

Aus der Klinik für Innere Medizin II
mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie

(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. M. Kneba)

im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Expansion und Isolation CMV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

NINA EBSEN

aus Itzehoe

Kiel 2016

1. Berichtstatter:

PD Dr. med. Benedikt Gahn

2. Berichtstatter:

Prof. Dr. med. Wolfram Klapper

Tag der mündlichen Prüfung:

18.10.2017

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

03.08.2017

Gez.: Prof. Dr. rer. nat. Matthias Peipp

(Vorsitzender der Prüfungsausschusses)

INHALTSVERZEICHNIS

1.	Einleitung.....	1
1.1	CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation.....	1
1.1.1	Zytomegalievirus.....	1
1.1.2	Kontrolle der CMV-Infektion durch CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten.....	1
1.1.3	Klinische Manifestationen.....	2
1.1.4	Risikofaktoren und Prävention.....	2
1.1.5	Prophylaxe und präemptive Therapie.....	3
1.1.6	Therapie.....	4
1.2	Adoptive Immuntherapie.....	5
1.2.1	Adoptive Immuntherapie bei CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation.....	5
1.2.2	Die Dendritische Zelle als Antigen-präsentierende Zelle.....	5
1.2.3	Ex vivo Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten.....	6
1.3	Multimere.....	7
1.3.1	Tetramere.....	7
1.3.2	Streptamere.....	8
1.4	Die T2-Zelle.....	9
1.5	Aufgabenstellung.....	10
2.	Material und Methoden.....	12
2.1	Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut.....	12
2.2	Zellzahlbestimmung.....	12
2.2.1	Sysmex.....	12
2.2.2	Zählkammer.....	13
2.3	Kryokonservation.....	13
2.4	MACS-Separation.....	13
2.5	Gewinnung dendritischer Zellen.....	14
2.6	Herstellung reifer CMV-Peptid-beladener dendritischer Zellen.....	14
2.7	Stimulation und Expansion der T-Lymphozyten mit MACSiBeads Particles..._	15
2.7.1	Stimulation mit Peptid-beladenen DCs.....	15
2.7.2	Expansion mit MACSiBeads Particles.....	15
2.8	Aufreinigung der CD8+ CTLs, Stimulation und Expansion unter optimierten Kulturbedingungen.....	16
2.8.1	Aufreinigung der CD8+ T-Lymphozyten.....	16
2.8.2	Simulation und Expansion der CD8+ CTLs unter optimierten Kulturbedingungen.....	16

2.9	Separation CMV-spezifischer T-Lymphozyten.....	17
2.9.1	Streptamere.....	17
2.9.2	Tetramere.....	18
2.10	Durchflusszytometrie.....	19
2.10.1	Streptamere.....	20
2.10.2	Tetramere.....	21
2.10.3	IFN γ Sekretionsassay.....	21
2.11	Kultivierung und Vorbereitung der T2-Zellen für den Zytotoxizitätsassay.....	23
2.12	Zytotoxizitätsassay.....	23
3.	Ergebnisse.....	25
3.1	Stimulation und Expansion der T-Lymphozyten mit MACSiBeads Particles...25	
3.1.1	Stimulation mit Peptid-beladenen DCs.....	25
3.1.2	Expansion der T-Lymphozyten mit MACSiBeads Particles.....	27
3.2	Stimulation und Expansion der CD8+ CTLs unter optimierten Kulturbedingungen.....	28
3.3	Nachweis der CMV-spezifischen IFN γ -Produktion.....	31
3.4	Zytotoxizität der T-Lymphozyten.....	33
3.5	Separation CMV-spezifischer T-Lymphozyten.....	35
3.5.1	Streptamere.....	35
3.5.2	Tetramere.....	36
4.	Diskussion.....	38
4.1	Indikationen für eine adoptive Immuntherapie bei CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation.....	38
4.2	Aktivierung CMV-spezifischer T-Lymphozyten.....	38
4.2.1	Stimulation mit anschließend Expansion.....	38
4.2.2	Stimulation der CTLs unter optimierten Kulturbedingungen.....	40
4.3	CMV-spezifische IFN γ -Produktion durch aktivierte T-Lymphozyten.....	43
4.4	Isolation CMV-spezifischer T-Lymphozyten.....	43
4.4.1	Streptamere.....	43
4.4.2	Tetramere.....	44
4.5	CMV-spezifische Zytotoxizität im Zytotoxizitätsassay.....	45
4.6	Klinische Relevanz des adoptiven Transfers CMV-spezifischer CTLs.....	45
5.	Zusammenfassung.....	47
6.	Literaturverzeichnis.....	49
7.	Abkürzungsverzeichnis.....	61
8.	Anhang.....	63
8.1	23rd Annual Meeting of the Society for Virology.....	63

8.1.1	Abstract.....	63
8.1.2	Poster.....	64
8.2	Vortrag im Labor für hämatologische Spezialdiagnostik.....	65

1. Einleitung

1.1 CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation

Infektionen mit dem Zytomegalievirus (CMV) sind eine häufige und ernst zu nehmende Komplikation bei Patienten nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSCT), welche den Therapieerfolg gefährden können.

1.1.1 Zytomegalievirus

Das Zytomegalievirus gehört zur Familie der Herpesviren. Verglichen mit den anderen Herpesviren ist es ein großes Virus mit einem Genom von etwa 235 Kilobasen, welche für ungefähr 164 Gene kodieren (Davison et al. 2003). Die Seroprävalenz des Zytomegalievirus beträgt zwischen 30% und 90% und steigt mit zunehmendem Alter an (Staras et al. 2006). Die Erstinfektion verläuft bei immunkompetenten Menschen in der Regel asymptomatisch und der Virus verbleibt danach lebenslang im Körper (Crough et al. 2009).

Verschiedene Studien haben aufgezeigt, dass Zellen des Granulozyten-Makrophagen-Systems CMV tragen und somit zu seiner Serokonservation beitragen (Bolovan-Fritts et al. 1999, Kondo et al. 1994, Taylor-Wiedemann et al. 1991). Der Anteil der mononukleären Zellen, welche während einer latenten Infektion Bestandteile des Virusgenoms tragen, liegt zwischen 0,004% und 0,01% (Slobedman and Mocarski 1999, Crough et al. 2009).

1.1.2 Kontrolle der CMV-Infektion durch CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten

Der wichtigste Faktor in der Kontrolle der CMV-Replikation ist die zelluläre Immunantwort. Dies zeigt sich auch darin, dass schwere CMV-Infektionen fast ausschließlich bei Patienten vorkommen, welche eine ausgeprägte zelluläre Immundefizienz haben (Crough et al. 2009). Zudem ging in Studien mit dem murinen CMV eine Depletion virusspezifischer CD8+ zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) mit einer erhöhten Rate von Reaktivierungen und mit einer Dissemination der Virusinfektion einher. Ebenso führt ein adoptiver Transfer CMV-spezifischer CTLs zur Kontrolle einer andernfalls letalen Erkrankung (Reddehase et al. 1985). CMV induziert eine starke Antwort durch CTLs. Der Anteil an CMV-spezifischen CTLs in gesunden Virusträgern ist ungewöhnlich hoch mit einem Median von 10% im peripheren Blut (Sylwester et al. 2005) und steigt mit dem Alter auf bis zu 45% (Khan et al. 2004). Es ist noch nicht abschließend verstanden, warum CMV eine so starke Immunantwort provoziert (Crough et al. 2009).

1.1.3 Klinische Manifestationen

Die gefährlichste Manifestation der CMV-Infektion bei Patienten nach allogener HSCT ist die CMV-Pneumonie mit einer Mortalität von bis zu 85% (Meyers et al. 1986). Sie tritt als atypische Pneumonie mit Fieber, unproduktivem Husten, Hypoxie und radiologisch interstitiellen Infiltraten auf. Die Standarddiagnostik besteht im Nachweis des Virus in einer bronchoalveolären Lavage (BAL) oder in einer Lungenbiopsie (Ljungman et al. 2011).

Die häufigste Manifestation ist die CMV-Infektion des Gastrointestinaltraktes (GI). Es kann zu tiefen Ulcera kommen, welche makroskopisch mit anderen Erkrankungen, einschließlich der Graft versus Host-Disease (GvHD), verwechselt werden können. Die Diagnostik erfolgt über den Nachweis des Virus in Biopsien, da in etwa 50% der Fälle trotz einer CMV-Infektion des GI kein Virus im Blut nachzuweisen ist (Mori et al. 2000, Jang EY et al. 2009). Zudem treten CMV-Infektion und GvHD häufig gleichzeitig auf, sodass es schwer ist, die Symptome korrekt zuzuordnen (Ljungman et al. 2011).

Weitere Manifestationen wie beispielsweise Retinitis, Hepatitis oder Encephalitis durch CMV können vorkommen, sind aber selten (Ljungman et al. 2011).

1.1.4 Risikofaktoren und Prävention

Der wichtigste Risikofaktor ist der CMV-Status von Spender und Empfänger. Während bei CMV-negativem Spender und Empfänger die Wahrscheinlichkeit einer CMV-Infektion gering ist, liegt diese bei positivem Spender und negativem Empfänger bei etwa 30% (Nichols et al. 2002). Somit sollte für seronegative Empfänger, wenn möglich, ein seronegativer Spender gefunden werden (Ljungman et al. 2011). Bei einer solchen Konstellation ist der Hauptrisikofaktor für eine CMV-Infektion die Transfusion von Blutprodukten (Bowden et al. 1986). Darum sollten CMV-seronegativen Patienten vor und nach der HSCT nur CMV-negative oder Leukozyten-depletierte Blutprodukte infundiert werden, um das Risiko einer CMV-Infektion zu minimieren (Bowden et al. 1995, Nichols et al. 2003, Boeckh et Ljungman 2009). Beide Konzepte scheinen gleichwertig zu sein; keine Studie konnte zeigen, dass es von Vorteil sei, Blutprodukte zu nutzen, welche sowohl CMV-negativ als auch Leukozyten-depletiert sind (Boeckh et Ljungman 2009, Boeckh et al. 2011).

Ein CMV-seropositiver Empfänger hat, ohne adäquate Prophylaxe, ein Risiko von 80% (Miller et al. 1986) an einer CMV-Infektion nach allogener HSCT zu erkranken (Ljungman et al. 2011), besonders wenn der Spender CMV-seronegatig ist (Ljungman et al. 2006). In diesem Fall gibt es keine eindeutigen Empfehlungen, ob der CMV-Status als Auswahlkriterium berücksichtigt werden sollte (Boeckh et Ljungman 2009).

1.1.5 Prophylaxe und präemptive Therapie

Seronegativen Patienten, welche von einem seronegativen Spender transplantiert werden, bedürfen keiner Prophylaxe in Bezug auf eine CMV-Infektion. Es ist aber zu empfehlen, dass eine engmaschige Überwachung erfolgt, um im Falle einer Infektion mit CMV frühzeitig eine Therapie einzuleiten (Nichols et al. 2003). Diese präemptive Therapie ermöglicht die Virusreplikation über einen kurzen Zeitraum, was wiederum das Immunsystem zu stimulieren scheint. Es setzt allerdings engmaschige Kontrollen voraus, um eine CMV-Infektion möglichst früh, vor Einsetzen der Symptome, zu detektieren (Ljungman et al. 2011).

Erhält ein seronegativer Patient Stammzellen eines CMV-positiven Spenders oder ist der Patient selbst seropositiv, gibt es neben der präemptiven Therapie die Möglichkeit einer Prophylaxe mit antiviralen Medikamenten. Der wesentliche Nachteil der Prophylaxe ist die eventuell unnötige Gabe von Virustatika mit deren Nebenwirkungen. Zudem kommt es zu einer verspäteten Erholung der CMV-spezifischen T-Zell-Antwort, wahrscheinlich bedingt durch die suffiziente Unterdrückung der CMV-Replikation (Li et al. 1994).

Beide Konzepte sind gleichwertig in Bezug auf die CMV-bedingte Mortalität und das Gesamtüberleben (Boeckh et al. 1996).

Der aktuelle Standard sowohl für die Prophylaxe als auch für die präemptive Therapie ist Ganciclovir. Die intravenöse Gabe reduziert das Risiko einer CMV-Infektion und -Erkrankung, bietet aber keinen Vorteil in Bezug auf das Gesamtüberleben (Winston et al. 1993, Boeck et al. 1996). Die gefährlichste und dosislimitierende Nebenwirkung von Ganciclovir ist bei etwa 30% der Patienten die Neutropenie durch Myelosuppression, welche das Risiko für bakterielle und fungale Infektionen erhöht (Goodrich et al. 1993, Boeckh et al. 1996, Salzberger et al. 1997).

Valganciclovir ist das Prodrug des Ganciclovir, welches bei oraler Gabe rasch resorbiert und zu Ganciclovir hydrolysiert wird (Pescovitz et al. 2000). Es erreicht dabei gleichwertige Serumspiegel wie intravenös verabreichtes Ganciclovir (Einsele et al. 2006). Es scheint in der präemptiven Therapie der CMV-Infektion nach HSCT gleichwertig mit intravenös verabreichtem Ganciclovir oder Foscarnet zu sein (Busca et al. 2007, Allice et al. 2009, Ruiz-Camps et al. 2011). Ebenso wie bei Ganciclovir tritt bei etwa 40% der Patienten als relevanteste Nebenwirkung die Neutropenie durch eine Myelosuppression auf (Ayala et al. 2006, Ruiz-Camps et al. 2011).

Foscarnet ist ebenso effektiv wie Ganciclovir in der präemptiven Therapie der CMV-Infektion nach HSCT (Reusser et al. 2002). Aufgrund der Nebenwirkungen ist es jedoch nur das Mittel

der zweiten Wahl und kommt zum Einsatz, wenn Ganciclovir kontraindiziert ist, nicht toleriert wird oder bei Resistenzen gegen Ganciclovir (Ljungman et al. 2011).

Aciclovir in hoher Dosierung verringert das Risiko einer CMV-Infektion oder –Erkrankung (Meyers et al. 1988, Prentice et al. 1994). Valaciclovir ist sein Prodrug und erreicht bei oraler Gabe aufgrund der besseren Resorption höhere Serumspiegel und ist somit effektiver in der Prophylaxe einer CMV-Infektion nach HSCT und verringert die Wahrscheinlichkeit, dass eine präemptive Therapie eingeleitet werden muss. Ein Unterschied im Gesamtüberleben gab es nicht (Ljungman et al. 2002). Unter einer Prophylaxe mit Aciclovir oder Valaciclovir sollte ein Routine-Monitoring auf CMV-Infektionen erfolgen (Ljungman et al. 2011).

Cidofovir ist ein Breitband-Virustatikum, welches ausschließlich intravenös verabreicht werden kann. Ein Vorteil ist seine lange Halbwertszeit, welche eine einmalige Gabe pro Woche ermöglicht. Die Haupttoxizität ist die akute renale tubuläre Nekrose, welche den Einsatz in der Therapie der CMV-Infektion nach HSCT limitiert. (Ljungman et al. 2001).

Neben den Nebenwirkungen der Virustatika kommt es vermehrt zu Resistenzen der Viren, was den Einsatz zusätzlich limitiert. Die Hauptrisikofaktoren für eine Resistenzbildung gegen die Medikamente sind eine lange Therapiedauer, das Fehlen einer vorherigen Immunität gegen CMV sowie eine intermittierend geringe Virusreplikation durch eine starke Immunsuppression oder unzureichende Medikamentenspiegel (Ljungman et al. 2011).

Intravenöses Immunglobulin (IVIG) wird weder für die Prophylaxe noch für die präemptive Therapie der CMV-Infektion nach HSCT genutzt. Teilweise führte es zwar zu einer niedrigeren Infektionsrate, das Gesamtüberleben konnte dadurch aber nicht verbessert werden (Bowden et al. 1991, Boeckh et Ljungman 2009).

1.1.6 Therapie

Der aktuelle Standard bei der CMV-Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation ist die Gabe von Ganciclovir. Nach Verabreichung einer Induktionsdosis für zwei bis drei Wochen, erhält der Patient eine Erhaltungsdosis bis alle Symptome verschwunden sind. Im Falle einer Zytopenie kann auf Foscarnet zurückgegriffen werden. Im Falle einer Pneumonie durch CMV wird empfohlen, diese zusätzlich mit intravenösem Immunglobulin (IVIG) zu behandeln (Boeckh et al. 2011, Boeckh et Ljungman 2009, Emanuel et al. 1988, Reed et al. 1988).

1.2 Adoptive Immuntherapie

Das Grundprinzip der adoptiven Immuntherapie ist der Transfer von immunologisch aktiven Antigen-spezifischen Zellen auf den Patienten. Diese Zellen werden zuvor in vitro kultiviert, expandiert und zusätzlich auf ihre Spezifität überprüft.

1.2.1 Adoptive Immuntherapie bei CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation

Eine verminderte Anzahl von immunkompetenten CMV-reaktiven CTLs ist einer der Hauptrisikofaktoren für die CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation (Reusser et al. 1991). Zur Prophylaxe einer CMV-Infektion und -Erkrankung nach HSCT wurden Patienten bereits erfolgreich CTLs infundiert, welche zuvor ihren CMV-positiven Stammzellspendern entnommen und in vitro kultiviert worden sind. Die CMV-spezifischen CTLs waren für mehrere Wochen im Blut der Patienten nachzuweisen; es kam zu keinen nennenswerten Nebenwirkungen während oder nach der Transfusion (Riddell et al. 1992, Walter et al. 1995). Auch nach Reaktivierung des Virus konnten CMV-sepzigische CTLs des seropositiven Spenders bereits erfolgreich eingesetzt werden (Cobbold et al. 2005). Zudem ist es möglich, die CMV-spezifischen CTLs mit Hilfe von Humanen Leukozyten Antigen (HLA)-Tetrameren zu selektieren und damit aufzureinigen. Somit sinkt der Anteil an unspezifischen CTLs, welche eine GvHD induzieren könnten (Cobbold et al. 2005, Szmania et al. 2001, Keenan et al. 2001).

Ist der Spender CMV-negativ, ist die Kultivierung CMV-spezifischer CTLs erschwert. In einer Studie konnten nur bei 20% der CMV-negativen Stammzellspender CD8+ CTLs generiert werden (Szmania et al. 2001). Es gibt die Überlegung, eine Zellbank mit virusspezifischen CTLs von Drittspendern aufzubauen, um auch CTLs für Patienten mit CMV-negativen Spendern zur Verfügung stellen zu können (Boeckh et al. 2014).

1.2.2 Die Dendritische Zelle als Antigen-präsentierende Zelle

Damit zytotoxische T-Lymphozyten suffizient aktiviert werden können, muss ihnen das Antigen über eine Antigen-präsentierende Zelle (APC) präsentiert werden. Die potenteste APC im menschlichen Organismus ist die Dendritische Zelle (DC). Sie ist eine große, granuliert Zelle, deren sternförmiges Aussehen von den vielen Zytoplasmaausläufern (Dendriten) herrührt. Myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln sich zu monozytären Zellen, welche als unreife DC in das Gewebe einwandern. Dort reifen sie durch die Aufnahme von Antigenen und pathogene Stimuli aus und wandern ins lymphatische Gewebe ein, wo sie über HLA-I- und HLA-II-Moleküle, welche auf den Dendriten lokalisiert sind, die Antigene an CD4+ und CD8+ T-Lymphozyten präsentieren. Ist der T-Zell-Rezeptor (TCR) des T-Lymphozyten kompatibel zu einem HLA-Peptid-Komplex, so verstärkt sich die

Bindung und kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 aktivieren die Zellen, was die klonale Vermehrung und Differenzierung der Effektorzellen bewirkt.

Demnach wurden für die Versuche dieser Arbeit, reife DCs benötigt, welche in der Lage sind, CMV an CD8+ CTLs zu präsentieren. Zu diesem Zwecke werden Monozyten aus dem peripheren Blut gewonnen und mit Hilfe der beiden Zytokine Interleukin 4 (IL-4) und Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) zu unreifen DCs kultiviert (Romani et al. 1994). Im Anschluss wurden diese unreifen DCs mit dem CMV-Peptid *NLVPMVATV* beladen und daraufhin einen Tag lang durch die proinflammatorischen Zytokine Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin 1 β (IL-1 β), Interleukin 6 (IL-6) und Prostaglandin E₂ (PGE₂) kultiviert und ausgereift (Jonuleit et al. 1997).

1.2.3 Ex vivo Stimulation zytotoxischer T-Lymphozyten

Naive T-Lymphozyten können im Blut jahrelang persistieren. Wird ihnen das passende Antigen präsentiert, in diesem Protokoll durch die ausgereiften und peptidbeladene DCs, so proliferieren und differenzieren sie und die Tochterzellen nehmen ihre Funktion als Effektorzellen wahr. Diese Vorgänge werden durch das autokrine Zytokin Interleukin 2 (IL-2) gesteuert (Smith et al. 1985). IL-2 wird von aktivierten Zellen gebildet und sezerniert. Ruhende T-Zellen exprimieren einen IL-2-Rezeptor mit niedriger Affinität, wohingegen aktivierte T-Lymphozyten einen Rezeptor mit höherer Affinität auf IL-2 haben. Somit werden vor allem T-Lymphozyten proliferieren, die zuvor durch das passende Antigen aktiviert wurden (Cerdan et al. 1995).

Die Differenzierung der T-Lymphozyten zu Effektorzellen ist nach etwa fünf Tagen abgeschlossen. CD4+ T-Zellen differenzieren zu T-Helfer-1-Zellen (T_H-1) und T-Helfer-2-Zellen (T_H-2). T_H-1 spielen hauptsächlich eine Rolle in der zellulären, T_H-2 in der humoralen Immunität. CD8+ T-Zellen differenzieren hierbei zu zytotoxischen Zellen (CTL), welche in der Lage sind, Zielzellen zu lysieren. Erkennen sie auf einer Zelle das passende Antigen, so entleeren sie ihre lytischen Granula in die Zielzelle, was diese wiederum zerstört. Durch die Antigenpräsentation auf DCs wird zudem die Produktion von Interferon- γ (IFN γ) ausgelöst. Die Produktion von IFN γ durch CTLs und T_H-1 kann durchflusszytometrisch nachgewiesen werden (Andersson et al. 1988, Andersson et al. 1990). Als Positivkontrolle dient hierbei das Superantigen Staphylokokkenenterotoxin A (SEA), welches in der Lage ist eine Vielzahl von T-Lymphozyten polyklonal zu aktivieren (Greaves et al. 1974).

1.3 Multimere

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) ist dazu in der Lage, einen spezifischen Peptid-MHC-Komplex auf Targetzellen zu erkennen. Sich diese Interaktion zu Nutzen machend, wurden MHC-Multimere erzeugt, welche das Ziel haben, spezifische T-Lymphozyten aus einer Vielzahl von Zellen heraus zu detektieren. Dies funktioniert über MHC-Moleküle, welche mit immundominanten Peptiden der antigenen Proteine beladen sind und somit von den spezifischen Zellen erkannt werden können. Die Multimere bestehen aus mehreren solcher MHC-Moleküle, welche über ein fluoreszierendes Molekül verbunden sind und somit in der Durchflusszytometrie detektiert werden können (Ramirez et Olivarra 2013).

Heutzutage gibt es verschiedenste Multimere, deren wichtigster Unterschied die Wertigkeit, die Anzahl der MHC-Moleküle in einem Komplex, ist. Der TCR allein hat nur eine geringe Affinität zum passenden Peptid-MHC-Gegenstück, sodass die Bindung nur für wenige Sekunden stabil ist (Corr et al. 1994, Davis et al. 1998). Monomere bilden somit eine zu instabile Verbindung mit dem TCR, als dass man damit effektive Färbe- oder Isolationsmethoden etablieren könnte. Kombiniert man jedoch mehrere dieser Monomere zu einem Komplex, dem Multimer, so wird die Stabilität der Bindung erheblich erhöht (Boniface et al. 1998, Cochran et al. 2000, Bakker et Schumacher 2005).

1.3.1 Tetramere

Tetramere waren die ersten Multimere, welche zur spezifischen T-Zell-Analyse verwendet wurden. Sie entstehen, indem an lösliche Monomere kovalent Biotin gebunden wird und sie anschließend durch die Bindung an fluorochrome-konjugiertes Streptavidin oder Avidin zu einer vierwertigen Struktur konjugiert werden. Sowohl Streptavidin als auch Avidin haben je vier Bindungsstellen für Biotin. (Altman et al. 1996). Die so entstehenden MHC-Tetramere sind aktuell die meist genutzten Multimere für die Detektion von Antigen-spezifischen Zellen (Bakker et Schumacher 2005).

Mit Hilfe der Tetramere ist es möglich, auch eine kleine Anzahl von spezifischen CTLs im peripheren Blut zu detektieren und diese auch zu isolieren (Busch et al. 1998, Keenan et al. 2001, Heijnen et al. 2004).

Es wurde jedoch gezeigt, dass Tetramere die lytische Funktion der CTLs herabsetzen können (Neudorfer et al. 2007). Verschiedene Studien am Mausmodell haben aufgezeigt, dass die dauerhafte Bindung der Multimere an die CTLs zur Modulation und zur Apoptose dieser führt. Diese Effekte sind temperaturbedingt unter physiologischen Bedingungen besonders ausgeprägt (Whelan et al. 1999, Daniels et Jameson 2000, O'Herrin et al. 2001, Xu et al. 2001, Knabel et al. 2002).

Für murine T-Lymphozyten konnte dieses Problem gelöst werden, indem die Multimere in Monomere zertrennt werden. Die Bindung zwischen Monomer und CTL ist sehr instabil, sodass binnen kurzer Zeit die T-Zelle wieder frei vorliegt und ihre Funktion erhalten werden kann (Knabel et al. 2002).

Andere Studien, welche die Tetramer-sortierten CMV-spezifischen CTLs als adoptive Therapie für Patienten mit CMV-Infektion nach allogener HSCT nutzten, kamen zu einem anderen Ergebnis. Die CMV-spezifischen CTLs wurden mit Hilfe von HLA I Tetrameren aus dem peripheren Blut der Stammzellspender gewonnen und im Anschluss auf die Patienten übertragen. Bei allen Patienten zeigte sich eine CMV-spezifische Immunrekonstitution sowie eine Reduktion der Virämie. Die CTLs waren trotz der Sortierung mit Tetrameren in vivo funktionstüchtig (Cobbold et al. 2005, Uhlin et al. 2012).

1.3.2 Streptamere

Streptamere bestehen aus *Strep*-tags, kurzen Peptiden, welche eine hohe Bindungsselektivität zu *Strep*-Tactin, einem technisierten Streptavidin, haben. *Strep*-tags können mit verschiedenen Proteinen verbunden werden, beispielsweise mit dem CMV-Peptid *NLVP MVATV*. *Strep*-Tactin kann mit fluoreszierenden Molekülen oder magnetischen Beads verbunden sein, sodass spezifische Zellen gefärbt oder magnetisch sortiert werden können. Die Besonderheit des *Strep*-tag – *Strep*-Tactin-Komplexes ist, dass die Bindung an die T-Lymphozyten reversibel ist. Das ist der wesentliche Unterschied zu anderen Multimeren. Durch die Zugabe von Biotin, welches eine wesentlich höhere Affinität zu dem *Strep*-Tactin als das *Strep*-tag hat, trennen sich die beiden Strukturen. Die monovalente Bindung zwischen dem MHC I Molekül und dem TCR ist schwach, sodass die MHC I Moleküle spontan vom TCR dissoziieren und durch Waschzyklen von den T-Lymphozyten entfernt werden können (IBA BioTAGnology).

Alle Arbeitsschritte der Streptamere werden bei 4°C durchgeführt, was die temperaturbedingten negativen Modifikationen der Zellen reduziert. Studien haben gezeigt, dass die CTLs, welche mit Streptameren behandelt und anschließend wieder von ihnen dissoziiert wurden, keine phänotypischen und funktionellen Unterschiede zu unbehandelten Lymphozyten aufwiesen (Knabel et al. 2002, Neudorfer et al. 2007).

1.4 Die T2-Zelle

T2-Zellen sind Hybride aus einer T- und B-lymphoblastoiden Zelllinie. Sie exprimiert HLA-A*0201 und HLA-B5. Aufgrund eines Defekts im *transporter associated with antigen processing* (TAP) werden keine zelleigenen Peptide über HLA-Moleküle auf der Zelloberfläche präsentiert. Als Folge dessen wird HLA-B5 gar nicht und HLA-A*0201 nur schwach auf der Zelloberfläche exprimiert. Werden die T2-Zellen mit einem exogenen Peptid mit den Bindungsmotiven für HLA-A*0201 inkubiert, so steigt die MHC-Expression an, da die peptidfreien aber instabilen HLA-A*0201-Moleküle diese Peptide binden können und somit stabilisiert werden.

Darum eignen sich T2-Zellen mit ihren unbesetzten Bindungsstellen hervorragend um mit exogenen HLA-A*0201-bindenden Peptiden beladen zu werden (Salter et al. 1985).

1.5 Aufgabenstellung

Der Transfer CMV-spezifischer CTLs eines geeigneten Spenders, die so genannte adoptive Immuntherapie, scheint eine vielversprechende Alternative zu sein. Hierbei wurden CTLs dem Stammzellspender entnommen, *in vitro* kultiviert und/oder selektioniert und anschließend dem Patienten reinfundiert. Es traten keine nennenswerten Nebenwirkungen auf. Im Falle von CMV-seropositiven Spendern gelang die Anreicherung CMV-spezifischer CTLs sehr gut, während der Erfolg bei CMV-seronegativen Spendern mäßig ausfiel (Riddell et al. 1992, Walter et al. 1995, Szmania et al. 2001, Keenan et al. 2001, Cobbold et al. 2005). Es muss also nach geeigneten Alternativen für Patienten mit CMV-seronegativen Spendern gesucht werden (Boeckh et al. 2014).

Ein möglicher Ansatz ist der Aufbau einer Drittspender-Zellbank (Boeckh et al. 2014). Hierbei werden CTLs von CMV-positiven, gesunden Menschen gewonnen, *in vitro* aktiviert, expandiert, gegebenenfalls sortiert und im Anschluss kryokonserviert. So hat man im Falle einer CMV-Erkrankung oder gewünschten Prophylaxe zügig Zugang zu CMV-spezifischen CTLs mit bekanntem HLA-Muster.

Eine mögliche Quelle solcher CMV-spezifischen CTLs könnten gesunde Blutspender sein. Der CMV-Status ist bekannt, das HLA-Muster kann bestimmt werden. Während der Blutspende werden dem Patienten in der Regel etwa 500ml Blut entnommen. Im Anschluss wird das Blut zentrifugiert, sodass die unterschiedlichen Blutbestandteile voneinander getrennt werden. Die Leukozyten werden dabei so gut wie möglich aus der Suspension entfernt, um das Risiko einer Immunisierung beim Empfänger zu minimieren. Damit werden diese Leukozyten als so genannter Buffy Coat vielfach verfügbar. Man erhält auf diese Weise die Anzahl an Leukozyten, die in etwa 500ml Vollblut enthalten wären.

In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob es möglich ist, aus dem Buffy Coat eines gesunden, CMV-seropositiven Blutspenders in ausreichendem Maße dendritische Zellen und T-Zellen zu gewinnen, die dendritischen Zellen *ex vivo* mit CMV-Peptiden zu beladen und auszureifen und anschließend zu nutzen, um die T-Zellen zu stimulieren. Die Generierung soll hierbei kein infektiöses Material enthalten (z.B. Viren) sowie der Zeit- und Arbeitsaufwand moderat sein.

Mittels Durchflusszytometrie wird ermittelt, wie groß der Anteil an CTLs ist, welche das PE-gebundene CMV-Antigen erkennen und binden. Die Funktionalität der CTLs wird durch verschiedene Versuche überprüft werden. Zum einen soll durch den IFN γ -Sekretionsassay gezeigt werden, dass die CTLs durch CMV-Antigene aktiviert werden und daraufhin IFN γ produzieren. Zum anderen soll der Zytotoxizitätsassay zeigen, dass die CTLs dazu fähig sind, CMV-positive Targetzellen zu erkennen und zu lysieren, während sie unbeladene

Targetzellen verschonen. Des Weiteren soll versucht werden, CMV-spezifische CTLs durch HLA-Tetramere anzureichern.

2. Material und Methoden

Die im Folgenden beschriebenen Versuchsabläufe wurden alle, mit Ausnahme des Zytotoxizitätsassay, unter sterilen Bedingungen (Microflow Safety Cabinet Modell 51424/5, Nunc) durchgeführt.

2.1 Gewinnung mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut

Die verwendeten Blutproben stammten von gesunden HLA-A2-positiven und CMV-positiven Blutspendern. Zur Gewinnung der peripheren mononukleären Zellen (PBMC) wurde das Blut zunächst in 50 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) überführt und im Verhältnis 1:1 mit phosphat-gepufferter Saline (PBS) (Biochrom AG) verdünnt, um eine Gerinnung zu verhindern. Im Anschluss wurden jeweils 25 ml der Blutsuspension auf je 15 ml Ficoll-Lösung (Biochrom AG) in 50 ml Falcon-Röhrchen geschichtet. Die Röhrchen wurden anschließend 20 Minuten (min) bei 1600 U/min (Umdrehungen pro Minute) ungebremst bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert (Labofuge 400, Heraeus Instruments). Durch den so entstehenden Dichtegradienten bildet sich bei dieser Methode in der Mitte des Röhrchens an der Oberfläche der Ficoll-Lösung eine weißliche Schicht aus, welche die mononukleären Zellen enthält (Noble et al. 1967). Diese wurde dann mit Hilfe einer sterilen Einmalpipette (Sarstedt) entnommen, in ein frisches 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und die Suspension mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Röhrchen 5 min bei 1600 U/min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet in PBS resuspendiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt bis der Überstand nach Zentrifugation klar war, um die restlichen Thrombozyten und Erythrozyten aus der Suspension zu entfernen.

2.2 Zellzahlbestimmung

2.2.1 Sysmex

Die Bestimmung der Zellzahl durch den Sysmex erfolgte automatisch. Hierzu aliquotiert das Analysegerät zunächst das angesaugte Blut und versetzt es mit verschiedenen Reagenzien, um die zellspezifischen Eigenschaften hervorzuheben. Definierte Volumina werden zur Analyse den verschiedenen Messkanälen zugeführt.

Die Erythrozyten und Thrombozyten werden mittels DC-Mantelstromtechnik gemessen. Hämoglobin wird absorptionsphotometrisch bestimmt.

Um das Differentialblutbild zu bestimmen, wird den Zellen zunächst eine oberflächenaktive Substanz (Surfactant) hinzu gesetzt. Diese induziert die Lyse der Erythrozyten und perforiert die Zellmembran der Leukozyten, sodass ein Polymethin-Fluoreszenzfarbstoff eindringen kann. Dieser binden an die Nukleinsäuren im Zellinneren. So kann die Probe fluoreszenz-durchflusszytometrisch analysiert werden.

2.2.2 Zählkammer

Wenn die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des Sysmex nicht gelang, wurden die Zellen in der Zählkammer unter dem Mikroskop ausgezählt. Hierzu wurden 10 µl aus der Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau (Biochrom AG) in einem 1,5 ml Röhrchen (Eppendorf) gemischt. Es wurde eine Neubauer Zählkammer *Improved bright-line, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²* (Marienfeld) vorbereitet, indem das Deckglas auf dem Objektträger fixiert wurde. 10 µl des Trypanblau-Zellgemisches wurden unter das Deckglas gegeben. Es folgte das Auszählen der Zellen in allen vier Quadranten unter dem Mikroskop. Durch das Trypanblau sind tote Zellen von vitalen zu unterscheiden, da tote Zellen den Farbstoff stärker aufnehmen und dadurch dunkelblau erscheinen, während vitale Zellen eine hellblaue Färbung annehmen. Die Zellzahl wurde im Anschluss wie folgt berechnet: Gezählte Zellen x Konstante x Verdünnung / Quadrantenzahl = Zellzahl/µl (Konstante = 10; Quadrantenzahl = 4).

2.3 Kryokonservtion

Zur längeren Aufbewahrung von nicht-kultivierten Zellen wurden diese kryokonserviert. Dazu wurden die suspendierten Zellen in ein Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und die im Pellet befindlichen Zellen wurden in Einfriermedium, bestehend aus 70% RPMI (Biochrom AG), 30% Humanalbumin (20%ig) (Behring) und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma-Aldrich) resuspendiert. Hierbei wurde jeweils 1 ml Medium für $1 \cdot 10^7$ T-Zellen bzw. für $1 \cdot 10^6$ Dendritische Zellen oder T2-Zellen verwendet. Jeweils 1 ml wurde dann in ein Einfrier Röhrchen *Cryp Tube TM Vials* (Nunc) gegeben und dieses wurde anschließend im Freezing Container „Mr. Frosty“ (Nalgene) bei - 80°C gelagert. Dieser Behälter enthielt Isopropanol, welches gewährleistete, dass die Röhrchen um 1°C pro Stunde abgekühlt wurden, um Zellschäden zu minimieren. Im Verlauf wurden die Einfrier Röhrchen zur längeren Aufbewahrung der Zellen in den Stickstofftank überführt.

2.4 MACS-Separation

Zur Separation einer bestimmten Zellsubpopulation wurde das MACS *Magnetic activated cell sorting* (Miltenyi Biotec) genutzt. Hierzu wurde die Zellsuspension 5 min bei 1600 U/min und RT zentrifugiert, der Überstand entnommen und das Zellpellet in 80 µl PBS und 20 µl des entsprechenden MACS-Antikörper (Miltenyi Biotec) je $1 \cdot 10^7$ Zellen gesamt resuspendiert. Anschließend folgte eine 15-minütige Inkubation bei 4-8°C. In dieser Zeit lagerten sich die MACS-Antikörper an die spezifischen Oberflächenmarker der entsprechenden Zellen an. Andere Zellen, welche die Oberflächenmarker nicht tragen, blieben frei von den magnetischen Antikörpern. Die Inkubation bei niedrigen Temperaturen verhinderte, dass sich

die fragile Antigen-Antikörper-Bindung wieder löste. Anschließend wurde die Suspension mit PBS aufgefüllt und dann 5 min bei 1600 U/min und RT zentrifugiert, um die überschüssigen Antikörper herauszuwaschen. Der Überstand wurde entnommen und das Zellpellet in 500 µl PBS je $1 \cdot 10^8$ Zellen resuspendiert. Parallel wurde eine LS Säule *Separation Columns LS* (Miltenyi Biotec) in das Magnetfeld gesetzt und mit 3 ml PBS vorgespült. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die Zellen, welche an die magnetischen MACS-Antikörper gebunden waren, blieben in der Säule haften, während die ungebundenen Zellen die Säule passierten und im Auffangröhrchen gesammelt wurden. Die Säule wurde dann dreimal mit 3 ml PBS gespült, um die restlichen, ungebundenen Zellen aus der Säule zu eliminieren. Die Zellen im Auffangröhrchen wurden zur weiteren Bearbeitung beiseite gestellt. Die LS Säule wurde aus dem Magnetfeld entnommen und auf ein neues 15 ml-Röhrchen (Sarstedt) gesetzt. 5 ml PBS wurden auf die Säule gegeben und die dort haftenden Zellen anschließend mit Hilfe eines Stempels aus der Säule eluiert.

2.5 Gewinnung dendritischer Zellen

Zur Gewinnung der dendritischen Zellen wurden zunächst die CD14+ Monozyten aus den PBMC selektiert. Dies erfolgte über die Magnetische Zellseparation mit CD14-Antikörpern (Miltenyi Biotec). Die CD14+ Monozyten verblieben in der sich im Magnetfeld befindlichen Säule während die übrigen CD14- Zellen diese passierten und in das Auffangröhrchen gelangten. Um die Monozyten zu gewinnen, wurde die Säule aus dem Magnetfeld entnommen, auf ein frisches 15 ml-Röhrchen gesetzt und die Monozyten unter Zugabe von 5 ml PBS mit Hilfe des passenden Stempels eluiert.

Im Anschluss wurden die Monozyten 5 min bei 1600 U/min und RT zentrifugiert und der Überstand entnommen. Das Pellet wurde in 1 ml CellGro *Dendritic Cell Medium* (CellGenix) je $1 \cdot 10^6$ Monozyten resuspendiert. Es wurden 500 IE/ml IL-4 (R&D Systems) sowie 800 IE/ml GM-CSF (R&D Systems) hinzugefügt. Die Suspension wurde in eine 75 cm² Kulturflasche (Sarstedt) gefüllt. Die Inkubation erfolgte bei 5% CO₂ und 37°C für 5 Tage (d) in einem Brutschrank *Hera Cell* (Heraeus Instruments). Ein Mediumaustausch erfolgte an Tag 3 und 5.

2.6 Herstellung reifer CMV-Peptid-beladener dendritischer Zellen

Zur Ausreifung der dendritischen Zellen wurden diese an Tag 6 geerntet, anschließend gezählt und je $3 \cdot 10^6$ DCs in 1 ml CellGro (CellGenix) gelöst. Es erfolgte erneut die Zugabe von 500 IE/ml IL-4 (R&D Systems) und 800 IE/ml GM-CSF (R&D Systems) sowie 1 ng des CMV-Nona-Peptids *NLVPMVATV* (IBA BioTAGnology). Je 1 ml der Suspension wurde in

eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte (Sarstedt) gegeben und für 2 Stunden (h) bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

Anschließend erfolgte die Zugabe von 1000 IE/ml TNF- α (R&D Systems), 2000 IE/ml IL-1 β (R&D Systems), 1000 IE/ml IL-6 (R&D Systems) und 1 μ g/ml PGE₂ (Sigma-Aldrich) und eine erneute Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C für weitere 22 Stunden.

2.7 Stimulation und Expansion der T-Lymphozyten mit MACSiBead Particles

2.7.1 Stimulation mit Peptid-beladenen DCs

Zur Gewinnung CMV-spezifischer T-Zellen wurden je $1 \cdot 10^7$ der CD14-negativen Zellen in 2 ml T-Zell-Medium, bestehend aus RPMI 1640 (Biochrom AG) mit 5 % inaktivierten Humanalbumin HSA (20%) (Behring), in eine Vertiefung einer 24-Loch-Platte (Sarstedt) gegeben. Hinzu gegeben wurden jeweils $1 \cdot 10^6$ der reifen CMV-Peptid-beladenen dendritischen Zellen an Tag 1, 8 und 15. Ein vollständiger Mediumaustausch erfolgte alle 2 bis 3 Tage. Hierzu wurden 1,5 ml Medium aus dem Überstand entnommen, ohne die am Boden befindlichen Zellen aufzuwirbeln, und durch frisches Medium ersetzt. Ab Tag 10 wurden zusätzlich 20 IE/ml IL-2 (R&D Systems) hinzugefügt.

2.7.2 Expansion mit MACSiBead Particles

Die Expansion der stimulierten T-Zellen erfolgte mittels Anti-Biotin MACSiBead Particles (Miltenyi Biotec), welche mit biotinylierten Antikörper gegen CD2, CD3 und CD28 (Miltenyi Biotec) beladen wurden. Diese imitieren Antigen-präsentierende Zellen und aktivieren somit ruhende T-Zellen.

Dafür wurden zunächst jeweils 100 μ l der biotinylierten Antikörper gegen CD2, CD3 und CD28 in einem 2 ml Röhrchen (Eppendorf) vermischt. In Anschluss wurden 500 μ l der Anti-Biotin MACSiBead Particles sowie 200 μ l PBS hinzugefügt. Die Suspension wurde für 2h unter regelmäßigem Schwenken bei 2-8°C inkubiert, um eine gute Vermischung der Substanzen zu gewährleisten.

Danach wurde die entsprechende Menge der beladenen Anti-Biotin-Partikel, 25 μ l je $5 \cdot 10^6$ T-Zellen, in ein frisches 2 ml Röhrchen überführt. 25 μ l der Suspension entsprechen $2,5 \cdot 10^6$ Anti-Biotin-Partikel. Es wurden 200 μ l Kulturmedium X-Vivo 15 (Lonza) hinzugefügt und die Suspension 5 min bei 1600 U/min und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und das Pellet in 100 μ l frischem Medium resuspendiert.

Je $5 \cdot 10^6$ T-Zellen wurden in 900 μ l X-Vivo 15 gelöst und die vorbereitete Suspension mit den Anti-Biotin-Partikeln hinzugegeben. So entstand ein Verhältnis zwischen den Partikel und

den Zellen von 1:2. Jeweils 1 ml wurde in eine Vertiefung einer 48-well-Platte (Sarstedt) gegeben. Es folgte eine Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 3 Tage.

An Tag 3 wurden die Zellen vorsichtig resuspendiert, im Verhältnis 1:1 aufgeteilt und frisches X-Vivo 15 mit 20 IE/ml IL-2 (R&D Systems) hinzugegeben. Die Aufteilung und die Zugabe frischen Mediums wurden an Tag 7 und 11 wiederholt. An Tag 14 ist die Expansion abgeschlossen. Die Zellen wurden geerntet und gezählt. Sollte die Zellzahl weiter erhöht werden, so wurde der Ablauf bei Tag 1 neu gestartet.

2.8 Aufreinigung der CD8+ CTLs, Stimulation und Expansion unter optimierten Kulturbedingungen

2.8.1 Aufreinigung der CD8+ T-Lymphozyten

Die Aufreinigung der zytotoxischen T-Lymphozyten erfolgte wiederum nach dem Prinzip der Magnetischen Zellseparation mit CD8+ MACS-Antikörpern. Die CD8+ CTLs verblieben in der sich im Magnetfeld befindlichen Säule während die übrigen CD8- Zellen diese passierten und im Auffangröhrchen landeten. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entnommen, auf ein frisches 15 ml-Röhrchen gesetzt und die CD8+ CTLs unter Zugabe von 5 ml PBS mit Hilfe des passenden Stempels eluiert.

2.8.2 Stimulation und Expansion der CD8+ CTLs unter optimierten Kulturbedingungen

Bei diesem Protokoll erfolgt die Stimulation und Expansion der CTLs in einem Ansatz, nicht wie bei dem vorherigen (siehe 2.7) nacheinander. Zudem wurde dem Medium anstelle von Humanalbumin autologes Plasma hinzugefügt. Die Zugabe von IL-2 erfolgte bei diesem Protokoll ab Tag 1 und nicht erst ab Tag 10.

Zur simultanen Stimulation und Expansion der CTLs wurden jeweils $1 \cdot 10^7$ CD8+ T-Lymphozyten in 2 ml M'-Medium mit 5 % autologen Plasma und 20 IE/ml IL-2 (R&D Systems) gelöst und in eine Vertiefung einer 96well-Platte gegeben (Durai et al. 2009). Das M'-Medium besteht aus RPMI (Biochrom AG) mit 200 mmol/l L-Glutamin (Biochrom AG), 100 mmol/l Natrium-Pyruvat (Biochrom AG), 4 ml/l MEM-Vitamine (Biochrom AG), 10 ml MEM-NEAA (Biochrom AG) und 50 µmol/l β-Mercaptoethanol (Gibco). Hinzu gegeben wurden jeweils $5 \cdot 10^6$ ausgereifte, CMV-Peptid beladene DCs, sodass ein Stimulationsverhältnis von 1:2 entsteht. Es erfolgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂. Eine Zugabe frischen Mediums erfolgte an Tag 4, 11 und 18.

An Tag 8 und 15 wurden die T-Lymphozyten geerntet, gezählt und im passenden Verhältnis mit frischen DCs restimuliert.

Dem für die Kultivierung der CD8+ CTLs genutzten Mediums wurden 5 % autologes Plasma hinzugefügt. Für dessen Gewinnung wurde das Spenderblut vor Gewinnung der PBMC 15 min bei 2500 U/min und RT zentrifugiert. Hierbei trennte sich das Plasma von den festen Blutbestandteilen und konnte mit einer sterilen Einmalpipette (Sarstedt) entnommen und in ein frisches 50 ml Röhrchen transferiert werden. Das entnommene Plasma wurde durch PBS ersetzt und die Gewinnung der PBMC, wie zuvor beschrieben, fortgesetzt. Das gewonnene autologe Plasma wurde bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.9 Separation CMV-spezifischer T-Lymphozyten

2.9.1 Streptamere

Zur Aufreinigung der CMV-spezifischen T-Lymphozyten wurde die Antigen-spezifische magnetische Isolation mit Streptameren (IBA BioTAGnology) genutzt. Hierbei war zu beachten, dass alle Reagenzien und Materialien eine Temperatur von 4°C hatten, damit die fragile Antikörper-Antigen-Bindung stabil blieb und die Isolation Erfolg hatte. Hierzu wurden auch die Materialien über Nacht bei 4°C gelagert.

Zunächst wurden die dreimal mit reifen DCs stimulierten T-Lymphozyten geerntet und in ein frisches 50 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden anschließend mit Buffer IS (IBA BioTAGnology) gewaschen und anschließend in 10 ml Buffer IS resuspendiert. Die Suspension wurde auf einen Nylonfilter (Miltenyi Biotec) gegeben, um Zellkoagel zu eliminieren. Es wurden Zellen für die Färbung „Vor Isolation“ entnommen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf Eis gelagert.

Zur Vorbereitung der Streptamere wurden 50 µl Streptamer Magnetic Beads (IBA BioTAGnology) mit 8 µl Streptamer MHC class I (IBA BioTAGnology) und 90 µl Buffer IS für 45 min bei 4°C inkubiert.

In der Zwischenzeit wurde eine MS Säule *Separation Columbs MS* (Miltenyi Biotec) in dem Magnetfeld platziert und mit 500 µl Buffer IS vorgespült. Im Anschluss wurde 1 ml Buffer IS zu der Magnetische Beads-MHC-Mischung gegeben und diese auf die Säule gegeben, um ungebundene MHC-Moleküle zu eliminieren. Im Anschluss wurde mit 2 ml Buffer IS gewaschen. Die Säule wird aus dem Magnetfeld entnommen und auf ein frisches Röhrchen gesetzt. Es wurden 250µl Buffer IS hinzu gegeben und die Beads somit aus der Säule gewaschen.

Die Zellen wurden für 5 min bei 1600 U/min und 4°C zentrifugiert und anschließend in 250 µl der Magnetische Beads-MHC-Mischung resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 45 min auf Eis.

Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit Buffer IS gewaschen, um ungebundene Magnetische Beads zu entfernen.

Eine LS Säule *Separation Columbs LS* (Miltenyi Biotec) wurde in das Magnetfeld gesetzt und mit 3 ml vorgespült. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die CMV-negativen Zellen passierten die Säule und landeten im Auffangröhrchen, während die CMV-positiven Zellen, welche die Beads gebunden hatten, in der Säule verblieben. Es wurde dreimal mit 3 ml Buffer IS gespült. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entnommen und die Zellen mit 5 ml Buffer IS mit Hilfe des passenden Stempels aus der Säule eluiert. Es wurden sowohl von der Positiv- als auch von der Negativfraktion Färbekontrollen entnommen.

Zur weiteren Verwendung oder Kultivierung der TC sollten diese von den Streptameren dissoziiert werden. Dies erfolgte mit D-biotin (IBA BioTAGnology). D-biotin löst die Bindung der magnetischen Beads. Die Bindung zwischen den MHC-Molekülen und der CTLs ist instabil, sodass diese spontan voneinander dissoziieren und durch Waschen aus der Suspension entfernt werden können. Auch diese Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nach der Sortierung wurden die Zellen zweimal mit 200 µl Buffer IS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 200 µl Buffer IS mit 1 mM D-biotin resuspendiert. Es erfolgte die Inkubation für 20 min bei 4°C. Danach wurden die Zellen einmal mit Buffer IS gewaschen und daraufhin erneut in 200 µl Buffer IS mit 1 mM D-biotin resuspendiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen viermal mit 200 µl Buffer IS gewaschen.

2.9.2 Tetramere

Die Isolation der CD8+ CMV-spezifischen TC erfolgte mit einer Kombination aus dem Tetramer-PE-Farbstoff (Glycotope) und den MACS-Antikörpern gegen den PE-Farbstoff *Anti-PE-MB* (Miltenyi Biotec). Die Zellen wurden geerntet, mit PBS gewaschen und im Anschluss gezählt. Es wurde eine Probe für die Färbung „Vor Isolation“ entnommen. Es folgte die Zentrifugation für 5 min bei 1600U/min und RT. Der Überstand wurde entnommen und die Zellen in 100 µl PBS je $1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendiert. Es wurden 5µl CMV-Tetramer-PE je $1 \cdot 10^6$ Zellen hinzugegeben. Es folgte die Inkubation für 45 min bei RT in Dunkelheit. Danach wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und daraufhin in 80 µl PBS und 10 µl Anti-PE-MB je $1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendiert. Es folgte die Inkubation für 15 min bei 4°C. Im Anschluss wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 500 µl je $1 \cdot 10^8$ Zellen resuspendiert.

Eine LS Säule *Separation Columbs LS* (Miltenyi Biotec) wurde in das Magnetfeld gesetzt und mit 3 ml PBS vorgespült. Im Anschluss wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben. Die ungebundenen CMV-negativen Zellen passierten die Säule und landeten im Auffangröhrchen, während die gebundenen CMV-positiven Zellen in der Säule verblieben. Es wurde dreimal mit 3 ml PBS gespült, um die darin verbliebenen ungebundenen Zellen zu eliminieren. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entnommen und auf ein frisches 15 ml Röhrchen gesetzt und die Zellen mit 5 ml PBS und dem Stempel aus der Säule eluiert.

Sowohl von der Positiv- als auch von der Negativfraktion wurden Färbekontrollen entnommen.

2.10 Durchflusszytometrie

Im Durchflusszytometer *BD FACS Canto* (BD) wurden die Zellen durch einen Laserstrahl gelenkt und die dadurch entstehende Streuung des Lichts wurde aufgezeichnet. Hierbei kann im *Forward Scatter* (FSC) die Größe und im *Side Scatter* (SSC) die Granularität der Zellen erfasst werden. Zusätzlich können bis zu vier intra- und extrazelluläre Zellcharakteristika mit Hilfe von fluoreszenz-markierten Antikörpern aufgezeigt werden.

Die Abbildungen der durchflusszytometrischen Untersuchung in dieser Arbeit wurden alle mit Hilfe der Analysesoftware *FACSDiva Software Version 6* (BD) erstellt. Hierbei wurden zunächst Größe und Granularität der Zellen erfasst. Um die zu untersuchenden Zellen wurde ein *Gate* gelegt. In einer neuen Abbildung konnten so gezielt nur diese Zellen angezeigt und auf weitere Charakteristika untersucht werden.

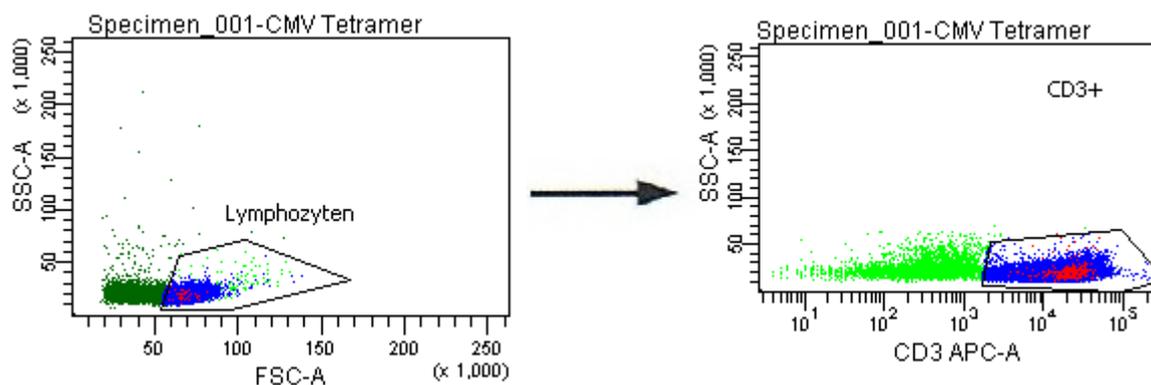


Abbildung 1: Selektion der CD3+ Lymphozyten

Lymphozyten sind klein (geringer Wert im FSC) und nur wenig granuliert (geringer Wert im SSC). Das rechte Bild zeigt ausschließlich Zellen, welche durch das Gate im linken Bild erfasst wurden. Hier wurden die Zellen zusätzlich mit einem CD3-Antikörper gefärbt. Die CD3+ Zellen befinden sich daher rechts im Bild.

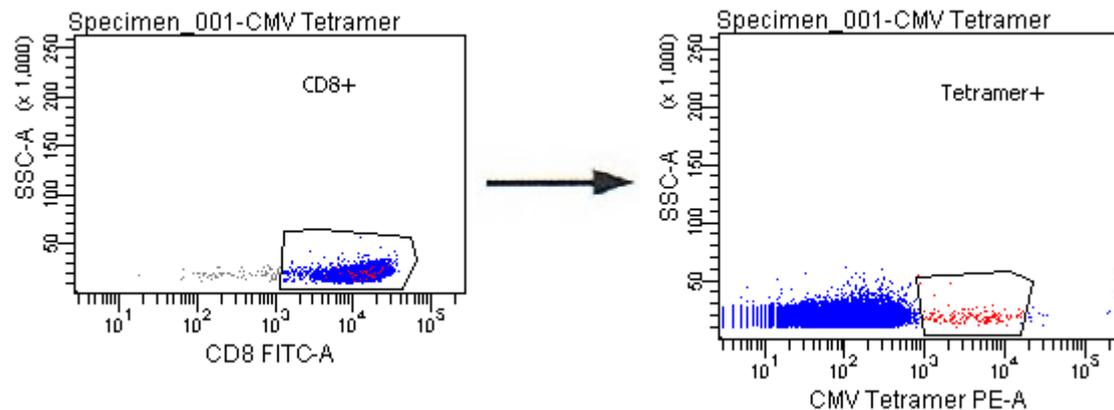


Abbildung 2: Selektion der CMV+ Lymphozyten

Auf dem linken Bild werden nur Zellen dargestellt, welche unter Abbildung 1 als CD3+ Zellen identifiziert wurden. Das rechte Bild zeigt nur CD8+ Zellen. Die Zellen wurden zusätzlich mit Antikörpern gegen CD8 und das CMV-Antigen gefärbt.

2.10.1 Streptamere

Bei der Färbung mit Streptameren ist zu beachten, dass alle Arbeitsschritte bei 4°C durchgeführt werden und auch alle Reagenzien und Materialien diese Temperatur vor Versuchsbeginn erreicht haben sollten.

Zur Vorbereitung der Färbung wurden zunächst 0,75 µg (5 µl) Strep-Tactin-PE (IBA BioTAGnology) mit 1 µg (4 µl) Streptamer MHC I zusammen mit 50 µl Buffer IS (IBA BioTAGnology) für 45 min bei 4°C inkubiert.

Die Zellen wurden nach der dreiwöchigen Kultur aus der Schale entnommen und gezählt. $2 \cdot 10^6$ TC werden in ein frisches 15 ml Röhrchen (Sarstedt) überführt und mit Buffer IS gewaschen. Die Zellsuspension wurde gesplittet und jeweils die Hälfte in ein frisches 1,5 ml Röhrchen (Eppendorf) überführt. Es folgte die Zentrifugation für 5 min bei 1600 U/min und 4°C. Der Überstand wurde entnommen. Das Zellpellet des Probenröhrchens wurde in der zuvor angesetzten Strep-Tactin-PE/MHC I-Mischung resuspendiert und 45 min bei 4°C inkubiert. Das zweite Röhrchen fungiert als Negativkontrolle und erhielt keine Streptamere. Im Anschluss erfolgte bei beiden Röhrchen die Zugabe von 10 µl CD3 FITC (BD) und die erneute Inkubation für 20 min bei 4°C. Die Proben werden anschließend einmal mit Buffer IS gewaschen und in 300 µl Buffer IS resuspendiert. Die Proben werden dann in ein FACS Röhrchen *5 ml Flow Cytometer* (Sarstedt) überführt und im Durchflusszytometer *CD FACS Canto* (BD) analysiert.

Röhrchen	FITC	PE	Bemerkung
1	CD3	Streptamer	Probe
2	CD3		Negativkontrolle

Tabelle 1: Streptamerfärbung

Proben und Antikörper der TC-Färbung mit Streptameren

2.10.2 Tetramere

Zur Überprüfung der Stimulation der CD8+ T-Lymphozyten wurde eine Färbung mit PE-gebundenen CMV-Tetrameren NLVPMVATV (Glycotope) durchgeführt. Hierzu wurden an Tag 1, 8, 15 und 23 jeweils $2 \cdot 10^6$ TC aus der Kultur entnommen, in ein frisches 2 ml Röhrchen (Eppendorf) überführt, einmal mit PBS gewaschen und in 2 ml PBS resuspendiert. Jeweils 1 ml, welcher $1 \cdot 10^6$ TC enthält, wurde in ein frisches 1,5 ml Röhrchen (Eppendorf) überführt. Es folgt die Zentrifugation für 5 min, RT und 1600 U/min. Der Überstand wurde entnommen und die Zellen in 100 μ l PBS resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 5 μ l CMV-Tetramer-PE zur Probe, die Negativkontrolle erhielt kein Tetramer. Die Probe wurde 45 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Beiden Röhrchen wurde dann 20 μ l CD8 FITC (BD) und 1 μ l CD3 APC (BD) hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 20 min bei RT wurden die Proben 5 min bei 1600 U/min zentrifugiert und anschließend in 300 μ l PBS resuspendiert und in ein FACS Röhrchen 5 ml *Flow Cytometer* (Sarstedt) überführt. Es folgte die Analyse im Durchflusszytometer *CD FACS Canto* (BD).

Röhrchen	FITC	PE	APC	Bemerkung
1	CD8	Tetramer	CD3	Probe
2	CD8		CD3	Negativkontrolle

Tabelle 2: Tetramerfärbung

Proben und Antikörper der TC-Färbung mit Tetrameren

2.10.3 IFN γ Sekretionsassay

TC, welche durch ein Fremdantigen aktiviert werden, sezernieren IFN γ . Zur Überprüfung dieser Sekretion wurde eine intrazelluläre IFN γ -Färbung durchgeführt. Als Kontrollprotein fungierte *Staphylococcus aureus* Enterotoxin A (SEA), welches als Fremdantigen die TC sicher aktiviert.

Hierzu wurden in drei Vertiefungen einer 24well-Platte je $1 \cdot 10^6$ DCs in 1 ml CellGro und 500 IE/ml IL-4 und 800 IE/ml GM-CSF gegeben. In zwei der Vertiefungen wurde je 1 ng/ml des CMV-Peptids NLVPMVATV gegeben. Die restlichen DCs fungierten als Negativkontrolle

und verblieben unbeladen. Die Positivkontrolle enthielt zusätzlich SEA (vgl. Tab. 3). Es folgte die Inkubation für 2h bei 37°C und 5% CO₂.

Anschließend erfolgt die Zugabe von 1000 IE/ml TNF-α (R&D Systems), 2000 IE/ml IL-1β (R&D Systems), 1000 IE/ml IL-6 (R&D Systems) und 1 µg/ml PGE2 (Sigma-Aldrich) und die erneute Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C für weitere 22 Stunden.

Im Anschluss wurden jeweils 1*10⁷ TC in 1 ml CellGro zu den DCs gegeben. Zusätzlich wurde zur Positivkontrolle 1 µl/ml SEA (Sigma) gegeben. Es erfolgte die Inkubation für 2h bei 37°C und 5% CO₂.

Zu jeder Vertiefung wurde nun 1 µl/ml Brefeldin A (Sigma Aldrich) gegeben. Die Zellen wurden nun für mindestens 4h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

Die Zellen wurden aus den Vertiefungen entnommen und separat in 15 ml Röhrchen (Sarstedt) gegeben und die jeweilige Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und aus jedem Röhrchen wurden 1*10⁶ Zellen für die Färbung und zusätzlich 2,5*10⁶ Zellen für die Kompensation entnommen. Anschließend erfolgte die Resuspension in 500 µl PBS und 500 µl Inside Fix *Inside Stain Kit* (Miltenyi) zur Fixierung der Zellen. Die Proben wurden gevortext und anschließend 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Es folgte die Zentrifugation für 5 min bei 1600 U/min und RT. Der Überstand wurde entnommen und die Zellen einmal mit 1 ml Inside Perm *Inside Stain Kit* (Miltenyi) gewaschen. Es erfolgte die Zugabe von 90 µl Inside Perm *Inside Stain Kit*. Dieses perforiert und permeabilisiert die Zellwand. So können intrazelluläre Botenstoffe wie IFN_γ markiert werden. Es wurden zusätzlich die Antikörper für die Färbung (siehe Tabelle 3) hinzugegeben. Nach gründlichem Vortexen erfolgte die Inkubation für 15 min im Dunkeln bei RT. Anschließend wurde einmal mit 1 ml Inside Perm gewaschen. Es folgte die Zentrifugation für 5 min bei 1600 U/min und RT, der Überstand wurde entnommen. Die Zellen wurden in 300µl PBS in einem FACS Röhrchen *5 ml Flow Cytometer* (Sarstedt) aufgenommen und innerhalb von 12h gemessen.

Röhrchen	FITC	PerCPCy5.5	APC	APC-H7	Bemerkung
1					Leere Kontrolle
2	IFN _γ	CD4	CD3	CD8	DCs nativ + TC
3	IFN _γ	CD4	CD3	CD8	DCs + Peptid + TC
4	IFN _γ	CD4	CD3	CD8	DCs + Peptid + TC + SEA

Tabelle 3: IFN_γ-Färbung

Proben und Antikörper der intrazellulären IFN_γ-Färbung der TC

2.11 Kultivierung und Vorbereitung der T2-Zellen für den Zytotoxizitätsassay

Zur Durchführung des Zytotoxizitätsassays wurde die T2-Zelle als Target genutzt. Diese wurde zur Vorbereitung mindestens 14 Tage lang kultiviert. Hierzu wurden $4 \cdot 10^5$ Zellen in 1 ml RPMI (Biochrom AG) mit 10 % inaktiviertem FCS (Biochrom AG) gelöst. Die Suspension wurde anschließend in eine Zellkulturflasche T75 (Biochrom AG) gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Ein Mediumaustausch erfolgte alle 4 Tage.

Zur Vorbereitung für den Assay wurden zwei Vertiefungen einer 24-Well-Platte mit je 1 ml RPMI und $1 \cdot 10^6$ T2-Zellen befüllt. In die erste Vertiefung wurden 10 µg/ml des HLA-A2-restringierten CMV-Peptids NLVPMVATV gegeben, die Zielzellen in der zweiten Vertiefung blieben als Negativkontrolle unbeladen. Es erfolgte die Inkubation für 1h bei 37°C und 5% CO₂.

2.12 Zytotoxizitätsassay

Zur Überprüfung der CMV-spezifischen Zytotoxizität der CTLs wurde der Chromfreisetzungssassay durchgeführt. Die T-Lymphozyten waren zuvor drei Wochen mit reifen, CMV-Peptid-beladenen DCs stimuliert worden. Nach dieser Stimulation sollten T-Lymphozyten CMV-positive T2-Zellen lysieren, welche zuvor mit radioaktivem Chrom 51 markiert worden waren. Durch die Lyse der Zielzellen wird das Chrom freigesetzt. Die gemessene Radioaktivität korreliert hierbei mit der Anzahl der zerstörten Zellen.

Zunächst wurden sowohl $1 \cdot 10^6$ der CMV-Peptid-beladenen als auch der unbeladenen T2-Zellen aus den Vertiefungen der 24-Loch-Platte entnommen und separat in frische 15 ml Falcon-Röhrchen (Sarstedt) gefüllt. Es folgte die Zentrifugation für 5 min bei 1600 U/min und RT, der Überstand wurde anschließend entnommen. Im Radioaktivitätslabor (Dr. Mildred-Scheel-Haus, UKSH Kiel) wurde das Pellet in 100 µl Chrom *Natrium chromate* [Cr 51] (Hartmann) resuspendiert und die Zellen 1h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen dreimal mit RPMI gewaschen, um das überschüssige Chrom zu eliminieren. Danach erfolgte die Resuspension in 10 ml RPMI, sodass sich eine Konzentration von 5000 T2-Zellen in 50 µl Suspension ergab.

Während der Inkubationszeit der T2-Zellen wurde eine 96-Well-Platte mit Rundboden (Sarstedt) mit den Effektorzellen vorbereitet. Sowohl die Probe als auch die Positiv- und Negativkontrolle wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Positivkontrolle (maximum release) sollte die maximale Chromfreisetzung darstellen. Hierzu wurden $5 \cdot 10^3$ T2-Zellen in 100 µl RPMI und 100 µl Triton X-100 Detergent (Merck) inkubiert. Triton X-100 ist eine Seifenlösung und führt zur Zerstörung aller T2-Zellen und somit zur maximalen Chromfreisetzung. Die Negativkontrolle (minimum release) stellte die basale Chromfreisetzung der T2-Zellen dar, hierzu wurden $5 \cdot 10^3$ T2-Zellen in 200 µl RPMI aufgenommen. Die Proben enthielten neben den chrombeladenen T2-Zellen auch die

Effektorzellen, im Verhältnis 5:1, 10:1, 20:1, 50:1 und 100:1. Es wurde jeweils eine Reihe mit peptidbeladenen und eine mit unbeladenen T2-Zellen durchgeführt (Tab.4). Es folgte die Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ für 4h.

	1	2	3	4	5	6
A	T2+Triton	T2+Triton	T2+Triton	T2+CMV +Triton	T2+CMV+ Triton	T2+CMV +Triton
B	T2	T2	T2	T2+CMV	T2+CMV	T2+CMV
C	T2+TC 1:5	T2+TC 1:5	T2+TC 1:5	T2+CMV +TC 1:5	T2+CMV +TC 1:5	T2+CMV +TC 1:5
D	T2+TC 1:10	T2+TC 1:10	T2+TC 1:10	T2+CMV +TC 1:10	T2+CMV +TC 1:10	T2+CMV +TC 1:10
E	T2+TC 1:20	T2+TC 1:20	T2+TC 1:20	T2+CMV +TC 1:20	T2+CMV +TC 1:20	T2+CMV +TC 1:20
F	T2+TC 1:50	T2+TC 1:50	T2+TC 1:50	T2+CMV +TC 1:50	T2+CMV +TC 1:50	T2+CMV +TC 1:50
G	T2+TC 1:100	T2+TC 1:100	T2+TC 1:100	T2+CMV +TC 1:100	T2+CMV +TC 1:100	T2+CMV +TC 1:100

Tabelle 4: Standardversuch des Zytotoxassays

Die Tabelle zeigt exemplarisch eine halbe 96well-Platte mit dem Standardversuchsansatz.

Reihe A repräsentiert hierbei die Positivkontrolle (maximum release), Reihe B die Negativkontrolle (minimum release). Die Reihen C bis G stellen Proben der Spender dar.

Anschließend wurden die Platten 5 min bei 1600 U/min und RT zentrifugiert. Jeweils 25 µl der Überstände wurde in eine neue 96-well-Platte (Perkin Elmer) gegeben. Diese war zuvor vorbereitet worden, indem in jede Vertiefung 125 µl Optiphase (Perkin Elmer) gegeben worden war. Die Platte wurde mit einer Plastikfolie abgeklebt und anschließend für 15 min auf eine Rüttelplatte (Witeg) mit 900 rpm gestellt.

Im Anschluss wurde die Platte in den Beta-Counter *Micro Beta TriLux* (Perkin Elmer) gestellt. Hier wurde die Radioaktivität jeder Vertiefung während einer Minute gemessen und der Mittelwert der dreifachen Versuchsansätze gebildet. Um dann den prozentualen Anteil der lysierten Zellen zu errechnen, wurde folgende Formel verwendet: $(\text{MW Probe} - \text{MW minimum release}) / (\text{MW maximum release} - \text{MW minimum release})$. Die Werte wurden auf zwei Nachkommastellen gerundet, negative Ergebnisse wurden aufgerundet auf 0.

3. Ergebnisse

3.1 Stimulation und Expansion der T-Lymphozyten mit MACSiBead Particles

3.1.1 Stimulation mit Peptid-beladenen DCs

Im Blut eines gesunden CMV-positiven Spenders ist nur eine geringe Anzahl von CMV-spezifischen T-Lymphozyten vorhanden. Um diese Population zu vergrößern, erfolgte die Stimulation der CD14-negativen Zellen über zwei Wochen. Hierbei wurden die T-Lymphozyten an Tag 1, 8, 15 mit ausgereiften, CMV-Peptid-beladenen DCs stimuliert. Zudem erfolgte an diesen Tagen und zusätzlich am Ende der Stimulation die Ermittlung der Zellzahl.

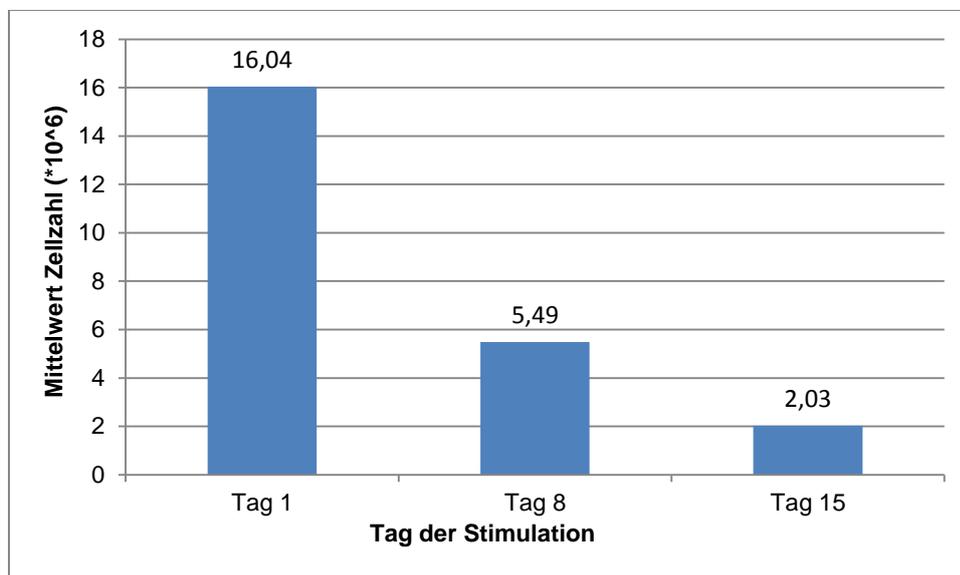


Abbildung 3: Mittelwert Zellzahl

Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Zellzahlen ($\cdot 10^7$) der T-Lymphozyten an Tag 1, 8 und 15 während der Stimulation.

Die Stimulation begann, wie in Tabelle 5 zu sehen, mit $5,8 \cdot 10^7$ bis $34,8 \cdot 10^7$ (Mittelwert: $16,04 \cdot 10^7$) CD14-negativen Zellen. Die Zellzahl nahm während der Stimulation kontinuierlich ab, da nur die CMV-spezifischen Zellen durch die dendritischen Zellen aktiviert wurden, die unspezifischen Zellen jedoch ohne Stimulus in Apoptose gingen. An Tag 8 waren noch $1 \cdot 10^7$ bis $10,8 \cdot 10^7$ (Mittelwert: $5,49 \cdot 10^7$) Zellen zu zählen und am Ende der Stimulation verblieben $0,45 \cdot 10^7$ bis $4,2 \cdot 10^7$ (Mittelwert: $2,03 \cdot 10^7$) Zellen. Auffällig ist hierbei, dass eine hohe Zellzahl zu Beginn der Stimulation nicht zwangsläufig mit hohen Zellzahlen an Tag 15 zusammenhing. 0,2% bis 66,2% der CD3+ Zellen waren an Tag 15 CMV-positiv.

Spender	Tag 1	Tag 8	Tag 15	CMV+ TC an Tag 15
A	$6 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	$0,45 \cdot 10^7$	66,2%
B	$34,8 \cdot 10^7$	$4,8 \cdot 10^7$	$1,9 \cdot 10^7$	0,2%
C	$11 \cdot 10^7$	$2,8 \cdot 10^7$	$1 \cdot 10^7$	3,3%
D	$27 \cdot 10^7$	$10,8 \cdot 10^7$	$1,2 \cdot 10^7$	0,8%
E	$16,5 \cdot 10^7$	$6,5 \cdot 10^7$	$2,64 \cdot 10^7$	/ ¹⁾
F	$5,8 \cdot 10^7$	$4,4 \cdot 10^7$	$1,92 \cdot 10^7$	/ ¹⁾
G	$11,8 \cdot 10^7$	$5,4 \cdot 10^7$	$3,15 \cdot 10^7$	/ ¹⁾
H	$19,4 \cdot 10^7$	$6,3 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^7$	/ ¹⁾
I	$12,1 \cdot 10^7$	$7,4 \cdot 10^7$	$1,8 \cdot 10^7$	/ ¹⁾
<i>Mittelwert</i>	$16,04 \pm 9,67 \cdot 10^7$	$5,49 \pm 2,80 \cdot 10^7$	$2,03 \pm 1,15 \cdot 10^7$	17,63%

Tabelle 5: Zellzahl während der Stimulation der T-Lymphozyten

Die Tabelle zeigt den Verlauf der Zellzahlen der T-Lymphozyten während der Stimulation an Tag 1, 8 und 15 und den Anteil der CD3+ CMV+ Zellen an Tag 15.

¹⁾Es erfolgte keine Färbung der Zellen, sondern direkt die Expansion.

Zum Nachweis der CMV-Spezifität wurde eine Färbung mit PE-gebundenen MHC I Streptameren durchgeführt. Zusätzlich wurden die CTLs mit CD3-APC als Marker für T-Lymphozyten gefärbt. Die Färbung erfolgte an Tag 15 der Stimulation. Abbildung 4 zeigt die Färbung der T-Lymphozyten mit CMV-Streptameren bei Spender A und C.

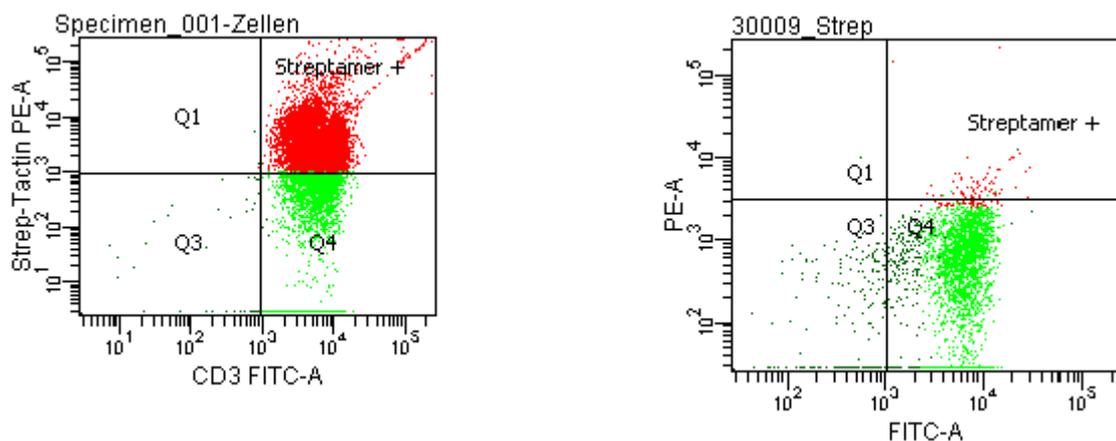


Abbildung 4: Streptamerfärbung

Die Abbildung zeigt die Färbung der CTLs mit Streptameren nach der Stimulation an Tag 15.

Bei Spender A konnten 66,2% CMV+ CD3+ Zellen detektiert werden, während es bei Spender C nur 3,3% waren.

3.1.2 Expansion der T-Lymphozyten mit MACSiBead Particles

Da die Zellzahl nach dreiwöchiger Stimulation deutlich abnimmt, musste, um weitere Spezifitätsnachweise durchführen zu können, die Zellzahl wieder erhöht werden. Dazu erfolgte eine zweiwöchige Expansion mit MACSiBead Particles (Miltenyi Biotec) der T-Lymphozyten. Auch hierbei wurde wöchentlich die Zellzahl ermittelt.

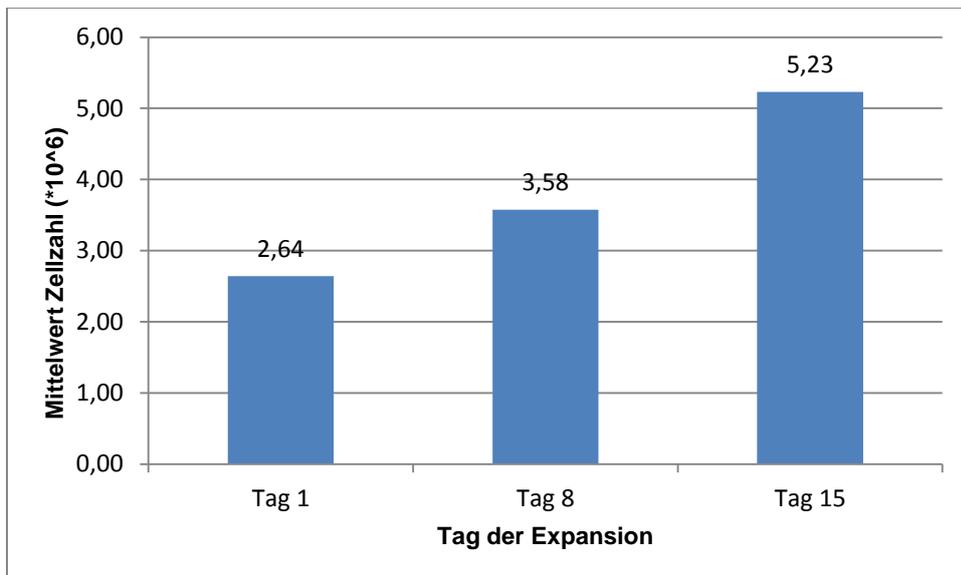


Abbildung 5: Mittelwert Zellzahl

Die Abbildung zeigt den Mittelwert der Zellzahlen ($\cdot 10^7$) der T-Lymphozyten an Tag 1, 8 und 15 während der Expansion.

Bei Spender F und I kam es zu einer deutlichen Zunahme der Zellzahl. Jedoch war der Anteil an CMV-spezifischen CTLs mit 0,6% und 1% gering. Bei den Spendern G und H kam es nicht zu einer Zunahme der Zellzahl, bei Spender E nahm diese sogar ab. Man konnte somit zwar die Zellzahl wieder erhöhen, jedoch war nur noch ein geringer Anteil der T-Lymphozyten CMV-spezifisch.

Spender	Tag 1	Tag 8	Tag 15	Anzahl der CMV-positiven Zellen an Tag 15
E	$2,44 \cdot 10^7$	$0,3 \cdot 10^7$	$0,56 \cdot 10^7$	0%
F	$1,92 \cdot 10^7$	$\beta^1)$	$9,9 \cdot 10^7$	0,6%
G	$2,85 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^7$	$\beta^2)$	0,1%
H	$4,2 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$\beta^2)$	2,4%
I	$1,8 \cdot 10^7$	$8 \cdot 10^7$	$\beta^2)$	1,0%
Mittelwert	$2,64 \pm 0,97 \cdot 10^7$	$3,58 \pm 3,31 \cdot 10^7$	$5,23 \pm 6,6 \cdot 10^7$	0,82%

Tabelle 6: Zellzahl während der Expansion der T-Lymphozyten

Die Tabelle zeigt die Zellzahl an Tag X und den prozentualer Anteil der CD3+ CMV+ Zellen am Ende der Expansion.

¹⁾In diesem Fall konnte die Zellzahl nicht ermittelt werden.

²⁾Es erfolgte lediglich eine Stimulation für eine Woche.

Am Ende der Expansion mit MACSiBead Particles wurde ebenfalls eine Färbung mit CD3-APC und Streptamer-PE durchgeführt, um zu überprüfen, wie hoch der Anteil an CMV-spezifischen CTLs war. Abbildung 6 zeigt, dass bei Spender H am Ende der Expansion 2,4% der CD3+ Zellen CMV-spezifisch waren, bei Spender F nur 0,6%.

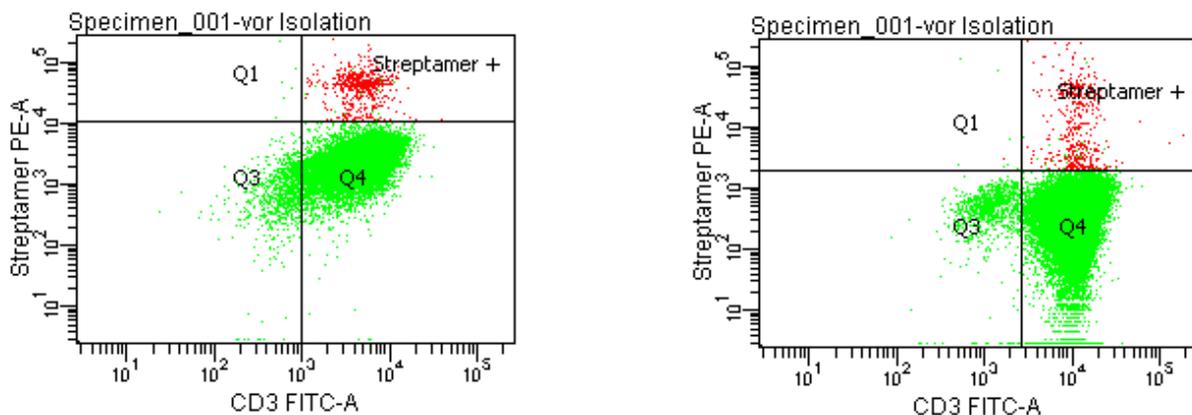


Abbildung 6: Streptamerfärbung

Die Abbildung zeigt die Färbung der CTLs mit Streptameren am Ende der Expansion an Tag 15. Bei Spender H (links) konnten 2,4% CMV-positiv CD3+ Zellen detektiert werden, während es bei Spender F (rechts) nur 0,6% waren.

3.2 Stimulation und Expansion der CD8+ CTLs unter optimierten Kulturbedingungen

Da bei der alleinigen Stimulation die Zellzahl am Ende dieser stark abgenommen hatte und durch die anschließende Expansion der Anteil an CMV-spezifischen T-Zellen sehr gering war, wurde auf ein Protokoll umgestiegen, in dem zum einen die CTLs gleichzeitig stimuliert und expandiert und zum anderen die Kulturbedingungen optimiert wurde.

Spender	Tag 1		Tag 8		Tag 15		Tag 22	
	Zellzahl	CMV+	Zellzahl	CMV+	Zellzahl	CMV+	Zellzahl	CMV+
J	1*10 ⁶	/	4,55*10 ⁶	/	110*10 ^{6 1)}	77,8%	120*10 ⁶	96,5%
K	1*10 ⁶	/	8,4*10 ^{6 1)}	/	68*10 ^{6 1)}	50,4%	64*10 ⁶	19,9%
L	2*10 ⁶	/	17,5*10 ^{6 3)}	/	4*10 ^{6 3)}	/	17*10 ⁶	0,4%
M	2*10 ⁶	0,3%	16,5*10 ^{6 2)}	5,2%	40*10 ^{6 2)}	13,6%	70*10 ⁶	13,7%
N	2*10 ⁶	0,2%	4,5*10 ⁶	0,0%	10,5*10 ⁶	0,0%	4)	
O	2*10 ⁶	3,6%	1*10 ⁶	0,6%	5)			
P	2*10 ⁶	0,1%	2*10 ⁶	/	50*10 ^{6 2)}	6,7%	21*10 ⁶	0,2%
Mittelwert	1,71*10 ⁶ ±0,49	1,05%	7,78*10 ⁶ ±6,73	1,93%	47,08*10 ⁶ ±39,11	29,70%	58,4*10 ⁶ ±42,05	26,14%

Tabelle 7: Zellzahl und Anteil CMV-positiver Zellen

Die Tabelle zeigt sowohl die Zunahme der Zellzahl als auch die Zunahme der CMV-spezifischen CD8+ CTLs im Laufe der Stimulation.

¹⁾Es wurden nur 6*10⁶ CTLs zur weiteren Stimulation genutzt.

²⁾Es wurden nur 4*10⁶ CTLs zur weiteren Stimulation genutzt.

³⁾Es wurden nur 2*10⁶ CTLs zur weiteren Stimulation genutzt.

⁴⁾Es erfolgte keine weitere Stimulation, da keine CMV-positiven CTLs nachzuweisen waren.

⁵⁾Es erfolgte keine weitere Stimulation, da nicht genug CTLs vorhanden waren.

Wie in Tabelle 7 gezeigt wird, wurde die Stimulation mit 1*10⁶ bis 2*10⁶ CTLs (Mittelwert 1,71*10⁶) gestartet. Am Ende der Expansion konnten bis zu 120*10⁶ (Mittelwert 58,4*10⁶) detektiert werden. Hiervon waren bis zu 96,5% CMV-positiv (Mittelwert 26,14%).

Zu beobachten war eine große individuelle Varianz der Zellzahlvermehrung und auch der anteiligen CMV-spezifischen CTLs zwischen den einzelnen Spendern. Bei einigen Spendern konnten keine CMV-spezifischen CTLs stimuliert werden. Bei Spender O beispielsweise fand sich anfangs mit 3,6% CMV+ CTLs einen relativ hohen Anteil an der Gesamtzahl der CTLs. Trotzdem gelang es nicht, die CTLs CMV-spezifisch zu aktivieren. Spender M hingegen startete mit nur 0,3% CMV+ CTLs und es fanden sich nach dreiwöchiger Expansion 70*10⁶ CTLs, wovon 13,7% CMV-spezifisch waren (Abb. 7).

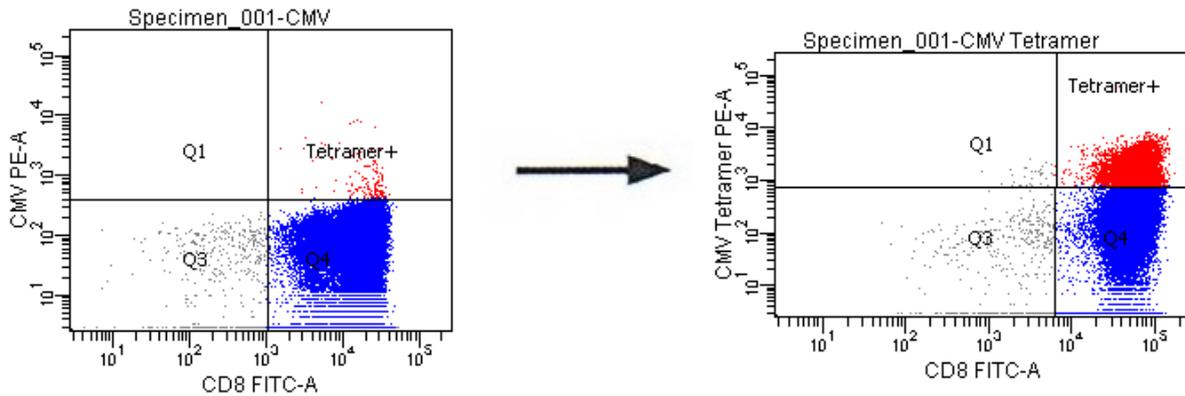


Abbildung 7: Tetramerfärbung

Die Abbildung zeigt die Färbung der CTLs mit CMV-Tetrameren an Tag 1 (links) und Tag 22 (rechts) bei Spender M. Der Anteil der CMV+ CD8+ CTLs konnte von 0,3% auf 13,7% erhöht werden.

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass bei den Spendern, bei welchen durch die Stimulation und Expansion eine extrem hohe Zellzahl generiert wurde (z.B. Spender J, K, L), nur ein kleiner Anteil der Zellen an den Tagen 8 und 15 zur weiteren Stimulation genutzt wurde, da die komplette Weiterkultivierung zu zeitaufwändig gewesen wäre.

Zum anderen konnten bei einigen Spendern (z.B. Spender N, O) zu einem Zeitpunkt keine CTLs mehr detektieren werden, sodass diese nicht weiterkultiviert werden konnten und somit auch nicht in die Statistik der Tage 15 und 22 eingehen.

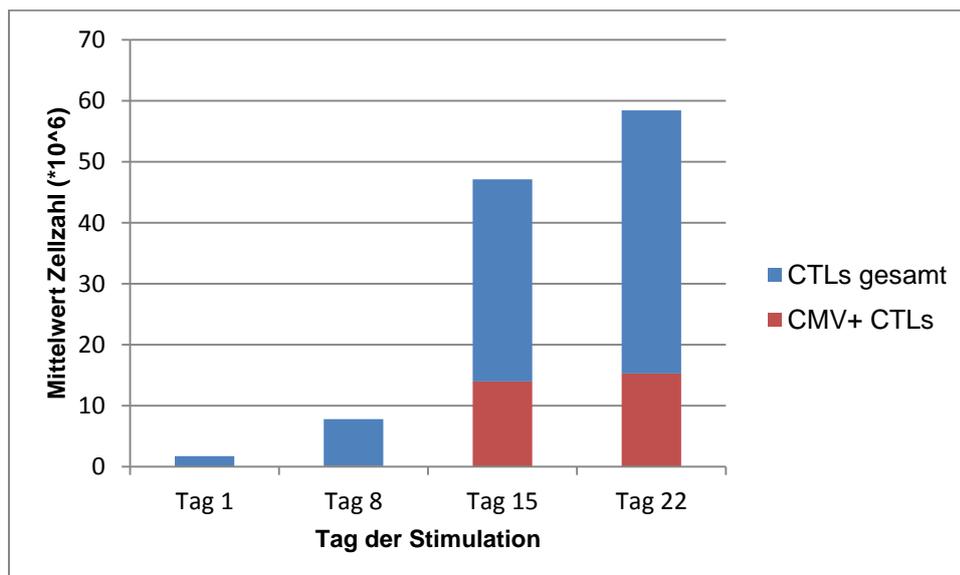


Abbildung 8: Mittelwert der CTLs nach Stimulation

Die Abbildung zeigt die stetige Zunahme sowohl der Gesamtzellzahl als auch des Anteils der CMV-spezifischen CTLs.

Abbildung 8 zeigt den kontinuierlichen Anstieg (als Mittelwerte) sowohl der Gesamtanzahl der CTLs als auch des Anteils der CMV-spezifischen CTLs. Hierbei steht der blaue Balken für die Gesamtzahl der CTLs und der rote Balken für die Gesamtzahl an CMV+ CTLs. Im Durchschnitt wurde die Stimulation mit $1,71 \cdot 10^6$ CTLs gestartet, hiervon waren bis zu 3,6% (MW 1,05%) CMV-positiv. Nach einer Woche stieg die Zellzahl auf $1 \cdot 10^6$ bis $17,5 \cdot 10^6$ (MW $7,78 \cdot 10^6$) CTLs mit 0% bis 5,2% (MW 1,93%) CMV+ CTLs. An Tag 15 konnten schon $4 \cdot 10^6$ bis $110 \cdot 10^6$ Gesamtzellen gezählt werden, davon waren 0,0% bis 77,8% (MW 29,7%) CMV-positiv. Am Ende der simultanen Stimulation und Expansion befanden sich $17 \cdot 10^6$ bis $120 \cdot 10^6$ (MW $58,4 \cdot 10^6$) CTLs mit einem Anteil an CMV+ CTLs von 0,2% bis 96,5% (MW 26,14%).

3.3 Nachweis der CMV-spezifischen intrazellulären IFN γ -Produktion

T-Lymphozyten, welche durch Kontakt zu einem Fremdartigen aktiviert wurden, sezernieren IFN γ . Der Nachweis der intrazellulären IFN γ -Produktion konnte nur bei CTLs durchgeführt werden, welche unter den optimierten Kulturbedingungen aktiviert wurde. Bei dem anderen Protokoll, bei dem die CTLs zunächst mit Peptid-beladenen DCs stimuliert und im Anschluss mit MACSiBeads expandiert wurden (s. 2.7 bzw. 3.1) konnten nicht genug CTLs aktiviert werden, um den IFN γ -Sekretionsassay durchzuführen.

Die CTLs, welche drei Wochen mit ausgereiften DCs unter optimierten Kulturbedingungen stimuliert wurden, wurden im Anschluss an die Stimulation erneut mit DCs restimuliert. Hierbei wurden für die Negativkontrolle zu einem Ansatz DCs gegeben, welche nicht Peptid-beladen waren, zum zweiten Ansatz Peptid-beladene DCs und zum dritten Ansatz zusätzlich SEA als Postivkontrolle.

Spender	DCs nativ+TC	DCs+CMV+TC	DCs+TC+SEA
L	¹⁾	0,3%	0,5%
M	0,2%	1,7%	1,5%

Tabelle 8: IFN γ -Produktion

Die Tabelle zeigt die prozentuale IFN γ -Produktion bei Spender L und M.

¹⁾Dieser Ansatz wurde nicht durchgeführt.

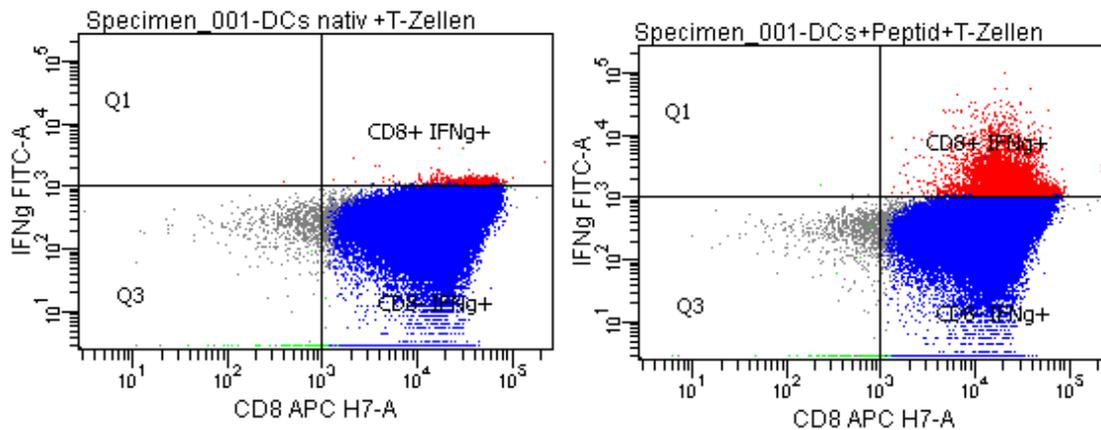


Abbildung 9: IFN γ -Produktion

Die Abbildung zeigt, dass bei Spender M T-Lymphozyten, welche mit Peptid-beladenen, ausgereiften DCs restimuliert wurden, IFN γ produzieren (re. Abb.), wohingegen T-Lymphozyten, welche mit unbeladenen DCs restimuliert wurden, dies nicht tun (li. Abb.).

Die expandierten T-Lymphozyten, welche mit Peptid-beladenen DCs restimuliert wurden, produzierten IFN γ im gleichen Maße wie die CTLs, welche zusätzlich mit SEA stimuliert wurden (Positivkontrolle). Bei Spender M wurde durch die CTLs, welche mit Peptid-beladenen DCs restimuliert wurden, von 1,7% der CD8+ CTLs IFN γ produziert. Hatten die CTLs Kontakt zu SEA, so produzierten 1,5% der CD8+ CTLs IFN γ . Hingegen wurden von den CTLs, welche mit unbeladenen DCs restimuliert wurden, kein IFN γ produziert.

3.4 Zytotoxizität der T-Lymphozyten

Da zur Überprüfung der CMV-spezifischen Zytotoxizität eine größere Anzahl von CTLs benötigt wurde, konnte der Chromfreisetzungssassay nur mit den CTLs durchgeführt werden, welche unter optimierten Kulturbedingungen simultan stimuliert und expandiert wurden, da nur hierbei genug CTLs kultiviert wurden. Der Chromfreisetzungssassay wurde hierbei am Ende der dreiwöchigen Stimulation und Expansion durchgeführt.

	Stimulationsverhältnis CTLs : T2-Zellen				
	5:1	10:1	20:1	40:1	100:1
Spender J					
T2-Zellen ohne CMV-Peptid	0%	0%	0%	0%	0%
T2-Zellen + CMV-Peptid	0%	0%	0%	0%	16,30%
Spender M					
T2-Zellen ohne CMV-Peptid	0%	0%	0%	0%	0%
T2-Zellen + CMV-Peptid	0%	0%	5,64%	29,47%	54,70%

Tabelle 9: Ergebnisse Zytotoxizitätassay

Die Tabelle zeigt, dass die CTLs die CMV-Peptid-beladenen T2-Zellen lysierten, während die unbeladenen nicht lysiert wurden.

Die höchste Zytotoxizität mit 54,70% konnte bei Spender M erreicht werden, indem man die CTLs im Verhältnis 100:1 mit den CMV-beladenen T2-Zellen inkubierte. Die unbeladenen T2-Zellen wurden in keinem Stimulationsverhältnis von den CTLs lysiert. Man konnte bei beiden Spendern beobachten, dass die prozentuale Anzahl der lysierten Targetzellen mit Erhöhung des Stimulationsverhältnisses stieg.

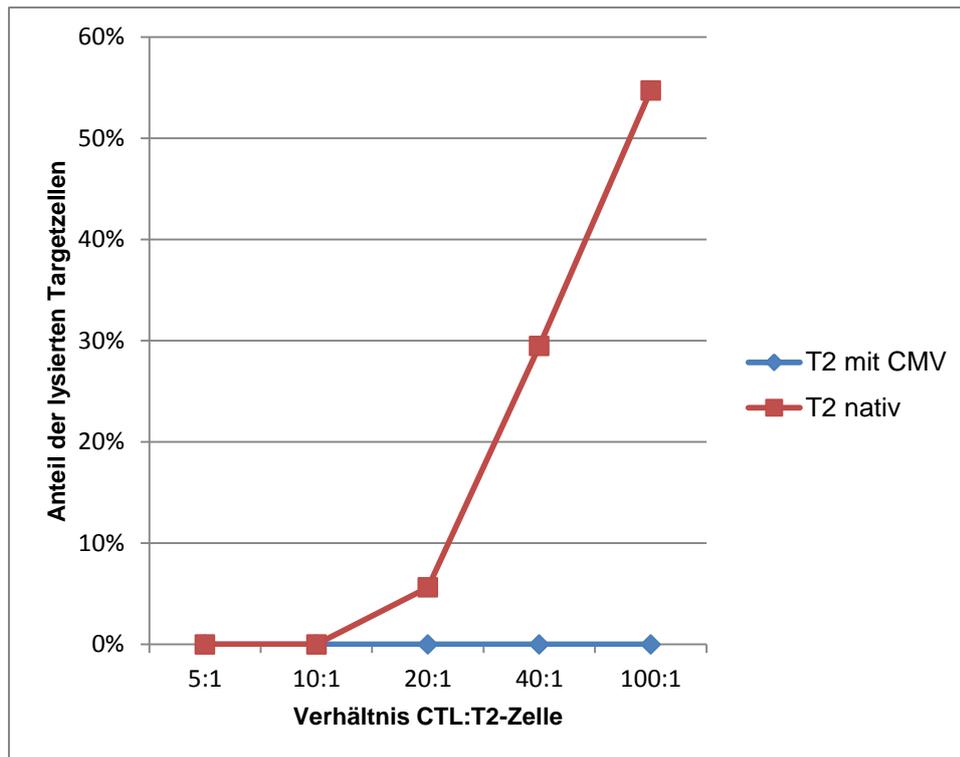


Abbildung 10: Ergebnisse Zytotoxizitätassay Spender M

Die Abbildung zeigt die Lyse der CMV-beladenen T2-Zellen durch die T-Lymphozyten, sowie eine Zunahme der lysierten Zellen mit Erhöhung der Stimulationsrate. Zudem zeigt die Abbildung auf, dass die unbeladenen T2-Zellen von den CTLs nicht angegriffen wurden.

Abbildung 10 zeigt den Erfolg des Zytotoxassays bei Spender M. Die rote Linie stellt die Ergebnisse der Inkubation von CMV+ CTLs mit CMV+ T2-Zellen dar, während die blaue Linie die Ergebnisse des Ansatzes von CMV+ CTLs und unbeladenen T2-Zellen repräsentiert. Wie gut zu erkennen ist, waren die CTLs dazu in der Lage, CMV-Peptid-beladene T2-Targetzellen zu lysieren. Hierbei stieg der Anteil der lysierten Zellen deutlich mit zunehmendem Stimulationsverhältnis. Während bei einer Stimulation von 20 CTLs zu einer T2-Zelle nur 5,64% der Targets zerstört wurden, stieg dieser Wert bei einem Stimulationsverhältnis von 100:1 auf 54,7% an. Hingegen waren die CTLs nicht in der Lage, unbeladene T2-Zellen zu lysieren. Selbst beim höchsten Stimulationsverhältnis wurden 0% der Targetzellen zerstört. Dieser Versuch zeigt somit, dass die CMV+ CTLs nicht nur dazu in der Lage sind, Targetzellen zu zerstören, sondern dies auch spezifisch in Bezug auf das CMV tun, da die CMV+ Targets im großen Maße lysiert wurden, die unbeladenen aber verschont blieben.

3.5 Separation CMV-spezifischer T-Lymphozyten

Nach der erfolgten Stimulation und Expansion war nur ein kleiner Anteil der Gesamtzellen CMV-positiv. Es wurde versucht, diese CMV-spezifischen CTLs von den unspezifischen mit Hilfe der Streptamere bzw. Tetrameren zu separieren, um die Reinheit für weitere Versuche zu erhöhen.

3.5.1 Streptamere

Spender	Vor Isolation			Positivfraktion nach Isolation		
	Zellzahl gesamt	Anteil CMV+TC	Anzahl CMV+TC	Zellzahl gesamt	Anteil CMV+ TC	Anzahl CMV+ TC
A	2,1*10 ⁶	66,2%	1,39*10 ⁶	0,1*10 ⁶	2,4)	4)
B	19*10 ⁶	0,2%	0,04*10 ⁶	1,4)	2,4)	4)
C	10*10 ⁶	3,3%	0,33*10 ⁶	1,4)	2,4)	4)
D	12*10 ⁶	0,8%	0,1*10 ⁶	0,6*10 ⁶	4,4%	0,03*10 ⁶
F	99*10 ⁶	0,6%	0,59*10 ⁶	23*10 ⁶	1,1%	0,25*10 ⁶
G	20*10 ⁶	0,1%	0,02*10 ⁶	2,5*10 ⁶	0%	0*10 ⁶
H	40*10 ⁶	2,4%	0,96*10 ⁶	8*10 ⁶	11,9%	0,95*10 ⁶
I	80*10 ⁶	1,0%	0,8*10 ⁶	3,4)	2,4%	4)
J	120*10 ⁶	96,5%	115,8*10 ⁶	77*10 ⁶	95,3 %	73,38*10 ⁶
Mittelwert	44,68*10 ⁶	19,01%	13,34*10 ⁶	12,36*10 ⁶	12,79%	8,29*10 ⁶
Median	20*10 ⁶	1,0%	0,59*10 ⁶	0,6*10 ⁶	1,1%	0,0*10 ⁶

Tabelle 10: Isolation der CTLs mit Streptameren

Mit Hilfe der Streptamere konnte keine suffiziente Anreicherung der CMV-positiven CTLs erreicht werden.

¹⁾Es waren keine Zellen zu detektieren.

²⁾Aufgrund der geringen Zellzahl konnte keine Färbung durchgeführt werden.

³⁾Die Zellen wurden direkt gefärbt. Auf die Bestimmung der Zellzahl wurde verzichtet, da dies einen Großteil der Zellen gekostet hätte.

⁴⁾Der Wert geht als 0 in die Statistik ein.

Wie in Tabelle 10 zu sehen ist, kam es nach der Isolation mit den Streptameren zu einer Reduktion der CTLs von 2,1*10⁶ bis 120*10⁶ (MW 44,68*10⁶) auf 0,1*10⁶ bis 77*10⁶ (MW 12,36*10⁶) CTLs in der Positivfraktion nach Isolation. Zwar konnte ein Anstieg des prozentualen Anteils der CMV-positiven CTLs von 0,1% bis 96,5% (MW 19,01%) auf 0% bis 95,3% (MW 12,79%) festgestellt werden, die absolute Anzahl an CMV+ CTLs sank jedoch von 0,02*10⁶ bis 115,8*10⁶ (MW 13,34*10⁶) auf 0,03*10⁶ bis 73,38*10⁶ (MW 8,29*10⁶).

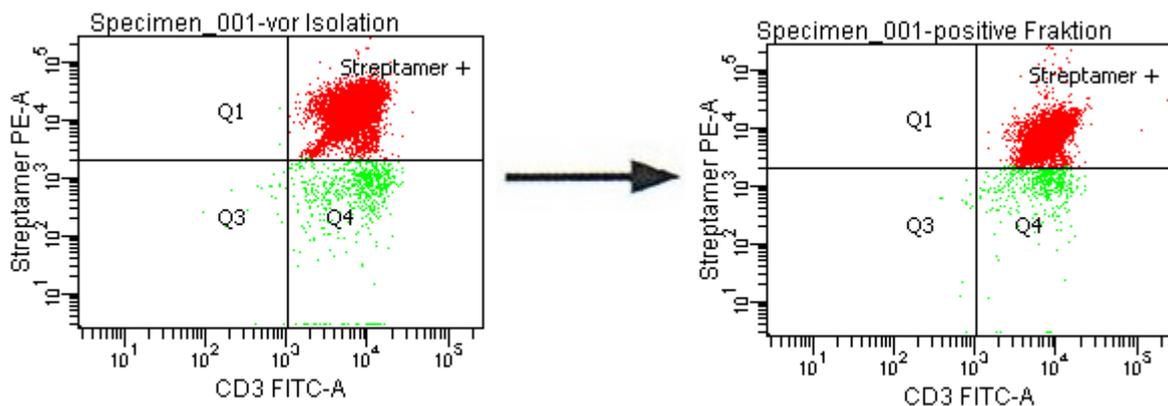


Abbildung 11: Streptamer-Isolation bei Spender J

Die Abbildungen zeigen, dass der Anteil der CMV+ Zellen von 96,5% auf 95,3% gleich geblieben ist. Allerdings ist die absolute Anzahl an CMV+ CTLs von $115,8 \cdot 10^6$ auf $73,38 \cdot 10^6$ gesunken.

Bei Spender J beispielsweise blieb der Anteil der CMV-spezifischen Zellen vor und nach der Isolation gleich. Allerdings sank die Gesamtzahl an CMV+ CTLs von $115,8 \cdot 10^6$ auf $73,38 \cdot 10^6$, das macht einen Verlust von 36,63% an CMV-spezifischen CTLs. Die Anreicherung CMV-spezifischer CTLs ist somit nicht gelungen. Im Gegenteil gingen durch die Methodik noch CMV+ CTLs verloren.

3.5.2 Tetramere

Spender	Vor Isolation		Positivfraktion	
	Zellzahl	CMV+	Zellzahl	CMV+
M	$26 \cdot 10^6$	6,2%	$7 \cdot 10^6$	82,9%
P	$10 \cdot 10^6$	0,2%	$1,8 \cdot 10^6$	96,4%
Mittelwert	$18 \cdot 10^6$	3,2%	$4,4 \cdot 10^6$	89,65%

Tabelle 11: Isolation der CTLs mit Tetrameren

Durch die Isolation mit Tetrameren und Anti-PE-MB konnte der Anteil der CMV-positiven CTLs deutlich erhöht werden.

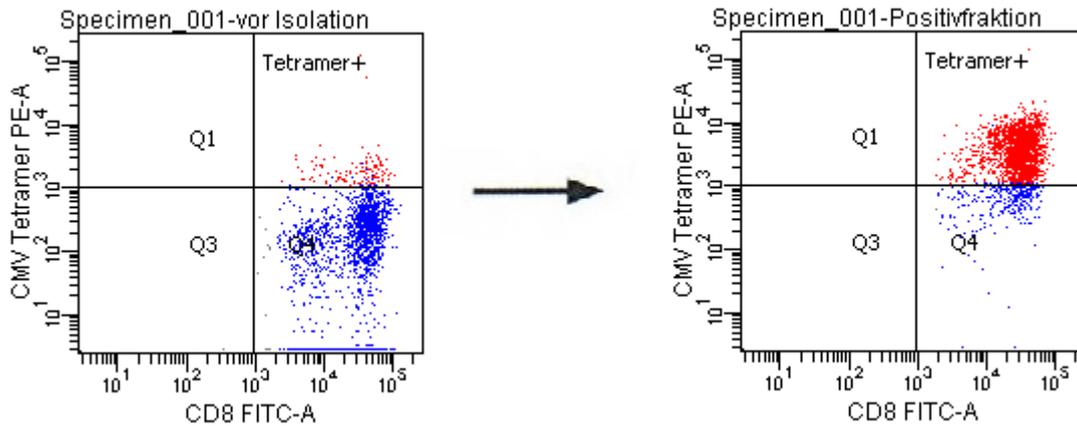


Abbildung 12: Tetramer-Isolation bei Spender M

Die Abbildungen zeigen, dass der Anteil der CMV+ CD8+ Zellen von 6,2% auf 82,9% gestiegen ist.

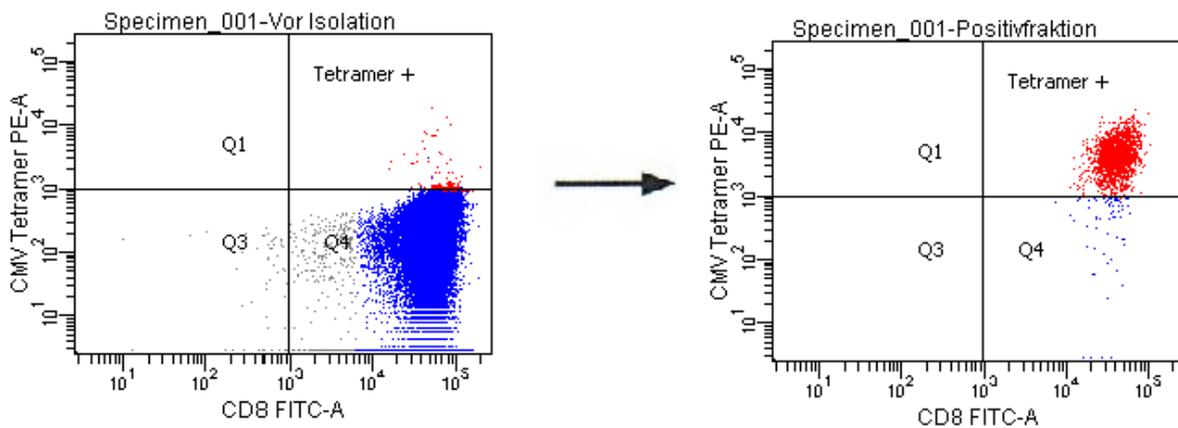


Abbildung 13: Tetramer-Isolation bei Spender P

Die Abbildungen zeigen, dass der Anteil der CMV+CD8+ Zellen von 0,2% auf 96,4% gestiegen ist.

Bei den Spendern M und P konnte durch die Isolation mit CMV-Tetrameren die Reinheit der CMV-spezifischen CTLs deutlich erhöht werden. Bei Spender M waren vor der Isolation 6,1% der CD8+ CTLs CMV-spezifisch, in der Positivfraktion fanden sich $7 \cdot 10^6$ CTLs. Hier waren 82,9% der CD8-positiven Zellen CMV-spezifisch. Bei Spender J waren vor der Isolation nur 0,2% der CD8+ Zellen CMV-positiv. Nach der Isolation wurden $1,8 \cdot 10^6$ CTLs gezählt. Dabei waren 96,4% der CD8+ CTLs CMV-spezifisch.

4. Diskussion

4.1 Indikationen für eine adoptive Immuntherapie bei CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation

Die CMV-Erkrankung nach allogener Stammzelltransplantation gefährdet mit einer Mortalität von bis zu 84% entscheidend den Therapieerfolg. Die gefährlichste Komplikation ist die CMV-Pneumonie (Meyers et al. 1986). Die aktuelle Standardtherapie mit Ganciclovir verringert zwar das Risiko einer CMV-Infektion, aber das Gesamtüberleben wird nicht verlängert. Das ist bedingt durch ein erhöhtes Risiko für bakterielle und fungale Infekte, da Ganciclovir eine Myelosuppression mit Neutropenie bedingen kann (Winston et al. 1993, Boeck et al. 1996, Goodrich et al. 1993, Boeckh et al. 1996, Salzberger et al. 1997).

Der Hauptrisikofaktor für eine CMV-Infektion nach allogener Stammzelltransplantation ist eine verminderte Anzahl von immunkompetenten CMV-reaktiven CTLs. Die adoptive Immuntherapie bietet die Möglichkeit, einem Patienten diese CMV-spezifischen CTLs zur Verfügung zu stellen, ohne dass er durch wesentliche Nebenwirkungen gefährdet wäre. Mit den spezifischen CTLs konnten auch Patienten erfolgreich therapiert werden, bei denen die Therapie mit Virustatika aufgrund von Resistenzen oder Nebenwirkungen nicht zum Erfolg geführt hatte (Reusser et al. 1991, Riddell et al. 1992, Walter et al. 1995).

4.2 Aktivierung CMV-spezifischer T-Lymphozyten

4.2.1 Stimulation mit anschließender Expansion

Durch die Stimulation der CD14-negativen Zellen mit DCs, welche zuvor mit dem CMV-Peptid NLVPMVATV beladen und anschließend ausgereift worden waren, konnten erfolgreich CMV-spezifische CD8+ TC generiert werden. Die T-Zellen wurden im Verhältnis 20:1 mit den DCs stimuliert. Hierbei nahm die Zellzahl kontinuierlich ab.

Der Nachweis der Spezifität der Zellen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei wurden neben Farbstoffen für den Oberflächenmarker CD3 auch Streptamere genutzt. Dies sind Farbstoff-gekoppelte HLA-Moleküle, welche das CMV-Antigen tragen. Somit können nur Zellen indirekt an den Farbstoff binden, welche spezifisch für CMV sind. Nach zweiwöchiger Expansion waren 0,2% bis 66,2% der Zellen CD3- und CMV-positiv (MW: 17,64%). Dabei zeigte sich, dass je höher der Prozentsatz an CMV-spezifischen T-Zellen war, desto geringer war die Gesamtzellzahl.

Auch andere Arbeitsgruppen haben versucht, CMV-spezifische CTLs mit Hilfe von Peptid-beladenen DCs zu generieren.

Kleihauer et al. (2001) haben mit autologen Peptid-beladenen DCs erfolgreich bei sechs von vierzehn Spendern CMV-spezifische CD8+ CTLs erzeugen können. Der Nachweis der Spezifität erfolgte hierbei durch eine IFN γ -Messung. Zu Beginn der Stimulation waren 0,2-1% aller CD8+ Zellen in der Lage, IFN γ zu sekretieren. Nach drei Stimulationen waren es 20-28% und nach fünf Stimulation 68-91% aller CD8+ CTLs (Kleihauer et al 2001).

Ebenso haben Peggs et al. (2001) es geschafft, mit Hilfe von autologen DCs, welche zuvor mit dem pp65-Antigen pulsiert wurden, T-Lymphozyten zu generieren, die im Anschluss an die Stimulation dazu in der Lage waren, im Zytotoxizitätsassay CMV-spezifisch Targetzellen zu lysieren (Peggs et al. 2001).

Bei beiden Arbeitsgruppen wurde keine Färbung der Zellen mit CMV-spezifischen Tetrameren durchgeführt. Ebenso wurde auf eine konkrete Bestimmung der Zellzahl verzichtet. Diese Studien haben demnach gezeigt, dass es möglich ist, CMV-spezifische CTLs mit Hilfe von autologen Peptid-beladenen DCs zu generieren, aber es gibt leider keine Daten zu der Anzahl der erzeugten CMV-positiven T-Zellen.

In einer weiteren Studie konnten erfolgreich CMV-spezifische CTLs mit Hilfe von DCs erzeugt werden. Hier wurde mit $1 \cdot 10^6$ PBMC gestartet und nach drei Wochen fanden sich noch $3,5 \cdot 10^5$ Zellen in der Kultur. Der Anteil an CD8+ CTLs, welche IFN γ produzieren, lag zu Beginn der Stimulation bei 0,1%. Am Ende der Stimulation waren bis zu 85% der CD8+ CTLs dazu in der Lage, CMV-spezifisch IFN γ zu produzieren (Vannucchi et al. 2001).

Diese Ergebnisse sind vergleichbar mit unseren. Die Gesamtzahl der Zellen nahm im Verlauf der Stimulation deutlich ab, der Anteil an CMV-spezifischen Zellen jedoch zu. Auch wenn die Gesamtzahl der CMV-spezifischen CTLs in beiden Fällen deutlich gestiegen ist, so ist diese Anzahl immer noch zu gering, um weiterführende Funktionsanalysen zu machen oder sie Patienten zum Zwecke einer adaptiven Immuntherapie zu infundieren.

Im Anschluss an die Stimulation der T-Zellen sollte deren Funktionalität mit Hilfe des IFN γ -Sekretionsassays und des Zytotoxizitätsassays überprüft werden. Da die Zellzahl nach zweiwöchiger Stimulation zu gering dafür war, entschieden wir uns die Zellen im Anschluss an die Stimulation zu expandieren. Hierfür nutzten wir Anti-Biotin MACSiBead Particles (Miltenyi Biotec). Die Expansion erfolgte über ein bis zwei Wochen und es konnte bei zwei Spendern die Zellzahl deutlich erhöht werden, bei zwei weiteren blieb sie gleich und bei dem letzten Spender sank sie sogar. Die eigentliche Problematik bestand darin, dass am Ende der Expansion nur 0% bis 2,4% (MW 0,76%) der CD3+ Zellen CMV-Tetramer-positiv waren. Es fanden sich demnach nach der Expansion weniger CD3+ CMV-spezifische T-Zellen in unserer Kultur als nach der Stimulation und vor der Expansion. Dies kann dadurch erklärt werden, dass durch MACSiBeads Particles eine unspezifische Stimulation der T-Zellen erfolgt, was den Anreiz zur Proliferation und Differenzierung gibt.

Andere Studien kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Hier wurden CD8⁺ CTLs über drei Wochen mit CMV-Peptid-beladenen DCs stimuliert. Am Ende dieser Stimulation waren 88% der CD8⁺ CTLs CMV-Tetramer-positiv. Im Anschluss wurden die CTLs mit Hilfe von CD3-CD28-Beads expandiert. Es gab eine bis zu siebenfache Vermehrung der gesamten Zellzahl, aber am Ende der Expansion erkannten nur noch 7,3% der CD8⁺ CTLs das CMV-Tetramer-PE (Oelke et al. 2003).

Naive T-Zellen proliferieren nach Antigenkontakt sehr schnell. Unsere CMV-spezifischen CTLs haben dies während der dreiwöchigen Kultur getan. Es hat sich gezeigt, dass bei den aktivierten spezifischen CTLs nach mehreren schnellen Teilungszyklen eine kleine Subpopulation sich langsamer teilenden Zellen entsteht, aus denen dann vermutlich verschiedene Gedächtniszellen hervorgehen. Fehlt das passende Antigen, so sinkt der Anteil an spezifischen CTLs wieder. Ein Teil verliert seine Differenzierung wieder, viele gehen bei fehlendem Antigenstimulus in Apoptose. Zurück bleibt ein kleiner heterogener Pool an CD8⁺ Gedächtniszellen, welcher im Falle eines erneuten Antigenkontakts eine raschere Immunantwort bewirken kann (Hamilton et Jameson 2012, Kinjyo et al. 2015).

Die CTLs, welche zuvor spezifisch durch das CMV-Antigen stimuliert wurden, verlieren durch den fehlenden Stimulus ihre Spezifität und gehen entweder in Apoptose oder entwickeln sich zu naiven T-Zellen zurück. So kommt es in unserem Versuch zwar zu einer deutlichen Zunahme der gesamten Zellzahl, aber leider zu einer Abnahme der CMV-spezifischen CTLs.

Der Versuch, CMV-spezifische T-Zellen mit Hilfe von Streptameren zu isolieren scheiterte, da nach der Stimulation eine zu geringe Zellzahl und nach der Expansion ein zu geringer Anteil CMV-spezifischer T-Zellen vorhanden war.

4.2.2 Stimulation der CTLs unter optimierten Kulturbedingungen

Da durch die Stimulation der T-Zellen mit anschließender Expansion durch Anti-Biotin MACSiBead Particles keine adäquate Anzahl an CMV-spezifischen T-Lymphozyten erzeugt werden konnte, musste das Protokoll umgestellt werden.

Die Generierung der CMV-Peptid-beladenen, ausgereiften DCs wurde beibehalten. Es wurden aber nicht CD14-negative Zellen kultiviert, sondern mittels Magnetischer Zellseparation die CD8⁺ T-Lymphozyten isoliert und in Kultur gegeben. Die CTLs wurden im Verhältnis 2:1 mit den DCs stimuliert. Es wurde nicht reines RPMI als Medium genutzt, sondern das M'-Medium. Das M'-Medium besteht aus RPMI mit L-Glutamin, Natrium-Pyruvat, MEM-Vitamine, MEM-NEAA und β -Mercaptoethanol. Zudem wurde dem M'-Medium nicht Humanalbumin zugesetzt, sondern autologes Plasma, welches vor der Dichtegradientenzentrifugation gewonnen wurde. Die Zugabe von IL-2 erfolgte ab Tag 1.

Es zeigte sich eine deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl sowie ein Anstieg der CMV-spezifischen CD8⁺ CTLs. Durch den starken Anstieg der Gesamtzellzahl nach den Stimulationen, wurde meist nur ein kleiner Teil der T-Zellen weiterkultiviert.

Wir entschieden uns gegen die Kultivierung einer solch großen Anzahl an CTLs, da zum einen bei einer 2:1-Stimulation nicht genug DCs zur Verfügung gestanden hätten und zum anderen die technische Umsetzung für eine Einzelperson kaum durchführbar gewesen wäre. Durch diese Methodik ist es gelungen, genug CTLs für weitere Funktionsanalysen zu gewinnen.

Alternativ zur Beladung der DCs mit dem CMV-Peptid NLVPMVATC, ist es auch möglich, das gesamte pp65 Protein über einen adenoviralen Vektor (Adpp65) in die Zelle einzubringen. Eine Studie hat die Fähigkeit der mit Adpp65 behandelten DCs zur Aktivierung CMV-spezifischer CTLs mit der von Peptid-beladenen DCs verglichen. Hierbei zeigte sich nur ein geringer Vorteil der Peptid-beladenen DCs. Vor der Stimulation waren 0,01-3% der CD8⁺ CTLs CMV-Tetramer-positiv. Nach drei Stimulationen mit Peptid-beladenen DCs waren 58-97% der CD8⁺ CTLs Tetramer-positiv, nach der Stimulation mit den DCs, in welche der Vektor eingeführt wurde, waren es 7-47%. Im Zytotoxizitätsassay konnten beide Zelllinien eine gleichwertige Lyse erzielen. Im Gegensatz zu den Peptid-gereiften DCs konnten die durch den adenoviralen Vektor transfektierten DCs zudem CD4⁺ Zellen CMV-spezifisch aktivieren. Dies wurde durch die Messung von IFN γ nachgewiesen. Die simultane Aktivierung von CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten ermöglicht die Kombination von zytotoxischen Effektorzellen und einem Langzeitgedächtnis, was auf lange Sicht wichtig für die Infektionskontrolle in vivo ist (Carlsson et al. 2003).

Es gibt zudem die Möglichkeit, dass DCs mit Hilfe von Elektroporation CMV pp65 mRNA aufnehmen und somit in der Lage sind, die Antigene auf der Zelloberfläche zu präsentieren. Carlsson et al. (2005) haben CTLs mit diesen DCs stimuliert und nach 12 Tagen waren 42% der CD8⁺ Zellen CMV-Tetramer-positiv. Eine zweite Kultur wurde mit Peptid-beladenen DCs stimuliert. Hier waren nach 12 Tagen 55% der CD8⁺ CTLs CMV-Tetramer-positiv. DCs, welche pp65 mRNA aufgenommen hatten, waren zusätzlich dazu in der Lage, CD4⁺ T-Lymphozyten zu aktivieren. Kombiniert man beide Verfahren, indem man dieselben DCs sowohl mit pp65 mRNA belädt als auch mit CMV-Peptiden pulsiert, so kann man effektiv simultan CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten CMV-spezifisch stimulieren (Carlsson et al. 2005). Es hat sich in vivo aber gezeigt, dass auch CD8⁺ CTLs allein dazu in der Lage sind, zum einen eine CMV-Infektion nach allogener HSCT zu kontrollieren und dass diese zum anderen noch bis zu drei Monate im Spender nachzuweisen waren (Riddell et al. 1992, Walter et al. 1995). Ein kleiner Teil der CD8⁺ CTLs differenziert zu Gedächtniszellen und kann im Falle eines erneuten Antigenkontakts reaktiviert werden und trägt somit auch zur

langfristigen Viruskontrolle bei (Hamilton et Jameson 2012, Kinjyo et al. 2015).

Möchte man alle CTLs in Kultur behalten, um neben den Funktionsanalysen noch genug Zellen für einen adoptiven Transfer zu gewinnen, so sind größere Mengen an Antigen-präsentierenden Zellen von Nöten. Eine Möglichkeit ist, den Blutspender zur erneuten Blutspende, -entnahme oder Apherese zu bitten. Dies ist jedoch mit großen Unsicherheiten verbunden, da Spender erkranken, den Wohnort wechseln oder das Interesse an einer Spende verlieren können.

Eine sicherere Alternative stellen artifizielle Antigen-präsentierende Zellen (aAPC) dar. Diese künstliche Version einer APC entsteht, indem HLA-Ig und CD28-spezifische Antikörper an Microbeads gekoppelt werden. Sie ist ebenso wie die DC dazu in der Lage, mit verschiedenen Peptiden beladen zu werden und diese im Anschluss an CD8+ CTLs zu präsentieren und diese dadurch zu stimulieren und aktivieren. Der Anteil an CD8+ CMV+ CTLs war nach dreiwöchiger Kultur mit aAPC vergleichbar mit dem Anteil an CD8+ CMV+ CTLs nach dreiwöchiger Stimulation durch Peptid-beladene DC (Oelke et al. 2003).

Die aAPC ist dazu in der Lage, CD8+ CMV-spezifische CTLs auch über einen längeren Zeitraum zu expandieren. Eine Arbeitsgruppe hat zunächst mit Hilfe von Peptid-beladenen DCs CD8+ CTLs über drei Wochen stimuliert. Am Ende der Stimulation waren 88% der CD8+ CTLs CMV-Tetramer-positiv. Ein Teil dieser CTLs wurde mit Hilfe von CD3-CD28-Beads expandiert. Zwar kam es hier zu einem starken Anstieg der Gesamtzellzahl, der Anteil an CMV-Tetramer-positiven CD8+ CTLs am Ende der Expansion betrug nur 7,3%. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch in unserer Arbeitsgruppe erzeugt. Der andere Teil der CMV-spezifischen CTLs wurde mit Hilfe von CMV-Peptid-beladenen aAPCs expandiert. Auch hier zeigte sich eine deutliche Zunahme der Gesamtzellzahl, jedoch waren am Ende der Expansion immer noch 86,5% der CD8+ CTLs CMV-Tetramer-positiv (Oelke et al. 2003). Der wesentliche Vorteil der aAPC gegenüber den DCs ist, dass sie ohne großen Aufwand lange und sicher aufbewahrt werden können, ohne dabei an Aktivität zu verlieren. Sie sind im Gegensatz zu den Spender-abhängigen DCs immer verfügbar und brauchen keine sterile und aufwendige Zellkultur (Oelke et al. 2003, Durai et al. 2009).

Zur Stimulation und Expansion CD8+ CMV-spezifischer CTLs sind aAPC eine sinnvolle Alternative. Sie sind allzeit verfügbar, einfach aufzubewahren und haben die Fähigkeit, in gleichem Maße CD8+ CMV-spezifische CTLs zu aktivieren wie Peptid-beladene DCs. Zudem kann man durch sie auf einen menschlichen Spender verzichten, was Aufwand und Geld spart.

4.3 CMV-spezifische IFN γ -Produktion durch aktivierte T-Lymphozyten

Bei zwei Spendern wurde ein IFN γ -Sekretionsassay durchgeführt. Dieser zeigte, dass die von uns generierten und verwendeten DCs in der Lage sind, TC CMV-spezifisch zu aktivieren, sodass sie IFN γ produzieren. Bei beiden Spendern war die IFN γ -Produktion der CTLs, welche mit CMV-Peptid-beladenen DCs restimuliert worden waren, vergleichbar hoch wie bei den CTLs, welche mit dem Antigen SEA stimuliert worden waren.

Es wurden solche T-Lymphozyten selektiert, welche CMV-spezifisch IFN γ produzieren. Diese wurden sowohl prophylaktisch als auch als präemptive Therapie Patienten nach allogener HSCT infundiert. Hierbei zeigte sich eine deutliche Reduktion der Viruslast sowie eine Expansion der CTLs in vivo ohne dass es dabei zu nennenswerten Nebenwirkungen oder dem Auftreten einer GvHD kam. Die infundierten CTLs blieben für einige Monate beim Empfänger nachzuweisen (MacKinnon et al. 2008).

Das zeigt, dass die Produktion von IFN γ ein guter Parameter für das virusspezifische Agieren der CTLs ist.

4.4 Isolation CMV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten

Da der Anteil der CMV-spezifischen CTLs am Ende der Kultivierung stark schwankte, wurde versucht die CMV-positiven Zellen mit Hilfe von Streptameren oder Tetrameren zu isolieren. Damit reduziert man zudem die Anzahl von unspezifischen CTLs, welche eine GvHD induzieren könnten. CMV-spezifische CTLs wiederum greifen nur Zellen an, welche auch Virusbestandteile auf ihrer Zelloberfläche tragen (Cobbold et al. 2005, Szmania et al. 2001, Keenan et al. 2001).

4.4.1 Streptamere

Die Aufreinigung der CTLs mit Hilfe von Streptameren ist relativ zeit- und arbeitsaufwändig. Alle Materialien müssen während der gesamten Zeit eine Temperatur von 4°C haben, damit sich die Bindung zwischen Streptamer und CTL nicht wieder löst. Die Streptamere müssen vorbereitet werden, indem Streptamer Magnetic Beads (IBA BioTAGnology) und Streptamer MHC class I (IBA BioTAGnology) 45min bei 4°C inkubiert werden. Nach der Isolation müssen die Streptamere mittels D-Biotin wieder von den CTLs gelöst werden.

Es kam bei allen Probanden zu einer deutlichen Abnahme der mittleren Gesamtzellzahl in der Positivfraktion. Es konnte bei allen erfolgreichen Isolationsversuchen ein Anstieg des Anteils an CMV-spezifischen CTLs in der Positivfraktion detektiert werden. Die Gesamtzahl der CMV-spezifischen CTLs sank jedoch nach Isolation.

Die Anreicherung CMV-spezifischer CTLs ist uns damit gelungen, jedoch auf Kosten der Zellzahl. Die Anzahl der CTLs in der Positivfraktion war in der Regel so niedrig, dass man damit keine weiteren funktionellen Tests durchführen konnte.

Eine andere Arbeitsgruppe hat CMV-spezifische CTLs direkt aus dem peripheren Blut isoliert. Hierbei begannen sie die Isolation mit $37,39 \pm 15,73 \cdot 10^6$ PBMC, wovon $0,5 \pm 0,29\%$ der Zellen CMV-positiv waren. Die Isolation erfolgte auch mit Hilfe von Streptameren. In der Positivfraktion nach Isolation fand sich eine Gesamtzellzahl von $7,58 \pm 5,82 \cdot 10^4$ mit einem Anteil von CMV-spezifischen Zellen von $88,9 \pm 13,67\%$. Damit fanden sich nur $56,19 \pm 33,95\%$ aller CMV-spezifischen CTLs auch wirklich in der Positivfraktion (Beloki et al. 2015). Aufgrund dieser Ergebnisse und der aufwendigen Nutzung der Streptamere, entschieden wir uns, von dieser Methode der Separation CMV-spezifischer Zellen Abstand zu nehmen und die Zellen stattdessen mit Hilfe von Tetrameren zu isolieren.

4.4.2 Tetramere

Da die Isolation der CTLs mit Hilfe von magnetischen Streptameren nicht zufriedenstellend war, wurde versucht, die Separation mittels Tetrameren durchzuführen. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit dem Tetramer-PE-Farbstoff inkubiert. Im Anschluss wurde ein MACS-Antikörper gegen den PE-Farbstoff hinzugegeben, sodass das nur solche CTLs in dem Magnetfeld gefangen werden, die das CMV-Antigen erkennen.

Wir haben die Isolation CMV-spezifischer CTLs bei zwei Spendern erfolgreich durchführen können. Der Zeitaufwand bei der Isolation mit Hilfe von Tetrameren ist moderat und alle Versuchsschritte können bei Raumtemperatur durchgeführt werden.

Unsere Ergebnisse sind vergleichbar mit denen von anderen Studien. Hier wurden die CMV+ CTLs jedoch direkt mit Hilfe von HLA-Tetrameren und AntiPE-Microbeads aus dem peripheren Blut isoliert.

Die Arbeitsgruppe von Keenan startete mit 0,03% bis 1,5% (MW 0,8%) und fand nach einer Isolation 0,1% bis 64% (MW 31,9%) CMV-positive CD+ CTLs. Hier wurde der Isolationsprozess mit der Positivfraktion wiederholt. In der zweiten Positivfraktion waren dann 13% bis 99,8% (MW 77,6%) der CD8+ CTLs CMV-positiv (Keenan et al. 2001). Wir konnten nach nur einer Isolation ähnliche Ergebnisse erzielen (82,9% bis 96,4%). Der wesentliche Unterschied ist, dass wir den Tetramer-PE-Farbstoff an die Zellzahl adaptiert haben. Je $1 \cdot 10^6$ Zellen wurde 5 μ l Tetramer-PE hinzu gegeben. Im Anschluss wurden je $1 \cdot 10^7$ Zellen mit 10 μ l AntiPE-MB inkubiert. Keenan nutzte insgesamt nur 2,5 μ l Tetramer-PE für 250ml Blut.

Cobbold et al. starteten mit 0,41% bis 12,3% CMV+ CD8+ CTLs und nach der Isolation waren 97,8% bis 99,9% der CD8+ Zellen CMV-positiv. Diese wurden dann direkt in Patienten infundiert (Cobbold et al. 2005). Auch hier sind unsere Ergebnisse vergleichbar, der Anteil an CMV-spezifischen CD8+ CTLs in der Positivfraktion nach Isolation ist bei uns etwas geringer. Unser Versuch unterscheidet sich darin, dass wir die Zellen nicht direkt aus dem peripheren Blut isoliert haben, sondern aus einer dreiwöchigen Zellkultur. Hier kommt es unter Umständen zur Ansammlung von einigen toten Zellen, welche dann unspezifisch an

das Tetramer-PE binden und somit in die Positivfraktion gelangen. Der Anteil an toten Zellen im peripheren Blut ist gering, was für diese Art der Zellsortierung von Vorteil ist.

Für künftige Isolationsversuche könnte man vor der Isolation mit Tetramer-PE und Anti-PE-MB die toten Zellen aus der Zellkultur entfernen, beispielsweise mit dem *Dead Cell Removal Kit* (Miltenyi Biotec). Im Anschluss daran sollen die verbleibenden Zellen gezählt und das Tetramer-PE dann adaptiert an die Zellzahl hinzugeben werden. Sollte nach der ersten Isolation der Anteil an CMV-spezifischen CD8+ CTLs in der Positivfraktion nicht hoch genug sein, so könnte man einen zweiten Isolationszyklus anschließen.

4.5 CMV-spezifische Zytotoxizität im Zytotoxizitätsassay

Um zu überprüfen, ob die CTLs in der Lage sind, Zielzellen zu zerstören, welche das CMV-Antigen tragen, wurde der Chromfreisetzungssassay durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten hierbei Targetzellen, welche mit keinem Antigen beladen wurden.

Bei beiden Spendern zeigte sich eine CMV-spezifische Zytotoxizität. Die mit CMV-Peptid-beladenen Targetzellen wurden in Abhängigkeit vom Stimulationsverhältnis. Bei beiden Spendern wurden keine unbeladenen T2-Zellen lysiert. Das zeigt zum einen, dass die CTLs die Fähigkeit zur Lyse CMV-positiver Zellen haben, und zum anderen, dass sie spezifisch agieren, da sie unbeladene Zellen verschonen.

4.6 Klinische Relevanz des adoptiven Transfers CMV-spezifischer CTLs

Durch den Transfer CMV-spezifischer CTLs kommt es bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation zu einer schnellen Rekonstitution der pathogen-spezifischen Abwehr (Reusser et al. 1991). Um diese CTLs dem Patienten transferieren zu können, sind meist aufwändige Arbeitsschritte ex vivo notwendig, was eine großflächige klinische Anwendung einschränkt. Trotzdem haben verschiedene Studien gezeigt, dass durch den adoptiven Transfer CMV-spezifischer CTLs eine Wiederherstellung der CMV-spezifischen Immunität ohne nennenswerte Toxizität oder ein erhöhtes Risiko für eine GvHD möglich ist (Reusser et al. 1991, Riddell et al. 1992, Walter et al. 1995). Die Generierung CMV-spezifischer Spenderleukozyten ist nur möglich, wenn der Spender CMV-seropositiv ist. Im Falle eines seronegativen Spenders könnte eventuell auf die CTLs eines CMV-seropositiven Drittspenders zurückgegriffen werden (Boeckh et al. 2014).

Limitierend für den klinischen Einsatz sind der große Zeit- und Arbeitsaufwand sowie die Problematik, dass nicht bei allen Spendern, obwohl sie alle CMV-seropositiv sind, CMV-spezifische CTLs erzeugt werden konnten. Man könnte versuchen, nicht nur mit dem

Nonapeptid *NLVPMVATV*, sondern zusätzlich auch mit anderen CMV-Peptiden oder einem Peptid-Mix zu arbeiten, um die Chance zu erhöhen, dass sich CMV-spezifische CTLs generieren lassen.

Wenn große Mengen an CTLs aktiviert werden sollen, reicht die Anzahl der DCs, welche durch eine einmalige Leukapherese gewonnen werden können, oft nicht aus. Eine Möglichkeit wäre, den Spender zur erneuten Aphaese oder Blutspende zu bitten. Dies ist eine unsichere Methode, da Spender erkranken, den Wohnort wechseln oder das Interesse an einer Spende verlieren können. Als Alternative bieten sich hierfür aAPC an, welche mit geringem Aufwand lange aufbewahrt werden können, ohne dass sie an Aktivität verlieren. Diese sind somit immer in ausreichender Anzahl verfügbar (Oelke et Schneck 2004).

5. Zusammenfassung

Die CMV-Infektion ist eine gefährliche Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation. Dabei ist die interstitielle Pneumonie die gefährlichste Komplikation mit einer Letalität von bis zu 84%.

Die aktuelle antivirale Standardtherapie verringert zwar das Auftreten einer CMV-Infektion und -Erkrankung, verlängert aufgrund der Nebenwirkungen das Gesamtüberleben nicht. Zudem limitieren auch vermehrt virale Resistenzen den Einsatz der Virustatika.

Ein neuer Therapieansatz ist der adoptive Transfer CMV-spezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten des Stammzellspenders. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass diese CTLs dazu in der Lage sind, eine CMV-Infektion effektiv zu bekämpfen, ohne dass es zu nennenswerten Nebenwirkungen oder einer Erhöhung des Risikos für eine GvHD kommt.

Ist der Stammzellspender CMV-seropositiv, so gelingt die Generierung von CMV-spezifischen CTLs mit gutem Erfolg. Ist der Spender hingegen CMV-seronegativ, gelingt dies nur mäßig.

Eine mögliche Alternative für Patienten mit seronegativen Spender wäre eine Drittspender-Zellbank. Es sollen CMV-spezifische CTLs von gesunden, CMV-seropositiven Menschen gewonnen werden, in vitro stimuliert, sortiert und im Anschluss kryokonserviert werden. So hätte man im Falle einer CMV-Erkrankung zügig Zugriff auf CMV-spezifische CTLs.

Für unsere Experimente haben wir Buffy Coats von gesunden, CMV-seropositiven Blutspendern genutzt. Die Vollblutspende wird von Leukozyten depletiert, welche uns dann als Buffy Coats zur Verfügung standen.

Es ist uns gelungen, aus den Buffy Coats gesunder, CMV-seropositiver Blutspender dendritische Zellen und T-Lymphozyten zu gewinnen. Die dendritischen Zellen wurden anschließend mit dem CMV-Peptid NLVPMVATV beladen und ausgereift. Mit Hilfe der Peptid-beladenen, ausgereiften DCs wurden CD8+ T-Lymphozyten stimuliert.

Durchflusszytometrisch konnte gezeigt werden, dass die Spender vor Beginn der Stimulation einen geringen Anteil an CMV-spezifischen CD8+ CTLs hatten. Die Stimulation wurde mit $1 \cdot 10^6$ bis $2 \cdot 10^6$ (MW $1,71 \cdot 10^6$) CD8+ CTLs begonnen. Nach drei Stimulationen mit CMV-Peptid-beladenen, ausgereiften DCs konnten wir $1,7 \cdot 10^7$ bis $12 \cdot 10^7$ (MW $5,84 \cdot 10^7$) Zellen detektieren, wovon 0,2% bis 96,5% (MW 26,14%) CMV-Tetramer-positiv waren.

Zudem waren die CD8+ CTLs dazu in der Lage, IFN γ zu produzieren und bewiesen ihre CMV-spezifische Zytotoxizität, indem sie im Chromfreisetzungssassay bis zu 54,7% der CMV-positiven Targetzellen lysierten, aber die Unbeladenen verschonten.

Mit Hilfe von CMV-spezifischen HLA-Tetrameren gelang die Aufreinigung von CMV-spezifischen CTLs. Hierbei fanden sich vor Isolation $1 \cdot 10^7$ bis $2,6 \cdot 10^7$ (MW $1,8 \cdot 10^7$) Zellen, wovon 0,2% bis 6,2% (MW 3,2%) CMV-positiv waren. Nach der Isolation mit Tetramer-PE und Anti-PE-MB fanden wir in der Positivfraktion $1,8 \cdot 10^6$ bis $7 \cdot 10^6$ (MW $4,4 \cdot 10^6$) Zellen, wovon 82,9% bis 96,4% (MW 89,65%) CMV-positiv waren.

Diese Daten zeigen zum einen, dass es möglich ist, CMV-spezifische CTLs aus dem peripheren Blut gesunder, CMV-positiver Spender zu aktivieren und zum anderen, dass auch aus einer geringen Anzahl an CMV-positiven CTLs eine große Population an CMV-spezifischen CD8+ CTLs erzeugt werden kann.

In zukünftigen Studien sollte der Zytotoxizitätsassay mit CMV-Tetramer-sortierten Zellen durchgeführt werden. Es wäre interessant zu sehen, ob der Anteil an lysierten Zellen aufgrund der Aufreinigung höher ist als bei unsortierten CTLs oder ob die Lyserate aufgrund der Interaktion der Tetramere mit den CTLs geringer ausfällt.

6. Literaturverzeichnis

Alice T, Busca A, Locatelli F, Falda M, Pittaluga F, Ghisetti V.

Valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection post-allogeneic stem cell transplantation: implications for the emergence of drug-resistant cytomegalovirus. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Mar;63(3):600-8. doi: 10.1093/jac/dkn521. Epub 2009 Jan 15.

Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science.* 1996 Oct 4;274(5284):94-6. Erratum in: *Science* 1998 Jun 19;280(5371):1821.

Andersson U, Andersson J, Lindfors A, Wagner K, Möller G, Heusser CH. Simultaneous production of interleukin 2, interleukin 4 and interferon-gamma by activated human blood lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1990 Jul;20(7):1591-6.

Andersson U, Halldén G, Persson U, Hed J, Möller G, DeLey M. Enumeration of IFN-gamma-producing cells by flow cytometry. Comparison with fluorescence microscopy. *J Immunol Methods.* 1988 Aug 9;112(1):139-42.

Ayala E, Greene J, Sandin R, Perkins J, Field T, Tate C, Fields KK, Goldstein S. Valganciclovir is safe and effective as pre-emptive therapy for CMV infection in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006 May;37(9):851-6.

Bakker AH, Schumacher TN. MHC multimer technology: current status and future prospects. *Curr Opin Immunol.* 2005 Aug;17(4):428-33. Review.

Beloki L, Ciaurriz M, Mansilla C, Zabalza A, Perez-Valderrama E, Samuel ER, Lowdell MW, Ramirez N, Olavarria E. Assessment of the effector function of CMV-specific CTLs isolated using MHC-multimers from granulocyte-colony stimulating factor mobilized peripheral blood. *J Transl Med.* 2015 May 20;13:165. doi: 10.1186/s12967-015-0515-z.

Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, Cunningham T, Schoch G, Bowden RA. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):4063-71.

Boeckh M, Ljungman P. How we treat cytomegalovirus in hematopoietic cell transplant recipients. *Blood*. 2009 Jun 4;113(23):5711-9. doi: 10.1182/blood-2008-10-143560. Epub 2009 Mar 18. Review.

Boeckh M, Murphy WJ, Peggs KS. Recent advances in cytomegalovirus: an update on pharmacologic and cellular therapies. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2015 Jan;21(1):24-9. doi: 10.1016/j.bbmt.2014.11.002. Epub 2014 Nov 11. Review.

Boeckh M. Complications, diagnosis, management, and prevention of CMV infections: current and future. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2011;2011:305-9. doi: 10.1182/asheducation-2011.1.305. Review.

Bolovan-Fritts CA, Mocarski ES, Wiedeman JA. Peripheral blood CD14(+) cells from healthy subjects carry a circular conformation of latent cytomegalovirus genome. *Blood*. 1999 Jan 1;93(1):394-8.

Boniface JJ, Rabinowitz JD, Wülfing C, Hampl J, Reich Z, Altman JD, Kantor RM, Beeson C, McConnell HM, Davis MM. Initiation of signal transduction through the T cell receptor requires the multivalent engagement of peptide/MHC ligands [corrected]. *Immunity*. 1998 Oct;9(4):459-66. Erratum in: *Immunity* 1998 Dec;9(6):891.

Bowden RA, Fisher LD, Rogers K, Cays M, Meyers JD. Cytomegalovirus (CMV)-specific intravenous immunoglobulin for the prevention of primary CMV infection and disease after marrow transplant. *J Infect Dis*. 1991 Sep;164(3):483-7.

Bowden RA, Sayers M, Flournoy N, Newton B, Banaji M, Thomas ED, Meyers JD. Cytomegalovirus immune globulin and seronegative blood products to prevent primary cytomegalovirus infection after marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1986 Apr 17;314(16):1006-10.

Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M, Weisdorf D, Cays M, Schoch G, Banaji M, Haake R, Welk K, Fisher L, McCullough J, Miller W. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood*. 1995 Nov 1;86(9):3598-603.

Busca A, de Fabritiis P, Ghisetti V, Alice T, Mirabile M, Gentile G, Locatelli F, Falda M. Oral valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection post allogeneic stem cell transplantation. *Transpl Infect Dis*. 2007 Jun;9(2):102-7.

Busch DH, Pilip IM, Vijn S, Pamer EG. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity*. 1998 Mar;8(3):353-62.

Carlsson B, Cheng WS, Tötterman TH, Essand M. Ex vivo stimulation of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells using CMV pp65-modified dendritic cells as stimulators. *Br J Haematol*. 2003 May;121(3):428-38.

Carlsson B, Hou M, Giandomenico V, Nilsson B, Totterman TH, Essand M. Simultaneous generation of cytomegalovirus-specific CD8+ and CD4+ T lymphocytes by use of dendritic cells comodified with pp65 mRNA and pp65 protein. *J Infect Dis*. 2005 Dec 1;192(11):1912-20.

Cerdan C, Martin Y, Courcoul M, Mawas C, Birg F, Olive D. CD28 costimulation up-regulates long-term IL-2R beta expression in human T cells through combined transcriptional and post-transcriptional regulation. *J Immunol*. 1995 Feb 1;154(3):1007-13.

Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, Tauro S, McDonald D, Osman H, Assenmacher M, Billingham L, Steward C, Crawley C, Olavarria E, Goldman J, Chakraverty R, Mahendra P, Craddock C, Moss PA. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med*. 2005 Aug 1;202(3):379-86.

Cochran JR, Cameron TO, Stern LJ. The relationship of MHC-peptide binding and T cell activation probed using chemically defined MHC class II oligomers. *Immunity*. 2000 Mar;12(3):241-50.

Corr M, Slanetz AE, Boyd LF, Jelonek MT, Khilko S, al-Ramadi BK, Kim YS, Maher SE, Bothwell AL, Margulies DH. T cell receptor-MHC class I peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity. *Science*. 1994 Aug 12;265(5174):946-9.

Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside. *Clin Microbiol Rev*. 2009 Jan;22(1):76-98, Table of Contents. doi: 10.1128/CMR.00034-08. Review.

Daniels MA, Jameson SC. Critical role for CD8 in T cell receptor binding and activation by peptide/major histocompatibility complex multimers. *J Exp Med*. 2000 Jan 17;191(2):335-46.

Davis MM, Boniface JJ, Reich Z, Lyons D, Hampl J, Arden B, Chien Y. Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:523-44. Review.

Davison AJ, Dolan A, Akter P, Addison C, Dargan DJ, Alcendor DJ, McGeoch DJ, Hayward GS. The human cytomegalovirus genome revisited: comparison with the chimpanzee cytomegalovirus genome. *J Gen Virol*. 2003 Jan;84(Pt 1):17-28. Erratum in: *J Gen Virol*. 2003 Apr;84(Pt 4):1053.

Durai M, Krueger C, Ye Z, Cheng L, Mackensen A, Oelke M, Schneck JP. In vivo functional efficacy of tumor-specific T cells expanded using HLA-Ig based artificial antigen presenting cells (aAPC). *Cancer Immunol Immunother*. 2009 Feb;58(2):209-20. doi: 10.1007/s00262-008-0542-1. Epub 2008 Jun 18.

Einsele H, Reusser P, Bornhäuser M, Kalhs P, Ehninger G, Hebart H, Chalandon Y, Kröger N, Hertenstein B, Rohde F. Oral valganciclovir leads to higher exposure to ganciclovir than intravenous ganciclovir in patients following allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2006 Apr 1;107(7):3002-8. Epub 2005 Dec 13.

Emanuel D, Cunningham I, Jules-Elysee K, Brochstein JA, Kernan NA, Laver J, Stover D, White DA, Fels A, Polsky B, et al. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. *Ann Intern Med.* 1988 Nov 15;109(10):777-82.

Goodrich JM, Bowden RA, Fisher L, Keller C, Schoch G, Meyers JD. Ganciclovir prophylaxis to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic marrow transplant. *Ann Intern Med.* 1993 Feb 1;118(3):173-8.

Greaves M, Janossy G, Doenhoff M. Selective triggering of human T and B lymphocytes in vitro by polyclonal mitogens. *J Exp Med.* 1974 Jul 1;140(1):1-18. Review.

Hamilton SE, Jameson SC. CD8 T cell memory: it takes all kinds. *Front Immunol.* 2012 Nov 27;3:353. doi: 10.3389/fimmu.2012.00353.

Heijnen IA, Barnett D, Arroz MJ, Barry SM, Bonneville M, Brando B, D'hautcourt JL, Kern F, Tötterman TH, Marijt EW, Bossy D, Preijers FW, Rothe G, Gratama JW; European Working Group on Clinical Cell Analysis.. Enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by single-platform, HLA tetramer-based flow cytometry: a European multicenter evaluation. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004 Nov;62(1):1-13.

Jang EY, Park SY, Lee EJ, Song EH, Chong YP, Lee SO, Choi SH, Woo JH, Kim YS, Kim SH. Diagnostic performance of the cytomegalovirus (CMV) antigenemia assay in patients with CMV gastrointestinal disease. *Clin Infect Dis.* 2009 Jun 15;48(12):e121-4. doi: 10.1086/599116. Erratum in: *Clin Infect Dis.* 2010 Jul 15;51(2):258.

Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997 Dec;27(12):3135-42.

Keenan RD, Ainsworth J, Khan N, Bruton R, Cobbold M, Assenmacher M, Milligan DW, Moss PA. Purification of cytomegalovirus-specific CD8 T cells from peripheral blood using HLA-peptide tetramers. *Br J Haematol.* 2001 Nov;115(2):428-34.

Khan N, Hislop A, Gudgeon N, Cobbold M, Khanna R, Nayak L, Rickinson AB, Moss PA. Herpesvirus-specific CD8 T cell immunity in old age: cytomegalovirus impairs the response to a coresident EBV infection. *J Immunol.* 2004 Dec 15;173(12):7481-9.

Kinjyo I, Qin J, Tan SY, Wellard CJ, Mrass P, Ritchie W, Doi A, Cavanagh LL, Tomura M, Sakaue-Sawano A, Kanagawa O, Miyawaki A, Hodgkin PD, Weninger W. Real-time tracking of cell cycle progression during CD8+ effector and memory T-cell differentiation. *Nat Commun.* 2015 Feb 24;6:6301. doi: 10.1038/ncomms7301.

Kleihauer A, Grigoleit U, Hebart H, Moris A, Brossart P, Muhm A, Stevanovic S, Rammensee HG, Sinzger C, Riegler S, Jahn G, Kanz L, Einsele H. Ex vivo generation of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells by peptide-pulsed dendritic cells. *Br J Haematol.* 2001 Apr;113(1):231-9.

Knabel M, Franz TJ, Schiemann M, Wulf A, Villmow B, Schmidt B, Bernhard H, Wagner H, Busch DH. Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med.* 2002 Jun;8(6):631-7.

Kondo K, Kaneshima H, Mocarski ES. Human cytomegalovirus latent infection of granulocyte-macrophage progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Dec 6;91(25):11879-83.

Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood.* 1994 Apr 1;83(7):1971-9.

Ljungman P, de La Camara R, Milpied N, Volin L, Russell CA, Crisp A, Webster A; Valacyclovir International Bone Marrow Transplant Study Group. Randomized study of valacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):3050-6.

Ljungman P, Deliliers GL, Platzbecker U, Matthes-Martin S, Bacigalupo A, Einsele H, Ullmann J, Musso M, Trenschele R, Ribaud P, Bornhäuser M, Cesaro S, Crooks B, Dekker A, Gratecos N, Klingebiel T, Tagliaferri E, Ullmann AJ, Wacker P, Cordonnier C. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood*. 2001 Jan 15;97(2):388-92.

Ljungman P, Hakki M, Boeckh M. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2011 Feb;25(1):151-69.

Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J, Avetisyan G, Sparrelid E, Aschan J, Barkholt L, Larsson K, Winiarski J, Yun Z, Ringdén O. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*. 2006 Jan;91(1):78-83.

Mackinnon S, Thomson K, Verfuërth S, Peggs K, Lowdell M. Adoptive cellular therapy for cytomegalovirus infection following allogeneic stem cell transplantation using virus-specific T cells. *Blood Cells Mol Dis*. 2008 Jan-Feb;40(1):63-7.

Meyers JD, Reed EC, Shepp DH, Thornquist M, Dandliker PS, Vicary CA, Flournoy N, Kirk LE, Kersey JH, Thomas ED, et al. Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1988 Jan 14;318(2):70-5.

Meyers JD. Infection in bone marrow transplant recipients. *Am J Med*. 1986 Jul 28;81(1A):27-38. Review.

Miller W, Flynn P, McCullough J, Balfour HH Jr, Goldman A, Haake R, McGlave P, Ramsay N, Kersey J. Cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation: an association with acute graft-v-host disease. *Blood*. 1986 Apr;67(4):1162-7.

Mori T, Okamoto S, Matsuoka S, Yajima T, Wakui M, Watanabe R, Ishida A, Iwao Y, Mukai M, Hibi T, Ikeda Y. Risk-adapted pre-emptive therapy for cytomegalovirus disease in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2000 Apr;25(7):765-9.

Neudorfer J, Schmidt B, Huster KM, Anderl F, Schiemann M, Holzapfel G, Schmidt T, Germeroth L, Wagner H, Peschel C, Busch DH, Bernhard H. Reversible HLA multimers (Streptamers) for the isolation of human cytotoxic T lymphocytes functionally active against tumor- and virus-derived antigens. *J Immunol Methods*. 2007 Mar 30;320(1-2):119-31.

Nichols WG, Corey L, Gooley T, Davis C, Boeckh M. High risk of death due to bacterial and fungal infection among cytomegalovirus (CMV)-seronegative recipients of stem cell transplants from seropositive donors: evidence for indirect effects of primary CMV infection. *J Infect Dis*. 2002 Feb 1;185(3):273-82. Epub 2002 Jan 17.

Nichols WG, Price TH, Gooley T, Corey L, Boeckh M. Transfusion-transmitted cytomegalovirus infection after receipt of leukoreduced blood products. *Blood*. 2003 May 15;101(10):4195-200. Epub 2003 Jan 16.

Noble PB, Cutts JH. Separation of blood leukocytes by Ficoll gradient. *Can Vet J*. 1967 May;8(5):110-1.

Oelke M, Maus MV, Didiano D, June CH, Mackensen A, Schneck JP. Ex vivo induction and expansion of antigen-specific cytotoxic T cells by HLA-Ig-coated artificial antigen-presenting cells. *Nat Med*. 2003 May;9(5):619-24.

Oelke M, Schneck JP. HLA-Ig-based artificial antigen-presenting cells: setting the terms of engagement. *Clin Immunol*. 2004 Mar;110(3):243-51. Review.

O'Herrin SM, Slansky JE, Tang Q, Markiewicz MA, Gajewski TF, Pardoll DM, Schneck JP, Bluestone JA. Antigen-specific blockade of T cells in vivo using dimeric MHC peptide. *J Immunol*. 2001 Sep 1;167(5):2555-60.

Peggs K, Verfuether S, Mackinnon S. Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood*. 2001 Feb 15;97(4):994-1000.

Pescovitz MD, Rabkin J, Merion RM, Paya CV, Pirsch J, Freeman RB, O'Grady J, Robinson C, To Z, Wren K, Banken L, Buhles W, Brown F. Valganciclovir results in improved oral absorption of ganciclovir in liver transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Oct;44(10):2811-5.

Prentice HG, Gluckman E, Powles RL, Ljungman P, Milpied N, Fernandez Rañada JM, Mandelli F, Kho P, Kennedy L, Bell AR. Impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic bone marrow transplantation. European Acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group. *Lancet*. 1994 Mar 26;343(8900):749-53.

Ramírez N, Olavarría E. Viral-specific adoptive immunotherapy after allo-SCT: the role of multimer-based selection strategies. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Oct;48(10):1265-70. doi: 10.1038/bmt.2012.262. Review.

Ramírez N, Olavarría E. Viral-specific adoptive immunotherapy after allo-SCT: the role of multimer-based selection strategies. *Bone Marrow Transplant*. 2013 Oct;48(10):1265-70. doi: 10.1038/bmt.2012.262. Review.

Reddehase MJ, Weiland F, Münch K, Jonjic S, Lüske A, Koszinowski UH. Interstitial murine cytomegalovirus pneumonia after irradiation: characterization of cells that limit viral replication during established infection of the lungs. *J Virol*. 1985 Aug;55(2):264-73.

Reed EC, Bowden RA, Dandliker PS, Lilleby KE, Meyers JD. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants. *Ann Intern Med*. 1988 Nov 15;109(10):783-8.

Reusser P, Einsele H, Lee J, Volin L, Rovira M, Engelhard D, Finke J, Cordonnier C, Link H, Ljungman P; Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. Randomized multicenter trial of foscarnet versus ganciclovir for preemptive therapy of cytomegalovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1159-64.

Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, Greenberg PD. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood*. 1991 Sep 1;78(5):1373-80.

Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992 Jul 10;257(5067):238-41.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kämpgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med*. 1994 Jul 1;180(1):83-93.

Ruiz-Camps I, Len O, de la Cámara R, Gurguí M, Martino R, Jarque I, Barrenetxea C, Díaz de Heredia C, Batlle M, Rovira M, de la Torre J, Torres A, Aguilar M, Espigado I, Martín-Dávila P, Bou G, Borrell N, Aguado JM, Pahissa A; Spanish Network for Research on Infection in Transplantation (RESITRA/REIPI). Spain. Valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients. *Antivir Ther*. 2011;16(7):951-7. doi: 10.3851/IMP1858

Salter RD, Howell DN, Cresswell P. Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids. *Immunogenetics*. 1985;21(3):235-46.

Salzberger B, Bowden RA, Hackman RC, Davis C, Boeckh M. Neutropenia in allogeneic marrow transplant recipients receiving ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease: risk factors and outcome. *Blood*. 1997 Sep 15;90(6):2502-8.

Slobedman B, Mocarski ES. Quantitative analysis of latent human cytomegalovirus. *J Virol.* 1999 Jun;73(6):4806-12.

Smith KA, Cantrell DA. Interleukin 2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985 Feb;82(3):864-8.

Staras SA, Dollard SC, Radford KW, Flanders WD, Pass RF, Cannon MJ. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994. *Clin Infect Dis.* 2006 Nov 1;43(9):1143-51. Epub 2006 Oct 2. PubMed PMID: 17029132.

Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB, Taormina C, Pelte C, Ruchti F, Sleath PR, Grabstein KH, Hosken NA, Kern F, Nelson JA, Picker LJ. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005 Sep 5;202(5):673-85.

Szmania S, Galloway A, Bruorton M, Musk P, Aubert G, Arthur A, Pyle H, Hensel N, Ta N, Lamb L Jr, Dodi T, Madrigal A, Barrett J, Henslee-Downey J, van Rhee F. Isolation and expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes to clinical scale from a single blood draw using dendritic cells and HLA-tetramers. *Blood.* 2001 Aug 1;98(3):505-12.

Taylor-Wiedeman J, Sissons JG, Borysiewicz LK, Sinclair JH. Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells. *J Gen Virol.* 1991 Sep;72 (Pt 9):2059-64.

Uhlin M, Gertow J, Uzunel M, Okas M, Berglund S, Watz E, Brune M, Ljungman P, Maeurer M, Mattsson J. Rapid salvage treatment with virus-specific T cells for therapy-resistant disease. *Clin Infect Dis.* 2012 Oct;55(8):1064-73.

Vannucchi AM, Glinz S, Bosi A, Caporale R, Rossi-Ferrini P. Selective ex vivo expansion of cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes using dendritic cells pulsed with a human leucocyte antigen A*0201-restricted peptide. *Br J Haematol.* 2001 May;113(2):479-82.

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, Riddell SR. 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*. 1995 Oct 19;333(16):1038-44.

Whelan JA, Dunbar PR, Price DA, Purbhoo MA, Lechner F, Ogg GS, Griffiths G, Phillips RE, Cerundolo V, Sewell AK. Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J Immunol*. 1999 Oct 15;163(8):4342-8.

Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, Du Mond C, Ebeling DF, Buhles WC, Champlin RE. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Intern Med*. 1993 Feb 1;118(3):179-84.

Xu XN, Purbhoo MA, Chen N, Mongkolsapaya J, Cox JH, Meier UC, Tafuro S, Dunbar PR, Sewell AK, Hourigan CS, Appay V, Cerundolo V, Burrows SR, McMichael AJ, Screaton GR. A novel approach to antigen-specific deletion of CTL with minimal cellular activation using alpha3 domain mutants of MHC class I/peptide complex. *Immunity*. 2001 May;14(5):591-602.

7. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm	
µl	Mikroliter	
aAPC	artificial Antigen presenting cell	Künstliche Antigen-präsentierende Zelle
Abb.	Abbildung	
Adpp65	Adenoviraler Vektor, enthält pp65	
AK	Antikörper	
APC	Antigen presenting cell	Antigen-präsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin	Roter Fluoreszenzfarbstoff
APC-H7	Allophycocyanin-Tandem-Konjugat	
BAL	Bronchoalveoläre Lavage	
CD	Cluster of differentiation	Lymphozyten-Differenzierungsantigen
CMV	Cytomegalovirus	Zytomegalievirus
CO ₂	carbon dioxid	Kohlenstoffdioxid
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyte	Zytotoxischer T-Lymphozyt
Cy5.5	Cyanin 5	
DC	Dendritic cell	Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid	
FACS	Fluorescence activated cell sorting	Durchflusszytometer
FCS	Fetal calf serum	Fetales Kälberserum
FITC	fluorescein isothiocyanate	grüner Fluoreszenzfarbstoff
FSC	forward scatter	
GM-CSF	granulocyte-macrophage-colony stimulating factor	Granulozyten- und Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease	Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion
H	hour	Stunde
HLA	Human Leucocyte Antigen	Histokompatibilitätsantigen
HSA	Human serum albumin	Humanes Serumalbumin

HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation	Hämatopoietische Stammzelltransplantation
IE	Internationale Einheit	
IFN γ	Interferon-gamma	
IL	Interleukin	
IVIG	Intravenous immune globulin	Intravenöses Immunglobulin
MACS	Magnetic activated cell sorting	Magnetische Zellseparation
MB	Microbeads	
MHC	Major Histocompatibility Complex	Haupthistokompatibilitätskomplex
Min	Minute	
ml	Milliliter	
ng	Nanogramm	
PBMC	Peripher blood mononuclear cells	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphat buffered saline	Phosphat gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin	roter Fluoreszenzfarbstoff
PerCP	Peridinin-chlorophyll	
PerCP-Cy5.5	Tandem-Konjugat aus Peridinin-chlorophyll und Cyanin 5	
PG	Prostaglandin	
RPM	Rounds per minute	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur	
SEA	staphylococcal enterotoxin A	Staphylococcus aureus Enterotoxin A
SSC	side scatter	
T2-Zelle	Hybrid einer T- und einer B-lymphoblastoiden Zelllinie	
Tab.	Tabelle	
TAP	transporter associated with antigen processing	Antigen-Peptid-Transporter
TCR	T cell receptor	T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor	
U	Unit	

8. Anhang

8.1 23rd Annual Meeting of the Society for Virology

8.1.1 Abstract

442

Posters

Antiviral Therapy and Resistance 1

435

Successful isolation and expansion of CMV-Reactive T cells from healthy donors that retain A strong Cytotoxic Effector function

N. Ebsen¹, A. Bodenbinder¹, M. Oelke², M. Staudinger¹, M. Ritgen¹, M. Gramatzki¹, M. Kneba¹, B. Gahn¹

¹UKSH Kiel, 2. Medizinische Klinik, Kiel, Germany

²Johns Hopkins University, Pathology, Baltimore, United States

Reactivation of latent cytomegalovirus (CMV) in the transient state of immunodeficiency after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) is a severe viral complication endangering leukemia therapy success. Cytomegalovirus (CMV) infections post-HSCT can be effectively controlled through the adoptive transfer of donor-derived CMV-specific T cells.

We have isolated CD8⁺ T cells from peripheral blood mononuclear cells in CMV seropositive, HLA-A*0201 healthy donors and stimulated weekly with DC loaded with the CMV pp65 peptide NLVPMVATV and interleukin-2.

CMV-specific CD8⁺ T-cell responses were detected in all 4 seropositive healthy donors. Using major histocompatibility complex-peptide tetramers, there was a low frequency of CMV-specific T-cells in the donors detected before stimulation of CD8⁺ T-cells. Starting with $1 \cdot 10^6$ CD8⁺ cells the T-cell lines generated after 3 stimulations with peptide loaded DC contained $1,7 \cdot 10^7$ to $1,2 \cdot 10^8$ (average $7,9 \cdot 10^7$) CD8⁺ T cells, consisting of 1.2%-96% (average 32%) NLVPMVATV-specific CD8⁺ T cells. Furthermore, functional analysis of the expanded CMV-specific T-cells revealed that these cells were able to produce interferon (IFN) γ and proved their specific cytotoxicity by lysing up to 54,7% of CMV-peptide loaded target cells while sparing the unloaded target cells. These CMV-specific T cells were isolated and enriched using magnetic tetramer isolation. Starting with 6,2% CMV-specific CD8⁺ T cells the eluted positive fraction contained 83% CD8⁺ CMV-specific T cells. The TCR clonotype analysis showed a monoclonal pattern of TCR gene rearrangements in the separated T cell fraction.

These data provide the evidence that CMV-specific T cells can be effectively manufactured from low T cell numbers. However polyepitope peptides may be necessary to activate high numbers of CMV-specific T cells in all HLA-A2(+) donors.

Corresponding author:

Nina Ebsen

ninaebsen@gmx.de

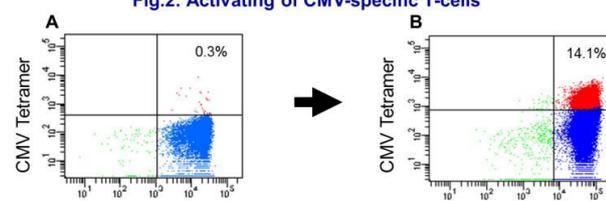
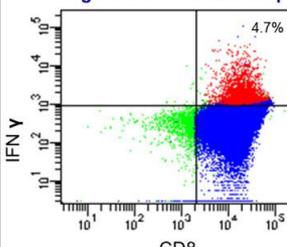
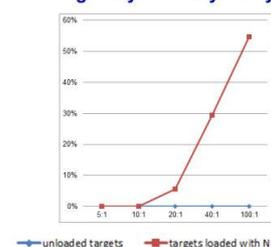
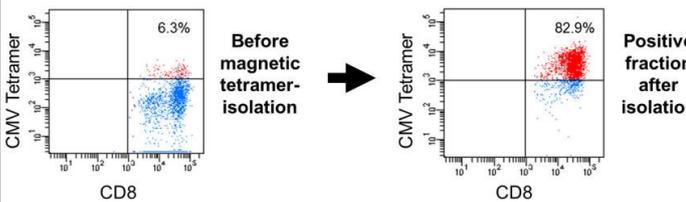
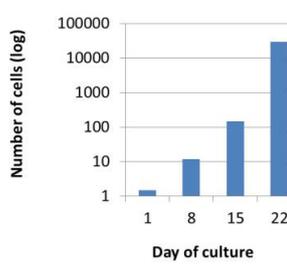


UNIVERSITÄTSKLINIKUM
Schleswig-Holstein, Campus Kiel



Successful Isolation And Expansion Of CMV-Reactive T-Cells That Retain A Strong Cytotoxic Effector Function

Ebsen N¹, Bodenbinder A¹, Oelke M², Staudinger M¹, Ritgen M¹, Gramatzki M¹, Kneba M¹, Gahn B¹
¹II. Department of Medicine, University Medical Center S-H, Kiel, ²Johns Hopkins University, Pathology, Baltimore

INTRODUCTION	RESULTS 2	
<ul style="list-style-type: none"> Reactivation of latent CMV in the transient state of immunodeficiency after HSCT is a severe viral complication endangering leukemia therapy success. CMV infections post-HSCT can be effectively controlled by the adoptive transfer of donor-derived CMV-specific T-cells. 	<p>Fig.2: Activating of CMV-specific T-cells</p>  <p>The CMV-specific CD8⁺ T-cells were detected in all 4 seropositive healthy donors. Using MHC-peptide tetramers, a low frequency of CMV-specific T-cells was detected before stimulation (A). After 3 stimulations the number of CMV-specific T-cells was effectively increased (B).</p>	
<p>HYPOTHESIS</p> <p>Functionally active CD8⁺ T-cells can be activated against the MHC class 1 restricted CMV-antigen NLVPMVATV.</p>	<p>Fig.3: Production of IFNγ</p>  <p>The expanded T-cells produced IFNγ after being restimulated with CMV peptide-loaded DCs.</p> <p>Fig.4: Cytotoxicity assay</p>  <p>The T-cells proved their specific cytotoxicity by lysis of the CMV peptide-loaded target cells.</p>	
<p>PATIENTS AND METHODS</p> <p>CD8⁺ T-cells were isolated from peripheral blood mononuclear cells in 4 CMV seropositive, HLA-A*0201 healthy donors and stimulated weekly by DC loaded with the CMV pp65 peptide NLVPMVATV and interleukin-2.</p>	<p>Fig.5: Isolation of CMV-specific T-cells</p>  <p>These CMV-specific T-cells were enriched by using magnetic tetramer isolation. Starting with 6.3% CMV-specific CD8⁺ T-cells the eluted positive fraction contained 82.9% CMV-specific T-cells.</p>	
<p>RESULTS 1</p>  <p>Fig.1: Starting with 1*10⁶ CD8⁺ T-cells the T-cell lines generated after 3 stimulations contained 1.7*10⁷ to 1.2*10⁸ (average 7.9*10⁷) T-cells, consisting of 1.2% to 96% (average 32%) NLVPMVATV-specific CD8⁺ T-cells.</p>	<p>SUMMARY & CONCLUSIONS</p> <ul style="list-style-type: none"> CMV-specific T-cells can be effectively activated and expanded from low T-cell numbers using autologous peptide-loaded dendritic cells. T-cells show CMV-specific IFNγ production and cytotoxicity. For further clinical applications CMV-specific T-cells can be enriched to high purity. 	

23rd Annual Meeting
of the Society for Virology

Kiel
06.-09. March 2013

correspondence:
PD Dr. Benedikt Gahn
II. Department of Medicine
University Medical Center S-H
Chemnitzstraße 33
D-24116 Kiel
+49 431 1697-5213
b.gahn@med2.uni-kiel.de

Fortbildung 2013

(Anwesenheitspflicht)

**Labor für Hämatologische
Spezialdiagnostik
II. Medizinische Klinik**

**Montag, den 13.05.2013
9:00 – 9:45 Uhr**

(Konferenzraum **K2** Haus 2, 2. Stock)

***„Successful isolation and expansion of
CMV-reactive T cells from healthy
donors that retain a strong cytotoxic
effector function”***

**Nina Ebsen
II. Med.Klinik, Labor für hämatologische Spezialdiagnostik**