maus-Zellen wurden vor der Fixierung bereits die Oberflächenproteine gefärbt und jeweils bei 1500 rpm zentrifugiert.

4.2.8.4 Proliferationstest mit BrdU

Während der Ko-Kultur wurden 10 μ M BrdU für eine Stunde zugegeben. Proliferierende, BrdU-inkorporierende Zellen wurden mit einem Kit von BD nach Herstellerangaben gefärbt und im FACS analysiert.

4.2.9 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen

Die zu färbenden Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen und dann 15' bei RT mit 4 % PFA fixiert. Nach 1x Waschen wurden unspezifische Bindungsstellen mit 10 % Serum/PBS für 30' bei RT geblockt. Hierzu wurde Serum der Spezies verwendet, in dem der spätere Sekundär-Antikörper hergestellt wurde. Nach 1x Waschen erfolgte die Markierung mit dem Primär-Antikörper in Serum/PBS für 2 h bei RT oder ÜN bei 4 °C. Anschließend wurden die Zellen 2x gewaschen und für 1 h bei RT mit dem Sekundär-Antikörper inkubiert. Bei diesem Schritt wurde wahlweise DAPI 1:2000 verdünnt zugegeben. Zum Schluss wurde noch 2x gewaschen und die Proben in Mowiol/Dabco eingedeckelt. Für die Färbung der Bindestelle des S-CARs wurden Alexa-594 markierte SVP von Knud Esser zur Verfügung gestellt (0,11 μ g/ μ l, 1:500). Die Aufnahmen wurden an den konfokalen Mikroskopen Leica SP5 oder Olympus Fluoview FV101 gemacht.

4.2.10 Generierung einer HBV- und HLA-A2-exprimierenden Mauslinie

HBVtg 1.3 Mäuse wurden mit HHDII Mäusen verpaart. Ab der zweiten Generation wurde von einem Stückchen der Schwanzspitze die DNA mit dem Core Kit von Qiagen aufgereinigt und die Vererbung der HHDII-Merkmale analysiert.

PCR-Ansätze:	Schwanz-DNA	3 μ l
	Primer sense	1 μ l
	Primer antisense	1 μ l
	H ₂ O	<u>20μl</u>
		25 μ l

PCR-Programme und Primer:

HHD: OPC30 + SM133
95°C 5'
95°C 1'
65°C 30'' } x35
72°C 2'
72°C 10'

H-2D^{b/-}: SMO130 + SMO131
95°C 5'
95°C 1'
67°C 30'' } x29
72°C 30''
72°C 10'

H-2D^{b+/+}: SMO132 + SM133
95°C 5'
95°C 1'
60°C 30'' } x30
72°C 2'
72°C 10'

β2m^{-/-}: SMO126 + SMO124
95°C 5'
95°C 1'
62°C 30'' } x35
72°C 2'
72°C 10'

4.2.11 Molekularbiologische Methoden

4.2.11.1 RNA-Isolation

Um die RNA aus Lebergewebe zu isolieren, wurde das Gewebe zunächst in 1 ml Trizol mit dem Ultrathorax homogenisiert. Danach folgte die Aufreinigung nach Anleitung von Invitrogen. Die RNA wurde auf 1 µg/µl eingestellt und mit einer DNase nach Herstellerangaben zur Entfernung eventueller DNA-Reste verdaut.

Um RNA aus T-Zellen zu isolieren, wurden die Zellen bei 400 x g und 4 °C 5' zentrifugiert, das Pellet durch Antippen gelöst und mit 1 ml Trizol für 5' bei RT inkubiert. Pro ml Trizol wurden 200 µl Bromchlorpropan zugegeben, 15'' invertiert, 3' bei RT inkubiert und dann bei 12.000 x g und 4 °C für 15' zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein neues Gefäß überführt und mit 500 µl Isopropanol gevortext. Nach 10' bei RT wurde die RNA bei 12.000 x g und 4 °C für 10' gefällt. Das Pellet wurde einmal mit 75 % EtOH gewaschen, getrocknet und in DEPC-H₂O aufgenommen. Stand nur sehr wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung, so wurde zu Beginn 20 µl Acrylamid in das Trizol gegeben und die Menge der Reagenzien herunterskaliert.

4.2.11.2 cDNA-Synthese

Die Umschreibung der RNA aus den T-Zellklonen in cDNA erfolgte für die Analyse der TZR α-Kette mit dem AMV-Kit von Roche. Es wurde ein Primer eingesetzt, der im konstanten Bereich

der Kette bindet. Die Reaktion wurde mit 1 µg RNA durchgeführt. War die RNA-Konzentration zu niedrig, so wurde das Maximum von 8,2 µl RNA eingesetzt.

10x Reaktionspuffer	2 µl	
MgCl ₂	4 µl	25 °C 10'
dNTPs	2 µl	42 °C 60'
CA1 Primer (10pmol/µl)	2 µl	99 °C 5'
RNase Inhibitor	1 µl	
AMV Reverse Transkriptase	<u>0,8 µl</u>	
	11,8 µl	
	1 µg RNA ad 8,2 µl H ₂ O (=20 µl)	

Alle anderen cDNA-Synthesen wurden mit dem SuperscriptII Kit von Invitrogen nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.2.11.3 PCR zur Analyse der TZR Ketten

Nachdem von den T-Zellklonen die RNA extrahiert und in cDNA umgeschrieben worden war, wurden PCRs durchgeführt. Da die variablen Sequenzen der TZR nicht bekannt waren, wurde entweder für jede mögliche variable Kette ein unterschiedlicher Primer verwendet oder degenerierte Primer eingesetzt, die in mehreren Ketten gleichzeitig binden können und so fast das gesamte Repertoire abdecken (Zhou et al., 2006). Alle PCRs wurden mit dem PCR Pure Taq Kit von GE durchgeführt, bei dem Polymerase, Puffer und Nukleotide als Lyophilisat vorliegen.

Deg. Alpha-PCR

cDNA (AMV)	3 µl
VPANHUM Primer (10 pmol/µl)	4 µl
CA2 Primer (10 pmol/µl)	4 µl
H ₂ O	<u>14 µl</u>
	25 µl

95 °C 10'	} 2x
95 °C 1'	
50 °C 2'	
72 °C 2'	
95 °C 1'	} 40x
55 °C 2'	
72 °C 2'	
72 °C 10'	

Deg. Beta-PCR

cDNA (SuperscriptII)	1,5 µl
VP1 oder VP2 Primer)(5 pmol/µl)	16 µl
CP1 Primer (5 pmol/µl)	1,6 µl
H ₂ O	<u>5,9 µl</u>
	25 µl

95 °C 2'	} 40x
95 °C 30''	
50 °C 30''	
72 °C 30''	
72 °C 10'	

Var. Primer alpha-PCR

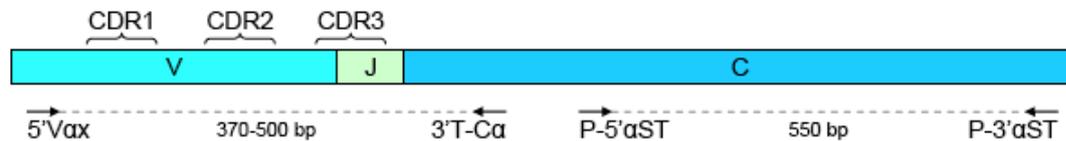
cDNA (SuperscriptII)	1 µl
5' Vα X Primer	6 µl
P5'αST Primer (2,5pmol/µl)	2,8 µl
P3'αST Primer (2,5pmol/µl)	2,8 µl
3'T-Cα Primer (5pmol/µl)	4 µl
H ₂ O	<u>8,4 µl</u>
	25 µl

Var. Primer beta-PCR

cDNA (SuperscriptII)	1 µl
5' Vβ X Primer	6 µl
P5'βST Primer (5pmol/µl)	4 µl
P3'βST Primer (5pmol/µl)	4 µl
P3'CβII Primer (5pmol/µl)	4 µl
H ₂ O	<u>6 µl</u>
	25 µl

95 °C 2'
 95 °C 30'' }
 56 °C 30'' } 38x
 72 °C 20'' }
 72 °C 10'

α-Kette



β-Kette

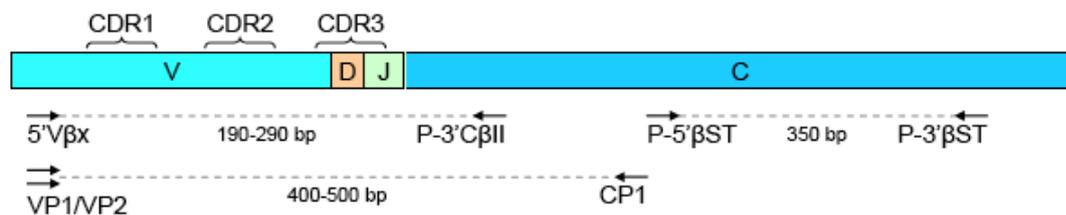


Abb. 4.2 Binderegionen der Primer zur Analyse der TZR-Ketten. V = variable, J = joining, D = diversity, C = constant (Schuster, 2008).

4.2.11.4 Quantitative PCR

Die PCR zur Quantifizierung von viraler DNA oder der Expression verschiedener Gene in der Leber wurde mit dem LightCycler 480 von Roche durchgeführt. Zur absoluten Quantifizierung der viralen DNA im Serum wurde ein Standard dem Überstand HBV-transfizierter Zellen verwendet. Dieser wurde mit dem Standard des diagnostischen Labors quantifiziert. Die HBV-PCR aus Lebergewebe wurde zum „single-copy“ Gen *Nid2* relativiert. Dieses Gen kommt diploid nur einmal pro Zelle vorher und diente somit als Referenz, aus wie vielen Zellen die DNA aufgereinigt worden war. mRNA-Bestimmungen wurden relativ zur mRNA von GAPDH gemessen. Als interner Kalibrator wurde eine Probe dreimal 1:2 verdünnt.

Sybr Green	7,5 µl
Primer sense	0,75 µl
Primer antisense	0,75 µl
Template	4 µl
H ₂ O	<u>2 µl</u>
	15 µl

Program Name	Cycles	Analysis Mode	Target (°C)	Acquisition Mode	Hold (hh:mm:ss)	Ramp Rate (°C/s)
Denaturation	1	None	95	None	00:05:00	4,4
Amplification	50	Quantification	95	None	00:00:25	4,4
			60	None	00:00:15	2,2
			72	Single	00:00:30	4,4
Melting Curve	1	MeltingCurves	95	None	00:00:01	4,4
			65	None	00:01:00	2,2
			95	Continuous Ac. per 5°C		0,11

4.2.11.5 Phenol/Chloroform Extraktion von DNA

Die genomische DNA aus Lebergewebe wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert. Ein etwa 7x7 mm großes Leberstück wurde in 1 ml Proteinase-K-Puffer mit dem Ultrathorax in einem 2ml Rundboden-Reaktionsgefäß zerkleinert. Die homogenisierte Leber wurde in ein 15 ml Gefäß überführt und mit weiteren 3 ml Puffer und 100 µl Proteinase K (50 mg/ml) ÜN bei 37 °C im Drehrad inkubiert. Dann wurden 5 µl RNase A (50 mg/ml) zugegeben und eine weitere Stunde verdaut. Danach wurde die Probe mit 4 ml Phenol gevortext und auf dem Drehrad bei RT für 5' gemischt. Die Phasen wurden bei RT und 3000 rpm für 5' getrennt. Der Überstand (wässrige Phase) wurde in ein neues Gefäß überführt, in welches vorher 2ml Phenol und 2ml Chloroform vorgelegt worden waren. Es wurde erneut gemischt und zentrifugiert und dann die obere Phase ebenso mit 4 ml Chloroform behandelt. Die wässrige Phase aus diesem Schritt wurde mit NaAc und EtOH gefällt und das DNA-Pellet in 500 µl dH₂O aufgenommen. Um die DNA gut zu lösen, wurde sie 10' bei 65 °C, ÜN bei 37 °C und 2 Tage bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurde die Konzentration auf 1 µg/µl eingestellt.

4.2.11.6 Gelelektrophorese und Gelextraktion

Agarosegele wurden, wenn nicht anders angegeben, mit TAE, 1 % Agarose und 0,4 mg/ml Ethidiumbromid gegossen. Für eine Extraktion der Banden wurden die Gele so kurz wie möglich UV-belichtet und die ausgeschnittenen Stücke nach Herstellerangaben mit Kits von Qiagen oder Peqlab aufgereinigt.

4.2.11.7 Sequenzierung

Sequenzierungen wurden bei GATC mit eigenen Primern (10 pmol/ μ l) durchgeführt. Die Konzentration des Plasmid-Templates betrug 30-100 ng/ μ l, die von PCR-Produkten 10-50 ng/ μ l. Die Fragmente aus der α - oder β -TZR Ketten PCR wurden sowohl mit den Primern aus den variablen als auch aus den konstanten Bereichen der entsprechenden Reaktion sequenziert. Die Ergebnisse wurden auf http://imgt.cines.fr/IMGT_vquest/vquest?livret=0&Option=humanTcR ausgewertet.

4.2.11.8 Klonierung der CAR-Konstrukte

Die CAR-Konstrukte wurden aus dem retroviralen Vektor pBULLET in pMP71 und pMSCV umkloniert. Dafür wurden zunächst über die Primer in der PCR neue Schnittstellen eingefügt.

pBULLET-CAR (5 ng/ μ l)	1 μ l	98 °C 30''	
KappaL_NotI Primer (100 pmol/ μ l)	1,5 μ l	98 °C 10''	} 8x
Sig_EcoRI Primer (100 pmol/ μ l)	1,5 μ l	65 °C 20''	
10x Puffer	5 μ l	72 °C 1'	
dNTPs	1 μ l	98 °C 10''	} 22x
Phusion Polymerase	0,5 μ l	72 °C 1'20''	
H ₂ O	<u>34,5 μl</u>	72 °C 8'	
	50 μ l		

Für die Klonierung in pMSCV wurde das Primerpaar KappaL_NotI und C8_hom2 verwendet. Die PCR-Produkte wurden mit einem Agarosegel auf die erwartete Länge überprüft und die gewünschten Banden ausgeschnitten und aufgereinigt. Es folgte der Restriktionsverdau von PCR-Inserts und den Ziel-Vektoren ÜN bei 37 °C.

pMP71-Vektor 4,2 μ g	23 μ l	Insert	20 μ l
NotI	2 μ l	NotI	1 μ l
EcoRI	2 μ l	EcoRI	1 μ l
10x Puffer Orange	<u>3 μl</u>	10x Puffer Orange	3 μ l
	30 μ l	H ₂ O	<u>5 μl</u>
			30 μ l
pMSCV_Her-2 4,8 μ g	21 μ l	Insert	20 μ l
NcoI	2 μ l	NcoI	1 μ l
BamHI	1 μ l	BglII	1 μ l
2x Puffer Tango	<u>6 μl</u>	2x Puffer Tango	<u>6 μl</u>
	30 μ l		30 μ l

Die Verdauungen wurden mit einem Kit von Qiagen aufgereinigt und nach Herstellerangaben mit einer T4 Ligase von Fermentas verknüpft. Dazu wurden mittels einer Berechnung auf http://molbiol.edu.ru/eng/scripts/01_07.html 100 ng Vektor und das Insert in 3facher Molarität bestimmt. 2,5 µl der Ligationsansätze wurden in 50 µl chemisch-kompetente Stbl3 Bakterien transformiert. Dieser Bakterienstamm soll laut Herstellerangaben die Gefahr der Rekombination von retroviralen Vektoren verhindern. Der Transformationsansatz wurde 30' auf Eis inkubiert, für 90'' bei 42 °C im Wasserbad einem Hitzeschock ausgesetzt und nach weiteren 2' auf Eis 1h mit 1ml SOC-Medium bei 37 °C geschüttelt. Die gesamten Bakterien wurden auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten ausplattiert. Am nächsten Morgen wurden Kolonien gepickt und nach Mini-Präparation nach Herstellerangaben mit einem Kit von Fermentas ein Kontrollverdau der Plasmid-DNA durchgeführt.

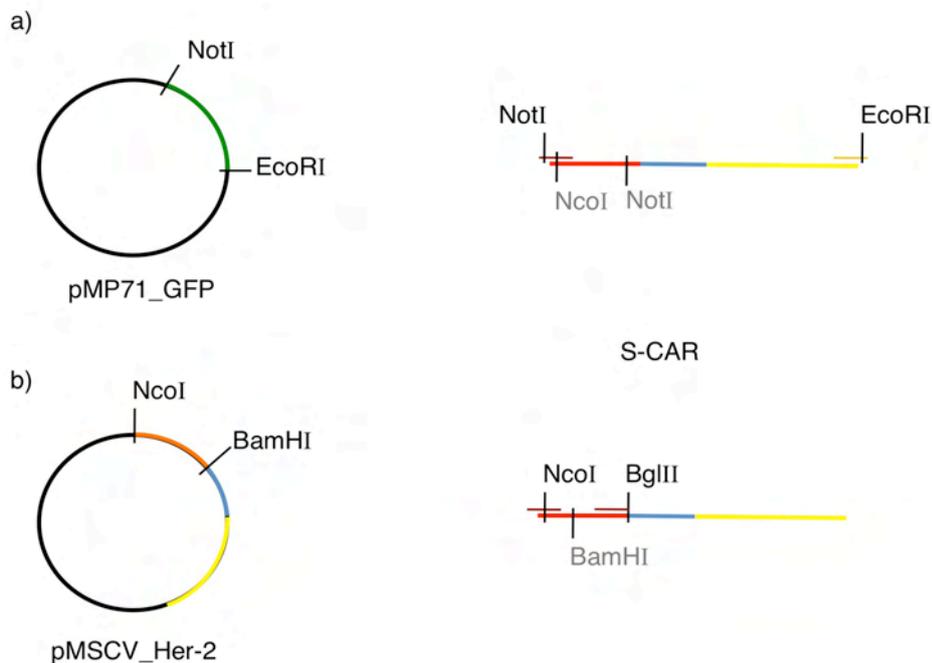


Abb. 4.2 Klonierungsschema. Grün = GFP, rot = ScFv gegen S, blau = hIgG, gelb = Signaldomänen, orange = ScFv gegen Her-2, dünnere Balken = Primer. a) Klonierung des S-CARs in den Vektor pMP71 über die Schnittstellen *Not* I und *Eco* R I. Da sich auch im ScFv C8 eine *Not* I-Schnittstelle befand, wurde in zwei Schritten kloniert. Erst inserierte nur der hintere, längere Teil des CARs. Der neu entstandene Vektor wurde nur mit *Not* I geschnitten und die spontane Religation durch eine alkalische Phosphatase verhindert. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls nur mit *Not* I verdaut und das kürzere Fragment aus einem Gel ausgeschnitten. Nach der Ligation wurde die Orientierung des vorderen *Not* I-*Not* I Fragments über die Position der *Nco* I-Schnittstelle überprüft. b) Klonierung des S-CARs in den Vektor pMSCV über die Schnittstellen *Nco* I und *Bam* H I bzw. *Bgl* II. Da sich im ScFv-Teil des S-CARs ebenfalls eine *Bam* H I-Schnittstelle befindet, wurde über einen Primer eine *Bgl* II-Schnittstelle eingefügt. *Bgl* II und *Bam* H I haben unterschiedliche Erkennungssequenzen, erzeugen aber beim Verdau identische überhängende Enden.

4.2.11.9 Southern Blot

Um die genomische DNA in einem Agarosegel auftrennen zu können, wurde sie zunächst ÜN bei 37°C verdaut und am nächsten Morgen aufgrund des hohen Reaktionsvolumens mit NaAc und EtOH gefällt. Es gibt keine *Hind* III-Schnittstelle im HBV-Genom.

Leber-DNA (1µg/µl)	75µl	Vor der Fällung wurden noch einmal weitere 5µl Enzym zugegeben und für 3h verdaut.
HindIII (50U/µl)	15µl	
10x HindIII Puffer	15µl	
H ₂ O	<u>45µl</u>	
	150µl	

Die Proben liefen ÜN bei 40V in einem 0,85%-igem Agarosegel mit 0,5x TBE-Puffer. Das Gel wurde bis zum Farbumschlag des Ladepuffers von blau zu gelb in 0,25 M HCl geschwenkt, dann mit H₂O gespült und 20-40' in Transferpuffer gelagert. Die DNA wurde ÜN auf eine Hybond N+ XL Membran geblottet und im Anschluss bei 80 °C für 2 h gebacken. Vor der Hybridisierung wurde die Membran mit 20 ml Church-Puffer mit 150 µl Lachs-Sperma (vorher 5' bei 99 °C aufgeköcht, 5' auf Eis) bei 65 °C für 1,5 h geblockt. Die HBV-Sonde (Plasmid pCH9, *Sal* I / *Nhe* I Fragment) wurde mit einem Kit von GE mit 50 µCi P32 dCTPs nach Herstellerangaben radioaktiv markiert. Über Gelfiltration wurde die Sonde von überschüssigen Nukleotiden befreit und ÜN zum Church-Puffer auf der Membran gegeben. Die Membran wurde danach bei 65 °C 5' mit Waschpuffer 1, 15' mit Waschpuffer 2 und 2 h mit Waschpuffer 3 gewaschen. Die Entwicklung erfolgte mit einem Film oder Phosphoscreen.

4.2.11.10 Protein-Detektion aus Zelllysaten

Die Zellen wurden trypsiniert und mit eiskaltem PBS für 5' bei 4 °C und 500 x g gewaschen. Dann wurden sie mit 550 µl Lysepuffer (z.B. pro Well einer 6-Well-Platte) für 10' auf Eis inkubiert und dann bei 17.000 x g für 30' bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und der Proteingehalt mit einem BCA-Assay quantifiziert. Die Proben wurden nach einem Standardprotokoll mit Probenpuffer versehen, 10' bei 99 °C gekocht und mit einem 12,5 %-igem SDS Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet (Rehm and Letzel, 2006). Die gewünschten Proteine wurden wie folgt detektiert: 1 h RT 5 % Milchpulver (MP), Primär-Antikörper in MP 4 °C ÜN, 3x waschen mit 0,05 % TBS-Tween, Sekundär-Antikörper in MP 1 h bei RT, 3x waschen, Detektion mit ECL.

4.2.12 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit Graph Pad Prism durchgeführt. In den Graphiken ist jeweils der Mittelwert +/- SEM angegeben. Das Signifikanz-Niveau wurde mit einem ungepaarten zweiseitigen T-Test ermittelt.

p-Wert: $> 0,05$ = nicht signifikant, $0,05-0,01$ = * signifikant, $0,01-0,001$ = ** sehr signifikant, $< 0,001$ = *** hoch signifikant.

5 Literaturverzeichnis

- Abel, M., Sene, D., Pol, S., Bourliere, M., Poynard, T., Charlotte, F., Cacoub, P., and Caillat-Zucman, S. (2006). Intrahepatic virus-specific IL-10-producing CD8 T cells prevent liver damage during chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 44, 1607-1616.
- Abken, H. (2009). Chimeric T Cell Receptors. In *Encyclopedia of Cancer* (Springer).
- Almasbak, H., Rian, E., Hoel, H.J., Pule, M., Walchli, S., Kvalheim, G., Gaudernack, G., and Rasmussen, A.M. (2011). Transiently redirected T cells for adoptive transfer. *Cytotherapy* 13, 629-640.
- Amicone, L., Galimi, M.A., Spagnoli, F.M., Tommasini, C., De Luca, V., and Tripodi, M. (1995). Temporal and tissue-specific expression of the MET ORF driven by the complete transcriptional unit of human A1AT gene in transgenic mice. *Gene* 162, 323-328.
- Amicone, L., Spagnoli, F.M., Spath, G., Giordano, S., Tommasini, C., Bernardini, S., De Luca, V., Della Rocca, C., Weiss, M.C., Comoglio, P.M., and Tripodi, M. (1997). Transgenic expression in the liver of truncated Met blocks apoptosis and permits immortalization of hepatocytes. *EMBO J* 16, 495-503.
- Andrade, F. (2010). Non-cytotoxic antiviral activities of granzymes in the context of the immune antiviral state. *Immunol Rev* 235, 128-146.
- Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., and Mak, T.W. (1995). Human T-cell receptor variable gene segment families. *Immunogenetics* 42, 455-500.
- Arens, R., and Schoenberger, S.P. (2010). Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol Rev* 235, 190-205.
- Bachmann, M.F., Wolint, P., Schwarz, K., Jager, P., and Oxenius, A. (2005). Functional properties and lineage relationship of CD8+ T cell subsets identified by expression of IL-7 receptor alpha and CD62L. *J Immunol* 175, 4686-4696.
- Backes, S. (2008). Vaccinia virus host range factor C7L plays an important regulatory role in the MVA life cycle. Dissertation *München*.
- Badovinac, V.P., Porter, B.B., and Harty, J.T. (2002). Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3, 619-626.
- Badovinac, V.P., Tvinnereim, A.R., and Harty, J.T. (2000). Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perforin and interferon-gamma. *Science* 290, 1354-1358.
- Beck, J., and Nassal, M. (2007). Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol* 13, 48-64.
- Becker, A.M., Blevins, J.S., Tomson, F.L., Eitson, J.L., Medeiros, J.J., Yarovinsky, F., Norgard, M.V., and van Oers, N.S. (2010). Invariant NKT cell development requires a full complement of functional CD3 zeta immunoreceptor tyrosine-based activation motifs. *J Immunol* 184, 6822-6832.
- Bendelac, A., Rivera, M.N., Park, S.H., and Roark, J.H. (1997). Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu Rev Immunol* 15, 535-562.
- Berger, C., Jensen, M.C., Lansdorp, P.M., Gough, M., Elliott, C., and Riddell, S.R. (2008). Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118, 294-305.
- Berger, C., Turtle, C.J., Jensen, M.C., and Riddell, S.R. (2009). Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific T cell immunity. *Curr Opin Immunol* 21, 224-232.

- Bertoletti, A., Chisari, F.V., Penna, A., Guilhot, S., Galati, L., Missale, G., Fowler, P., Schlicht, H.J., Vitiello, A., Chesnut, R.C., and et al. (1993). Definition of a minimal optimal cytotoxic T-cell epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid protein. *J Virol* 67, 2376-2380.
- Bertoletti, A., Costanzo, A., Chisari, F.V., Levrero, M., Artini, M., Sette, A., Penna, A., Giuberti, T., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1994). Cytotoxic T lymphocyte response to a wild type hepatitis B virus epitope in patients chronically infected by variant viruses carrying substitutions within the epitope. *J Exp Med* 180, 933-943.
- Bertoletti, A., and Gehring, A. (2007). Immune response and tolerance during chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology Res* 37 Suppl 3, S331-338.
- Bertoletti, A., Maini, M., and Williams, R. (2003). Role of hepatitis B virus specific cytotoxic T cells in liver damage and viral control. *Antiviral Res* 60, 61-66.
- Bertoletti, A., Southwood, S., Chesnut, R., Sette, A., Falco, M., Ferrara, G.B., Penna, A., Boni, C., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1997). Molecular features of the hepatitis B virus nucleocapsid T-cell epitope 18-27: interaction with HLA and T-cell receptor. *Hepatology* 26, 1027-1034.
- Bertoni, R., Sidney, J., Fowler, P., Chesnut, R.W., Chisari, F.V., and Sette, A. (1997). Human histocompatibility leukocyte antigen-binding supermotifs predict broadly cross-reactive cytotoxic T lymphocyte responses in patients with acute hepatitis. *J Clin Invest* 100, 503-513.
- Betts, M.R., Brenchley, J.M., Price, D.A., De Rosa, S.C., Douek, D.C., Roederer, M., and Koup, R.A. (2003). Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281, 65-78.
- Bissig, K.D., Wieland, S.F., Tran, P., Isogawa, M., Le, T.T., Chisari, F.V., and Verma, I.M. (2010). Human liver chimeric mice provide a model for hepatitis B and C virus infection and treatment. *J Clin Invest* 120, 924-930.
- Boettler, T., Panther, E., Bengsch, B., Nazarova, N., Spangenberg, H.C., Blum, H.E., and Thimme, R. (2006). Expression of the interleukin-7 receptor alpha chain (CD127) on virus-specific CD8+ T cells identifies functionally and phenotypically defined memory T cells during acute resolving hepatitis B virus infection. *J Virol* 80, 3532-3540.
- Bohne, F., Chmielewski, M., Ebert, G., Wiegmann, K., Kurschner, T., Schulze, A., Urban, S., Kronke, M., Abken, H., and Protzer, U. (2008). T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 134, 239-247.
- Bohne, F., and Protzer, U. (2007). Adoptive T-cell therapy as a therapeutic option for chronic hepatitis B. *J Viral Hepat* 14 Suppl 1, 45-50.
- Boni, C., Fisicaro, P., Valdatta, C., Amadei, B., Di Vincenzo, P., Giuberti, T., Laccabue, D., Zerbini, A., Cavalli, A., Missale, G., et al. (2007). Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 81, 4215-4225.
- Bowden, S., and Locarnini, S. (2006). Molecular Diagnostics in Hepatitis B. In *Principles of molecular medicine* (Humana Press).
- Boyman, O., Purton, J.F., Surh, C.D., and Sprent, J. (2007). Cytokines and T-cell homeostasis. *Curr Opin Immunol* 19, 320-326.
- Brenner, M. (2010). T cell receptors and cancer: gain gives pain. *Nat Med* 16, 520-521.
- Brooks, A.R., Harkins, R.N., Wang, P., Qian, H.S., Liu, P., and Rubanyi, G.M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6, 395-404.
- Brooks, D.G., Trifilo, M.J., Edelmann, K.H., Teyton, L., McGavern, D.B., and Oldstone, M.B. (2006). Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. *Nat Med* 12, 1301-1309.
- Bruss, V. (2007). Hepatitis B virus morphogenesis. *World J Gastroenterol* 13, 65-73.

Bruss, V., Hagelstein, J., Gerhardt, E., and Galle, P.R. (1996). Myristylation of the large surface protein is required for hepatitis B virus in vitro infectivity. *Virology* 218, 396-399.

Bünig, H., Uckert, W., Cichutek, K., Hawkins, R.E., and Abken, H. (2010). Do CARs need a driver's license? Adoptive cell therapy with chimeric antigen receptor-redirected T cells has caused serious adverse events. *Hum Gene Ther* 21, 1039-1042.

Callendret, B., and Walker, C. (2011). A siege of hepatitis: immune boost for viral hepatitis. *Nat Med* 17, 252-253.

Carman, W.F., Zanetti, A.R., Karayiannis, P., Waters, J., Manzillo, G., Tanzi, E., Zuckerman, A.J., and Thomas, H.C. (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336, 325-329.

Carreno, V., Zeuzem, S., Hopf, U., Marcellin, P., Cooksley, W.G., Fevery, J., Diago, M., Reddy, R., Peters, M., Rittweger, K., *et al.* (2000). A phase I/II study of recombinant human interleukin-12 in patients with chronic hepatitis B. *J Hepatol* 32, 317-324.

Casciola-Rosen, L., Garcia-Calvo, M., Bull, H.G., Becker, J.W., Hines, T., Thornberry, N.A., and Rosen, A. (2007). Mouse and human granzyme B have distinct tetrapeptide specificities and abilities to recruit the bid pathway. *J Biol Chem* 282, 4545-4552.

Cattaneo, R., Will, H., and Schaller, H. (1984). Hepatitis B virus transcription in the infected liver. *EMBO J* 3, 2191-2196.

Cavanaugh, V.J., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (1997). Interleukin-12 inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* 71, 3236-3243.

Chan, T.M. (2010). Hepatitis B and Renal Disease. *Curr Hepat Rep* 9, 99-105.

Chang, J., Cho, J.H., Lee, S.W., Choi, S.Y., Ha, S.J., and Sung, Y.C. (2004). IL-12 priming during in vitro antigenic stimulation changes properties of CD8 T cells and increases generation of effector and memory cells. *J Immunol* 172, 2818-2826.

Chen, M.T., Billaud, J.N., Sallberg, M., Guidotti, L.G., Chisari, F.V., Jones, J., Hughes, J., and Milich, D.R. (2004). A function of the hepatitis B virus precore protein is to regulate the immune response to the core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 14913-14918.

Chmielewski, M. (2007). Antigen-spezifische T-Zellaktivierung durch rekombinante Immunrezeptoren: Evaluierung in einem immunkompetenten Maus-Modell. *Dissertation Köln*.

Clements, C.J., Coghlan, B., Creati, M., Locarnini, S., Tedder, R.S., and Torresi, J. (2010). Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization?, Vol 88, 66-73 edn (WHO).

Coates, T., Wilson, R., Patrick, G., Andre, F., and Watson, V. (2001). Hepatitis B vaccines: assessment of the seroprotective efficacy of two recombinant DNA vaccines. *Clin Ther* 23, 392-403.

Cohen, C.J., Li, Y.F., El-Gamil, M., Robbins, P.F., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2007). Enhanced antitumor activity of T cells engineered to express T-cell receptors with a second disulfide bond. *Cancer Res* 67, 3898-3903.

Cohen, C.J., Zhao, Y., Zheng, Z., Rosenberg, S.A., and Morgan, R.A. (2006). Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid T-cell receptor (TCR) in human lymphocytes is associated with improved pairing and TCR/CD3 stability. *Cancer Res* 66, 8878-8886.

Cornberg, M., Protzer, U., Dollinger, M.M., Petersen, J., Wedemeyer, H., Berg, T., Jilg, W., Erhardt, A., Wirth, S., Schirmacher, P., *et al.* (2007). [Prophylaxis, Diagnosis and Therapy of Hepatitis-B-Virus-(HBV-)Infection: upgrade of the guideline, AWMF-Register 021/011]. *Z Gastroenterol* 45, 525-574.

Cote, P.J., Korba, B.E., Miller, R.H., Jacob, J.R., Baldwin, B.H., Hornbuckle, W.E., Purcell, R.H., Tennant, B.C., and Gerin, J.L. (2000). Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 31, 190-200.

- Cullen, S.P., Adrain, C., Luthi, A.U., Duriez, P.J., and Martin, S.J. (2007). Human and murine granzyme B exhibit divergent substrate preferences. *J Cell Biol* 176, 435-444.
- Curtsinger, J.M., and Mescher, M.F. (2010). Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr Opin Immunol* 22, 333-340.
- Dandri, M., Burda, M.R., Torok, E., Pollok, J.M., Iwanska, A., Sommer, G., Rogiers, X., Rogler, C.E., Gupta, S., Will, H., *et al.* (2001). Repopulation of mouse liver with human hepatocytes and in vivo infection with hepatitis B virus. *Hepatology* 33, 981-988.
- Dandri, M., Burda, M.R., Will, H., and Petersen, J. (2000). Increased hepatocyte turnover and inhibition of woodchuck hepatitis B virus replication by adefovir in vitro do not lead to reduction of the closed circular DNA. *Hepatology* 32, 139-146.
- Dandri, M., Murray, J.M., Lutgehetmann, M., Volz, T., Lohse, A.W., and Petersen, J. (2008). Virion half-life in chronic hepatitis B infection is strongly correlated with levels of viremia. *Hepatology* 48, 1079-1086.
- Dane, D.S., Cameron, C.H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1, 695-698.
- Del Vecchio, M., Bajetta, E., Canova, S., Lotze, M.T., Wesa, A., Parmiani, G., and Anichini, A. (2007). Interleukin-12: biological properties and clinical application. *Clin Cancer Res* 13, 4677-4685.
- Derby, M., Alexander-Miller, M., Tse, R., and Berzofsky, J. (2001). High-avidity CTL exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity CTL. *J Immunol* 166, 1690-1697.
- Desmond, C.P., Bartholomeusz, A., Gaudieri, S., Revill, P.A., and Lewin, S.R. (2008). A systematic review of T-cell epitopes in hepatitis B virus: identification, genotypic variation and relevance to antiviral therapeutics. *Antivir Ther* 13, 161-175.
- Domm, S., Cinatl, J., and Mrowietz, U. (2008). The impact of treatment with tumour necrosis factor-alpha antagonists on the course of chronic viral infections: a review of the literature. *Br J Dermatol* 159, 1217-1228.
- Dou, H.Y., Wu, J.C., Peng, W.L., Chang, C., Chi, W.K., Chu, Y.D., and Hu, C.P. (1998). Analysis of T cell receptor Vbeta gene usage during the course of disease in patients with chronic hepatitis B. *J Biomed Sci* 5, 428-434.
- Dunn, C., Brunetto, M., Reynolds, G., Christophides, T., Kennedy, P.T., Lampertico, P., Das, A., Lopes, A.R., Borrow, P., Williams, K., *et al.* (2007). Cytokines induced during chronic hepatitis B virus infection promote a pathway for NK cell-mediated liver damage. *J Exp Med* 204, 667-680.
- Dunn, C., Peppas, D., Khanna, P., Nebbia, G., Jones, M., Brendish, N., Lascar, R.M., Brown, D., Gilson, R.J., Tedder, R.J., *et al.* (2009). Temporal analysis of early immune responses in patients with acute hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* 137, 1289-1300.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Löffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H.G., Kanz, L., *et al.* (2002). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-3922.
- Engels, B., Cam, H., Schuler, T., Indraccolo, S., Gladow, M., Baum, C., Blankenstein, T., and Uckert, W. (2003). Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Hum Gene Ther* 14, 1155-1168.
- Erhardt, A., Biburger, M., Papadopoulos, T., and Tiegs, G. (2007). IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. *Hepatology* 45, 475-485.
- Fattovich, G. (2003). Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 23, 47-58.
- Fisicaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., Cavallo, M.C., Silini, E.M., Andreone, P., Missale, G., and Ferrari, C. (2010). Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 138, 682-693, 693 e681-684.

Flepp, M. (2009). Chronische Hepatitis B: Behandlungsmöglichkeiten 2010. <http://www.hiv.ch/rubriken/hep/HepBRx.pdf>.

Franzese, O., Kennedy, P.T., Gehring, A.J., Gotto, J., Williams, R., Maini, M.K., and Bertolotti, A. (2005). Modulation of the CD8⁺-T-cell response by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 79, 3322-3328.

Freitag, H., Gress, G., Messer, K., Sivaz, G., Weinbender, O., Zündorf, I., and Dingermann, F. (2009). Bitte ein BiTE! Pharmazie in unserer Zeit 38.

Galle, P.R., Hagelstein, J., Kommerell, B., Volkmann, M., Schranz, P., and Zentgraf, H. (1994). In vitro experimental infection of primary human hepatocytes with hepatitis B virus. *Gastroenterology* 106, 664-673.

Ganem, D., and Schneider, R. (2001). Hepadnaviridae - Their viruses and their replication (Lipincott-Raven).

Ganusov, V.V. (2007). Discriminating between different pathways of memory CD8⁺ T cell differentiation. *J Immunol* 179, 5006-5013.

Gehring, A.J., Sun, D., Kennedy, P.T., Nolte-'t Hoen, E., Lim, S.G., Wasser, S., Selden, C., Maini, M.K., Davis, D.M., Nassal, M., and Bertolotti, A. (2007). The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 81, 2940-2949.

Gehring, A.J., Xue, S.A., Ho, Z.Z., Teoh, D., Ruedl, C., Chia, A., Koh, S., Lim, S.G., Maini, M.K., Stauss, H., and Bertolotti, A. (2010). Engineering virus-specific T cells that target HBV infected hepatocytes and hepatocellular carcinoma cell lines. *J Hepatol*.

Gerlich, W.H., and Glebe, D. (2010). Hepatitis B-Impfung: altbewährt, doch nicht perfekt. *Hepatitis&more*, 30-36.

Gerlich, W.H., and Kann, M. (2005). Hepatitis B. In Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections: Virology (Hodder Arnold, London).

Gilbert, R.J., Beales, L., Blond, D., Simon, M.N., Lin, B.Y., Chisari, F.V., Stuart, D.I., and Rowlands, D.J. (2005). Hepatitis B small surface antigen particles are octahedral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14783-14788.

Gorelik, E., Edwards, R.P., Feng, X., Marrangoni, A.M., Grandis, J.R., Drenning, S.D., Velikokhatnaya, L., Kwon, J.A., and Lokshin, A.E. (2004). IL-12 receptor-mediated upregulation of FasL in human ovarian carcinoma cells. *Int J Cancer* 112, 620-627.

Gripon, P., Diot, C., Theze, N., Fourel, I., Loreal, O., Brechot, C., and Guguen-Guillouzo, C. (1988). Hepatitis B virus infection of adult human hepatocytes cultured in the presence of dimethyl sulfoxide. *J Virol* 62, 4136-4143.

Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C., and Guguen-Guillouzo, C. (2002). Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15655-15660.

Gückel, E. (2005). Expression und Charakterisierung von single-chain Antikörpern gegen das S-Oberflächenprotein des Hepatitis B Virus. Diplomarbeit *Heidelberg*.

Guidotti, L.G. (2002). The role of cytotoxic T cells and cytokines in the control of hepatitis B virus infection. *Vaccine* 20 Suppl 4, A80-82.

Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2001). Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol* 19, 65-91.

Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol* 1, 23-61.

Guidotti, L.G., Ishikawa, T., Hobbs, M.V., Matzke, B., Schreiber, R., and Chisari, F.V. (1996). Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 4, 25-36.

- Guidotti, L.G., Matzke, B., Schaller, H., and Chisari, F.V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J Virol* *69*, 6158-6169.
- Guidotti, L.G., McClary, H., Loudis, J.M., and Chisari, F.V. (2000). Nitric oxide inhibits hepatitis B virus replication in the livers of transgenic mice. *J Exp Med* *191*, 1247-1252.
- Guidotti, L.G., Rochford, R., Chung, J., Shapiro, M., Purcell, R., and Chisari, F.V. (1999). Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* *284*, 825-829.
- Gust, I.D., Burrell, C.J., Coulepis, A.G., Robinson, W.S., and Zuckerman, A.J. (1986). Taxonomic classification of human hepatitis B virus. *Intervirology* *25*, 14-29.
- Harari, A., Dutoit, V., Cellerai, C., Bart, P.A., Du Pasquier, R.A., and Pantaleo, G. (2006). Functional signatures of protective antiviral T-cell immunity in human virus infections. *Immunol Rev* *211*, 236-254.
- Hawley, R.G., Lieu, F.H., Fong, A.Z., Goldman, S.J., Leonard, J.P., and Hawley, T.S. (1996). Retroviral vectors for production of interleukin-12 in the bone marrow to induce a graft-versus-leukemia effect. *Ann N Y Acad Sci* *795*, 341-345.
- Heise, T., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (1999). La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA. *J Virol* *73*, 5767-5776.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., Heath, W.R., Howard, J.L., Bevan, M.J., and Carbone, F.R. (1994). T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell* *76*, 17-27.
- Hohler, T., Kruger, A., Gerken, G., Schneider, P.M., Meyer zum Buschenefelde, K.H., and Rittner, C. (1998). A tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promoter polymorphism is associated with chronic hepatitis B infection. *Clin Exp Immunol* *111*, 579-582.
- Hohn, G. (2007). Chimäre T-Zellrezeptoren gegen Hepatitis B Hüllproteine: Therapeutische Anwendung in vivo. Diplomarbeit Köln.
- Hohn, H., Neukirch, C., Freitag, K., Necker, A., Hitzler, W., Seliger, B., and Maeurer, M.J. (2002). Longitudinal analysis of the T-cell receptor (TCR)-VA and -VB repertoire in CD8+ T cells from individuals immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *Clin Exp Immunol* *129*, 309-317.
- Holz, L.E., Warren, A., Le Couteur, D.G., Bowen, D.G., and Bertolino, P. (2010). CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes. *J Autoimmun* *34*, 15-22.
- Hombach, A., Hombach, A.A., and Abken, H. (2010). Adoptive immunotherapy with genetically engineered T cells: modification of the IgG1 Fc 'spacer' domain in the extracellular moiety of chimeric antigen receptors avoids 'off-target' activation and unintended initiation of an innate immune response. *Gene Ther* *17*, 1206-1213.
- Hosel, M., Quasdorff, M., Wiegmann, K., Webb, D., Zedler, U., Broxtermann, M., Tedjokusumo, R., Esser, K., Arzberger, S., Kirschning, C.J., *et al.* (2009). Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* *50*, 1773-1782.
- Hoshino, Y., Morishima, T., Kimura, H., Nishikawa, K., Tsurumi, T., and Kuzushima, K. (1999). Antigen-driven expansion and contraction of CD8+-activated T cells in primary EBV infection. *J Immunol* *163*, 5735-5740.
- Hourioux, C., Kneser, J., and Bruss, V. (2002). In vitro expression of human hepatitis B virus genomes carrying woodchuck hepatitis virus pre-S1 sequences. *Intervirology* *45*, 233-236.
- Huang, J., and Liang, T.J. (1993). A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol Cell Biol* *13*, 7476-7486.
- Hyodo, N., Tajimi, M., Ugajin, T., Nakamura, I., and Imawari, M. (2003). Frequencies of interferon-gamma and interleukin-10 secreting cells in peripheral blood mononuclear cells and liver infiltrating lymphocytes in chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* *37*, 109-116.

Ikeda, K., Saitoh, S., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Tsubota, A., Koida, I., Arase, Y., Fukuda, M., Chayama, K., Murashima, N., and Kumada, H. (1998). Disease progression and hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic viral hepatitis: a prospective observation of 2215 patients. *J Hepatol* 28, 930-938.

Isogawa, M., Furuichi, Y., and Chisari, F.V. (2005). Oscillating CD8(+) T cell effector functions after antigen recognition in the liver. *Immunity* 23, 53-63.

Janeway, Travers, Walport, and Shlomchik (2005). *Immunobiology*, 6 edn (Garland Science Publishing).

Jena, B., Dotti, G., and Cooper, L.J. (2010). Redirecting T-cell specificity by introducing a tumor-specific chimeric antigen receptor. *Blood* 116, 1035-1044.

JHSPH (2011). "Geographic distribution of chronic HBV infections" und "Geographic distribution of hepatitis B virus genotypes" from *Epidemiology of Infectious Diseases*. . (<http://ocw.jhsph.edu>, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health. Creative Commons BY-NC-SA. Adapted by CTLT from CDC.).

Jost, S., Turelli, P., Mangeat, B., Protzer, U., and Trono, D. (2007). Induction of antiviral cytidine deaminases does not explain the inhibition of hepatitis B virus replication by interferons. *J Virol* 81, 10588-10596.

June, C.H. (2007). Adoptive T cell therapy for cancer in the clinic. *J Clin Invest* 117, 1466-1476.

Kafrouni, M.I., Brown, G.R., and Thiele, D.L. (2001). Virally infected hepatocytes are resistant to perforin-dependent CTL effector mechanisms. *J Immunol* 167, 1566-1574.

Kaiserman, D., Bird, C.H., Sun, J., Matthews, A., Ung, K., Whisstock, J.C., Thompson, P.E., Trapani, J.A., and Bird, P.I. (2006). The major human and mouse granzymes are structurally and functionally divergent. *J Cell Biol* 175, 619-630.

Kakimi, K., Isogawa, M., Chung, J., Sette, A., and Chisari, F.V. (2002). Immunogenicity and tolerogenicity of hepatitis B virus structural and nonstructural proteins: implications for immunotherapy of persistent viral infections. *J Virol* 76, 8609-8620.

Kakimi, K., Lane, T.E., Wieland, S., Asensio, V.C., Campbell, I.L., Chisari, F.V., and Guidotti, L.G. (2001). Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 194, 1755-1766.

Kamanaka, M., Kim, S.T., Wan, Y.Y., Sutterwala, F.S., Lara-Tejero, M., Galan, J.E., Harhaj, E., and Flavell, R.A. (2006). Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 25, 941-952.

Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., and Helenius, A. (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J Cell Biol* 145, 45-55.

Kastenmuller, W., Gasteiger, G., Stross, L., Busch, D.H., and Drexler, I. (2009). Cutting edge: mucosal application of a lyophilized viral vector vaccine confers systemic and protective immunity toward intracellular pathogens. *J Immunol* 182, 2573-2577.

Kennedy, P.T., Gehring, A.J., Nowbath, A., Selden, C., Quaglia, A., Dhillon, A., Dusheiko, G., and Bertolotti, A. (2008). The expression and function of NKG2D molecule on intrahepatic CD8+ T cells in chronic viral hepatitis. *J Viral Hepat* 15, 901-909.

Kimura, K., Kakimi, K., Wieland, S., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2002). Activated intrahepatic antigen-presenting cells inhibit hepatitis B virus replication in the liver of transgenic mice. *J Immunol* 169, 5188-5195.

Knabel, M., Franz, T.J., Schiemann, M., Wulf, A., Villmow, B., Schmidt, B., Bernhard, H., Wagner, H., and Busch, D.H. (2002). Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med* 8, 631-637.

- Knolle, P.A., Loser, E., Protzer, U., Duchmann, R., Schmitt, E., zum Buschenfelde, K.H., Rose-John, S., and Gerken, G. (1997). Regulation of endotoxin-induced IL-6 production in liver sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells by IL-10. *Clin Exp Immunol* *107*, 555-561.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R.M., Clark, S.C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., and Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* *170*, 827-845.
- Kock, J., Borst, E.M., and Schlicht, H.J. (1996). Uptake of duck hepatitis B virus into hepatocytes occurs by endocytosis but does not require passage of the virus through an acidic intracellular compartment. *J Virol* *70*, 5827-5831.
- Kohn, D.B., Dotti, G., Brentjens, R., Savoldo, B., Jensen, M., Cooper, L.J., June, C.H., Rosenberg, S., Sadelain, M., and Heslop, H.E. (2011). CARs on track in the clinic. *Mol Ther* *19*, 432-438.
- Komuro, K., Itakura, K., Boyse, E.A., and John, M. (1975). Ly-5: A New T-Lymphocyte Antigen System. *Immunogenetics* *1*, 452-456.
- Kowolik, C.M., Topp, M.S., Gonzalez, S., Pfeiffer, T., Olivares, S., Gonzalez, N., Smith, D.D., Forman, S.J., Jensen, M.C., and Cooper, L.J. (2006). CD28 costimulation provided through a CD19-specific chimeric antigen receptor enhances in vivo persistence and antitumor efficacy of adoptively transferred T cells. *Cancer Res* *66*, 10995-11004.
- Kraß, P. (2006). Bindung und Synthese von Hepatitis B-Virus surface Antigen durch primäre Tupaiahepatozyten. Dissertation *Gießen*.
- Kronig, H., Hofer, K., Conrad, H., Guillaume, P., Muller, J., Schiemann, M., Lennerz, V., Cosma, A., Peschel, C., Busch, D.H., *et al.* (2009). Allorestricted T lymphocytes with a high avidity T-cell receptor towards NY-ESO-1 have potent anti-tumor activity. *Int J Cancer* *125*, 649-655.
- Kuball, J., Dossett, M.L., Wolfl, M., Ho, W.Y., Voss, R.H., Fowler, C., and Greenberg, P.D. (2007). Facilitating matched pairing and expression of TCR chains introduced into human T cells. *Blood* *109*, 2331-2338.
- Kürschner, T. (2000). Konstruktion und Screening von Antikörperbibliotheken gegen Oberflächenantigene. Dissertation *Heidelberg*.
- Kwon, H., and Lok, A.S. (2011). Hepatitis B therapy. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*.
- Lamers, C.H., Willemsen, R., van Elzakker, P., van Steenberghe-Langeveld, S., Broertjes, M., Oosterwijk-Wakka, J., Oosterwijk, E., Sleijfer, S., Debets, R., and Gratama, J.W. (2011). Immune responses to transgene and retroviral vector in patients treated with ex vivo-engineered T cells. *Blood* *117*, 72-82.
- Lanford, R.E., Chavez, D., Brasky, K.M., Burns, R.B., 3rd, and Rico-Hesse, R. (1998). Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 5757-5761.
- Lau, G.K., Piratvisuth, T., Luo, K.X., Marcellin, P., Thongsawat, S., Cooksley, G., Gane, E., Fried, M.W., Chow, W.C., Paik, S.W., *et al.* (2005). Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* *352*, 2682-2695.
- Lavanchy, D. (2005). Worldwide epidemiology of HBV infection, disease burden, and vaccine prevention. *J Clin Virol* *34 Suppl 1*, S1-3.
- Le Seyec, J., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., and Gripon, P. (1999). Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol* *73*, 2052-2057.
- Lee, J.B., Lee, K.A., and Chang, J. (2007). Phenotypic changes induced by IL-12 priming regulate effector and memory CD8 T cell differentiation. *Int Immunol* *19*, 1039-1048.
- Lee, S.W., Park, Y., Yoo, J.K., Choi, S.Y., and Sung, Y.C. (2003). Inhibition of TCR-induced CD8 T cell death by IL-12: regulation of Fas ligand and cellular FLIP expression and caspase activation by IL-12. *J Immunol* *170*, 2456-2460.

- Leisegang, M., Engels, B., Meyerhuber, P., Kieback, E., Sommermeyer, D., Xue, S.A., Reuss, S., Stauss, H., and Uckert, W. (2008). Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. *J Mol Med* *86*, 573-583.
- Li, J., Lin, S., Chen, Q., Peng, L., Zhai, J., Liu, Y., and Yuan, Z. (2010). Inhibition of hepatitis B virus replication by MyD88 involves accelerated degradation of pregenomic RNA and nuclear retention of pre-S/S RNAs. *J Virol* *84*, 6387-6399.
- Liu, M.L., Winther, B.L., and Kay, M.A. (1996). Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J Virol* *70*, 2497-2502.
- Livingston, B.D., Alexander, J., Crimi, C., Oseroff, C., Celis, E., Daly, K., Guidotti, L.G., Chisari, F.V., Fikes, J., Chesnut, R.W., and Sette, A. (1999). Altered helper T lymphocyte function associated with chronic hepatitis B virus infection and its role in response to therapeutic vaccination in humans. *J Immunol* *162*, 3088-3095.
- Loirat, D., Mancini-Bourguine, M., Abastado, J.P., and Michel, M.L. (2003). HBsAg/HLA-A2 transgenic mice: a model for T cell tolerance to hepatitis B surface antigen in chronic hepatitis B virus infection. *Int Immunol* *15*, 1125-1136.
- Lopes, A.R., Kellam, P., Das, A., Dunn, C., Kwan, A., Turner, J., Peppas, D., Gilson, R.J., Gehring, A., Bertolotti, A., and Maini, M.K. (2008). Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection. *J Clin Invest* *118*, 1835-1845.
- Louis, H., Le Moine, O., Peny, M.O., Gulbis, B., Nisol, F., Goldman, M., and Deviere, J. (1997a). Hepatoprotective role of interleukin 10 in galactosamine/lipopolysaccharide mouse liver injury. *Gastroenterology* *112*, 935-942.
- Louis, H., Le Moine, O., Peny, M.O., Quertinmont, E., Fokan, D., Goldman, M., and Deviere, J. (1997b). Production and role of interleukin-10 in concanavalin A-induced hepatitis in mice. *Hepatology* *25*, 1382-1389.
- Lucifora und Arzberger, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., and Protzer, U. (2011). Hepatitis B Virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol*.
- MacDonald, D.M., Holmes, E.C., Lewis, J.C., and Simmonds, P. (2000). Detection of hepatitis B virus infection in wild-born chimpanzees (*Pan troglodytes verus*): phylogenetic relationships with human and other primate genotypes. *J Virol* *74*, 4253-4257.
- Madalinski, K., Burczynska, B., Heermann, K.H., Uy, A., and Gerlich, W.H. (1991). Analysis of viral proteins in circulating immune complexes from chronic carriers of hepatitis B virus. *Clin Exp Immunol* *84*, 493-500.
- Maher, J., Brentjens, R.J., Gunset, G., Riviere, I., and Sadelain, M. (2002). Human T-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric TCRzeta /CD28 receptor. *Nat Biotechnol* *20*, 70-75.
- Maier, H., Isogawa, M., Freeman, G.J., and Chisari, F.V. (2007). PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* *178*, 2714-2720.
- Maini, M.K., Boni, C., Lee, C.K., Larrubia, J.R., Reignat, S., Ogg, G.S., King, A.S., Herberg, J., Gilson, R., Alisa, A., *et al.* (2000). The role of virus-specific CD8(+) cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis B virus infection. *J Exp Med* *191*, 1269-1280.
- Maini, M.K., Boni, C., Ogg, G.S., King, A.S., Reignat, S., Lee, C.K., Larrubia, J.R., Webster, G.J., McMichael, A.J., Ferrari, C., *et al.* (1999). Direct ex vivo analysis of hepatitis B virus-specific CD8(+) T cells associated with the control of infection. *Gastroenterology* *117*, 1386-1396.
- Maru, Y., Yokosuka, O., Imazeki, F., Saisho, H., and Omata, M. (2003). Analysis of T cell receptor variable regions and complementarity determining region 3 of infiltrating T lymphocytes in the liver of patients with chronic type B hepatitis. *Intervirology* *46*, 277-288.
- Mason, W.S., Litwin, S., Xu, C., and Jilbert, A.R. (2007). Hepatocyte turnover in transient and chronic hepatitis B virus infections. *J Viral Hepat* *14 Suppl 1*, 22-28.

- Mason, W.S., Seal, G., and Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J Virol* *36*, 829-836.
- McAleer, W.J., Buynak, E.B., Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J., and Hilleman, M.R. (1984). Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. *Nature* *307*, 178-180.
- Meyaard, L., Hovenkamp, E., Otto, S.A., and Miedema, F. (1996). IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J Immunol* *156*, 2776-2782.
- Michel, M.L., Deng, Q., and Mancini-Bourguine, M. (2011). Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: Perspectives and challenges. *J Hepatol* *54*, 1286-1296.
- Milich, D., and Liang, T.J. (2003). Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* *38*, 1075-1086.
- modifiziert nach: Glebe, D., and Urban, S. (2007). Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* *13*, 22-38.
- modifiziert nach: Janeway, C.A., Travers, Walport, and Shlomchik (2005). *Immunobiology*, 6 edn (Garland Science Publishing).
- modifiziert nach: Varela-Rohena, A., Carpenito, C., Perez, E.E., Richardson, M., Parry, R.V., Milone, M., Scholler, J., Hao, X., Mexas, A., Carroll, R.G., *et al.* (2008). Genetic engineering of T cells for adoptive immunotherapy. *Immunol Res* *42*, 166-181.
- Moeller, M., Haynes, N.M., Kershaw, M.H., Jackson, J.T., Teng, M.W., Street, S.E., Cerutti, L., Jane, S.M., Trapani, J.A., Smyth, M.J., and Darcy, P.K. (2005). Adoptive transfer of gene-engineered CD4+ helper T cells induces potent primary and secondary tumor rejection. *Blood* *106*, 2995-3003.
- Moraleda, G., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Averett, D., Condreay, L., and Mason, W.S. (1997). Lack of effect of antiviral therapy in nondividing hepatocyte cultures on the closed circular DNA of woodchuck hepatitis virus. *J Virol* *71*, 9392-9399.
- Morgan, R.A., Dudley, M.E., Wunderlich, J.R., Hughes, M.S., Yang, J.C., Sherry, R.M., Royal, R.E., Topalian, S.L., Kammula, U.S., Restifo, N.P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* *314*, 126-129.
- Morita, S., Kojima, T., and Kitamura, T. (2000). Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther* *7*, 1063-1066.
- Mosser, D.M., and Zhang, X. (2008). Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev* *226*, 205-218.
- Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Suresh, M., Sourdive, D.J., Zajac, A.J., Miller, J.D., Slansky, J., and Ahmed, R. (1998). Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* *8*, 177-187.
- Nayersina, R., Fowler, P., Guilhot, S., Missale, G., Cerny, A., Schlicht, H.J., Vitiello, A., Chesnut, R., Person, J.L., Redeker, A.G., and Chisari, F.V. (1993). HLA A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* *150*, 4659-4671.
- Nowak, M.A., Bonhoeffer, S., Hill, A.M., Boehme, R., Thomas, H.C., and McDade, H. (1996). Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 4398-4402.
- Ozawa, T., Tajiri, K., Kishi, H., and Muraguchi, A. (2008). Comprehensive analysis of the functional TCR repertoire at the single-cell level. *Biochem Biophys Res Commun* *367*, 820-825.
- Palmer, E.M., Farrokh-Siar, L., Maguire van Seventer, J., and van Seventer, G.A. (2001). IL-12 decreases activation-induced cell death in human naive Th cells costimulated by intercellular adhesion molecule-1. I. IL-12 alters caspase processing and inhibits enzyme function. *J Immunol* *167*, 749-758.

- Pascolo, S., Bervas, N., Ure, J.M., Smith, A.G., Lemonnier, F.A., and Perarnau, B. (1997). HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J Exp Med* *185*, 2043-2051.
- Pasquetto, V., Wieland, S.F., Uprichard, S.L., Tripodi, M., and Chisari, F.V. (2002). Cytokine-sensitive replication of hepatitis B virus in immortalized mouse hepatocyte cultures. *J Virol* *76*, 5646-5653.
- Pawlik, T.M., Schulick, R.D., and Choti, M.A. (2008). Expanding criteria for resectability of colorectal liver metastases. *Oncologist* *13*, 51-64.
- Peggs, K.S., Verfuether, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P.A., and Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* *362*, 1375-1377.
- Penna, A., Artini, M., Cavalli, A., Levrero, M., Bertolotti, A., Pilli, M., Chisari, F.V., Rehermann, B., Del Prete, G., Fiaccadori, F., and Ferrari, C. (1996). Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest* *98*, 1185-1194.
- Phillips, S., Chokshi, S., Riva, A., Evans, A., Williams, R., and Naoumov, N.V. (2010). CD8(+) T cell control of hepatitis B virus replication: direct comparison between cytolytic and noncytolytic functions. *J Immunol* *184*, 287-295.
- Pol, S., and Sogni, P. (2010). [Treatment of chronic hepatitis B: adherence and safety]. *Gastroenterol Clin Biol* *34 Suppl 2*, S142-148.
- Proto, S., Taylor, J.A., Chokshi, S., Navaratnam, N., and Naoumov, N.V. (2008). APOBEC and iNOS are not the main intracellular effectors of IFN-gamma-mediated inactivation of Hepatitis B virus replication. *Antiviral Res* *78*, 260-267.
- Protzer, U., and Abken, H. (2010). Can engineered "designer" T cells outsmart chronic hepatitis B? *Hepat Res Treat* *2010*, 901216.
- Protzer, U., Seyfried, S., Quasdorff, M., Sass, G., Svorcova, M., Webb, D., Bohne, F., Hosel, M., Schirmacher, P., and Tiegs, G. (2007). Antiviral activity and hepatoprotection by heme oxygenase-1 in hepatitis B virus infection. *Gastroenterology* *133*, 1156-1165.
- Pule, M.A., Savoldo, B., Myers, G.D., Rossig, C., Russell, H.V., Dotti, G., Huls, M.H., Liu, E., Gee, A.P., Mei, Z., *et al.* (2008). Virus-specific T cells engineered to coexpress tumor-specific receptors: persistence and antitumor activity in individuals with neuroblastoma. *Nat Med* *14*, 1264-1270.
- Quasdorff, M., Hosel, M., Odenthal, M., Zedler, U., Bohne, F., Gripon, P., Dienes, H.P., Drebber, U., Stippel, D., Goeser, T., and Protzer, U. (2008). A concerted action of HNF4alpha and HNF1alpha links hepatitis B virus replication to hepatocyte differentiation. *Cell Microbiol* *10*, 1478-1490.
- Rapoport, A.P., Aqui, N.A., Stadtmauer, E.A., Vogl, D.T., Fang, H.B., Cai, L., Janofsky, S., Chew, A., Storek, J., Akpek, G., *et al.* (2011). Combination immunotherapy using adoptive T-cell transfer and tumor antigen vaccination on the basis of hTERT and survivin after ASCT for myeloma. *Blood* *117*, 788-797.
- Raziorrouh, B., Schraut, W., Gerlach, T., Nowack, D., Gruner, N.H., Ulsenheimer, A., Zchoval, R., Wachtler, M., Spannagl, M., Haas, J., *et al.* (2010). The immunoregulatory role of CD244 in chronic hepatitis B infection and its inhibitory potential on virus-specific CD8+ T-cell function. *Hepatology* *52*, 1934-1947.
- Refaeli, Y., Van Parijs, L., Alexander, S.I., and Abbas, A.K. (2002). Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes. *J Exp Med* *196*, 999-1005.
- Rehermann, B., Ferrari, C., Pasquinelli, C., and Chisari, F.V. (1996a). The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* *2*, 1104-1108.

- Rehermann, B., Fowler, P., Sidney, J., Person, J., Redeker, A., Brown, M., Moss, B., Sette, A., and Chisari, F.V. (1995). The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* *181*, 1047-1058.
- Rehermann, B., Lau, D., Hoofnagle, J.H., and Chisari, F.V. (1996b). Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* *97*, 1655-1665.
- Rehermann, B., and Nascimbeni, M. (2005). Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* *5*, 215-229.
- Rehm, H., and Letzel, T. (2006). *Der Experimentator Proteinbiochemie / Proteomics*, 4 edn (Spektrum Akademischer Verlag).
- Rigopoulou, E.I., Suri, D., Chokshi, S., Mullerova, I., Rice, S., Tedder, R.S., Williams, R., and Naoumov, N.V. (2005). Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity. *Hepatology* *42*, 1028-1036.
- RKI (2010). Virushepatitis B, C und D im Jahr 2009. *Epidemiologisches Bulletin* *20*.
- Romero, R., and Lavine, J.E. (1996). Cytokine inhibition of the hepatitis B virus core promoter. *Hepatology* *23*, 17-23.
- Rosenberg, S.A., Yang, J.C., Sherry, R.M., Kammula, U.S., Hughes, M.S., Phan, G.Q., Citrin, D.E., Restifo, N.P., Robbins, P.F., Wunderlich, J.R., *et al.* (2011). Durable Complete Responses in Heavily Pretreated Patients with Metastatic Melanoma Using T Cell Transfer Immunotherapy. *Clin Cancer Res*.
- Rosler, C., Kock, J., Malim, M.H., Blum, H.E., and von Weizsacker, F. (2004). Comment on "Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G". *Science* *305*, 1403; author reply 1403.
- Rüttinger, D., Zugmaier, G., Nagorsen, D., Reinhardt, C., and Baeuerle, P.A. (2008). BiTE-Antikörper: Durch Bispezifität T-Lymphozyten gegen Tumorzellen richten. *Journal Onkologie* *04-08*.
- Sanderson, S., and Shastri, N. (1994). LacZ inducible, antigen/MHC-specific T cell hybrids. *Int Immunol* *6*, 369-376.
- Sanjabi, S., Zenewicz, L.A., Kamanaka, M., and Flavell, R.A. (2009). Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF-beta, IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Curr Opin Pharmacol* *9*, 447-453.
- Schaefer, S. (2007). Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* *13*, 14-21.
- Schirmbeck, R., Dikopoulos, N., Kwissa, M., Leithauser, F., Lamberth, K., Buus, S., Melber, K., and Reimann, J. (2003). Breaking tolerance in hepatitis B surface antigen (HBsAg) transgenic mice by vaccination with cross-reactive, natural HBsAg variants. *Eur J Immunol* *33*, 3342-3352.
- Schirmbeck, R., Wild, J., Stober, D., Blum, H.E., Chisari, F.V., Geissler, M., and Reimann, J. (2000). Ongoing murine T1 or T2 immune responses to the hepatitis B surface antigen are excluded from the liver that expresses transgene-encoded hepatitis B surface antigen. *J Immunol* *164*, 4235-4243.
- Schlicht, H.J., and Schaller, H. (1989). Analysis of hepatitis B virus gene functions in tissue culture and in vivo. *Curr Top Microbiol Immunol* *144*, 253-263.
- Scholten, K.B., Kramer, D., Kueter, E.W., Graf, M., Schoedl, T., Meijer, C.J., Schreurs, M.W., and Hooijberg, E. (2006). Codon modification of T cell receptors allows enhanced functional expression in transgenic human T cells. *Clin Immunol* *119*, 135-145.
- Schulze, A., Gripon, P., and Urban, S. (2007). Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology* *46*, 1759-1768.
- Schulze-Bergkamen, H., Untergasser, A., Dax, A., Vogel, H., Buchler, P., Klar, E., Lehnert, T., Friess, H., Buchler, M.W., Kirschfink, M., *et al.* (2003). Primary human hepatocytes--a valuable tool for investigation of apoptosis and hepatitis B virus infection. *J Hepatol* *38*, 736-744.

Schurich, A., Khanna, P., Lopes, A.R., Han, K.J., Peppas, D., Micco, L., Nebbia, G., Kennedy, P.T., Geretti, A.M., Dusheiko, G., and Maini, M.K. (2011). Role of the co-inhibitory receptor CTLA-4 on apoptosis-prone CD8 T cells in persistent HBV infection. *Hepatology*.

Schuster, I. (2008). Identifikation, Klonierung und retroviraler Transfer allorestingierter FMNL1-peptidspezifischer T-Zellrezeptoren für die Entwicklung adoptiver Immuntherapien gegen B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphome. Dissertation *München*.

Seeger, C., Marion, P.L., Ganem, D., and Varmus, H.E. (1987). In vitro recombinants of ground squirrel and woodchuck hepatitis viral DNAs produce infectious virus in squirrels. *J Virol* *61*, 3241-3247.

Sells, M.A., Chen, M.L., and Acs, G. (1987). Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* *84*, 1005-1009.

Sette, A.D., Oseroff, C., Sidney, J., Alexander, J., Chesnut, R.W., Kakimi, K., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2001). Overcoming T cell tolerance to the hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus-transgenic mice. *J Immunol* *166*, 1389-1397.

Shata, M.T., Pfahler, W., Brotman, B., Lee, D.H., Tricoche, N., Murthy, K., and Prince, A.M. (2006). Attempted therapeutic immunization in a chimpanzee chronic HBV carrier with a high viral load. *J Med Primatol* *35*, 165-171.

Sobao, Y., Sugi, K., Tomiyama, H., Saito, S., Fujiyama, S., Morimoto, M., Hasuike, S., Tsubouchi, H., Tanaka, K., and Takiguchi, M. (2001). Identification of hepatitis B virus-specific CTL epitopes presented by HLA-A*2402, the most common HLA class I allele in East Asia. *J Hepatol* *34*, 922-929.

Sommermeier, D., and Uckert, W. (2010). Minimal amino acid exchange in human TCR constant regions fosters improved function of TCR gene-modified T cells. *J Immunol* *184*, 6223-6231.

Sprinzl, M.F., and Galle, P.R. (2008). Differential diagnosis of human hepatitis. In *Comparative Hepatitis* (Birkhäuser Verlag).

Sprinzl, M.F., Oberwinkler, H., Schaller, H., and Protzer, U. (2001). Transfer of hepatitis B virus genome by adenovirus vectors into cultured cells and mice: crossing the species barrier. *J Virol* *75*, 5108-5118.

Stoop, J.N., van der Molen, R.G., Baan, C.C., van der Laan, L.J., Kuipers, E.J., Kusters, J.G., and Janssen, H.L. (2005). Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* *41*, 771-778.

Summers, J., O'Connell, A., and Millman, I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* *72*, 4597-4601.

Summers, J., Smolec, J.M., and Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc Natl Acad Sci U S A* *75*, 4533-4537.

Suri, D., Schilling, R., Lopes, A.R., Mullerova, I., Colucci, G., Williams, R., and Naoumov, N.V. (2001). Non-cytolytic inhibition of hepatitis B virus replication in human hepatocytes. *J Hepatol* *35*, 790-797.

Swain, M.G., Appleyard, C., Wallace, J., Wong, H., and Le, T. (1999). Endogenous glucocorticoids released during acute toxic liver injury enhance hepatic IL-10 synthesis and release. *Am J Physiol* *276*, G199-205.

Szkaradkiewicz, A., Jopek, A., and Wysocki, J. (2005). Effects of IL-12 and IL-18 on HBcAg-specific cytokine production by CD4 T lymphocytes of children with chronic hepatitis B infection. *Antiviral Res* *66*, 23-27.

Takahashi, T., Tanaka, M., Inazawa, J., Abe, T., Suda, T., and Nagata, S. (1994). Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* *6*, 1567-1574.

Takemoto, N., Intlekofer, A.M., Northrup, J.T., Wherry, E.J., and Reiner, S.L. (2006). Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. *J Immunol* *177*, 7515-7519.

- Tan, A.T., Koh, S., Goh, V., and Bertolletti, A. (2008a). Understanding the immunopathogenesis of chronic hepatitis B virus: an Asian prospective. *J Gastroenterol Hepatol* 23, 833-843.
- Tan, A.T., Loggi, E., Boni, C., Chia, A., Gehring, A.J., Sastry, K.S., Goh, V., Fiscicaro, P., Andreone, P., Brander, C., *et al.* (2008b). Host ethnicity and virus genotype shape the hepatitis B virus-specific T-cell repertoire. *J Virol* 82, 10986-10997.
- Thimme, R., Wieland, S., Steiger, C., Ghayeb, J., Reimann, K.A., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2003). CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 77, 68-76.
- Thomson, A.W., and Knolle, P.A. (2010). Antigen-presenting cell function in the tolerogenic liver environment. *Nat Rev Immunol* 10, 753-766.
- Tillmann, H.L. (2007). Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol* 13, 125-140.
- Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3, 133-146.
- Turelli, P., Liagre-Quazzola, A., Mangeat, B., Verp, S., Jost, S., and Trono, D. (2008). APOBEC3-independent interferon-induced viral clearance in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 82, 6585-6590.
- Turelli, P., Mangeat, B., Jost, S., Vianin, S., and Trono, D. (2004). Inhibition of hepatitis B virus replication by APOBEC3G. *Science* 303, 1829.
- Uko, G.P., Fraser, P.A., Awdeh, Z.L., Fici, D.A., Crawford, K.D., Larsen, C.E., and Alper, C.A. (2001). Hepatitis B surface antigen- and tetanus toxoid-specific clonal expansion of CD4+ cells in vitro determined by TCRBV CDR3 length and nucleotide sequence. *Genes Immun* 2, 11-19.
- Unterberger, C., Staples, K.J., Smallie, T., Williams, L., Foxwell, B., Schaefer, A., Kempkes, B., Hofer, T.P., Koepfel, M., Lohrum, M., *et al.* (2008). Role of STAT3 in glucocorticoid-induced expression of the human IL-10 gene. *Mol Immunol* 45, 3230-3237.
- Valenzuela, J.O., Hammerbeck, C.D., and Mescher, M.F. (2005). Cutting edge: Bcl-3 up-regulation by signal 3 cytokine (IL-12) prolongs survival of antigen-activated CD8 T cells. *J Immunol* 174, 600-604.
- Varela-Rohena, A., Carpenito, C., Perez, E.E., Richardson, M., Parry, R.V., Milone, M., Scholler, J., Hao, X., Mexas, A., Carroll, R.G., *et al.* (2008a). Genetic engineering of T cells for adoptive immunotherapy. *Immunol Res* 42, 166-181.
- Varela-Rohena, A., Molloy, P.E., Dunn, S.M., Li, Y., Suhoski, M.M., Carroll, R.G., Milicic, A., Mahon, T., Sutton, D.H., Laugel, B., *et al.* (2008b). Control of HIV-1 immune escape by CD8 T cells expressing enhanced T-cell receptor. *Nat Med* 14, 1390-1395.
- Voehringer, D., Blaser, C., Grawitz, A.B., Chisari, F.V., Buerki, K., and Pircher, H. (2000). Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol* 165, 2415-2422.
- von Freyend, M.J., Untergasser, A., Arzberger, S., Oberwinkler, H., Drebber, U., Schirmacher, P., and Protzer, U. (2010). Sequential control of hepatitis B virus in a mouse model of acute, self-resolving hepatitis B. *J Viral Hepat* 18, 216-226.
- Walter, E., Keist, R., Niederost, B., Pult, I., and Blum, H.E. (1996). Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes in vitro and in vivo. *Hepatology* 24, 1-5.
- Watanabe, T., Bertolletti, A., and Tanoto, T.A. (2010). PD-1/PD-L1 pathway and T-cell exhaustion in chronic hepatitis virus infection. *J Viral Hepat* 17, 453-458.

- Webster, G.J., Reignat, S., Brown, D., Ogg, G.S., Jones, L., Seneviratne, S.L., Williams, R., Dusheiko, G., and Bertoletti, A. (2004). Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 78, 5707-5719.
- Webster, G.J., Reignat, S., Maini, M.K., Whalley, S.A., Ogg, G.S., King, A., Brown, D., Amlot, P.L., Williams, R., Vergani, D., *et al.* (2000). Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32, 1117-1124.
- Wentworth, P.A., Vitiello, A., Sidney, J., Keogh, E., Chesnut, R.W., Grey, H., and Sette, A. (1996). Differences and similarities in the A2.1-restricted cytotoxic T cell repertoire in humans and human leukocyte antigen-transgenic mice. *Eur J Immunol* 26, 97-101.
- Westhoff, T.H., Jochimsen, F., Schmittl, A., Stoffler-Meilicke, M., Schafer, J.H., Zidek, W., Gerlich, W.H., and Thiel, E. (2003). Fatal hepatitis B virus reactivation by an escape mutant following rituximab therapy. *Blood* 102, 1930.
- Wherry, E.J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol* 131, 492-499.
- Wieland, S., Thimme, R., Purcell, R.H., and Chisari, F.V. (2004 - nicht editiert und überprüft). Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6669-6674.
- Wieland, S.F., Guidotti, L.G., and Chisari, F.V. (2000). Intrahepatic induction of alpha/beta interferon eliminates viral RNA-containing capsids in hepatitis B virus transgenic mice. *J Virol* 74, 4165-4173.
- Wieland, S.F., Vega, R.G., Muller, R., Evans, C.F., Hilbush, B., Guidotti, L.G., Sutcliffe, J.G., Schultz, P.G., and Chisari, F.V. (2003). Searching for interferon-induced genes that inhibit hepatitis B virus replication in transgenic mouse hepatocytes. *J Virol* 77, 1227-1236.
- Wigginton, J.M., Park, J.W., Gruys, M.E., Young, H.A., Jorcyk, C.L., Back, T.C., Brunda, M.J., Strieter, R.M., Ward, J., Green, J.E., and Wiltrout, R.H. (2001). Complete regression of established spontaneous mammary carcinoma and the therapeutic prevention of genetically programmed neoplastic transition by IL-12/pulse IL-2: induction of local T cell infiltration, Fas/Fas ligand gene expression, and mammary epithelial apoptosis. *J Immunol* 166, 1156-1168.
- Willemsen, R.A., Debets, R., Chames, P., and Bolhuis, R.L. (2003). Genetic engineering of T cell specificity for immunotherapy of cancer. *Hum Immunol* 64, 56-68.
- Wood, N.J. (2011). Immunotherapy: Therapeutic potential of genetically modified HBV-specific T cells for chronic HBV infection and HBV-related HCC. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 8, 61.
- Wursthorn, K., Lutgehetmann, M., Dandri, M., Volz, T., Buggisch, P., Zollner, B., Longerich, T., Schirmacher, P., Metzler, F., Zankel, M., *et al.* (2006). Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 44, 675-684.
- Wursthorn, K., and Manns, M.P. (2009). Hepatotrope Virusinfektionen. In *Medizinische Virologie: Grundlagen, Diagnostik, Prävention und Therapie viraler Erkrankungen* (Georg Thieme Verlag).
- Xiong, S.Q., Lin, B.L., Gao, X., Tang, H., and Wu, C.Y. (2007). IL-12 promotes HBV-specific central memory CD8+ T cell responses by PBMCs from chronic hepatitis B virus carriers. *Int Immunopharmacol* 7, 578-587.
- Yuh, C.H., Chang, Y.L., and Ting, L.P. (1992). Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *J Virol* 66, 4073-4084.
- Zhao, Y., Moon, E., Carpenito, C., Paulos, C.M., Liu, X., Brennan, A.L., Chew, A., Carroll, R.G., Scholler, J., Levine, B.L., *et al.* (2010). Multiple injections of electroporated autologous T cells expressing a chimeric antigen receptor mediate regression of human disseminated tumor. *Cancer Res* 70, 9053-9061.
- Zhong, X.S., Matsushita, M., Plotkin, J., Riviere, I., and Sadelain, M. (2010). Chimeric antigen receptors combining 4-1BB and CD28 signaling domains augment PI3kinase/AKT/Bcl-XL activation and CD8+ T cell-mediated tumor eradication. *Mol Ther* 18, 413-420.

Zhou, D., Srivastava, R., Grummel, V., Cepok, S., Hartung, H.P., and Hemmer, B. (2006). High throughput analysis of TCR-beta rearrangement and gene expression in single T cells. *Lab Invest* 86, 314-321.

Zhou, Q., Munger, M.E., Highfill, S.L., Tolar, J., Weigel, B.J., Riddle, M., Sharpe, A.H., Valleria, D.A., Azuma, M., Levine, B.L., *et al.* (2010). Program death-1 signaling and regulatory T cells collaborate to resist the function of adoptively transferred cytotoxic T lymphocytes in advanced acute myeloid leukemia. *Blood* 116, 2484-2493.

Zhu, Y., Yamamoto, T., Cullen, J., Saputelli, J., Aldrich, C.E., Miller, D.S., Litwin, S., Furman, P.A., Jilbert, A.R., and Mason, W.S. (2001). Kinetics of hepadnavirus loss from the liver during inhibition of viral DNA synthesis. *J Virol* 75, 311-322.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung	Abkürzung	Bedeutung
ALT	Alanin Aminotransferase	IU	International Units
BrdU	Bromdesoxyuridin	J	joining
C8	ScFv Teil des S-CARs	LAMP-1	Lysosomal associated membrane glycoprotein
CAR	Chimärer Antigen Rezeptor	Met	Mesenchymal epithelial transition factor
cccDNA	Covalently closed circular DNA	MHC	Major histocompatibility Complex
CD	Cluster of differentiation	MIBI	Institut für Medizinische Mikrobiologie TU München
CDR	Complementarity determining region	MNC	Mononuclear cells
CEA	Carcinoembryonales Antigen	MoMuLV	Moloney murine leukemia virus
CMV	Cytomegalovirus	NGFR	Nerve growth factor receptor
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte Antigen 4	NK Zellen	Natürliche Killer Zellen
D	Diversity	PD-1	Programmed death-1
DHBV	Duck Hepatitis B Virus	Peg	pegyliert
DNA	Desoxyribonucleic acid	rcDNA	Relaxed circular DNA
E	Effector cells	RKI	Robert-Koch-Institut
EBV	Epstein-Barr-Virus	RNA	Ribonucleic acid
ER	Endoplasmatisches Retikulum	Rpm	Rounds per minute
FACS	Fluorescence activated cell sorting	ScFv	Single chain variable fragment
FasL	Fas Ligand	SVP	Subvirale Partikel
FasR	Fas Rezeptor	T	Target cells
Fc	Fragment, crystallizable	TNF	Tumor Nekrose Faktor
HBsAg	Hepatitis B surface Antigen	Tr	transgen
HBV	Hepatitis B Virus	TZM	T-Zellmedium
HE	Hämatoxylin-Eosin	TZR	T-Zellrezeptor
HLA	Human leukocyte antigen	V	Variable
IFN	Interferon	V _H	Schwere Kette
IgG	Immunglobulin G	VIRO	Institut für Virologie TU München
IL	Interleukin	V _L	Leichte Kette
IMMEI	Institut für Molekulare Medizin und experimentelle Immunologie	WHV	Woodchuck Hepatitis B Virus
		WMHBV	Woolly monkey Hepatitis B Virus
		Xfs	X frame shift

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Ulla Protzer, dafür dass sie das spannende Thema der Arbeit gestellt hat und an dem Projekt festhielt, als ich bereit war, aufzugeben. Dank ihrer Großzügigkeit und Unterstützung war es mir möglich, mehrere Kongresse zu besuchen und an Weiterbildungen teilzunehmen, die zeitintensiv waren und zu meiner persönlichen Entwicklung beigetragen haben.

Bei Prof. Gabi Multhoff und Prof. Jörg Durner möchte ich dafür bedanken, dass sie sich spontan und ohne Zögern bereit erklärten, als Prüfungsvorsitzende bzw. Betreuer an der Hochschule einzuspringen und mich so aus einer misslichen Lage befreien.

Prof. Dirk Busch und seinem Team danke ich für die Bereitstellung der Streptamere und Prof. Angela Krackhardt, Luise Weigand und Stan Riddell für gute Protokolle und technische Hilfe, ohne die die Gewinnung der T-Zellklone nicht so einfach funktioniert hätte. In diesem Sinne danke ich auch Martin Sprinzl und den Immunmonitoring-Mädels für die Organisation der Blutproben und besonders Spender 2, der mir immer wieder Blut spendete.

Nina Böttinger danke ich ganz besonders, dass sie mir an diversen Abenden und Wochenenden mit den Mausversuchen geholfen hat und durch ihren Einsatz und Diskussionsbereitschaft zum Gelingen des CAR-Projektes maßgeblich beigetragen hat. Seit sie in das Projekt eingestiegen ist, macht es viel mehr Spaß!

Auch Silke Arzberger gilt besonderer Dank für das Injizieren und Bluten der Mäuse und dafür, dass sie bei privaten und labortechnischen Themen immer ein offenes Ohr und einen guten Ratschlag hatte.

Vera Siegler danke ich für eine tolle Freundschaft, ohne die München nicht so schön wäre!

Zusammen danke ich Nina, Silke, Vera und meiner Mama für die kritische Korrektur meiner Dissertation.

I also want to thank Julie Lucifora for a great friendship, lots of fun and the girl's talk. It was always a pleasure to share the hood with her!

Although Chris Zhang was not involved in my project, I want to thank him for knowing an answer to almost every molecular-biological questions and for helping with the little lab-things during every other weekend.

Ein besonderer Dank geht an unsere gute Seele Theresa Asen, ohne deren Organisation im Labor nichts mehr funktionieren würde. Auch Chantal Gotthier und Andi Weicht danke ich für zahlreiche Hilfe!

Auch den Tierpflegern in Neuherberg und der Trogerstraße, Raindy Tedjokusumo, den Sekretariaten und allen anderen Kollegen, die hier nicht namentlich genannt sind, danke ich außerordentlich für die gute Zusammenarbeit, Labortipps und Hilfsbereitschaft, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Dank der tollen Atmosphäre in der Arbeitsgruppe Protzer hat es immer Spaß gemacht zu arbeiten.

Meinen Eltern danke ich von ganzen Herzen dafür, dass sie in der Zeit, als mein Interesse für die Virologie geweckt wurde, bedingungslos hinter mir gestanden haben und mich auch sonst immer unterstützt haben. Hätten Sie mich nicht dazu erzogen, Sachen zu hinterfragen, wäre aus mir vielleicht kein Wissenschaftler geworden.

Nicht zuletzt danke ich meinem Christian für die große moralische Unterstützung während der Promotion. Dank ihm konnte ich an den gemeinsamen Wochenenden viel lachen und jeden Laborfrust komplett vergessen.