

Generierung von virus-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2003

vorgelegt von
Georg Rauser

Tag der mündlichen Prüfung: 22. September 2003
Dekan: Prof. Dr. Hansgeorg Probst
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Hermann Einsele
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	5
1.1.	Das Immunsystem.....	5
1.2.	Professionelle antigenpräsentierende Zellen.....	6
1.3.	MHC-Moleküle.....	7
1.4.	Antigenprozessierung.....	11
1.5.	MHC-Moleküle und T-Zellantwort.....	14
1.6.	Das humane Cytomegalievirus (HCMV)	15
1.6.1.	Virale Struktur des HCMV.....	15
1.6.2.	Virusvermehrung in der Wirtszelle.....	15
1.6.3.	Infektion mit HCMV.....	16
1.6.4.	CMV-Erkrankung bei Patienten nach allogener Stammzell- transplantation.....	17
1.6.5.	HCMV-Diagnostik.....	17
1.6.6.	Therapie der HCMV-Infektion.....	18
1.7.	Immunantwort gegen HCMV.....	20
1.8.	Adoptive Immuntherapie der HCMV-Infektion.....	21
1.9.	Adoptive Immuntherapie EBV assoziierter Erkrankungen.....	22
1.10.	Zielsetzung.....	24
2.	Material.....	25
2.1.	Plastik- und Glaswaren.....	25
2.2.	Reagenzien und Chemikalien.....	25
2.3.	Seren.....	26
2.4.	Kulturmedien.....	26
2.5.	Einfriermedium.....	26
2.6.	Zytokine.....	26
2.7.	Antikörper.....	27
2.8.	FACS-Antikörper.....	27
2.9.	Produkte für die magnetische Zellseparation.....	27
2.10.	Peptide.....	28
2.11.	Virus-Lysat, Virus-Protein.....	29
2.12.	Tetramere.....	29

2.13.	Hodgkin-Zelllinie HD-MYZ.....	29
2.14.	TAP-mutante Zelllinie.....	30
2.15.	Virusstamm.....	30
2.16.	HLA-typisierte humane Hautfibroblasten.....	30
2.17.	HLA-typisierte Blutspender.....	30
3.	Methoden.....	31
3.1.	Allgemeine Zellkulturmethoden.....	31
3.1.1.	Isolierung der peripheren blutmononukleären Zellen (PBMCs).....	31
3.1.2.	Bestimmung der Zellzahl.....	31
3.1.3.	Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	31
3.1.4.	Bestrahlen der Zellen.....	32
3.1.5.	Herstellung des humanen PBMC-Pools.....	32
3.1.6.	Gewinnung von Serum.....	32
3.1.7.	Kultivierung der T2-Zelllinie und der Hodgkin-Zelllinie HD-MYZ.....	32
3.1.8.	Kultivierung der humanen Vorhautfibroblasten.....	33
3.1.9.	Trypsinierung der humanen Vorhautfibroblasten.....	33
3.1.10.	Generierung der dendritischen Zellen (DCs)	33
3.1.11.	Antigen-/Peptidbeladung der dendritischen Zellen (DCs)	34
3.1.12.	Isolierung von CD4+/CD8+ T-Zellen mittels MACS MicroBeads.....	34
3.1.13.	Peptidbindungstest.....	34
3.2.	Generierung der virus-spezifischen T-Zellen.....	35
3.2.1.	Isolierung virus-spezifischer T-Zellen mittels IFN- γ Secretion Assay.....	35
3.2.2.	Kultivierung der virus-spezifischen T-Zellen.....	36
3.2.3.	Expansion von virus-spezifischen T-Zellen mittels „Rapid expansion Protocol“ (REP).....	36
3.3.	Charakterisierung der Zellen.....	37
3.3.1.	Oberflächen- FACS-Analyse.....	37
3.3.2.	Tetramer-FACS-Analyse.....	37
3.3.3.	IFN- γ -Bestimmung mittels intrazellulärer FACS-Analyse.....	38
3.3.4.	IFN- γ -Bestimmung mittels IFN- γ Secretion Assay Detection Kit.....	38
3.3.5.	Proliferationsassay.....	39
3.3.6.	Zytotoxizitätsassay.....	39

3.3.6.1.	Peptidbeladung der T2-Zellen und der HD-MYZ-Zellen.....	39
3.3.6.2.	Infektion der Fibroblasten mit dem Laborstamm AD169.....	39
3.3.6.3.	Zytotoxizitätstest.....	40
3.3.7.	Gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte culture, MLC).....	41
4.	Ergebnisse.....	42
4.1.	Generierung von HCMV/pp65 Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	42
4.1.1.	Expansion der angereicherten Lymphozytenfraktion.....	42
4.1.2.	Tetramer-FACS-Analyse der PBMCs und der generierten T-Zellen.....	44
4.1.3.	IFN- γ Sekretion der generierten T-Zellen nach Peptid-Stimulation.....	45
4.1.4.	Zytotoxizität der generierten T-Zellen.....	46
4.2.	Definition eines neuen HLA-A*0201 Peptides aus dem HCMV/IE1-Antigen.....	47
4.2.1.	Epitop-Vorhersage mittels SYFPEITHI.....	47
4.2.2.	Bindung der vorhergesagten IE1-Peptide auf T2-Zellen.....	47
4.2.3.	Verbesserung der Peptid-Vorhersage mit dem PAProC-Programm.....	48
4.2.4.	Nachweis einer HCMV IE1 Peptid-spezifischen T-Zell-Antwort in HCMV-seropositiven Blutspendern.....	50
4.2.5.	Rekonstitution pp65 und IE1 Peptid-spezifischer T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation.....	51
4.3.	Generierung von HCMV/IE1 Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	54
4.4.	Generierung von CD4+ und CD8+ HCMV-spezifischen T-Zelllinien für den klinischen Einsatz.....	56
4.4.1.	Isolation und Expansion der CMV-spezifischen T-Zellen.....	58
4.4.2.	Frequenz CMV Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen (Tetramer-FACS).....	59
4.4.3.	Frequenz CMV-spezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen (IFN- γ Nachweis).....	61
4.4.4.	Proliferation der generierten T-Zellen nach Restimulation mit CMV-Antigen.....	62
4.4.5.	Zytotoxizität der generierten T-Zellen.....	63
4.4.6.	Alloreaktivität der generierten T-Zellen.....	64
4.5.	Optimierung des klinischen Protokolls.....	66
4.5.1.	Einsatz von weiteren CMV-Peptiden.....	66
4.5.2.	Generierung von CMV-spezifischen CD4+ T-Zellen mit rekombinantem CMV/pp65-Protein.....	68

4.6.	Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen von CMV-negativen Donoren..	71
4.7.	Generierung von EBV Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	72
4.7.1.	Generierung von LMP2 und BMLF1 EBV Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	72
4.7.2.	Generierung von LMP1 Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	74
5.	Diskussion.....	77
5.1.	Generierung von HCMV/pp65 Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	77
5.2.	Definition eines neuen HLA-A*0201 Peptides aus dem HCMV/IE1-Antigen.....	78
5.3.	Generierung von HCMV/IE1 Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	81
5.4.	Generierung von CD4+ und CD8+ HCMV-spezifischen T-Zelllinien für den klinischen Einsatz.....	82
5.5.	Optimierung des klinischen Protokolls.....	85
5.5.1.	Einsatz von weiteren CMV-Peptiden.....	85
5.5.2.	Generierung von CMV-spezifischen CD4+ T-Zellen mit rekombinantem CMV/pp65-Protein.....	85
5.6.	Generierung von EBV Peptid-spezifischen T-Zelllinien.....	86
6.	Zusammenfassung.....	88
7.	Literatur.....	90
8.	Abkürzungsverzeichnis.....	108
9.	Publikationsliste.....	110
10.	Danksagung.....	111
11.	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	112
12.	Lebenslauf.....	113

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem stellt ein außerordentlich komplexes Netzwerk aus Molekülen und Zellen dar, mit der Fähigkeit, zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden. Seine Aufgabe ist einerseits der Schutz des Organismus vor Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilzen und Parasiten, andererseits soll das Immunsystem maligne körpereigene Zellen bekämpfen, die aufgrund von genetischen Veränderungen ihre ursprünglichen Eigenschaften verloren haben und somit als „fremd“ erkannt werden. Die vielfältigen Schutzmechanismen des Immunsystems lassen sich der angeborenen oder der adaptiven Immunantwort zuordnen.

Zur angeborenen Immunantwort gehören physiologische Barrieren (z.B. die Haut), das Komplementsystem, Phagozyten, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und lösliche Mediatoren. Diese Mechanismen sind seit der Geburt vorhanden und zeichnen sich durch das Fehlen von Gedächtnis und geringe Spezifität aus.

Die adaptive Immunantwort hingegen wird durch Lymphozyten vermittelt, die zum einen die angeborene Immunantwort verstärken und fokussieren. Zum anderen sind sie dafür verantwortlich, dass eine wiederholte Infektion eine beschleunigte und verstärkte Immunantwort auslöst, was als immunologisches Gedächtnis bezeichnet wird. Die adaptive Immunantwort lässt sich weiter unterteilen in eine humorale und eine zelluläre Komponente.

Das humorale Immunsystem ist gegen membranständige Antigene gerichtet und wird durch lösliche Antikörpermoleküle vermittelt, die von B-Lymphozyten produziert und sezerniert werden. Das Komplementsystem kann hierbei als Verstärker dienen, indem es die Schwelle für die Aktivierung der B-Zellen erniedrigt.

Zu den wichtigsten Effektorzellen des zellulären Immunsystems gehören die zytotoxischen T-Lymphozyten (cytotoxic T lymphocytes, CTLs), die in der Lage sind, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Die Erkennung dieser Zellen erfolgt durch deren veränderte Proteinausstattung im Vergleich zu normalen Zellen desselben Gewebes, die Lysierung der Zellen erfolgt durch Ausschüttung von Perforin und Granzymen, sowie durch Expression des Fas-Liganden (CD95L). Unterstützt werden die CTLs von T-Helferzellen, die in aktivierter Form den CD40-Liganden exprimieren, der durch Bindung an CD40 die

antigenpräsentierenden Eigenschaften von dendritischen Zellen verstärkt. Außerdem sezernieren die T-Helferzellen Interleukin 2, das die CTLs zu starker Proliferation anregt.

1.2. Professionelle Antigenpräsentierende Zellen

Antigenpräsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) spielen eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung von Immunität zwischen Antigen und Effektorzellen. Makrophagen und B-Lymphozyten können als APCs dienen, die potentesten APCs stellen aber die dendritischen Zellen (*dendritic cells*, DCs) dar (Reid et al., 2000), die in den 80er Jahren von Ralph Steinman entdeckt wurden. Sie präsentieren naiven T-Zellen Antigen und sind in der Lage, zytotoxische Zellen nach einem vorhergehenden Kontakt mit T-Helferzellen (Ridge et al., 1998) oder auch unmittelbar (Inaba et al., 1997) zu stimulieren. Dendritische Zellen sind eine sehr heterogene Zellpopulation und werden laufend von Knochenmarkstammzellen gebildet. Es wurden zwei humane DC-Linien beschrieben (Liu et al., 2001): myeloide Monozyten (Pre-DC1) werden zu myeloiden DCs, die IL-12 produzieren und so eine Th1-Antwort induzieren, plasmacytoide DCs (Pre-DC2) werden zu lymphoiden DCs und induzieren eine Th2-Antwort. Nach Antigenkontakt oder Stimulation der unreifen DCs durch inflammatorische Mediatoren (z.B. über Toll-like-Rezeptoren) migrieren sie aus den Geweben in die afferente Lymphe (das sogenannte *homing*) und treten in den T-Zellbereichen der Lymphknoten als interdigitierende retikuläre Zellen in Erscheinung (Steinman, 1991; Cella et al., 1997). Zu diesem Zeitpunkt hat sich das Erscheinungsbild entscheidend geändert, die reifen DCs sind jetzt nicht mehr in der Lage, Antigen aufzunehmen und zu prozessieren und verfügen nun über die ausgeprägte Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren. Dabei werden charakteristische Marker exprimiert, die als Costimulatoren dienen können (z.B. CD80, CD86, CD83). Eine reife dendritische Zelle ist in der Lage, mehrere tausend T-Zellen zu stimulieren, wobei sich stabile Cluster zwischen DCs und T-Zellen ausbilden (Banchereau and Steinman, 1998). Eine weitere wichtige Aufgabe unreifer DCs (einschließlich epidermaler Langerhans-Zellen und interstitieller DCs aus nicht-lymphoiden Geweben) ist es, durch ständige Präsentation von Selbst-Antigenen die T-Zell Selbsttoleranz aufrecht zu erhalten (Banchereau and Steinman, 1998).

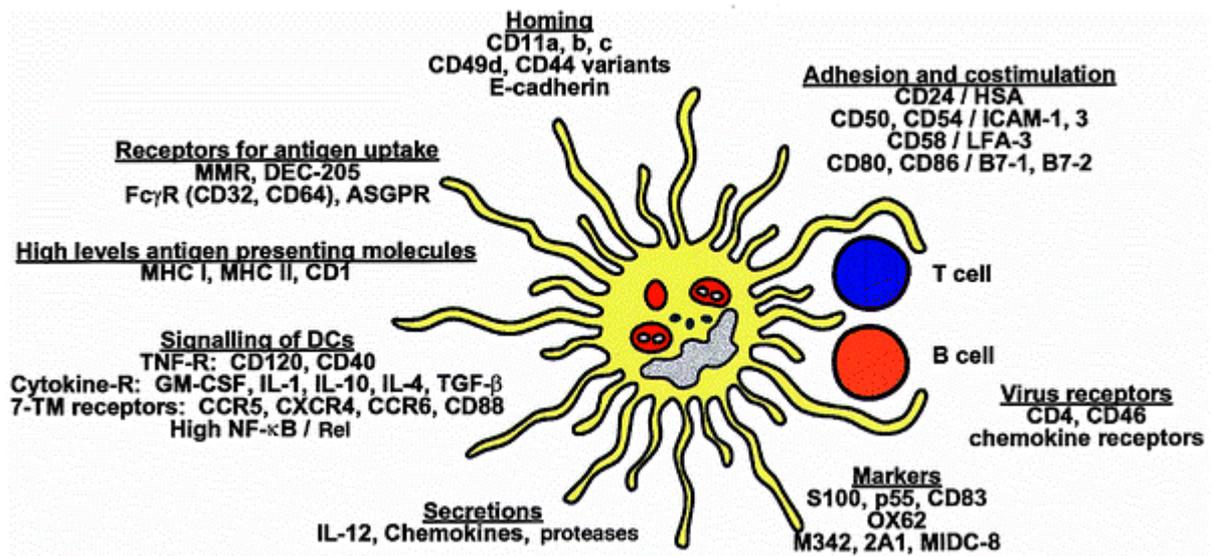


Abb. 1.1. Reife Dendritische Zelle und ihre Eigenschaften [Reprinted by permission from Nature (Banchereau and Steinman, 1998) copyright (1998) Macmillan Publishers Ltd]

1.3. MHC-Moleküle

In ihrer Funktion sind sowohl die humorale als auch die zelluläre Immunantwort von membranständigen Glykoproteinen abhängig, die Peptide aus extrazellulären bzw. zytosolischen Proteinen binden und für die Erkennung durch T-Lymphozyten präsentieren. Diese Glykoproteine werden beim Menschen als *Human Leucocyte Antigens* (HLA) bezeichnet. Sie werden von den Genen des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kodiert, der auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 lokalisiert ist und mit über 3500 kb ca. 0,1% des menschlichen Genoms umfasst.

Klassische MHC-Moleküle lassen sich nach Struktur und Funktion in zwei Klassen einteilen:

Während MHC Klasse I-Moleküle auf nahezu allen zellkernhaltigen Vertebratenzellen zu finden sind, werden MHC Klasse II-Moleküle in der Regel nur von spezialisierten APCs, wie z.B. von B-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert.

MHC Klasse I-Moleküle (Abb. 1.2, Saper et al., 1991) bestehen aus einer 45-kD- α -Kette, auch schwere Kette genannt, die nichtkovalent mit einem extrazellulären 12-kD-Polypeptid, dem β_2 -Mikroglobulin, assoziiert ist.



Abb. 1.2. Kristallstruktur des HLA-A2-Moleküls im Komplex mit einem Peptidliganden. Darstellung als Ribbon-Diagramm. Das gebundene Peptid ist zur besseren Unterscheidung in der Backbone-Darstellung abgebildet [nach Saper et al., 1991]

Die α -Kette besitzt drei extrazelluläre Immunglobulindomänen (α_{1-3}), eine Transmembranregion und eine kurze zytosolische Domäne.

MHC Klasse II-Moleküle (Abb. 1.3, Stern et al., 1994) hingegen bestehen aus zwei nichtkovalent assoziierten schweren Ketten, α (34 kD) und β (29 kD), die jeweils zwei extrazelluläre Immunglobulindomänen (α_1 und α_2 bzw. β_1 und β_2), eine Transmembranregion und eine kurze zytosolische Domäne besitzen.

Für die schweren Ketten von MHC Klasse I-Molekülen sowie für die α - und β -Ketten der MHC Klasse II-Moleküle befinden sich beim Menschen auf Chromosom 6 je drei Loci: HLA-A, -B und -C für die Klasse I, HLA-DP, -DQ und -DR für die Klasse II. Diese Gene zeichnen sich durch einen außergewöhnlich starken Polymorphismus aus, wogegen das auf Chromosom 15 liegende Gen für β_2 -Mikroglobulin nicht polymorph ist.

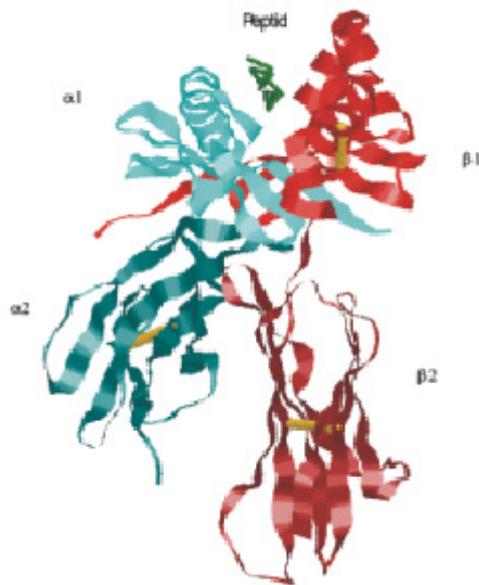


Abb. 1.3. Kristallstruktur des HLA-DR1-Moleküls im Komplex mit dem Peptidliganden PKYVKQNTLKLAT aus dem Influenza A Virus Hämagglutinin (306-313) [nach Stern et al., 1994], Darstellung wie in Abb.1.2

Die Bindung eines Peptids durch ein MHC-Molekül erfolgt über die zwei N-terminalen Domänen der schweren Ketten. Im Falle des MHC Klasse I-Moleküls sind dies die α_1 - und die α_2 -Domäne, im Falle des MHC Klasse II-Moleküles die α_1 - und die β_1 -Domäne. Diese bilden eine längliche Peptidbindungsgrube, wobei der Boden von einer β -Faltblattstruktur gebildet wird, die seitlich von zwei α -helikalen Bereichen begrenzt ist (Abb. 1.4, Stern et al., 1994). Die Peptidbindungsgrube erlaubt die Bindung von Peptiden über nichtkovalente Wechselwirkungen und ist der Bereich, in dem sich die verschiedenen Allelprodukte am stärksten unterscheiden. Den größten Anteil an der Bindung haben bei MHC Klasse I-Molekülen Bereiche der α_1 -Helix, bei MHC-Klasse II-Molekülen unter anderem Bereiche der β_1 -Helix. Diese treten in Wechselwirkung mit den sogenannten „Ankerminosäuren“ des gebundenen Peptids, die nach allen Kristallstrukturen von der MHC-Moleküloberfläche weg zur β -Faltblattstruktur der Bindungsgrube hin orientiert sind.

Im Falle der MHC Klasse I-Moleküle sind außerdem die C- und N- Termini des Liganden an den geschlossenen Grubenenden fixiert. Daher ergibt sich für MHC Klasse I-Liganden eine charakteristische Länge von meist 9 Aminosäuren. Die Peptidbindungsgruben der MHC Klasse II-Moleküle sind dagegen an den Enden offen, weshalb die Liganden eine variable Länge von 9-25 Aminosäuren aufweisen.

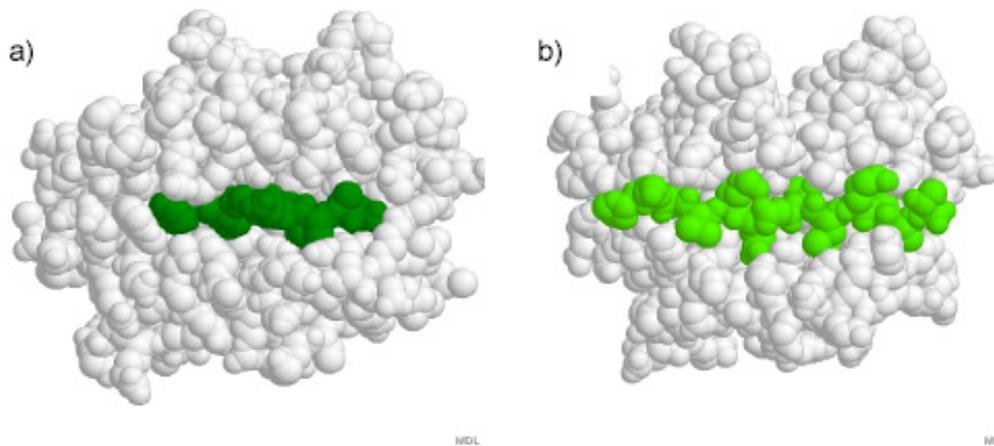


Abb. 1.4. Peptidbindungsgruben von MHC-Molekülen aus der Sicht eines T-Zellrezeptors
 a) Peptidbindungsgrube eines H2-K^b-Moleküls mit gebundenem viralem Nonapeptid;
 b) Peptidbindungsgrube eines HLA-DR1 Moleküles mit einem Influenza-Tridecapeptid
 [nach Stern et al., 1994]

Die Tatsache, dass die Peptidbindungsgruben der einzelnen HLA-Allelprodukte jeweils charakteristische chemische Verhältnisse aufweisen, führt dazu, dass Peptide, die an ein bestimmtes Allelprodukt binden, strukturelle Gemeinsamkeiten besitzen. Es ergibt sich für jedes Allel ein „Peptidmotiv“ (Falk et al., 1991), das Länge und Besetzung der für die Bindung entscheidenden Positionen eines idealen Liganden beschreibt. Die Identifizierung von Peptidmotiven wurde durch die Entwicklung eines Elutionsverfahrens für MHC-gebundene Peptide und der Pool-Sequenzierung des erhaltenen Gemisches möglich (Falk et al., 1991; Stevanovic et al., 1993). Inzwischen konnte für viele MHC-Allele das entsprechende Peptidmotiv identifiziert werden.

Der starke Polymorphismus der MHC-Moleküle führt dazu, dass die meisten Individuen heterozygot sind und wegen der kodominanten Expression der Gene der schweren Ketten bis zu sechs verschiedene MHC I-Moleküle besitzen. Auf Populationsebene betrachtet erhöht sich dadurch die Wahrscheinlichkeit, dass Peptide aus einem beliebigen Pathogen von einem ausreichend großen Teil der Bevölkerung durch MHC-Moleküle präsentiert werden können und damit eine überlebenssichernde Immunantwort auslösen.

1.4. Antigenprozessierung

Die Beladung der MHC-Moleküle mit Peptiden erfolgt für Klasse I und II auf unterschiedlichen Wegen, die sich aus der unterschiedlichen Herkunft der Peptide ergeben. Peptide, die mittels MHC-I präsentiert werden, sind vor allem zytosolischen Ursprungs und entstehen durch intrazelluläre Proteolyse von Proteinen. Auf gesunden Zellen sind dies demnach Selbstpeptide, die den regulären zytosolischen Zellbestand widerspiegeln. Im Falle von virusinfizierten Zellen oder von Tumorzellen werden dagegen auch Peptide aus virus- bzw. tumorspezifischen Proteinen präsentiert.

Die wichtigste Rolle beim intrazellulären Proteinabbau kommt dem Proteasom zu, einem Multienzymkomplex, der im Zytosol und in der Kernmatrix lokalisiert ist. Die Entdeckung der durch das Zytokin Interferon- γ (IFN- γ) induzierbaren proteasomalen Untereinheiten LMP2 und LMP7 stellte einen ersten konkreten Hinweis auf eine Beteiligung des Proteasoms an der Klasse-I-Antigenprozessierung dar. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition des Proteasoms durch den spezifischen Inhibitor Lactacystin die MHC Klasse I-vermittelte Antigenpräsentation blockiert (Cerundolo et al., 1997). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das Proteasom tatsächlich für die Generierung der C-Termini von MHC Klasse I-Liganden verantwortlich ist (Stoltze et al., 1998).

Das humane Proteasom besteht aus einer katalytisch aktiven Komponente, dem 20S-Proteasom, das *in vivo* zumindest teilweise in Komplex mit dem 19S-Aktivator als sogenanntes 16S-Proteasom vorliegt. Das 20S-Proteasom ist ein fassartiger Komplex aus vier übereinanderliegenden Ringen mit je sieben α -Untereinheiten (äußere Ringe) und sieben β -Untereinheiten (innere Ringe), wobei je drei β -Untereinheiten enzymatisch aktive Zentren mit unterschiedlichen Schnittspezifitäten darstellen. Unter dem Einfluß von IFN- γ , z.B. im Zusammenhang mit einer viralen Infektion, kommt es zu einem Austausch der konstitutiven aktiven β -Untereinheiten durch die schon erwähnten MHC-codierten Untereinheiten LMP2 und LMP7 (Belich et al., 1994) sowie die MECL1-Untereinheit (Groettrup et al., 1996; Hisamatsu et al., 1996). Vergleicht man die Schnittmuster des humanen konstitutiven Proteasoms und dieses sogenannten Immunoproteasoms, so ergeben sich vermehrt Schnitte nach hydrophoben Aminosäuren, jedoch weniger Schnitte nach sauren Aminosäuren

(Toes et al., 2001). Damit entstehen vermehrt potentielle MHC Klasse I-Liganden, da alle bekannten Peptidmotive für humane MHC Klasse I-Moleküle C-terminal entweder hydrophobe oder basische Aminosäuren fordern.

Die durch das Proteasom gebildeten Peptide gelangen über das heterodimere Transportprotein TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) ATP-abhängig in das endoplasmatische Retikulum (ER). Dort bindet das Peptid an ein geeignetes leeres MHC Klasse I-Molekül. Aus dem ER gelangt der trimere Komplex aus Peptid, schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin auf dem regulären Exozytoseweg für Membranproteine über den Golgi-Komplex und exozytische Vesikel an die Zelloberfläche, wo er CD8+ T-Zellen präsentiert wird (Abb.1.5).

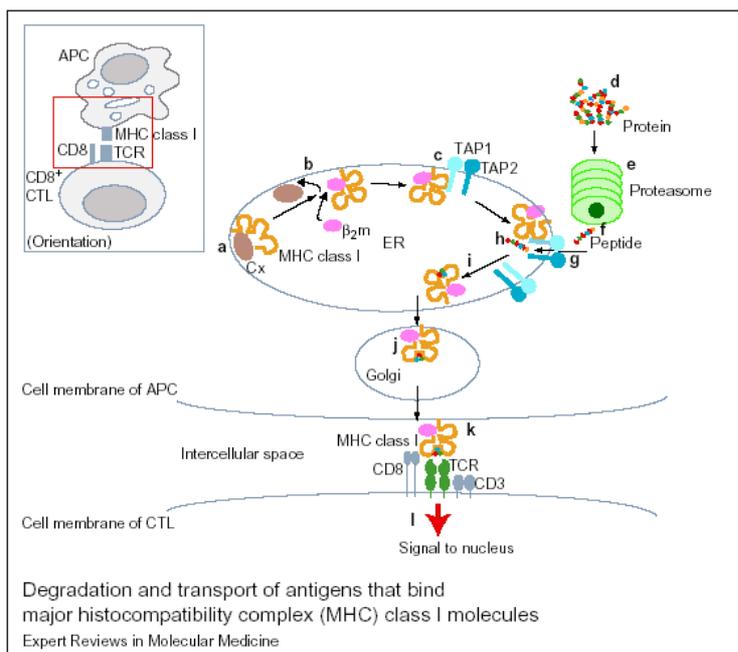


Abb.1.5. Prozessierung und Präsentation von Antigenen, die an MHC Klasse I-Moleküle binden [nach „expert reviews in molecular medicine“ <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>]

Peptide, die auf MHC Klasse II-Molekülen präsentiert werden, stammen dagegen aus Proteinen, die in das endosomale/lysosomale Kompartiment gelangen. Dies können zytosolische, extrazelluläre Proteine oder Membranproteine sein. Die Aufnahme eines exogenen Proteins kann entweder unspezifisch durch Pinozytose und Phagozytose oder spezifisch durch rezeptorvermittelte Endozytose geschehen (Watts, 1997). Anschließend erfolgt in den angesäuerten Vesikeln die Spaltung des

Proteins in Peptide durch eine Reihe lysosomaler Proteasen, wie z.B. Cathepsin S und B. Leere MHC Klasse II-Moleküle werden nach ihrer Synthese im ER nach Komplexbildung mit der „Invariant Chain“ (IC) ebenfalls in das späte endosomale/lysosomale Kompartiment befördert. Dabei bindet ein Teil von IC in der Peptidbindungsgrube. Im lysosomalen Kompartiment kommt es zum Abbau von IC bis auf das in der Bindungsgrube lokalisierte und damit geschützte Peptid (*class II-associated invariant chain peptide*, CLIP). Ein weiteres Molekül, HLA-DM, katalysiert im Fall von HLA-DR den Austausch von CLIP gegen hochaffine Peptide exogenen Ursprungs (Kropshofer et al., 1997). Schließlich wird analog zur Klasse I-Antigenprozessierung der trimere Komplex aus den schweren Ketten und Peptid in Vesikeln zur Zelloberfläche transportiert (Abb.1.6).

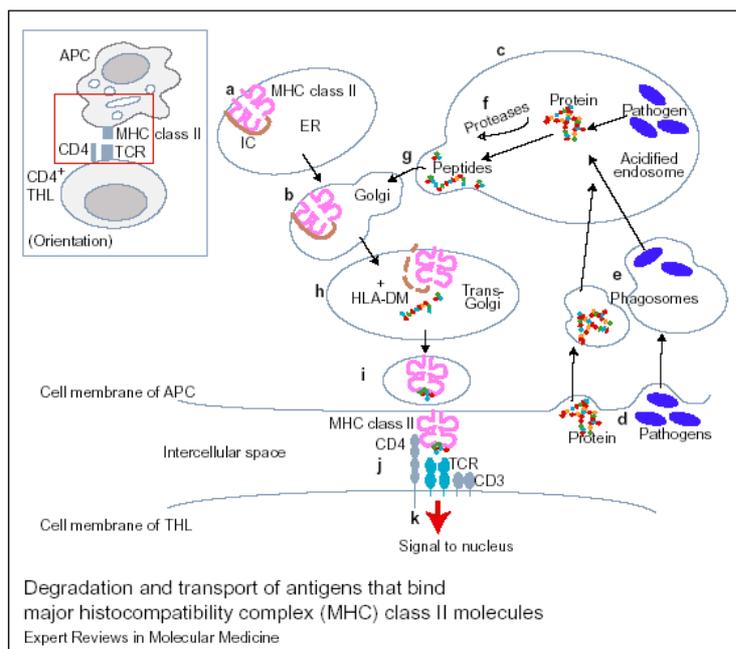


Abb.1.6. Prozessierung und Präsentation von Antigenen, die an MHC Klasse II-Moleküle binden [nach „expert reviews in molecular medicine“ <http://www.ermm.cbcu.cam.ac.uk>]

Für die Stabilität von MHC-Molekülen an der Zelloberfläche ist das gebundene Peptid von entscheidender Bedeutung. Gelangt im MHC Klasse I-Weg der unbeladene dimere Komplex aus schwerer Kette und β_2 -Mikroglobulin im Zuge des konstitutiven Exozytoseweges an die Oberfläche, so erfolgt rasche Abdissoziation des β_2 -Mikroglobulin und schließlich Reinternalisierung der schweren Kette (Rock et al., 1991).

1.5. MHC-Moleküle und T-Zellantwort

Die unterschiedliche Herkunft der MHC Klasse I- und II-präsentierten Peptide spiegelt sich in der Erkennung durch unterschiedliche Effektorzellen wieder.

Im MHC Klasse I-System sind dies CD8⁺ CTLs. Gedrungene CTLs zirkulieren bis zur Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes ständig im Körper und passieren dabei die lymphatischen Gewebe wie z.B. die Lymphknoten, in denen eine hohe Dichte an APCs herrscht. Der Erkennungsprozess im Zusammenhang mit einem kostimulierenden Signal, das von den APCs ausgesendet wird, führt zur Aktivierung der CTLs und ihrer sekretorischen und rezeptorvermittelten zytotoxischen Mechanismen gegen krankhaft veränderte Zielzellen in der Peripherie (Berke, 1994). Daneben produzieren CTLs Zytokine wie z.B. IFN- γ , die u.a. Entzündungsreaktionen induzieren, das Immunproteasom aktivieren, die antigenpräsentierenden Eigenschaften von APCs verbessern und virale Replikationsvorgänge inhibieren.

Die Erkennung MHC Klasse II-präsentierter Peptide auf APCs erfolgt durch CD4⁺ T-Zellen. Der Erkennungsprozess führt zur Ausschüttung von Zytokinen, wobei sich nach Funktion und Zytokinmuster zwei Untergruppen unterscheiden lassen: Th1- oder inflammatorische T-Zellen, deren Leitzytokin IFN- γ ist, aktivieren Makrophagen, um intravesikuläre Bakterien abzutöten. Th2- oder T-Helferzellen, deren Leitzytokin Interleukin 4 ist, aktivieren dagegen die Antikörperproduktion durch B-Lymphozyten und sind damit für die humorale Immunantwort von entscheidender Bedeutung.

Alle T-Zellen durchlaufen während ihrer Reifungsphase im Thymus Selektionsprozesse, die für die Funktionalität der spezifischen Immunantwort eines Individuums von entscheidender Bedeutung sind. Positive Selektion bedeutet Selektion von nur solchen T-Zellen, die Peptide im Kontext der selbst-MHC-Moleküle erkennen. Die negative Selektion dagegen führt zur Apoptose solcher T-Zellen, die Peptide erkennen, welche auch auf gesunden Körperzellen präsentiert werden. Ergänzend kann es in der Peripherie zu einer Inaktivierung selbstreaktiver T-Zellen durch Anergie kommen. Letzteres stellt sicher, dass auch solche T-Zellen inaktiviert werden, die ein lokal gewebsspezifisches Antigen erkennen. Die Bedeutung der Mechanismen der negativen Selektion wird an Autoimmunkrankheiten deutlich, wo es zu einer Immunreaktion gegen körpereigene Antigene kommt.

1.6. Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

HCMV gehört zu den β -Herpesviren, die sich durch ein enges Wirtsspektrum, langsame Replikation und meist eine Vergrößerung (Zytomegalie) der infizierten Wirtszellen auszeichnen. Die offizielle Nomenklatur bezeichnet das Virus als Humanes Herpesvirus 5 (HHV-5). HCMV wurde erstmals 1956 von Smith aus der Speicheldrüse und den Nieren eines Kindes isoliert, welches an der „Einschlusskörperchen-Krankheit“ verstarb (Smith, 1956).

1.6.1. Virale Struktur des HCMV

Die humanen Herpesviren sind charakterisiert durch eine doppelsträngige DNA und ein von einer Virushülle umgebenes Nukleokapsid aus 162 Kapsomeren (Apperley and Goldman 1998). Das HCMV-Genom besteht aus mehr als 200 bekannten Genen und codiert über 250 strukturelle und nicht strukturelle Proteine (Chee et al., 1990). Die DNA des HCMV besteht aus ca. 240 000 Basenpaaren mit einem relativen Molekulargewicht von 150 000 kD (Geleen et al., 1978). Die Herpesviren können alle nach abgelaufener Primärinfektion im Organismus persistieren, wobei als Ort dieser Persistenz vor allem Monozyten und Endothelzellen betroffen sind. Die persistierenden Viren können unter bestimmten Umständen reaktiviert werden, so zum Beispiel bei Tumorerkrankungen, in der Schwangerschaft, bei bestimmten Anämien, sowie bei Suppression des Immunsystems durch HIV oder durch zytostatische und immunsuppressive Therapie.

1.6.2. Virusvermehrung in der Wirtszelle

Die Replikation des HCMV geht im Vergleich zu anderen Herpesviren sehr langsam vonstatten. Es vergehen zwei bis drei Tage, bis das Virus nachgewiesen werden kann (Walthen and Stinski, 1982). Glykoproteine in der Virushülle vermitteln die Adsorption des Virus an die Oberfläche der Wirtszelle, worauf die Virushülle über die Glykoproteine gB, gH (Keay et al., 1988; Rasmussen et al., 1991) und UL18, einem Homolog zum β_2 -Mikroglobulin des MHC (Farell et al., 1997), mit der Zielzelle

fusioniert. Die Freisetzung der Virus-DNA, das sogenannte *uncoating*, geschieht an den Kernporen, wobei die DNA in den Zellkern gelangt und eine zirkuläre Struktur annimmt. Dort werden weit mehr als 30 Strukturproteine sowie eine noch unbekannte Anzahl an Nicht-Strukturproteinen, die für den Virusstoffwechsel wichtig sind, kaskadenartig gebildet (Mocarski, 1993). Der sogenannte *major IE locus* (IE1 und IE2), der zwischen 169 kbp und 175 kbp liegt, bewirkt die Synthese der α -Proteine, den *immediate early antigens* (Chee et al., 1990). Dies sind Regulatorproteine, die die Synthese der β -Proteine $\beta 1$ und $\beta 2$ (*early antigens*) aktivieren und es sind die ersten viralen Gene, die nach der Infektion der Wirtszelle transkribiert werden. Auch die β -Proteine sind Regulatorproteine oder Enzyme (z.B. DNA-Polymerase), erst die γ -Proteine oder auch *late antigens* $\gamma 1$ und $\gamma 2$ bilden als Strukturproteine mit der neu synthetisierten DNA den Viruspartikel. Das Nukloekapsid wird im Zellkern gebildet und gelangt durch die Zellmembran an die Zelloberfläche, wo das reife infektiöse Virus entsteht (Eggers et al., 1992).

1.6.3. Infektion mit HCMV

Bei einer HCMV-Primärinfektion beim Immunkompetenten kommt es nach einer Inkubationszeit von 4-8 Wochen zu einer weitestgehend zellgebundenen Virämie der Monozyten und Granulozyten (Saltzman et al., 1988). Die Primärinfektion verläuft meist inapparent, es kann jedoch zur subklinischen Hepatitis, zu einer unspezifischen Fieberreaktion oder zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild kommen. Das Virus bzw. dessen Genom persistiert nun meist lebenslang in latent infizierten Zellen, ohne sich zu replizieren (Bein et al., 1993). Hierbei unterläuft das Virus die Immunabwehr des Menschen und entzieht sich damit einer wirksamen Bekämpfung (Bailey et al., 1995).

1.6.4. CMV-Erkrankung bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation

Trotz neuer Diagnose- und Therapieverfahren stellt die CMV-Reaktivierung bzw. -Neuinfektion bei Stammzell-Transplantierten immer noch ein großes Problem dar. 40-70% der seropositiven Stammzell-Transplantierten erkranken im Anschluss an eine Stammzelltransplantation (SCT) an CMV (Meyers et al., 1986; Trenchel et al., 2000), die HCMV-Infektion stellt mit die häufigste Todesursache bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation dar (Ho, 1994). Neben Infektionen des GI-Traktes, der Leber (Reed et al., 1990; Bombi et al., 1987) und des hämatopoetischen Systems weist vor allem die interstitielle Pneumonie (IP) eine sehr hohe Letalität auf (Emanuel et al., 1988; Reed et al., 1988; Winston et al., 1990) und ist somit entscheidend für die weitere Prognose. Ohne Therapie tritt bei 49-56% der Hochrisikopatienten nach SCT eine IP auf, deren Letalität ohne Therapie bei etwa 65% liegt (Schmidt et al., 1993). Gefährdet sind vor allem Patienten, die CMV-seropositiv sind und/oder einen CMV-seropositiven Spender hatten (Meyers et al., 1986; Winston et al., 1990; Bilgrami et al., 1999).

Weitere Risikofaktoren stellen granulozytenhaltige Transfusionen von CMV-seropositiven Spendern (Meyers et al., 1986) sowie schlechter körperlicher Zustand und höheres Alter des Patienten dar. Das Risiko einer CMV-Infektion ist in den ersten 4 Monaten (besonders zwischen Tag 50-60) nach SCT am größten (Wingard et al., 1990), jedoch bereits ab Tag 30 nach SCT nachzuweisen (Bilgrami et al., 1999).

1.6.5 HCMV-Diagnostik

Eine HCMV-Infektion bzw. eine HCMV-assoziierte Erkrankung lässt sich nach Isolierung des Virus aus der Kultur mit Hilfe serologischer und molekularbiologischer Methoden nachweisen. Der Kulturnachweis des Virus erfolgt mittels monoklonaler Antikörper (Gleaves et al., 1985), das serologische Verfahren, eine HCMV-Infektion nachzuweisen, verwendet den sogenannten *enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)*, bei dem IgM (akute Infektion) und IgG (nach Infektion zeitlebens nachweisbar) bestimmt wird. Die HCMV-Virämie ist ein ungünstiger prognostischer Marker für das Auftreten einer Erkrankung (Schmidt et al., 1991). Langzeitstudien bei

Transplantatempfängern und HIV-infizierten Personen haben gezeigt, dass der Nachweis der Antigenämie durch das virale Tegumentprotein pp65 in Blutleukozyten mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern (Boeckh et al., 1992) Aufschluss über den Krankheitsverlauf und die Symptome der Krankheit gibt. Dies gilt auch für den HCMV-DNA-Nachweis mittels der *Polymerase-Kettenreaktion (PCR)* im Blut und zu späteren Zeitpunkten im Urin (Rasmussen et al., 1997; Spector et al., 1998). Zudem ist es möglich, mit quantitativen Methoden (quantitative PCR) die Wirksamkeit der Behandlung zu überwachen und nötigenfalls die Therapie-modalitäten anzupassen (Einsele et al., 1991; Einsele et al., 1995; Spector et al., 1998).

1.6.6. Therapie der HCMV-Infektion

Immunglobuline mit HCMV-spezifischen Antikörpern stehen für die passive Immunprophylaxe zur Verfügung. Bei der Organtransplantation konnte dadurch die Schwere der Krankheit zwar reduziert, die Erkrankung selbst aber nicht verhindert werden. Ausschlaggebend für die antivirale Wirkung ist ein ausreichend hoher Titer, der oftmals nicht erreicht wird (Bachmann et al., 1997). Die kombinierte Gabe von Hyperimmunglobulinen und Ganciclovir führt zwar zu einer Verminderung der Sterblichkeit bei der interstitiellen Pneumonie zum frühen Zeitpunkt, doch auf lange Sicht ist die Überlebensrate gering (Emanuel et al., 1988; Reed et al., 1988; Ljungman et al., 1992).

Die antivirale Therapie bei dokumentiertem CMV-Nachweis bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation erfolgt routinemäßig mit Ganciclovir und Foscarnet. Ganciclovir ist ein CMV- bzw. Herpesvirus-spezifischer Guanosin-Antimetabolit (Tyms et al., 1984), der nach Phosphorylierung durch virale Kinasen als Ganciclovir-Triphosphat in die virale DNA eingebaut wird und zum Abbruch oder einer deutlichen Beschränkung der viralen DNA-Elongation führt. Ganciclovir hat erhebliche Nebenwirkungen, wovon vor allem die Myelosuppression (Bowden et al., 1987) für Patienten nach Stammzelltransplantation von großer Bedeutung ist.

Nach erfolgloser Behandlung mit Ganciclovir (wegen einer möglichen Unwirksamkeit oder Resistenz) und bei Patienten mit bereits eingeschränkter Knochenmarksfunktion kommt Foscarnet zum Einsatz. Dessen virustatische Wirkung beruht auf

einer direkten allosterischen Hemmung viraler Enzyme wie der DNA-Polymerase und der Reversen Transkriptase. Foscarnet hat ein anderes Nebenwirkungsspektrum als Ganciclovir, hier wird der Einsatz vor allem durch die Nephrotoxizität limitiert (Aschan et al., 1992; Bowden et al., 1991).

Die antiviralen Therapeutika führen nicht immer zu einer vollständigen Unterdrückung des Virus, so dass zunehmend Resistenzen gegen diese Virustatika auftreten (Erice et al., 1997; Alain et al., 1997; Bowen et al., 1998). Molekularbiologische Untersuchungen Ganciclovir-resistenter HCMV-Isolate zeigten eine Mutation im Gen von UL97, das die virale Phosphotransferase kodiert und für die Phosphorylierung und somit Aktivierung des Prodrugs Ganciclovir verantwortlich ist. Diese Mutation im Gen UL54 induziert nicht nur eine Resistenz gegenüber Ganciclovir, sondern zeigt auch eine Kreuzresistenz gegenüber Cidofovir (Chou et al., 1997; Erice et al., 1997; Smith et al., 1997). Mittlerweile stehen Methoden zur Detektion dieser resistenten Virusstämme zur Verfügung (Erice A, 1999).

Die Resistenzentwicklung gegen Ganciclovir bei Stammzelltransplantierten hängt außerdem in hohem Maße von der Art der Transplantation ab. So war eine 14-tägige Ganciclovir-Behandlung bei bis zu 26% der Patienten nach Knochenmarktransplantation unwirksam, während diese Rate nach Transplantation mit peripher gewonnenen Stammzellen lediglich bei 7% lag. (Trenschel et al., 2000).

Nach erfolgloser Therapie mit Ganciclovir oder Foscarnet kann als Second-line-Therapeutikum Cidofovir eingesetzt werden. 66% der in einer Studie untersuchten Patienten, die zuvor erfolglos mit herkömmlichen Virustatika behandelt wurden, sprachen auf eine Therapie mit Cidofovir an (Ljungman et al., 2001). Trotz der Prophylaxe mit Probenecid und Bewässerung hatten allerdings 39% der Patienten erhebliche Nebenwirkungen (26% renale Schäden, die auch nach Therapieende bestehen blieben).

Ein Problem bei der bis jetzt routinemäßig durchgeführten präemptiven Behandlung mit Ganciclovir ist das vermehrte Auftreten von späten CMV-Erkrankungen (>Tag 100 nach Transplantation). Es zeigte sich, dass dabei 10% der Patienten eine CMV-Infektion nach Tag 100 entwickeln (Einsele et al., 2000). Ein wesentlicher Risikofaktor für das Auftreten einer späten (late-onset) CMV-Infektion war die längere Behandlung (über 4 Wochen) mit Ganciclovir.

1.7. Immunantwort gegen HCMV

Eine HCMV-Infektion ruft sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervor. Die Interaktion von HCMV mit dem Immunsystem ist überaus komplex, da HCMV selbst immunsuppressiv wirkt und über verschiedene Mechanismen versucht, dem Immunsystem zu entkommen (Mocarski, 1996). So konnte gezeigt werden, dass HCMV-infizierte DCs die Expression des MHC I-Komplexes, sowie der CD40 und CD80 Moleküle herunterregulieren (Grigoleit et al., 2002), in geringerem Maße auch die Expression des MHC II-Komplexes und von CD86 (Moutsafsi et al., 2002). Verstärkt exprimiert werden dagegen der Apoptose-induzierende Ligand CD95L (FasL) und der *tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) (Raftery et al., 2001).

Die wichtigste Komponente der Immunantwort stellen die zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) dar. Ihr Vorkommen korreliert bei Transplantationspatienten direkt mit einem positiven klinischen Verlauf (Ljungman et al., 1985; Reusser et al. 1991), und ein adoptiver Immuntransfer nach Transplantation mit HCMV-spezifischen CTLs reduzierte signifikant die Inzidenz schwerer HCMV-Infektionen (Riddell et al. 1992; Walter et al., 1995). Das Phosphoprotein pp65 wurde als Hauptziel der HCMV-spezifischen CTL-Antwort identifiziert (Wills et al., 1996; Longmate et al., 2001; Mc Laughlin-Taylor et al., 1994), und die meisten HCMV Peptid-Epitope, die mittels Klonierungs-Technik (Wills et al., 1996; Longmate et al., 2001; Diamond et al., 1997) oder mittels MHC Klasse-I Epitop-Vorhersage (Solache et al., 1999) definiert wurden, stammen aus pp65. Weitere Induktoren einer HCMV CTL-Antwort sind die Proteine IE1, pp150, gB und gH (Gyulai et al., 2000; Kern et al., 1999; Tabi et al., 2001; Retiere et al., 2000).

Zum zellulären Teil der HCMV-Immunantwort gehören desweiteren die NK-Zellen, die den ersten Schutz bei der Virusinfektion bieten, indem sie infizierte Zellen lysieren und das antivirale Zytokin IFN- γ sezernieren (Kos and Englemann, 1996). HCMV ist in der Lage, die Expression der MHC Klasse-I Moleküle der infizierten Zellen zu vermindern. Dies erkennen die NK-Zellen und zerstören diese Zelle daraufhin.

Trotz extensiver Studien ist die genaue Bedeutung der Antikörper in der HCMV-Immunantwort noch unklar. Sie scheinen allein die Reaktivierung von latentem Virus zu hemmen, während eine Primärinfektion weitgehend unbeeinflusst bleibt (Jonjic et

al., 1994). Als Induktoren einer Antikörper-Antwort sind bislang erst die drei Glykoproteine gp65, gpH und gpB bekannt, wobei die Mehrheit der neutralisierenden Antikörper gegen das Glykoprotein B gerichtet ist (Rasmussen et al., 1991; Meyer et al., 1992; Weber et al., 1993; Liu et al., 1991).

1.8. Adoptive Immuntherapie der HCMV-Infektion

Die HCMV-Infektion bzw. -Erkrankung stellt trotz Einführung neuer antiviraler Therapiestrategien noch immer eine der Haupttodesursachen für Patienten nach allogener SCT dar (Boeckh et al., 1999; Einsele et al., 1995; Ljungman et al., 1992; Einsele et al., 2000). Da immer häufiger von Virustatika-resistenten HCMV-Isolaten nach SCT berichtet wird und die Virustatika-Therapie zudem mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist, wird intensiv nach Alternativen zur Behandlung und Prävention der HCMV-Erkrankung gesucht. Eine solche Alternative stellt die adoptive Immuntherapie dar, bei der HCMV-spezifische Zellen des Spenders auf den Empfänger übertragen werden. Es zeigte sich, dass eine fehlende Rekonstitution der HCMV-spezifischen Immunantwort nach allogener SCT entscheidend für die Entwicklung einer HCMV-Erkrankung ist (Krause et al., 1997; Ljungman et al., 1985; Reusser et al., 1991; Walter et al., 1995) und Transplantatempfängern eine schützende HCMV-spezifische T-Zell Immunität übertragen werden konnte, indem den Patienten *ex vivo* generierte, HCMV-spezifische T-Zellen des Spenders infundiert wurden (Walter et al., 1995; Riddell et al., 1992; Einsele et al., 2002).

Verschiedene Strategien zur Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen sind beschrieben worden. Erfolgreich war die *ex vivo* Induktion HCMV-spezifischer CTLs mittels HCMV-infizierter autologer Fibroblasten als Stimulator-Zellen (Walter et al., 1995) oder EBV-infizierter LCLs als Feeder-Zellen (Szmania et al., 2001), doch für den klinischen Einsatz sind diese Methoden ungeeignet, da die Anwesenheit von CMV- oder EBV-Viren ein nicht zu unterschätzendes Infektionsrisiko darstellt. Die *ex vivo* Induktion HCMV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe dendritischer Zellen, die entweder mit HCMV-Peptiden (Szmania et al., 2001; Kleihauer et al. 2001; Vannucchi et al., 2001), oder mit HCMV-Antigen (Peggs et al., 2001; Einsele et al., 2002) gepulst werden ist ebenfalls erfolgsversprechend, der Nachteil hierbei liegt

jedoch in der arbeitsintensiven und sehr zeitaufwendigen *ex vivo* Expansion über mehrere Wochen.

Wichtig für eine langandauernde Persistenz transferierter CD8⁺ T-Zellen scheint die zusätzliche Anwesenheit von CD4⁺ T-Helferzellen zu sein. Diese senden Wachstumsfaktoren aus, wie z.B. Interleukin 2 oder vermitteln kostimulierende Signale, z.B. über CD40/CD40L, was wiederum die Antigenpräsentation und die kostimulatorische Kapazität von APCs deutlich erhöht (Schoenberger et al., 1998; Sarawar et al., 2001). So konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der CMV-Antwort der infundierten zytotoxischen T-Zellen gerade bei den Patienten auftrat, die keine CMV-spezifische CD4⁺ T-Helfer Antwort zeigten (Walter et al., 1995). Im Gegenteil, das Auftreten einer T-Helfer Antwort nach Infusion ging einher mit einer anhaltenden oder zunehmenden CMV-Antwort der zytotoxischen T-Zellen (Walter et al., 1995; Heslop et al., 1996). Der Transfer von ausschließlich CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen konnte zwar eine Expansion CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen induzieren, aber lediglich bei den Patienten, bei denen Vorläuferzellen vorhanden waren (Einsele et al., 2002).

1.9. Adoptive Immuntherapie Epstein-Barr-Virus assoziierter Erkrankungen

Das Epstein-Barr-Virus (EBV) gehört zu den α -Herpesviren und ist mit schweren malignen Erkrankungen, wie dem nasopharyngealen Karzinom (Raab-Traub, 1992), dem Burkitt-Lymphom (Magrath et al., 1992), der posttransplantär lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) (Thomas et al., 1991) oder dem Hodgkin-Lymphom (Weiss et al., 1989) assoziiert.

Polyklonale EBV-spezifische CTLs wurden in der Vergangenheit erfolgreich zur Prävention und Behandlung der PTLD eingesetzt (Rooney et al., 1998); auch für die Behandlung von 13 Patienten mit EBV-positiver Hodgkin-Erkrankung wurden EBV-spezifische CTLs eingesetzt, allerdings konnte kein Patient mit einer schweren Erkrankung geheilt werden (Gottschalk et al., 2002; Heslop et al., 2000). Eine Erklärung dafür ist, dass die mit den gängigen Methoden generierten EBV-spezifischen CTL-Linien vor allem durch Klone dominiert werden, die sich gegen EBV-Proteine richten, die in den malignen Reed-Sternberg Zellen der EBV-positiven Hodgkin-Erkrankung nicht exprimiert werden (Rickinson et al., 1997). So werden von

den Hodgkin-Reed-Sternberg Zellen nur die EBV-Antigene EBNA1, BARF0, LMP1 und LMP2 exprimiert (Herbst et al., 1991; Oudejans et al., 1995), während die immundominanten Epitope EBNA 3A, B und C, gegen die sich die CTL-Linien vorwiegend richten, in den Tumorzellen nicht exprimiert werden.

Da EBNA1 wegen seiner Glycin/Alanin Repeat-Sequenz nicht über MHC Klasse I präsentiert werden kann (Leen et al., 2001) und die BARF0-Expression für eine CTL-Erkennung zu gering sein dürfte (Kienzle et al., 1998), kommen als mögliche Ziele für adoptiv transferierte CD8+ T-Zellen nur LMP1 und LMP2 in Frage.

Zwar wurden bereits von mehreren Gruppen Protokolle zur Generierung von LMP1- oder LMP2-spezifischen CTLs beschrieben (Gottschalk et al., 2003; Gahn et al., 2001; Su et al., 2001; Ranieri et al., 1999), der für den Gentransfer benötigte Einsatz von Adenoviren stellt aber noch immer ein nicht zu unterschätzendes Risiko dar. Ein weiterer Nachteil ist auch hier die arbeitsintensive und sehr zeitaufwendige *ex vivo* Expansion über mehrere Wochen.

1.10. Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollten die Voraussetzungen für eine effektive, klinisch anwendbare adoptive Immuntherapie mit virus-spezifischen T-Zellen für Patienten nach allogener Stammzelltransplantation geschaffen werden.

Hierbei sollten die Nachteile der bekannten und in 1.8 erwähnten Methoden umgangen werden:

- 1) Innerhalb kurzer Zeit sollten aus einer Vollblutspende (500 ml) ausreichend CMV-spezifische T-Zellen für einen klinischen Einsatz generiert werden.
- 2) Die generierten CMV-spezifischen T-Zelllinien sollten CD4+ und CD8+ T-Zellen enthalten.
- 3) Die Generierung sollte keine infektiösen Materialien (z.B. Viren) erfordern und ausschließlich im autologen System ablaufen (→ Erfüllung von GMP-Kriterien).

Ein weiteres Ziel war die Definition neuer Peptide aus dem HCMV IE1-Antigen und deren Einsatz für die Generierung CMV-spezifischer T-Zellen. Durch den gleichzeitigen Einsatz pp65- und IE1-spezifischer T-Zellen könnte auf diese Weise eine breitere und effektivere T-Zellantwort erzielt werden.

Im letzten Teil wurde schließlich untersucht, ob und inwieweit sich die entwickelte Strategie der Generierung CMV-spezifischer T-Zellen auch zur Generierung anderer virus-spezifischer T-Zellen einsetzen lässt. So stellt das Epstein-Barr-Virus (EBV) und die damit assoziierten malignen Erkrankungen ein vielversprechendes Ziel für eine adoptive Immuntherapie dar. Aus diesem Grund wurde die Generierung EBV-spezifischer T-Zellen versucht.

2. Material

2.1. Plastik- und Glaswaren

Einmal-Sterilfilter	0,2 µm/0,45 µm Minisart	Sartorius, Göttingen
Einfriertubes	Cryo Vials, steril, 2 ml	Greiner, Ammerbuch
FACS-Röhrchen	Rundboden-Tube	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturflaschen	T-25, T-75	Becton Dickinson, Heidelberg
Gewebekulturplatten	6-well-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
	24-well-Platten	Becton Dickinson, Heidelberg
	96-well-Platten	Greiner, Ammerbuch
Pipettenspitzen		Eppendorf, Hamburg
Plastikpipetten	1 ml – 50 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
Szintillator-Platten	LumaPlate™ 96	Packard, Dreieich
Zentrifugenröhrchen	15 ml, 50 ml, 220 ml	Becton Dickinson, Heidelberg

2.2. Reagenzien und Chemikalien

Brefeldin		Sigma, München
CFSE		Molecular Probes, Eugene, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	reinst	Merck, Darmstadt
EDTA	AccuGENE™ 0,5 m	BioWhittaker, Rockland, USA
EU-Solution CR13-100		Pharmacia, Freiburg
FACS-Permeabilizing solution		Becton Dickinson, Heidelberg
Ficoll/Paque		Biochrome, Berlin
Formalin solution	10%	Sigma, München
Gentamicin	Refobacin 40 mg/ml	Merck, Darmstadt
Ionomycin		Sigma, München
NaN ₃		Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin		Gibco BRL, Karlsruhe
PMA		Sigma, München
PBS		Gibco BRL, Karlsruhe
[³ H]Thymidin		Amersham, Braunschweig

Trypanblau	0,4%	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypsin/EDTA		Gibco BRL, Karlsruhe

2.3. Seren

FCS		Sigma, München
BSA		Sigma, München
Human-Albumin	Kabi 20%	Pharmacia, Erlangen

2.4. Kulturmedien

RPMI 1640 mit Glutamax I		Gibco BRL, Karlsruhe
IMDM		Gibco BRL, Karlsruhe

2.5. Einfriermedium

RPMI 1640 mit Glutamax I
 10% DMSO (Endkonzentration)
 50% FCS (Endkonzentration)

2.6. Zytokine

Rekombinantes humanes IL-1 β		R&D Systems, Wiesbaden
Humanes Interleukin-2	Proleukin ^R (Aldesleukin 18x10 ⁶ I.E./ml)	Chiron, Ratingen
Humanes Interleukin-4		R&D Systems, Wiesbaden
Humanes Interleukin-6		R&D Systems, Wiesbaden
TNF- α		Boehringer Ingelheim, Wien, Österreich
GM-CSF	Leukomax ^R	Novartis, Basel, Schweiz
PGE2		Cayman Chemicals, Ann Arbor, USA

2.7. Antikörper

CD28		Becton Dickonson, Heidelberg
CD49d		Immunotech, Marseille, Frankreich
Anti-CD3	Orthoclone™ OKT3	Janssen-Cilag, Neuss

2.8. FACS-Antikörper

Anti-human IgG1	FITC, PE, PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD3	PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD4	FITC, PE, PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD8	FITC, PE, PerCP	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human IFN- γ	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human HLA-A,B,C	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD14	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD1a	PE	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD40	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD80	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD83	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human CD86	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-human HLA-DR	FITC	Becton Dickinson, Heidelberg

2.9. Produkte für die magnetische Zellseparation

CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IFN- γ Secretion Assay Detection Kit (PE)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IFN- γ Secretion Assay Cell Enrichment and Detection Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MACS MultiStand	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
MidiMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

LS columns	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CliniMACS Instrument	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CliniMACS Tubing Set	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
CliniMACS PBS/EDTA Buffer	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Pre-System Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Luer/Spike Interconnector	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Transfer Bag 150 ml	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IFN- γ Catch reagent	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
IFN- γ MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.10. Peptide

MHC-Klasse I Peptide

HCMV-Peptid aus pp65	AS 495-503: NLVPMVATV	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus pp150	AS 945-955: TTVYPPSSTAK	HLA-A*0301
HCMV-Peptid aus pp65	AS 16-24: GPISGHVLK	HLA-A*1101
HCMV-Peptid aus pp65	AS 417-426: TPRVTGGGAM	HLA-B*0702
HCMV-Peptid aus pp65	AS 265-275: RIPHERNGVTVL	HLA-B*0702
HCMV-Peptid aus IE1	AS 301-317: RVLCCYVL	HLA-B*0702
HCMV-Peptid aus pp65	AS 512-521: EFFWDANDIY	HLA-B*44XX
HCMV-Peptid aus IE1	AS 316-324: VLEETSVML	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus IE1	AS 81-89: VLAELVKQI	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus IE1	AS 297-305: TMYGGISLL	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus IE1	AS 256-264: ILDEERDKV	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus IE1	AS 49-58: SLGDPLFPEL	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus IE1	AS 304-312: LLSEFCRVL	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus IE1	AS 329-338: LITKPEVISV	HLA-A*0201
HCMV-Peptid aus IE1	AS 354-363: YILGADPLRV	HLA-A*0201
EBV-Peptid aus LMP1	AS 125-133: YLLEMLWRL	HLA-A*0201
EBV-Peptid aus LMP1	AS 159 -167: YLQQNWWTL	HLA-A*0201
EBV-Peptid aus LMP2	AS 426-434: CLGGLLTMV	HLA-A*0201
EBV-Peptid aus BMLF1	AS 259-267: GLCTLVAML	HLA-A*0201

Die Peptide wurden in der AG von PD Dr. Stefan Stevanovic aus dem Institut für Zellbiologie, Abteilung Immunologie der Universität Tübingen synthetisiert. Sie wurden mittels Fmoc-Festphasensynthese in einem Peptidsynthesizier (Modell 432A, Applied Biosystems, Weiterstadt) synthetisiert und durch eine HPLC (Varian star, Zinsser, München), sowie durch Massenspektrometrie (G2025A, Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) analysiert.

2.11. Virus-Lysat, Virus-Protein

Cytomegalovirus Ag (AD 169) Lysat

Biodesign, Saco, USA

Viral Antigens, Memphis, USA

Rekombinantes HCMV/pp65-Potein

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

2.12. Tetramere

MHC-Peptid Tetramer	HLA-A*0201; NLVPMVATV, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-A*0201; VLEETSVML, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-B*0701; TPRVTGGGAM, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-B*0701; RIPHERNGVTVL, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-B*0701; RVLCCYVL, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-A*0201; GLCTLVAML, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-A*0201; CLGGLLTMV, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-A*0201; YLQQNWWTL, PE	Prolimmune Ltd., GB
MHC-Peptid Tetramer	HLA-A*0201; YLLEMLWRL, PE	Prolimmune Ltd., GB

2.13. Hodgkin-Zelllinie HD-MYZ

Die HLA-A2 exprimierende Hodgkin-Zelllinie HD-MYZ wurde von Prof. Hans Knecht, Kantonsspital Basel, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

2.14. TAP-mutante Zelllinie

Die T2-Zelllinie stellt eine Fusion einer lymphoblastoiden B-Zelllinie, die eine Deletion in den MHC Klasse II aufweist, und der T-Zelllinie CEM (T1) dar. Die Syntheserate der MHC-I-Moleküle ist bei der T2-Zelllinie normal. Aufgrund der TAP-Mutation in TAP1 und TAP2 ist die Peptidbeladung der MHC I im endoplasmatischen Retikulum allerdings unzureichend. Die reduzierte Zelloberflächenexpression von HLA-A2-Molekülen resultiert aus der Instabilität der nicht-peptidbeladenen MHC Klasse I-Molekülen. Die Expression der MHC Klasse I-Moleküle auf der Zelloberfläche wird durch Inkubation der T2-Zelllinie mit HLA-A2-bindendem Peptid erhöht, wobei das Peptid die unbeladenen MHC Klasse I-Moleküle stabilisiert und so eine hohe Dichte an MHC-Peptid-Komplexen entsteht.

2.15. Virusstamm

In der vorliegenden Arbeit wurde der humane CMV-Laborstamm AD169 eingesetzt, der im Institut für Virologie der Universität Tübingen auf humanen Hautfibroblasten angezüchtet und von Dr. Christian Sinzger zur Verfügung gestellt wurde.

2.16. HLA-typisierte humane Hautfibroblasten

In der vorliegenden Arbeit wurden im Zytotoxizitätstest HLA-A2-exprimierende und HLA-A2-negative humane Vorhautfibroblasten eingesetzt. Diese wurden ebenfalls von Dr. Christian Sinzger, Institut für Virologie der Universität Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.17. HLA-typisierte Blutspender

Die in der Arbeit verwendeten freiwilligen Blutspender wurden in der Blutbank typisiert.

3. Methoden

3.1. Allgemeine Zellkulturmethoden

3.1.1. Isolierung der peripheren blutmononukleären Zellen (PBMCs)

Die PBMCs wurden aus Buffy coats oder heparinisiertem Vollblut von Patienten oder gesunden Spendern isoliert, die HLA-typisiert und HCMV-getestet waren. Buffy coat oder Vollblut wurden 1:1 mit PBS verdünnt und je 30 ml wurden auf 15 ml Ficoll, die in 50 ml Falconröhrchen vorgelegt waren, geschichtet (Boyum, 1964). Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 2000 rpm, wurde der Interphasenring vorsichtig abgenommen und mehrmals gewaschen.

3.1.2. Bestimmung der Zellzahl

Die Anzahl der Zellen wurde unter dem Mikroskop mit Hilfe der Neubauerzählkammer bestimmt. Ein Anteil der Zellsuspension wurde mit Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Die unter dem Mikroskop gezählte Zellzahl konnte dann auf das Gesamtvolumen der Zellsuspension umgerechnet werden.

3.1.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

PBMCs, DCs, Fibroblasten und T-Zelllinien wurden auf die gleiche Art und Weise eingefroren und aufgetaut. Die Zellen wurden gewaschen, gezählt und auf 5×10^6 bis 5×10^7 pro ml Einfriermedium (RPMI 1640 mit 50% FCS und 10% DMSO) und Einfrieröhrchen eingestellt. Die Kryoröhrchen mit den Zellen wurden bei -80°C eingefroren und nach wenigen Tagen in flüssigen Stickstoff für die Langzeitaufbewahrung überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C, bis der Eiskern sich von der Wand des Einfrierröhrchens gelöst hatte. Die Zellen wurden in RPMI/10% FCS aufgenommen und mehrmals gewaschen.

3.1.4. Bestrahlen der Zellen

T-Zellen und DCs wurden mit 30 Gy (3500 rad) bestrahlt, T2-Zellen wurden mit 60 Gy (7000 rad) bestrahlt.

3.1.5. Herstellung des humanen PBMC-Pools

Aus 5-10 HCMV-seronegativen und -seropositiven Buffy coats mit unterschiedlichen HLA-Typen wurden die PBMCs nach der Methode 3.1.1 isoliert, vereinigt und mit 30 Gy (3500 rad) bestrahlt. Die Zellen wurden anschließend als Feeder-Zellen in der Zellkultur eingesetzt oder nach der Methode 3.1.3 eingefroren.

3.1.6. Gewinnung von Serum

Frisches Vollblut (ohne Heparin) wurde in 50 ml Falconröhrchen überführt, 3-4 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend bei 2000 rpm 30 min zentrifugiert. Dann wurde das Serum abpipettiert, 30 min bei 56°C im Wasserbad hitzeinaktiviert und schließlich sterilfiltriert. Das Serum wurde entweder sofort zur Herstellung von Kulturmedium verwendet oder bei -20°C eingefroren. Zur Herstellung von „Humanserum“ wurden die Seren von mehreren Spendern gepoolt.

3.1.7. Kultivierung der T2-Zelllinie und der Hodgkin-Zelllinie HD-MYZ

Die T2-Zellen wurden in T-75 Kulturflaschen dicht wachsend in RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FCS kultiviert, das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt.

3.1.8. Kultivierung der humanen Vorhautfibroblasten

Die HLA-typisierten humanen Vorhautfibroblasten wurden in 250 ml Kulturflaschen in IMDM mit 10% FCS und 2% Penicillin/Streptomycin (komplettes IMDM-Kulturmedium) kultiviert. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt und die Fibroblasten dicht wachsend expandiert.

3.1.9. Trypsinierung der humanen Vorhautfibroblasten

Die dicht gewachsenen Fibroblasten wurden mit Trypsin/EDTA vom Zellkulturflaschenboden abgelöst, indem 2 ml Trypsin/EDTA auf den Zellrasen pipettiert und 10 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Leichtes Klopfen an den Flaschenrand gewährleistete das endgültige Lösen der Fibroblasten vom Kulturschalenboden. Nach einer Kontrolle unter dem Mikroskop wurden die Fibroblasten in ein 50 ml Falconröhrchen überführt und zweimal gewaschen.

3.1.10. Generierung der dendritischen Zellen (DCs)

Dendritische Zellen (DCs) wurden aus Blut-Monozyten generiert. Pro well einer 6-well Platte wurden 1×10^7 PBMCs in 3 ml Kulturmedium (RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem FCS) eingesetzt und für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die nicht-adhärenenten Zellen abgenommen, die Platte(n) einmal mit RPMI gespült und die adhärenente Zellfraktion in Kulturmedium einschließlich 800 U/ml GM-CSF und 1000 U/ml IL-4 aufgenommen. Diese Zytokine wurden erneut an Tag 3 in 1 ml frischem Medium pro well zugegeben. Für die Reifung der DCs wurden an Tag 6 zusätzlich zu GM-CSF und IL-4 noch IL-1 β (5 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), TNF- α (25 ng/ml) und PGE2 (1 ng/ml) zugesetzt. An Tag 7 wurden die reifen DCs geerntet, einmal gewaschen und anschließend gezählt.

3.1.11. Antigen-/Peptidbeladung der dendritischen Zellen (DCs)

Für die Antigenbeladung wurden zu den unreifen DCs an Tag 6 zusätzlich zu den Zytokinen 10 µg/ml CMV-Antigen gegeben. Für die Peptid- bzw. Proteinbeladung erfolgte die Zugabe (10 µg/ml Peptid bzw. 2.5 µg/ml Protein) für die letzten 4 Stunden der DC-Reifung.

3.1.12. Isolierung von CD4+/CD8+ T-Zellen mittels MACS MicroBeads

Um CD4+ T-Zellen oder CD8+ T-Zellen zu isolieren, wurden MicroBead-gekoppelte Antikörper eingesetzt (Brosterhus et al., 1999). 1×10^7 Zellen wurden in 80 µl kaltem Puffer (PBS mit 0.5% BSA und 2 mM EDTA) aufgenommen und mit 20 µl MACS CD4- bzw. CD8-MicroBeads versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen gewaschen, in 500 µl Puffer aufgenommen und auf die vorgespülte und in den Magneten eingespannte Separations-Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule zweimal mit Puffer gespült, aus dem Magneten genommen und die Positiv-Fraktion eluiert. Die isolierten Zellen wurden einmal gewaschen und schließlich gezählt.

3.1.13. Peptidbindungstest

Jedes HLA-A*0201-Motivpeptid aus HCMV/IE1 wurde auf die Bindungsfähigkeit an das MHC Klasse I-Molekül getestet. Die Peptide wurden auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt und auf 1 mM und 0.1 mM verdünnt. Die T2-Zellen wurden auf 3×10^5 Zellen pro Well einer 96er Mikrotitrierplatte eingestellt und in RPMI 1640 aufgenommen. Nun wurden 10 µl der Peptidverdünnung zupipettiert und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Ansatz wurde bei 1300 rpm 5 min abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und einmal mit 200 µl PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 200 µl PBS/1% FCS aufgenommen und 10 µl des PE-markierten anti-HLA-A,B,C-Antikörper pro Well zupipettiert. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert, bei 1300 rpm 5 min abzentrifugiert, einmal mit 200 µl PBS und einmal mit 200 µl 4%iger Formalinlösung gewaschen. Dann wurden die Zellen

mit 150 µl 4%iger Formalinlösung in FACS-Röhrchen überführt und im Durchflußzytometer analysiert. Als Kontrolle wurde die T2-Zelllinie ohne Peptid als Nullwert eingesetzt. Auf diese Art und Weise wurden alle in der Arbeit verwendeten IE1-Peptide auf die Bindungsfähigkeit hinsichtlich der MHC Klasse I-Moleküle getestet. Der Fluoreszenzwert wurde aus dem Verhältnis „mean fluorescence intensity with peptide“ (MFI mit Peptid) zu „mean fluorescence intensity without peptide“ (MFI ohne Peptid)

3.2. Generierung der virus-spezifischen T-Zellen

3.2.1. Isolierung virus-spezifischen T-Zellen mittels IFN- γ Secretion-Assay

Zur Isolierung der virus-spezifischen T-Zellen wurden für den IFN- γ Secretion-Assay 1×10^8 - 4×10^8 PBMCs von HLA-typisierten Donoren mit bekanntem HCMV-Serostatus eingesetzt (Manz et al., 1995). Als Medium wurde RPMI 1640 mit 10% hitzeinaktiviertem Serum verwendet, wobei verschiedene Seren zum Einsatz kamen. So wurde in einigen Versuchen FCS verwendet, in anderen Versuchen autologes Serum des Spenders oder von mehreren Spendern gepooltes „Humanserum“ (siehe 3.1.6). Je 1×10^7 PBMCs wurden in 1 ml Medium aufgenommen und für 16 h bei 37°C und 5% CO₂ mit HLA-restringierten Peptiden (1 µg/ml) und/oder Virus-Lysat (10 µg/ml) bzw. Virus-Protein (2.5 µg/ml) stimuliert. Die Zellen wurden mit Puffer (PBS mit 0.5% BSA und 2 mM EDTA) gewaschen, mit IFN- γ Catch Reagent, einem bispezifischen Antikörper für CD45 und IFN- γ , gelabelt und für die Sekretionsphase in Medium (1×10^6 – 2×10^6 Zellen pro ml) 45 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Während dieser Sekretionsphase wurden die Zellen alle 5 min aufgeschüttelt, um eine gleichmäßige und dauerhafte Verteilung zu gewährleisten. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und entweder gleich mit anti-IFN- γ MicroBeads gelabelt (klinisches Protokoll) oder zuerst mit PE-markierten anti-IFN- γ Antikörpern und in einem nächsten Schritt mit anti-PE MicroBeads (Labor-Protokoll). Die magnetische Anreicherung der IFN- γ sezernierenden Zellen erfolgte nach dem Labor-Protokoll analog zu 3.1.12: Die Zellen wurden in Puffer aufgenommen und auf die vorgespülte und in den Magneten eingespannte Separations-Säule gegeben.

Anschließend wurde die Säule zweimal mit Puffer gespült, aus dem Magneten genommen und die Positiv-Fraktion eluiert. Die isolierten Zellen wurden einmal gewaschen.

Das klinische Protokoll sah eine Isolierung der IFN- γ sezernierenden Zellen mit dem CliniMACS vor. Hierzu wurden die Zellen in 30 ml Puffer aufgenommen und mit einer Spritze in den Transfer-Beutel überführt. Das Tubing-Set wurde nach Anleitung in den CliniMACS eingelegt und der Beutel mit den Zellen sowie ein Beutel mit CliniMACS-Buffer angehängt. Dann wurde das Enrichment-Programm 3.1 gestartet, bei dem die Zellen mehrmals auf die Säule aufgetragen und gewaschen wurden. Die Zellen der Positiv-Fraktion und der Negativ-Fraktion wurden einmal gewaschen und anschließend gezählt.

3.2.2. Kultivierung der virus-spezifischen T-Zellen

Die Positiv-Fraktion aus dem IFN- γ Secretion Assay wurde im entsprechenden Kulturmedium expandiert (3.2.1). Pro well einer 24-well Kulturplatte wurden 5×10^5 Zellen in 2 ml Medium mit 50 IU/ml IL-2 eingesetzt, als Feeder-Zellen wurden entweder 5×10^6 allogene, bestrahlte PBMCs (3.1.5) oder 2.5×10^7 autologe, bestrahlte PBMCs pro well zugegeben. Die Expansion erfolgte über mehrere Tage bis Wochen, wobei alle 2-3 Tage die Hälfte des Mediums gegen frisches Medium (einschließlich IL-2) ausgetauscht wurde. Das Wachstum der Zellen wurde unter dem Lichtmikroskop beobachtet und die Zellen bei hoher Zelldichte im Verhältnis 1:2 oder 1:3 gesplittet.

3.2.3. Expansion von virus-spezifischen T-Zellen mittels „Rapid expansion Protocol“ (REP)

Die Expansion virus-spezifischer T-Zellen erfolgte mit kleinen Abweichungen nach dem Protokoll von Riddell und Greenberg, 1990. Dazu wurden in einer T-25 Kulturflasche 1×10^5 T-Zellen mit 5×10^6 bestrahlten T2-Zellen und 2.5×10^7 bestrahlten allogenen PBMCs in 25 ml Medium (RPMI 1640 mit 10% humanem Serum) aufgenommen und mit 30 ng/ml anti-CD3 Antikörper (OKT-3) versetzt. Die Zellen

wurden bei 37°C und 5% CO₂ expandiert, wobei an Tag 1, Tag 7 und an Tag 10 jeweils 50 U/ml IL-2 zugegeben wurden und die Zellen an Tag 4 einmal gewaschen und in frischem Medium mit 50 U/ml IL-2 aufgenommen wurden. An Tag 11-14 wurden die Zellen schließlich geerntet und gezählt. Bei starker Expansion der Zellen mussten diese zwischendurch in eine größere Kulturflasche (T-75) mit 60 ml Medium überführt werden.

3.3. Charakterisierung der Zellen

3.3.1. Oberflächen-FACS-Analyse

Pro Ansatz wurden 5×10^5 - 1×10^6 Zellen in 200 µl FACS-Puffer (PBS mit 10% FCS) aufgenommen und je 5 µl fluoreszenzmarkierter Antikörper (FITC: Fluoroisothiocyanat, PE: Phycoerythrin, PerCP: Peridinin-Chlorophyllprotein) zugegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen einmal mit FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen und im FACSCalibur-Durchflußzytometer analysiert.

3.3.2. Tetramer-FACS-Analyse

Pro Ansatz wurden 5×10^5 - 1×10^6 Zellen in 500 µl 37°C warmem Puffer (PBS mit 10% FCS) aufgenommen, mit 1 µl des fluoreszenzmarkierten MHC-Peptid Tetramer-Komplexes versetzt und 15 min bei 37°C bei 5% inkubiert. Die Zellen wurden anschließend gewaschen, in 200 µl kaltem Puffer aufgenommen und mit 5 µl fluoreszenzmarkierten Oberflächen-Antikörpern versetzt. Nach 15 minütiger Inkubation bei 4°C wurden die Zellen ein weiteres mal mit Puffer gewaschen, in 100 µl Puffer aufgenommen und im FACSCalibur-Durchflußzytometer analysiert.

3.3.3. IFN- γ -Bestimmung mittels intrazellulärer FACS-Analyse

1×10^6 PBMCs wurden in 500 μ l Medium (RPMI 1640 mit 10% FCS) aufgenommen und mit 10 μ g/ml Peptid und/oder 10 μ g/ml Antigen stimuliert. CTLs wurden mit peptid- bzw. antigenbeladenen DCs (3.1.11) im Verhältnis 5:1 stimuliert. Für die 6-stündige Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurden je 0,5 μ g/ml der kostimulierenden Antikörper CD28 und CD49d (Waldrop et al., 1998), und für die letzten 5 Stunden 10 μ g/ml Brefeldin A zugegeben. Als Negativ-Kontrolle wurde ein HLA-A*0201-bindendes HIV-Peptid eingesetzt, für die Positiv-Kontrolle wurden die Zellen mit 0,5 μ g/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin stimuliert. Nach der Inkubation wurden die Zellen einmal mit Puffer (PBS / 0.5% BSA / 0.1% NaN₃) gewaschen, in Permeabilisations-Lösung aufgenommen (2×10^6 Zellen je ml) und 12 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut gewaschen und 30 min mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IFN- γ und Oberflächenantigene gelabelt. Danach wurden die Zellen nochmals gewaschen, in 100 μ l Puffer aufgenommen und im FACSCalibur-Durchflußzytometer analysiert.

3.3.4. IFN- γ -Bestimmung mittels IFN- γ Secretion Assay Detection Kit

Je 1×10^6 Zellen wurden in 200 μ l Medium (RPMI 1640 mit 10% FCS) aufgenommen und bei 37°C und 5% CO₂ für 16 Stunden mit 1 μ g Peptid und/oder 10 μ g CMV-Lysat inkubiert. Dann wurden die Zellen einmal mit kaltem Puffer (PBS mit 0.5% BSA und 2 mM EDTA) gewaschen, in 90 μ l kaltem Medium resuspendiert und mit 10 μ l IFN- γ Catch Reagent, einem bispezifischen Antikörper für CD45 und IFN- γ , für 5 min auf Eis gelabelt. Für die folgende Sekretionsphase wurden die Zellen in warmem Medium (1×10^6 - 2×10^6 Zellen pro ml) aufgenommen und 45 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, in 90 μ l kaltem Puffer resuspendiert und mit 10 μ l PE-markiertem anti-IFN- γ Antikörper, sowie 5 μ l Oberflächenantikörpern für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals gewaschen, in 100 μ l Puffer aufgenommen und im FACSCalibur-Durchflußzytometer analysiert.

3.3.5. Proliferationsassay

Die Fähigkeit der PBMCs und der generierten T-Zellen, nach CMV-Antigen Stimulation zu proliferieren, wurde mittels CFSE-labeling untersucht. 1×10^7 Zellen (PBMCs oder CTLs) wurden mit $0.6125 \mu\text{M}$ Carboxyfluorescein-diacetatsuccinimidylester (CFDASE) für 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Ungebundenes CFDASE oder die deacetylierte Form, CFSE, wurde durch Zugabe von RPMI mit 15% FCS und 20 minütige Inkubation beseitigt. Anschließend wurden die Zellen zweimal gewaschen und 1×10^6 pro ml in einer 6-well Platte (5 ml/well) mit 2×10^5 autologen, CMV-lysat beladenen DCs stimuliert. Nach 7 Tagen Kultur wurden die Zellen gezählt, mit Fluorochrom-konjugierten anti-CD4- oder anti-CD8 Antikörpern gelabelt und im FACSCalibur-Durchflußzytometer analysiert.

3.3.6. Zytotoxizitätsassay

Der Zytotoxizitätsassay wurde entweder mit Peptid-beladenen T2-Zellen bzw. HD-MYZ-Zellen oder mit infizierten Fibroblasten durchgeführt. Dabei wurde der Chrom-release assay oder der Europium-release assay angewendet.

3.3.6.1. Peptidbeladung der T2-Zellen und HD-MYZ-Zellen

5×10^5 Zielzellen wurden in 200 μl Medium (RPMI mit 10% FCS) aufgenommen und mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Peptid gepulst.

3.3.6.2. Infektion der Fibroblasten mit dem Laborstamm AD169

Die Infektion der Fibroblasten wurde von Dr. Christian Sinzger, Institut für Virologie, Tübingen durchgeführt, wobei die Zielzellen für 2 Stunden mit dem CMV-Laborstamm AD169 in einer MOI (multiplicity of infection) von 5 inkubiert wurden.

3.3.6.3. Zytotoxizitätstest

A) Chrom-release assay

5×10^5 Target-Zellen wurden in 200 μl Medium (RPMI mit 10% FCS) aufgenommen und mit 20 μl CrO_4 für 1 h bei 37°C gelabelt. Nach zweimaligem Waschen wurden 5000 Zellen in 100 μl Medium pro well einer 96-well Platte pipettiert und Effektor-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen zugegeben (alle Ansätze in Triplikaten) mit einem Endvolumen von 200 μl . Zur Bestimmung des Spontan-releases wurden die Target-Zellen allein eingesetzt, für den Maximal-release wurden zu den Target-Zellen 100 μl Triton X gegeben. Die Zellen wurden 4 h bei 37°C inkubiert, anschließend wurden je well 30 μl Überstand abgenommen, auf eine Szintillator-Platte pipettiert und nach Trocknung über Nacht in einem Liquid scintillation counter analysiert. Die Berechnung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte nach der Formel

$$\% \text{ spezifische Lyse} = \frac{[(\text{Experiment-release} - \text{Spontan-release}) / (\text{Maximal-release} - \text{Spontan-release})] \times 100}$$

B) Europium-release assay

5×10^6 - 6×10^6 Target-Zellen wurden in 800 μl Puffer (PBS mit 50mM HEPES, 93 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl, 10 mM DTPA (Diethylene-triamine-pentaacetic acid) und 2 mM Europium-III-acetat) aufgenommen und für 6 min auf Eis inkubiert. Nach Permeation der Zellen mittels Elektroporation (250 V, 0.5 μF , 200 Ω) wurden sie erneut für 10 min auf Eis inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden 5000 Zellen in 100 μl Medium pro well einer 96-well Platte pipettiert und Effektor-Zellen in unterschiedlichen Verhältnissen zugegeben (alle Ansätze in Triplikaten) mit einem Endvolumen von 200 μl . Zur Bestimmung des Spontan-releases wurden die Target-Zellen allein eingesetzt, für den Maximal-release wurden zu den Target-Zellen 100 μl Triton X gegeben. Die Zellen wurden 4 h bei 37°C inkubiert, anschließend wurde je well 20 μl Überstand abgenommen und die Europium-Freisetzung nach Zugabe von 180 μl EU-solution gemessen. Die Berechnung der spezifischen Zytotoxizität erfolgte analog dem Chrom-release assay.

3.3.7. Gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte culture, MLC)

Als Stimulator-Zellen wurden allogene, reife DCs (3.1.10) verwendet, die bestrahlt (3500 rad) und in Triplikaten in einer 96-well Rundbodenplatte vorgelegt wurden (pro well 10 000 DCs in 100 µl RPMI 1640 mit 10% FCS). Dazu wurden je well 100 000 CD4-angereicherte (3.1.11) Effektorzellen (PBMCs und generierte T-Zellen) in 100 µl Medium zupipettiert. Als Kontrolle wurden die Effektorzellen allein eingesetzt.

Die Zellen wurden 5 Tage im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert, wobei für die letzten 18 Stunden 1 µCi [³H]-Thymidin pro well zugegeben wurde. Der Inhalt der wells wurde mittels eines Zellerntegerätes auf Glasfaserfilter gebracht, worauf diese ca. 3 Stunden an der Luft getrocknet wurden. Anschließend wurden die Filter eingeschweißt, mit Szintillationsflüssigkeit getränkt und in einem Szintillationszählgerät vermessen.

4. Ergebnisse

4.1. Generierung von HCMV/pp65 Peptid-spezifischen T-Zelllinien

Um die Anwendbarkeit des IFN- γ Secretion Assays für die Generierung von virusspezifischen T-Zellen zu testen, wurde in einem ersten Schritt versucht, HCMV/pp65 Peptid-spezifische CD8+ T-Zelllinien zu generieren.

Dazu wurden 1×10^8 - 2×10^8 PBMCs aus Buffy coats von 10 gesunden, HLA-A*0201 CMV-seropositiven Blutspender isoliert und mit dem HLA-A*0201-Peptid NLVPMVATV stimuliert. Die Anreicherung der IFN- γ sezernierenden Zellen erfolgte mit dem IFN- γ Secretion Assay nach dem Labor-Protokoll, die Expansion der Zellen über mehrere Tage bis Wochen mit allogenen, gepoolten und bestrahlten PBMCs als Feeder-Zellen in RPMI/10% FCS mit 50 IU/ml IL-2. Die Frequenz der Peptid-spezifischen CD8+ Lymphozyten wurde mittels Tetramer-FACS-Analyse sowohl in den PBMCs als auch in den angereicherten und expandierten Zellen bestimmt. Die Analyse der Funktionalität der generierten T-Zellen erfolgte mittels IFN- γ Nachweis (nach Peptidstimulation) und Zytotoxizitätsassay.

4.1.1. Expansion der angereicherten Lymphozytenfraktion

Die mittels IFN- γ Secretion Assay angereicherten Zellen wurden über mehrere Tage bis Wochen expandiert und dabei zu verschiedenen Zeitpunkten gezählt (Abb. 4.1.1. und Abb. 4.1.2.). Zur Einschätzung der Expansionsstärke wurden die Zeitpunkte (Tag nach Isolation) der T-Zelllinien verglichen, an denen mindestens 1×10^7 Zellen gezählt werden konnten. Im Schnitt wurde diese Zellzahl nach einer Expansionszeit von 17 Tagen erreicht (Tab. 4.1.1.).

Donor	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	SA7	SA8	SA9	SA10	Ø
Tag nach Isolation	22	11	19	18	10	16	17	28	23	8	17

Tab. 4.1.1. Tag der Expansion nach Isolation, an dem mindestens 1×10^7 Zellen gezählt wurden.

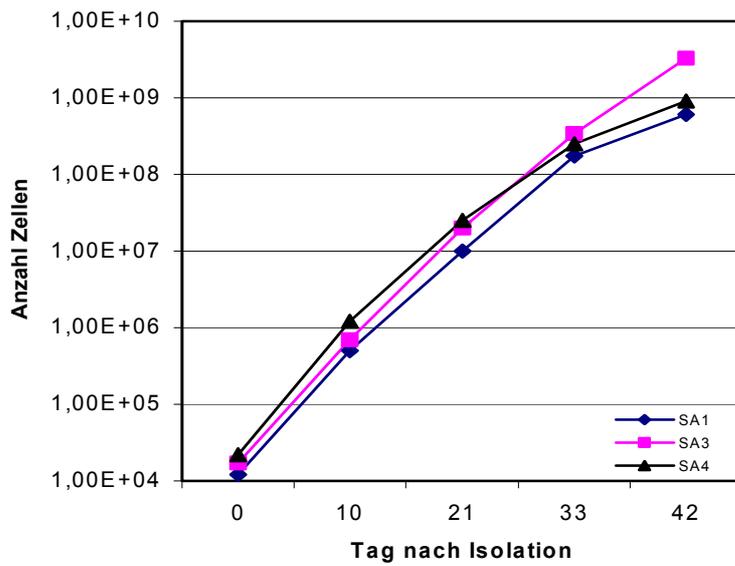


Abb. 4.1.1. Expansion der angereicherten Zellen von drei Donoren (SA1, SA3, SA4) über 42 Tage. Die Zellen wurden an den Tagen 10, 21, 33 und 42 gezählt.

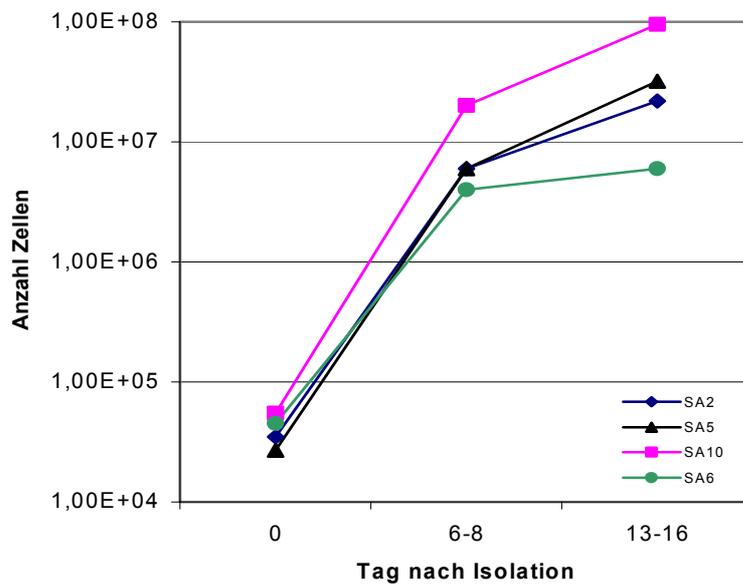


Abb. 4.1.2. Expansion der angereicherten Zellen von vier Donoren (SA2, SA5, SA6, SA10) über 13-16 Tage. Die Zellen wurden außerdem an Tag 6-8 gezählt.

4.1.2. Tetramer-FACS-Analyse der PBMCs und der generierten T-Zellen

Die Frequenz CMV-Peptid-spezifischer T-Zellen wurde mittels Tetramer-FACS-Analyse sowohl in den PBMCs als auch in den isolierten Zellen nach 14 bis 42 tägiger Expansion bestimmt. Die Analyse der PBMCs der 10 HLA-A*0201 positiven Donoren zeigte, dass im Durchschnitt 0.76% (<0.1% - 3.68%) der CD3+/CD8+ Lymphozyten positiv für das HLA-A*0201/pp65₄₉₅₋₅₀₃ Tetramer waren. Nach Anreicherung und 13 - 42 Tagen Expansion waren 88.2% (66.2% - 99.3%) der CD3+/CD8+ Lymphozyten positiv für das HLA-A*0201/pp65₄₉₅₋₅₀₃ Tetramer (Abb. 4.1.3.). Die absolute Anzahl Peptid-spezifischer T-Zellen betrug damit im Schnitt 14.5×10^7 (2.0×10^7 - 61×10^7) (Tab. 4.1.2.).

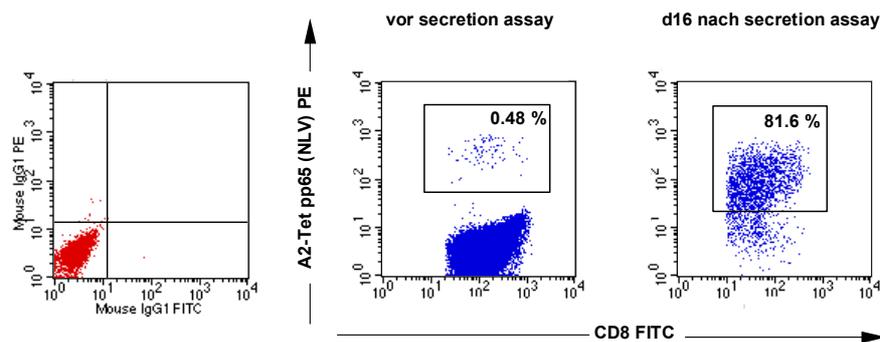


Abb. 4.1.3. Tetramer-FACS der PBMCs und der nach Anreicherung über 16 Tage expandierten Zellen eines Donors (SA2).

Charakterisierung vor Anreicherung		Charakterisierung nach Anreicherung und Expansion		
	Tetramer-FACS: NLVPMVATV spezifische CTLs in CD3+/CD8+	Tag nach Isolation	Tetramer-FACS: NLVPMVATV spezifische CTLs in CD3+/CD8+	Anzahl Peptid-spezifischer CTLs*
SA1	≤0.1%	42	98.3%	61.0 x 10 ⁷
SA2	0.48%	16	81.6%	2.2 x 10 ⁷
SA3	0.22%	21	84.9%	2.0 x 10 ⁷
SA4	0.25%	33	99.3%	25.0 x 10 ⁷
SA5	1.49%	14	95.8%	3.2 x 10 ⁷
SA6	3.68%	20	66.2%	3.2 x 10 ⁷
SA7	0.36%	29	87.9%	34.0 x 10 ⁷
SA8	0.49%	28	91.2%	2.0 x 10 ⁷
SA9	≤0.1%	27	81.7%	3.0 x 10 ⁷
SA10	0.64%	16	94.9%	9.5 x 10 ⁷
Ø	0.76%		88.2%	14,5 x 10⁷

* Berechnung mittels Zellzahl an Tag nach Isolation und Prozentsatz an Peptid-spezifischen CTLs

Tab. 4.1.2. Charakterisierung der Zellen mittels Tetramer-FACS vor Anreicherung sowie nach Anreicherung und Expansion über 14 - 42 Tage.

4.1.3. IFN- γ Sekretion der generierten T-Zellen nach Peptid-Stimulation

5 der generierten Zelllinien wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, nach Stimulation mit dem Peptid NLVPMVATV IFN- γ zu sezernieren. Diese Analyse erfolgte entweder mit dem intrazellulären IFN- γ assay (3.3.3.) oder dem IFN- γ Secretion Assay Detection Kit (3.3.4.). Die IFN- γ Produktion der T-Zelllinien nach Anreicherung und Expansion über 14 - 42 Tage lag dabei im Schnitt bei 88.7% (64.4% - 99.5 %, n=5).

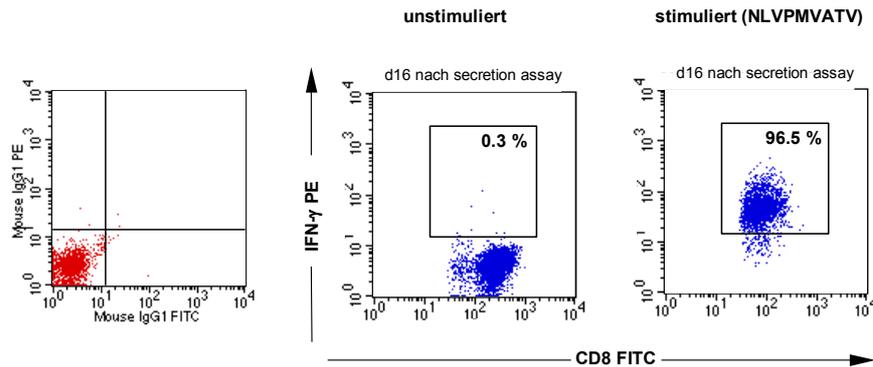


Abb. 4.1.4. IFN- γ Nachweis der über 16 Tage expandierten Zellen eines Donors (SA2).

4.1.4. Zytotoxizität der generierten T-Zellen

Zuletzt wurde untersucht, ob die generierten T-Zellen Peptid-gepulste T2-Zellen und CMV-infizierte Fibroblasten lysieren. Jeweils 5 der generierten T-Zelllinien wurden gegen die beiden Targets getestet, wobei im Schnitt 57.5% (22.2% - 80.7%; E:T 40:1) der mit dem pp65₄₉₅₋₅₀₃ beladenen T2-Zellen (Europium-release assay), sowie 49.1% (35.2% - 66.3%; E:T 33:1 (n=2) bzw. 100:1 (n=3)) der CMV-infizierten HLA-A*0201 Fibroblasten (Chrom-release assay) lysiert wurden.

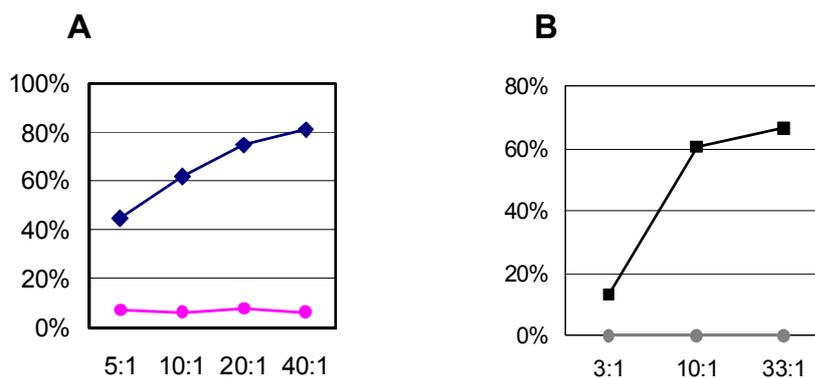


Abb. 4.1.5. Zytotoxizitäts assay der generierten Zellen gegen Peptid-gepulste T2-Zellen (**A**; -◆- (SA1)) und CMV-infizierte HLA-A*0201 Fibroblasten (**B**; -■- (SA6)). Als Kontrolle dienten T2-Zellen, die mit einem irrelevanten IMP-Peptid (GILGFVFTL) beladen wurden (**A**: -●-) bzw. nicht-infizierte HLA-A*0201 Fibroblasten (**B**: -●-).

4.2. Definition eines neuen HLA-A*0201 Peptides aus dem HCMV/IE1-Antigen

4.2.1. Epitop-Vorhersage mittels SYFPEITHI

Für die HLA-Restriktion A*0201 wurden mögliche Peptide aus dem IE1-Antigen von HCMV durch die Arbeitsgruppe von Herrn PD Dr. Stevanovic, Institut für Zellbiologie, Tübingen, vorhergesagt. Die Epitop-Vorhersage erfolgte mit dem SYFPEITHI-Vorhersage-Algorithmus nach den kürzlich publizierten Regeln (Rammensee et al., 1999; www.syfpeithi.de). Acht Peptide, die als am besten bindend vorhergesagt wurden (höchster Score), wurden synthetisiert (Tab. 4.2.1.). Diese Peptide wurden dann auf ihre Fähigkeit untersucht, HLA-A*0201 Moleküle auf der Zelloberfläche von T2-Zellen zu stabilisieren.

4.2.2. Bindung der vorhergesagten IE1-Peptide auf T2-Zellen

Wie gut die vorhergesagten Peptide über MHC Klasse I Moleküle präsentiert werden können, wurde im Peptidbindungsassay untersucht. Dabei wurden T2-Zellen mit dem relevanten Peptid inkubiert und der resultierende Anstieg der Zelloberflächenexpression von HLA-A*0201 auf den T2-Zellen gemessen. Zur Positiv-Kontrolle wurde das Peptid NLVPMVATV aus dem pp65-Antigen von HCMV (AS 495-503), das bekanntermaßen eine hohe Bindungsaffinität für das HLA-A*0201 Molekül besitzt, eingesetzt. Die Bindung dieses Peptids resultierte in einem 100%igen Anstieg der HLA-A*0201 Expression (Tab. 4.2.1.). Die HLA-A*0201 Peptide aus HCMV-IE1 zeigten unterschiedliche Stabilisierungsgrade des HLA-A*0201 Moleküls auf den T2-Zellen, wobei die Peptide 285, 307, 324 und 331 am stärksten stabilisierend waren (Tab. 4.2.1., grau unterlegt).

Peptid	Position	Protein	Aminosäuresequenz	Länge	Score*	% FI**
7089	495-503	pp65	NLVPMVATV	9	30	99.5
328	81-89	IE1	VLAELVKQI	9	27	30.4
307	297-305	IE1	TMYGGISLL	9	27	60.8
285	256-264	IE1	ILDEERDKV	9	26	45.5
308	49-58	IE1	SLGDPLFPEL	10	26	7.7
331	304-312	IE1	LLSEFCRVL	9	25	73.2
311	329-338	IE1	LITKPEVISV	10	25	9.4
314	354-363	IE1	YILGADPLRV	10	25	14.9
324	316-324	IE1	VLEETSVML	9	24	40.9

* SYFPEITHI-Score: je höher, desto stärker die Peptid-HLA-A*0201-Bindung (max. Score = 36)

** Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu T2-Zellen ohne Peptid

Tab. 4.2.1. Charakterisierung der IE-Peptide, Score nach SYFPEITHI und Erhöhung der HLA-A*0201-Stabilisierung.

4.2.3. Verbesserung der Peptid-Vorhersage mit dem PAProC-Programm

Um die Vorhersage für MHC Klasse I-bindende Peptide weiter zu verbessern und eine Vorstellung davon zu bekommen, ob die mittels des SYFPEITHI-Programms vorhergesagten Liganden tatsächlich auch *in vivo* produziert, d.h. vom Proteasom geschnitten werden können, wurde die Generierung der C-Termini der Liganden mit Hilfe der neuesten PAProC-Version vorhergesagt (Prediction Algorithm for Proteasomal Cleavages, www.paproc.de) (Nussbaum et al., 2001). Der Algorithmus dieses Programms wurde anhand der Schnittstellen im Modell-Substrat Enolase (Toes et al., 2001) durch das konstitutive Proteasom oder das Immunproteasom gemäß einer kürzlich publizierten Methode ermittelt (Kuttler et al., 2000).

Die Test-Sequenz (298 Aminosäuren lang) enthielt alle 8 vorhergesagten MHC Klasse I Peptide (Tab. 4.2.1), N- und C-terminal jeweils von mindestens 10 Aminosäuren der natürlichen Sequenz flankiert. Mit diesen Einstellungen ermittelte der Algorithmus für das konstitutive Proteasom (c20S) 98 Schnitte in der Test-Sequenz, die beiden Algorithmen für das Immunproteasom (basierend auf zwei

unabhängigen Sets von Trainingsdaten) sagten 118 (i20S1) bzw. 64 (i20S2) Schnittstellen voraus.

Um schwache Schnittstellen auszuschließen und den Vergleich zwischen den verschiedenen Algorithmen zu erleichtern, wurde die Anzahl berücksichtigter Schnitte auf bestimmte Werte festgelegt (64, 40 und 20 Schnitte).

Die C-termini von 3 der 4 am besten bindenden Peptide wurden mit dem Algorithmus für das konstitutive Proteasom nicht als Schnittstellen vorhergesagt. Hingegen wurden die C-termini von 3 dieser 4 Peptide als klare Schnittstellen des Immunproteasoms ermittelt (*strong cut* bzw. *very strong cut*, siehe Tabelle 4.2.2.). Am deutlichsten wurde dabei der C-terminus des Peptides VLEETSVML als Schnittstelle von beiden Immunproteasom-Algorithmen vorhergesagt. Diese dominante Schnittstelle wurde zusätzlich durch einen *in vitro* Verdau des Test-Peptides durch das aufgereinigte Immunproteasom bestätigt. Das konstitutive Proteasom verursachte, wie mittels PAProC vorhergesagt, keine Schnittstelle.

Somit wurde durch Kombination der beiden Vorhersage-Programme SYFPEITHI und PAProC mit zusätzlicher Analyse im Peptidbindungsassay das Peptid VLEETSVML klar als das CTL-Epitop vorhergesagt, das *in vivo* während einer Immunreaktion (aktives Immunproteasom) am wahrscheinlichsten geschnitten, präsentiert und von CMV-spezifischen T-Zellen erkannt wird.

Mit einer ähnlichen Strategie wurden kürzlich auch HLA-B27 restringierte bakterielle Peptide vorhergesagt (Kuon et al., 2001).

Peptid	Position		Aminosäuresequenz	Score	PAProC*			% FI
					c20S	i20S1	i20S2	
A2	495-503	pp65	NLVPMVATV	30	+++	+++	++	99.5
328	81-89	IE1	VLAELVKQI	27	-	+	++++	30.4
307	297-305	IE1	TMYGGISLL	27	+	++	-	60.8
285	256-264	IE1	ILDEERDKV	26	-	-	+++	45.5
308	49-58	IE1	SLGDPLFPEL	26	+	+++	+++	7.7
331	304-312	IE1	LLSEFCRVL	25	-	++	++++	73.2
311	329-338	IE1	LITKPEVISV	25	+++	-	-	9.4
314	354-363	IE1	YILGADPLRV	25	++++	++	++	14.9
324	316-324	IE1	VLEETSVML	24	-	++++	++++	40.9

* Ergebnisse der PAProC-Vorhersage

c20S: konstitutives Proteasom,

i20S1 und i20S2: Immunproteasom

- no C-terminal cleavage predicted in the default setting

+ C-terminus only cleaved in the default setting (>64 cuts allowed) = weak cut

++ C-terminus cleaved within 64 allowed cuts (and not any more within 40 cuts) = medium strength cut

+++ C-terminus cleaved within 40 allowed cuts = strong cut

++++ C-terminus cleaved within 20 allowed cuts = very strong cut

Tab. 4.2.2. PAProC-Vorhersage für die synthetisierten IE1-Peptide.

4.2.4. Nachweis einer HCMV IE1 Peptid-spezifischen T-Zell-Antwort in HCMV-seropositiven Blutspendern

In einer ersten Analyse wurde mittels intrazellulärem IFN- γ Assay das Blut gesunder, HCMV-seropositiver Spender auf das Vorhandensein von CD8⁺ T-Zellen, die sich gegen das vorhergesagte IE1-Peptid VLEETSVML richten, getestet. In 3 von 12 HLA-A*0201 positiven Spendern waren VLEETSVML-spezifische T-Zellen nachweisbar mit einer mittleren Frequenz von 0.4% (0.2% - 1.6%) aller CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen. In HCMV-negativen Donoren konnten keine IE1 Peptid-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden (Frequenz <0.1%, n=3).

Um die Frequenz NLVPMVATV- und VLEETSVML-spezifischer CTLs in HLA-A*0201 positiven, gesunden Spendern zu vergleichen, wurden die PBMCs von 24 Donoren mittels Tetramer-Färbung analysiert. HCMV/pp65-spezifische CTLs waren dabei in 18 der 24 Spender mit einer mittleren Frequenz von 0.58% (<0.1% - 4.7%) aller CD8⁺ T-Zellen nachweisbar, IE1-spezifische T-Zellen konnten in 5 der 24 Spender mit einer mittleren Frequenz von 2.1% (<0.1% - 4.3%) nachgewiesen werden (Abb.

4.2.1.). Obwohl also IE1- und pp65-spezifische CTLs in vergleichbaren Frequenzen zu finden waren, zeigten mehr Spender eine CTL-Antwort gegen das pp65-Peptid.

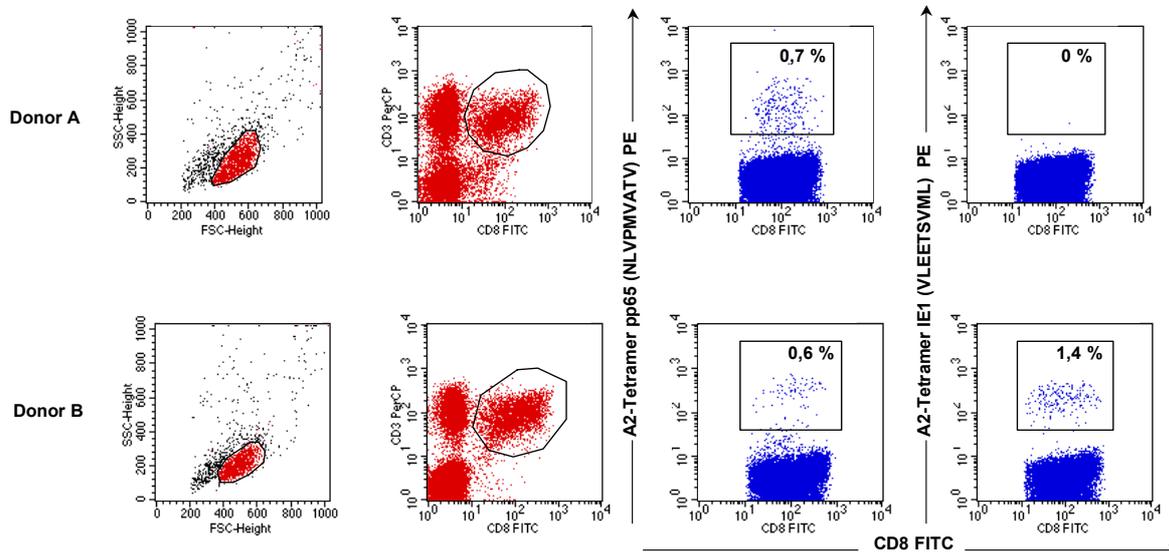


Abb. 4.2.1. Tetramer-FACS der PBMCs von zwei gesunden, HLA-A*0201 CMV-positiven Donoren. Die Tetramere waren komplexiert mit dem pp65-Peptid NLVPMVATV oder dem IE1-Peptid VLEETSVML.

4.2.5. Rekonstitution pp65 und IE1 Peptid-spezifischer T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation

Zuletzt wurde die Rekonstitution HCMV-Peptid-spezifischer CTLs bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation untersucht. Wie aus früheren Untersuchungen bekannt ist (Hebart et al., 2002), zeigt die Mehrheit der Patienten eine solche Rekonstitution ab ungefähr Tag 100 nach Transplantation, weshalb nur Proben von späteren Zeitpunkten analysiert wurden.

An Tag ≥ 100 nach Transplantation wurden in 10 von 11 Patientenproben HCMV NLVPMVATV-spezifische CTLs gefunden, während VLEETSVML-spezifische CTLs in 3 der 11 Patienten detektierbar waren ($P=0.014$, McNemar's test) (Tab. 4.2.3.).

Ein Patient mit einer dominanten pp65 Peptid-spezifischen CTL-Antwort nach einer ersten Transplantation zeigte 5 Monate nach einer zweiten Transplantation desselben Donors eine massive Expansion IE1 Peptid-spezifischer CTLs (Tab.

4.2.3., Pat. 4: Analyse mittels intrazellulärem IFN- γ Staining; Abb. 4.2.2.: Analyse mittels Tetramer staining).

Die durchschnittliche Dauer der HCMV-DNAämie vor Tag 100 war bei den 3 Patienten, bei denen IE1 VLEETSVML-spezifische CTLs gefunden wurden, kürzer im Vergleich zu den 8 Patienten, bei denen lediglich pp65 NLVPMVATV-spezifische T-Zellen rekonstituierten (durchschnittliche Dauer 1 [0-3] Woche(n) versus 8 [0-9] Wochen, $P=0.01$, Wilcoxon-Test), und keiner dieser 3 Patienten entwickelte eine HCMV-Erkrankung.

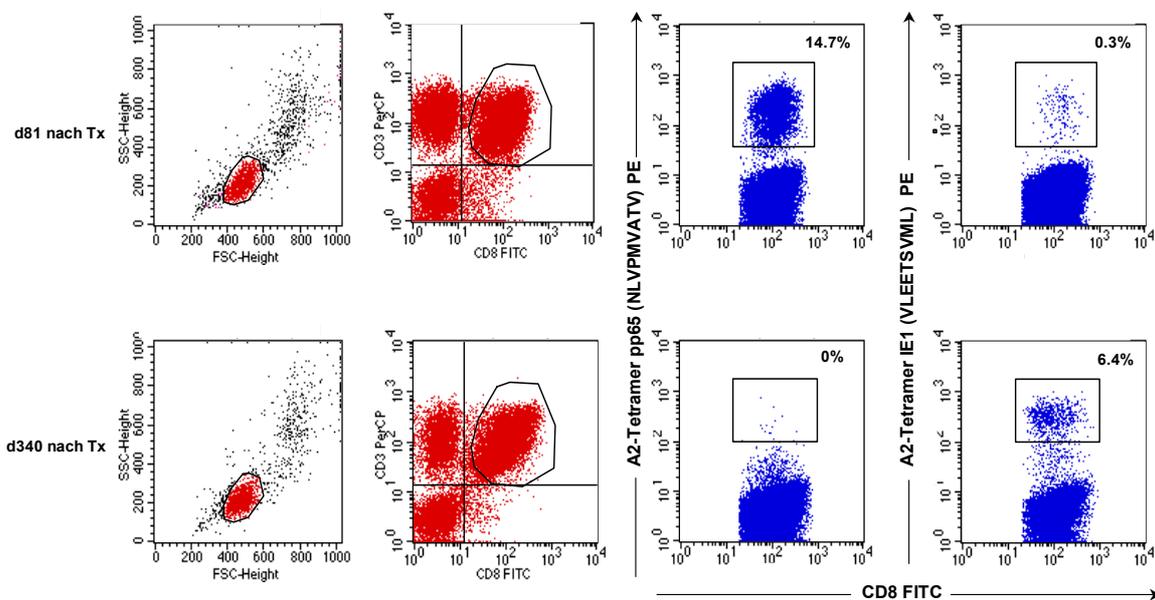


Abb. 4.2.2. Tetramer FACS der PBMCs eines Patienten, 81 und 340 Tage nach Transplantation. Die Tetramere waren komplexiert mit dem pp65-Peptid NLVPMVATV oder dem IE1-Peptid VLEETSVML.

Pat.	Donor	HCMV-Serologie ^{a)}		HCMV Infektion		CMV- Erkrankung	pp65 NLVPMVATV- spez. CTLs ^{c)}		IE1 VLEETSVML- spez. CTLs ^{c)}	
		D/R	cGvHD	Dauer [Wochen] ^{b)}	max. Virus- Last [Kopien/ml]		[%]	[n/μl]	[%]	[n/μl]
1	Sibl. [†]	+/+	Lim	3	3240	-	0.8	3	<0.1	-
2	Sibl.	+/+	-	0	<400	-	0.75	7.6	0.26	2.6
3	Sibl.*	+/+	Lim	8	56900	späte IP	0.9	7.6	<0.1	-
4	Sibl.	+/+	Lim	3	3610	-	2	15.1	3.04	22.9
5 [§]	Sibl.	+/+	Lim	0	negativ	-	2.2	2.4	<0.1	-
6 [‡]	MUD [†]	+/+	Lim	2	<400	späte IP	7.7	35.8	<0.1	-
7	MUD	+/-	Lim	8	11300	-	2.2	5.4	<0.1	-
8	MUD [†]	-/+	Lim	8	50400	späte IP	<0.1	-	<0.1	-
9	MM*	+/+	Ext	9	n.d.	-	11.6	52.5	<0.1	-
10	MM	+/-	Lim	0	negativ	-	0.27	0.07	0.53	0.14
11	MM	+/+	Lim	9	n.d.	-	1.3	6.22	<0.1	-

a) HCMV-Serologie bestimmt mittels ELISA; D: Stammzell-Donor; R: Stammzell-Empfänger

b) Anzahl an Wochen, während der vor Tag 100 nach Transplantation eine Virämie bestand. Bestimmung mittels in-house PCR Methode. Die Quantifizierung der Virus-Last erfolgte mittels COBAS Amplicor HCMV Monitor (Roche Diagnostics). Angegeben ist die maximale Virus-Last vor Tag 100 nach Transplantation.

c) Maximale Anzahl an CTLs zu irgendeinem Zeitpunkt ≥ 100 Tage nach Transplantation. Die Analyse erfolgte mittels Tetramer-FACS (n=5, Pat. 1, 3, 5, 7, 11) oder intrazellulärem IFN- γ Nachweis nach Peptid-stimulation (n=6, Pat. 2, 4, 6, 8-10).

* Patienten erhielten CD34-selektionierte Stammzellen (Anreicherung mittels CliniMACS, Miltenyi)

[†] Patienten erhielten nicht-myeloablative Konditionierung

[‡] Dieser Patient erhielt Spender-Lymphozyten aufgrund eines Rückfalls der malignen Grunderkrankung, entwickelte eine schwere graft-versus-host Erkrankung, die mit Kortikoiden und OKT3 behandelt wurde, und verstarb schließlich an einer HCMV-induzierten Pneumonie

[§] Analyse erfolgte bereits an Tag 64 nach Transplantation

Pat.=Patient; cGvHD=chronische graft-versus-host Erkrankung; Lim=limited; Ext=extensive; Sibl.=HLA-identischer Geschwister-Spender; MM=HLA-nicht-identischer Familien-Spender; MUD=HLA-identischer nicht-verwandter Spender; IP=interstitielle Pneumonie; n.d.=nicht gemacht

Tab. 4.2.3. HCMV/pp65- und IE1-spezifische Immunrekonstitution von 11 Patienten an Tag ≥ 100 nach allogener SCT.

4.3. Generierung von HCMV/IE1 Peptid-spezifischen T-Zelllinien

HCVM-spezifische Klone wurden erfolgreich eingesetzt, um Patienten nach allogener SCT vor dem Auftreten einer HCMV-Erkrankung zu schützen (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995). Da die Generierung der transfundierten Klone meist mit HCMV-infizierten Antigen-präsentierenden Zellen erfolgte und das immundominante Antigen pp65 die Prozessierung und Präsentation von IE1 blockiert (Gilbert et al., 1996), waren die Klone fast ausschließlich gegen pp65 gerichtet. Da aber, wie oben gezeigt, sowohl in Gesunden wie auch in Patienten nach allogener SCT IE1-spezifische T-Zellen vorhanden sind, scheint auch das IE1-Protein ein erfolgsversprechendes Ziel der HCMV-spezifischen adoptiven T-Zelltherapie zu sein. Im Folgenden wurde daher versucht, HCMV/IE1-spezifische CTLs zu generieren.

Dazu wurden 1×10^8 PBMCs aus Buffy coats von 14 gesunden, HLA-A*0201 CMV-seropositiven Blutspender isoliert und mit dem HLA-A*0201-Peptid VLEETSVML stimuliert. Die Anreicherung der IFN- γ sezernierenden Zellen erfolgte mit dem IFN- γ -Secretion Assay nach dem Labor-Protokoll, die Expansion der Zellen über 2-4 Wochen mit allogenen, gepoolten und bestrahlten PBMCs als Feeder-Zellen in RPMI/10% FCS mit 50 IU/ml IL-2. Die Frequenz der Peptid-spezifischen CD8+ Lymphozyten wurde mittels Tetramer-FACS-Analyse sowohl in den PBMCs als auch in den angereicherten und expandierten Zellen bestimmt.

In den PBMCs von 4 der 14 Spendern konnten VLEETSVML-spezifische CTLs mittels Tetramer-FACS nachgewiesen werden (0.1% - 4.3%), während in den PBMCs aller übrigen Spendern keine VLEETSVML-spezifischen CTLs detektierbar waren (<0.1%). Der IFN- γ Secretion Assay wurde mit den PBMCs aller 14 Spender durchgeführt, jedoch konnten nur von den 4 Spendern mit detektierbarer IE1 Peptid-spezifischer Vorläufer-Frequenz CTLs generiert werden. Die Expansionsrate war vergleichbar mit der mittels IFN- γ Secretion Assay generierten NLVPMVATV-spezifischen CTLs (4.1.1.), die Peptidspezifität der isolierten und expandierten CTLs lag nach 2-4 Wochen zwischen 42.6% und 98.6% (Abb. 4.3.1.).

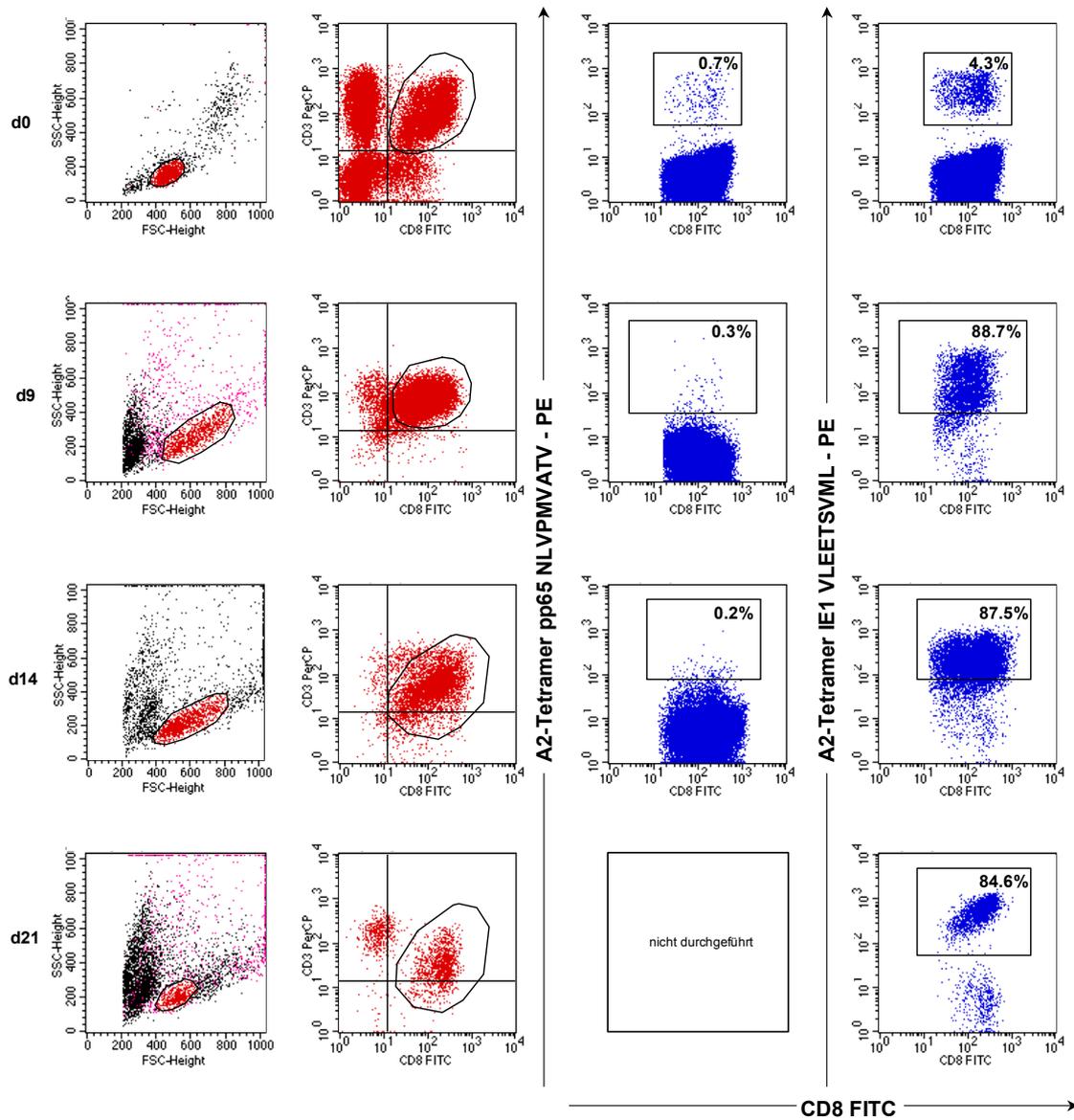


Abb. 4.3.1. Tetramer FACS der PBMCs und CTLs (9, 14 und 21 Tage nach IFN- γ Secretion Assay) eines HLA-A*0201, HCMV-seropositiven Spenders. Die Tetramere waren komplexiert mit dem pp65-Peptid NLVPMVATV (Negativ-Kontrolle) oder dem IE1-Peptid VLEETSVML.

4.4. Generierung von CD4+ und CD8+ HCMV-spezifischen T-Zelllinien für den klinischen Einsatz

Im nächsten Schritt wurde ein Protokoll erarbeitet, das die Generierung CD4+ und CD8+ HCMV-spezifischer T-Zelllinien für den klinischen Einsatz ermöglicht (Abb. 4.4.1.). 8 gesunden HLA-A*0201 und/oder HLA-B7 positiven Blutspendern wurden 360 ml Heparinblut zur PBMC-Isolierung und 140 ml Vollblut zur Serumgewinnung entnommen. 2×10^8 - 4×10^8 PBMCs wurden mit HLA-restringierten Peptiden (HLA-A2: pp65₄₉₅₋₅₀₃ (NLVPMVATV), IE₃₁₆₋₃₂₄ (VLEETSVML); HLA-B7: pp65₄₁₇₋₄₂₅ (TPRVTGGGAM)) und CMV-Lysat für 16 h stimuliert. Anschließend wurden die CMV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen mittels IFN- γ Secretion Assay nach dem klinischen Protokoll (3.2.1.) isoliert und über mehrere Tage mit autologen Feederzellen und autologem Serum expandiert. Die Charakterisierung der generierten Zellen erfolgte mittels Tetramer-FACS, intrazellulärem IFN- γ Nachweis, Proliferationsassay, Zytotoxizitätsassay und MLC.

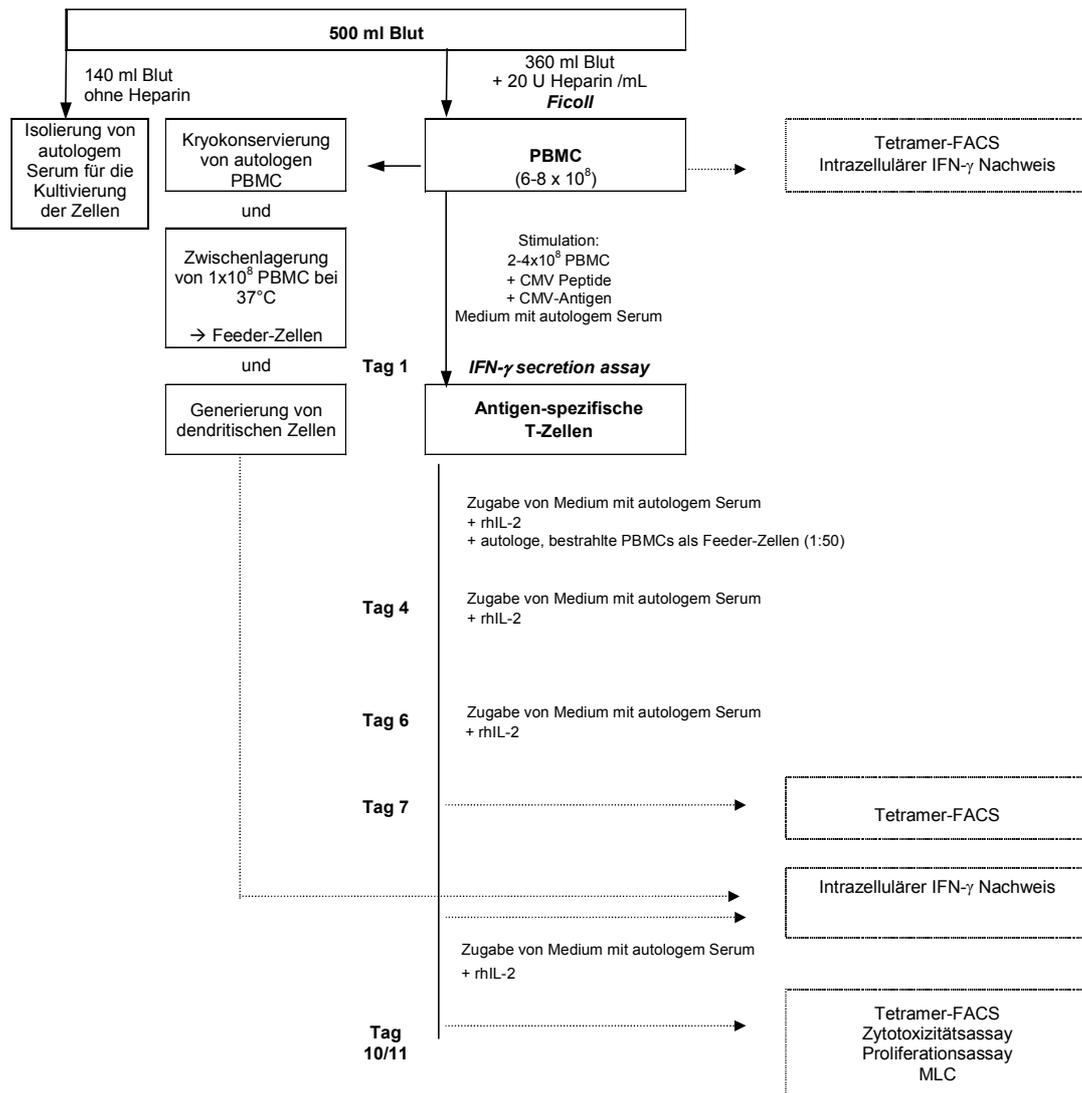


Abb. 4.4.1. Protokoll zur Generierung und Charakterisierung CD4+ und CD8+ HCMV-spezifischer T-Zellen für den klinischen Einsatz.

4.4.1. Isolation und Expansion der CMV-spezifischen T-Zellen

Nach Stimulation von 2×10^8 - 4×10^8 PBMCs mit HLA-restringierten Peptiden und CMV-Lysat wurden mittels IFN- γ Secretion Assay im Durchschnitt 3.0×10^6 (2×10^5 - 1×10^7) IFN- γ sezernierende Zellen isoliert, die nach 7 Tagen zu 4.6×10^7 (7×10^6 - 2.4×10^8) und nach 10 bzw. 11 Tagen zu 4.6×10^8 (8.4×10^7 - 2.2×10^9 ; n=6) Zellen expandierten (Tab. 4.4.1. und Abb. 4.4.2.).

Donor	HLA - A / HLA - B	Zellzahl, in Secretion-assay eingesetzt	Zellzahl direkt nach Secretion-assay	Zellzahl nach 7 Tagen Expansion	Zellzahl nach 10/11 Tagen Expansion
LSA2	A2 / A68 / B51 / B65	4×10^8	3.0×10^6	6.5×10^7	n.b.
LSA4	A2 / A32 / B44	3×10^8	5.0×10^6	4.2×10^7	2.1×10^8
LSA5	A2 / B44 / B18	4×10^8	1.0×10^6	2.3×10^7	1.0×10^8
LSA6	A2 / A23 / B8 / B44	3×10^8	0.9×10^6	0.7×10^7	0.8×10^8
LSA7	A2 / A11 / B51 / B62	3×10^8	1.3×10^6	4.5×10^7	1.0×10^8
LSA8	A2 / A3 / B7 / B8	4×10^8	2.5×10^6	3.6×10^7	$10.2 \times 10^8^*$
LSA9	A2 / A3 / B7 / B27	3×10^8	10×10^6	24×10^7	21.6×10^8
LSA10	A3 / B7	2×10^8	0.2×10^6	1.0×10^7	1.0×10^8

* Zellzahl nach 13 Tagen Expansion

n.b.= nicht bestimmt

Tab. 4.4.1. HLA-A / HLA-B der Donoren; Zellzahlen vor Secretion Assay, direkt nach Secretion Assay und nach 7, sowie 10 bzw. 11 Tagen Expansion.

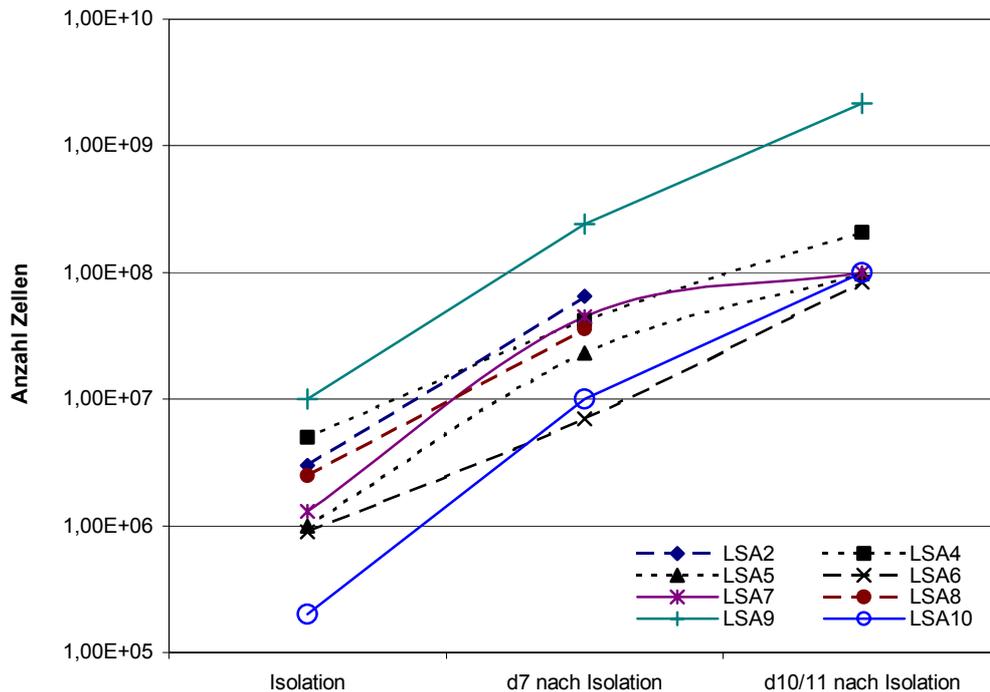


Abb. 4.4.2. Expansion der Zellen nach Isolation über 10/11 Tage

4.4.2. Frequenz CMV Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen (Tetramer FACS)

Die Frequenz CMV Peptid-spezifischer CD8+ T-Zellen wurde mittels Tetramer-FACS-Analyse (3.3.2.) sowohl in den PBMCs als auch in den isolierten Zellen nach 7 tägiger Expansion bestimmt. Die Analyse der PBMCs der 7 HLA-A*0201 positiven Donoren zeigte, daß im Durchschnitt 0.82% (<0.1% - 2.85%) der CD3+/CD8+ Lymphozyten positiv für das HLA-A*0201/pp65₄₉₅₋₅₀₃ Tetramer und 1.65% (<0.1% - 6.45%) für das HLA-A*0201/IE₃₁₆₋₃₂₄ Tetramer waren. Nach Anreicherung und 7 Tagen Expansion waren 35.7% (3.78% - 92.39%) bzw. 18.2% (<0.1% - 66.61%) der CD3+/CD8+ Lymphozyten positiv für das HLA-A*0201/pp65₄₉₅₋₅₀₃ Tetramer bzw. für das HLA-A*0201/IE₃₁₆₋₃₂₄ Tetramer (Abb. 4.4.3. und Abb. 4.4.4.). Die Tetramer-Frequenz für das B7-Epitop lag bei den drei HLA-B7 positiven Donoren (LSA8, LSA9 und LSA10) zwischen <0.1% und 3.70% (PBMCs) und nach 7 tägiger Expansion zwischen 7.38% und 59.13% (Abb. 4.4.4.). Obwohl in 3 Donoren keine Tetramer-positiven Zellen für die getesteten Epitope detektiert werden konnten (Frequenz <0.1%), waren nach Anreicherung und Expansion T-Zellen gegen diese Peptide in

zum Teil hohen Frequenzen (bis 59% Tetramer-positive CD3+/CD8+ T-Zellen, LSA8) nachweisbar. In 4 von 5 Donoren, die für mindestens 2 der gestesteten Epitope eine Tetramer-Frequenz > 0.1% in den PBMCs aufwiesen, blieb das relative Verhältnis der Frequenzen zwischen den Peptid-spezifischen T-Zellen über die Anreicherungs- und Expansionszeit stabil.

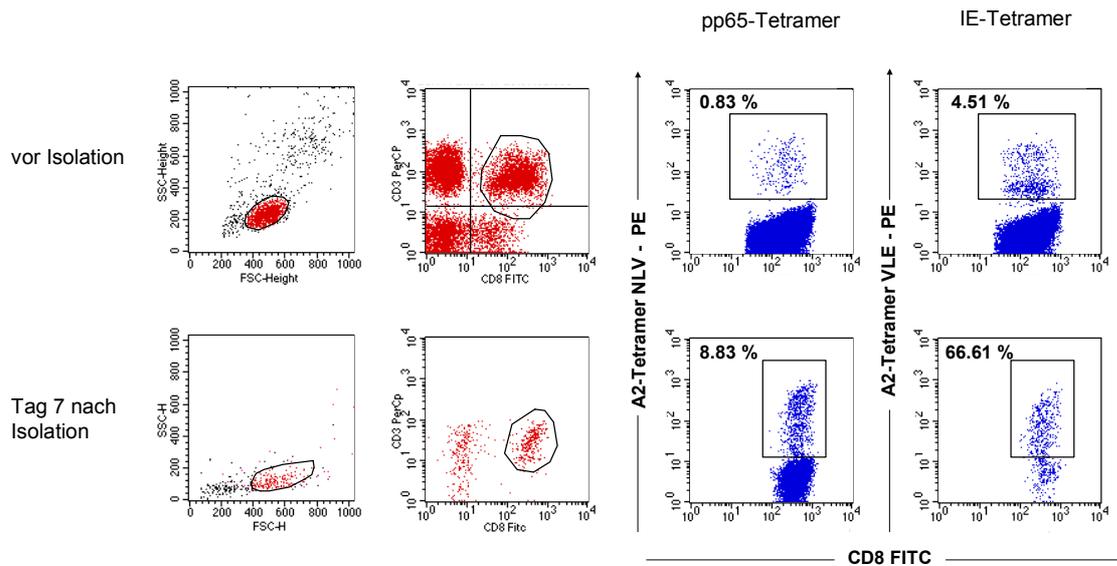


Abb. 4.4.3. Tetramer-FACS der PBMCs und der über 7 Tage expandierten Zellen eines Donors (LSA4). Die Tetramere waren komplexiert mit den Peptiden NLVPMVATV aus pp65 und VLEETSMVL aus dem IE1-Antigen.

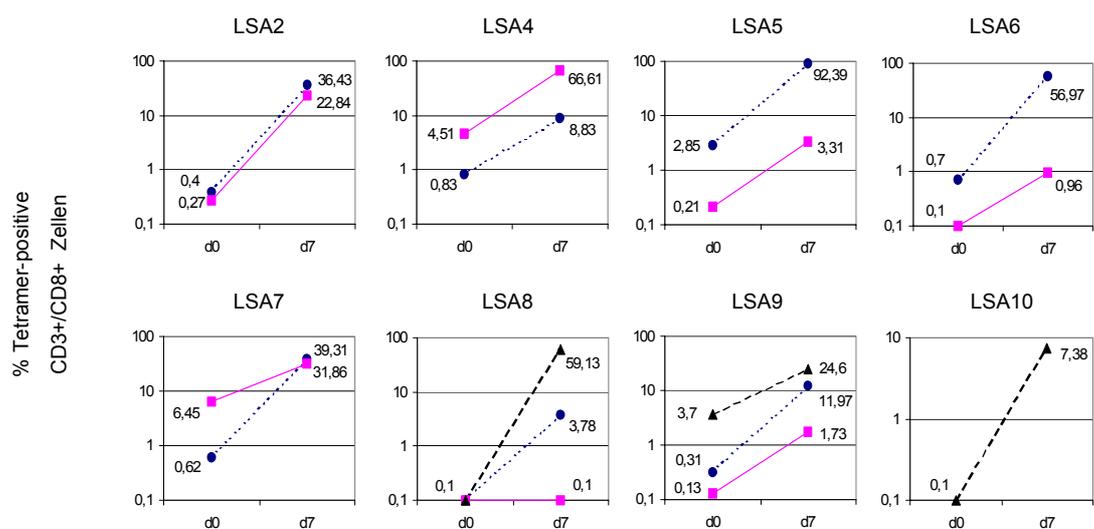


Abb. 4.4.4. Die Diagramme zeigen die Tetramer-Frequenzen aller 8 Donoren vor Anreicherung (d0) und an Tag 7 nach Isolation (d7). Die Tetramere waren komplexiert mit den Peptiden NLVPMVATV (●-○), VLEETSMVL (■-□) und TPRVTGGGAM (▲-△).

4.4.3. Frequenz CMV-spezifischer CD4+ und CD8+ T-Zellen (IFN- γ Nachweis)

Die weitere Charakterisierung der CMV-spezifischen T-Zellen erfolgte mittels intrazellulärem IFN- γ Nachweis (3.3.3.). Damit konnten neben den CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen (Stimulation mit Peptid) auch die CMV-spezifischen CD4+ T-Zellen bestimmt werden (Stimulation mit CMV-Lysat). Die Analyse der PBMCs der 7 HLA-A*0201 positiven Donoren zeigte, dass im Durchschnitt 0.59% (<0.1% - 3.04%) der CD8+ Lymphozyten nach Stimulation mit dem Peptid NLVPMVATV IFN- γ produzierten und 0.91% (<0.1% - 5.32%) nach Stimulation mit dem Peptid VLEETSVML. Nach 7 Tagen Expansion stieg die Spezifität der CD8+ Lymphozyten auf 26.9% (3.10% - 60.39%; Peptid NLVPMVATV) bzw. 17.7% (<0.1% - 66.74%; Peptid VLEETSVML) (Abb. 4.4.5.). Die IFN- γ Produktion der CD8+ T-Zellen lag nach Stimulation mit dem B7-Peptid TPRVTGGGAM bei den HLA-B7 positiven Donoren zwischen 0.16% und 1.53% vor Isolation und zwischen <0.1% und 16.53% nach Isolation und Expansion. Der Prozentsatz der IFN- γ produzierenden CD4+ Lymphozyten lag bei 0.57% (0.21% - 2.03%) in den PBMCs und stieg nach Anreicherung und 7 Tagen Expansion auf 27.35% (15.08% - 50.91%) an.

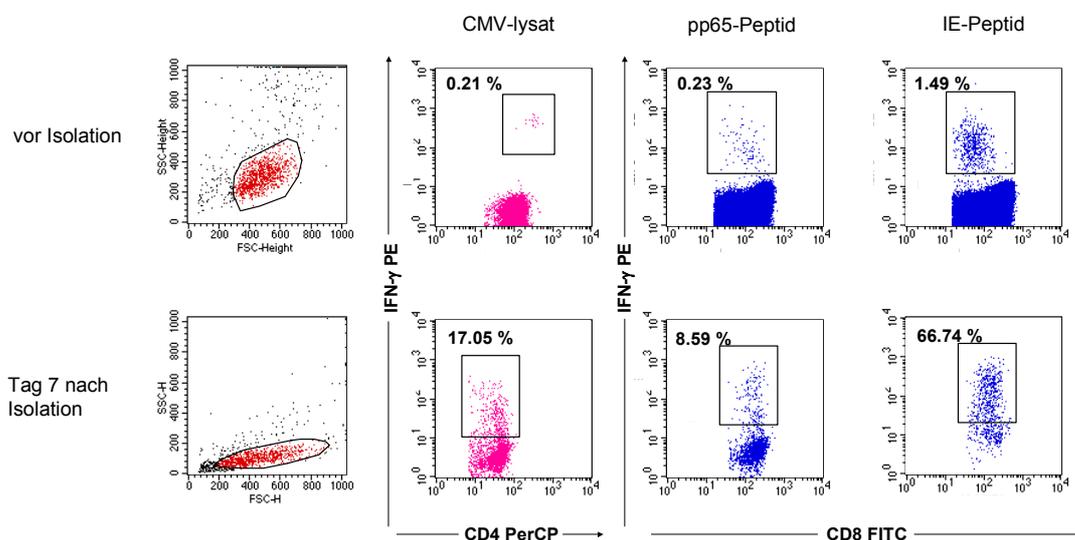


Abb. 4.4.5. Intrazellulärer IFN- γ Nachweis der PBMCs und der über 7 Tage expandierten Zellen eines Donors (LSA4). Die PBMCs wurden mit den Peptiden NLVPMVATV aus pp65 und VLEETSVML aus dem IE1-Antigen oder mit CMV-Lysat stimuliert. Die generierten T-Zellen sezernierten IFN- γ nach Stimulation mit den entsprechend Peptid- bzw. Lysat-beladenen autologen DCs.

Ausgehend vom Prozentsatz IFN- γ produzierender T-Zellen and Tag 7, wurde die absolute Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen in der Startfraktion sowie 10 Tage nach Anreicherung und Expansion berechnet. Die absolute Anzahl CMV-spezifischer CD4+ T-Zellen stieg danach im Durchschnitt von 7.3×10^5 auf 9.0×10^7 , die der CMV-spezifischen CD8+ T-Zellen von 2.1×10^6 auf 4.4×10^7 (Abb. 4.4.6.).

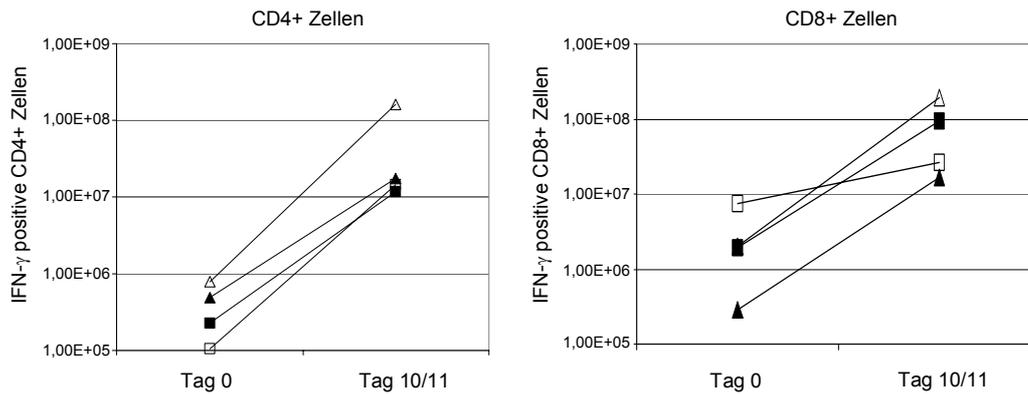


Abb. 4.4.6. Die beiden Diagramme zeigen die absoluten Zellzahlen IFN- γ produzierender CD4+ bzw. CD8+ Lymphozyten von 4 Donoren ((LSA2 (■), LSA4 (□), LSA6 (▲) and LSA8 (△)) vor Anreicherung (Tag 0) und nach Anreicherung und 10 bzw. 11 Tagen Expansion (Tag 10/11).

4.4.4. Proliferation der generierten T-Zellen nach Restimulation mit CMV-Antigen

Zur weiteren Charakterisierung der generierten CD4+ und CD8+ T-Zellen wurde ihre Fähigkeit zur Proliferation nach Restimulation mit CMV-Antigen in einem CFSE Proliferationsassay (3.3.5.) getestet. Der Großteil der isolierten und expandierten CD4+ und CD8+ T-Zellen durchlief mindestens 3 Teilungen (gemessen als verminderte Intensität des CFSE-Signals), während weniger als 13% der unselektierten CD4+ T-Zellen bzw. 17% der unselektierten CD8+ T-Zellen desselben Donors das CFSE verdünnten. Die starke Teilungsaktivität der generierten T-Zellen korrelierte mit einem Anstieg der Zellzahl (bis zu 11-fach), während die unselektionierten PBMCs in der selben Zeit nur marginal expandierten (bis 2.3-fach) (Abb. 4.4.7.).

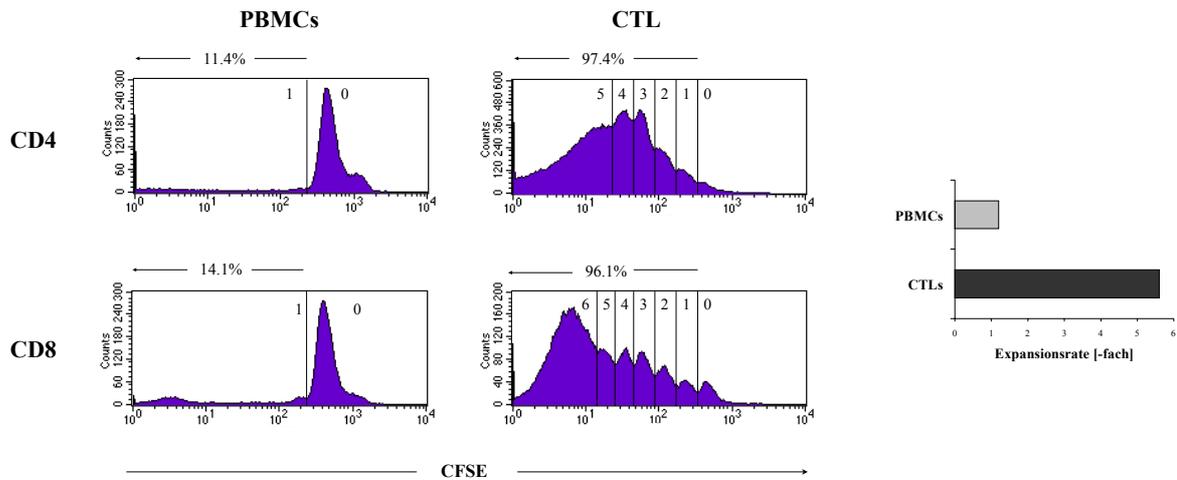


Abb. 4.4.7. Teilungsaktivität (CFSE-Verdünnung) und Expansion der PBMCs und der generierten T-Zellen (CTLs) eines Donors (LSA9) nach Restimulation mit CMV-Lysat gepulsten autologen DCs über 7 Tage.

4.4.5. Zytotoxizität der generierten T-Zellen

Um die Effektor-Funktion der generierten T-Zellen zu testen, wurde in einem Chrom-release-assay deren Fähigkeit untersucht, CMV-infizierte Fibroblasten und Peptid-gepulste T2-Zellen zu lysieren (3.3.6.). CMV-infizierte Fibroblasten wurden von allen 3 getesteten CMV-spezifischen T-Zelllinien lysiert, während nicht-infizierte Fibroblasten nicht lysiert wurden (Abb. 4.4.8. (A)). Um sagen zu können, ob sowohl pp65- als auch IE1-spezifische T-Zellen an der Lyse der CMV-infizierten Fibroblasten beteiligt sind, wurden T2-Zellen mit beiden Peptiden gepulst und als Zielzellen eingesetzt. Die T-Zelllinien, die für beide Peptide hohe Frequenzen an CD8⁺ T-Zellen aufwiesen, lysierten auch sowohl die T2-Zellen, die mit dem pp65-Peptid gepulst als auch die T2-Zellen, die mit dem IE1-Peptid gepulst waren effizient (Abb. 4.4.8. (B)). Im Gegensatz dazu wurden die IE1-Peptid-gepulsten T2-Zellen nicht getötet, wenn die eingesetzte T-Zelllinie keine IE1-Peptid spezifischen CD8⁺ T-Zellen enthielt.

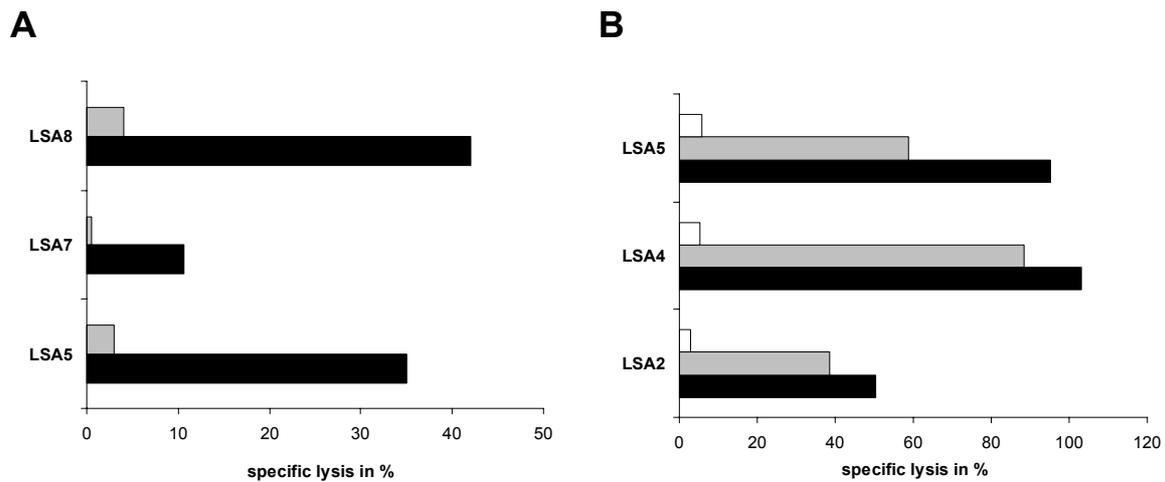


Abb. 4.4.8. (A) Die generierten T-Zellen lysierten CMV-infizierte HLA-A*0201 Fibroblasten effizient (schwarze Balken), während nicht-infizierte Fibroblasten nicht lysiert wurden (graue Balken). (B) Zytotoxizitätsassay der generierten T-Zellen gegen Peptid-gepulste T2-Zellen. Die T2-Zellen waren gepulst mit den Peptiden NLVPMVATV (schwarze Balken), VLEETSVML (graue Balken), oder einem irrelevanten Peptid (weisse Balken).

4.4.6. Alloreaktivität der generierten T-Zellen

Um auszuschließen, dass die generierten T-Zellen im potentiellen allogenen Stammzellempfänger eine GvH-Reaktion auslösen, wurden die CD4⁺ PBMCs mit den generierten CD4⁺ T-Zellen in einer gemischten Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte culture, MLC) verglichen (3.3.7.). Dazu wurden die CD4⁺ Zellen der PBMCs und der generierten T-Zellen mittels Magnet-Beads angereichert und mit reifen, bestrahlten DCs eines allogenen Blutspenders stimuliert. Als Kontrolle wurden CD4⁺ Lymphozyten ohne DCs eingesetzt. Die CD4⁺ Lymphozyten der PBMCs zeigten eine starke Proliferation gegen allogene DCs, wogegen die Proliferation der generierten CD4⁺ T-Zellen um über 95% reduziert war (Abb. 4.4.9.; n=3).

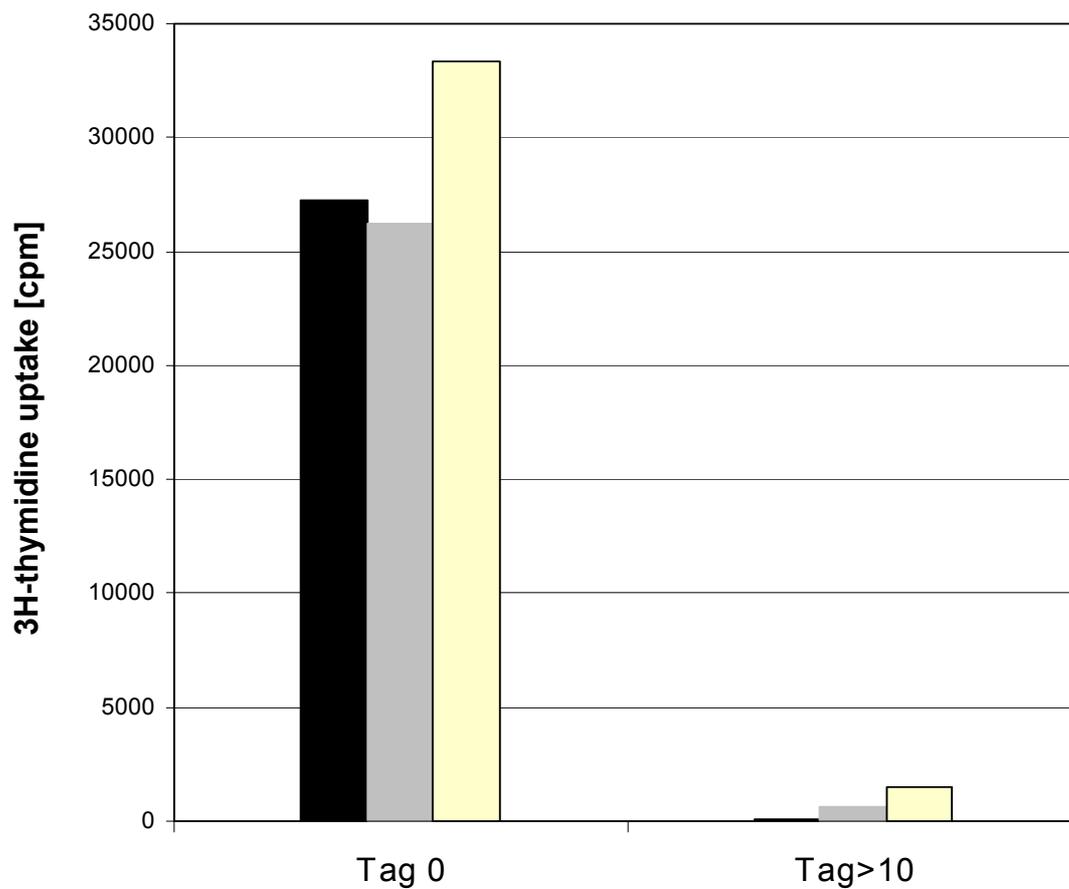


Abb. 4.4.9. Die CD4+ Lymphozyten von drei Spendern (LSA8: schwarze Balken, LSA7: graue Balken, LSA5: weiße Balken) zeigten in der gemischten Lymphozytenreaktion vor Anreicherung (Tag 0) eine starke Proliferation. Die Generierten CD4+ Lymphozyten zeigten dagegen nur noch eine minimale Proliferation (Reduktion um über 95%).

4.5. Optimierung des klinischen Protokolls

Zur weiteren Optimierung des Protokolls für die Generierung klinisch einsetzbarer CMV-spezifischer T-Zellen wurden verschiedene Modifizierungs- und Erweiterungsmöglichkeiten getestet. So wurden zwei weitere HLA-B*07-Peptide, eines aus pp65 und eines aus dem IE1-Antigen, zur Generierung CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen eingesetzt. Für die Generierung CMV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen wurden die PBMCs mit rekombinantem pp65-Protein stimuliert.

4.5.1. Einsatz von weiteren CMV-Peptiden

Um das Spektrum der CMV-spezifischen CD8⁺ Immunantwort noch mehr zu erweitern, wurden für die Generierung von CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinien zwei weitere, kürzlich beschriebene HLA-B*07-restringierte Peptide eingesetzt. 2 gesunden HLA-B*07 positiven Blutspendern wurden 360 ml Heparinblut zur PBMC-Isolierung und 140 ml Vollblut zur Serumgewinnung entnommen. 2×10^8 PBMCs wurden im einen Fall (LSA9b) für 16 h mit dem HLA-B*07-Peptid RIPHERNGVTVL aus dem CMV-Phosphoprotein pp65 (AS 265-275) stimuliert. Die PBMCs des zweiten Donors (LSA8c) wurden zusätzlich mit dem HLA-B*07-Peptid RVLCCYVL aus dem IE1-Antigen (AS 301-317) stimuliert. Anschließend wurden die CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mittels IFN- γ Secretion Assay nach dem klinischen Protokoll (3.2.1.) isoliert und über mehrere Tage mit autologen Feeder-Zellen und autologem Serum expandiert. Die Charakterisierung der PBMCs und der generierten Zellen erfolgte mittels intrazellulärem IFN- γ Nachweis nach Stimulation mit den entsprechend Peptid-gepulsten autologen DCs.

Die CD8⁺ PBMCs von LSA9b zeigten nach Stimulation mit dem IE1-Peptid RVLCCYVL eine IFN- γ Frequenz von 0.26%, nach Anreicherung und Expansion der stimulierten Zellen über 7 Tage waren 2.1% der CD8⁺ Zellen IFN- γ positiv. Die IFN- γ Produktion der CD8⁺ T-Zellen des Spenders LSA8 lag nach Stimulation mit den Peptiden RVLCCYVL und RIPHERNGVTVL bei 0.93% bzw. 0.17% vor Isolation und bei 0.19% bzw. 9.78% nach Isolation und Expansion (Abb. 4.5.1.).

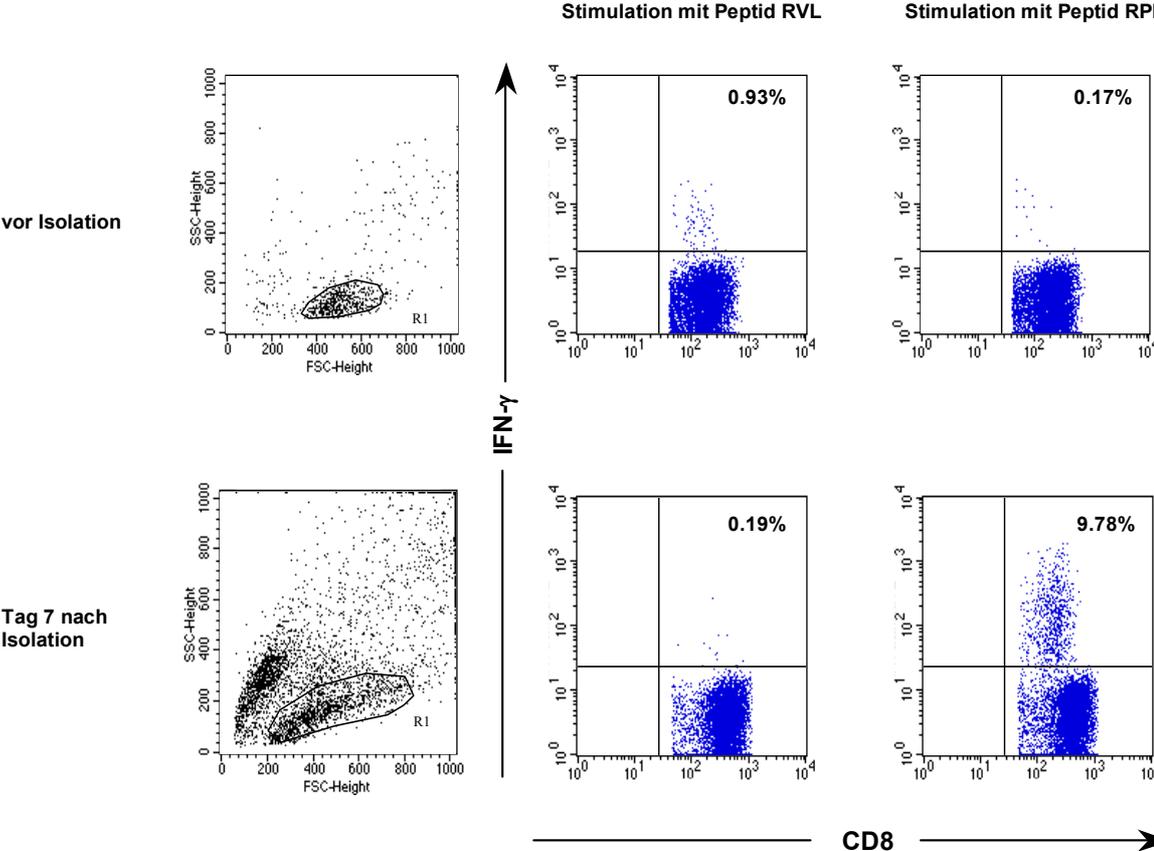


Abb. 4.5.1. Intrazellulärer IFN- γ Nachweis der PBMCs und der über 7 Tage expandierten Peptid - spezifischen T-Zellen eines Donors (LSA8c) nach Stimulation mit den entsprechend Peptid-gepulsten autologen DCs.

4.5.2. Generierung von CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen mit rekombinantem CMV/pp65-Protein

Zur Generierung von CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen wurde bisher CMV-Lysat eingesetzt. Dieses besteht allerdings nur zu ca. 10% aus viralen Proteinen und ist in der Zusammensetzung sehr variabel und schlecht charakterisiert. Der Einsatz eines solchen Produktes für den klinischen Einsatz wäre somit bedenklich, weshalb nach einer Alternative zur Generierung von CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen gesucht wurde. Eine Möglichkeit stellt die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen mit rekombinantem Protein dar. Im Folgenden wurde ein solcher Ansatz mit rekombinantem CMV/pp65-Protein gewählt.

Da anzunehmen ist, dass das pp65-Protein nicht das einzige immunogene CMV-Protein darstellt, wurde zunächst untersucht, welcher Prozentsatz einer mittels CMV-Lysat generierten T-Zelllinie nach Stimulation mit dem pp65-Protein IFN- γ sezerniert. Dazu wurden aus PBMCs eines Spenders, von dem bereits CMV-Lysat-spezifische T-Zellen vorlagen (LSA9, Tag7), DCs generiert, mit CVM-Lysat (10 μ g/ml) bzw. pp65-Protein (2.5 μ g/ml) beladen und zur Stimulation der T-Zelllinie, die nach CMV-Lysat-Stimulation entsprechend dem klinischen Protokoll generiert wurde, verwendet. Die Analyse im intrazellulären FACS ergab, dass nur 1.79% der CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit dem pp65-Protein IFN- γ sezernierten, während 7.38% der CD4⁺ T-Zellen CMV-Lysat-spezifisch waren (Abb. 4.5.2.).

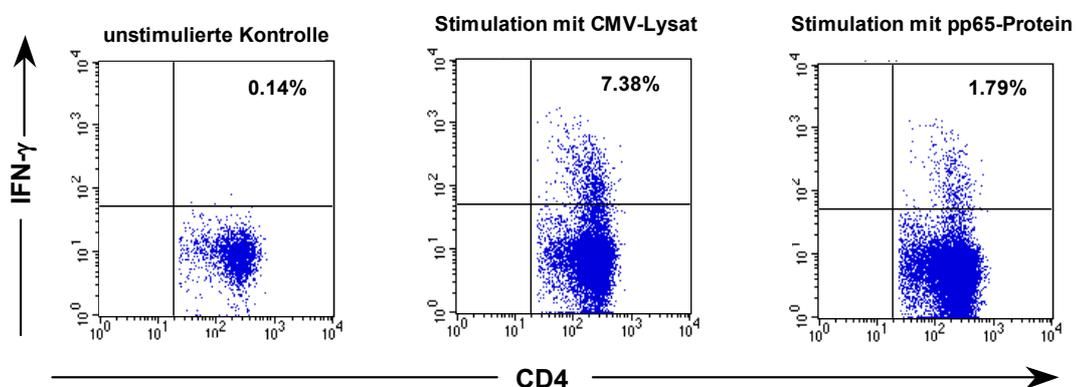


Abb. 4.5.2. IFN- γ Produktion von CMV-Lysat-spezifischen T-Zellen (LSA9, Tag7) nach Stimulation mit DCs, die entweder mit CMV-Lysat oder mit CMV/pp65-Protein beladen waren.

Im nächsten Schritt wurden CMV-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zelllinien mit verschiedenen Peptiden und CMV/pp65-Protein generiert. 2 gesunden CMV-seropositiven Blutspendern wurden 360 ml Heparinblut zur PBMC-Isolierung und 140 ml Vollblut zur Serumgewinnung entnommen. 2×10^8 - 3×10^8 PBMCs wurden mit HLA-restringierten Peptiden und CMV/pp65-Protein (2.5 µg/ml) für 16 h stimuliert. Anschließend wurden die CMV-spezifischen CD4+ und CD8+ T-Zellen mittels IFN- γ -Secretion Assay nach dem klinischen Protokoll (3.2.1.) isoliert und über mehrere Tage mit autologen Feeder-Zellen und autologem Serum expandiert. Die Charakterisierung der PBMCs und der generierten CD4+ T-Zellen erfolgte mittels intrazellulärem IFN- γ Nachweis nach Stimulation mit CMV/pp65-Protein oder CMV-Lysat.

Die IFN- γ Produktion der CD4+ PBMCs war in beiden Fällen nach Stimulation mit dem pp65-Protein stärker als nach Stimulation mit dem CMV-Lysat (0.36% versus 0.21%, bzw. 0.22% versus 0.19% IFN- γ Sekretion). Dieses Ergebnis zeigt, dass bei diesen beiden Donoren pp65 das Hauptziel der CMV-spezifischen CD4+ Immunantwort darstellt.

Die generierten CD4+ T-Zellen sezernierten an Tag 7 nach Isolation im einen Fall über 70% IFN- γ nach erneuter Stimulation mit dem pp65-Protein, die INF- γ Sekretion nach Stimulation mit CMV-Lysat lag bei 63.7% (Abb. 4.5.3.). Im zweiten Fall waren nach 7 tägiger Expansion 3.78% der CD4+ Zellen nach Stimulation mit pp65-Protein und 3.37% der CD4+ Zellen nach Stimulation mit CMV-Lysat IFN- γ positiv.

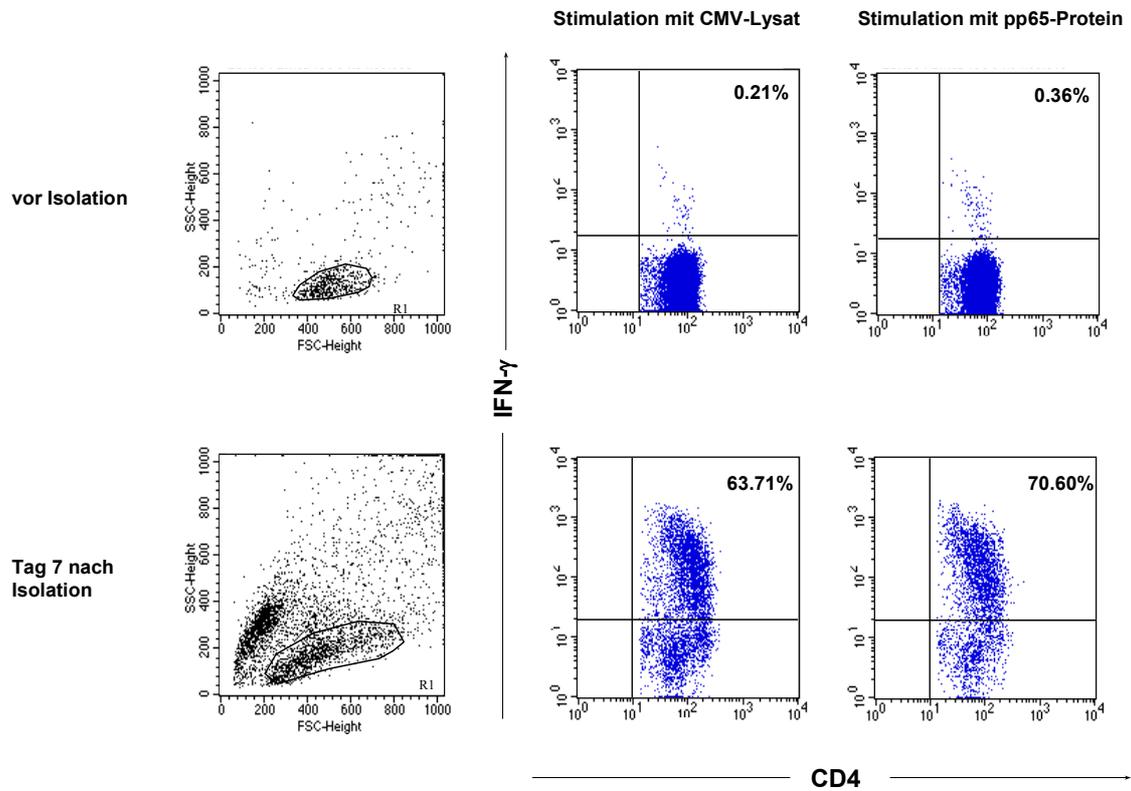


Abb. 4.5.3. Intrazellulärer IFN- γ Nachweis der PBMCs und der über 7 Tage expandierten CMV/pp65-Protein-spezifischen T-Zellen eines Donors nach Stimulation mit CMV-Lysat bzw. mit CMV/pp65-Protein.

4.6. Generierung HCMV-spezifischer T-Zellen von CMV-seronegativen Donoren

CMV-negative Donoren besitzen keine oder nur in äusserst geringer Anzahl Vorläuferzellen. Im Folgenden wurde versucht, aus PBMCs CMV-seronegativer Donoren CMV-spezifische T-Zellen zu generieren. Dazu wurden 1×10^8 PBMCs aus Buffy coats von 3 gesunden, HLA-A*0201 CMV-seronegativen Blutspender isoliert und mit CMV-Lysat stimuliert. Die Anreicherung der IFN- γ sezernierenden Zellen erfolgte mit dem IFN- γ Secretion Assay nach dem Labor-Protokoll, die Expansion der Zellen mit allogenen, gepoolten und bestrahlten PBMCs als Feeder-Zellen in RPMI/10% FCS mit 50 IU/ml IL-2. Zwar expandierten nach Anreicherung in allen drei Fällen Zellen innerhalb kurzer Zeit zu großen Zellzahlen (bis 9×10^7 an Tag 14 nach Secretion Assay), die Zellen sezernierten aber allesamt kein IFN- γ nach Stimulation mit dem CMV-Lysat (Analyse mittels intrazellulärem FACS).

Die Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus dem Blut CMV-seronegativer Donoren war also mit der Methode des IFN- γ Secretion Assay mit anschließender Expansion nicht möglich.

4.7. Generierung von EBV Peptid-spezifischen T-Zelllinien

4.7.1. Generierung von LMP2 und BMLF1 EBV Peptid-spezifischen T-Zelllinien

Um zu untersuchen, ob und inwieweit sich die entwickelte Strategie der Generierung CMV-spezifischer T-Zellen auch zur Generierung von EBV-spezifischen T-Zellen einsetzen lässt, wurden zunächst CD8⁺ T-Zelllinien generiert, die sich gegen die gut beschriebenen HLA-A*0201-Peptide CLGGLLTMV aus dem latenten Membranprotein 2 (LMP2) (Lee et al., 1993) und GLCTLVAML aus dem frühen lytischen Protein BMLF1 (Steven et al., 1997) richten.

Dazu wurden 1×10^8 PBMCs aus Buffy coats von drei gesunden, HLA-A*0201 positiven Blutspendern isoliert und mit den beiden HLA-A*0201-Peptiden CLGGLLTMV und GLCTLVAML stimuliert. Die Anreicherung der IFN- γ sezernierenden Zellen erfolgte mit dem IFN- γ Secretion Assay nach dem Labor-Protokoll, die Expansion der Zellen über 14 bzw. 15 Tage mit allogenen, gepoolten und bestrahlten PBMCs als Feeder-Zellen in RPMI mit 10% Humanserum und 50 IU/ml IL-2. Die Frequenz der Peptid-spezifischen CD8⁺ Lymphozyten wurde mittels Tetramer-FACS-Analyse sowohl in den PBMCs als auch in den angereicherten und expandierten Zellen bestimmt. Die Analyse der Funktionalität der generierten T-Zellen erfolgte mittels IFN- γ Nachweis (nach Peptidstimulation).

Die mit dem IFN- γ Secretion Assay angereicherten 1×10^5 - 2×10^5 Zellen expandierten innerhalb von 14 bzw. 15 Tagen zu durchschnittlich 2.3×10^7 (2.5×10^6 - 5×10^7) Zellen, und obwohl die PBMCs aller drei Donoren weder im Tetramer-FACS noch im intrazellulären IFN- γ Nachweis für eines der beiden Peptide spezifisch waren (Frequenz <0.1%), zeigten die isolierten und expandierten Zellen eine hohe Peptidspezifität für zumindest eines der beiden Peptide. So waren zwei der drei T-Zelllinien vor allem spezifisch für das Peptid CLGGLLTMV (94.24% und 83.76% Tetramer-positive CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, bzw. 25.5% und 24.36% IFN- γ -positive CD8⁺ T-Zellen nach Peptid-Stimulation), während die Spezifität für das Peptid GLCTLVAML eher gering war (0.42% und 1.50% Tetramer-positive CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen, bzw. 0.11% und 3.31% IFN- γ -positive CD8⁺ T-Zellen nach Peptid-

Stimulation) (Abb. 4.7.1.). Die dritte T-Zelllinie war hingegen vor allem GLCTLVAML-spezifisch (30.48% Tetramer-positive CD3+/CD8+ T-Zellen, bzw. 3.04% IFN- γ -positive CD8+ T-Zellen nach Peptid-Stimulation), die CLGGLLTMV-Spezifität war dafür weniger ausgeprägt (7.61% Tetramer-positive CD3+/CD8+ T-Zellen, bzw. 3.12% IFN- γ -positive CD8+ T-Zellen nach Peptid-Stimulation).

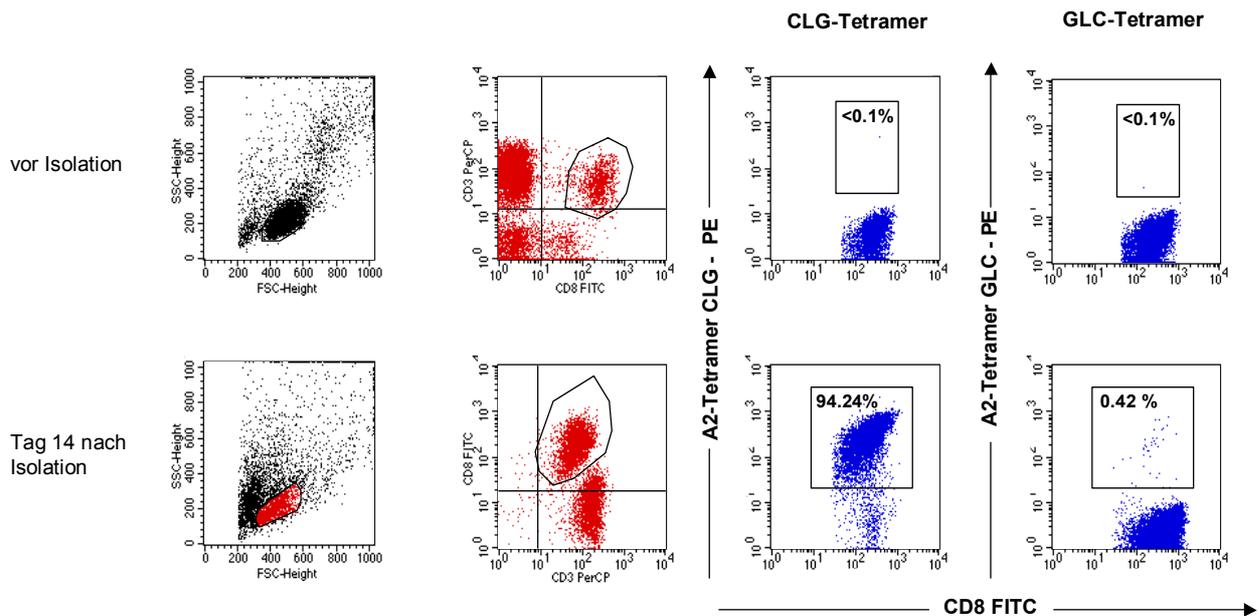


Abb. 4.7.1. Tetramer-FACS der PBMCs und der über 14 Tage expandierten Zellen eines Donors (ESA1). Die Tetramere waren komplexiert mit den Peptiden CLGGLLTMV (CLG) und GLCTLVAML (GLC).

Die eine Zelllinie mit vorwiegend CLGGLLTMV-spezifischen T-Zellen (83.76% Tetramer-positive CD3+/CD8+ T-Zellen, gegenüber 1.50% GLCTLVAML-Tetramer-positiven CD3+/CD8+ T-Zellen) wurde im Zytotoxizitätsassay gegen Peptid-gepulste Hodgkin-Zellen (HD-MYZ) getestet. Bei einem Effektor-Target-Verhältnis von 30:1 wurden 40.9% der CLGGLLTMV-gepulsten und 19.1% der GLCTLVAML-gepulsten HD-MYZ-Zellen lysiert. Von den HD-MYZ-Zellen ohne Peptid wurden lediglich 5.3% lysiert.

4.7.2. Generierung von LMP1 Peptid-spezifischen T-Zelllinien

Schliesslich wurden CD8⁺ T-Zelllinien generiert, die sich gegen die Peptide YLQQNWWTL und/oder YLLEMLWRL aus dem subdominanten latenten Membranprotein 1 (LMP1) (Khanna et al., 1998) richten.

1x10⁸ PBMCs aus Buffy coats von drei gesunden, HLA-A*0201 positiven Blutspendern wurden mit den beiden HLA-A*0201-Peptiden YLLEMLWRL und YLQQNWWTL stimuliert. Die Anreicherung der IFN- γ sezernierenden Zellen erfolgte mit dem IFN- γ Secretion Assay nach dem Labor-Protokoll, die Expansion der Zellen über 19 bzw. 20 Tage mit allogenen, gepoolten und bestrahlten PBMCs als Feeder-Zellen in RPMI mit 10% Humanserum und 50 IU/ml IL-2. Die Frequenz der Peptid-spezifischen CD8⁺ Lymphozyten wurde mittels Tetramer-FACS-Analyse sowohl in den PBMCs als auch in den angereicherten und expandierten Zellen bestimmt.

Die mittels IFN- γ Secretion Assay isolierten Zellen expandierten innerhalb von 19 bzw. 20 Tagen lediglich zu 1.1x10⁶ Zellen (2x10⁵ - 2.5x10⁶), waren aber spezifisch für das Peptid YLLEMLWRL. So waren 89.8% (78.7% - 92.6%) der generierten CD3⁺/CD8⁺ T-Zellen positiv für das YLLEMLWRL-Tetramer, YLQQNWWTL-spezifische T-Zellen konnten in keiner der drei Linien nachgewiesen werden (Frequenz <0.1%). Die PBMCs aller drei Donoren waren im Tetramer-FACS für keines der beiden Peptide spezifisch (Frequenz <0.1%)

Um die Expansionsrate der Zellen zu steigern, wurde versucht, die Zellen direkt nach Isolation über den IFN- γ Secretion Assay mit dem „Rapid expansion protocol“ (REP) zu vermehren (Riddell und Greenberg, 1990). Diese Methode war jedoch nicht erfolgreich: Die Zellen expandierten zwar zu hohen Zellzahlen, waren aber anschließend für keines der zur Stimulation eingesetzten Peptide spezifisch (Frequenz im Tetramer-FACS <0.1%, n=3).

Erfolgreich hingegen war die Strategie, die mittels IFN- γ Secretion Assay angereicherten Peptid-spezifischen T-Zellen zuerst 10 - 14 Tage lang nach dem herkömmlichen Protokoll mit allogenen, gepoolten und bestrahlten PBMCs als

Feeder-Zellen in RPMI mit 10% Humanserum und 50 IU/ml IL-2 zu expandieren und erst anschließend nach dem REP weiter zu vermehren. Die PBMCs wurden dafür nur mit dem Peptid YLLEMLWRL stimuliert. Nach Isolation und 11 - 14 Tagen Expansion nach dem herkömmlichen Protokoll konnten aus den PBMCs drei von drei Donoren YLLEMLWRL-spezifische T-Zellen generiert werden (87.65% (79.03% - 96.56%) Tetramer-positive CD3+/CD8+ T-Zellen bzw. 49.27% (39.12% - 56.62%) IFN- γ sezernierende CD3+/CD8+ T-Zellen nach Peptid-Stimulation) (Abb. 4.7.2.). Ein kleiner Teil der Zellen (2×10^5 – 1.5×10^6) wurde anschließend in das REP eingesetzt und weitere 10 - 13 Tage expandiert. Hochgerechnet auf alle Zellen ergaben sich so nach insgesamt 24 - 26 Tagen Kultur 2.47×10^9 (1.98×10^8 - 6.28×10^9) Zellen, die nach wie vor spezifisch waren. So waren 70.57% (23.62% - 97.28%) der CD3+/CD8+ T-Zellen Tetramer-spezifisch, die IFN- γ Produktion nach Peptid-Stimulation betrug 48.65% (8.12% - 61.57%) (Abb.4.7.2.). Die generierten Zellen eines Donors wurden im Zytotoxizitätsassay (Chrom-release assay) auf ihre Funktionalität überprüft. Dabei wurden 38.3% der mit dem Peptid YLLEMLWRL gepulsten HD-MYZ-Zellen lysiert (E:T 30:1), während die mit dem Kontrollpeptid YLQQNWWTL gepulsten HD-MYZ-Zellen nur zu 4.8% lysiert wurden.

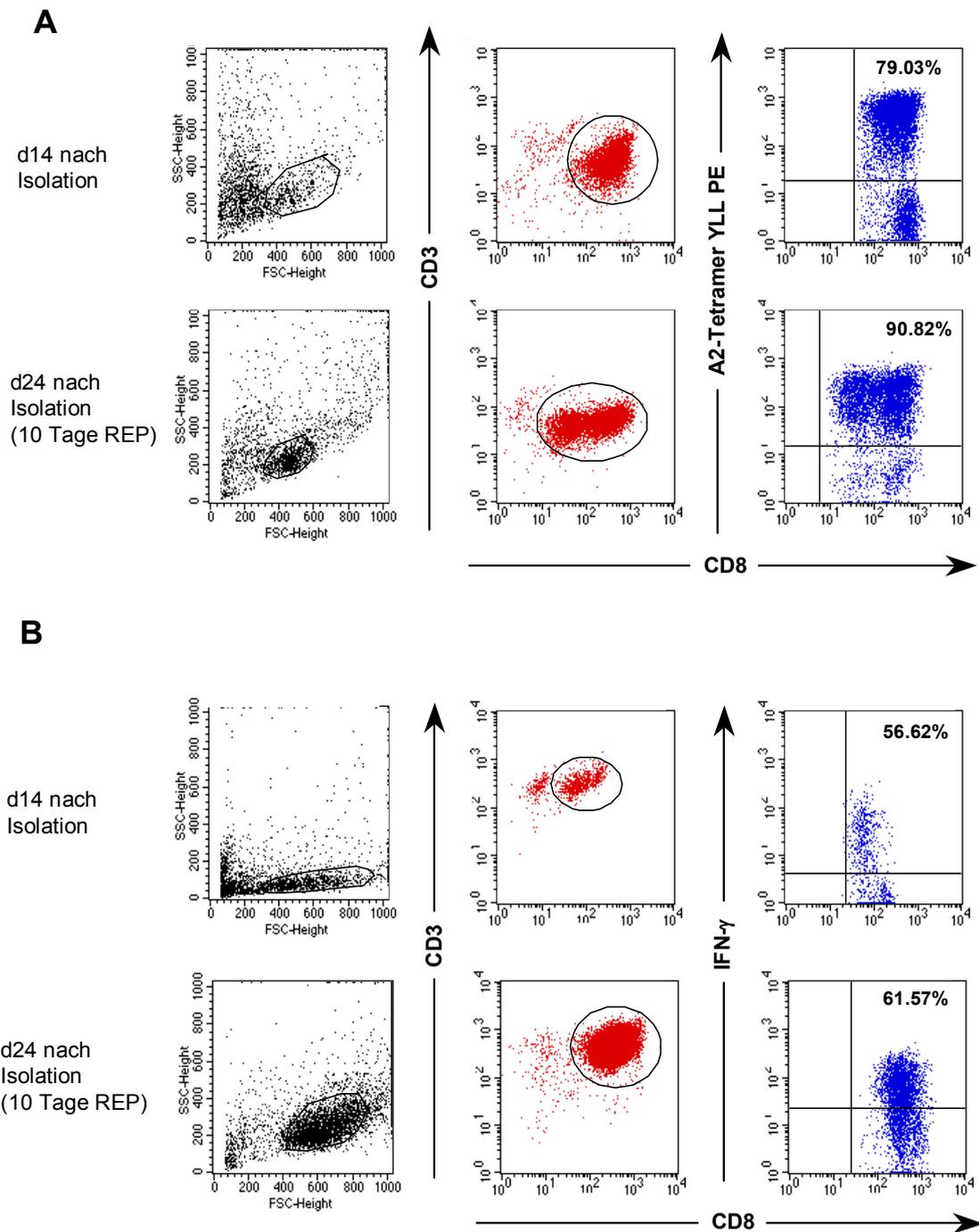


Abb. 4.7.2. Tetramer-FACS (A) und intrazellulärer IFN- γ Nachweis (B) YLLEMLWRL-spezifischer T-Zellen eines Donors, 14 bzw. 24 Tage nach Isolation. Die Zellen wurden die ersten 14 Tagen nach dem herkömmlichen Protokoll expandiert und anschließend 10 Tage mittels „rapid expansion protocol“ weiter vermehrt.

5. Diskussion

5.1. Generierung von HCMV/pp65 Peptid-spezifischen T-Zelllinien

In einer ersten Versuchsreihe sollte eine neue Strategie zur Generierung von virus-spezifischen T-Zellen erarbeitet werden, mit der die Nachteile der bereits beschriebenen Methoden umgangen werden können. So sollten zur Generierung keine infektiösen Materialien verwendet werden (Walter et al., 1995; Szmania et al., 2001) und es sollte innerhalb relativ kurzer Zeit eine für den adoptiven Transfer ausreichende Menge virus-spezifischer T-Zellen erzielt werden (Szmania et al., 2001; Kleihauer et al. 2001; Vannucchi et al., 2001; Peggs et al., 2001; Einsele et al., 2002).

Die Anreicherung von virus-spezifischen T-Zellen mit dem IFN- γ Secretion Assay (Manz et al., 1995) und die anschließende Expansion der isolierten Zellen mit Hilfe von Feeder-Zellen und IL-2 stellte dafür einen interessanten und erfolgsversprechenden Ansatz dar.

So gelang es, nach Stimulation von 1×10^8 - 2×10^8 PBMCs 10 gesunder, HLA-A*0201 CMV-seropositiver Donoren mit dem dominanten HCMV-Peptid NLVPMVATV (Diamond et al., 1997), über den IFN- γ Secretion Assay Zellen anzureichern und diese innerhalb von 17 (8 - 28) Tagen zu einer Zellzahl von $\geq 1 \times 10^7$ zu expandieren. Die Ausgangsfraktion der PBMCs enthielt 0.76% (<0.1% - 3.68%) Peptid-spezifische CD3+/CD8+ T-Zellen (Tetramer-FACS), die Tetramer-Frequenz der isolierten und über 13 - 42 Tage expandierten CD3+/CD8+ T-Zellen lag bei 88.2% (66.2% - 99.3%). Die Funktionalität der generierten CD8+ T-Zellen konnte durch IFN- γ Sekretion (88.7% (64.4% - 99.5 %) IFN- γ positive CD8+ T-Zellen nach Peptid-Stimulation, n=5) und spezifische Lyse von Peptid-gepulsten T2-Zellen (57.5% (22.2% - 80.7%), n=5) bzw. HCMV-infizierten Fibroblasten (49.1% (35.2% - 66.3%), n=3) gezeigt werden.

Die gewählte Strategie zur Generierung von HCMV/pp65 Peptid-spezifischen CTLs war somit sehr effektiv: Sie erzielte innerhalb kurzer Zeit eine große Anzahl an

spezifischen Zellen, die auch über eine längere Expansionszeit (bis 42 Tage) ihre Spezifität und Funktionalität behielten. Mit kleinen Änderungen des Protokolls wäre ein Einsatz der generierten Zellen für einen adoptiven Transfer bei HCMV-erkrankten Patienten nach allogener Stammzelltransplantation möglich.

5.2. Definition eines neuen HLA-A*0201 Peptides aus dem HCMV/IE1-Antigen

Das Phosphoprotein pp65 wurde als Hauptziel der HCMV-spezifischen CTL-Antwort identifiziert (Wills et al., 1996; Longmate et al., 2001; Mc Laughlin-Taylor et al., 1994) und die meisten HCMV Peptid-Epitope, die definiert wurden, stammen aus pp65. In letzter Zeit wurden aber bei einigen Donoren auch die Proteine IE1, pp150 und gB als dominante Ziele einer HCMV-spezifischen CTL-Antwort beschrieben (Gyulai et al., 2000; Kern et al., 1999; Tabi et al., 2001; Retiere et al., 2000; Khan et al., 2002). Um das Spektrum der CMV-spezifischen MHC Klasse I-Immunantwort zu erweitern, ist es daher wünschenswert, spezifische CD8+ T-Zellen auch gegen diese Antigene generieren zu können.

Ziel war es zunächst, ein HLA-A*0201-Peptid-Epitop aus dem HCMV/IE1-Antigen zu definieren, das bei Gesunden wie auch bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation von spezifischen CD8+ T-Zellen erkannt wird.

In den letzten Jahren konnte die Identifizierung von bisher unbekanntem viralen Peptid-Epitopen durch die Vorhersage von Peptiden hinsichtlich ihres MHC Klasse I-Motivs wesentlich verbessert werden (Solache et al., 1999; Hebart et al. 2002; Rammensee et al., 1999; Kern et al., 1998; Kern et al., 2000). Ob die Peptide, die an die MHC Klasse I-Moleküle binden, allerdings von der Zelle tatsächlich effizient prozessiert werden, ist damit weiterhin nicht geklärt (Ayyoub et al., 2002; Valmori et al., 1999). Basierend auf der Identifizierung der genauen C-Termini von MHC Klasse I-restringierten Peptiden mittels proteasomalem *in vitro* Verdau wurde daher eine neue immunologische Strategie beschrieben, die die Anzahl hochaffiner HLA-A2 Liganden von Tumor-Antigenen deutlich eingrenzt (Ayyoub et al., 2002; Nussbaum et al., 2001; Kessler et al., 2001).

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, brachte die Kombination der Computerbasierten Epitop-Vorhersage mit der Vorhersage proteasomaler Schnittstellen eine deutliche Verbesserung für die Identifizierung eines möglichen MHC Klasse I-Liganden aus dem HCMV/IE1-Antigen.

Vier der acht Peptide, die vom SYFPEITHI-Programm als am besten MHC Klasse I-bindend vorhergesagt wurden, zeigten im Peptidbindungstest eine hohe Bindungsaffinität für das HLA-A*0201-Molekül. Und während der C-Terminus nur eines dieser vier Peptide vom konstitutiven Proteasom als Schnittstelle vorhergesagt wurde, wurden die C-Termini von drei der vier Peptide als klare Kandidaten eines immunproteasomalen Verdaus identifiziert. Wichtiger noch: Beide PAProC Immunproteasom-Algorithmen identifizierten den C-Terminus des später definierten HLA-A*0201 restringierten HCMV/IE1-spezifischen T-Zell Epitops VLEETSVML als dominante Schnittstelle. Dies zeigt auch, dass die unabhängige Vorhersage von Schnittstellen, die durch das konstitutive Proteasom und durch das Immunproteasom verursacht werden, für die Identifizierung viraler T-Zell Epitope von großem Vorteil ist.

Mit einer ähnlichen Strategie wurden kürzlich HLA-B27 restringierte Peptide aus *Chlamydia trachomatis* definiert (Kuon et al., 2001).

Ein Grund für die Definition von pp65 als Hauptziel HCMV-spezifischer CTLs, könnte der Einsatz von Fibroblasten gewesen sein, die mit dem Labor-Stamm AD169 infiziert wurden (Wills et al., 1996; Longmate et al., 2000; Mc Laughlin-Taylor et al., 1994). So könnte einerseits in diesem spezifischen Kultursystem eine unphysiologische Überexpression von pp65 vorliegen, andererseits wurde beschrieben, dass pp65 die Prozessierung und Präsentation von IE1-Peptiden hemmt (Gilbert et al., 1996).

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten zeigen, auch in Übereinstimmung mit den Ergebnissen anderer Publikationen (Gyulai et al., 2000; Kern et al., 1999; Khan et al., 2002), dass in manchen gesunden HCMV-seropositiven Spendern IE1 Peptidspezifische CD8+ T-Zellen detektierbar sind und zwar in vergleichbaren oder sogar höheren Frequenzen als pp65 Peptidspezifische CD8+ T-Zellen. Insgesamt zeigten aber mehr Spender eine CD8+ T-Zellantwort gegen pp65 (18 von 24) als gegen IE1 (5 von 24).

Ähnlich sah das Verhältnis auch in den untersuchten Patientenproben aus, die zu einem späten Zeitpunkt nach Transplantation (>Tag 100) entnommen wurden. IE1 Peptid-spezifische T-Zellen waren in drei von elf Patienten nachweisbar, während bei zehn von elf Patienten pp65 Peptid-spezifische T-Zellen detektierbar waren. Ein Patient mit einer dominanten pp65 Peptid-spezifischen T-Zellantwort nach der ersten Transplantation zeigte 5 Monate nach einer zweiten Transplantation eine massive Expansion von IE1 Peptid-spezifischen T-Zellen. Dies zeigt, dass sich die Spezifität der HCMV-spezifischen T-Zellantwort über die Zeit auch verändern kann.

Dennoch stellt sich die Frage, warum CMV/IE-spezifische T-Zellen bei manchen Personen in solch hohen Frequenzen gefunden werden. Es ist denkbar, dass trotz Beeinflussung der IE-Präsentation durch pp65 in CMV-infizierten Zellen, T-Zellepitope aus dem IE-Antigen verfügbar sind um CD8+ T-Zellen zu „primen“. Die CMV-vermittelte Zelllyse und die Aufnahme von CMV-Proteinen durch unreife DCs könnte dabei möglicherweise der Hauptmechanismus für effizientes „Priming“ einer T-Zellantwort, spezifisch für neu synthetisierte Proteine, wie das IE-Protein, darstellen.

Die Persistenz IE-spezifischer CD8+ T-Zellen auf hohem Niveau könnte durch periodische CMV-Reaktivierung bedingt sein, was in den vorher latent infizierten Zellen, wie DCs oder Endothelzellen, zu einer Expression des IE-Proteins führt, noch bevor die Expression des späten Antigens pp65 die IE-Antigenprozessierung behindert (Toro et al., 1996; Docke et al., 1994).

Es scheint somit plausibel, dass zur Kontrolle der CMV-Reaktivierung CMV/IE-spezifische T-Zellen wesentlich beitragen. Der Transfer solcher CMV/IE-spezifischer T-Zellen kombiniert mit CMV/pp65-spezifischen T-Zellen in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation ohne CMV-Virämie könnte daher vorteilhaft sein und möglicherweise die CMV-Reaktivierung effektiver verhindern als der alleinige Transfer von CMV/pp65-spezifische T-Zellen.

5.3. Generierung von HCMV/IE1 Peptid-spezifischen T-Zelllinien

Im nächsten Schritt wurden nun spezifische T-Zellen gegen das neu definierte IE1-Peptid generiert. Dazu wurde das im ersten Teil dieser Arbeit erarbeitete Protokoll unter Einsatz des IFN- γ Secretion Assay angewendet.

Damit konnten von allen vier Donoren, die eine VLEETSVML-spezifische T-Zell Frequenz zeigten (>0.1% Tetramer-positive CD3+/CD8+ Lymphozyten) spezifische T-Zelllinien generiert werden. Wie die pp65 Peptid-spezifischen T-Zellen expandierten auch die IE1 Peptid-spezifischen T-Zellen innerhalb kurzer Zeit zu hohen Zellzahlen und waren im Tetramer-FACS nach zwei bis vier Wochen zwischen 42.6% und 98.6% VLEETSVML-spezifisch.

Die Verminderung bzw. Blockierung der IE1-Peptid-Präsentation in HCMV-infizierten Fibroblasten wurde bereits im letzten Abschnitt angesprochen. Sie hat darüber hinaus zur Folge, dass für einen Zytotoxizitätsassay HCMV-infizierte Fibroblasten keine geeigneten Zielzellen darstellen, weshalb eine Funktionalitätsprüfung der generierten T-Zelllinien nicht möglich war.

5.4. Generierung von CD4+ und CD8+ HCMV-spezifischen T-Zelllinien für den klinischen Einsatz

Es wurde schließlich eine Strategie erarbeitet, die, unter Berücksichtigung der bis dahin erzielten Erfahrungen mit dem IFN- γ Secretion Assay, die Generierung CD4+ und CD8+ HCMV-spezifischer T-Zelllinien für den klinischen Einsatz ermöglicht.

Um eine möglichst breite CMV-Immunantwort zu erhalten, wurde für die Stimulation der Zellen neben dem HLA-A2 restringierten pp65-Peptid NLVPMVATV auch das neu charakterisierte HLA-A2 IE1-Peptid VLEETSVML, sowie das HLA-B7 pp65-Peptid TPRVTGGGAM (Wills et al., 1996; Kern et al., 1998) eingesetzt. Um CD4+ CMV-spezifische T-Zellen generieren zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit CMV-Antigen stimuliert. Die Anreicherung der IFN- γ sezernierenden Zellen erfolgte dann über das System des CliniMACS unter Einsatz von Antikörpern, die für einen klinischen Einsatz geeignet sind. Für die anschließende Expansion der isolierten Zellen wurden die allogenen Feeder-Zellen durch autologe Feeder-Zellen ersetzt, als Mediumzusatz für die Zellkultur wurde autologes Serum des Spenders verwendet.

Mit diesem Protokoll war es möglich, aus den PBMCs einer 500 ml-Blutspende von acht zufällig ausgewählten CMV-seropositiven Donoren innerhalb von zehn Tagen im Durchschnitt 1.3×10^8 CMV-spezifische T-Zellen zu generieren. Die generierten T-Zelllinien waren sowohl CD4+ als auch CD8+ CMV-spezifisch, wie der intrazelluläre IFN- γ Nachweis zeigte, und CMV-infizierte Target-Zellen wurden effizient lysiert. Wichtiger noch: Die generierten CMV-spezifischen T-Zellen stellten keine terminal differenzierten CD4+ oder CD8+ T-Zellen dar. So führte eine Restimulation der Zellen mit CMV-Antigen zu mehreren Zellteilungen, wie die Verdünnung des CFSE-Farbstoffs in den entsprechenden Experimenten zeigte, sowie zu einer korrespondierenden Expansion der Zellen.

Somit könnten die generierten T-Zellen, wenn sie in einen Stammzelltransplantatempfänger transferiert würden, nach *in vivo* Stimulation mit CMV-Antigen präsentierenden Zellen weiter expandieren.

Die Anzahl der CMV-spezifischen T-Zellen, die für die Prävention und/oder Therapie eine CMV-Virämie benötigt werden, sowie deren notwendige Zusammensetzung

bezüglich des Verhältnisses von CD4⁺ T-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen, ist nach wie vor unklar. So erfolgte die Einführung der CMV-Immuntherapie mittels CD8⁺ T-Zellen durch adoptiven Transfer von bis zu $5 \times 10^9/m^2$ T-Zellklonen (Riddell et al., 1992). Eine länger anhaltende Immunität wurde dabei jedoch nur in Patienten mit endogener Rekonstitution CMV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen erzielt. Andererseits war der adoptive Transfer von $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ausreichend, eine CMV-Virämie zu beseitigen, allerdings nur bei den Patienten, bei denen eine endogene CD8⁺ T-Zellantwort auftrat (Einsele et al., 2002). Der Adoptive Transfer von $1 \times 10^7/m^2$ CD4⁺ und CD8⁺ EBV-spezifischen T-Zellen in Patienten, die ein T-Zell depletierendes Transplantationsregime erhalten hatten, führte zu einer lang anhaltenden Persistenz der transfundierten T-Zellen und verhinderte das Auftreten einer posttransplantär lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) (Heslop et al., 1996). Beobachtungen bei Mäusen zeigten, dass adoptiv transferierte antigen-spezifische T-Zellen auch Antigen-unabhängig eine homöostatische Proliferation durchlaufen und damit das nach allogener Stammzelltransplantation fehlende T-Zellkompartiment wieder auffüllen (Goldrath and Bevan, 1999). Dieses Prinzip wurde erst kürzlich in einer klinischen Studie angewendet, indem *ex vivo* expandierte autologe Tumorinfiltrierende Lymphozyten in Melanom-Patienten, die vorher eine T-Zell depletierende Konditionierung mit Fludarabin und Cyclophosphamid erhalten hatten, transferiert wurden (Dudley et al., 2002). Die übertragenen T-Zellen expandierten *in vivo* rasch und stellten in manchen Patienten bis zu 80% aller gemessenen CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut. Daher könnte der Transfer von virus-spezifischen T-Zellen zu einem frühen Zeitpunkt in Empfänger eines T-Zell depletierten Stammzelltransplantats zu einer schnellen Immunrekonstitution führen.

Durch den Transfer von Zellen, die aus Spenderblut gewonnen wurden, könnten auch alloreaktive T-Zellen übertragen werden, die, selbst in geringer Anzahl, eine schwere oder gar tödliche GvHD auslösen könnten, insbesondere, wenn Spender und Empfänger sich in mehr als einem HLA-Allel unterscheiden. Die extensive Kultivierung der T-Zellen oder die Generierung von T-Zellklonen könnte zwar alloreaktive T-Zellen vermeiden, andererseits besteht dann die Gefahr, dass die zu transferierenden virus-spezifischen T-Zellen schließlich nicht mehr teilbar sind. In der vorliegenden Arbeit wurden die generierten T-Zellen auf mögliche Alloreaktivität untersucht, indem isolierte CD4⁺ T-Zellen aus der PBMC-Fraktion und der isolierten

und expandierten Fraktion mit allogenen DCs stimuliert wurden. Es wurden dabei nur die CD4⁺ T-Zellen betrachtet, da diese wesentlich potentere Mediatoren einer Alloreaktivitätsreaktion darstellen als die CD8⁺ T-Zellen (Johnsen et al., 1992). Obwohl die eingesetzten allogenen DCs nicht MHC Klasse II typisiert werden, ist es doch wahrscheinlich, dass sich die Stimulator- und Effektor-Zellen in mindestens zwei, möglicherweise in drei MHC Klasse II-Antigenen unterscheiden.

Bei zwei von drei Spendern war die Alloreaktivität der generierten CD4⁺ T-Zellen stark vermindert, beim dritten Spender um über 95% reduziert, verglichen jeweils mit den angereicherten CD4⁺ T-Zellen der PBMC-Fraktion.

Andere Gruppen bestimmten die Alloreaktivität ihrer generierten T-Zelllinien mittels intrazellulärem IFN- γ Nachweis (Koehne et al., 2002) oder mit allogenen PHA-Blasten als Targets in einem Chrom-Release-Assay (Einsele et al., 2002). In beiden Fällen wurde mit den entsprechenden Tests eine starke Reduktion der Alloreaktivität festgestellt. Dennoch bleibt unklar, welches der beste Assay für die Untersuchung der generierten T-Zellen auf eine mögliche Alloreaktivität darstellt.

In Übereinstimmung mit anderen Berichten (Gillespie et al., 2002; Topp et al., im Druck) wurden im peripheren Blut von CMV-seropositiven HLA-A*0201 und/oder HLA-B*07XX Spendern hohe Frequenzen an CMV/pp65 spezifischen CD8⁺ T-Zellen gefunden. Bei den zwei Spendern, die sowohl HLA-A*0201 als auch HLA-B*07XX exprimieren, zeigte sich eine Dominanz der HLA-B*0702 CTL-Antwort gegenüber der HLA-A*0201 CTL-Antwort, was auch bereits in früheren Publikationen berichtet wurde (Hebart et al., 2002; Komanduri et al., 2002; Lacey et al., 2003).

Es zeigte sich auch hier wieder, dass bei einigen Spendern die Frequenz HLA-A*0201 restringierter CMV/IE spezifischen CD8⁺ T-Zellen höher ist als die der HLA-A*0201 restringierten CMV/pp65 spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Dies unterstreicht noch einmal die Bedeutung von IE-spezifischen T-Zellen für einen möglichen adoptiven Transfer.

5.5. Optimierung des klinischen Protokolls

Die Optimierung des Protokolls zur Generierung CMV-spezifischer T-Zellen für den klinischen Einsatz umfasste zwei wesentliche Punkte: Einerseits wurden zwei weitere HLA-B*07-Peptide, eines aus pp65 und eines aus dem IE1-Antigen, zur Generierung CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen eingesetzt. Andererseits wurden die PBMCs für die Generierung CMV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen mit rekombinantem pp65-Protein stimuliert.

5.5.1. Einsatz von weiteren CMV-Peptiden

Um das Spektrum der CMV-spezifischen CD8⁺ Immunantwort noch mehr zu erweitern, wurden für die Generierung von CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zelllinien zwei weitere, kürzlich beschriebene HLA-B*07-restringierte Peptide eingesetzt. Auch mit diesen Peptiden war die Generierung spezifischer CD8⁺ T-Zellen möglich, wenn auch nicht mit ganz so hoher Spezifität.

Außer für HLA-A2 und HLA-B7 sind mittlerweile für eine ganze Reihe weiterer HLA-Restriktionen (A1, A3, A11, A24, A68, B35, B44) CMV-Peptide beschrieben worden, gegen die sich eine spezifische T-Zellantwort richtet (Reddehase, 2002). Bei Einsatz dieser Peptide für die Generierung von CMV-spezifischen T-Zellen könnten über 95% der Kaukasier von einer solchen T-Zelltherapie profitieren.

5.5.2. Generierung von CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen mit rekombinantem CMV/pp65-Protein

Die Generierung von CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen mit CMV-Lysat stellt für den klinischen Einsatz ein Problem dar, da das CMV-Lysat nur zu ca. 10% aus viralen Proteinen besteht und in seiner Zusammensetzung sehr variabel und zudem schlecht charakterisiert ist. Daher wurde als Alternative die Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen mit rekombinantem CMV/pp65-Protein versucht. Zwar sezernierte eine mittels CMV-Lysat generierte T-Zelllinie nach Stimulation mit dem pp65-Protein deutlich weniger IFN- γ als nach Restimulation mit CMV-Lysat, die beiden Donoren, aus deren

PBMCs pp65-Protein spezifische T-Zellen generiert wurden, zeigten aber in der Ausgangsfraktion ein ähnliches, wenn nicht sogar besseres Ansprechen auf das pp65-Protein als auf CMV-Lysat. In beiden Fällen war die Generierung pp65-spezifischer T-Zellen möglich, wobei die IFN- γ Produktion der isolierten und expandierten Zellen nach Stimulation mit CMV-Lysat annähernd so hoch war wie nach Stimulation mit dem pp65-Protein. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Ergebnissen einer kürzlich durchgeführten Untersuchung (Kern et al., 2002), wonach sich die Hauptimmunantwort der CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen gegen das pp65-Antigen richtet. So zeigten 63% der getesteten Spender eine messbare CD4⁺-Antwort gegen dieses Protein und bei neun getesteten Donoren war die IFN- γ Produktion nach Stimulation mit einem pp65-Peptidpool ähnlich hoch wie nach Stimulation mit CMV-Lysat derselben Konzentration. Das Verhältnis der Immunantwort gegen pp65 und der Immunantwort gegen CMV-Lysat variierte aber auch hier deutlich zwischen den einzelnen Spendern, was vermuten lässt, dass zwar bei den meisten Individuen, jedoch nicht in allen, pp65 das Hauptziel der CMV-spezifischen CD4⁺-Immunantwort darstellt.

5.6. Generierung von EBV Peptid-spezifischen T-Zelllinien

Die Expression der EBV-Antigene ist bei den einzelnen EBV-assoziierten Erkrankungen sehr unterschiedlich. So wird beim Burkitt Lymphom als einziges virales Protein das Epstein-Barr nuclear Ag 1 (EBNA1) exprimiert. Dieses Expressionsmuster wird Latenztyp I genannt. Beim Latenztyp II, der beim Hodgkin Lymphom und beim nasopharyngealen Karzinom vorkommt, werden zusätzlich die beiden latenten Membranproteine LMP1 und LMP2 exprimiert. Die lytischen Proteine sowie die übrigen EBNA's (EBNA2, 3A und 3C) werden nur bei der posttransplantär lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD), dem Latenztyp III, exprimiert.

Die gängigen Protokolle zur Generierung EBV-spezifischer T-Zellen unter Einsatz von autologen LCLs (Rickinson et al., 1981) oder mittels selektiver Restimulation (Reali et al., 1996; Morgan et al., 1996) sind nicht dazu geeignet, die gewonnenen Zellen bei einer EBV-positiven Hodgkin-Erkrankung einzusetzen, da sich die wenigsten der so generierten T-Zell Klone gegen die erwähnten subdominanten

Epitope EBNA1, LMP1 und LMP2 richten. Als mögliche Ziele für adoptiv transferierte CD8⁺ T-Zellen bei Hodgkin-Patienten kommen nur LMP1 und LMP2 in Frage, da EBNA1 wegen seiner Glycin/Alanin Repeat-Sequenz nicht über MHC-Klasse I präsentiert werden kann (Leen et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnten unter Einsatz des IFN- γ Secretion Assays sowohl LMP1- als auch LMP2-Peptid-spezifische CD8⁺ T-Zellen generiert werden. Obwohl in den PBMCs von keinem der Spender spezifische T-Zellen für die getesteten Peptide detektierbar waren (Frequenz im Tetramer-FACS <0.1%), zeigten die generierten Zellen im Tetramer-FACS eine hohe Peptid-Spezifität und lysierten zudem Peptid-beladene Hodgkin-Zellen. Bei der Generierung der LMP2-spezifischen CD8⁺ T-Zellen mit dem herkömmlichen Expansionsprotokoll wurden zwar nur sehr geringe Zellzahlen erzielt, dieses Problem ließ sich aber durch die Anwendung des „Rapid expansion protocol“ (REP) beheben, so dass nach insgesamt 24 - 26 Tagen Kultur im Schnitt 2.47×10^9 Zellen erhalten wurden, die im Tetramer-FACS bis zu 97.28% Peptid-spezifisch waren. Das LMP1-Peptid YLQQNWWTL erwies sich dabei als ungeeignet, lediglich gegen das LMP1-Peptid YLLEMLWRL liessen sich spezifische T-Zellen generieren.

In einem nächsten Schritt muss nun überprüft werden, ob die generierten EBV-spezifischen T-Zellen auch natürlich prozessiertes Antigen erkennen, denn erst dann könnten sie in einem möglichen klinischen Protokoll zum Einsatz kommen. Dazu wird momentan die Hodgkin-Zelllinie HD-MYZ mit LMP1 retroviral transduziert, die dann als Target in einem Zytotoxizitätsassay eingesetzt wird. Alternativ können LMP1-spezifische T-Zellen dann auch generiert werden, indem die LMP1-transduzierte Zelllinie zur Stimulation von PBMCs EBV-postiiver Donoren verwendet wird.

Ein Problem bei der Generierung EBV-spezifischer T-Zellen aus Patientenblut könnte sein, dass einerseits nur eine begrenzte Zellzahl als Ausgangsmaterial zur Verfügung steht, andererseits wurde beschrieben, dass die Proliferation von CTL-Linien aus Patientenmaterial wegen suboptimaler Expression der TCR Zeta-Kette erniedrigt ist (Renner et al., 1996). Die Expansion der T-Zelllinien mittels des REP könnte sich daher auch in diesen Fällen als vorteilhaft erweisen.

6. Zusammenfassung

Die HCMV-Infektion stellt für Patienten nach allogener Stammzelltransplantation nach wie vor eine lebensbedrohliche Erkrankung dar. Da die medikamentöse Behandlung der HCMV-Infektion mit schweren Nebenwirkungen verbunden ist und zudem immer häufiger von Virustatika-resistenten HCMV-Stämmen berichtet wird, stellt die adoptive Immuntherapie eine wichtige alternative Therapieoption dar.

Die gängigen Protokolle zur Generierung CMV-spezifischer T-Zellen verwenden vermehrungsfähige Viren oder allogene Zellkulturzusätze, was die klinische Anwendbarkeit der generierten Zellen deutlich einschränkt. Die Expansion der T-Zellen dauert meistens mehrere Wochen bis Monate. Außerdem wurden in der Vergangenheit meist entweder nur CD4⁺ T-Zellen oder nur CD8⁺ T-Zellen eingesetzt, beide sind aber wichtig für die Effektivität und langanhaltende Persistenz der transferierten Zellen.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Protokoll entwickelt, das die Generierung CMV-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelllinien aus einer 500 ml Vollblutspende ermöglicht, wobei ausschließlich autologe Zell- und Serumkomponenten zum Einsatz kamen. Nach Stimulation von Spenderlymphozyten mit verschiedenen HLA-restringierten Peptiden sowie CMV-Antigen und Anreicherung der IFN- γ produzierenden Zellen mittels IFN- γ Secretion Assay, konnten in der anschließenden Kultur innerhalb von zehn Tagen eine für einen Transfer ausreichende Menge an T-Zellen gewonnen werden. Die generierten T-Zellen waren auch nach der Expansion hochspezifisch und weiterhin vermehrungsfähig. Die CMV-spezifische Immunantwort wurde noch erweitert, indem ein neues HLA-A*0201 Peptid aus dem IE-Antigen von HCMV definiert wurde, das bei einigen Spendern Ziel einer CMV-spezifischen CD8⁺ Immunantwort ist und gegen das sich ebenfalls spezifische T-Zellen generieren liessen. Da der Einsatz von CMV-Lysat für die klinische Anwendung der generierten CD4⁺ T-Zellen problematisch sein könnte, wurde in einem weiteren Schritt rekombinantes pp65-Protein als alternatives Stimulanz getestet und für geeignet befunden. Im letzten Teil der Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das erarbeitete Protokoll mit kleinen Änderungen der Expansionsbedingungen auch zur Generierung von EBV-spezifischen T-Zellen, insbesondere LMP1- und LMP2- Peptid-spezifischen

T-Zellen, einsetzen lässt. Der Transfer solcher T-Zellen stellt eine wichtige Therapieoption für Patienten mit EBV-positivem Hodgkin-Lymphom dar.

Die Spezifität und mögliche Alloreaktivität der generierten T-Zellen wurde zwar *ex vivo* mit verschiedenen Methoden bestimmt, erst in einer klinischen Studie, die nun als nächstes ansteht, kann aber letztlich die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der generierten und transferierten CD4+ und CD8+ CMV-spezifischen T-Zellen getestet werden. Das entwickelte Protokoll lässt sich dabei leicht an die erforderlichen GMP-Bedingungen anpassen, alle benötigten Reagenzien stehen in geeigneter Qualität zur Verfügung, auch entsprechende Reinräume sind vorhanden.

7. Literatur

- Alain S, Honderlick P, Grenet D, et al. Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation*. 1997;63:1533-1536
- Apperley JF, and Goldman JM. Cytomegalovirus: Biology, clinical features and methods for diagnosis. *Bone Marrow Transplant*. 1988;3:253-264
- Aschan J, Ringden O, Ljungman P, Lonnqvist B, and Ohlman S. Foscarnet for treatment of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients. *Scand J Infect Dis*. 1992;24:143-150
- Ayyoub M, Stevanovic S, Sahin U, et al. Proteasome-assisted identification of a SSX-2-derived epitope recognized by tumor-reactive CTL infiltrating metastatic melanoma. *J Immunol*. 2002;168:1717
- Bachmann MF, Kalinke U, Althage A, et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science*. 1997;276:2024
- Bailey TC, Buller NA, Ettinger NA, et al. Quantitative analysis of cytomegalovirus viremia in lung transplant recipients. *J Infect Dis*. 1995;171:1006
- Banchereau J, and Steinman RM. Dendritic cells and control of immunity. *Nature*. 1998;392:245
- Bein G, Bitsch A, Hoyer J, et al. A longitudinal prospective study of cytomegalovirus pp65 antigenemia in renal transplant recipients. *Transplant Int*. 1993;6:185
- Belich MP, Glynn RJ, Senger G, Sheer D, and Trosdale J. Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol*. 1994;4:769
- Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol*. 1994;12:735

- Bilgrami S, Aslanzadeh J, Feingold JM, et al. Cytomegalovirus viremia, viruria and disease after autologous peripheral blood stem cell transplantation: no need for surveillance. *Bone Marrow Transplant.* 1999;24:69
- Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM, Pettinger M, and Meyers JD. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood.* 1992;80:1358
- Bombi JA, Cardes A, Llebaria C, et al. Main autopsy findings in bone marrow transplant patients. *Arch Pathol Lab Med.* 1987;11:125
- Bowden RA, Digel J, Reed EC, and Meyers JD. Immunosuppressive effects of ganciclovir on in vitro lymphocyte responses. *J Infect Dis.* 1987;156:899
- Bowden RA, Fisher LD, Rogers K, Cays M, and Meyers JD. Cytomegalovirus (CMV)-specific intravenous immunoglobulin for the prevention of primary CMV infection and disease after marrow transplant. *J Infect Dis.* 1991;164:483
- Bowen EF, Emery VC, Wilson P, et al. Cytomegalovirus polymerase chain reaction viraemia in patients receiving ganciclovir maintenance therapy for retinitis. *AIDS.* 1998;12:605
- Boyum A. Separation of white blood cells. *Nature.* 1964;204:793
- Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H, et al. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4+ and CD8+ T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol.* 1999;29:4053
- Cella M, Sallusto F, and Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Op Immunol.* 1997;5:10
- Cerundolo V, Benham A, Braud V, et al. The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol.* 1997;27:336

- Chee MS, Bankier T, Beck S, et al. Analysis of the protein-coding content of the sequence of human cytomegalovirus strain AD169. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;154:125
- Chou S, Marousek G, Guentzel S, et al. Evolution of mutations conferring multidrug resistance during prophylaxis and therapy for cytomegalovirus disease. *J Infect Dis.* 1997;176:786
- Cwynarski K, Ainsworth J, Cobbold M, et al. Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2001;97:1232
- Diamond DJ, York J, Sun JY, Wright CL, and Forman SJ. Development of a candidate HLA-A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood.* 1997;90:1751
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, et al. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science.* 2002;298:850
- Eggers M, Bogner B, Agricola H, Kern HF, and Radsak K. Inhibition human cytomegalovirus maturation by brefeldin A. *Gen Virol.* 1992;73:2679
- Einsele H, Steidle M, Vallbracht A, Saal JG, Ehninger G, and Muller CA. Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique. *Blood.* 1991;77:1104
- Einsele H, Ehninger G, Hebart H, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood.* 1995;86:2815

- Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C, et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant.* 2000;25:757
- Einsele H, Roosnek E, Rufer N, et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 2002;99:3916
- Emanuel D, Cunningham I, Jules-Elysee K, et al. Cytomegalovirus pneumonia after bmt successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. *Ann Intern Med.* 1988;109:777
- Erice A, Gil-Roda C, Perez JL, et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 1997;175:1087
- Erice A. Resistance of human cytomegalovirus to antiviral drugs. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12:286
- Falk K, Rötzschke O, Stevanovic S, et al. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature.* 1991;351:290
- Farell HE, Vally H, Lynch DM, et al. Inhibition of natural killer cells by a cytomegalovirus MHC class I homologue in vivo. *Nature.* 1997;386:510
- Gahn B, Siller-Lopez F, Pirooz AD, et al. Adenoviral gene transfer into dendritic cells efficiently amplifies the immune response to LMP2A antigen: a potential treatment strategy for Epstein-Barr virus--positive Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer.* 2001;93:706
- Geleen JL, Wali MC, Wertheim P, and van der Noordaa J. Human cytomegalovirus DNA, molecular weight and infectivity. *J Virol.* 1978;26:813

- Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, and Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature*. 1996;383:720
- Gillespie GM, Wills MR, Appay V, et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol*. 2000;74:8140
- Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, and Pearson GR. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 1985;21:217
- Goldrath AW, Bevan MJ. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8+ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity*. 1999;11:183
- Gottschalk S, Edwards OL, Sili U, et al. Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. *Blood*. 2003;101:1905
- Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH, et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8(+) T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood*. 2001;98:1358
- Grigoleit U, Riegler S, Einsele H, et al. Human cytomegalovirus induces a direct inhibitory effect on antigen presentation by monocyte-derived immature dendritic cells. *Br J Haematol*. 2002;119:189
- Groettrup M, Kraft R, Kostka S, Standera S, Stohwasser R, and Kloetzel PM. *Eur J Immunol*. 1996;26:863
- Gyulai Z, Endresz V, Burian K, et al. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis*. 2000;181:1537

- Hebart H., Dagnik S., Stevanovic S., et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon- γ -enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2002;99:3830-3837
- Herbst H, Dallenbach F, Hummel M, et al. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:4766
- Heslop HE, Ng CY, Li C, Smith CA, et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med*. 1996;2:551
- Hisamatsu H, Shimbara N, Saito Y, et al. Newly identified pair of proteasomal subunits regulated reciprocally by interferon gamma. *J Exp Med*. 1996;183:1807
- Ho M. Advances in understanding cytomegalovirus infection after transplantation. *Transplant Proc*. 1994;26:7
- Inaba K, Young JW, and Steinman RM. Direct activation of CD8⁺ lymphocytes by dendritic cells. *J Exp Med*. 1987;166:182
- Johnsen HE, Bostrom L, Moller J, Jorgensen JA, Jensen L, Ringden O. A study of donor alloreactivity, which may predict acute graft-versus-host disease in HLA identical bone marrow transplantations for early leukaemia. *Scand J Immunol*. 1992;35:353
- Jonjic S, Pavic I, Polic B, Crnkovic I, Lucin P, and Koszinowski UH. Antibodies are not essential for the resolution of primary cytomegalovirus infection but limit dissemination of recurrent virus. *J Exp Med*. 1994;179:1713

- Keay S, Rasmussen L, and Merigan T. Syngeneic monoclonal anti-idiotypic antibodies which bear the internal image of human cytomegalovirus neutralization epitope. *J Immunol.* 1988;140:944
- Kern F, Sural IP, Brock C, et al. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med.* 1998;4:975
- Kern F, Sural IP, Faulhaber N, Frommel C, et al. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol.* 1999;73:8179
- Kern F, Faulhaber N, Frommel C, et al. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol.* 2000;30:1676
- Kern F, Bunde T, Faulhaber N, et al. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis.* 2002;185:1709
- Kessler JH, Beekman NJ, Bres-Vloemans SA, et al. Efficient identification of novel HLA-A(*)0201-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes in the widely expressed tumor antigen PRAME by proteasome-mediated digestion analysis. *J Exp Med.* 2001;193:73
- Khan N, Cobbold M, Keenan R, and Moss PA. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis.* 2002;185:1025
- Khanna R, Burrows SR, Nicholls J, and Poulsen LM. Identification of cytotoxic T cell epitopes within Epstein-Barr virus (EBV) oncogene latent membrane protein 1 (LMP1): evidence for HLA A2 supertype-restricted immune recognition of EBV-infected cells by LMP1-specific cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 1998;28:451

- Kienzle N, Sculley TB, Poulsen L, et al. Identification of a cytotoxic T-lymphocyte response to the novel BAF0 protein of Epstein-Barr virus: a critical role for antigen expression. *J Virol.* 1998;72:6614
- Kleihauer A, Grigoleit U, Hebart H, et al. *Ex vivo* generation of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells by peptide-pulsed dendritic cells. *Brit J Haematol.* 2001;113:231
- Koehne G, Smith KM, Ferguson TL, et al. Quantitation, selection, and functional characterization of Epstein-Barr virus-specific and alloreactive T cells detected by intracellular interferon-gamma production and growth of cytotoxic precursors. *Blood.* 2002;99:1730
- Komanduri KV, Ozdemir E, Gillespie GM, et al. Definitive evidence for an immunodominance hierarchy in the human CD8⁺ T-cell response to Cytomegalovirus [Abstract]. *Blood.* 2002;100:5209a
- Kos FJ, and Engleman EG. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol Today.* 1996;17:174
- Krause H, Hebart H, Jahn G, Muller CA, and Einsele H. Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant.* 1997;19:1111
- Kropshofer H, Arndt SO, Moldenhauer G, Hämmerling GJ, and Vogt AB. HLA-DM acts as a molecular chaperone and rescues empty HLA-DR molecules at lysosomal pH. *Immunity.* 1997;6:293
- Kuon W, Holzhutter HG, Appel H, et al. Identification of HLA-B27-restricted peptides from the *Chlamydia trachomatis* proteome with possible relevance to HLA-B27-associated diseases. *J Immunol.* 2001;167:4738
- Kuttler C, Nussbaum AK, Dick TP, Rammensee HG, Schild H, and Haderl KP. An algorithm for the prediction of proteasomal cleavages. *J Mol Biol.* 2000;298:417

- Lacey SF, et al. Relative dominance of HLA-B*07 restricted CD8(+) T-Lymphocyte immune responses to human cytomegalovirus pp65 in persons sharing HLA-A*02 and HLA-B*07 alleles. *Hum Immunol.* 2003;64:440
- Lee SP, Thomas WA, Murray RJ, et al. HLA A2.1-restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein-Barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein LMP2. *J Virol.* 1993;67:7428
- Leen A, Meij P, Redchenko I, et al. Differential immunogenicity of Epstein-Barr virus latent-cycle proteins for human CD4(+)T-helper 1 responses. *J Virol.* 2001;75:8649
- Liu YN, Klaus A, Kari B, Stinski MF, Eckhardt J, and Gehrz RC. The N-terminal 513 amino acids of the envelope glycoprotein gB of human cytomegalovirus stimulates both B- and T-cell immune responses in humans. *J Virol.* 1991;65:644
- Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, and Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol.* 2001;2:585
- Ljungman P, Deliliers GL, Platzbecker U, et al. 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;97:388
- Ljungman P, Engelhard D, Link H, et al. Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group. *Clin Infect Dis.* 1992;14:831
- Ljungman P, Lonnqvist B, Wahren B, Ringden O, and Gahrton G. Lymphocyte responses after cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients a one-year follow-up. *Transplantation.* 1985;40:515
- Longmate J, York J, La Rosa C, et al. Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics.* 2001;52:165

- Magrath I, Jain V, and Bhatia K. Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. *Semin Cancer Biol.* 1992;3:285
- Manz R, Assenmacher M, Pfluger E, Miltenyi S, and Radbruch A. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:1921
- Mc Laughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ, et al. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol.* 1994;43:103
- Meyer H, Sundqvist VA, Pereira L, and Mach M. Glycoprotein gp116 of human cytomegalovirus contains epitopes for strain-common and strain-specific antibodies. *J Gen Virol.* 1992;73:2375
- Meyers ED, Flournoy N, and Thomas E. Risk factors for cytomegalovirus infection after human bone marrow transplantation. *J Infect Dis.* 1986;153:478
- Mocarski ES Jr. The human herpesviruses. Raven press, Ltd, New York 1993. Chapter 5:173-210
- Mocarski ES. Cytomegalovirus and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds.) *Fields Virology*, 3rd ed., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996:2447-2492
- Morgan SM, Wilkinson GW, Floettmann E, Blake N, and Rickinson AB. A recombinant adenovirus expressing an Epstein-Barr virus (EBV) target antigen can selectively reactivate rare components of EBV cytotoxic T-lymphocyte memory in vitro. *J Virol.* 1996;70:2394
- Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, and Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood.* 2002;99:2913

- Nussbaum AK, Kuttler C, Hadelers KP, Rammensee HG, and Schild H. PAPProC: a prediction algorithm for proteasomal cleavages available on the WWW. *Immunogenetics*. 2001;53:87
- Oudejans JJ, van den Brule AJ, Jiwa NM, et al. BHRF1, the Epstein-Barr virus (EBV) homologue of the BCL-2 protooncogene, is transcribed in EBV-associated B-cell lymphomas and in reactive lymphocytes. *Blood*. 1995;86:1893
- Peggs K, Verfuert S, and 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;97:994
- Raab-Traub N. Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 1992;3:297
- Raftery MJ, Schwab M, Eibert SM, Samstag Y, Walczak H, and Schonrich G. Targeting the function of mature dendritic cells by human cytomegalovirus: a multilayered viral defense strategy. *Immunity*. 2001;15:997
- Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NP, Bachor OA, and Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999;50:213
- Ranieri E, Herr W, Gambotto A, et al. Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B: a new modality for vaccination. *J Virol*. 1999;73:10416
- Rasmussen L, Matkin C, Spaete R, Pacht C, and Merigan TC. Antibody response to human cytomegalovirus glycoproteins gB and gH after natural infection in humans. *J Infect Dis*. 1991;164:835
- Rasmussen L, Resta S, and Merigan T. Human cytomegalovirus glycoprotein-receptor interactions. *Transplant Proc*. 1991;23:60

- Rasmussen L, Zipeto D, Wolitz RA, Dowling A, Efron B, and Merigan TC. Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. *J Infect Dis.* 1997;176 :1146
- Reali E, Guerrini R, Giori B, et al. Activation of epitope-specific memory cytotoxic T lymphocyte responses by synthetic peptides. *Clin Exp Immunol.* 1996;105:369
- Reddehase MJ. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol.* 2002;2:831
- Reed EC, Bowden PS, Dandliker KE, Lilleby KE, and Meyers JD. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bmt. *Ann Intern Med.* 1988;109:783
- Reed EC, Wolford JL, Kopecky KJ, et al. Ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus gastroenteritis in bone marrow transplant patients. A randomized, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* 1990;289:1
- Reid SD, Penna G, and Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2000;12:114
- Renner C, Ohnesorge S, Held G, et al. T cells from patients with Hodgkin's disease have a defective T-cell receptor zeta chain expression that is reversible by T-cell stimulation with CD3 and CD28. *Blood.* 1996;88:236
- Retiere C, Prod'homme V, Imbert-Marcille BM, Bonneville M, et al. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins : a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol.* 2000;74:3948
- Reusser P, Riddell SR, Meyers JD, and 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;78:1373

- Rickinson AB, Moss DJ, Allen DJ, Wallace LE, Rowe M, and Epstein MA. Reactivation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells by in vitro stimulation with the autologous lymphoblastoid cell line. *Int J Cancer*. 1981;27:593
- Rickinson AB, and Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:405
- Riddell SR, and Greenberg PD. The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells. *J Immunol Methods*. 1990;128:189
- Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, and Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science*. 1992;257:238
- Ridge JP, Di Rosa F, and Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998;393:474
- Rock KL, Gamble S, Rothstein L, and Benacerraf B. Reassociation with beta 2-microglobulin is necessary for Db class I major histocompatibility complex binding of an exogenous influenza peptide. *Proc Natl Acad Sci*. 1991;88:301
- Rötzschke O, Falk K, Deres K, et al. Isolation and analysis of naturally processed viral peptides as recognized by cytotoxic T cells. *Nature*. 1990; 348:252
- Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood*. 1998;92:1549
- Saltzman RL, Quirk MR, and Jordan MC. Disseminated cytomegalovirus infection. Molecular analysis of virus and leucocyte interactions in viremia. *J Clin Invest*. 1988;81:75

- Saper MA, Björkman PJ, and Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol.* 1991;219:277
- Sarawar SR, Lee BJ, Reiter SK, and Schoenberger SP. Stimulation via CD40 can substitute for CD4 T cell function in preventing reactivation of a latent herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:6325
- Schmidt GM, Horak DA, Niland JC, Duncan SR, Forman SJ, and Zaia JA. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *N Engl J Med.* 1991;324:1005
- Schmidt GM. Treatment of CMV infections and disease in transplantation. *Transplant Proc.* 1991;23(3 Suppl. 3):126
- Schmidt U, Metz KA, Soukou C, and Quabeck K. The association of pulmonary CMV infection with interstitial pneumonia after bone marrow transplantation. Histopathological and immunohistochemical findings in 104 autopsies. *Zentralbl Pathol.* 1993;139:225
- Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, and Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature.* 1998;393:480
- Schrier RD, Nelson JA, and Oldstone MBA. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural infection. *Science.* 1985;230:1048
- Smith IL, Cherrington JM, Jiles RE, Fuller MD, Freeman WR, and Spector SA. High-level resistance of cytomegalovirus to ganciclovir is associated with alterations in both the UL97 and DNA polymerase genes. *J Infect Dis.* 1997;176:69
- Smith MG. Propagation in tissue cultures of cytopathogenic virus from human salivary gland virus disease. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995;92:424

- Solache A, Morgan CL, Dodi AI, et al. Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus. *J Immunol.* 1999;163:5512
- Spector SA, Wong R, Hsia K, Pilcher M, and Stempien MJ. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *J Clin Invest.* 1998;101:497
- Steimle V, Otten LA, Zufferey M, and Mach B. Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell.* 1993;75:135
- Steinmann RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol.* 1991;9 :271
- Stern LJ, Brown JH, Jardetzky TS, et al. Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature.* 1994;368:215
- Stevanovic S, and Jung G. Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Annal Biochem.* 1993;212:212
- Steven NM, Annels NE, Kumar A, Leese AM, Kurilla MG, and Rickinson AB. Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med.* 1997;185:1605
- Stoltze L, Dick TP, Deeg M, Pömmerl B, Rammensee HG, and Schild H. Generation of the vesicular stomatitis virus nucleoprotein cytotoxic T lymphocyte epitopes requires proteasome-dependent and -independent proteolytic activities. *Eur J Immunol.* 1998;28:4029
- Su Z, Peluso MV, Raffegerst SH, Schendel DJ, and Roskrow MA. The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease. *Eur J Immunol.* 2001;31:947

- Szmania S, Galloway A, Bruorton M, et al. 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;98:505
- Tabi Z, Moutaftsi M, and Borysiewicz LK. Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J Immunol*. 2001;166:5695
- Thomas JA, Allday MJ, and Crawford DH. Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders in immunocompromised individuals. *Adv Cancer Res*. 1991;57:329
- Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, et al. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med*. 2001;194:1
- Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD. Restoration of CD28 expression in CD28-CD8+ memory effector T-cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med*. In press.
- Toro AI, Ossa J. PCR activity of CMV in healthy CMV-seropositive individuals: does latency need redefinition? *Res Virol*. 1996;147:233
- Trenschel R, Ross S, Husing J, et al. Reduced risk of persisting cytomegalovirus pp65 antigenemia and cytomegalovirus interstitial pneumonia following allogeneic PBSCT. *Bone Marrow Transplant*. 2000;25:665
- Tyms AS, Davis JM, Jeffries DJ, and Meyers JD. BWB759U, an analogue of acyclovir, inhibits human cytomegalovirus in vitro. *Lancet*. 1984;2:924
- Valmori D, Gileadi U, Servis C, et al. Modulation of proteasomal activity required for the generation of a cytotoxic T lymphocyte-defined peptide derived from the tumor antigen MAGE-3. *J Exp Med*. 1999;189:895

- Vannucchi AM, Glinz S, Bosi A, Caporale R, and 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. *Brit J Haematol.* 2001;113:479
- Waldrop SL, Davis KA, Maino VC, and Picker LJ. Normal human CD4⁺ memory T cells display broad heterogeneity in their activation threshold for cytokine synthesis. *J Immunol.* 1998;161:5284
- Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, et al. 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;333:1038
- Walthen M, and Stinski M. Temporal patterns of human cytomegalovirus transcription: mapping the viral RNAs synthesized at immediate early, early and late times after infection. *J Virol.* 1982;41:462
- Watts C. Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:821
- Weber B, Klinghardt U, Lux A, Braun W, Rabenau H, and Doerr HW. Detection of neutralizing antibodies against human cytomegalovirus: influence of strain variation. *J Med Virol.* 1993;40:28
- Weiss LM, Movahed LA, Warnke RA, and Sklar J. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med.* 1989;320:502
- Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K, et al. The human cytotoxic (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol.* 1996;70:7569

Wingard JR, Piantadosi S, Burns WH, Zahurak ML, Santos GW, and Saral R. Cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients given intensive cytoreductive therapy. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl. 7:793

Winston DJ, Ho WG, and Champlin RE. Cytomegalovirus infection after allogeneic bmt. *Rev Infect Dis.* 1990;12 Suppl. 7:776

8. Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
CFSE	Carboxyfluoreszeinsuccimidylester
CTL	Zytotoxische T-Zelle (cytotoxic T- lymphocyte)
DC	Dendritische Zelle (dendritic cell)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiammintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (fluorescent activated cell sorter)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus host disease
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen
IE	Immediate early
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (lymphoblastoid cell line)
LMP	Latentes Membranprotein
MACS	Magnet-assoziierte Zellsortierung (magnetic associated cell sorting)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MLC	Gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocyte culture)
NK	Natürliche Killer
PBMC	Periphere Blutmononukleäre Zelle (periphere blood mononuclear cell)
PBS	Phosphatgepufferte Saline (phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin

PerCP	Peridinin Chlorophyllprotein
pp	Phosphoprotein
RT	Raumtemperatur
SCT	Stammzelltransplantation (stem cell transplantation)
SI	Stimulationsindex
TCR	T-Zellrezeptor (T-cell receptor)
TNF	Tumornekrosefaktor

9. Publikationsliste

1. Einsele H, Rauser G, Grigoleit U, Hebart H, Sinzger C, Riegler S, Jahn G. Induction of CMV-specific T-cell lines using Ag-presenting cells pulsed with CMV protein or peptide. *Cytotherapy*. 2002;4:49-54
2. Hebart H, Daginik S, Stevanovic S, Grigoleit U, Dobler A, Baur M, Rauser G, Sinzger C, Jahn G, Loeffler J, Kanz L, Rammensee HG, Einsele H. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood*. 2002;99:3830-7
3. Bissinger AL*, Rauser G*, Hebart H, Frank F, Jahn G, Einsele H. Isolation and expansion of human cytomegalovirus- specific cytotoxic T lymphocytes using interferon-gamma secretion assay. *Exp Hematol*. 2002;30:1178-84
4. Loeffler J, Bauer R, Hebart H, Douek DC, Rauser G, Bader P, Einsele H. Quantification of T-cell receptor excision circle DNA using fluorescence resonance energy transfer and the LightCycler system. *J Immunol Methods*. 2002;271:167-75
5. Hebart H*, Rauser G*, Stevanovic S, Haenle C, Nussbaum AK, Meisner C, Bissinger AL, Tenzer S, Jahn G, Loeffler J, Rammensee HG, Schild HJ, Einsele H. A CTL Epitope From HCMV IE1 Defined By Combining Prediction Of HLA Binding And Proteasomal Processing Is The Target Of Dominant Immune Responses In Patients After Allogeneic SCT. *Exp Hematol*. In Druck
6. Rauser G, Sinzger C, Wernet D, Kuntz G, Assenmacher M, Campbell JDM, Einsele H, Topp MS. Rapid generation of combined CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell lines for adoptive transfer into allogeneic stem cell transplant recipients. Eingereicht

* both authors contributed equally

10. Danksagung

Danken möchte ich ganz herzlich Herrn Prof. Dr. Hermann Einsele für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung, die Freundlichkeit und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee gilt mein Dank für die Begutachtung der Arbeit sowie zahlreiche wertvolle Hinweise.

Durch die Zusammenarbeit mit Dr. Max Topp ist meine Arbeit wesentlich vorangekommen. Ihm möchte ich ganz besonders für sein unermüdliches Engagement, seine wertvolle Kritik und seine Begeisterungsfähigkeit danken.

Herrn PD Dr. Holger Hebart danke ich für die Zusammenarbeit und die Unterstützung meiner Arbeit.

Allen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor, insbesondere Jürgen, Gaby, Friederike, Olaf, Christina, Horst, Elenie, Ingrid, Ingeborg, Uli, Lennart, sowie zahlreichen Doktorandinnen, Doktoranden und Diplomanden, möchte ich für die Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima danken.

Weiterhin möchte ich mich auch bei allen Kooperationspartnern (Dr. Christian Sinzger und Dr. Susanne Riegler aus der Virologie, PD Dr. Stefan Stevanovic aus der Immunologie, Prof. Dr. Dorothee Wernet aus der Transfusionsmedizin, sowie Dr. Mario Assenmacher und Dr. John Campbell von der Firma Miltenyi Biotec) für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Ganz besonderen Dank verdienen meine Eltern, die mich all die Jahre hindurch in jeglicher Hinsicht unterstützt haben und nie an meinen Fähigkeiten zweifelten. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

Nicht zuletzt gilt mein Dank auch meiner Frau Judith und unserer Tochter Emma, die mich immer wieder ermutigt haben und es mir stets nachsahen, wenn ich an so manchen Wochenenden „meinen Zellen“ mehr Aufmerksamkeit schenkte als ihnen.

11. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Ich danke meinen akademischen Lehrerinnen und Lehrern

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon

Frau Prof. Dr. G. Drews

Herrn Prof. Dr. L. Heide

Herrn Prof. Dr. K.-A. Kovar

Herrn Prof. Dr. P.C Schmidt

Herrn Prof. Dr. J.E. Schultz

Herrn Prof. Dr. M. Wahl

12. Tabellarischer Lebenslauf

von

Georg Rauser, geboren am 19.02.1975 in Oberndorf am Neckar

Schule:	1981-1985	Grundschule, Deißlingen
	1985-1994	Albertus-Magnus-Gymnasium, Rottweil
	06/1994	Abitur
Zivildienst:	1994-1995	Familienerholungswerk FEW, Schramberg-Sulgen
Studium:	1995-2000	Pharmaziestudium an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
	11/2000	Approbation als Apotheker
Praktikum:	11/1999 - 10/2000	Je 6 Monate Pharmazie-Praktikant in der Widder-Apotheke, München und in der Apotheke des Universitätsklinikums, Tübingen
Doktorarbeit:	01/ 2001 - 09/ 2003	Universitätsklinik Tübingen, AG Prof. Dr. H. Einsele, Titel: "Generierung von virus-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer"

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Georg Rauser
Kirchgasse 2
72070 Tübingen