

Aus dem Institut für Immunologie
(Professor Doktor Dietrich Kabelitz)
am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Immortalisierung von zytotoxischen T-Lymphozyten mit
Herpesvirus saimiri und Direktnachweis der Transformation in T-
Lymphozyten von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Christopher H a r t

aus Frankfurt am Main

Kiel 2010

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Jörg Steinmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Helmut Fickenscher

Tag der mündlichen Prüfung: 02.06.2010

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 02.06.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis:.....	VI
I. Einleitung	1
1. Virustransformation.....	1
2. Zelluläre Immuntherapie maligner Erkrankungen	3
II. Aufgabenstellung.....	5
1. Virustransformation und Immortalisierung von autolog- und allogen-reaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten aus „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMNC) vom Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie.	5
2. Kontrolle des Wachstumsverhaltens von CTL-Linien.	5
3. Durchflusszytometrische Untersuchungen des Phänotyps der transformierten CTL-Linien.	5
4. Direktnachweis der Virustransformation in zytotoxischen T-Lymphozyten:	5
III. Material und Methoden.....	6
1. Generierung von SHV-2 Überstand	6
2. Gewinnung von mononukleären Zellen (MNC) aus humanem peripheren venösem Blut.....	7
3. Herstellung von EBV-transformierten PBMNC als Stimulator- und Zielzellen	7
4. Herstellung von syngen- und allogen-reaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten	8
5. Immortalisierung/Transfektion von CTL mit SHV-2.....	8
6. Durchflusszytometrische Untersuchungen der SHV-2-transformierten CTL und der EBV-transformierten B-Lymphozyten	9
6.1 Antikörper	10
6.2 Analyse der Antigenexpression auf SHV-2-transformierten CTL.....	10
7. Herstellung einer herpesvirus-saimiri-spezifischen DNA-Sonde.....	11
8. Herstellung der Präparate zur Hybridisierung.....	11
9. In-situ-Hybridisierung	12
9.1 Vorbereitung	12
9.2 Hybridisierung.....	14
9.3 Waschung.....	14
9.4 Detektion der Sonde	14
10. Kontrollen	15
10.1 Positiv-Kontrollen:.....	15
10.2 Negativkontrollen	15
11. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	16
12. Mycoplasmendetektion	16
13. Berechnung, Graphik und Ausarbeitung.....	17

IV.	Ergebnisse	18
1.	Wachstumsverhalten der SHV-2-transformierten CTL.....	18
1.1	Antigen-unabhängige Proliferation.....	18
1.2	Wachstumsrate	19
2.	Durchflusszytometrische Untersuchungen - Phänotypisierung der SHV-2-transformierten CTL	20
2.1	Expression der T-Zellmarker CD3, CD4, CD8, und TCR α/β	20
2.2	CD45RO-Expression	21
2.3	CD3- und CD16-Expression	22
2.4	Coexpression von CD56.....	22
3.	Qualitätsprüfung einer Herpesvirus-saimiri-spezifischen DNA-Sonde	25
4.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	27
4.1	Präparate	27
4.2	Kontrollen	30
4.2.1	Verfahrenskontrolle	30
4.2.2	Negativkontrolle	31
4.3	Verfahrensbewertung	32
V.	Diskussion.....	33
1.	Virustransformation von Lymphozyten.....	33
2.	Biologische Sicherheit	34
3.	Transformation von T-Lymphozyten durch Herpesvirus saimiri	35
3.1	Genom und Transfektionsmechanismus	35
3.2	Wachstumsverhalten und Phänotyp	36
4.	Herstellung der Sonde	38
5.	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	39
6.	Chancen und Risiken der zellulären Immuntherapie	40
VI.	Zusammenfassung	43
VII.	Literaturverzeichnis.....	45
VIII.	Danksagung	50
IX.	Lebenslauf.....	51

Abkürzungsverzeichnis:

AMCA	amino-methyl-coumarin-acetate
Bp	Basenpaar
CD	Cluster of Differentiation, Oberflächenmarker
CML	chronisch myeloische Leukämie
CPE	zytopathische Effekte
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyten
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIG	Digoxigenin
DLI	donor lymphocyte infusion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluorescein
GvH	graft versus host
GvL	Graft versus leukaemia
HTLV-1	humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1
IL-2	Interleukin-2
LANA	latency associated nuclear antigen
LMP	low melting point
M. argini	Mycoplasma argini
M. hyorhinis	Mycoplasma hyorhinis
M. laidlawii	Mycoplasma laidlawii
M. orale	Mycoplasma orale
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MNC	mononukleäre Zellen
NK	natural killer
OMK	owl monkey kidney
ORF	open reading frame
PBMNC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNM	Hydrogenphosphat-Puffer mit Magermilchpulver
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SHV-2	Herpesvirus saimiri
SSC	Standard Saline Citrate
StpC	Saimiri transformations-assoziertes Protein Untergruppe C
Td	Denaturierungstemperatur
Th	Hybridisierungstemperatur
Tip	Thyrosinkinase interagierendes Protein
Tm	Schmelztemperatur
TRIS-HCl	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, hydrochloride

Immortalisierung von zytotoxischen T-Lymphozyten mit Herpesvirus saimiri und Direktnachweis der Transformation in T-Lymphozyten von Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie

I. Einleitung

Der adoptive Transfer von in vitro generierten zytotoxischen Lymphozyten (CTL und NK-Zellen) ist eine therapeutische Option im Stadium der minimalen Resterkrankung z. B. nach erfolgter Chemotherapie von Tumorpatienten. Für die zelluläre Immuntherapie entsprechend große Zellzahlen (tumor-) spezifischer CTL oder NK-Zellen in vitro zu generieren, gestaltet sich jedoch schwierig.

1. Virustransformation

Das Herpesvirus saimiri (SHV-2) könnte zur Lösung dieses Problems beitragen. Das Virus transformiert T-Lymphozyten und überführt sie damit in eine Antigen-unabhängige kontinuierliche Proliferation.

Die virus-induzierte Transformation von Lymphozyten ist eine seit Jahren etablierte Methode in der immunologischen Forschung. So immortalisiert das Epstein-Barr-Virus (EBV) effizient B-Lymphozyten (Nilsson *et al.* 1982, Tosato *et al.* 1997), wobei diese nach erfolgter Transformation ihre Eigenschaft der Antigen-Präsentation beibehalten. Dies wurde in unzähligen Untersuchungen zur Antigen-Spezifität von T-Lymphozyten genutzt. Die Transformation von T-Lymphozyten mit HTLV-1 in kontinuierlich stabil wachsende Zellkulturen stellt einen weiteren etablierten Versuchsansatz dar (Miyoshi *et al.* 1981, Yamamoto *et al.* 1982). Nachteilig wirkt sich hierbei jedoch aus, dass die transformierten Zellen ihre zytotoxische Aktivität, ihre Interleukin-2 (IL-2) Abhängigkeit und ihren T-Zell-Rezeptor-Komplex verlieren (Inatsuki *et al.* 1989, Yssel *et al.* 1989). Bedenklich ist ebenfalls die Produktion von Retroviren durch HTLV-1 transformierte T-Lymphozyten.

Herpesvirus saimiri (Melendez *et al.* 1968) ist ein γ_2 -Herpesvirus, dessen natürlicher Wirt der Totenkopfpaffe (*saimiri sciureus*) ist. Diese Tiere zeigen im Zusammenhang mit einer SHV-2-Infektion keinerlei Anzeichen einer Erkrankung. Im Gegensatz dazu

entwickeln andere Neuwelt Primaten, wie z.B. Nachtaffen (*aotus trivirgatus*) und Lisztaffen (*sanguinus oedipus*), nach Infektion mit dem Virus akute Leukämien oder T-Zell-Lymphome (Trimble *et al.* 1991, Biesinger *et al.* 1992). Diese Erkrankungen gehen mit einer massiven Virusreplikation einher.

Das Herpesvirus *saimiri* kann auf einfache Weise von peripherem Blut der meisten Totenkopffaffen isoliert und in großer Menge durch Infektion von Nierenzellen der Nachtaffen gewonnen werden (H. Fickenscher und B. Fleckenstein 1998).

SHV-2 (subgroup C488) transformierte humane T-Lymphozyten wachsen IL-2-abhängig, jedoch Antigen unabhängig, mit einer wöchentlichen Verdoppelung der Zellzahl. Nach erfolgter Virustransformation bleiben die phänotypischen Eigenschaften der CTL erhalten (Biesinger *et al.* 1992, Fickenscher *et al.* 1998). Ebenso zeigt sich eine hohe spezifische zytotoxische Aktivität (Medveczky *et al.* 1993).

Das Virusgenom persistiert als nicht-integriertes histon-assoziiertes Episom bei nur latenter Expression einzelner weniger Abschnitte des Virusgenoms. Darunter finden sich die beiden Onkogene Saimiri transformations-assoziiertes Protein der Untergruppe C (StpC) und Thyrosinkinase interagierendes Protein (Tip) aus dem open reading frame 1 (ORF 1), die einen wesentlichen Beitrag zur Immortalisierung der T-Lymphozyten leisten und das latency associated nuclear antigen (LANA) aus dem ORF 73, das für die Latenz und den Verbleib des Episoms zuständig ist. Die Möglichkeit zur Induktion einer Reaktivierung der Virusreplikation scheint nicht gegeben zu sein. Eine Produktion von Viruspartikeln findet nicht statt (Biesinger *et al.* 1992, Fickenscher *et al.* 1996, Knappe *et al.* 1997). Trotzdem ist die biologische Sicherheit im Bezug auf eine zelluläre Immuntherapie mit virustransformierten T-Zellen letztlich noch nicht geklärt. Die Ergebnisse nach autologer Reinfusion SHV-2-transformierter T-Lymphozyten und die Bestrebungen um den Einbau eines Suizidgenes (Hiller *et al.* 2000) stimmen optimistisch, was einen möglichen klinischen Einsatz betrifft.

Erste Versuche im Tiermodell mit Macaquen zeigten, dass die autologe Reinfusion SHV-2-transformierter T-Zellen uneingeschränkt von den Tieren toleriert wurde und keine Anzeichen einer Leukämie oder eines sich entwickelten Lymphoms auftraten (Knappe *et al.* 2000). Die mit einer hohen Dosis SHV-2 infizierten Kontrolltiere entwickelten in kurzer Zeit periphere pleomorphe T-Zell-Lymphome, wohingegen Affen,

die zuvor mit SHV-2-transformierten T-Zellen autolog reinfundiert wurden, keine Lymphome entwickelten.

2. Zelluläre Immuntherapie maligner Erkrankungen

Ein weiteres Problem in der zellulären Immuntherapie von Tumoren stellt die Induktion von zwei trennbaren Phänomenen dar. Zum einen der gewünschte sogenannte Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft versus leukaemia, GvL) und zum anderen die unerwünschte Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (graft versus host, GvH) (Horowitz *et al.* 1990, Glass *et al.* 1992, Uharek *et al.* 1993, Sebens *et al.* 1995, Xun *et al.* 1995).

Allogene (von möglichst gewebeverträglichem Fremdspender), zytotoxische Effektorzellen des Immunsystems (z. B. CTL und NK-Zellen) erkennen bei der GvL die Tumorzellen des Wirtsorganismus nach erfolgter *in vitro* Anreicherung und anschließender intravenöser Gabe oder im Rahmen einer Knochenmarktransplantation als „fremd“ und eliminieren diese mit unterschiedlicher Intensität. Gewünschte Folge ist eine geringere Rezidivrate. Bei der GvH erkennen die transplantierten immunkompetenten Effektorzellen den Wirtsorganismus als „fremd“, insbesondere richtet sich diese Reaktion gegen die Haut, Darmschleimhaut und Leber des Empfängers. Dies kann bei unterschiedlicher Ausprägung und akutem bzw. chronischem Verlauf für den Patienten unter Umständen tödlich enden. Leider zeigen auch hier allogene Effektorzellen mitunter größere GvH-Reaktionen. Wünschenswert sind eine minimale GvH-Reaktion und ein maximaler GvL-Effekt.

Zytotoxische T-Lymphozyten können im hohen Maße spezifisch Tumorzellen eliminieren, werden allerdings auch für das Auftreten von GvH-Reaktionen verantwortlich gemacht (Soiffer *et al.* 1992 und 1993).

NK-Zellen scheinen ein weniger problematisches Verhalten in der zellulären Immuntherapie zu zeigen. In murinen Tiermodellen konnten deutliche GvL-Effekte nachgewiesen werden, die unerwünschten GvH-Reaktionen traten gar nicht oder nur in sehr geringem Maße auf (Xun *et al.* 1995, Glass *et al.* 1996, Zeis *et al.* 1997). Zusätzlich nach erfolgter Knochenmarktransplantation gegebene NK-Effektorzellen konnten das Überleben behandelter Mäuse signifikant steigern (Zeis *et al.* 1995).

Somit wären große Mengen von NK-Zellen in der zellulären Immuntherapie von NK-sensiblen Malignomen oder malignomspezifische Klone von zytotoxischen T-Lymphozyten analog den donor lymphocyte infusion (DLI) ideal, da beide bei nachgewiesenem deutlichen GvL-Effekt keine relevante GvH-Reaktion verursachen (Porter *et al.*, 2006).

II. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen T-Lymphozyten von Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie (CML) mit dem SHV-2 Stamm C488 infiziert und zunächst unter verschiedenen Kulturbedingungen in ihrem Wachstumsverhalten kontrolliert werden. Die auf diese Weise erzeugten T-Lymphozyten sollen bezüglich ihrer phänotypischen Eigenschaften untersucht werden. Parallel dazu soll eine Methode entwickelt werden, die den direkten Nachweis der erfolgten Virustransformation auf Zellebene ermöglicht.

Geplantes Vorgehen:

1. Virustransformation und Immortalisierung von autolog- und allogene-reaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten aus „peripheral blood mononuclear cells“ (PBMNC) vom Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie.
2. Kontrolle des Wachstumsverhaltens von CTL-Linien.
3. Durchflusszytometrische Untersuchungen des Phänotyps der transformierten CTL-Linien.
4. Direktnachweis der Virustransformation in zytotoxischen T-Lymphozyten:
 - a. Erstellen einer virusspezifischen DNA-Sonde
 - b. Nachweis der Virustransformation durch Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

III. Material und Methoden

1. Generierung von SHV-2 Überstand

Um Virusüberstand zur Transformation von T-Zellen zu gewinnen, wurden epitheliale Nierenzellen von Nachtaffen (*Aotus lemurinus*, owl monkey kidney cells, OMK-Zellen) in Kultur genommen. Diese Zellen der Nachtaffen sind ein typisches Fortpflanzungssystem für Herpesviren von Neuweltaffen (z. B. Herpesvirus saimiri, Herpesvirus aotus und Herpesvirus ateles). Zu beziehen sind sie bei ATCC, Rockville, USA. Sie lassen sich unproblematisch in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) kultivieren. Die Aufbewahrung erfolgte in 30 ml Kulturflaschen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 37° C und 5% CO₂. Wöchentlich wurden die Kulturen nach Lösen der adhärennten Zellen von der Flaschenwand mit Trypsin (Sigma, München, Deutschland) geteilt und in frischem Kulturmedium resuspendiert.

Nachdem mikroskopisch ein dichter Bewuchs ca. $\frac{3}{4}$ des Bodens der Kulturflasche mit OMK-Zellen nachgewiesen werden konnte, inokulierten wir die Zellkulturen mit dem Herpesvirus saimiri Stamm C488. Dieser ist, im Gegensatz zu anderen SHV-2 Stämmen (mit „subgroup-A/B“-Virusanteilen), aufgrund seines „subgroup-C“-Anteils in der Lage, humane T-Lymphozyten zu transformieren (Biesinger *et al.* 1992). Die Virussuspension wurde dem Kulturmedium zugesetzt.

Nach 1-2 Tagen erkannte man unter dem Mikroskop erste zytopathische Effekte (CPE). Die Zellen rundeten sich ab, die Granulation des Zellplasmas nahm zu, der anfänglich dichte Zellrasen erschien löchrig, und im weiteren Verlauf konnte man nur noch vereinzelte Zellinseln identifizieren. Ein kompletter CPE entstand nach 1-2 Wochen, d. h. der dichte Zellrasen wurde durch das Virus komplett lysiert. Die Kulturen mit komplettem CPE überführten wir in 10 ml Spitzröhrchen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) und zentrifugierten sie bei 12.000 U/min für zwei Stunden. Der so gewonnene Virusüberstand (über 10⁹ Viruspartikel pro ml Überstand) wurde in 500 µl-Portionen in 1,8-ml-Kryoröhrchen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) bei 4° C gelagert.

Prof. Dr. H. Fickenscher aus Tübingen stellte uns freundlicherweise das notwendige Herpesvirus saimiri (SHV-2 C488) und die OMK-Zellen für unsere ersten Virusreplikationen zur Verfügung.

2. Gewinnung von mononukleären Zellen (MNC) aus humanem peripher-venösem Blut

Zur Gewinnung von T-Lymphozyten als Effektorzellen wurde Patienten mit nachgewiesener chronische myeloischer Leukämie nach deren Einverständnis heparinisier-tes peripher-venöses Blut entnommen und mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) im Verhältnis 1:2 verdünnt. Das Blut wurde dann in einem Reagenzglas mit Lymphoflot (Fa. Biotest, Dreieich, Deutschland) unterschichtet. Die Auftrennung erfolgte durch Dichtegradienten-Zentrifugation (20 Minuten bei 2500 U/min), wobei der aus Lymphozyten und Monozyten, also MNC bestehende Phasenring mit einer Pasteurpipette oberhalb der Lymphoflotphase abgesaugt wurde. Dreimaliges Waschen mittels Herunterzentrifugieren und Resuspendieren im Kulturmedium und das Zählen der gewonnenen Zellen in einer Neubauer-Zählkammer stellten die abschließenden Arbeitsschritte dar. Die Anzahl der PBMNC aus 50 ml venösem Blut variierte zwischen 5×10^7 und 1×10^8 . Die so gewonnenen Leukozyten konnten anschließend in Kultur genommen werden.

3. Herstellung von EBV-transformierten PBMNC als Stimulator- und Zielzellen

Für unsere autologen Versuchsansätze stellten die durch das Epstein-Barr-Virus transformierten B-Lymphozyten eine ideale Zelllinie dar: permanent wachsende Zellen, die stark das HLA-Klasse I-Antigen exprimieren, und somit sowohl in späteren zytotoxischen Essays als Ziel-Zelle und, da antigenpräsentierend, als Stimulatorzellen für CTLs einsetzbar sind.

Für die Transformation wurden 2×10^6 vitale PBMNC in 400 μ l Medium mit 1 ml EB-Virusüberstand (eigene Virusreplikation des Instituts) in Schrägröhrchen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) kultiviert. Nach 24 h Aufbewahrung im Brutschrank (37° C und 5% CO₂) erfolgte die Zugabe von Medium mit 15% FCS und Cyclosporin A (2 μ g/ml, Novartis pharma, Nürnberg, Deutschland). In diesem Ansatz dient das Cyclosporin A durch die T-Zell-toxische Wirkung zur Selektion der B-Lymphozyten. Eine Woche

später wurden die Zellen bei 1000 U/min abzentrifugiert und in 1 ml Medium mit 15% FCS und Cyclosporin A resuspendiert. Die in den folgenden Wochen wachsende Zelllinie wurde in 50 ml Kulturflaschen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) aufbewahrt und je nach Bedarf mit frischem Medium versorgt.

4. Herstellung von syngen- und allogen-reaktiven zytotoxischen T-Lymphozyten

Die für die eigentliche Untersuchung benötigten Effektorzellen wurden durch Inkubation von PBMNC mit Stimulatorzellen gewonnen. Als Stimulatorzellen fungierten die wie oben beschrieben generierten autologen EBV-transformierten B-Lymphozyten, aber auch die autologen PBMNCs der Patienten mit CML. Die vorherige Bestrahlung der Stimulatorzellen mit 50 Gy erlaubte eine ausreichende Hemmung der Zellproliferation unter Erhaltung der Immunogenität.

In den syngen Versuchsansätzen wurde zur optimalen CTL Ausbeute ein Responder-Stimulator Verhältnis von 5:1 gewählt. Die Responder-Zellen wurden in RPMI 1640 + 15% FCS + Streptomycin + Penicillin G bei 37 °C und 5% CO₂ in Kultur gehalten. Nach der Stimulation wurde der Kultur an den Tagen 3 und 6 frisches Medium mit 30 U/ml rekombinantem Interleukin-2 (IL-2, Roussel-Uclaf, Romainville, Frankreich) zugegeben. Für die weiteren Untersuchungen benutzten wir sechs jeweils syngen stimulierte CTL-Linien (KL, JB, HM, SI, WB und IH).

5. Immortalisierung/Transfektion von CTL mit SHV-2

Um Antigen-unabhängige, permanent wachsende CTL-Linien zu erhalten, wurden die, wie oben beschrieben, gewonnenen syngen HLA-abhängigen CTL mit Herpesvirus saimiri-Überstand (SHV-2) inkubiert. Drei bis fünf Tage nach Antigenstimulation wurden vitale CTL in einer Anzahl von 3×10^6 Zellen in 500 µl Medium mit 1 ml Virusüberstand kultiviert. Die Kultur wurde für 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ gelagert und anschließend mit frischem Medium + 15% FCS versorgt.

Nach 3 bis 5 Tagen wurden die Zellen herunterzentrifugiert (1000 U/min), in 5 ml Medium + 15% FCS unter Zugabe von 30 U/ml IL-2 resuspendiert und in 50 ml Zell-

kulturflaschen (Fa. Nunc, Roskilde, Dänemark) aufbewahrt. Bedarfsorientiert erfolgten die Zugabe von frischem Kulturmedium und die erforderlichen Teilungen der Zellkulturen. IL-2 wurde den Zellen in dreitägigen Abständen mit einer Konzentration von 30 U/ml zugegeben. Eine weitere Antigenstimulation war nicht mehr notwendig. Die so gewonnenen transformierten CTL-Linien konnten in hoher Anzahl für mehr als zwölf Monate in Kultur gehalten werden.

Der Umgang mit SHV-2 und SHV-2-transformierten Zellen erfolgte unter Beachtung der Sicherheitsstufe 2 der Unfallverhütungsvorschrift Biotechnologie.

6. Durchflusszytometrische Untersuchungen der SHV-2-transformierten CTL und der EBV-transformierten B-Lymphozyten

Unter Verwendung der Durchflusszytometrie können Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften von suspensierten Zellen gemessen werden. Dabei gelangen die zu untersuchenden Zellen über einen Pufferstrom einzeln zu einem Analysepunkt, an dem sie von einem Laser bestrahlt werden. Die elektronisch verrechnete Streulichteigenschaft erlaubt eine präzise Aussage über Größe und Granularität der Zellen. Indem der Laser bestimmte Fluorochrome anregt, ermöglicht die Durchflusszytometrie die quantitative Messung von fluoreszenzmarkierten Oberflächenantigenen.

Vorbereitend wurden die Zellen für 30 Minuten mit einem Primärantikörper bei 4° C inkubiert, herunterzentrifugiert und anschließend in 5 ml PBS mit 2% Serum gewaschen. Die simultane Bestimmung von zwei Antigenen (z. B. CD8 und CD56) erfolgte unter Zusetzung von zwei direkt mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Antikörpern (z. B. CD8-FITC und CD56-Phytoerythrin). Ungekoppelte Primärantikörper wurden durch ein an ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppeltes spezifisches Antiserum messbar gemacht (Fa. Jackson Immuno Research, Baltimore, USA). Die Messung erfolgte in 500 µl Trägerlösung (Sheath, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Autofluoreszenz-Kontrollen mittels Präparationen ohne Antikörper sowie die anteilige Bestimmung von toten Zellen durch Kernfärbung mit Propidiumjodid (Sigma, München, Deutschland) waren Standardschritte des Verfahrens. Zur Feststellung des Anteils unspezifischer Antikörperbindungen wurden Isotopenkontrollen der Fa. Becton Dickinson als Negativkontrollen verwendet.

6.1 Antikörper

Die Tabelle 1 zeigt die Primärantikörper, die für die durchflusszytometrischen Untersuchungen verwendet wurden:

Antigen	Antikörper	Firma
CD3	Leu TM -4	Becton Dickinson
CD4	Leu TM -3a	Becton Dickinson
CD8	Leu TM -2a	Becton Dickinson
CD16	368	PharMingen
CD56	Leu TM -19	Becton Dickinson
CD45RA	HI 100	PharMingen
CD45RO	UCHL 1	PharMingen
TCR α/β	T10B9	PharMingen
TCR γ/δ	B1.1	PharMingen
TCR α/β	BMA 031	Immunotech

Tabelle 1: Antigenpezifitäten und Primärantikörper für die Durchflusszytometrie (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland; PharMingen, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland; Immunotech, Marseille, Frankreich)

6.2 Analyse der Antigenexpression auf SHV-2-transformierten CTL

Charakterisiert wurden die Effektorzellen durchflusszytometrisch mittels direkter und indirekter Immunfluoreszenz. Im Mittelpunkt der Untersuchungen standen dabei die Expression von Aktivierungsmarkern, der prozentuale Anteil von CD8+ und CD4+ Zellen und die Expression von NK Zell-Markern.

7. Herstellung einer herpesvirus-saimiri-spezifischen DNA-Sonde

Um die Transformation der CTL mit Herpesvirus saimiri direkt auf Zellebene nachweisen zu können, musste eine spezifische DNA-Sonde hergestellt werden.

Hierzu bedienten wir uns einer 400 Basenpaar (bp) langen Sonde, die den StpC-Leserahmen aus der terminalen Sequenz von C488 (freundlicherweise bereitgestellt von Prof. Fickenscher) enthielt. Die in den Bluescript KS+ Vektor eingebaute Sonde wurde amplifiziert und nach ECO-R1 Verdau im Agarosegel (low melting point (LMP)-Agarose 1,5%, Sigma, München, Deutschland) aufgetrennt. Die Banden wurden aus dem Gel möglichst genau ausgeschnitten und mit einem Kit eluiert (Qiagen Elution Kit, Qiagen, Hilden, Deutschland) und gereinigt (GeneClean II Kit, BIO 101, La Jolla, USA).

Anschließend erfolgte die Oligomarkierung (random primed labeling) der DNA-Sonde mit Digoxigenin (DIG). Dazu wurde enzymatisch DIG-11-dUTP mit Hilfe des Klenow-Fragments der E. coli-DNA-Polymerase in die Sonde eingebaut (DIG-High-Prime, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland). Die Markierung der Sonde wurde im Dot-Blot-Verfahren nachgewiesen.

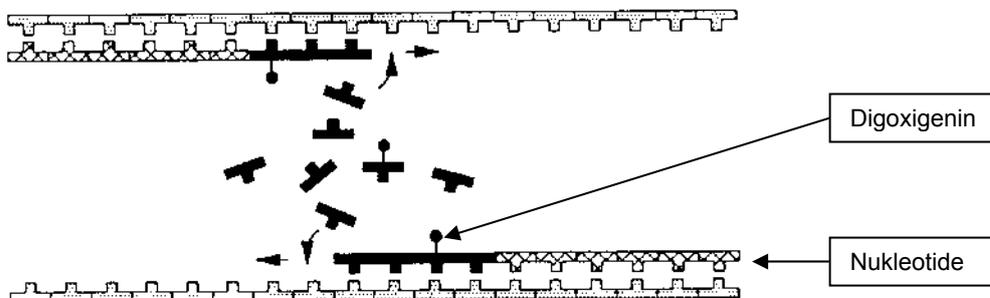


Abb.1: Oligomarkierung mit Digoxigenin markierten Nucleotiden

8. Herstellung der Präparate zur Hybridisierung

Es wurden von den verschiedenen Zelllinien mit CTL und Kontrollen auf Objektträgern Zell-Präparate angefertigt, um diese anschließend für die in situ Hybridisierung

zu verwenden. Dazu wurden 1×10^6 Zellen in einem Gemisch aus 3 Teilen Methanol und einem Teil Eisessig bei ca. $4 \text{ }^\circ\text{C}$ resuspendiert und für eine halbe Stunde bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Nach Zentrifugieren und Resuspension in einer minimalen Menge des Methanol/Eisessiggemisches wurden die Zellen auf einen Objektträger aufgetropft. Nach 24 Stunden im Kühlschrank war es nicht mehr nötig die so „aufgetropften Zellen“ zu fixieren. Unter dem Phasenkontrast-Mikroskop ließ sich die Güte der Präparate feststellen: gewünscht waren einzeln liegende Zellen.

9. In-situ-Hybridisierung

9.1 Vorbereitung

Die nach obiger Anleitung hergestellte 400 bp lange Sonde wurde in den weiteren Schritten zur Hybridisierung der angefertigten „aufgetropften Zellen“ verwendet.

Die in situ Hybridisierung nutzt die Vorgänge beim Denaturieren und Renaturieren einer DNA aus. Die Denaturierung oder das Schmelzen von DNA (Lösen der Wasserstoffbrückenverbindungen zwischen den kompletten Nukleotidpaaren) erreicht man am einfachsten durch Temperaturerhöhung oder einen alkalischen pH-Wert (Pardue und Gall; 1969, Cook et al., 1988). Schnelles Abkühlen nach dem Schmelzen hindert die Einzelstrang-DNA daran, sich sofort wieder zu einer Doppelstrang-DNA zusammenzulagern, d. h. die Zeit, in der die Einzelstrang-konfiguration vorliegt, wird verlängert.

Die Schmelztemperatur (T_m) einer doppelsträngigen DNA ist definiert als diejenige Temperatur, bei der 50% der DNA als Einzelstrang vorliegt. Die T_m beträgt etwa $50 - 100 \text{ }^\circ\text{C}$, je nach den vorliegenden Bedingungen. Zur Berechnung der T_m wurde folgende Formel herangezogen (Bolton und McCarthy, 1962):

$$T_m = 0,41(\%GC) + 16,6 \log [M] - 500/n - 0,61(\%\text{Formamid}) + 81,5 \quad (I)$$

%GC: prozentualer Anteil der Nucleotide Guanin und Cytosin der Sonde, in unserem Ansatz ca. 30%

[M]: Konzentration monovalenter Kationen (Na^+), in unserem Ansatz $0,3 \text{ mol/l}$

N: Länge der Sonde in bp, in unserem Ansatz 390 bp

%Formamid: Formamidkonzentration in Prozent, in unserem Ansatz 50%

Es ergibt sich also eine T_m von ca. $53 \text{ }^\circ\text{C}$ unter den genannten Bedingungen.

Zum Denaturieren liegt die optimale Temperatur (T_d) ca. 25 bis 30 °C oberhalb der Schmelztemperatur:

$$T_d = T_m + 25 \text{ °C (in unserem Ansatz ca. } 75^\circ\text{C)}$$

Die optimale Hybridisierungstemperatur (T_h) liegt etwa 15 - 20° C unterhalb T_m :

$$T_h = T_m - 15^\circ \text{ C (in unserem Ansatz } T_h \text{ ca. } 37^\circ\text{ C)} \quad (\text{II})$$

Die Mindestzeit für die Hybridisierung betrug 4 Stunden, die besten Ergebnisse lieferte ein Zeitraum von 12 bis 14 Stunden. Eine längere Inkubationszeit verschlechterte das Hybridisierungsergebnis im Sinne von vermehrtem Hintergrundrauschen.

Nach der Hybridisierung fand die sogenannte Waschprozedur statt, hierbei ist der Terminus „mismatch“ von Bedeutung. Mismatch gibt den prozentualen Anteil der heterologen DNA-DNA Hybride und damit durch die geringere Zahl von Wasserstoffbrückenbindungen instabilere Hybride an. Pro Prozent mismatch sinkt die T_m um 1,5° C.

$$T_{mm} = T_m - 1,5(\%\text{mismatch}) \quad (\text{III})$$

T_{mm} : Schmelzpunkt der heterologen Hybride

Dies bedeutet, dass bei einer unterhalb von T_m liegenden Waschttemperatur ein heterologes DNA-DNA Hybrid nicht wieder gelöst wird und eine unspezifische Bindung erhalten bleibt. Daher wurde versucht, bei der Waschprozedur möglichst nahe an die T_m des homologen DNA-DNA Hybrids zu kommen, da unter diesen Bedingungen die heterologen DNA-DNA Hybride instabil sind.

9.2 Hybridisierung

Die vorbereiteten Zytopräparate wurden ohne Fixierung und ohne Vorverdau für die in situ Hybridisierung verwendet.

Es erfolgte der Probenauftrag von 1,5 µl Hybridisierungsmix bestehend aus einem Gemisch aus 9 Teilen 50%igem „Mastermix“ (5 ml deionisiertes Formamid (Sigma, München, Deutschland), 2 ml 50% Dextransulfat (Sigma, München, Deutschland), 0,5 ml 20 x SSC, 0,4 ml Human COT-1 DNA (Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ad 9 ml Aqua dest.) und 1 Teil der Sondenlösung (ca. 0,5 - 2 mg/ml). Diese visköse Flüssigkeit soll das Präparat blasenfrei bedecken und anschließend soll es mit einem Deckglas abgedeckt und luftdicht abgeschlossen werden. Dann wurde für 7 Minuten bei 75 °C in einer feuchten Kammer denaturiert. Es erfolgte die Hybridisierung über Nacht für 12 - 14 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

9.3 Waschung

Die Waschungen erfolgten nach Entfernung des Deckgläschens 3 Mal für 7 Minuten bei 45 °C in 50% Formamid in 2 x SSC und anschließend für 1 Minute bei 45 °C in 2 x SSC.

9.4 Detektion der Sonde

Nach Abschluss der Waschprozedur wurden die Präparate in PNM Puffer (HNa_2PO_4 und H_2NaPO_4 auf pH 8 eingestellt mit 5% Magermilchpulver, Sigma, München, Deutschland) equilibriert. Das Magermilchpulver dient zum Abblocken unspezifischer Antikörper-Bindungen.

Im Folgenden wurden zur Detektion der Sonde und Amplifikation des Fluoreszenz-Signals mehrere Schritte mit Antikörperinkubationen durchgeführt.

- a) Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Anti-DIG-FITC AK von der Maus.
- b) Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Anti-Maus-FITC AK vom Schaf.
- c) Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur mit einem Anti-Schaf-FITC AK vom Esel.
(Alle Antikörper von Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Großbritannien)

Zwischen den Amplifikationsschritten erfolgten jeweils 3 Waschungen in PNM-Puffer über jeweils 3 Minuten.

Je nach Präparat reichten diese 3 Amplifikationsschritte, bei Bedarf könnten weitere Zwischenschritte eingebaut werden.

Abschließend erfolgte bei jedem Präparat noch eine Kern(DNA)färbung in blau mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol, (Sigma, München, Deutschland)). Die Präparate wurden für 3 Minuten in 2 x SSC gewaschen und für 5 Minuten mit DAPI (2,5 µl Stammlösung in 25 µl 2 x SSC) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Waschung für 3 Minuten in 2 x SSC wurden die Präparate eingedeckelt und konserviert.

Die Konservierung erfolgte mit Antifade (DABCO (1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan, (Sigma, München, Deutschland)) mit destilliertem Wasser, TRIS-HCl und Glycerin) und die Präparate wurden eingedeckelt.

10. Kontrollen

10.1 Positiv-Kontrollen:

Als Positivkontrollen dienten die CTL Linien, die bereits seit mehreren Monaten in unserem Labor unter oben genannten Bedingungen ohne weitere Antigen-Stimulation sich in Kultur befanden.

10.2 Negativkontrollen

Als Negativkontrollen für die DNA-Sonde dienten Zelllinien, die sicher nicht mit SHV infiziert waren. Insbesondere wurden die als Stimulator-Zellen eingesetzten mit EBV

immortalisierten B-Zelllinien der Patienten und kommerziell verfügbare T-Zelllinien wie Jurkat-Zellen oder Zelllinie-K-562 als Kontrollen benutzt.

11. Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Die Aufbewahrung von Effektor- und Zielzellen in flüssigem Stickstoff hat den Vorteil, dass diese beliebig lange gelagert werden können und bei eventuellem Bedarf für spätere Untersuchungen jederzeit zur Verfügung stehen.

Hierzu wurden 5×10^6 bis 1×10^7 Zellen in 1 ml FCS resuspendiert und in ein 1,8 ml-Kryoröhrchen (Fa. NUNC, Roskilde, Dänemark) überführt. Dann wurde den Zellsuspensionen 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) zugeführt, und anschließend erfolgte das sofortige Einfrieren bei -80 °C . Nach 24 Stunden wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt und bei -196 °C gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen für ca. 3 Minuten in ein 37 °C Wasserbad gestellt. Sofortiges Überführen der Zellen in warmes Kulturmedium und anschließendes zweimaliges Waschen verhinderten größere toxische Schädigungen der Zellen durch das DMSO. Die Zellen konnten anschließend wieder ohne Probleme in Kultur genommen werden.

12. Mycoplasmendetektion

Die Kontamination durch Mycoplasmen ist gerade bei Langzeitkulturen ein großes Problem. Schwer in den kultivierten Zellen zu erkennen, sind sie oft Ursache schlecht wachsender Kulturen und verfälschter experimenteller Ergebnisse.

Der Nachweis von Mycoplasmen erfolgte einmal alle 14 Tage mit einem kommerziellen ELISA (Mycoplasma Detection Kit, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Deutschland), wobei *M. argini*, *M. hyorhinae*, *M. laidlawii* und *M. orale* als häufigste Arten detektiert werden können. Kontaminierte Kulturen wurden sofort verworfen.

13. Berechnung, Graphik und Ausarbeitung

Die Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit einem kommerziellen Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft, München, Deutschland) bzw. einem Durchflusszytometrieprogramm (WinMDI, Version 2.8, freeware, <http://facs.scripps.edu/software.html>) durchgeführt. Für die Ausarbeitung wurde ein kommerzielles Textverarbeitungsprogramm verwendet (Word, Microsoft, München, Deutschland). Die mikroskopischen Bilder wurden an Carl Zeiss Lichtmikroskopen mit einer Digitalkamera von Nikon mit freundlicher Erlaubnis von Prof. Dr. Löffler II. Medizin Kiel erstellt.

IV. Ergebnisse

1. Wachstumsverhalten der SHV-2-transformierten CTL

1.1 Antigen-unabhängige Proliferation

Die sechs transformierten CTL-Linien (KL, JB, HM, SI, WB und IH) wurden im Verlauf der Kultivierung nicht mit Antigenen stimuliert.

In dreitägigen Abständen wurde den transformierten CTL-Kulturen Interleukin-2 zugegeben. Eine Erhöhung der IL-2 Konzentration zeigte keine signifikante Proliferationssteigerung im ^3H -Thymidin-Proliferationsassay, so dass zur Kultivierung eine IL-2 Konzentration von 30 U/ml ausreichend war.

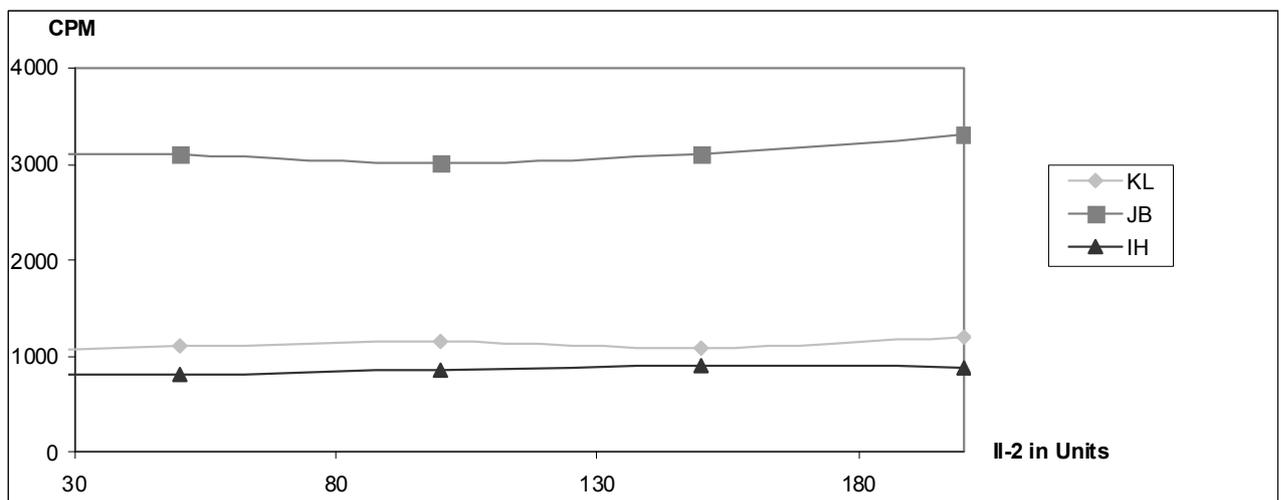


Abb.2: Die SHV-2-transformierten Lymphozyten zeigten keine Steigerungen der Proliferation nach Erhöhung der IL-2 Konzentration.

1.2 Wachstumsrate

Um die Proliferationsrate der transformierten Zellen zu bestimmen, wurde die Zellzahl einzelner Kulturen in einwöchigen Abständen (später zweiwöchige Abstände) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

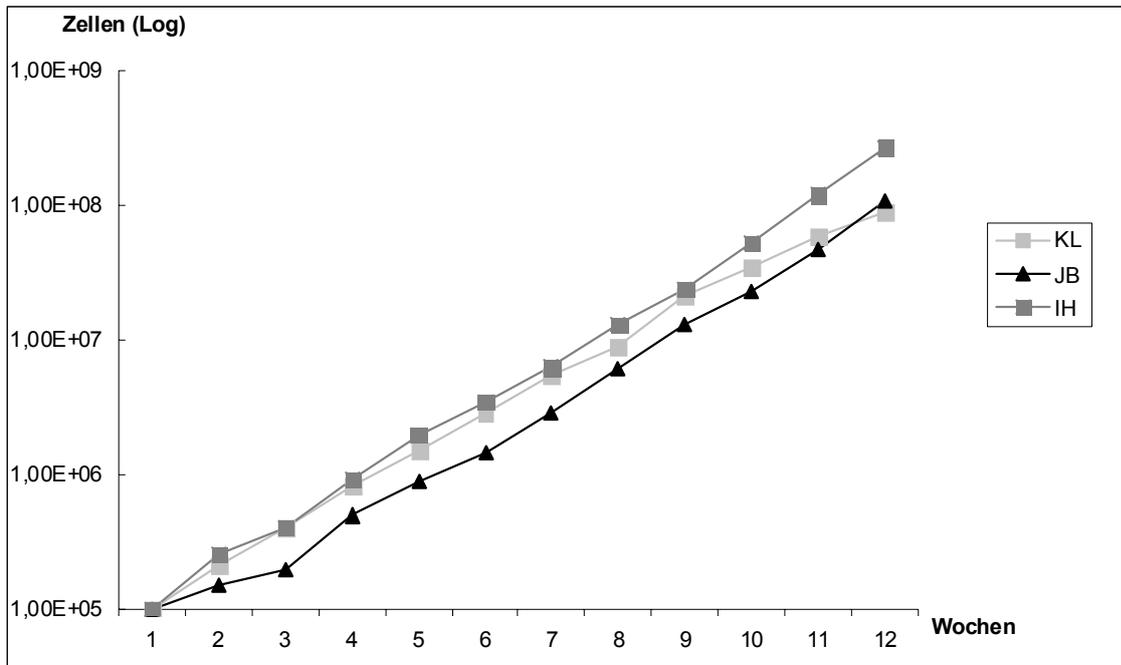


Abb.3: Logarithmische Darstellung der Proliferation von 3 Zelllinien.

2. Durchflusszytometrische Untersuchungen - Phänotypisierung der SHV-2-transformierten CTL

Um die transformierten Lymphozyten phänotypisch zu klassifizieren, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen auf die Expression unterschiedlicher Oberflächenmoleküle der Zellen vorgenommen.

Dabei untersuchten wir die Expression der T-Zell-Marker CD3 (auf allen T-Lymphozyten exprimiert), CD4 bzw. CD8 (auf MHC-Klasse-II- bzw. MHC-Klasse-I-restringierten Zellen exprimiert), die Expression des T-Zell-Rezeptors α/β , sowie das nach Antigenstimulation in hohem Maße vorkommende Oberflächenmolekül CD45RO. Eine weitere wichtige Untersuchung war der Nachweis von NK-Zellpopulation, die auf der Zelloberfläche CD16 exprimieren bzw. von NK-ähnlichen T-Zellen, die durch Coexpression von CD56 charakterisiert sind.

Die durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass sich alle sechs Zelllinien in ihrem Phänotyp nur im Bezug auf ihre CD56 Expression hin unterscheiden (s.u.).

Fast alle Zellen in den Kulturen zeigten eine nahezu 100%ige CD3-Expression und davon sind über 70% CD8+ T-Lymphozyten. Diese Zellen liegen im aktivierten Zustand mit starker Expression des T-Zell-Rezeptors α/β und CD45RO vor.

Bemerkenswerterweise zeigten die T-Lymphozyten eine starke Coexpression des NK-Oberflächenmoleküls CD56. Dieses NK-Oberflächenmolekül kommt nur zu ungefähr 1 bis 5 Prozent in unkultivierten T-Lymphozytenpopulationen vor.

2.1 Expression der T-Zellmarker CD3, CD4, CD8, und TCR α/β

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen exemplarisch die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse der CD3-, CD4-, und CD8-Moleküldichte und der TCR α/β -Expression auf den SHV-2-transformierten Effektorzellen. Bei den Effektoren handelt es sich zu 80 bis 100% um zytotoxische T-Zellen mit einer Coexpression von CD3+ und CD8+ mit einer über 95%igen TCR α/β -Expression. CD 4 wird nur in seltenen Fällen mit CD 8 gemeinsam auf Zellen exprimiert, Zellen, die nur CD3 und CD4 ohne CD8

trugen, waren nicht nachweisbar. Eine Co-Expression von CD4 und CD8 fand sich in 1 - 28% der CD3+ Zellen.

Zelllinie KL

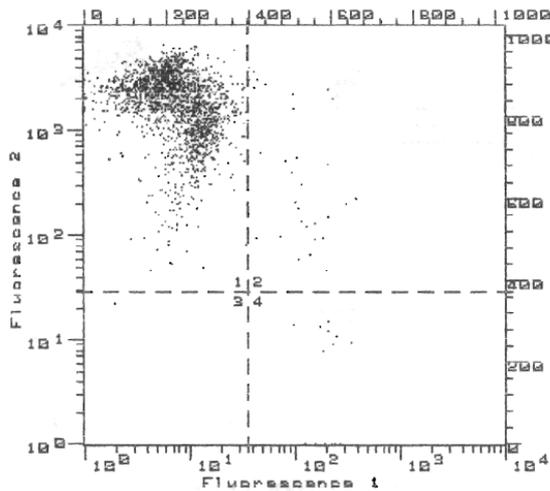


Abb.4: CD4 vs. CD8

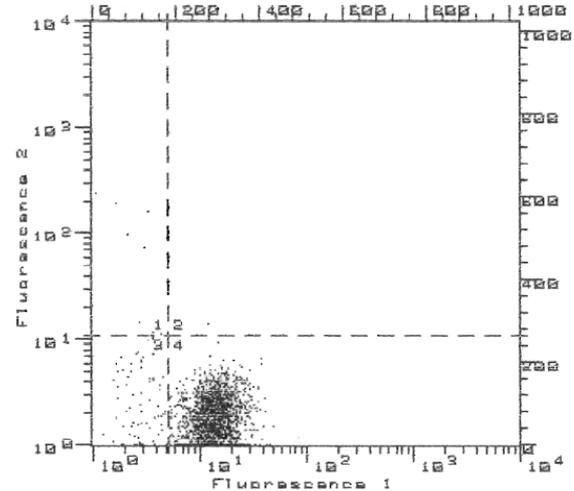


Abb.5: TCR α/β vs. TCR gamma/delta

2.2 CD45RO-Expression

Die durchflusszytometrische Analyse zeigte ebenfalls eine über 95%ige Expression des nach Aktivierung vorzufindenden Oberflächenmoleküls CD45RO auf allen sechs Effektor-Zelllinien. Dargestellt ist diese Untersuchung exemplarisch in der Abbildung 6.

Zelllinie WB

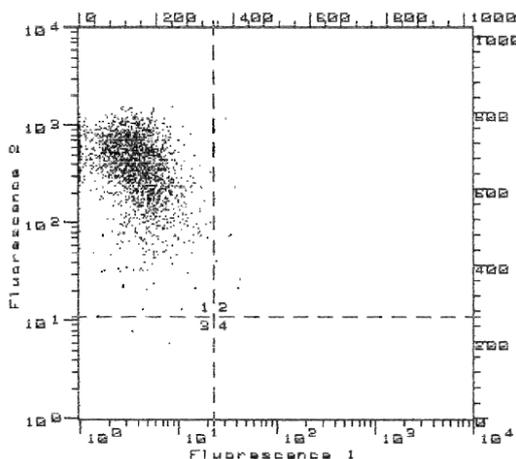
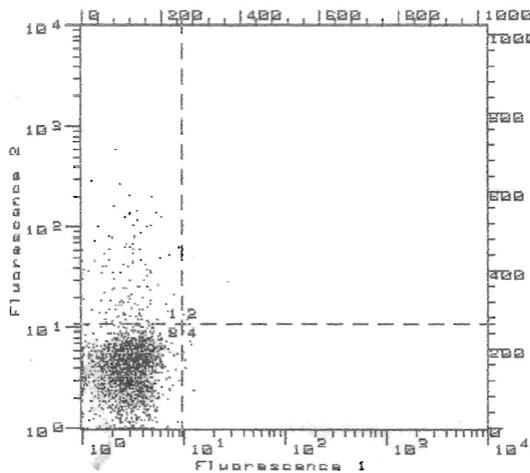


Abb.6: CD45RA vs. CD45RO

2.3 CD3- und CD16-Expression

Mit der Durchflusszytometrie wurde die Dichte der CD16-Oberflächenmoleküle auf den transformierten Effektorzellen untersucht. Hierbei konnte keine signifikante CD16+-Zellpopulation nachgewiesen werden.

Zelllinie WB



Zelllinie KL

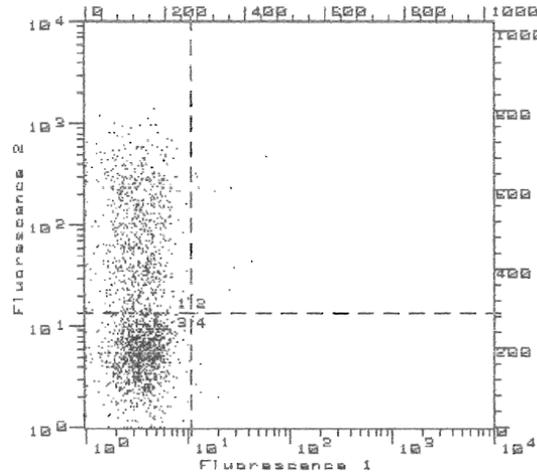


Abb. 7: CD16 vs. CD56

Abb. 8: CD16 vs. CD56

Abb.7 und 8: CD16 vs. CD56. Durchflusszytometrische Analyse der CD16-Moleküldichte auf den transformierten Effektoren. NK-Zellen (CD16+) konnten nicht in signifikanter Anzahl nachgewiesen werden.

2.4 Coexpression von CD56

Die durchflusszytometrische Analyse der CD56-Moleküldichte auf den Effektorzellen zeigte unterschiedliche Prozentsätze von Co-Expressionen in den sechs SHV-2-transformierten Zelllinien. Es fand sich in einer Zelllinie (WB) eine mit ca. 9% kleine, in 4 Zelllinien (KL, IH, SI und HM) eine mit 40 - 55% mittlere und in einer Zelllinie (JB) eine mit ca. 78% große T-Zellpopulation mit NK-Oberflächenmolekül (CD3+/CD56+). Exemplarisch ist hier jeweils eine Zelllinie für niedrige, mittlere und hohe Co-Expression von NK-Oberflächenmolekül (CD3+/CD56+) dargestellt.

Zelllinie WB

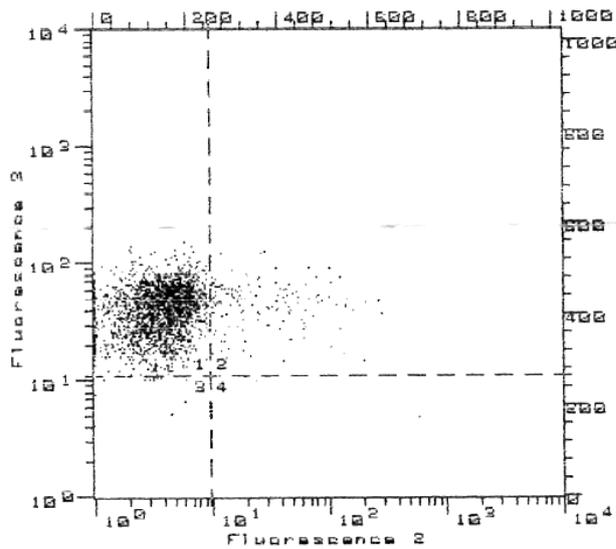


Abb.9: CD56 vs. CD3. Die transformierten CTL der Zelllinie WB wiesen eine ca. 9%ige Expression des NK-Markers CD56 auf.

Zelllinie IH

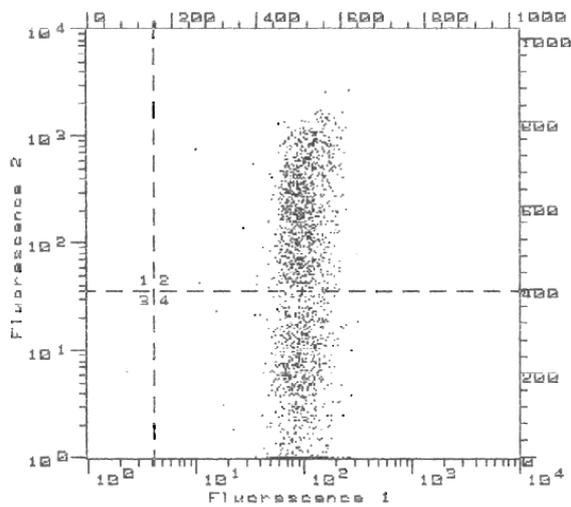


Abb.10: CD3 vs. CD56. Die transformierten CTL der Zelllinie IH zeigen eine ca. 55%ige Coexpression des NK-Markers CD56.

Zelllinie JB

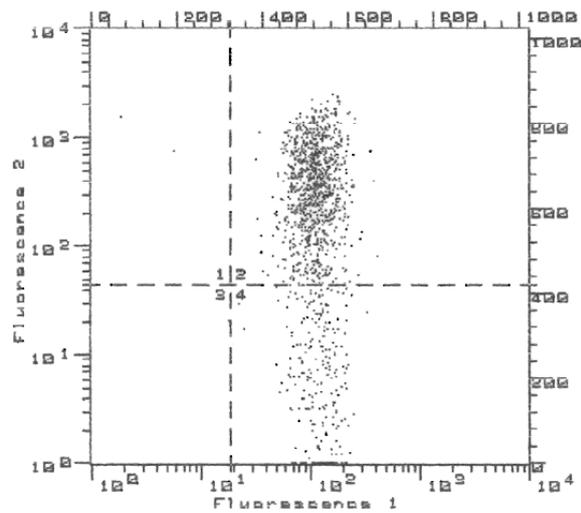


Abb.11: CD3 vs. CD56. Die transformierten CTL der Zelllinie JB wiesen eine ca. 78%ige Expression des NK-Markers CD56 auf.

3. Qualitätsprüfung einer Herpesvirus-saimiri-spezifischen DNA-Sonde

Um im weiteren Verlauf die Virustransformation der CTL nachzuweisen, wurde eine Herpes-saimiri-spezifische DNA-Sonde hergestellt. Die dafür bereitgestellten DNA-Fragmente wurden mit unterschiedlichen Methoden aufbereitet und auf ihre Hybridisierungsfähigkeit getestet. Als gut praktikable Methode mit der optimalen Sonde hat sich das oben beschriebene Verfahren herausgestellt. Nach Amplifikation und Verdau des Bluescript-Vektors wurde die Sonden DNA im Agarosegel aufgetrennt. Die erwartete Bande bei ca. 400 bp zeigte sich sehr gut.

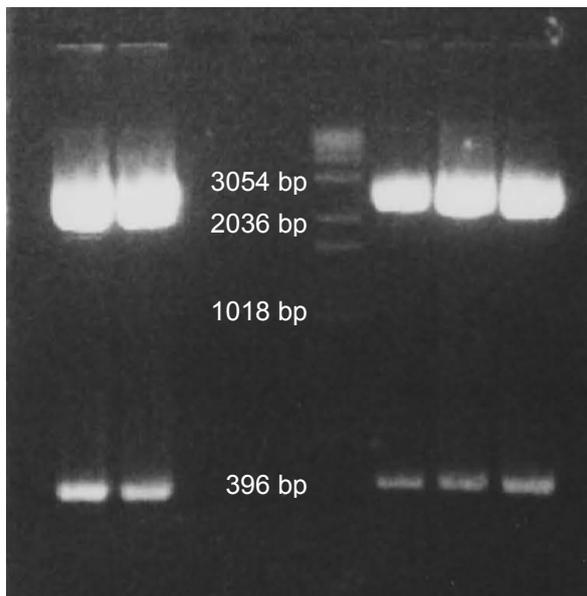


Abb. 12: Agarosegel nach dem Auftrennen verschiedener Ansätze (Konzentrationsunterschiede) zeigte sich eine gut sichtbare ca. 400 bp große Bande, die ausgeschnitten und weiterverarbeitet wurde.

Nach dem Aufreinigen der ausgeschnittenen Banden erfolgte der Schritt der Oligo-Markierung. Die Markierung wurde Anhand des Dot-Blot- und des Southern-Blot-Verfahrens überprüft. Mit der kleineren, ca. 400 bp großen, Sonde zeigten sich hier gute Ergebnisse mit einem gut praktikablen und einfach reproduzierbaren Verfahren.

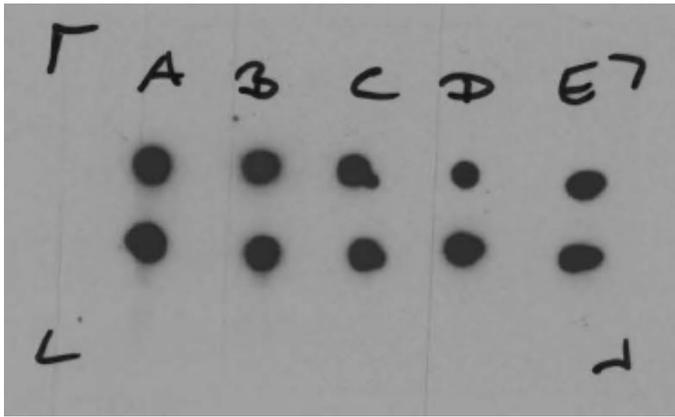


Abb. 13: einfacher Dot Blot mit verschiedenen Verdünnungen zur Kontrolle der Markierung mit Digoxigenin

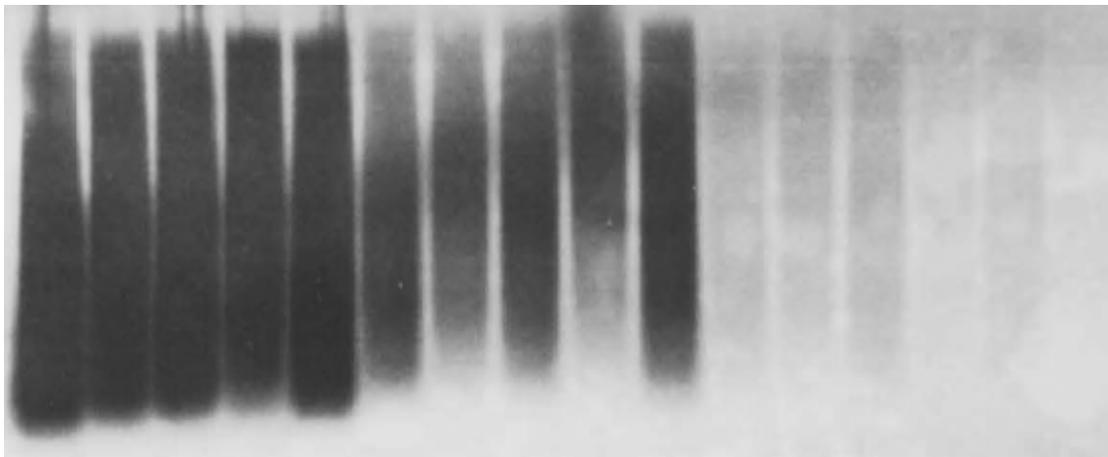


Abb. 14: Southern Blot der DIG markierten DNA Sonde in verschiedenen Verdünnungen aus den verschiedenen Ansätzen.

4. Fluoreszenz in situ Hybridisierung

4.1 Präparate

Schon die Tatsache, dass eine mindestens 6 monatige Kultivierung der Zellen ohne erneute Antigenstimulation gelang, spricht für eine Virustransformation.

Ziel der Arbeit war es jedoch, die Transformation der einzelnen Zelle zu einem beliebigen Zeitpunkt nachzuweisen. Mittels der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) mit der hergestellten DNA-Sonde konnte in den Zellen aller 6, mit SHV2-C488 immortalisierten Zelllinien, spezifische Virus-DNA nachgewiesen werden. In den Zellen fanden sich die per Sonde markierten Virus-DNA-Abschnitte im Zellkern als Episomen in einer hohen Kopiezahl.

Die durchgeführten Versuchsansätze mit Vorverdau der Zytopräparate mit Trypsin (Sigma, München, Deutschland) führten zu schlechteren Ergebnissen: Die Virus-DNA wurde nicht mehr im Kern nachgewiesen, es kam zu einer unspezifischen Färbung des gesamten Präparates. Ebenso brachte die vorherige Fixierung der Zytopräparate keinen Vorteil, die Sonden konnten teilweise nicht in die Zellen eindringen und das Signal war deutlich abgeschwächt.

Im Folgenden sind mehrere Präparate unterschiedlicher Zelllinien mit dem Nachweis der Transfektion zu sehen. In allen Präparaten sind die im Kern liegenden grünen Punkte Korrelat für die Virus-DNA, die über die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit dem Fluoreszenz Farbstoff FITC sichtbar gemacht wurde.

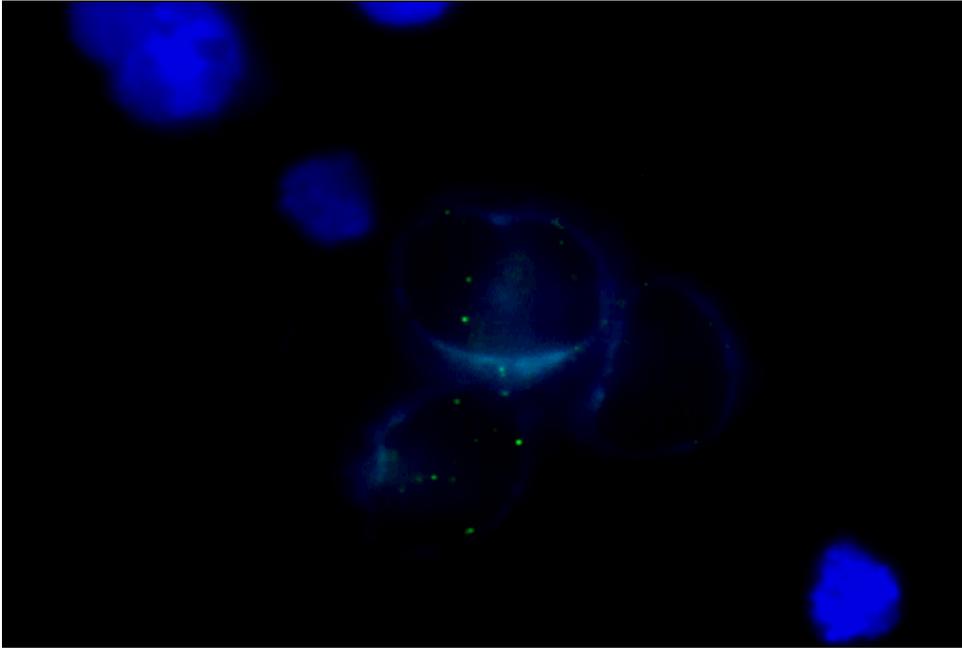


Abb. 15: Zelllinie KL

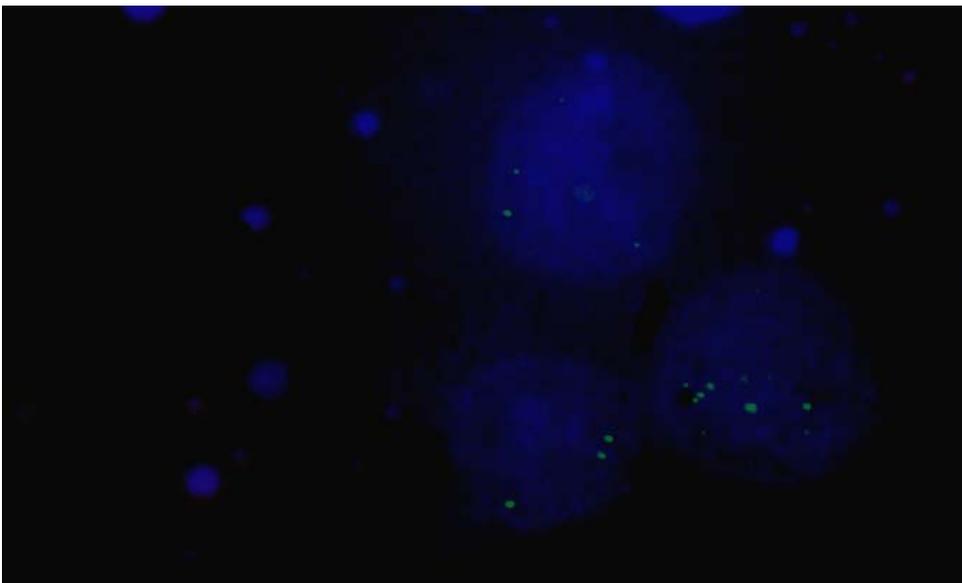


Abb. 16: Zelllinie IH

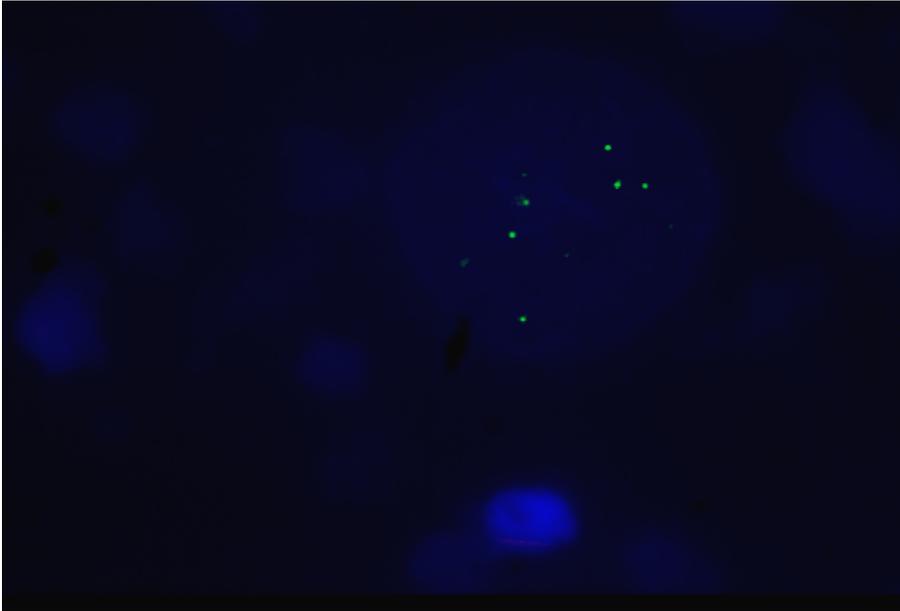


Abb. 17: Zelllinie SJ

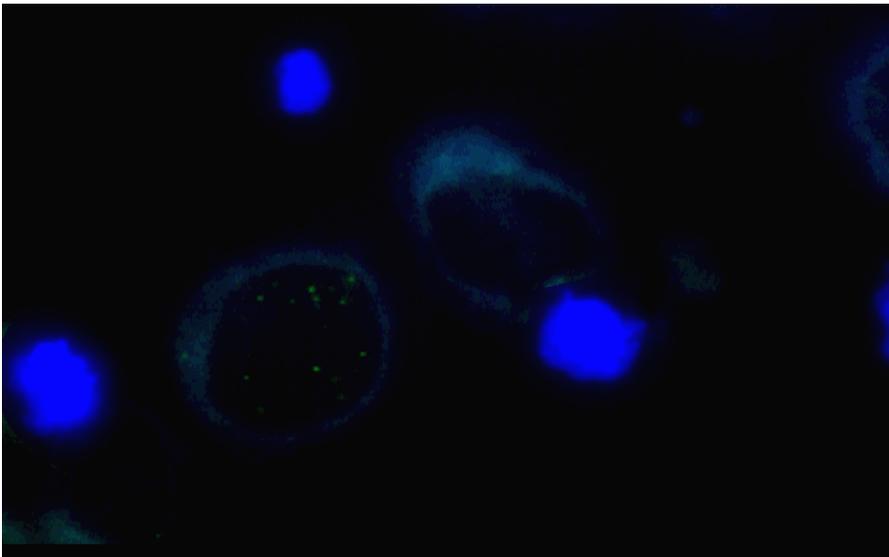


Abb. 18: Zelllinie JB

4.2 Kontrollen

4.2.1 Verfahrenskontrolle

Als Kontrolle des gesamten Hybridisierungsverfahrens wurde an EBV-transformierten B-Zellen eine kommerziell erworbene EBV-DNA-Sonde (Biohit Oy, Helsinki, Finland) getestet.

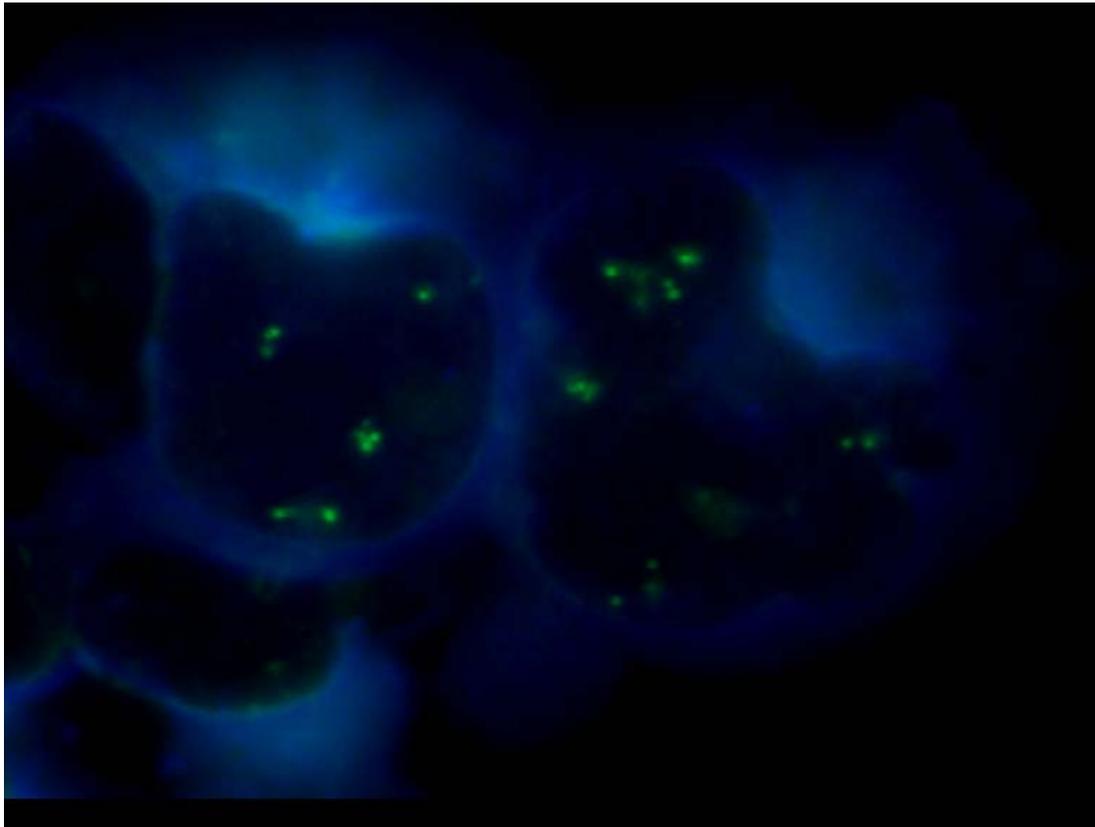


Abb. 19: EBV immortalisierte Zielzelle (B-Zelle) mit Nachweis des EBV-Genoms. Die blaue Färbung der Zellmembran ist hier ein CD19 Antikörper mit AMCA (amino-methyl-coumarin-acetate) Farbstoff.

4.2.2 Negativkontrolle

An keiner der als Negativkontrollen eingesetzten Zelllinien konnte mit der DNA-Sonde und dem beschriebenen Verfahren ein Signal nachgewiesen werden. Auf diese Art und Weise konnte demonstriert werden, dass eine unspezifische Bindung der DNA-Sonde in unserem Versuchsansatz nicht vorkommt. Dass es allerdings mit anderen Rhadinoviren zu einer Kreuzreaktion kommt, kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

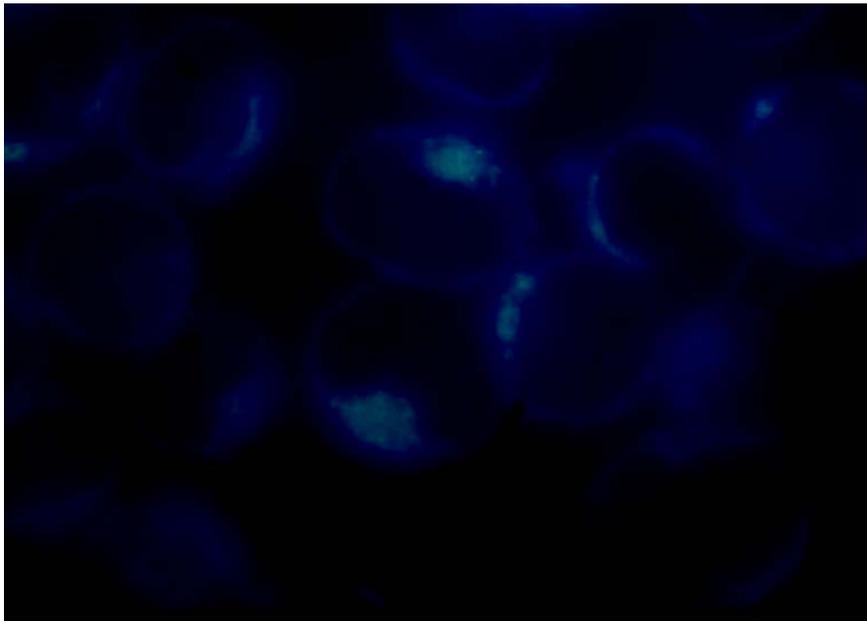


Abb. 20: Jurkat-Zellen nach Hybridisierung mit der Herpesvirus saimiri DNA-Sonde

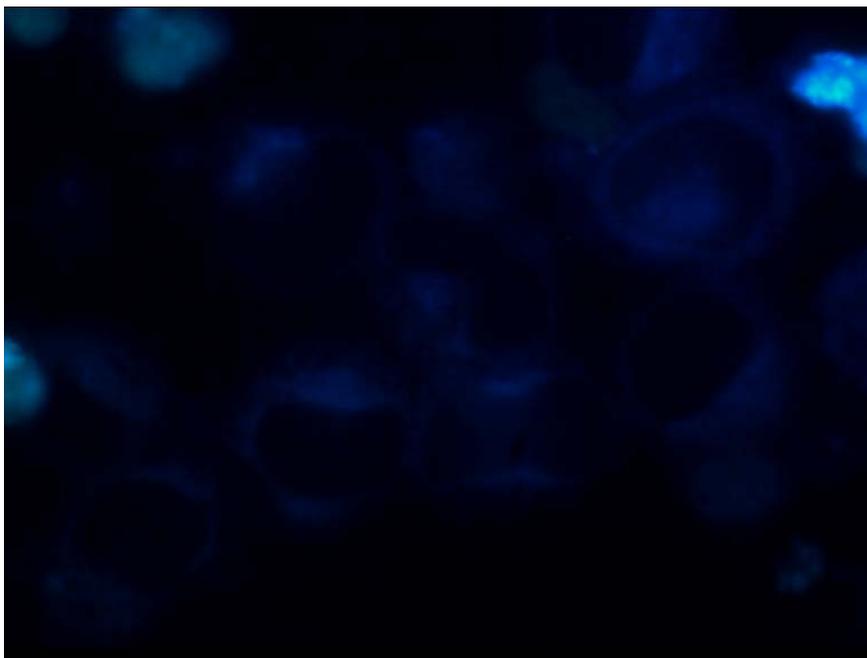


Abb. 21: K562-Zellen nach Hybridisierung mit der Herpesvirus saimiri DNA-Sonde

4.3 Verfahrensbewertung

Unter Anwendung der oben genannten Formeln zur Bestimmung von Schmelztemperatur, Stringenz und Mismatch ergibt sich ein Mismatch von 14%. Das bedeutet, dass nur noch DNA-DNA Hybride die Waschung überstehen, die mindestens zu 86% homolog sind. Die Stringenz, mit der die in situ-Hybridisierung durchgeführt wurde, bestimmt den ungefähren Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im Doppelstrang aus DNA-Sonde und Zielsequenz. In obigem Verfahren wurde besonders für die Waschungen ein stringenter Ansatz gewählt.

Bei einer T_m von 53°C und einer Waschtemperatur (T_a) von 45 °C ergibt sich bei einer Sondenlänge von ca. 400 bp nach folgender Formel eine Stringenz von 92%:

$$\text{Stringenz (\%)} = 100 - M_f (T_m - T_a)$$

M_f : Fehlpaarungsfaktor (1 für Sonden über 150 bp, 5 für Sonden unter 20 bp)

T_m : errechnete Schmelztemperatur, s. o.

T_a : Hybridisierungs- bzw. Waschtemperatur, s. o.

V. Diskussion

1. Virustransformation von Lymphozyten

Die virus-induzierte Transformation von Zellen ermöglichte Anfang der 80er Jahre einen erheblichen Fortschritt bei den molekularbiologischen und immunologischen Untersuchungen von Lymphozyten. Auf diese Weise konnte man zwei große Probleme lösen. Zum Einen, das der häufig zu geringen Zellzahlen in den Kulturen und zum Anderen, das der oft zu kurzen Lebensdauer von in Kultur gehaltenen Lymphozyten. Eine weitere Schwierigkeit stellte der Erhalt der Antigen-Spezifität von T-Zellen dar. Regelmäßige Antigen-Stimulation (durch inaktivierte „bestrahlte“ Zellen) brachte einen erheblichen Kulturaufwand mit sich. Daneben konnten die als Antigen fungierenden Zellen die Zellkulturen verunreinigen und Interpretationen von Ergebnissen deutlich erschweren. Die Immortalisierung von Lymphozyten schien der ideale Weg zur Lösung dieser Probleme zu sein.

Das humane T-Zell-Leukämie-Virus Typ 1 (HTLV-1) transformiert humane T-Lymphozyten und führt somit zu kontinuierlich stabil wachsende Zellkulturen (Miyoshi *et al.* 1981, Yamamoto *et al.* 1982, Faller *et al.* 1988, Persaud *et al.* 1995). In zahlreichen Versuchsansätzen erwiesen sich diese als nützliche Untersuchungsobjekte, wobei die transformierten T-Zellen phänotypisch zum größten Teil CD4 positiv waren. Unglücklicherweise zeigten die Zellen nach längerer Kultivierung (2 bis 4 Monate) einen Verlust ihrer Zytotoxizität, ihres T-Zell-Rezeptors und ihrer Interleukin-2-Abhängigkeit (Inatsuki *et al.* 1989, Yssel *et al.* 1989). Aus biosicherheitstechnischen Gründen ist die permanente Produktion von Retroviren durch die transformierten T-Lymphozyten-Kulturen bedenklich.

Humane B-Lymphozyten können durch das Epstein-Barr-Virus effizient immortalisiert werden (Nilsson *et al.* 1982, Tosato *et al.* 1997). Wegen der erhaltenen antigen-präsentierenden Eigenschaften können sie – als Zielzelle eingesetzt – somit als mittlerweile etablierte Methode dazu dienen, die Antigen-Spezifitäten von T-Lymphozyten zu untersuchen.

Die im murinen Modell erfolgreiche Technik der T-Zell-Hybridom-Fusion spielt bei humanen T-Zellen aufgrund der Instabilität der T-Zell-Klone eine eher untergeordnete Rolle.

T-lymphoblastische Tumor-Zelllinien, wie z.B. „Jurkat“, weisen im Vergleich zu nativen Lymphozyten unterschiedliche phänotypische Eigenschaften auf, ebenso gibt es starke Unterschiede in der Genregulation und Signaltransduktion.

Die Immortalisierung von T-Zellen durch das Herpesvirus saimiri führt wie beschrieben zu permanent wachsenden Kulturen ohne weitere Antigen-Stimulation bei erhaltener T-Zell-Spezifität und erhaltenem T-Zell-Phänotyp und stellt somit letztendlich eine Fortführung etablierter Labormethoden dar.

2. Biologische Sicherheit

Wie gefährlich das Herpesvirus saimiri für den Menschen wirklich ist, kann mit letzter Sicherheit zum jetzigen Zeitpunkt niemand sagen. Intravenöse Gaben von hohen Dosen des reinen SHV-2 (10^6 plaqueforming units pro ml) verursachen akute Lymphome mit letalem Ausgang bei nahen Verwandten des Menschen, den Macaquen (Knappe *et al.* 2000). Dahingegen wurden SHV-2-transformierte T-Zellen nach autologer Reinfusion vom Wirtsorganismus ohne Anzeichen einer Erkrankung toleriert.

Bekanntermaßen persistiert das Virusgenom als Episom in transformierten T-Zellen. Nach autologer Transfusion konnte Virus-DNA mittels durchgeführter PCR für mehrere Monate in mononukleären Blutzellen (PBMNC) und kultivierten T-Zellen nachgewiesen werden. Diese PCR-DNA-Signale scheinen den transfundierten Zellen zu entstammen (Knappe *et al.* 2000). Ebenfalls per PCR wurde auf Einzelklonbasis die Persistenz von Herpesvirus saimiri Genom in T-Lymphozyten nach Transfektion einzelner Zellen (limiting dilution cloning) nachgewiesen (Lehner *et al.* 2009).

Die Produktion von Viruspartikeln unter normalen Umständen konnte bis heute nicht nachgewiesen werden (Biesinger *et al.* 1992, Fickenscher *et al.* 1996, Bröker *et al.* 1999, Hiller *et al.* 2000). Allerdings gelang es mit sehr starken Lyseinduktoren (Histondeacetylaseinhibitor Trichostatin A) in den immortalisierten T-Zellen die frühe lytische Phase zu induzieren (Alberter, 2008). Vor einem klinischen Einsatz muss aus diesem Grunde die Replikation von Herpesvirus saimiri-Vektoren im Zielorganismus durch transformierte Zellen sicher auszuschließen sein.

Bestrebungen, ein Suizidgen in das Genom von Herpesvirus saimiri einzubauen (Hiller et al. 2000) bzw. replikations-freie Varianten herzustellen, lassen jedoch den Einsatz SHV-2-transformierter T-Zellen in der zellulären Immuntherapie möglich erscheinen.

3. Transformation von T-Lymphozyten durch Herpesvirus saimiri

3.1 Genom und Transfektionsmechanismus

Herpesvirus saimiri (Melendez *et al.* 1968), nach dem Internationalen Komitee für Virustaxonomie SHV-2 („saimiri herpesvirus Typ 2“) abgekürzt, ist ein γ_2 -Herpesvirus, dessen natürlicher Wirt der Totenkopffaffe (*saimiri sciureus*) ist. Leicht von peripherem Blut der meisten Totenkopffaffen zu isolieren (Falk *et al.* 1972), kann es in großen Mengen durch Infektion von Nierenzellen der Nachtaffen gewonnen werden (Fickenscher und Fleckenstein, 1998).

Das Virusgenom war und ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Es persistiert in transformierten T-Zellen als nicht integriertes Episom. Die DNA der Viruspartikel ist linear angeordnet. Das Herpesvirus saimiri Genom umfaßt eine 112 kb große, charakteristische DNA-Sequenz, die beidseits von einem nicht codierenden DNA-Segment flankiert wird. Der Herpesvirus saimiri Prototyp Stamm A11 wurde bereits sequenziert und weist 76 offene Leserahmen (open reading frames, ORF) auf. Nachweisbar ist eine hohe Anzahl von Genen, die Homologien zu zellulären Proteinen aufweisen, wie z. B. Thymidylatsynthetase, Dihydrofolatdehydrogenase, Complement kontrollierende Proteine, CD59 und Bcl12 (Albrecht *et al.* 1992, Albrecht und Fleckenstein, 1994, Fickenscher *et al.* 1996). Während des lytischen Viruswachstums nachgewiesen, könnten sie eine wichtige Rolle bei der Virusreplikation spielen.

Essentiell für die Onkogenität und insbesondere für die Transformation von T-Zellen scheint der links terminale Anteil der Virus-DNA zu sein (Biesinger *et al.* 1992). Diese Region wird in drei Untergruppen (subgroups A, B, C) unterteilt, wobei nur die „subgroup C“ in der Lage ist, humane T-Zellen dauerhaft und antigen-unabhängig zu immortalisieren. Zwei in transformierten T-Zellen nachgewiesene virale Proteine scheinen hierbei eine Schlüsselrolle zu spielen, nämlich StpC (saimiri transformation

associated protein of C-strain) und TIP (tyrosinkinase interacting protein) (Biesinger *et al.* 1995 Jung *et al.* 1995, Fickenscher *et al.* 1997).

Der Weg der Einschleusung des SHV-2 in die Zellen und damit der Mechanismus der Transformation sind bis heute unklar. Trotz vieler Analogien zum Epstein-Barr-Virus, das an den Complement-Rezeptor (CD21) der B-Lymphozyten bindet und diese lebenslänglich infiziert, gibt es sicherlich Unterschiede im Transfektionsmechanismus. Der vom Herpesvirus saimiri benutzte Rezeptor muss auf den verschiedenen Geweben auch unterschiedlicher Spezies weitverbreitet sein, da sowohl hämatopoetische Zellen als auch epitheliale und mesenchymale Zellen infiziert werden (Fickenscher u. Fleckenstein 2001). Vom TCR-Komplex ist die Transformation allerdings unabhängig, da neben Zellen mit defektem CD3-Oberflächenmolekülen auch T-Lymphozyten mit defektem T-Zell-Rezeptor infiziert werden konnten. Versuche, NK-Zellen durch das Herpesvirus saimiri zu immortalisieren, verliefen im Gegensatz dazu frustan (unveröffentlichte Versuche der eigenen Arbeitsgruppe).

3.2 Wachstumsverhalten und Phänotyp

Die durch das Herpesvirus saimiri transformierten T-Zellen wachsen am besten in hoher Zelldichte, sind Interleukin-2-abhängig, jedoch antigen-unabhängig. Unter diesen Kulturbedingungen vermehren sich die Zellen in einer Woche um den Faktor zwei bis vier (Biesinger *et al.* 1992). Die von uns untersuchten transformierten T-Lymphozyten bestätigten diese Beobachtungen. Ohne Antigen-Stimulation zeigten alle sechs Zelllinien ein kontinuierliches Proliferationsverhalten mit einer wöchentlichen Verdoppelung der Zellzahlen (Abb.2, S.22). Eine Erhöhung der Interleukin-2 Dosierungen während der Kultivierung erbrachte keine signifikante Proliferationssteigerung (Abb.3, S.23), so dass eine Interleukin-2-Gabe von 30 U/l alle drei Tage zu den Zellkulturen ausreichend erscheint.

Zahlreiche Untersuchungen von Herpesvirus saimiri transformierten T-Zellen haben nachweisen können, dass diese Zellen phänotypisch reifen, aktivierten CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Lymphozyten entsprechen, die neben ihrer Zytotoxizität auch ihre Fähigkeiten zur Zytokinproduktion und Signaltransduktion beibehalten, allerdings ihr Zytokinmuster eher in Richtung Typ 1 T-Helferzellen verschieben (Biesinger *et al.* 1992,

Weber *et al.* 1993, Bröker *et al.* 1993, De Carli *et al.* 1993, Mittrücker *et al.* 1993, Berend *et al.* 1993, Tsygankov 2005). Die durchflusszytometrischen Untersuchungen aller sechs Zelllinien zeigten, dass der größte Anteil (jeweils über 80%) der über viele Monate in Kultur gehaltenen transformierten T-Zellen zytotoxische T-Lymphozyten (CD3+/CD8+) sind, die eine hohe Expression des T-Zell-Rezeptors α/β aufweisen (Abb.5, S.24). Ebenso fand sich auf vielen Zellen das auch bei aktivierten cytotoxischen T-Zellen nachweisbare Oberflächenmolekül CD45RO.

Bis zum heutigen Zeitpunkt konnten bei SHV-2-transformierten Lymphozyten weder die B-Zellmarker (CD1 und CD19) noch die NK-Oberflächenmoleküle (CD16 und CD57) nachgewiesen werden. Der NK-Zellmarker CD56, auch in geringem Maße auf T-Zellen zu finden (1 bis 5%), konnte bis jetzt nur auf wenigen transformierten T-Zelllinien nachgewiesen werden (Meinl *et al.* 1995).

Interessanterweise erbrachten unsere durchflusszytometrischen Untersuchungen den Nachweis einer hohen Coexpression des Oberflächenmoleküls CD56. Vier Zelllinien waren zu über 40% und eine sogar zu knapp 80% phänotypisch T-Zellen mit NK-Funktion (CD3+/CD56+) (Abb.9f, S.27). Aus der Literatur heraus kann das Herpesvirus saimiri nicht in ursächlichem Zusammenhang mit dieser hohen CD56-Coexpression der transformierten CTL gebracht werden; ein solcher ist aber letztendlich nicht sicher auszuschließen. So könnten phänotypische Unterschiede der transformierten T-Zellen durch verschiedene Stämme der „subgroup C“ bedingt sein (Fickenscher *et al.* 1997). In unserem Versuchsanstz lässt sich dieses Phänomen besser über die vorhandenen Kulturbedingungen und die Art der Antigenstimulation mit syngenen antigen-präsentierenden Zellen aus Patienten mit einer chronischen Krankheit erklären. Andere Gruppen, die nicht unselektiv mit Phytohämagglutinin, sondern mit spezifischen antigenpräsentierenden Zellen stimulierten, erhielten eine ähnliche clonale Selektion mit einem hohen Anteil an CD8+/CD56+ NK-like CTL (Mosoian *et al.* 2000). Dies unterstützt die Theorie, dass es möglich ist, autologe CML-spezifische zytotoxische T-Zellen mit NK-like-Funktion von Patienten mit CML zu isolieren und ggf. nach Expansion zur Bekämpfung der minimal residual disease einzusetzen.

4. Herstellung der Sonde

Um bereits im frühen Stadium nach Inkubation der T-Zellen mit dem Herpesvirus saimiri in der Lage sein zu können deren Immortalisierung auf Einzelzellebene nachzuweisen, wurde der Weg der *in situ* Hybridisierung gewählt. Die *in situ* Hybridisierung erfüllt die gestellten Anforderungen: einfache Anwendung eines etablierten Standardverfahrens in der immunologischen Zellforschung, Nachweismöglichkeit auf Einzelzellebene mit der Möglichkeit im selben Moment auch noch den Phänotyp der Zelle zu bestimmen. Dies könnte ohne großen weiteren Aufwand im selben Arbeitsschritt in Anlehnung an die FICTION-Technik (fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics as a tool for the investigation of neoplasms) erfolgen (Martín-Subero et al., 2002).

Nach einigen Versuchen gelang es mit dem 400 bp großen DNA-Fragment aus dem ORF1 von Herpesvirus saimiri Untergruppe C488, konstante Ergebnisse bezüglich der Vervielfältigung und der Oligomarkierung mit Digoxigenin zu erhalten. Die Versuche mit einer längeren Sonde wurden aufgrund von falsch negativen Ergebnissen wegen Schwierigkeiten mit der Zellwand-Penetration eingestellt. Größere Fragmente sind in der Hybridisierung spezifischer, was die Paarung mit der Ziel-DNA betrifft; die Hybridisierungs- und Waschvorgänge können dann weniger stringent gewählt werden. Allerdings ist es für größere Fragmente auch deutlich schwieriger die Zellmembran zu penetrieren und es kann durch notwendige Vorverdau-Schritte zu einer Auflösung der Zellulären Matrix und somit zu einem falsch negativen Ergebnis kommen. Unsere Versuche mit einer kürzeren Sonde führten zu unspezifischen Signalen. Bei kleineren Fragmenten spielt hauptsächlich die Fehlpaarung eine Rolle, es kommt vermehrt zu falsch positiven Ergebnissen, da die Sonde bei weniger stringenter Hybridisierungs- und Waschvorgängen zur Fehlpaarung neigt. Die Markierung mit Digoxigenin ist im Vergleich zur Radionuklidmarkierung deutlich einfacher im Umgang und liefert über die Markierung mit an Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Antikörpern in der Fluoreszenzlicht-Mikroskopie eindeutige Ergebnisse. Jeder Arbeitsschritt ist über einfache etablierte Methoden (z.B. dot blot, Southern blot) leicht zu überprüfen und damit die gesamte Methode wenig anfällig gegenüber Fehlern.

5. Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist ein Standardverfahren, das hauptsächlich in der molekularen Zytogenetik seine Anwendung findet. Das Verfahren ist weit erprobt und auch weitgehend automatisiert verfügbar (Jin und Lloyd 1997).

In der vorliegenden Arbeit musste die DNA-Sonde, die zur Hybridisierung und somit zum Nachweis des Herpesvirus saimiri Genoms verwendet wurde, erst hergestellt werden, da diese kommerziell nicht verfügbar war. Das 400 bp große Stück eignete sich sehr gut sowohl für die Penetration in die Zielzelle, als auch um eine gute Bindung an die Virus-DNA im Sinne einer guten Spezifität zu erreichen. Insgesamt wurde mit rechnerisch 92 % Stringenz ein sehr stringenter Versuchsansatz besonders in den Waschungen benutzt, um eine Fehlpaarung und somit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. In der Literatur wird für Studienzwecke eine Stringenz von über 80% in vergleichbaren Versuchsansätzen gefordert (Schwarzacher-Robinson et al.. 1988).

In allen immortalisierten T-Zelllinien, die auch tatsächlich über mehrere Monate ohne weitere Antigenstimulation in Kultur gehalten wurden, konnte mit der FISH-Methode das Virusgenom im Nukleus nachgewiesen werden (Abb. 15f). Herpesvirus saimiri DNA, die außerhalb des Nucleus lag, konnte nicht nachgewiesen werden. Dies entspricht den Angaben aus der Literatur, in der nach Immortalisierung der Verbleib der Virus-DNA in Episomen im Nukleus ohne eine Form der Virus-Replikation beschrieben ist (Fickenscher und Fleckenstein 2001).

In den bisherigen Studien mit immortalisierten T-Lymphozyten mit dem Herpesvirus saimiri wurde keine FISH als Direktnachweis der Virustransfektion eingesetzt. Im Großteil der Fälle wurde schon das antigen-unabhängige langzeitige Wachstum als Nachweis gewertet (Pon et al., 2003). Des Weiteren erfolgte häufiger ein PCR-Nachweis von SHV-2-DNA unspezifisch in der Zellkultur (Heck et al., 2006). Als Nachweis auf Einzelzellebene könnte der PCR-Nachweis von SHV-2-DNA in der Kultur nach Transfektion einzelner Zellen (limiting dilution cloning) gelten (Lehner et al. 2009). Dies entspricht aber nicht den Erfordernissen unseres Versuchsansatzes und kann nicht bereits kurze Zeit nach Transfektion eingesetzt werden.

Mit der hier etablierten Methode ist es nun möglich einen Direktnachweis des Virusgenoms in der Zelle und somit deren Immortalisierung zu erbringen. In einem weite-

ren Verfahrensschritt kann gleichzeitig die Zelle phänotypisiert werden. Dieses Verfahren ist als FICTION beschrieben und wird eigentlich in der Zytogenetik verwendet (Martín-Subero et al., 2002). Auf diese einfache Art und Weise lassen sich in einem Arbeitsschritt die erfolgreiche Immortalisierung und Selektion bestimmter zytotoxischer T-Zellklone nachweisen (Abb. 19, S. 34).

6. Chancen und Risiken der zellulären Immuntherapie

Die zelluläre Immuntherapie kann als eine Strategie verstanden werden, biologische Funktionen von defektem Gewebe oder Systemen durch den Einsatz autologer oder allogener Zellen wiederherzustellen. Zahlreiche Wege wurden bisher mit sehr unterschiedlichem Erfolg beschritten.

Lymphokin-aktivierte Killerzellen (LAK) und Tumor-infiltrierende Lymphozyten (TIL) wurden seit den 70er Jahren bei der Bekämpfung von Tumoren eingesetzt. Hierbei zeigen die TIL eine höhere spezifische Zytotoxizität als die LAK, allerdings ist ihr klinischer Nutzen eher auf solide Tumoren (z. B. Melanome und Glioblastome) beschränkt.

Einige virale Infektionen können bereits durch eine zellvermittelte Immuntherapie bekämpft werden. Nach Gabe von in vitro generierten CD8⁺ CTL konnten mit dem Zytomegalie-Virus infizierte Patienten erfolgreich therapiert werden (Riddell *et al.* 1992, Walter *et al.* 1995). Die Bekämpfung von EBV-Infektionen bei immunsupprimierten Patienten durch die autologe Reinfusion Antigen-spezifischer CTL stellt einen weiteren Therapieansatz dar. Dies führt zur Wiederherstellung einer zellulären Immunreaktion gegen das Epstein-Barr-Virus, wobei die in vitro generierten CTL nachweislich über 18 Monate im menschlichen Organismus lebensfähig waren (Heslop *et al.* 1996).

Ein weiterer Versuchsansatz beschäftigte sich mit einer verstärkten Immunreaktion gegen Tumorzellen durch Antigenpräsentation. Hierzu wurden dendritische Zellen in vitro mit Tumor-spezifischen Proteinen gepulst (Hsu *et al.* 1996).

Für hämatologische Neoplasien, insbesondere für auftretende Rezidive nach erfolgter Knochenmarktransplantation, konnte gezeigt werden, dass diese erfolgreich durch Leukozytentransfusionen therapiert werden können. Patienten, die nach er-

folgter Knochenmarktransplantation an einem Rezidiv einer chronisch-myeloischen Leukämie erkrankten, erreichten nach Infusionen mit Leukämie-spezifischen mononukleären Zellen (MNC) des primären Spenders zu über 70% eine vollständige Remission (Drobyski *et al.* 1993, Kolb *et al.* 1990, Porter *et al.* 1995). Auch für Rezidive akuter Leukämien (ALL) sind Erfolge einer T-Zelltherapie beschrieben (Slavin *et al.* 1996).

Der Einsatz von *in vitro* generierten zytotoxischen Lymphozyten (CTL und NK-Zellen) stellt eine theoretische Therapieoption im Stadium der minimalen Resterkrankung dar. Diese sind bekanntermaßen die Träger des gewünschten GvL-Effektes (Graft versus leukemia), nämlich der Eliminierung von als „fremd“ erkannten Tumorzellen und einer damit verbundenen geringeren Rezidivrate. Allogene (von gewebeverträglichem Fremdspender), zytotoxische Zellen zeigen hier die ausgeprägtesten Effekte, unglücklicherweise auch bei der GvH-Reaktion, einer gegen den Wirtsmechanismus gerichteten, mitunter letal endenden Immunreaktion.

Für das Auftreten dieser GvH-Reaktion wurden die mit hoher spezifischer Zytotoxizität ausgestatteten CTL verantwortlich gemacht (Soiffer *et al.* 1992). NK-Zellen scheinen bei deutlichen GvL-Effekten diese unerwünschten GvH-Reaktionen nicht oder nur in geringem Maße zu zeigen (Xun *et al.* 1995, Glass *et al.* 1996, Zeis *et al.* 1997).

Somit wären große Mengen an NK-Zellen in der zellulären Immuntherapie wünschenswert, allerdings stellt sich die Umsetzung dieses Ziels aufgrund der oben genannten Probleme weiterhin als schwierig dar.

Inwieweit T-Lymphozyten mit NK-Funktion (CD3+/CD56+) ein ähnlich ideales Verhalten mit großem GvL-Effekt und geringer GvH-Reaktion zeigen, war und ist Gegenstand einiger Untersuchungen. Die Antitumoraktivität von CIK-Zellen (CD3+/CD56+) konnte bereits 1994 im murinen Modell nachgewiesen werden. (Lu *et al.* 1994). Untersuchungen zur Zytotoxizität von CIK-Zellen gegen Tumorzellen von z.B. CML-Patienten konnten eine Lyse von Tumorzellen unter Schonung hämatopoetischer Vorläuferzellen nachweisen (Scheffold *et al.* 1995). Aktuell richtet sich die Forschung mehr auf Tumorproteine, die von Leukämiezellen präsentiert werden und von spezifischen CIK-Zellen erkannt werden (Quintarelli *et al.* 2008).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind diese Zellen, im Gegensatz zu den NK-Zellen, einer Herpesvirus saimiri-Immortalisierung zugänglich und somit in großer Menge für einen möglichen Einsatz in der zellulären Immuntherapie generierbar.

Einige Arbeiten in dieser Richtung haben gezeigt, dass eine zelluläre Immuntherapie mit SHV-2-transformierten T-Zellen keine Absurdität ist. Im Tiermodell mit Macaquen konnte gezeigt werden, dass die Tiere nach Reinfusion autologer SHV-2-transformierter T-Lymphozyten keinerlei Anzeichen einer Erkrankung, insbesondere eines pleomorphen T-Zell-Lymphomes bzw. einer Leukämie, aufwiesen (Knappe *et al.*, 2000). Nach Infektion mit einer hohen Dosis Herpesvirus saimiri (SHV-2C488) überlebten diese Tiere ebenfalls ohne pathologische Krankheitszeichen, wohingegen mit der gleichen SHV-2 Dosis infizierte Kontrolltiere innerhalb von zwei Wochen an den Folgen pleomorpher peripherer T-Zell-Lymphome verstarben. Die SHV-2-transformierten T-Zellen scheinen im Wirtsorganismus unter Beibehaltung ihrer Funktionen überleben zu können und den Ausbruch einer experimentell induzierten (durch SHV-2-Infektion) akuten Leukämie verhindern zu können.

Vermutlich verhindert eine T-Zellreaktion, die gegen Virusantigene gerichtet ist, den Ausbruch einer Leukämie. Diese Form der Immunkontrolle korreliert mit der Persistenz von EBV im Menschen. Dass es in diesem Falle zu keinem Ausbruch einer Erkrankung kommt, wird durch eine T-Zell-vermittelte Immunreaktion verhindert. Zellen, die eine Virusreplikation aufweisen, werden effizient durch zytotoxische T-Zellen eliminiert. Diese Immunreaktion könnte auch der Grund dafür sein, dass SHV-2-transformierte CTL nach autologer Reinfusion vom Wirtsorganismus ohne Anzeichen einer Erkrankung toleriert wurden.

Neben den Bestrebungen um den Einbau eines Suizidgenes in das SHV-2-Genom bzw. die Herstellung replikationsfreier Varianten könnte dieser vermutete Schutz-Effekt einen klinischen Einsatz SHV-2-transformierten T-Zellen zukünftig ermöglichen.

VI. Zusammenfassung

Das Herpesvirus saimiri (SHV-2) ist ein γ_2 -Herpesvirus, das in der Lage ist, effizient T-Lymphozyten zu immortalisieren. Die transformierten T-Zellen entsprechen phänotypisch dem Bild reifer und aktivierter T-Lymphozyten. Sie behalten nach erfolgreicher Transformation sowohl ihre Zytotoxizität wie auch die Fähigkeit zur Zytokinproduktion und Signaltransduktion bei. Die Zytokinproduktion erfolgt jedoch mit einem leicht veränderten Muster: verschoben in Richtung zur Typ1-Helferzelle. Auf diese Weise ist es möglich, große Zellpopulationen antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen zu generieren. Neben dem Einsatz in der molekularbiologischen Erforschung von T-Zellen ist ein Einsatz in der adjuvanten zellulären Immuntherapie nach sicherem Ausschluss einer Virusreplikation im Patienten denkbar.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann eine Produktion von Viruspartikeln in transformierten Zellen nicht mit absoluter Sicherheit ausgeschlossen werden. Bestrebungen um den Einbau eines Suizidgenes in das Virusgenom bzw. die Herstellung Replikations-freier Virusvarianten lassen jedoch den Einsatz Herpesvirus saimiri transformierter T-Zellen in der zellulären Immuntherapie möglich erscheinen.

In der vorliegenden Arbeit wurden von Patienten mit chronisch-myeloischer Leukämie zunächst humane, zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) mit dem SHV-2-Stamm C488 immortalisiert. Die CTL wurden zuvor im syngenen (demselben Spender entstammend) Versuchsansatz durch Stimulation mononukleärer Zellen (MNC, Lymphozyten und Monozyten) mit EBV-transformierten Zellen gewonnen. Sechs so gewonnene CTL-Linien zeigten über 12 Monate ein stabiles Proliferationsverhalten mit einer wöchentlichen Verdoppelung der Zellzahlen. Den Zellen mussten lediglich in regelmäßigen Abständen frisches Kulturmedium und Interleukin-2 zugegeben werden; eine zusätzliche Antigenstimulation war nicht nötig. Auch die Zytotoxizität blieb erhalten.

Die transformierten CTL wurden dann in der Durchflusszytometrie auf ihre phänotypischen Eigenschaften untersucht. Hier konnten wir in allen sechs CTL-Linien (KL, JB, HM, SI, WB und IH) reife, aktivierte, größtenteils zytotoxische T-Lymphozyten (jeweils über 80% CD3+/CD8+ Zellen) nachweisen, die eine hohe Expression des T-Zell-Rezeptors α/β aufwiesen. Nicht auf der Oberfläche der transformierten T-Zellen zu finden waren die NK-Oberflächenmoleküle CD16 und CD57. Auffällig war der Nachweis von großen Populationen zytotoxischer T-Zellen mit Coexpression des NK-

Zellmarkers CD56 (mit jeweils über 40% CD8+/CD56+ Zellen) in fünf von sechs CTL-Linien.

Der Direktnachweis der Transfektion mit Herpesvirus saimiri ist ein wichtiger Schritt auf dem Weg zu einem adoptiven Immuntransfer syngener oder allogener zytotoxischer T-Zellen als Therapie der minimal residual disease. Es gilt früh nach Virusinkubation der jeweiligen T-Zell-Populationen nachzuweisen, dass auch tatsächlich die Klone mit spezifischer Zytotoxizität immortalisiert wurden. Das verwendete 400 bp lange Stück stammt aus dem Bereich des N-terminalen Endes der DNA des Herpesvirus saimiri (Untergruppe C488) und eignete sich optimal für den Direktnachweis. Dieser DNA-Bereich enthält auch den ORF 1, der das Protein StpC kodiert, welches maßgeblich zur Immortalisierung der transformierten T-Zelle beiträgt. Da ein Direktnachweis auf Einzelzellebene geplant war, erfolgte die Markierung der DNA-Sonde mit Digoxigenin. Damit eignete sich die markierte Sonde zur Fluoreszenz in situ Hybridisierung, um mikroskopisch in der einzelnen Zelle diesen Nachweis führen zu können. In allen immortalisierten Zelllinien konnte eine hohe Kopiezahl von episomal im Nukleus angeordneter Virus-DNA nachgewiesen werden.

Im Rahmen einer adjuvanten zellulären Immuntherapie kann der Einsatz dieser T-Zellen mit NK-Funktion eine Therapieoption im Stadium der minimalen Resterkrankung darstellen. Die Generierung entsprechend großer Zellzahlen könnte durch die Herpesvirus saimiri-Immortalisierung gewährleistet werden.

Erste Schritte in diese Richtung wurden bereits durch Knappe *et al.* 2000 im Tiermodell mit Macaquen unternommen. Die Tiere zeigten nach Reinfusion autologer SHV-2-transformierter T-Lymphozyten keinerlei Anzeichen einer Erkrankung und überlebten nach Infektionen mit Herpesvirus saimiri ohne pathologische Veränderungen.

Die beschriebenen Ergebnisse eröffnen eine interessante Perspektive möglicher adjuvanter Zelltherapien mit SHV-2-transformierten T-Zellen.

VII. Literaturverzeichnis

- Alberter B.** (2008): Die Epigenetik des Herpesvirus saimiri-Genoms, Med. Diss., Erlangen-Nürnberg
- Albrecht J., Fleckenstein B.** (1994): New member of the multigene family of complement control proteins in herpesvirus saimiri. *J Virol.* 66(6):3937-40.
- Albrecht J., Nicholas J., Biller D., Cameron K., Biesinger B., Newman C., Wittmann S., Craxton M., Coleman H., Fleckenstein B.** (1992): Primary structure of the herpesvirus saimiri genome. *J Virol.* 66(8):5047-58.
- Berend K., Jung J., Boyle T., DiMaio J., Mungal S., Desrosiers R., Lyerly H.** (1993): Phenotypic and functional consequences of herpesvirus saimiri infection of human CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J Virol.* 67(10):6317-21.
- Biesinger B., Müller-Fleckenstein I., Simmer B., Lang G., Wittmann S., Platzer E., Desrosiers R., Fleckenstein B.** (1992): Stable growth transformation of human T lymphocytes by herpesvirus saimiri. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(7):3116-9.
- Biesinger B., Tsygankov A., Fickenscher H., Emmrich F., Fleckenstein B., Bolen J., Bröker BM.** (1995): The product of the Herpesvirus saimiri open reading frame 1 (tip) interacts with T cell-specific kinase p56lck in transformed cells. *J Biol Chem.* 270(9):4729-34.
- Bolton ET, McCarthy BJ.** (1962): A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962 Aug;48:1390-7.
- Bröker BM, Tsygankov AY, Müller-Fleckenstein I, Guse AH, Chitaev NA, Biesinger B, Fleckenstein B, Emmrich F.** (1993): Immortalization of human T cell clones by Herpesvirus saimiri. Signal transduction analysis reveals functional CD3, CD4, and IL-2 receptors. *J Immunol.* 1993 Aug 1;151(3):1184-92.
- Bröker BM., Fickenscher H.** (1999): Herpesvirus saimiri strategies for T cell stimulation and transformation. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 187(3):127-36.
- Cook AF, Vuocolo E, Brakel CL.** (1988): Synthesis and hybridization of a series of biotinylated oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 1988 May 11;16(9):4077-95.
- De Carli M., Berthold S., Fickenscher H., Fleckenstein I., D'Elia M., Gao Q., Biagiotti R., Giudizi M., Kalden J., Fleckenstein B.** (1993): Immortalization with herpesvirus saimiri modulates the cytokine secretion profile of established Th1 and Th2 human T cell clones. *J Immunol.* 151(9):5022-30.
- Drobyski W., Keever C., Roth M., Koethe S., Hanson G., McFadden P., Gottschall J., Ash R., van Tuinen P., Horowitz M.** (1993): Salvage immunotherapy using donor leukocyte infusions as treatment for relapsed chronic myelogenous leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: efficacy and toxicity of a defined T-cell dose. *Blood.* 82(8):2310-8.
- Falk L., Wolfe L., Deinhardt F.** (1972): Isolation of Herpesvirus saimiri from blood of squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*). *J Natl Cancer Inst.* 48(5):1499-505.
- Faller D., Crimmins M., Mentzer S.** (1988): Human T-cell leukemia virus type I infection of CD4+ or CD8+ cytotoxic T-cell clones results in immortalization with retention of antigen specificity. *J Virol.* 62(8):2942-50.

- Fickenscher H.**, Biesinger B., Knappe A., Wittmann S., Fleckenstein B. (1996): Regulation of the herpesvirus saimiri oncogene stpC, similar to that of T-cell activation genes, in growth-transformed human T lymphocytes. *J Virol.* 70(9):6012-9.
- Fickenscher H.**, Bokel C., Knappe A., Biesinger B., Meinel E., Fleischer B., Fleckenstein B., Bröker BM. (1997): Functional phenotype of transformed human alphabeta and gammadelta T cells determined by different subgroup C strains of Herpesvirus saimiri. *J Virol.* 71(3):2252-63.
- Fickenscher H.**, Fleckenstein B. (1998): Growth-transformation of human T cells, *Methods in Microbiology: Immunological Methods*, Chapter IV.3.
- Fickenscher H.**, Fleckenstein B. (2001): Herpesvirus saimiri. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2001 Apr 29;356(1408):545-67.
- Glass B.**, Uharek L., Gassmann W., Focks B., Bolouri H., Löffler H., Müller-Ruchholtz W. (1992): Graft-versus-leukaemia activity after bone marrow transplantation does not require graft-versus-host disease. *Ann Hematol.* 64(6):255-9.
- Glass B.**, Uharek L., Zeis M., Löffler H., Müller-Ruchholtz W., Gassmann W. (1996): Graft-versus-leukaemia activity can be predicted by natural cytotoxicity against leukaemia cells. *Br J Haematol.* 93(2):412-20.
- Heck E.**, Friedrich U, Gack MU, Lengenfelder D, Schmidt M, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Ensser A, Biesinger B. (2006): Growth transformation of human T cells by herpesvirus saimiri requires multiple Tip-Lck interaction motifs. *J Virol.* 2006 Oct;80(20):9934-42.
- Heslop H.**, Ng C., Li C., Smith C., Loftin S., Krance R., Brenner M., Rooney C. (1996): Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med.* 2(5):551-5.
- Hiller C.**, Wittmann S., Slavin S., Fickenscher H. (2000): Functional long-term thymidine kinase suicide gene expression in human T cells using a herpesvirus saimiri vector. *Gene Ther.* 7(8):664-74.
- Horowitz M.**, Gale R., Sondel P., Goldman J., Kersey J., Kolb H., Rimm A., Ringden O., Rozman C., Speck B. (1990): Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 75(3):555-62.
- Hsu F.**, Benike C., Fagnoni F., Liles T., Czerwinski D., Taidi B., Engleman E., Levy R. (1996): Vaccination of patients with B-cell lymphoma using autologous antigen-pulsed dendritic cells. *Nat Med.* 2(1):52-8.
- Inatsuki A.**, Yasukawa M., Kobayashi Y. (1989): Functional alterations of herpes simplex virus-specific CD4+ multifunctional T cell clones following infection with human T lymphotropic virus type I. *J Immunol.* 143(4):1327-33.
- Jin L.**, Lloyd RV (1997): *In situ hybridization: methods and applications.* *J Clin Lab Anal.* 1997;11(1):2-9.
- Jung J.**, Desrosiers R (1995): Association of the viral oncoprotein STP-C488 with cellular ras. *Mol Cell Biol.* 15(12):6506-12.
- Knappe A.**, Feldmann G, Dittmer U, Meinel E, Nisslein T, Wittmann S, Matz-Rensing K, Kirchner T, Bodemer W, Fickenscher H (2000): Herpesvirus saimiri-transformed macaque T cells are tolerated and do not cause lymphoma after autologous reinfusion. *Blood.* 95(10):3256-61.

- Knappe A**, Hiller C, Thureau M, Wittmann S, Hofmann H, Fleckenstein B, Fickenscher H (1997): The superantigen-homologous viral immediate-early gene ie14/vsag in Herpesvirus saimiri-transformed human T cells. *J Virol.* 71(12):9124-33.
- Kolb H**, Mittermuller J, Clemm C, Holler E, Ledderose G, Brehm G, Heim M, Wilmanns W (1990): Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients. *Blood.* 76(12):2462-5.
- Lehner M**, Grillhoesl C, Full F, Vogel B, Weller P, Müller-Fleckenstein I, Schmidt M, Fleckenstein B, Holter W, Ensser A. (2009): Transformation efficiency by Herpesvirus saimiri is not a limiting factor in clonal CD8pos T cell outgrowth. *Virology.* 2009 May 25;388(1):15-20.
- Lu P**, Negrin R (1994): A novel population of expanded human CD3+CD56+ cells derived from T cells with potent in vivo antitumor activity in mice with severe combined immunodeficiency. *J Immunol.* 153(4):1687-96.
- Martín-Subero JI**, Chudoba I, Harder L, Gesk S, Grote W, Novo FJ, Calasanz MJ, Siebert R. (2002): Multicolor-FUNCTION: expanding the possibilities of combined morphologic, immunophenotypic, and genetic single cell analyses. *Am J Pathol.* 2002 Aug;161(2):413-20.
- Medveczky M**, Geck P, Sullivan J, Serbousek D, Djeu J, Medveczky P (1993): IL-2 independent growth and cytotoxicity of Herpesvirus saimiri-infected human CD8 cells and involvement of two open reading frame sequences of the virus. *Virology.* 196(2):402-12.
- Meinl E**, Hohlfeld R, Wekerle H, Fleckenstein B (1995): immortalization of human T cells by Herpesvirus saimiri. *Immunol Today.* 16(2):55-8.
- Melendez L**, Daniel M, Hunt R, Garcia F (1968): An apparently new herpesvirus from primary kidney cultures of the squirrel monkey (*Saimiri sciureus*). *Lab Anim Care* 18(3):374-81.
- Mittrücker H**, Müller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Fleischer B (1993): Herpes virus saimiri-transformed human T lymphocytes: normal functional phenotype and preserved T cell receptor signalling. *Int Immunol.* 5(8):985-90.
- Miyoshi I**, Kubonishi I, Yoshimoto S, Akagi T, Ohtsuki Y, Shiraishi Y, Nagata K, Hinuma Y (1981): Type C virus particles in a cord T-cell line derived by co-cultivating normal human cord leukocytes and human leukaemic T cells. *Nature.* 294(5843):770-1.
- Mosoian A**, Teixeira A, Caron E, Piwoz J, Klotman ME (2000): CD8+ cell lines isolated from HIV-1-infected children have potent soluble HIV-1 inhibitory activity that differs from beta-chemokines. *Viral Immunol.* 2000;13(4):481-95.
- Nilsson K**, Klein G (1982): Phenotypic and cytogenetic characteristics of human B-lymphoid cell lines and their relevance for the etiology of Burkitt's lymphoma. *Adv Cancer Res.*;37:319-80.
- Pardue ML**, Gall JG (1969): Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1969 Oct;64(2):600-4.
- Persaud D**, Munoz J, Tarsis S, Parks E, Parks W (1995): Time course and cytokine dependence of human T-cell lymphotropic virus type 1 T-lymphocyte transformation as revealed by a microtiter infectivity assay. *J Virol.* 69(10):6297-303. PMID: 7666530

- Pon RA**, Freedman MS. (2003): Study of Herpesvirus saimiri immortalization of gammadelta T cells derived from peripheral blood and CSF of multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol.* 2003 Jun;139(1-2):119-32.
- Porter D**, Antin J (1995): Adoptive immunotherapy for relapsed leukemia following allogeneic bone marrow transplantation. *Leuk Lymphoma.* 1995 Apr;17(3-4):191-7.
- Porter D**, Antin J. (2006): Donor leukocyte infusions in myeloid malignancies: new strategies. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2006;19(4):737-55.
- Quintarelli C**, Dotti G, De Angelis B, Hoyos V, Mims M, Luciano L, Heslop HE, Rooney CM, Pane F, Savoldo B.(2008): Cytotoxic T lymphocytes directed to the preferentially expressed antigen of melanoma (PRAME) target chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1876-85. Epub 2008 Jun 30.
- Riddell S**, Watanabe K, Goodrich J, Li C, Agha M, Greenberg P (1992): Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science.* 257(5067):238-41.
- Scheffold C**, Brandt K, Johnston V, Lefterova P, Degen B, Schöntube M, Huhn D, Neubauer A, Schmidt-Wolf IG. (1995): Potential of autologous immunologic effector cells for bone marrow purging in patients with chronic myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 1995 Jan;15(1):33-9.
- Schwarzacher-Robinson T**, Cram LS, Meyne J, Moyzis RK (1988): Characterization of human hetero-chromatin by in situ hybridization with satellite DNA clones. *Cytogenet Cell Genet.* 1988;47(4):192-6.
- Sebens T**, Uharek L, Glass B, Müller-Ruchholtz W, Steinmann J (1995): Allogeneic mouse T cell lines distinguish three Balb/c leukemias from each other and from non-leukemic lymphocytes. *Bone Marrow Transplant.* 16(3):443-9.
- Slavin S**, Naparstek E, Nagler A, Ackerstein A, Samuel S, Kapelushnik J, Brautbar C, Or R (1996): Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood.* 87(6):2195-204.
- Soiffer R**, Murray C., Mauch P., Anderson K., Freedman A., Rabinowe S., Takvorian T., Robertson M., Spector N., Gonin R (1992): Prevention of graft-versus-host disease by selective depletion of CD6-positive T lymphocytes from donor bone marrow. *J Clin Oncol.* 10(7):1191-200.
- Soiffer R**, Ritz J. (1993): Selective T cell depletion of donor allogeneic marrow with anti-CD6 monoclonal antibody: rationale and results. *Bone Marrow Transplant.* 12 Suppl 3:S7-10.
- Tosato G** (1997): Generation of Epstein-Barr virus (EBV)-immortalized B cell lines, "current protocols in immunology", pp. 7.22.1-7.22.3, j. Wiley, New York.
- Trimble J.**, Desrosiers R. (1991): Transformation by herpesvirus saimiri. *Adv Cancer Res.* 56:335-55.
- Tsygankov A.** (2005): Cell Transformation by Herpesvirus saimiri. *J cell Physiol.* 203:305-318
- Uharek L.**, Glass B., Gaska T., Zeiss M., Gassmann W., Löffler H., Müller-Ruchholtz W. (1993): Natural killer cells as effector cells of graft-versus-leukaemia activity in a murine transplantation model. *Bone Marrow Transplant.* 12/Suppl 3:S.57-60.

- Walter E.**, Greenberg P., Gilbert M., Finch R., Watanabe K., Thomas E., Riddell S. (1995): Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med.* 1333(16):1038-44.
- Weber F.**, Meini E., Drexler K., Czlonkowska A., Huber S., Fickenscher H., Müller-Fleckenstein I., Fleckenstein B., Wekerle H., Hohlfeld R. (1993): Transformation of human T-cell clones by Herpesvirus saimiri: intact antigen recognition by autonomously growing myelin basic protein-specific T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(23):11049-53.
- Xun C.**, Thompson J., Jennings C., Brown S. (1995): The effect of human IL-2-activated natural killer and T cells on graft-versus-host disease and graft-versus-leukaemia in SCID mice bearing human leukemic cells. *Transplantation.* 60(8):821-7.
- Yamamoto N.**, Okada M., Koyanagi Y., Kannagi M., Hinuma Y. (1982): Transformation of human leukocytes by cocultivation with an adult T cell leukemia virus producer cell line. *Science.* 217(4561):737-739
- Yssel H.**, de Waal Malefyt R., Duc Dodon M., Blanchard D., Gazzolo L., de Vries J., Spits H. (1989): Human T cell leukemia/lymphoma virus type I infection of a CD4+ proliferative/cytotoxic T cell clone progresses in at least two distinct phases based on changes in function and phenotype of the infected cells. *J Immunol.* 142(7):2279-89.
- Zeis M.**, Uharek L., Glass B., Gaska T., Steinmann J., Gassmann W., Löffler H, Müller-Ruchholtz W. (1995): Allogeneic NK cells as potent antileukemic effector cells after allogeneic bone marrow transplantation in mice. *Transplantation.* 59(12):1734-6.
- Zeis M.**, Uharek L., Glass B., Steinmann J., Dreger P., Gassmann W, Schmitz N. (1997): Allogeneic MHC-mismatched activated natural killer cells administered after bone marrow transplantation provide a strong graft-versus-leukaemia effect in mice. *Br J Haematol.* 96(4):757-61.

VIII. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. J. Steinmann, der mir diese interessante Thematik meiner Doktorarbeit überließ und die notwendigen Mittel zur Verfügung stellte. Besonders dankbar bin ich ihm für sein stetes Engagement am Fortgang dieser Arbeit, seiner Bereitschaft zu kontroversen Diskussionen, oft in Anspruch genommenen seelischen Beistand und nicht zuletzt für die Beantwortung und Klärung vieler spannender immunologischer Fragestellungen.

Casimir Malanda, Reina Zühlke und Susan Dingeldein möchte ich für die Einführung in die verschiedenen Labortechniken und die Unterstützung bei der täglichen immunologischen Laborarbeit danken.

Weiterer Dank gebührt besonders Herrn Dr. R. Koch und den Herren PD Dr. L. Uharek, PD Dr. B. Glass, Dr. M. Zeis Dr. C. Lehmann und Prof. Dr. R. Siebert, die in zahlreichen gemeinsamen Besprechungen wertvolle Anregungen und praktische Tipps zum Fortgang dieser Arbeit beisteuerten.

Ich danke Prof. H. Fickenscher für das Herpesvirus saimiri und die Virus-DNA.

Für das Korrekturlesen danke ich meinem Vater.

IX. Lebenslauf

Am 3. März 1971 wurde ich, Christopher Hart, als einziges Kind der Eheleute Christa Hart, geb. John, und Dieter Hart in Frankfurt am Main geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule von 1977 bis 1981 war ich im Anschluss, von 1981 bis 1987, Schüler des Schulzentrums Rockwinkel in Bremen und von 1987 bis 1990 Schüler des Alten Gymnasiums in Bremen, das ich im Juni 1990 mit Bestehen des Abiturs verließ.

Nach einem dreijährigen Studium der Chemie an der Universität Konstanz wechselte ich zum Wintersemester 1993 den Studiengang und begann mein Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Den klinischen Studienabschnitt begann ich im Oktober 1996. Ein Jahr später, im August 1997, bestand ich das erste Staatsexamen und nach zwei weiteren Jahren, im September 1999, das zweite Staatsexamen. Nach Ableistung des Praktischen Jahres in Kiel legte ich im Juni 2000 die Prüfung zum dritten Staatsexamen der Humanmedizin ab.

Seit Juli 2000 war ich als Arzt im Praktikum und ab Januar 2002 als Assistenzarzt in der Klinik für Pädiatrie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel tätig.

Seit Juli 2002 bin ich als Assistenzarzt in der Klinik für Kinderkardiologie an der Universitätsklinik Schleswig-Holstein Campus Kiel angestellt.

Mit meiner Lebensgefährtin Anneke Brunnemann habe ich zwei gemeinsame Töchter: Charlotte Paula Sophie wurde im August 2005 und Theresa Clara Marie wurde im März 2007 geboren.

Die praktische Arbeit für die vorliegende Dissertation wurde von Juni 1995 bis Oktober 1998 durchgeführt. Teilergebnisse dieser Arbeit wurden als Vortrag und Abstract auf der Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie im März 1997 in Binz auf Rügen veröffentlicht:

C. Hart, R. Schoch, M. Krönke, J. Steinmann (1997): Detection of Herpesvirus Siamiri-DNA in infected T-Cell Lines by Fluorescence-in-situ-Hybridisation. Abstracts of the XIIIth Spring Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie Binz, 6.-8.03.1997.