

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Einsele**

**Analyse zur Kreuzreaktivität von CMV IE-1 VLEETSVML
(316-324) spezifischen T-Zellen gegen hämatologische
Neoplasien in gesunden Spendern**

**Analysis of cross-reactivity of CMV IE-1 VLEETSVML
(316-324) specific T-cells against hematologic
neoplasms in healthy donors**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von**

**Katharina Merker
aus Würzburg
Würzburg, 01.07.2018**

Referent: Priv. Doz. Dr. Götz Ulrich Grigoleit

Koreferent: Prof. Dr. Matthias Eyrich

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2019

Die Promovendin ist Ärztin.

„Erfolg hat drei Buchstaben:

TUN“

Johann Goethe

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation	1
1.1.1 Allogene Stammzelltransplantation.....	2
1.1.2 Maligne hämatologische Erkrankungen.....	4
1.1.3 Graft-versus-Host Reaktion	5
1.1.4 Graft-versus-Leukämie Effekt	7
1.2 Immunologische Reaktionen der T-Lymphozyten	8
1.2.1 Haupthistokompatibilitätskomplex: MHC-Klasse I und II Proteine...	9
1.2.2 Alloreaktivität der T-Lymphozyten	10
1.2.3 Kreuzreaktivität der T-Lymphozyten.....	12
1.2.4 Antigen Kreuzpräsentation der dendritischen Zellen	15
1.3 Das humane Cytomegalovirus	17
1.3.1 Reaktivierung des CMV nach allogener Stammzelltransplantation ...	18
1.4 Fragestellung und Ziel	21

2 Material

2.1 Geräte	22
2.2 Verbrauchsmaterial	22
2.3 Reagenzien	22
2.4 Lösungen und Kulturmedien.....	23
2.5 Monoklonale Antikörper und Peptide / Peptidmixe	24
2.6 Chemikalien und Kits.....	26

3 Methoden

3.1 Isolation der PBMCs aus EDTA Blut.....	27
3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen	27
3.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer	27
3.4 Gewinnung von Allopool-Fütter-Zellen	28
3.5 Screening nach geeigneten Spendern	28

3.5.1	CMV IE-1-HLA-A*0201–Streptamer Färbung in Spendervollblut.....	28
3.5.2	CMV IE-1-HLA-A*0201–Pentamer Färbung in Spendervollblut.....	29
3.5.3	CMV IE-1-HLA-A*0201–Tetramer Färbung in Spendervollblut	29
3.5.4	Intrazelluläre Färbung mit Nachweis von IFN γ und CD107a in frisch isolierten PBMCs	30
3.6	Kultivierung der CMV IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 spezifischen Lymphozyten	31
3.7	Kontrolle der CD137 Expression in den IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen	31
3.8	CD137 Isolation mittels magnetischer Zellseparation.....	32
3.9	Expansion der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mithilfe der Allopool-Fütter-Zellen.....	34
3.10	CD14 Monozyten Selektion mittels Miltenyi Kit.....	34
3.11	Generierung von dendritischen Zellen	35
3.12	Phänotypisierung der reifen dendritischen Zellen	36
3.13	CD137 Färbung der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen nach Kultivierung mit den Allopool-Fütter-Zellen.....	36
3.14	Nachweis der IFNγ und CD107a-Aktivität in IE-1 VLEETSVML Lymphozyten.....	36
3.14.1	Peptidbeladung der ausgereiften dendritischen Zellen	37
3.14.2	Peptidstimulation der CMV IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 spezifischen T-Zellen mit Nachweis von IFN γ und CD107a.....	37
3.14.3	Charakterisierung der CMV IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 spezifischen Lymphozyten durch Nachweis der Induktion der IFN γ - und der indirekten Perforin Produktion mittels der Durchflusszytometrie	36

4 Ergebnisse

4.1	Vergleich der Screeningverfahren: Multimere vs. Funktionalitätstest	40
4.2	Anzahl von IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Zellen im Vergleich zu pp65-A2 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen.....	46
4.3	Phänotypisierung der reifen dendritischen Zellen.....	49

4.4 Expansion und Anreicherung der IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten	51
4.4.1 Kontrolle der CD137 Expression der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen.....	52
4.4.2 CD137 Isolation der spezifischen IE-1 VLEETSVML Lymphozyten und die Expansion mit Allopool-Fütter-Zellen	54
4.4.3 Kontrolle der CD137 Expression der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen Tag 14 nach Expansion mit Allopool-Fütter-Zellen.....	56
4.5 Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten mit Tumor assoziierten Antigenen	57
5 Diskussion	64
6 Zusammenfassung / Summary.....	69
7 Literaturverzeichnis	72

1 Einleitung

1.1 Stammzelltransplantation

Die Therapieoptionen bei malignen Erkrankungen sind vielfältig. Neben einer hochdosierten Zytostatika- und Radiotherapie besteht die Option einer Stammzelltransplantation, mit dem Ziel der Kuration der malignen Neoplasie.

Bei der Stammzelltransplantation werden Stammzellen eines passenden Spenders auf den myeloablativ vorbehandelten Empfänger, d. h. der vorab Zytostatika und/ oder Radiotherapie erhalten hat, übertragen.

Hierbei kann der erwünschte Graft-versus-Leukämie Effekt auftreten, bei dem die Spenderlymphozyten, die bei der Stammzelltransplantation dem Empfänger infundiert wurden, die noch verbliebenen Leukämie- und Tumorzellen des Empfängers eliminieren. Der genaue Mechanismus des Graft-versus-Leukämie Effekts ist jedoch noch nicht vollständig geklärt.

Eine gefürchtete Komplikation der Stammzelltransplantation ist die Graft-versus-Host Erkrankung. Die übertragenen Spenderlymphozyten greifen das gesunde Empfängergewebe an und schädigen es. Neben leichten Ekzemen sind auch lebensbedrohliche Situationen, mit Organversagen und Transplantatabstoßung, möglich.

Nach der Stammzelltransplantation tritt beim Empfänger ein Immundefekt auf, der einerseits auf den Einsatz von Immunsuppressiva, zur Verringerung der Graft-versus-Host Erkrankung, andererseits auf die Phase bis zur Rekonstitution der Hämatopoese und des Immunsystems zurückzuführen ist. Aufgrund dieses induzierten Immundefektes ist der stammzelltransplantierte Patient für Infektionen sowie Reaktivierung von Viren, wie z. B. des Cytomegalovirus (CMV), prädisponiert. Trotz etablierter antiviraler Therapie ist die CMV Reaktivierung mit einer erhöhten Mortalität des Patienten verbunden (Boeckh et. al, 2003). Jedoch scheint eine CMV Reaktivierung einen positiven Einfluss auf das rezidivfreie Überleben nach einer Stammzelltransplantation zu haben, wie die Publikation von Elmaagacli et. al, 2011 zeigt.

In dieser Arbeit soll die Frage geklärt werden, welche Rolle die CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten nach einer Stammzelltransplantation, haben. Sind diese CMV spezifischen T-Zellen womöglich mit für den Graft-

versus-Leukämie Effekt verantwortlich und sind sie in der Lage, Tumor assoziierte Antigene zu erkennen?

1.1.1 Allogene Stammzelltransplantation

Bei einer Stammzelltransplantation werden hämatopoetische Stammzellen von einem geeigneten Spender auf einen Empfänger übertragen. Die hämatopoetischen Stammzellen sind multipotent und können durch mitotische Teilung weitere Stammzellen generieren oder sich durch Differenzierung zu spezialisierten Zellen entwickeln. Es entwickeln sich entweder lymphatische oder myeloische Vorläuferzellen. Aus den lymphatischen Vorläuferzellen gehen naive T- und B-Lymphozyten sowie die natürlichen Killerzellen hervor. Aus den myeloischen Vorläuferzellen werden, nach mehreren Zwischenschritten, Thrombozyten, Erythrozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen und die verschiedenen Arten der Granulozyten (basophile, eosinophile, und neutrophile Granulozyten) generiert.

Es gibt neben der allogenen Stammzelltransplantation, die am häufigsten Anwendung findet, auch die autologe, bei der der Empfänger auch gleichzeitig der Spender ist.

Bei der allogenen Stammzelltransplantation sind alle Spender geeignet, die gewebekompatibel zum Empfänger sind, d. h. einen ähnlichen HLA-Typ (humanes Leukozyten Antigen) aufweisen wie der Empfänger. Die HLA-Moleküle befinden sich auf jeder kernhaltigen Zelle und ermöglichen dem Organismus die Unterscheidung zwischen körperfremd und körpereigen. Diese Form der Stammzelltransplantation wird bei malignen hämatologischen Erkrankungen wie der Leukämie, Lymphomen und myelodysplastischen Syndromen sowie bei einigen nicht malignen hämatologischen Erkrankungen, wie beispielsweise der aplastischen Anämie, eingesetzt.

Bereits 1969 wurden im Rahmen einer Studie Leukämiepatienten erfolgreich transplantiert, mit einer 10-Jahresüberlebensrate von 10 % (Thomas et. al, 1975). Die Anzahl der allogenen Transplantationen steigt stetig an. Seit 2006 bis 2016 nahm die Anzahl der Ersttransplantationen um 30% zu. Die häufigste Indikation für eine allogene Stammzelltransplantation ist die Leukämie, gefolgt von

lymphoproliferative Erkrankungen wie das Non-Hodgkin Lymphom (Deutsches Register für Stammzelltransplantationen, 2006).

Vor einer Stammzelltransplantation unterzieht sich der Stammzellempfänger einer Konditionierungstherapie, die aus einer Zytostatikatherapie oder einer kombinierten Zytostatika- und Radiotherapie besteht. Diese Therapie dient zur Immunsuppression des Empfängers, um das Risiko einer Transplantatabstoßung zu verringern. Des Weiteren sollen möglichst viele Tumorzellen vor der Stammzelltransplantation eliminiert werden. Die Konditionierungstherapie wird anhand der Intensität der Zytostatika bzw. Radiotherapie, in ein volles und ein reduziertes Konditionierungsregime unterteilt. Bei der Vollkonditionierungstherapie, die auch als myeloablativ bezeichnet wird, wird eine hochdosierte Zytostatika- oder eine kombinierte Zytostatika- und Radiotherapie verabreicht, die zur Zerstörung des Knochenmarks führt. Dieses Verfahren kommt bei jüngeren Patienten sowie bei älteren Patienten ohne Komorbiditäten und einem guten Allgemeinzustand zum Einsatz. Bei der reduzierten Konditionierungstherapie wird eine reduzierte Dosis an Zytostatika- ggf. Radiotherapie verabreicht. Sie findet vor allem bei älteren Patienten und Patienten mit Komorbiditäten Anwendung. Diese Form der Therapie ist besser verträglich und beeinflusst das Immunsystem des Empfängers weniger, zeigt jedoch einen geringeren Therapieerfolg.

Bei der klassischen Knochenmarkstransplantation wird durch eine intensive Zytostatikaverabreichung ggf. in Kombination mit der Radiotherapie das Knochenmark des Patienten und damit auch möglichst viele Tumorzellen zerstört. Von einem gesunden Spender werden durch eine Beckenkammpunktion multipotente hämatopoetische Stammzellen gewonnen, die dann dem Patienten infundiert werden. Diese Methode ist mit vielen Unannehmlichkeiten, wie Schmerzen an der Punktionsstelle, für den Spender vergesellschaftet und findet heute kaum Anwendung. Heutzutage erfolgt die Stammzellgewinnung aus dem peripheren Blut (Ottinger et. al, 1996). Mittels subkutaner Applikation eines Wachstumsfaktors (G-CSF: Granulozyten-Kolonien-stimulierender Faktor) werden Stammzellen im Knochenmark zur Proliferation angeregt und aus dem Knochenmark in die Peripherie ausgeschwemmt (Socinski et.al, 1998). Die

ausgeschwemmten Stammzellen werden durch eine Stammzellapherese aus dem Blut des Spenders gesammelt, maschinell aufbereitet und können dem Empfänger als Infusion verabreicht werden. Die Spenderstammzellen siedeln sich im Empfängerknochenmark der Plattenknochen an, und es kommt zu einer Regeneration der Hämatopoese.

Nachteilig für den Patienten ist die Knochenmarkaplasie, die Infektionen begünstigt, und den Einsatz von Antibiotika, Virustatika sowie Antimytotika notwendig macht. Außerdem ist eine Unterbringung in einem Zimmer mit einer spezifischen Filterluftanlage erforderlich. Auch sind weitere Vorsichtsmaßnahmen, wie beispielsweise eine keimarme Ernährung notwendig. Im Rahmen des Engraftments der Spenderzellen sind Abstoßungsreaktionen möglich, die dann eine zusätzliche Gabe von Immunsuppressiva erfordern.

1.1.2 Maligne hämatologische Erkrankungen

Die Einteilung der malignen hämatologischen Erkrankungen wurde von der WHO, der Weltgesundheitsorganisation, vorgenommen und stellt die Leitlinie für Pathologen und Onkologen dar. Es werden unter anderem die morphologischen, immunphänotypischen, genetischen und klinischen Kriterien berücksichtigt. Die wichtigsten malignen hämatologischen Erkrankungen werden in folgende Gruppen unterteilt: Lymphome, akute Leukämien, myeloproliferative Erkrankungen (z. B. chronisch idiopathische Myelofibrose) und das myelodysplastische Syndrom.

Bei der akuten Leukämie handelt es sich um eine maligne Erkrankung des blutbildenden oder des lymphatischen Systems mit unkontrollierter Proliferation funktionsuntüchtiger myeloischer oder lymphatischer Blutzellen. Durch diese unkontrollierte Proliferation der lymphatischen bzw. myeloischen Zellen, kommt es zur Verdrängung der normalen Hämatopoese im Knochenmark, mit einem Mangel an funktionsfähigen Blutzellen. Die Folgen sind eine erhöhte Infektanfälligkeit durch die Granulozytopenie, Müdigkeit und Blässe durch die Anämie sowie die Thrombozytopenie mit einer erhöhten Blutungsneigung unter Hämatombildung nach Bagatelltraumata sowie petechialen Einblutungen.

Leukämien können anhand der entarteten Vorläuferzellen sowie dem zeitlichen

Krankheitsverlauf und dem Reifungsgrad der Zellen eingeteilt werden.

Es werden folgende Leukämieformen unterschieden: akute lymphatische Leukämie (ALL), akute myeloische Leukämie (AML), chronisch lymphatische Leukämie (CLL) und chronisch myeloische Leukämie (CML). Die Einteilung der Leukämien ist entscheidend für den Verlauf der Erkrankung, die Therapie sowie die Prognose.

Eine akute Leukämie zeichnet sich durch eine rasche Symptomentwicklung, meist aus völliger Gesundheit heraus, aus, mit einer schnellen Progredienz der Erkrankung. Unbehandelt verläuft diese Erkrankung infaust. In der Peripherie finden sich im Differenzialblutbild unreife Blasten, die nahezu funktionslos sind.

Die CML wird zu den myeloproliferativen Erkrankungen gezählt und kann längere Zeit asymptomatisch verlaufen sowie eine B-Symptomatik, wie Nachtschweiß, ungewollten Gewichtsverlust und Fieber zeigen. Die CLL ist ein niedrig malignes B-Zell Non-Hodgkin Lymphom, die sich durch eine Lymphozytose im Labor zeigt und durch Lymphadenopathie sowie Hepato- und/ oder Splenomegalie auffallen kann.

Maligne Lymphome sind Neoplasien, die von entarteten Lymphozyten, durch unkontrollierte monoklonale Proliferation, ausgehen. Für die Entartung können B- oder T-Zellen verantwortlich sein. Es werden Non-Hodgkin Lymphome (NHL) und Hodgkin Lymphome (HL) unterschieden. Die Non-Hodgkin Lymphome werden weiter in B- und T-Zell NHL sowie hoch- und niedrig maligne Lymphome unterteilt. Das Leitsymptom einer Lymphomerkkrankung ist die indolente Lymphadenopathie in Kombination mit einer B-Symptomatik. Die Behandlung maligner hämatologischer Erkrankungen kann neben der Zytostatika- und Radiotherapie auch eine Stammzelltransplantation notwendig machen.

1.1.3 Graft-versus-Host Erkrankung

Die „*Graft-versus-Host-Disease*“ (GvHD) ist eine häufige und gefürchtete Komplikation der allogenen Stammzelltransplantation. Sie kann in unterschiedlicher Ausprägung auftreten (Grad I-IV) und die Organfunktion sowie die Lebensqualität des Patienten einschränken.

Die Arbeit von Reddy et. al, 2003 beschreibt den Mechanismus der Graft-versus-

Host Erkrankung als ein Zusammenspiel zwischen dem adaptiven und dem angeborenen Immunsystem des transplantierten Patienten. Die Konditionierungstherapie mit Zytostatika- und/oder Radiotherapie führt zur Inflammation und Schädigung des Empfängergewebes. Inflammatorische Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 werden sezerniert. Im Empfängergewebe werden als Folge vermehrt Alloantigene über MHC-Moleküle präsentiert, wodurch die Spender T-Zellen, aufgrund der Interaktion mit den antigenpräsentierenden Zellen, aktiviert werden. Die MHC-Moleküle werden beim Menschen als humane Leukozyten Antigene bezeichnet und in die Klassen I und II unterteilt. Hierdurch wird die Differenzierung zwischen körperfremd und körpereigen sowie die Erkennung von Infektionserregern ermöglicht. Schließlich kommt es zur Proliferation und Differenzierung der Spender T-Zellen sowie einer vermehrten Zytokinsekretion, die zur Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen, Makrophagen und natürlichen Killerzellen führt und mit einer Schädigung des Wirtorganismus einhergeht.

Die GvHD kann akut oder chronisch auftreten. Bei der akuten Form, die sich bei 30-60 % der Patienten nach allogener Stammzelltransplantation ereignet und innerhalb der ersten 100 Tage auftritt, wird meist das Epithel des Darms, Leber, Haut und der Anhangsorgane beschädigt (Ferrara et. al, 2009). Bei der chronischen GvHD können noch zusätzlich die Lunge, Gelenke und die Muskeln befallen sein.

Um die GvHD zu reduzieren, wurde in den 70er Jahren die HLA-Typisierung von Stammzellspendern eingeführt. Es werden zwei Formen der Spendersuche unterschieden. Neben der Familienspendersuche, bei der Eltern und Geschwister typisiert werden, kommen auch nichtverwandte Spender in Frage, die national und international mittels Registern ermittelt werden. Die Spender sind vollkompatibel, wenn die Genorte HLA-A, -B, -C und -DRB1 sowie DQB1 übereinstimmen (dag-kbt Leitlinien). Es wird eine Vollkompatibilität zwischen Spender und Empfänger angestrebt, um die Graft-versus-Host Erkrankung so gering wie möglich zu halten. Je geringer die Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger umso schwerwiegender die Graft-versus-Host Erkrankung (Ferrara et. al, 2009). Eine komplette Unterdrückung der GvHD ist nicht sinnvoll,

da die moderate Verlaufsform zur Senkung der Rezidivrate der malignen Grunderkrankung führt und das Gesamtüberleben verbessert (Lee et. al, 2002).

1.1.4 Graft-versus-Leukämie-Effekt

Der „*Graft-versus-Leukämie*“ (GvL) Effekt, auch als Graft-versus-Tumor Effekt (GVT) bezeichnet, ist eine erwünschte, hoch effektive Therapiemodalität, nach einer allogenen Stammzelltransplantation. Dieser Effekt trägt zur Elimination der noch verbliebenen malignen Zellen im Empfängerorganismus bei. Bei jeder allogenen Stammzelltransplantation wird ein Anteil an Spender Lymphozyten auf den Empfänger übertragen, die dann zur GvL und/oder GvHD (Graft-versus-Host Disease) führen können. Wie genau der Graft-versus-Leukämie Effekt zustandekommt, ist noch nicht vollständig geklärt.

Die Arbeit von Kolb et. al, 2008 gibt einen Einblick in den Mechanismus der Graft-versus-Host Erkrankung sowie Erklärungen für den Graft-versus-Leukämie Effekt. Durch Radio- und/oder Zytostatikatherapie werden dendritische Zellen (DC = dendritic cells) des Empfängers aktiviert. Eine Aktivierung der DCs durch virale oder bakterielle Infektionen ist ebenfalls möglich. Durch Präsentation der minor Histokompatibilitätsantigene werden Spender T-Zellen aktiviert, die sich durch Kostimulation und Zytokinfreisetzung zu T-Helferzellen, zytotoxischen T-Zellen und anderen T-Zell Unterarten differenzieren. Auf vielen Spenderorganen bzw. Spenderzellen werden minor Histokompatibilitätsantigene sowohl über MHC-I- als auch über MHC-II-Komplexe präsentiert und ermöglichen die Unterscheidung zwischen körperfremdem und körpereigenem Gewebe. Die transfundierten Spender T-Zellen erkennen die minor Histokompatibilitätsantigene auf den antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers, ebenso wie die verbliebenen Tumorzellen und das gesunde Empfängergewebe und greifen es an. Daraus resultiert die GvHD und der GvL Effekt, wobei beim GvL Effekt die Spender T-Lymphozyten eine Toleranz gegenüber den Empfängerzellen entwickeln und das gesunde Gewebe unbeschadet bleibt.

Bei vielen entarteten Zellen kommt es zur Überexpression von Tumor Antigenen, wie MUC-1, WT1 und Proteinase 3. MUC-1 kann beispielsweise in AML und multiplem Myelom überexprimiert sein. Eine vermehrte WT1 Expression kann in

ALL, CML und ALL Patienten detektiert werden. Diese Tumor assoziierten Antigene (TAA) werden auf der Oberfläche der entarteten Zellen über MHC-Moleküle präsentiert und können von den übertragenen T-Zellen erkannt werden. Die transfundierten Spender T-Zellen proliferieren stark, zerstören die entarteten Zellen und tragen so womöglich zum GvL Effekt bei. Bei stammzelltransplantierten Patienten mit ALL als Grunderkrankung wird das Rezidivrisiko gesenkt, wenn spezifische T-Zellen gegen WT1 nachweisbar sind (Rezvani et. al, 2007).

Ebenso sinkt die Rezidivrate nach Stammzelltransplantation bei AML und ALL Patienten mit Nachweis von MUC-1 spezifischen T-Zellen (Kapp, et. al, 2009). Offensichtlich besteht ein Zusammenhang zwischen GvL und der GvHD, da Patienten mit einer GvHD Grad II, den besten GvL Effekt aufweisen und ein längeres rezidivfreies Überleben zeigen. Jedoch haben ca. 50 % der Patienten eine Remission ohne Anzeichen einer klinischen GvHD (Kolb et. al, 2008).

Bei der Spender Lymphozyten Infusion, die als DLI (= donor lymphocyte infusion) bezeichnet wird, werden hämatologisch erkrankten Patienten gezielt Lymphozyten des Spenders infundiert, um bei Erkrankungen wie der CML, Polyzythaemia vera, AML und dem myelodysplastischen Syndrom eine Remission zu erreichen. Auch wird das Rezidivrisiko gesenkt (Kolb et. al, 1995). Die Konditionierungstherapie vor einer allogenen Stammzelltransplantation scheint entscheidend zu sein, wie die Arbeit von Manjappa S. et. al, 2014 zeigt. Die Patientengruppe, die myeloablativ vorbehandelt wurde und eine CMV Reaktivierung hatte, zeigte eine Verlängerung des rezidivfreien Überlebens. Entfernt man hingegen die Lymphozyten des Spenders aus dem Transplantat sinkt die Wahrscheinlichkeit für eine Graft-versus-Host Erkrankung, jedoch treten häufiger Rezidive der hämatologischen Grunderkrankung auf (Horowitz et. al, 1990).

1.2 Immunologische Reaktionen der T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten sind ein wichtiger Bestandteil unseres Immunsystems. Zusammen mit den B-Zellen gehören sie zum adaptiven Immunsystem, das in der Lage ist, Antigene spezifisch zu erkennen und so zielgenau bestimmte

Strukturen des Erregers anzugreifen.

1.2.1 Haupthistokompatibilitätskomplex: MHC-Klasse I und II Proteine

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC: major histocompatibility complex) umfasst eine Reihe von Genen, die beim Menschen auf dem Chromosom 6 liegen und für die MHC-Klasse I und MHC-Klasse II Proteine kodieren. Die MHC-Komplexe sind Glykoproteine, die in der Zellmembran verankert sind und beim Menschen als Leukozyten Antigene (= HLA: human leukocyte antigen) bezeichnet werden, da sie durch spezifische Antikörper auf der Oberfläche von beispielsweise Leukozyten nachgewiesen werden können. Das MHC-System ist wichtig für die immunologische Abwehr eines Organismus, da hierüber die Antigenpräsentation stattfindet. Die HLA-Klassen spielen eine große Rolle bei der Gewebeverträglichkeit, wie beispielsweise im Rahmen der Stammzelltransplantation, da der Organismus über dieses System in der Lage ist zwischen körpereigenen und körperfremd zu unterscheiden. Des Weiteren sind sie für die immunologische Individualität verantwortlich.

MHC-Klasse-I Proteine

Die MHC-Klasse-I Proteine finden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen und werden in HLA-A, HLA-B und HLA-C unterteilt. Über den MHC-I-Komplex werden intrazelluläre Antigene präsentiert, die körpereigenen als auch körperfremden Ursprungs sein können. Die zytosolischen Peptide werden im Proteasom fragmentiert und anschließend im endoplasmatischen Retikulum auf die MHC-Klasse-I Moleküle geladen. Die Protein beladenen MHC-Moleküle werden in Vesikel verpackt und durch Fusion mit der Zellmembran auf der Oberfläche jeder kernhaltigen Körperzelle präsentiert. Zytotoxische T-Zellen können die prozessierten Antigene, durch die Bindung mit ihrem T-Zell-Rezeptor an den MHC-I Komplex der Zelle, erkennen, sodass eine Differenzierung zwischen körpereigenen und körperfremd gegeben ist. Bei Präsentation von viralen oder tumor Antigenen wird die zytotoxische T-Zelle aktiviert und kann ebenso auf anderen Körperzellen dieses Antigen spezifisch erkennen. Als Folge wird die virus- bzw. tumorbefallene Zelle durch Ausschüttung von Perforin und Granzyme

oder durch Induktion der Apoptose abgetötet.

MHC-Klasse-II Proteine

Zu den MHC-Klasse-II Proteinen gehören die Isotypen HLA-DP, HLA-DQ und HLA-DR. Diese Komplexe befinden sich auf der Oberfläche von antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wie den dendritischen Zellen, Makrophagen, Monozyten, B-Lymphozyten und Endothelzellen, und dienen zur Präsentation von extrazellulären Antigenen. Das Antigen wird durch eine rezeptorvermittelte Endozytose oder Phagozytose in die APZ aufgenommen, durch pH-abhängige Proteasen im Lysosom fragmentiert und zum endoplasmatischen Retikulum transportiert. Im endoplasmatischen Retikulum findet die Beladung der MHC-II Komplexe mit den Proteinfragmenten statt, die dann auf der Oberfläche der APZ präsentiert werden. Die CD4⁺ T-Helferzellen erkennen spezifisch das Antigen und setzen Zytokine frei, um andere Zellen zu aktivieren. Die B-Zellen werden beispielsweise zur Proliferation und zur Antikörperproduktion angeregt. Die Makrophagen zur Phagozytose und Verdauung des aufgenommenen Antigens.

1.2.2 Alloreaktivität der T-Lymphozyten

Das „T“ in den T-Lymphozyten steht für den Thymus, in dem die Reifung und Differenzierung der T-Lymphozyten stattfindet und als Thymopoese bezeichnet wird. Die Vorläuferzellen der T-Lymphozyten verlassen das Knochenmark und wandern in den Thymus ein. Im Thymus werden sie als Thymozyten bezeichnet und durchlaufen mehrere Reife- und Differenzierungsstadien. Die eingewanderten Vorläuferzellen werden als doppelt negative Thymozyten bezeichnet, da sie weder einen T-Zell-Rezeptor (TZR), noch den CD4 bzw. CD8 Co-Rezeptor besitzen. Die doppelt negativen Thymozyten proliferieren stark und es kommt zum zufälligen Rearrangement der T-Zell-Rezeptor-Gene sowie der Bildung des T-Zell-Rezeptors. Anschließend finden zwei Selektionsschritte statt. Die epithelialen Zellen im Thymuscortex präsentieren MHC-I und MHC-II-Moleküle und nur die Thymozyten die an eines der beiden MHC-Moleküle schwach binden, überleben. Die CD8⁺ T-Zellen erkennen MHC-Klasse I-

Moleküle und entwickeln sich zu Killerzellen. Die MHC-II-Moleküle werden von CD4⁺ T-Zellen erkannt, die sich zu T-Helferzellen entwickeln. Die restlichen Zellen, die an die MHC-Moleküle zu stark binden oder diese nicht erkennen, werden apoptotisch abgebaut. Dieser Vorgang wird als positive Selektion bezeichnet.

Im Thymusmark findet die negative Selektion der Thymozyten statt. Dendritische Zellen und Makrophagen präsentieren über MHC-Moleküle Autoantigene. Die CD8⁺ und CD4⁺ Thymozyten sollten die MHC-Moleküle erkennen, jedoch nicht mit den präsentierten Autoantigenen interagieren. In diesem letzten Schritt der Selektion werden autoreaktive T-Lymphozyten apoptotisch abgebaut und die Selbsttoleranz des Immunsystems erzeugt. 95 % der zuvor gebildeten T-Lymphozyten gehen während der Selektion im Thymus zugrunde. Naive T-Zellen verlassen den Thymus und wandern in die als sekundär lymphatisch bezeichneten Organe ein. In den sekundär lymphatischen Organen findet der Antigenkontakt und die Proliferation der T-Lymphozyten statt.

Bei jeder Stammzelltransplantation werden neben den Stammzellen auch T-Lymphozyten des Spenders auf den Empfänger übertragen. Einige der Spender T-Zellen interagieren mit den genetisch fremden Empfängergewebe. Diese Reaktion wird als Alloreaktivität bezeichnet. Es werden zwei Mechanismen diskutiert. Die transfundierten T-Zellen werden durch die Fremd-MHC-Moleküle des Empfängers stimuliert, unabhängig vom gebundenen Peptid. Möglich wäre auch eine Aktivierung durch das gebundene Peptid ohne die Erkennung des Fremd-MHC-Komplexes (Nesic et. al, 2002). Als Folge kann die GvHD auftreten.

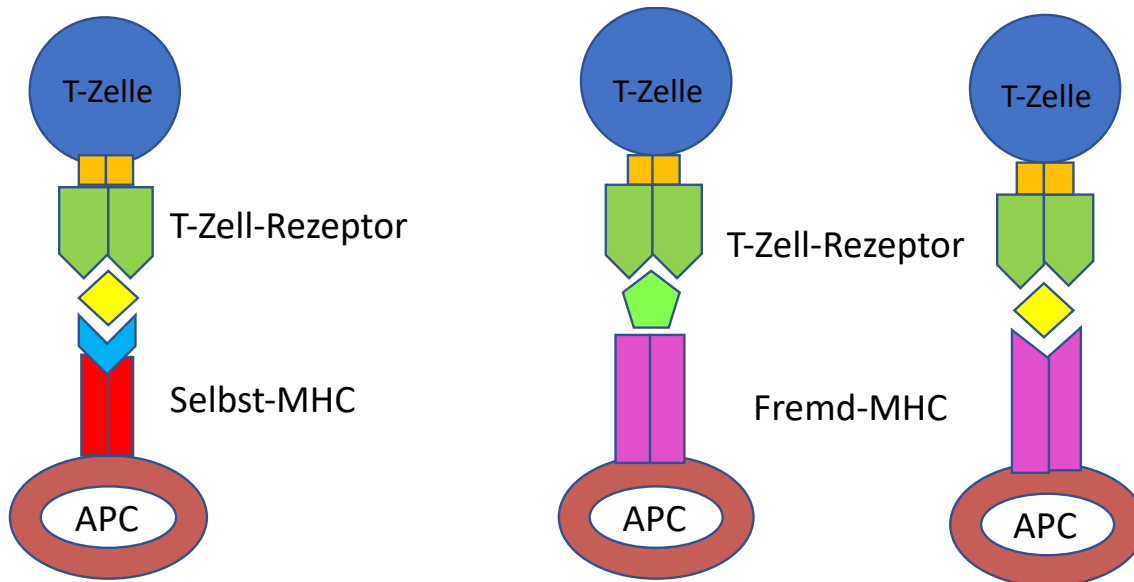


Abb.1.2.2: Alloreaktivität der T-Zellen; Abbildung nach Nesic et. al, 2002

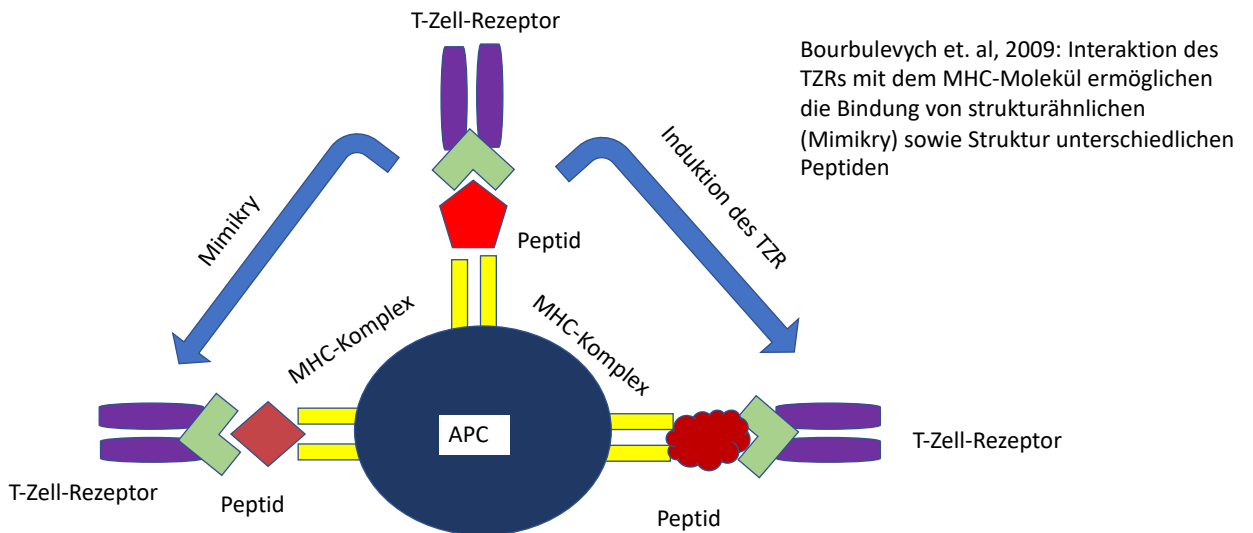
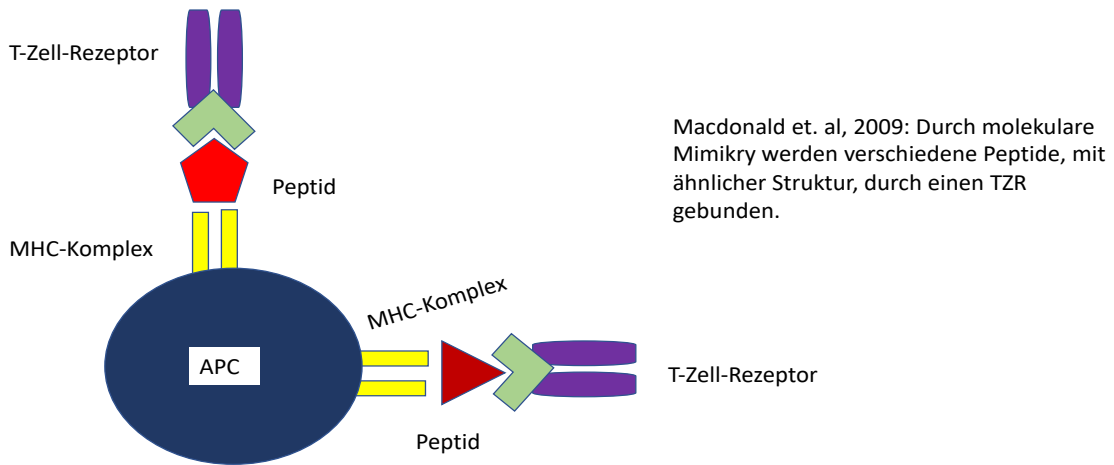
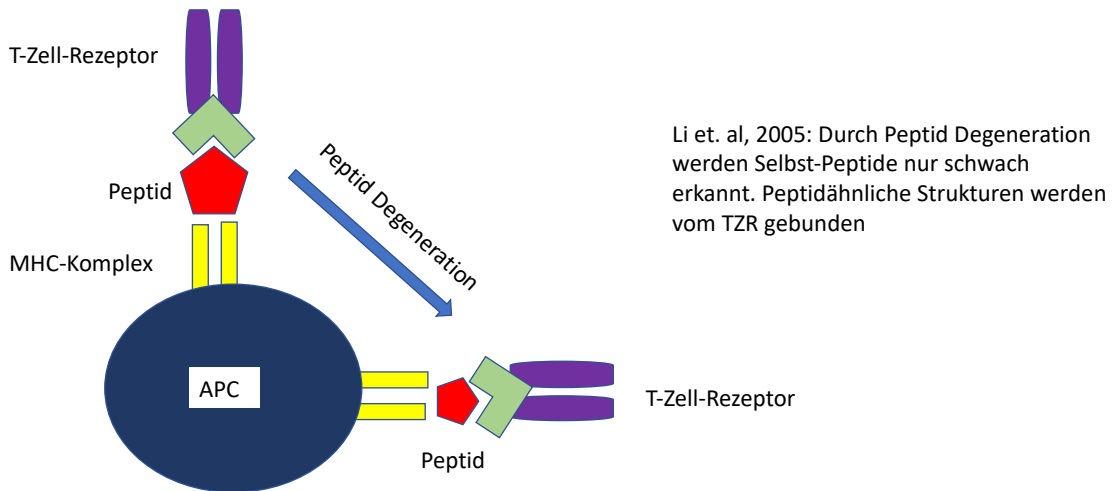
Der T-Zell-Rezeptor erkennt Antigene, die über eigene MHC-Komplexe präsentiert werden (links). Bei der Alloreaktivität der T-Zellen werden zwei Mechanismen diskutiert. Bei der Peptid-abhängigen Variante wird nur das Antigen, das vom Fremd-MHC präsentiert wird erkannt (Mitte). Bei der zweiten Variante, erkennt der T-Zell-Rezeptor Peptid unabhängig den Fremd-MHC Komplex (rechts).

1.2.3 Kreuzreaktivität der T-Lymphozyten

Der T-Zell-Rezeptor ist ein membranständiger Proteinkomplex auf der Oberfläche von T-Zellen, der zur Erkennung von Antigenen, die über die MHC-Moleküle präsentiert werden, dient. Der Rezeptor wird als Heterodimer bezeichnet, da er aus einer α - und β -Kette, seltener aus einer γ - und δ -Kette, besteht, die durch Disulfidbrückenbindungen verbunden sind. Die Ketten weisen eine konstante Region (C-Region) und eine variable Region (V-Region) auf. Die variable Domäne der α -Untereinheit setzt sich aus sogenannten V- und J-Segmenten und die β -Untereinheit aus den V-, D- und J-Segmenten zusammen. Die große Diversität der T-Zell-Rezeptoren wird durch genetische Rekombination der beiden Polypeptidketten und durch somatische Hypermutation erreicht, bei der es in den variablen Regionen zu Punktmutationen kommt.

T-Zellen sind hochspezialisierte Zellen, die neben der schnellen Immunantwort, auch alle eingedrungenen Pathogene erkennen und diese mit hoher Spezifität binden sollen. Hingegen dürfen T-Zellen nicht mit Autoantigenen interagieren, um eine Selbsttoleranz zu gewährleisten. Es gibt eine bestimmte Anzahl an T-Zellen

im Organismus und eine begrenzte Anzahl an Varianten des T-Zell-Rezeptors, die aber die Vielzahl der Antigene nicht abdecken könnten, wenn man davon ausgeht, dass jeder T-Zell-Rezeptor nur ein Antigen erkennt. Um den Ansprüchen gerecht zu werden und um die Vielzahl der Antigene abzudecken, muss von einer Kreuzreaktivität der T-Zellen ausgegangen werden. Die T-Zellen können neben homologen Antigenen, die eine Homologie zur Aminosäuresequenz des T-Zell-Rezeptor aufweisen, auch Antigenen erkennen, die keine Aminosäuresequenzhomologie zeigen (Matthias Regner, 2001). Im Mini Review von Yin und Mariuzza (2009) werden die verschiedenen Bindungsvarianten der kreuzreaktiven T-Zellen dargestellt. Es wird diskutiert, dass der T-Zell-Rezeptor (TZR) unterschiedliche Liganden binden kann, indem der Rezeptor ligandeninduziert angepasst wird (Mazza et. al, 2007). Des Weiteren wäre eine Bindung des T-Zell-Rezeptors an unterschiedliche MHC-Komplexe, durch unterschiedliche Andockmechanismen, denkbar (Colf.et.al, 2007). Die Kreuzreaktivität könnte durch ein molekulares Mimikry erklärt werden. Einige Antigene weisen eine Strukturhomologie zu den eigentlichen Antigenen auf und werden von dem gleichen T-Zell-Rezeptor erkannt. Beispielsweise erkennt der TZR LC13 sowohl ein Epitop des Epstein-Barr Virus als auch die Allopeptide HLA-B*4402 und HLA-B*4405 (Macdonald et. al, 2009). Eine Konformationsänderung des T-Zell-Rezeptors nach Interaktion mit den peptidbeladenen MHC-Molekül, ermöglicht eine Erkennung von strukturähnlichen, aber auch unterschiedlichen Peptiden (Borbulevych et.al, 2009). Durch eine strukturelle Degeneration der Autoantigene, werden diese schwach durch die T-Zellen erkannt, wodurch auch die Erkennung von Peptiden mit ähnlicher Aminosäuresequenz gegeben ist (Li. et. al, 2005).



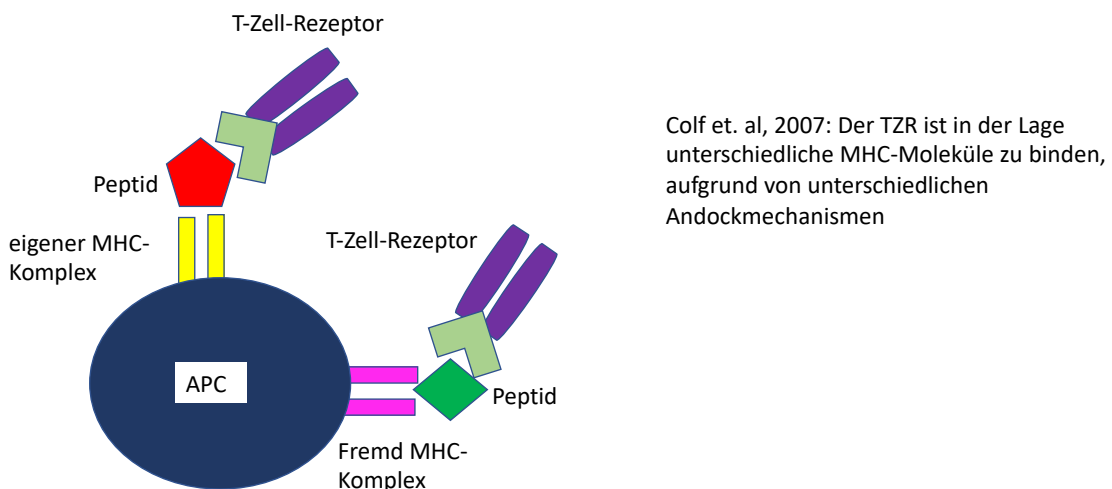
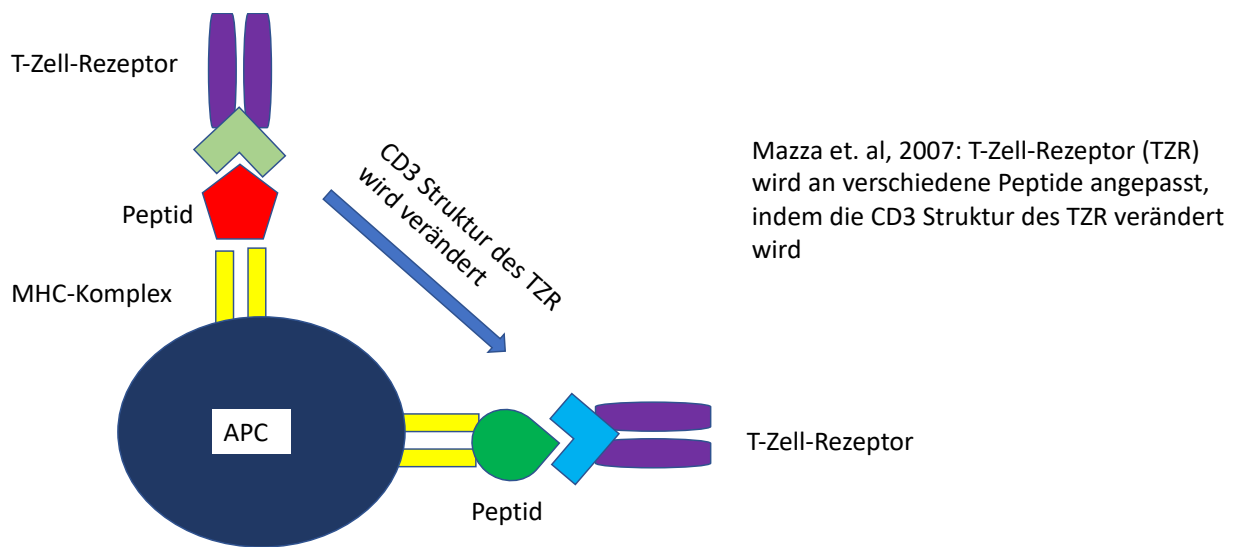


Abb. 1.2.3: Kreuzreaktivität der T-Zellen nach Yin und Mariuzza (2009); TZR: T-Zell-Rezeptor

1.2.4 Antigen Kreuzpräsentation der dendritischen Zellen

Dendritische Zellen gehören neben den B-Zellen, Makrophagen und den Monozyten zu den antigenpräsentierenden Zellen des Immunsystems. Extrazelluläre Antigene wie Tumorfragmente, Autoantigene oder Viruspartikel werden durch Phagozytose bzw. Endozytose aufgenommen und über die MHC-II-Komplexe auf der Oberfläche der dendritischen Zellen präsentiert. Dies führt zur Aktivierung der CD4⁺ T-Helferzellen, die wiederum andere Immunzellen

aktivieren. Bei der Kreuzpräsentation werden die extrazellulären Antigene über MHC-I-Komplexe, statt über MHC-II, präsentiert und führen zur Aktivierung der zytotoxischen T-Lymphozyten. Für gewöhnlich werden intrazelluläre Antigene über die MHC-I Moleküle präsentiert. Welche Mechanismen der Kreuzpräsentation zugrunde liegen könnten, wird von Groothuis und Neefjes, 2005 eingehend diskutiert. Beim klassischen Weg gelangt über die Endozytose das intrazelluläre Antigen in das Zytosol der dendritischen Zelle und wird in den Proteasomen prozessiert. Über den Antigenpeptid-Transporter (TAP) wird das Antigen ins endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert und auf den MHC-I-Komplex geladen, um anschließend auf der Oberfläche präsentiert zu werden. Das exogene Antigen kann von infizierten Nachbarzellen über gap-junctions, das sind Verbindungsstrukturen zwischen den Zellen, in das Zytosol der dendritischen Zelle gelangen und auf MHC-I-Moleküle geladen werden. Des Weiteren kann durch das Recycling der MHC-I-Moleküle ein Austausch des extrazellulären Antigens im Endosom stattfinden. Infizierte Zellen sondern Exosomen mit exogenen Antigenen ab, die von anderen dendritischen Zellen kreuzpräsentiert werden können. Auch kann ein Austausch von extrazellulären Antigenen zwischen dem Zytosol und dem Phagosom stattfinden, wodurch die Antigene auf MHC-I-Molekülen präsentiert werden. Exogene Antigene können aber auch über die endosomale Membran transportiert werden und im Proteasom fragmentiert werden. Es folgt die MHC-I Beladung mit dem Antigen und die Präsentation auf der Oberfläche. Eine schematische Darstellung der oben genannten Mechanismen ist der Abbildung 1.2.4 zu entnehmen.

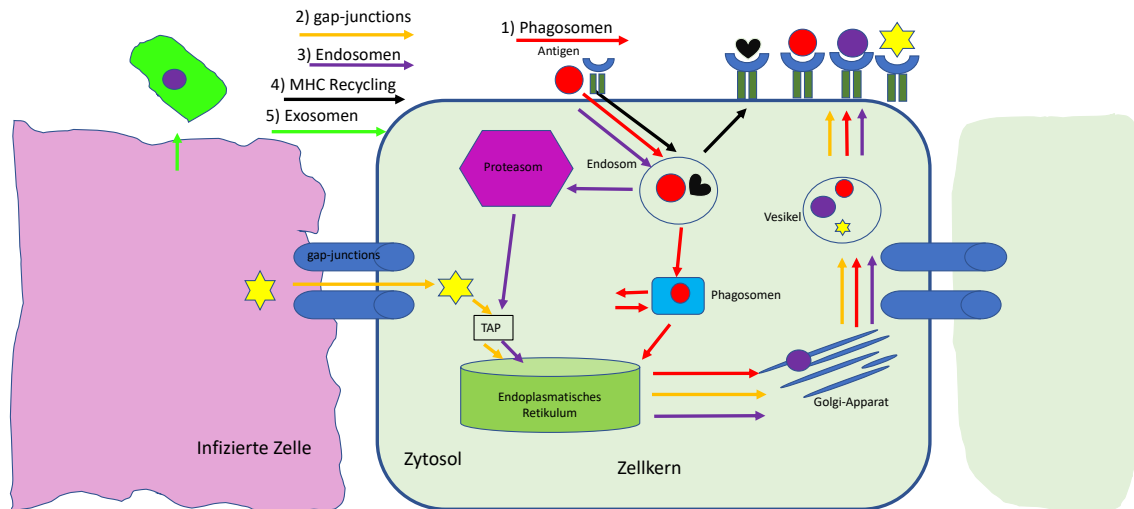


Abb.1.2.4: Verschiedene Möglichkeiten der Kreuzpräsentation nach Groothuis und Neeffes, 2005

Beim klassischen Weg wird das intrazelluläre Antigen durch Proteasom und Peptidasen fragmentiert und über das TAP (Antigenpeptid-Transporter) in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Hier findet die Beladung auf die MHC-I-Moleküle statt. Das Antigen wird auf der Oberfläche der dendritischen Zelle präsentiert.

1) Phagosomen: Das aufgenommene extrazelluläre Antigen kann vom Phagosomen zum Zytosol und durch das phagosomale TAP System wieder zurück zum Phagosom transportiert werden. Nun erfolgt die MHC-I Beladung im ER und die Präsentation auf der Oberfläche.

2) gap-junctions: Über gap-junctions einer infizierten Nachbarzelle gelangt das extrazelluläre Antigen ins Zytosol der dendritischen Zelle und wird über TAP ins ER transportiert, um dort auf das MHC-I-Molekül geladen zu werden.

3) Endosomen: Exogenes Antigen wird durch Endozytose aufgenommen und im Endosomen fragmentiert. Anschließend erfolgt der Transport ins ER mit Beladung der MHC-I-Moleküle. Das Antigen wird auf der Oberfläche der DC präsentiert.

4) Recycling: MHC-I-Moleküle werden im Endosom recycelt, wodurch exogene Antigene ausgetauscht werden können.

5) Exosomen: Infizierte Zellen sezernieren Exosomen, die extrazelluläres Antigen enthalten, die von anderen dendritischen Zellen gebunden und kreuzpräsentiert werden können.

1.3 Das humane Cytomegalovirus

Das Cytomegalovirus, auch als humanes Herpesvirus 5 bezeichnet, gehört zu der β -Subfamilie der *Herpesviridae*, zu der noch sieben weitere Vertreter wie das Epstein-Bar-Virus, Herpes-simplex-Virus 1 und 2 sowie das Varizella-Zoster-Virus gehören. Namensgebend für das Virus sind die Eigenschaften der Zellvergrößerung (Cytomegalie) der infizierten Zellen und die Fähigkeit, Einschlusskörperchen im Zytoplasma und im Zellkern zu bilden. Das Cytomegalovirus ist weltweit verbreitet und weist eine Durchseuchungsrate von 30–90 % auf. Es ist vom Alter und sozioökonomischen Faktoren abhängig (Cannon et. al, 2010), was die hohe Schwankungsbreite der Durchseuchungsrate erklärt. Das Cytomegalovirus wird durch Tröpfchen- und/oder Schmierinfektionen übertragen. Es kann in der Muttermilch,

Tränenflüssigkeit, Speichel, Urin, Blut und Genitalsekret enthalten sein. Im menschlichen Organismus wird das Virus durch die CD4⁺ und CD8⁺ Lymphozyten kontrolliert, indem die Replikation der Viren sowie die klinische Ausprägung der Krankheitssymptome eingedämmt werden (Ridell et. al, 1992, Foster et. al, 2002). Die Hauptangriffsziele der zytotoxischen T-Zellen sind virale Antigene wie das pp65 und IE-1 (Khan et. al, 2002). Die Primärinfektion wird meistens im Kindesalter erworben und verläuft asymptomatisch. Das Virus hat einen breiten Zelltropismus und lässt sich in Endothelzellen, Makrophagen und Lymphozyten nachweisen (Staras et. al, 2006, Mocarski et. al, 2007). Charakteristisches Merkmal aller Herpesviren ist die lebenslange Persistenz im Organismus nach Infektion. In infizierten Zellen persistiert das Virus ohne sich zu replizieren. Besonders gefährdet sind Personen mit angeborenen oder erworbenen Immundefekten und noch nicht ausgereiftem Immunsystem wie Neugeborene, aber auch Patienten unter Zytostatika- bzw. Radiotherapie. Bei Immunsuppression, z. B. nach einer Transplantation, ist eine Reaktivierung des Virus möglich.

1.3.1 Reaktivierung des CMV nach allogener Stammzelltransplantation

Eine primäre Cytomegalovirus Infektion verläuft bei gesunden immunkompetenten Menschen häufig inapparent. Nur sehr selten kommt es zur Ausbildung grippeähnlicher Symptome wie hohem Fieber und einem mononukleoseähnlichen Krankheitsbild. Vereinzelt können auch Lymphadenopathien, Gastritis und Ösophagitis beobachtet werden. Ein Hauptproblem nach einer Stammzelltransplantation ist die CMV Infektion, die sich in 30-50 % der Fälle, klinisch als Erkrankung manifestiert (Sissons et. al, 2002). Aufgrund der Immunsuppression des stammzelltransplantierten Patienten verläuft die Erkrankung schwerwiegender als bei immunkompetenten Menschen. Als Folge der CMV Infektion tritt neben der Hepatitis und Chorionretinitis auch teilweise eine interstitielle Pneumonie auf, die sehr häufig, trotz Therapie, letal verläuft. In ca. 30 % der Fälle kommt es zur Reaktivierung der latenten CMV Infektion nach einer allogenen Stammzelltransplantation, wobei 72 % der Hochrisikopatienten betroffen sind, die ein seropositives Organ oder Zellen des

seropositiven Spenders erhalten haben (Ruell et. al, 2007). In der Phase der Reaktivierung durchläuft das Virus den lytischen Zyklus, wobei die neu synthetisierten Viruspartikel durch Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden. Sowohl bei der Reaktivierung als auch bei der Primärinfektion spielen die „*immediate-early*“ (IE) Proteine eine wichtige Rolle, da wie der Name schon vermuten lässt, diese Proteine früh synthetisiert werden. Die IE-Proteine (IE-1 und IE-2) fungieren als Transkriptionsfaktoren für die Expression früher Gene, die die Synthese von neuen Viren induzieren. Des Weiteren inhibieren IE-Proteine die Immunreaktion des Wirts gegen das Virus (Paulus und Nevels, 2009). Für die Immunität gegen das Cytomegalovirus sind CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen verantwortlich, da eine akute CMV-Reaktivierung zur massiven Proliferation von CMV spezifischen CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen bei seropositiven Empfänger mit seropositiven Spenderstammzellen führt (Foster et. al, 2002). Die virusspezifischen Gedächtnis T-Zellen des Spenders können eine Alloreaktivität gegenüber den MHC-Molekülen des Empfängers zeigen und die Graft-versus-Host Erkrankung sowie die Transplantabstoßung vermitteln (D'Orsogna et. al, 2010). Die Therapie einer CMV Infektion umfasst die Gabe von Ganciclovir oder Foscarnet. Durch die antivirale Therapie wird das Auftreten einer CMV Erkrankung verringert, jedoch steigt die medikamenteninduzierte Mortalität, aufgrund von Nebenwirkungen. Ganciclovir kann zur Thrombozytopenie und Leukozytopenie führen (Crumpacker, 1996). Das Medikament Foscarnet kann Nierenschäden sowie Hyperkaliämie verursachen, das zu Nierenversagen und Herzrhythmusstörungen führen kann (Sissons, 2002). Die Reaktivierung des Cytomegalovirus nach allogener Stammzelltransplantation birgt nicht nur Risiken, sondern scheint, wie einige Publikationen zeigen, das rezidivfreie Überleben zu verlängern. In der Studie von Elmaagacli et. al, 2011 wurden über einen Zeitraum von 10 Jahren 266 AML Patienten, im Hinblick auf eine CMV Reaktivierung sowie das rezidivfreie Überleben untersucht. Bei 77 AML Patienten kam es zu einer frühen CMV Reaktivierung nach allogener Stammzelltransplantation. Innerhalb der nächsten 10 Jahren entwickelten 42 % der AML Patienten ohne CMV Reaktivierung ein Rezidiv der malignen Grunderkrankung. In der Gruppe der AML Patienten mit CMV Reaktivierung kam es hingegen nur bei 9 % zu einem Rezidiv.

In der retrospektiven Studie von Green ML et. al, 2013 wurden neben AML Patienten, auch Patienten mit ALL, CML, Lymphomen und myelodysplastischem Syndrom nach allogener Stammzelltransplantation, untersucht. Eine Reduktion des Rezidivrisikos wurde bei AML Patienten mit CMV Seropositivität des Empfängers und einer CMV Reaktivierung innerhalb der ersten 100 Tage beobachtet. 1 Jahr nach der Stammzelltransplantation wurde das Rezidivrisiko für alle untersuchten malignen hämatologischen Erkrankungen reduziert.

1.4 Fragestellung und Ziel

Die Cytomegalovirusinfektion ist, trotz Virustatika, eine sehr häufige Infektionserkrankungen nach allogener Stammzelltransplantation. Durch Immunsuppression des Empfängers, wird das Virus reaktiviert und es kommt zur Ausprägung unterschiedlicher Krankheitssymptome. Neben der Erkrankung selbst, scheint die Reaktivierung einen positiven Einfluss auf das Rezidivrisiko zu haben, wie die Studie von Elmaagacli et. al, 2011 zeigt. Nach allogener Stammzelltransplantation, mit frühzeitiger Replikation des Cytomegalovirus, entwickelten AML Patienten, im Vergleich zu Patienten ohne CMV Reaktivierung, seltener Rezidive. Welche Rolle das Cytomegalovirus dabei spielt und welcher Mechanismus dahinter steckt ist nicht geklärt.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die CMV IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 spezifischen T-Lymphozyten, die Fähigkeit besitzen, Tumor assoziierte Antigene zu erkennen und ob sie für den Graft-versus-Leukämie Effekt verantwortlich sind.

Sind CMV IE1-A2 VLEETSVML spezifische Lymphozyten in der Lage mit ihrem T-Zell-Rezeptor sowohl das IE-1 VLEETSVML Antigen als auch Tumorpeptide spezifisch zu binden?

Für die Versuche wurden PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) von gesunden Spendern mit dem IE-1 VLEETSVML Peptid kultiviert, um CD137 positive IE-1-A2 VLEETSVML spezifische Lymphozyten anzureichern. In den anschließenden Funktionalitätsversuchen wurde die Kreuzreaktivität der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen bei Stimulation durch Tumor assoziierte Antigen untersucht.

2. Material

2.1 Geräte

Gefrierschrank -80 °C Typ Forma	Thermo Scientific, Dreieich
Kühl- und Gefrierschrank Typ Premium	Liebherr, Schweiz
Stickstofftank Typ K10	Taylor Wharton, Husum
Durchflusszytometer FACS-Calibur	BD, Heidelberg
Meß- und Analyseprogramm:	
Cellquest Pro	BD, Heidelberg
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar
sterile Werkbank Hera safe KS12	Thermo Scientific, Dreieich
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Typ Rontanta 46 RC	Hettich, Tuttlingen
Bestrahlungsgerät RT200 (Fa. Müller)	Philips Medizin Systeme, Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterial

Zellkulturplatten 6-well	Falcon/ BD, Heidelberg
Zellkulturplatten 96-well Rundboden	Falcon/BD, Heidelberg
Zellkulturplatte 24-well	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Greiner, Frickenhausen
Pipetten Typ Research	Eppendorf, Hamburg
serologische Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen
LS-Magnetsäulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach

2.3 Reagenzien

FACS-flow	BD, Heidelberg
FACS-clean	BD, Heidelberg
FACS-rinse	BD, Heidelberg
Humanes Serum	Sigma, Taufkirchen
FCS (fetales Kälberserum)	Sigma, Taufkirchen
Aqua ad injectabilis	Braun, Melsungen

DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Taufkirchen
D-PBS	Sigma, Taufkirchen
Biocoll	MerckMillipore, Darmstadt
Gentamycin 50 mg/ml	Gibco, Darmstadt
Trypanblau	Gibco, Darmstadt
RPMI 1640 Glutamax	Gibco, Darmstadt
GolgiStop: Monensin solution	BD, Heidelberg
Strep-Tactin-PE	iba, Göttingen

2.4 Lösungen und Kulturmedium

Einfriermedium	50 %FCS + RPMI 1640 L-Glutamax + 10 % DMSO
Kulturmedium	RPMI 1640 L-Glutamax + 10 % FCS + Gentamycin 50µg/ml
MACS-Puffer	D-PBS + 1 % FCS + 2mM EDTA
Waschpuffer	D-PBS + 1 % FCS
Trypanblau (0,4 %)	Verdünnung 1:10 in D-PBS
IS-Puffer (Streptamer washing puffer):	Verdünnung 1:10 in A.dest

2.5 monoklonale Antikörper und Peptide/Peptidmixe

Tab.2.5.1: monoklonale Antikörper und Multimere

Antigen	Konjugat	Isotyp	Herkunft	Klon	Hersteller	Verdünnung
IgG1	FITC	IgG1 k	Maus	X40	BD	1:20/1:50
CD3	FITC	IgG1 k	Maus	SK7	BD	1:50
CD8	FITC	IgG1 k	Maus	SK1	BD	1:20
HLA-A2	FITC	IgG2b k	Maus	BB7.2	BD	1:50
IgG1	PE	IgG1 k	Maus	X40	BD	1:20
CD4	PE	IgG1 k	Maus	SK3	BD	1:20
CD80	PE	IgG1 k	Maus	B7.5	BD	1:20
CD86	PE	IgG1k	Maus	2331	BD	1:20
IFN-γ	PE	IgG1	Maus	45.15	Beckman Coulter	1:20
HLA-ABC	PE	IgG1k	Maus	G46-2.6	BD	1:20
IgG	APC	IgG1k	Maus	X40	BD	1:100
IgG2alpha	APC	IgG2a	Maus	20102	R&D	1:5
CD1a	APC	IgG1 k	Maus	HI149	BD	1:20
CD4	APC	IgG1k	Maus	SK3	BD	1:100
CD8	APC	IgG1k	Maus	SK1	BD	1:100
CD14	APC	IgG1k	Maus	HCD14	BioLegend	1:20
CD40	APC	IgG1 k	Maus	5C3	BD	1:20
CD107a	APC	IgG1 k	Maus	H4A3	BD	1:80
IgG1	perCP	IgG1k	Maus	X40	BD	1:20
IgG2alpha	perCP	IgG2a k	Maus	X39	BD	1:20
CD4	perCP	IgG1	Maus	SK3	BD	1:20
CD8	perCP	IgG1 k	Maus	SK1	BD	1:20
HLA-DR	perCP	IgG2a k	Maus	L243 (G46-6)	BD	1:20
Multimer	Konjugat	Verdünnung	Hersteller			
IE-1-Pentamer	PE	1:20	Proimmune			
IE-1-Streptamer (MHC-I-Strep HLA-A*0201 IE-1)	PE	1:15	Iba			
IE-1-Tetramer	PE	1:10	MBL			
Negativ Tetramer	PE	1:10	MBL			

Tab. 2.5.2: Peptide und Pools

Peptid	Sequenz	HLA restringiert	Position
CMV-IE1-A2	VLEETSVML	HLA-A*0201	316-324
CMV-pp65-A2	NLVPMVATV	HLA-A*0201	495-503
Proteinase 3	RLFPDFFFTRV VLQELNVTV	HLA-A*0201 HLA-A*0201	227-236 69-77
HIV-1-RT	ILKEPVHGV	HLA-A*0201	476-484
Bcl-2	SLALVGACI WLSLKTLLSL PLFDFSWLSL	HLA-A*0201 HLA-A*0201 HLA-A*0201	222-230 214-223 208-217
Pool	Konzentration	gelöst	Hersteller
WT1	50µg/ml	DMSO	Miltenyi
MUC-1	25µg/Peptid/vial	DMSO	jpt, Berlin
NY-ESO	25µg/Peptid/vial	DMSO	jpt, Berlin
PRAME	25µg/Peptid/vial	DMSO	jpt, Berlin
IE	6nmol/ Peptid	A.dest	Miltenyi

Die verwendeten Einzelpeptide wurden am Institut für Immunologie der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen synthetisiert. Der Ansprechpartner ist Prof. Dr. Stefan Stevanovic. Die Stammlösung der Peptide betrug 10 mg/ml. Diese Stammlösung wurde 1:10 in A.dest weiter verdünnt, um eine Endkonzentration von 1 mg/ml zu erhalten.

2.6 Chemikalien und Kits

Tab.2.6: Chemikalien und Kits

Chemikalien	Stammlösung	Firma
Interleukin 2	100 IU/µl in Aqua	Novartis, Schweiz
Interleukin 4	10 µg/ml in in Aqua + 0,1 % humanes Serum	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Interleukin 7	10 ng/µl in Aqua + 0,1 % humanes Serum	PeptoTech, Hamburg
Interleukin 15	10 ng/µl in Aqua + 0,1 % humanes Serum	PeptoTech, Hamburg
GM-CSF (Leukine Saramostin)	500 µg/ml in A.dest	Sanofi, Frankfurt am Main
TNF-alpha	10 ng/µl in Aqua	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Brefeldin A	5 mg/ml in DMSO	Invitrogen, Darmstadt
Ionomycin	1 mg/ml in DMSO	Sigma, Taufkirchen
Perm2 10x		BD, Heidelberg
PMA	1 mg/ml in DMSO	Sigma, Taufkirchen
PHA-L	1 mg/ml in Aqua	Sigma, Taufkirchen
Kits		
CD137 Microbeads		Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD14 Microbeads		Miltenyi, Bergisch Gladbach

3. Methoden

3.1 Isolation der PBMCs aus EDTA-Blut

Das EDTA-Blut eines gesunden Spenders wurde in einem Verhältnis von 1:1 in D-PBS verdünnt. In vorbeschriftete 50 ml Röhren wurden 15 ml Ficoll vorgelegt und mit ca. 35 ml des verdünnten EDTA-Blutes vorsichtig, mit einer 10ml Stabpipette, überschichtet. Die Röhren wurden bei 2000 rpm für 20 Min. ohne Bremse abzentrifugiert und die Interphase vorsichtig abgenommen. Die abpipettierten Zellen wurden in ein neues 50 ml Röhren transferiert und mit D-PBS aufgefüllt. Die Zellen wurden anschließend bei 1500 rpm für 10 Min. RT zentrifugiert und der Waschvorgang wurde erneut wiederholt.

3.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden bei 1500 rpm RT für 5 Min. abzentrifugiert und im Einfriermedium resuspendiert. Pro Kryoröhren wurden maximal $5 \cdot 10^7$ Zellen in 1,5 ml Einfriermedium weggefroren. Die Zellen wurden schonend in einer Stryporbox über Nacht eingefroren und am nächsten Tag, zur längeren Lagerung, in den Stickstofftank überführt.

Zum Auftauen wurden die gefrorenen Zellen, durch vorsichtiges Schwenken im Wasserbad bei 37 °C, aufgetaut und zügig in das vorbereitete und vorgewärmte RPMI Medium überführt (10 ml RPMI pro Kryoröhren). Anschließend wurden die Zellen bei 1500 rpm, 10 Min. bei RT abzentrifugiert und das Pellet im RPMI Medium resuspendiert. Dann erfolgte die Zellzahlbestimmung mittels Neubauerzählkammer.

3.3 Zellzahlbestimmung mit der Neubauerzählkammer

Ein Aliquot wurde 1:100 in 0,4 %-iger Trypanblaulösung verdünnt und eine Kammer der Neubauerzählkammer befüllt. Nun wurden die Zellen der vier äußeren Großquadrate, die in je 16 Kleinquadraten unterteilt sind, ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde durch 4 geteilt und anschließend mit dem Kammerfaktor 10^4 und dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert, sodass das Ergebnis der Zellzahl pro Milliliter entsprach.

3.4 Gewinnung von Allopool- Fütter Zellen

Es wurden PBMCs aus dem Blut von 10 Spendern (DRK-Blutspendedienst, Frankfurt am Main) isoliert und auf eine gleiche Zellzahl von 2×10^8 Zellen pro 10 ml D-PBS eingestellt. Danach wurden die Zellen gepoolt, auf 6×10^7 Zellen pro 1,5 ml Einfriermedium eingestellt und in einem Kryoröhrchen eingefroren. Vor der Verwendung der Zellen wurden diese mit 35 Gy radioaktiv bestrahlt.

3.5 Screening nach geeigneten Spendern

Die gesunden Blutspender wurden unter Zuhilfenahme der Multimeren und dem Nachweis von IFN γ und CD107a, in einer intrazellulären Färbung, auf ihren CMV-Status sowie ihren HLA-Typ hin untersucht. Ein Spender war geeignet, wenn er CMV seropositiv war und einen HLA-A*0201 Typ aufwies. Wurden diese beiden Kriterien erfüllt, so erfolgte mittels einer intrazellulären Färbung oder eines Multimers das Screening nach CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen im Blut des Spenders. Bei Eignung des Spenders wurden aus 150 ml EDTA-Blut mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gewonnen und mit der Expansion der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten begonnen.

3.5.1 CMV IE-1 HLA-A*0201-Streptamer Färbung in Spendervollblut

Die CMV IE-1 HLA-A*0201-MHC-Klasse-I-Strep-tag-Monomere wurden zunächst an das Tactin-PE gekoppelt. Der gekoppelte Komplex lagert sich durch die Bindung des MHC-Peptid Komplex an den spezifischen T-Zell-Rezeptor an und kann vorhandene CMV IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen so detektiert. Es wurden für einen Ansatz bis zu 5×10^6 Zellen eingesetzt. Für 5×10^6 Zellen wurden 2 μ l IE-1-A2-MHC-I-Lösung mit 2 μ l-PE und 6 μ l IS-Puffer zusammengemischt und für 45 Min., bei 4 °C im Dunkeln inkubiert.

Danach wurden 20 μ l EDTA-Blut in ein FACS-Röhrchen vorgelegt. Pro Spender wurde eine Isotyp-Kontrolle und das HIV-Streptamer, als Negativkontrolle zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen, mitgeführt. Von der angesetzten Streptamer-Mischung wurden 7,5 μ l pro Ansatz in das EDTA-Blut zugegeben und für 20 Min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml IS-Puffer durch zentrifugieren, gewaschen (1500 rpm, 4 °C, 5 Min.). Der Überstand

wurde verworfen und das Pellet in 100 µl IS-Puffer resuspendiert. Danach wurden die Antikörper HLA-A2-FITC (1:20) und CD8-APC (1:100) zugesetzt. Zur Isotyp-Kontrolle wurden die entsprechenden Antikörper zugegeben. Die Ansätze wurden für 30 Min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden danach mit 1 ml IS-Puffer gewaschen. Für die Erythrozyten-Lyse wurden 500 µl FACS-Lyse pro Ansatz hinzugefügt und für 10 Min., bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach der Lyse wurden die Zellen erneut mit 1 ml IS-Puffer gewaschen und das Pellet in 200 µl D-PBS aufgenommen. Es erfolgte eine Messung am Durchflusszytometer.

3.5.2 CMV IE-1 HLA-A*0201-Pentamer Färbung in Spendervollblut

Das IE-1-A2-MHC-Klasse-I-Pentamer bindet spezifisch an den T-Zell-Rezeptor, sodass vorhandene spezifische IE-1 VLEETSVML Lymphozyten nachgewiesen werden können. Es wurde eine Isotyp-Kontrolle und das Negativ-Pentamer bei jedem Spender mitgeführt. Pro Ansatz wurden 20 µl EDTA-Blut und 80 µl D-PBS in ein FACS-Röhrchen zusammengemischt. Nach der Zugabe von 5 µl des IE-1-Pentamers (1:20), wurden die Zellen für 15 Min. bei RT im Dunkeln mit dem Pentamer inkubiert.

Danach wurde CD8-APC (1:100) und HLA-A2-FITC (1:20) zugegeben und erneut für 15 Min., diesmal bei 4 °C im Dunkeln, inkubiert. Nach einem Waschschrift (1500 rpm, 4 °C, 5 Min.) mit 1 ml PBS/1%FCS wurde durch das Hinzufügen von 500 µl FACS-Lyse, pro Ansatz, die Erythrozyten-Lyse angeschlossen. Nach 10 Min. Inkubation bei RT im Dunkeln, wurden die Ansätze zwei Mal mit 1 ml PBS/1% FCS gewaschen. Anschließend erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

3.5.3 CMV IE-1 HLA-A*0201-Tetramer Färbung in Spendervollblut

Das IE-1-A2-Tetramer lagert sich durch die Bindung des MHC-Peptid Komplexes an den T-Zell-Rezeptor an und IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen können erfasst werden.

Es wurden 20 µl EDTA-Blut mit 80 µl D-PBS in einem FACS-Röhrchen gemischt. Bei jedem Spender wurde eine Isotyp-Kontrolle und ein Negativ-Tetramer mitgeführt. Zur Probe wurde 10 µl IE-1 Tetramer-PE (1:10) bzw. 10 µl Negativ-Tetramer zugegeben und für 20 Min. bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde

HLA-A2-FITC (1:50) und CD8-APC (1:100) hinzugefügt und für weitere 15 Min. bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Nach einmaligem Waschen (1500 rpm, 4 °C, 5 Min.) erfolgte die Erythrozyten-Lyse, durch Zugabe von 500 µl FACS-Lyse pro Ansatz. Nach 10 Min. Inkubation, bei RT im Dunkeln wurden die Ansätze zwei Mal mit 1 ml PBS/1% FCS gewaschen. Die Proben wurden am Durchflusszytometer gemessen.

3.5.4 Intrazelluläre Färbung mit Nachweis von IFN γ und CD107a in frisch isolierten PBMCs

Zunächst wurden die PBMCs von gesunden Spender isoliert (Punkt 3.1). Danach wurden je $5 \cdot 10^5$ PBMCs in 200 µl RPMI-Medium pro Kavität einer 96-Loch Rundbodenplatte vorgelegt. Pro Spender wurden eine Isotyp-Kontrolle, PMA/Ionomycin, als Positivkontrolle, und je eine Kavität mit 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptid mitgeführt. Als Positivkontrolle wurde 0,5 µg/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin, auf die Endkonzentration berechnet, hinzugegeben. Beide Substanzen sind unspezifische Stimulatoren, die eine IFN γ sowie den CD107a Nachweis in den Lymphozyten ermöglichen, der als Ausdruck der spezifischen Aktivierung der T-Zellen durch das Antigen ist. Anschließend wurde der CD107a-APC Antikörper in einer Verdünnung von 1:80 dazugegeben, außer in die Isotyp-Kontrolle. In alle Ansätze wurde Brefeldin A (10 µg/ml auf Endkonzentration berechnet) und Golgi-Stop (1:15 im RPMI-Medium) hinzupipettiert, gut gemischt und bei 37 °C, 5 % CO₂ für 16-18 Stunden inkubiert. Das weitere Vorgehen wird in Punkt 3.14.3 beschrieben, mit dem Unterschied, dass keine dendritischen Zellen für die Antigenpräsentation generiert wurden. Das IE-1 VLEETSVML wurde direkt in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml, zu den frischen PBMCs hinzugegeben und nach der Inkubation wurde die Frequenz von IFN γ und CD107a durchflusszytometrisch ermittelt. Durch die Titration des IE-1 VLEETSVML Peptids wurde die Peptidkonzentration für die spätere Expansion der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen ermittelt.

3.6 Kultivierung der CMV IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 spezifischen Lymphozyten

Zur Kultivierung von CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten wurde das IE-1 VLEETSVML Peptid direkt zu den PBMCs hinzugefügt. Das Peptid fungiert als Proliferationsstimulus auf die vorhandenen IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen. Die Kultivierung erfolgte unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 99 % Luftfeuchtigkeit.

Tag 1

Die frischen PBMCs wurden auf eine Zellzahl von $1 \cdot 10^6$ Zellen/ml im RPMI Medium eingestellt. 2 ml pro 6-Loch Zellkulturplatte wurden ausgesät. Am selben Tag wurde das CMV IE-1-A2 VLEETSVML Peptid zugegeben. Die Peptidkonzentration wurde so gewählt, wie es in der IFN γ und CD107a Messung beim Screeningverfahren ermittelt wurde (Punkt 3.5.4). Diese lag bei 0,1 μ g/ml und 1,0 μ g/ml Endkonzentration (Watanabe K, 2007).

Tag 3

Am dritten Tag erfolgte die erste Zytokinzugabe: IL-2 50 UI/ml und je 5 mg/ml IL-15 bzw. IL-7 auf 1 ml neuen RPMI-Medium berechnet. Dazu wurde je 1 ml aus jedem Loch entnommen, abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Min. bei RT) und mit Zytokinen, auf das Endvolumen berechnet, versetzt zugegeben (Wölfl M, 2007).

Tag 5–10

An jedem zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel unter Zugabe der entsprechenden Zytokine, wie bei Tag 3 beschrieben (Wölfl M, 2007). Wenn nach ca. 10 Tagen Kultur die CD137 Expression der IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Zellen über 5 % lag, wurde eine CD137 Selektion durchgeführt (Punkt 3.8).

3.7 Kontrolle der CD137 Expression in den IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen

Das CD137 gehört zur TNF (Tumor-Nekrose Faktor) Familie und ist ein Ausdruck der Lymphozytenaktivierung. Die Kontrolle der CD137-Expression ist wichtig, um das Vorhandensein aktivierter CMV IE-1 VLEETSVML spezifischer T-Lymphozyten nachzuweisen. Es wurden $3 \cdot 10^5$ T-Zellen/200 μ l RPMI Medium pro

Ansatz in eine 96-Loch Rundbodenplatte vorgelegt und mit der entsprechenden IE-1-A2 VLEETSVML Peptidkonzentration (0,01 µg/ ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml Endkonzentration) restimuliert. Es wurde sowohl die Isotyp-Kontrolle als auch das HIV-A2 ILKEPVHGV Peptid (1,0 µg/ ml Endkonzentration) als Negativkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂, im Brutschrank, für 20 Stunden mit dem entsprechenden Peptid (HIV bzw. IE-1) inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze in vorbereitete FACS-Röhrchen überführt und mit je 1 ml kaltem PBS/1% FCS gewaschen (1500 rpm, 5 Min. bei 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Rückfluss resuspendiert. Für das Anfärben der Zellen wurden Flurochrom-markierte Antikörper, wie in Tabelle 3.7 dargestellt, zugegeben und für 30 Min. bei 4 °C im Dunkeln, inkubiert.

Tab.3.7: Übersicht des Färbeschemas der CD137 Färbung

	PE	PerCP	FITC	APC
Isotyp-Kontrolle	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
HIV ILKEPVHGV 1,0 µg/ml/Negativ Kontrolle	CD137	CD4	CD3	CD8
Ansätze mit IE-1-A2 VLEETSVML Peptid	CD137	CD4	CD3	CD8
Verdünnung	1:20	1:20	1:20	1:100

Nach der Inkubation wurden die Ansätze mit je 1 ml Waschpuffer bei 1500 rpm, 5 Min., bei 4 °C gewaschen. Für die Analyse am Durchflusszytometer wurde das Pellet in 150 µl Waschpuffer resuspendiert (Watanabe et.al, 2008).

3.8 CD137 Isolation mittels magnetischer Zellseparation

Die Restimulation der IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten mit dem IE-1-A2 VLEETSVML Peptid führt zur Hochregulation des CD137 auf der Oberfläche der T-Zellen. Durch einen anti-CD137-PE Antikörper und einen Sekundärantikörper, der an dem Phycoerythrin bindet, werden die Lymphozyten markiert. Der Sekundärantikörper ist mit einem magnetischen Partikel konjugiert

und ermöglicht so eine reversible Bindung an dem CD137 der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen, die in der magnetischen Säule hängenbleiben und selektiert werden können. Die sterile Isolation erfolgte unter Zuhilfenahme des CD137- Micro-Bead Kit von Miltenyi, nach Anleitung des Herstellers (Wöfl et.al, 2007; Wehler et.al, 2008; Watanabe et.al, 2008).

Zur Peptid-Restimulation wurde pro Kavität einer 24-Lochplatte $5 \cdot 10^6$ CD137 positiven T-Zellen pro 1 ml RPMI ausgesät und durch Zugabe der entsprechenden IE-1 VLEETSVML Peptidkonzentration restimuliert. Die Peptidkonzentration wurde anhand der Auswertung der CD137-Färbung, wie in Punkt 3.7 beschrieben, ist gewählt. Dem RPMI-Medium wurde IL-2 (50 U/ml), IL-7 (5 ng/ml) und IL-15 (5 ng/ml), auf das Endvolumen berechnet, zugesetzt. Die Zellen wurden für 22 Stunden bei 37 °C, 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen durch abpipettieren abgeerntet und bei 1500 rpm, 10 Min. bei 4 °C, abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 10 ml eiskaltem MACS-Puffer resuspendiert und der Waschschrift wiederholt. Alle nachfolgenden Waschschrift wurden bei 1500 rpm, 4 °C und für 10 Min. durchgeführt. Der Überstand wurde komplett entfernt und 40 µl MACS-Puffer sowie 10 µl CD137-PE pro $1 \cdot 10^7$ Zellen hinzugefügt. Der Ansatz wurde gut gemischt und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Mit 10 ml eiskaltem MACS-Puffer wurden die Zellen gewaschen und abzentrifugiert. Danach wurden 80 µl MACS-Puffer und 20 µl anti-Micro-beads pro $1 \cdot 10^7$ Zellen zugegeben, gut gemischt und für 10 Min. auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zwei Mal mit je 10 ml MACS-Puffer gewaschen und das Pellet anschließend in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert.

Die LS-Säule wurde am Magneten befestigt und mit 3 ml eiskaltem MACS-Puffer vorgespült. Es wurden 2 ml markierte Zellen auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 3x3 ml MACS-Puffer nachgespült und der Durchfluss für die spätere CD137 Färbung aufgehoben (Punkt 3.7). Die Säule wurde vom Magneten genommen und die Zellen mit 2 ml MACS-Puffer eluiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und ca. $1 \cdot 10^5$ Lymphozyten je Ansatz für eine Kontroll-CD137 Färbung eingesetzt. Es wurden 3 Ansätze gemacht mit je einer Isotyp-Kontrolle, dem Durchfluss aus der Säule und den CD137 positiven T-Zellen.

Die Färbung erfolgte analog zur CD137-Färbung Punkt 3.7.

3.9 Expansion der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten mithilfe der Allopool-Fütter-Zellen

Die Allopool-Fütter-Zellen dienen zur alloreaktiven unspezifischen Stimulation der CD137 positiven CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen und sollen deren Proliferation anregen.

Zunächst wurden die Allopool-Fütter-Zellen aufgetaut und bei 35 Gy radioaktiv bestrahlt. Zur Herstellung der Allopool-Fütter-Zellen siehe Punkt 3.4.

In eine 24-Lochplatte wurden pro 1 ml RPMI $5 \cdot 10^4$ CD137 positive T-Zellen und $5 \cdot 10^6$ Allopool-Fütter-Zellen gemischt. Danach wurden IL-2 50 U/ml, IL-7 5 ng/ml IL-15 5 ng/ml, und 1 μ g/ml PHA-L dem RPMI-Medium hinzugefügt. PHA-L dient zur Wachstumsstimulation der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, in dem die Hälfte des Mediums abpipettiert, abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT) und mit Zytokinen versetzt wieder zugegeben wurde. Nach ca. 14 Tagen Kultur erfolgte eine CD137 Färbung (siehe Punkt 3.7)

3.10 CD14 Monozyten Selektion mittels Miltenyi Kit

Das Prinzip der CD14 Selektion beruht auf der Bindung, eines mit magnetischem Partikel gekoppelten CD14 Antikörper, der an den CD14 Rezeptor bindet. Dieser Rezeptor wird zum größten Teil auf den Makrophagen und Monozyten exprimiert. Die CD14 Isolation erfolgte aus frisch isolierten PBMCs, wie in Punkt 3.1 beschrieben. Es wurden ca. $3 \cdot 10^8$ PBMCs für die CD14 Selektion eingesetzt und in 50 ml MACS-Puffer, in einem 50 ml Röhrchen, bei 1500 U/min 10 Min. 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 80 μ l MACS-Puffer sowie 20 μ l CD14 Microbeads pro $1 \cdot 10^7$ Zellen resuspendieren. Die PBMCs wurden für 15 Min. auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 50 ml kaltem MACS-Puffer bei 1500 U/min 10 Min. 4 °C gewaschen. Die LS-Säule wurde nach Befestigung, mit 6 ml kaltem MACS-Puffer vorgespült. Pro Säule können maximal $2 \cdot 10^9$ unmarkierte Zellen hinzugegeben werden. Das Pellet wurde, nach der Zentrifugation in 2 ml MACS-Puffer resuspendiert und auf

die Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit 6 ml MACS-Puffer durchgespült bis der Durchfluss klar war. Abschließend wurde die Säule vom Magneten gelöst und die CD14 positiven Zellen, durch Aufsetzen des Stempels, aus der Säule eluiert. Die Zellzahl wurde bestimmt (Punkt 3.3).

3.11 Generierung von dendritischen Zellen

Nach der Isolation der CD14 Monozyten, wurden diese durch Zugabe verschiedener Zytokinen zu potenten antigenpräsentierenden Zellen ausgereift. Die Ausreifung der dendritischen Zellen ist wichtig für die Antigenpräsentation und die T-Zelle Aktivierung.

Tag 1

Es wurden $5 \cdot 10^6$ Monozyten, in 3 ml RPMI pro Kavität auf eine 6-Lochplatte ausgesät. Das Medium wurde mit GM-CSF 100 ng/ml und IL-4 20 ng/ml, zur Differenzierung der Monozyten, versetzt.

Tag 2-4

Am zweiten und vierten Tag erfolgte ein Mediumwechsel, indem 1 ml RPMI entnommen wurde, abzentrifugiert (1500 rpm, 5 Min., RT) und mit Zytokinen (wie oben beschrieben) versetzt wieder zugegeben wurde.

Tag 6

Am sechsten Tag wurde ebenfalls ein Mediumwechsel vorgenommen und zusätzlich zum GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (10 ng/ml), TNF- α (10 μ g/ml), zur Ausreifung der Monozyten, hinzugefügt.

Tag 7

Die adhärennten und reifen dendritischen Zellen erkennt man mikroskopisch an ihren sternenförmigen Ausläufern. Zum Ernten wurden die dendritischen Zellen in der Zellkulturplatte für 30 Min. auf Eis gestellt. Dadurch verlieren sie ihre Adhärenz und können durch abpipettieren abgeerntet werden. Die leeren Kavitäten wurden mit 1 ml kaltem D-PBS nachgespült, um den Zellverlust gering zu halten. Ein Teil der reifen dendritischen Zellen wurde für die Phänotypisierung am Durchflusszytometer eingesetzt (Punkt 3.12), der Rest eingefroren (Punkt 3.2).

3.12 Phänotypisierung der reifen dendritischen Zellen

Pro Ansatz wurden 50.000 DCs eingesetzt.

Tab.3.12: Phänotypisierung der reifen dendritischen Zellen

Nr.	PE	PerCP	APC
1	5 µl IgG ₁	5 µl IgG ₂ alpha	5 µl IgG ₁
2	5 µl CD80	x	5 µl CD1a
3	5 µl CD86	x	5 µl CD14
4	5 µl HLA-ABC	x	5 µl CD40
5	x	x	10 µl CD83
6	x	5 µl HLA-DR	X
7	x	x	15 µl IgG ₂
8	x	x	15 µl CCR-7

Die Antikörper wurden entsprechend der Tabelle 3.12 zugegeben und für 20 Min. bei 4 °C, im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze durch Zugabe von 1 ml PBS/1% FCS bei 1500 rpm, 4 °C für 5 Min. gewaschen und in 100 µl PBS/1%FCS aufgenommen. Danach erfolgte die Messung am Durchflusszytometer.

3.13 CD137 Färbung der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen nach Kultivierung mit Allopool-Fütter-Zellen

Nach 14-tägiger Kultivierung der CMV IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten sterben die Allopool-Fütter-Zellen ab, die als unspezifischer Proliferationsstimulus auf die IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen wirken. Anschließend wurde eine CD137 Färbung durchgeführt (Punkt 3.7), um die Frequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten zu bestimmen.

3.14 Nachweis von IFN γ und CD107a in IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 Lymphozyten

Die dendritischen Zellen sind potente antigenpräsentierende Zellen. Zur spezifischen Stimulation von T-Lymphozyten wurden die dendritischen Zellen mit unterschiedlichen Tumor assoziierten Antigenen und dem IE-1 VLEETSVML Peptid beladen. Die Stimulierbarkeit der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen zeigte sich im Nachweis von IFN γ und CD107a.

3.14.1 Peptidbeladung der reifen dendritischen Zellen

Für einen Ansatz wurden $1 \cdot 10^5$ DCs (dendritische Zellen) eingesetzt. Die entsprechende Anzahl an DCs wurde aufgetaut und nach der Zellzahlbestimmung (Punkt 3.3) in 100 μ l RPMI Medium ohne Zusätze auf 15 ml Röhren verteilt. Nach dem unten aufgeführten Schema wurden die Peptide bzw. der Poole hinzugegeben und die DCs bei 37 °C, 5 % CO₂ für 2 Stunden inkubiert.

Tab. 3.14.1: Übersicht der Peptidbeladung der dendritischen Zellen

Nr.	Name	Konzentration auf DCs
1	Isotyp-Kontrolle	Unbeladen
2	HIV-A2 ILKEPVHGV	10 μ g/ml
3	PMA/Ionomycin	
4	IE-1-A2 VLEETSVML	Konz. wie im ICS ermittelt
5	Proteinase 3 (PR2,0322)	10 μ g/ml
6	Bcl-2 (90311,91164,91166)	10 μ g/ml
7	WT1-Pool	5 μ g/ml
8	NY-ESO-Pool	5 μ g/ml
9	MUC-1-Pool	5 μ g/ml
10	PRAME-Pool	5 μ g/ml
11	IE-A2-Pool	1 μ g/ml

Nach Inkubation wurden die DCs zwei Mal mit RPMI ohne Zusätze gewaschen (1500 rpm, 10 Min., RT) und in 100 μ l/Ansatz aufgenommen.

3.14.2 Peptidstimulation der CMV IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 spezifischen T-Zellen mit Nachweis von IFN γ und CD107a

Die IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen werden durch das IE-1 VLEETSVML Peptid sowie Tumor assoziierte Antigene, das von den DCs auf der Oberfläche präsentiert werden, stimuliert und die IFN γ Produktion sowie die CD107a Expression gemessen.

Es wurden $5 \cdot 10^5$ CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen in 100 μ l RPMI-Medium pro Kavität in eine 96-Loch Rundbodenplatte vorgelegt. Anschließend wurden $1 \cdot 10^5$ DCs in 100 μ l RPMI-Medium pro Kavität zugegeben, sodass ein Verhältnis von 5:1 (T-Zellen:DCs) entsteht. Die Ansätze wurden gut gemischt und

für 1 Stunde bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert.

Tab. 3.14.2: Testansätze zum Nachweis von IFN γ und CD107a in den IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten

Probe	PMA/Iono	Brefeldin A/ Golgi	APC
Isotyp-Kontrolle	x	Brefeldin A: 10 μ g/ml Golgi-Stop: 1:15	X
HIV-A2 ILKEPVHGV	x	in jede Kavität	CD107a 1:80
PMA/Iono	0,5 μ g/ml PMA 1 μ g/ml Iono		CD107a 1:80
Proben 1-8	x		CD107a 1:80

Als Positivkontrolle wurde 0,5 μ g/ml PMA und 1 μ g/ml Ionomycin, auf die Endkonzentration berechnet, hinzugegeben. Beide Substanzen sind unspezifische Stimulatoren, die eine IFN γ sowie die CD107a Nachweis in den Lymphozyten ermöglichen. Anschließend wurde der CD107a-APC Antikörper in einer Verdünnung von 1:80 dazugegeben, außer in die Isotyp-Kontrolle. In alle Ansätze wurde Brefeldin A (10 μ g/ml auf Endkonzentration berechnet) und Golgi-Stop (1:15 im RPMI-Medium) hinzupipettiert, gut gemischt und bei 37 °C, 5 % CO₂ für 16-18 Stunden inkubiert.

3.14.3 Charakterisierung der CMV IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 spezifischen Lymphozyten durch Nachweis der Induktion der IFN γ - und der indirekten Perforin Produktion mittels der Durchflusszytometrie

Mit diesem Funktionalitätstest soll nun, wie der Name schon sagt, die Funktion der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen überprüft werden. Die IE-1 VLEETSVML T-Zellen wurden 16-18 Stunden mit Tumor assoziierten Antigenen bzw. Pools beladenen dendritischen Zellen inkubiert. Dies dient zur Aktivierung der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mit Nachweis von IFN γ und CD107a. Der Nachweis von IFN γ und CD107a ist ein Ausdruck des spezifischen Erkennens des präsentierten Antigens, durch die T-Zellen. Die Testansätze, bestehend je aus IE-1 VLEETSVML Einzelpeptid und je Tumorpeptiden bzw. Pools beladenen DCs, werden in vorbeschriftete FACS-Röhrchen überführt. Hierzu wurde zuvor je 1 ml Waschpuffer vorgelegt. Die Zellen wurden 5 Min. bei

4 °C mit 1500 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im Rückfluss, durch die Zugabe der Oberflächenantikörper CD3-FITC und CD8-perCP, gefärbt. Die Proben wurden gut gemischt für 20 Min. im Dunkeln bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit 1 ml Waschpuffer gewaschen (1500 rpm für 5 Min. bei 4 °C). Der Vorgang wurde wiederholt. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und 250. µl Perm 2 1-fach pro Ansatz hinzugefügt. Die Ansätze wurden gut gemischt und für 12 Min., bei RT im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit 1 ml Waschpuffer gewaschen (1500 rpm für 5 Min., bei 4 °C). Die permeabilisierten T-Zellen wurden nun durch die Zugabe vom IFN γ Antikörper für 20 Min. bei 4 °C intrazellulär angefärbt. Danach wurde der Waschschrift zweimal wiederholt. Das Pellet wurde in 200 µl Waschpuffer für die Messung am Durchflusszytometer aufgenommen. Eine Übersicht des Färbeschemas ist der Tabelle 3.14.3 zu entnehmen.

Tab. 3.14.3: Färbeschema zur Charakterisierung der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten

Probe	FITC	PE	perCP	APC
Isotyp-Kontrolle	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
HIV-A2 ILKEPVHGV	CD3	IFN γ	CD8	X
PMA/Ionomycin	CD3	IFN γ	CD8	X
Proben 1-8	CD3	IFN γ	CD8	X
Verdünnung	1:50	1:20	1:20	1:80

4. Ergebnisse

4.1 Vergleich der Screeningverfahren: Multimere vs. Funktionalitätstest

Es wurde die Kreuzreaktivität der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten, hinsichtlich der Erkennung von Tumorantigenen, untersucht. Hierzu wurden PBMCs von gesunden Spendern isoliert und durch Zugabe des IE-1 VLEETSVML Peptids spezifische T-Lymphozyten über mehrere Wochen angereichert. Die Reaktivität wurde mittels einer Funktionalitätstestung nachgewiesen. Dazu wurden die CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten mit dendritischen Zellen des selben Spenders, die zuvor mit Tumorantigenen beladen wurden, inkubiert. Danach wurde IFN γ und CD107a in der intrazellulären Färbung durchflusszytometrisch bestimmt. IFN γ und CD107a sind Marker für die spezifische Aktivierung der T-Lymphozyten durch ein Antigen.

Bei der Suche nach geeigneten Spendern wurden Multimere, wie das Streptamer, Pentamer und Tetramer, sowie der Nachweis von IFN γ und CD107a in der intrazellulären Färbung eingesetzt. IE-1 Multimere binden spezifisch an den T-Zell-Rezeptor der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten und können durchflusszytometrisch detektiert werden.

Es wurden insgesamt 332 gesunde Spender auf eine CMV Infektion untersucht, von denen 108 Spender CMV seropositiv waren. Von diesen seropositiven Spendern wurden bei 10 Personen IE-1 VLEETSVML spezifische T-Lymphozyten im Blut nachgewiesen und konnten somit für die Versuche herangezogen werden. Bei 5 von 10 geeigneten Spendern ließen sich spezifische IE-1 VLEETSVML T-Lymphozyten expandieren und in ausreichender Zellzahl anreichern. Der HLA-Typ der Spender wurde ebenfalls bestimmt und nur Spender die HLA-A2 positiv waren, konnten für die Versuche herangezogen werden, da das CMV IE-1-A2 VLEETSVML Antigen untersucht wurde, das über das MHC-I HLA-A*0201 Allel präsentiert wird. Die HLA-Moleküle der Klasse I (humane Leukozyten Antigene) befinden sich auf jeder kernhaltigen Zelle und dienen zur Unterscheidung zwischen körperfremd und körpereigen. Bei den restlichen 5 geeigneten Spendern ließen sich keine CMV IE-1 VLEETSVML spezifische T-Lymphozyten expandieren.

Das Streptamer, Pentamer bzw. Tetramer wurde zusammen mit den CD8 sowie den HLA-A2 Antikörper dem EDTA-Blut direkt zugesetzt. Für die Aussage, ob ein Spender geeignet ist, wurden nur die IE-1/HLA-A2/CD8 positiven T-Lymphozyten berücksichtigt.

Für die intrazelluläre Färbung wurden PBMCs isoliert (Punkt 3.1) und mit dem IE-1 VLEETSVML Peptid in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml über Nacht inkubiert (Punkt 3.14.2 und 3.14.3). Als Positivkontrolle dienten PMA/Ionomycin, die als unspezifische Stimulatoren zu einer IFN γ Ausschüttung und einer CD107a Expression in den T-Lymphozyten führten. Das HIV-1 ILKEPVHGV Peptid wurde, in einer Konzentration von 1,0 µg/ml als Negativkontrolle mitgeführt und diente zum Ausschluss unspezifischer Reaktionen.

Anhand von zwei Spendern (J56 und K30) soll der Vergleich zwischen den Multimeren und der intrazellulären Färbung verdeutlicht werden.

Auffällig waren die hohen IE-1 VLEETSVML Ausgangsfrequenzen in der Pentamerfärbung bei vielen Spendern. Beim Spender J56 waren laut Pentamer 41,22 % der Lymphozyten IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen. Vergleichend dazu die Streptamerergebnisse mit 0,93 % und in der Tetramerfärbung lag die IE-1 Frequenz bei 0,69 %. Um die Frequenz sowie die Funktionalität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen zu beurteilen, wurde schließlich eine intrazelluläre Färbung angefertigt und das IE-1 VLEETSVML Peptid in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml titriert.

Die beste Stimulation der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen im Spender J56 wurde bei einer Peptidkonzentration von 1,0 µg/ml mit 1,79 % ermittelt. Nach 10-tägiger Kultivierung lag die Frequenz an IE-1 spezifischen T-Zellen 10-fach höher (11,62 %). Die Abbildungen 1.1.2 und 1.1.3 stellen zusammenfassend die Ergebnisse der Multimer- und der intrazellulären Färbung des Spenders J56 dar.

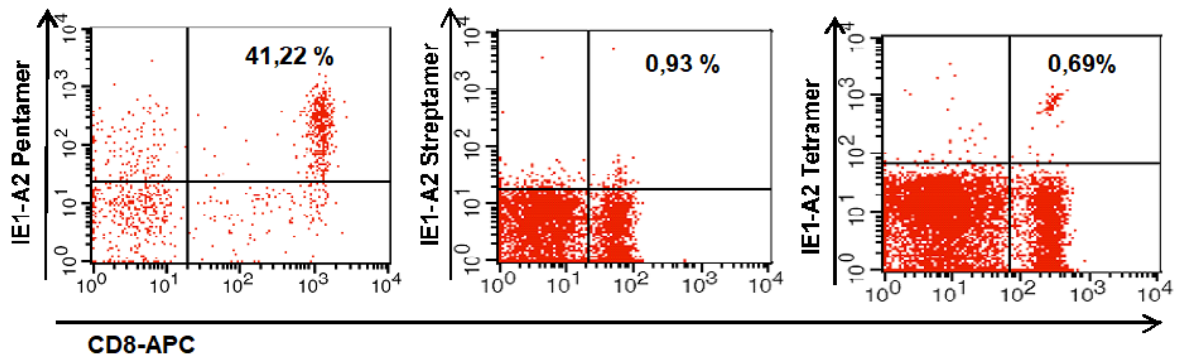


Abb. 4.1.1: Multimere im Vergleich Spender J56: Die Färbung wurde im frischen EDTA-Blut durchgeführt. Nach Zugabe von einem CD8 sowie HLA-A2 Antikörper und einer Inkubationszeit erfolgt die Messung am Durchflusszytometer. Laut Pentamerfärbung sind 41,22 % IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen, in der Streptamerfärbung 0,93 % und in der Tetramerfärbung 0,69 %.

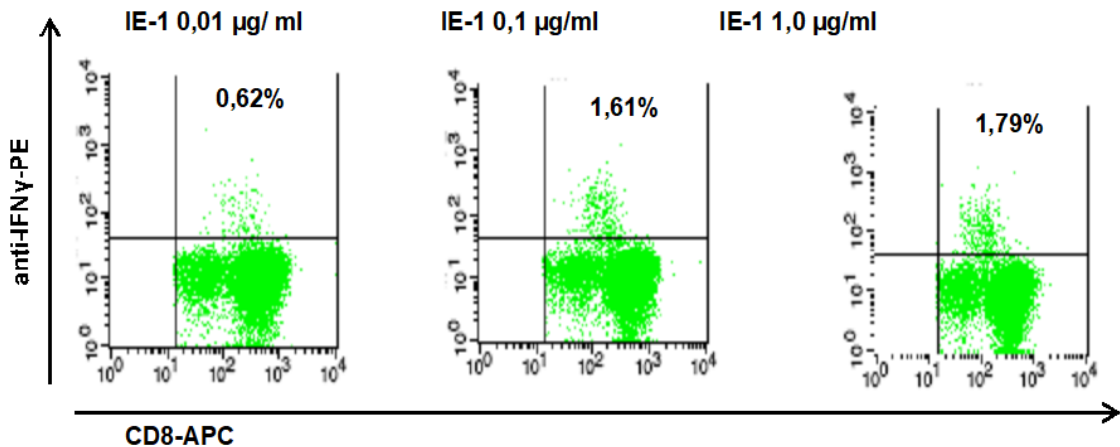


Abb. 4.1.2 IFN γ Nachweis beim Spender J56 in frischen PBMCs: Stimulation der PBMCs mit dem CMV IE-1-A2 VLEETSVML Peptid in unterschiedlichen Konzentrationen (0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml) über Nacht; Darstellung der IFN γ Produktion in CD3/CD8 positiven Lymphozyten. Mit zunehmender Peptidkonzentration an IE-1 VLEETSVML steigt auch der Anteil der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen.

Problematisch war, dass bei den Pentamer und Streptamer positiv getesteten Spendern keine Expansion der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten möglich war. Laut der Pentamerfärbung (Abb. 4.1.3) des Spenders K30 waren 36,88 % IE-1 VLEETSVML spezifische T-Lymphozyten. Parallel dazu wurde eine intrazelluläre Färbung (Abb. 4.1.4) durchgeführt. Hierzu wurde das IE-1 VLEETSVML Peptid in den Konzentrationen 0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml titriert und direkt zu den frisch isolierten PBMCs hinzugegeben. Das HIV-A2 ILKEPVHGV Peptid wurde als Negativkontrolle mitgeführt. Der Anteil an IE-1

VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten in den frischen PBMCs des Spenders K30 bei einer zugesetzten IE-1 VLEETSVML Peptidkonzentration von 0,1 µg/ml lag bei 0,85 %. Eine Stimulation der PBMCs mit niedrigeren oder höheren IE-1 VLEETSVML Peptidkonzentrationen brachte schlechtere Ergebnisse. Die HIV-A2 ILKEPVHGV Negativkontrolle lag allerdings bei 0,89 %, sodass die Aktivierung der T-Zellen als unspezifisch zu werten ist. Die PBMCs des Spenders K30 wurden mit 0,1 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptid weiter expandiert. Nach 10 Tagen erfolgte eine CD137 Färbung (Abb. 4.1.5), zum Nachweis der bis dahin expandierten spezifischen IE-1 VLEETSVML T-Zellen. Der Anteil der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen bei einer IE-1 Peptidkonzentration von 0,1 µg/ml lag bei 1,39 %, die HIV-A2 ILKEPVHGV Negativkontrolle bei 1,49 %. Somit waren keine IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen expandierbar, trotz der hochpositiven Ergebnisse in der Pentamerfärbung.

Selbst Modifikationen des Färbeprotokolls mit Verlängerung bzw. Verkürzung der Inkubationszeit sowie Inkubation bei RT und bei 37 °C brachte keine Änderung der ermittelten Pentamer Ergebnisse. Die Detektion der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mittels VLEETSVML Pentamer war unspezifisch, da trotz Nachweis von IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen, keine T-Zellen expandiert werden konnten. Die Färbungen mit Streptamer und Tetramer ergaben ähnliche Ergebnisse wie die intrazelluläre Färbung, die sich als das verlässlichste Verfahren zeigte. Wurden beim Screening in der intrazellulären Färbung IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen nachgewiesen konnten T-Zellen expandiert werden.

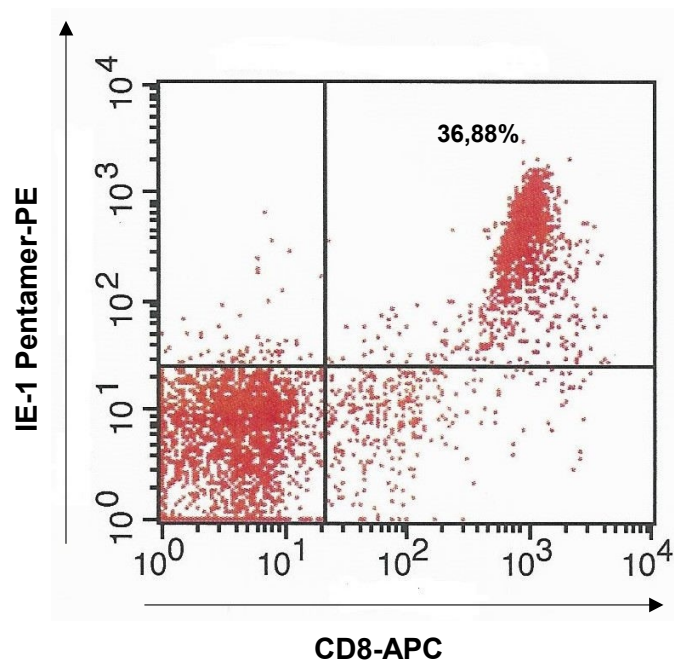


Abb. 4.1.3: Pentamerfärbung des Spenders K30. Nach Isolation der PBMCs wurde das IE-Pentamer und der CD8 Antikörper hinzugegeben. Nach Inkubation erfolgte die Messung am Durchflusszytometer. 36,88 % der Lymphozyten IE-1 VLEETSMVL spezifische T-Zellen wurden durch das IE-1 VLEETSMVL Peptid aktiviert

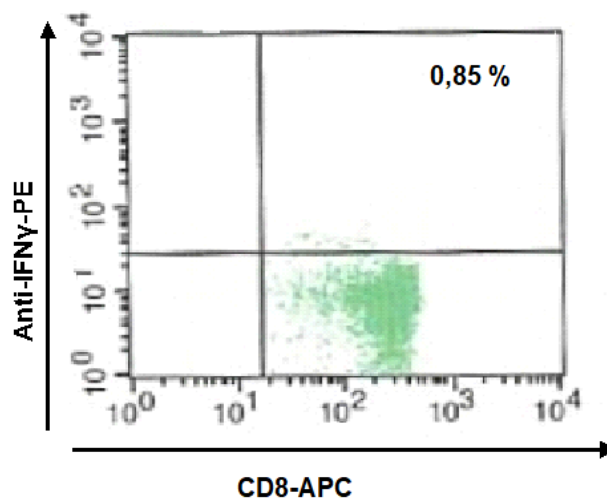


Abb. 4.1.4: Intrazelluläre Färbung der frisch isolierten PBMCs des Spenders K30. Zu den frischen PBMCs wurde 0,1 µg/ml IE-1 VLEETSMVL Peptid zugegeben. Nach Inkubation und einigen Waschschrinen sowie der Zugabe von weiteren Antikörpern erfolgte die durchflusszytometrische Auswertung. 0,85 % der T-Zellen des K30 Spenders wurden durch das IE-1 VLEETSMVL Peptid aktiviert. Die Negativkontrolle lag bei 0,89%. Der Spender K30 hat keine IE-1 VLEETSMVL spezifischen T-Zellen.

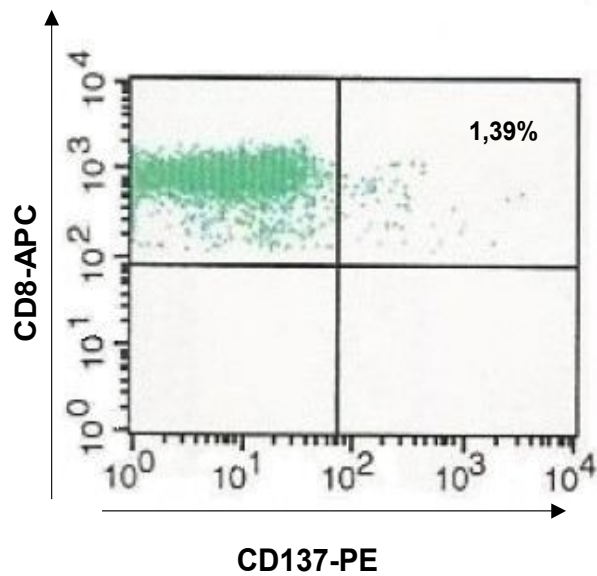


Abb. 4.1.5: CD137 Färbung des Spenders K30 nach 10 Tagen Kultivierung. Hierzu wurden die T-Zellen mit 0,1 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptid für 20 Stunden inkubiert und anschließend mit den CD8 sowie CD137 Antikörpern gefärbt. Nach 10 Tagen Kultur wurden 1,39 % der T-Zellen durch das IE-1 VLEETSVML Peptid aktiviert, wobei die HIV ILKEPVHGV Negativkontrolle bei 1,49 % lag. Somit wurden keine IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen expandiert

Eine Übersicht aller geeigneten Spender und ihrer Ausgangsfrequenz an IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten, liefert Tabelle 4.1.

Tab. 4.1: Übersicht der Ausgangsfrequenz an IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Zellen in verschiedenen Spendern. Beim Spender J56 lag in der Tetramerfärbung die Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen bei 0,69 %. In der intrazellulären Färbung in frischen PBMCs wurde bei einer 1,0 µg/ml Konzentration an IE-1 VLEETSVML Peptid 1,79 % der T-Zellen spezifisch durch das Peptid aktiviert. Die weitere Kultivierung der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen erfolgte mit 1,0 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptid.

Spender	IE-1-Tetramer Ausgangsfrequenz	Intrazelluläre Färbung IFN γ -PE – CD3/CD8 positive Lymphozyten beim Screening	CD137-PE - CD3/CD8-APC positive Lymphozyten beim Screening	Ermittelte IE-1 VLEETSVML Peptidkonzentration für die Expansion in der Zellkultur
J56	0,69 %	IE-1 0,01 µg/ml: 0,62 % IE-1 0,1 µg/ml: 1,61 % IE-1 1,0 µg/ml: 1,79 %		1,0 µg/ml IE-1
W42	0,33 %	IE-1 0,01 µg/ml: 0,20 % IE-1 0,1 µg/ml: 0,63 % IE-1 1,0 µg/ml: 0,95 %		1,0 µg/ml IE-1
V66	0,80 %	IE-1 0,01 µg/ml: 0,00 % IE-1 0,1 µg/ml: 1,92 % IE-1 1,0 µg/ml: 1,82 %		0,1 µg/ml IE-1
O56	2,04 %		IE-1 0,01 µg/ml: 0,65 % IE-1 0,1 µg/ml: 0,70 % IE-1 1,0 µg/ml: 0,58 %	0,1 µg/ml IE-1
Z16	0,30 %			0,1 µg/ml IE-1

4.2 Anzahl von IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Zellen im Vergleich zu pp65-A2 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen

Bei einer primären CMV Infektion wird sowohl das adaptive als auch das angeborene Immunsystem aktiviert. Um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen hat das Cytomegalovirus verschiedene Mechanismen entwickelt, wie beispielsweise die Reduktion der Prozessierung und Präsentation der viralen Peptide über die MHC-II Moleküle. Hierdurch wird eine latente Infektion ermöglicht. Das Cytomegalovirus wird direkt über Fusion der Zellmembran oder durch Endozytose in die Wirtszelle aufgenommen. Die Tegumentproteine wie das pp71 und das pp65, werden in den Zellkern transportiert und induzieren dort die Expression der immediate early Gene. Das pp65 Protein, auch pUL83 genannt, reguliert nicht nur die virale Genexpression, sondern sorgt auch für die Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes gegen das Virus. Die IE-1 und IE-2 Proteine führen ebenfalls zur Suppression der antiviralen Immunreaktion des Wirtes und sind essentiell für die virale Replikation. Durch die Expression der IE-

Gene tritt das Virus in den lytischen Zyklus ein. Die frühen IE-Proteine sorgen für die Replikation der viralen DNA, die späten IE-Proteine führen zum Zusammenbau der viralen Partikel und deren Freisetzung. Latent infizierte Zellen exprimieren eine geringe Anzahl an viralen Antigenen, um eine Immunantwort des Wirtes nicht zu provozieren. Bei einer latenten Infektion werden IE-Proteine kaum exprimiert, sodass IE spezifische CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in geringer Anzahl vorhanden sind. Eine Reaktivierung ist bei Immundefizienz, beispielsweise im Rahmen einer Stammzelltransplantation, möglich. Die IE-Proteine scheinen hierbei eine große Rolle zu spielen (Cristea et. al, 2010, Betran et. al, 2014, Crough et. al, 2009, Sinclair et. al, 2006, Kalejta R. F. et. al, 2008, Wills et. al, 2015). Der HLA-Typ ist ebenfalls von großer Bedeutung, da höhere IE-1 T-Zell Frequenzen bei HLA-A2, -B7, -B18, -B35 und -B8 positiven Spendern beobachtet wurden (Khan, et. al, 2002, Kern et. al, 2010). In der Literatur werden IE-1-A2 VLEETSVML und pp65-A2 NLVPMVATV als kodominante und immunogene Peptide von CMV bezeichnet.

Die Arbeit von Wills et. al, 1996 beschreibt eine 10-fach höhere Frequenz an pp65 T-Zellen in gesunden Spender im Vergleich zu IE-1. Auch Khan et. al, 2002 bestätigt mit seiner Arbeit, die höheren Frequenzen an pp65 in gesunden Probanden. Ein Grund für die unterschiedliche Immunogenität der beiden CMV Peptide könnte die Inhibierung der Präsentation und der Prozessierung des IE-1 Peptids durch das pp65 Peptid sein, wie die Arbeit von Gilbert et. al., 1996 zeigt. In dieser Arbeit waren von 332 gesunden Spendern 108 CMV seropositiv. 108 Probanden wiesen pp65-A2 NLVPMVATV spezifische T-Zellen auf, wobei 10 Spender zusätzlich IE-1-A2 VLEETSVML T-Lymphozyten hatten. Die Abb. 4.2 stellt die Ausgangsfrequenzen an IE-1-A2 VLEETSVML und pp65-A2 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen sowie die Frequenzen nach 10-tätiger Kultivierung vom Spender J56 und S9 gegenüber.

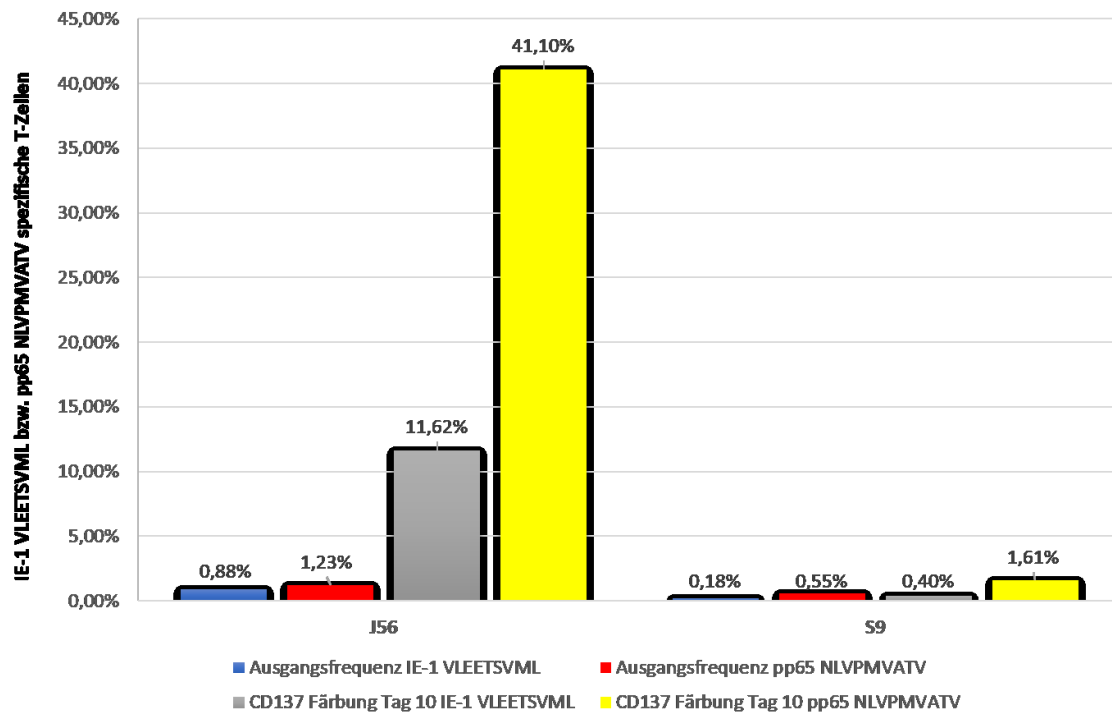


Abb. 4.2: Vergleich der pp65-A2 NLVPMVATV und IE-1-A2 VLEETSVMML T-Zell Frequenz beim Versuchsbeginn und nach 10 Tagen Kultivierung bei den Spendern J56 und S9. Die Ausgangsfrequenz wurde in frischem EDTA-Blut mittels Tetramer bzw. Streptamer ermittelt. Nach Isolation der PBMCs und anschließender Zugabe von 1,0 µg/ml IE-1 VLEETSVMML Peptid bzw. 0,1 µg/ml pp65-A2 NLVPMVATV, wurde nach 10 Tagen Kultivierung die CD137 Expression untersucht.

Beim Spender J56 lag die Ausgangsfrequenz der IE-1 VLEETSVMML spezifischen T-Zellen bei 0,88 %, die für pp65 NLVPMVATV bei 1,23%. Nach 10 Tagen Kultivierung konnten die pp65 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen auf 41,10 % expandiert werden, die IE-1 VLEETSVMML spezifischen T-Zellen auf 11,62 %. Die Frequenz der pp65 T-Zellen lag 33-fach höher; beim IE-1 Peptid 13-fach höher.

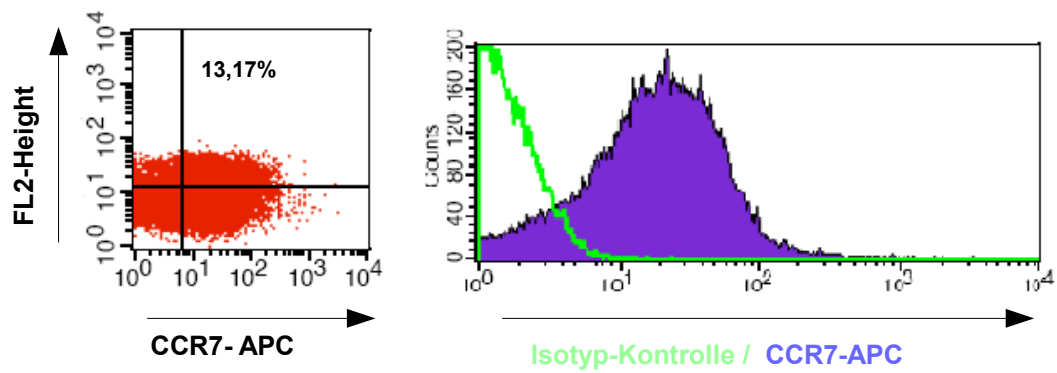
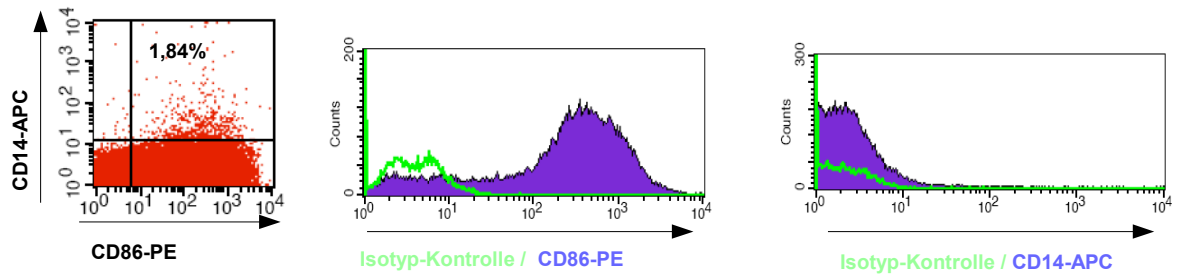
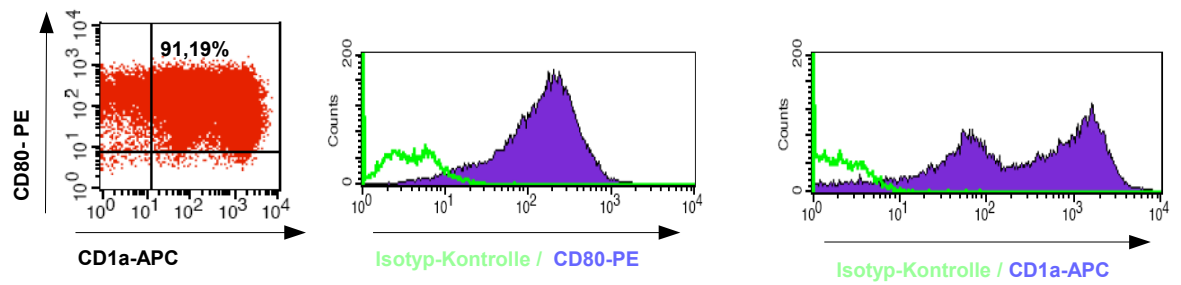
Die Ausgangsfrequenz der pp65 spezifischen T-Zellen, im Vergleich zu den IE-1 T-Zellen war bei beiden Spendern höher. Auch konnte nach 10 Tagen Kultivierung mehr pp65 spezifische T-Zellen angereichert werden.

Nachdem die Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVMML und pp65 NLVPMVATV T-Zellen mittels einer intrazellulären Färbung ermittelt wurde, wurden die PBMCs (Punkt 3.1) isoliert. Die PBMCs wurden mit 1,0 µg/ml IE-1-A2 VLEETSVMML und 0,1 µg/ml pp65-A2 NLVPMVATV Peptid stimuliert. Anschließend erfolgte die Kultivierung der Lymphozyten (Punkt 3.6) mit Kontrolle der CD137 Expression an Tag 10. CD137 gehört zur Tumor-Nekrose Familie und ist ein Ausdruck der Lymphozytenaktivierung, die durch das entsprechende Antigen (IE-1 bzw. pp65) stimuliert wurden. Beim Spender J56 lag die Ausgangsfrequenz an IE-1 CD8/IFN γ positiven Lymphozyten bei 0,88 % und für das pp65 Peptid bei 1,23 %. Nach 10-tägiger Expansion der IE-1-A2 VLEETSVMML und pp65-A2 NLVPMVATV spezifischen T-Lymphozyten stieg der Anteil an IE-1 VLEETSVMML spezifischen

Lymphozyten auf das 13-fache (11,62 %) und für das pp65 NLVPMVATV Peptid auf das 33-fache (41,1 %) an. Beim Spender S9 konnten die IE-1 VLEETSVML T-Zellen von 0,18 % auf 0,4 % angereichert werden. Bei den pp65 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen von 0,55 % auf 1,61 % gesteigert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass, in den untersuchten gesunden Spendern, die Ausgangsfrequenz an pp65-A2 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen im Vergleich zu IE-1-A2 VLEETSVML höher lag. Spender mit pp65 NLVPMVATV T-Zellen waren häufiger anzutreffen als mit IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen, den von 332 untersuchten Spendern hatten 108 pp65 NLVPMVATV spezifische T-Zellen und 10 Spender IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen. Des Weiteren ließen sich pp65-A2 NLVPMVATV spezifischen T-Lymphozyten besser expandieren, wie die Ergebnisse des Spenders J56 zeigen.

4.3 Phänotypisierung der reifen dendritischen Zellen

Bei allen geeigneten Spendern wurde aus den frisch isolierten PBMCs (Punkt 3.1) die CD14 Selektion durchgeführt mit anschließender Differenzierung zu unreifen DCs und schließlich die Ausreifung zu reifen dendritischen Zellen (Punkt 3.10). Nach dem Abernten der reifen dendritischen Zellen erfolgte eine Phänotypisierung der Zellen mittels Durchflusszytometrie. Danach wurden die reifen DCs, bis zu ihrem Einsatz in der intrazellulären Färbung, weggefroren. Die Reifung der dendritischen Zellen zeigte sich durch Hochregulierung von CD1a, CD40, CD80, CD83, CD86, CCR-7 und HLA-DR sowie Verlust von CD14. Exemplarisch wird die DC Phänotypisierung des Spenders J56 aufgeführt, die ausgereifte dendritische Zellen zeigt.



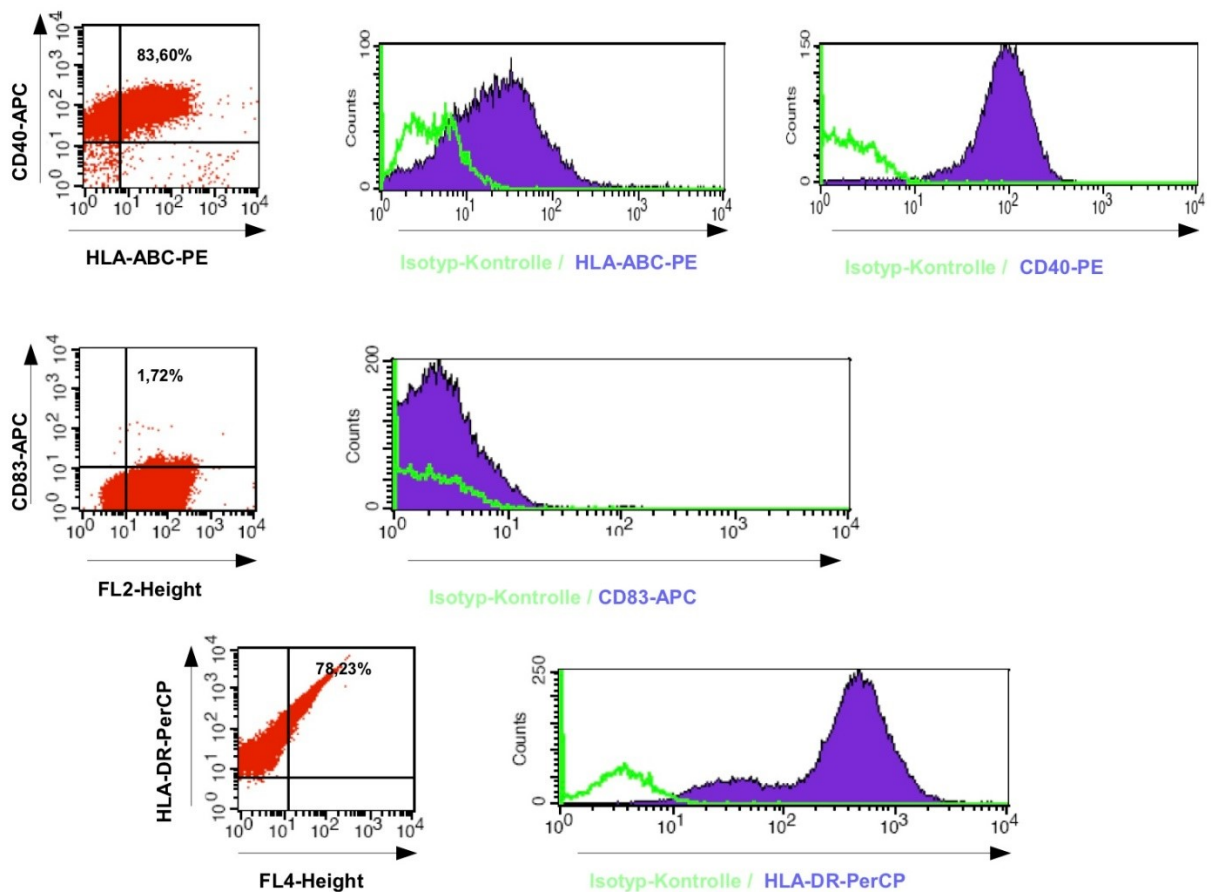


Abb. 4.3: Darstellung der reifen dendritischen Zellen des Spenders J56. Nach Isolierung der PBMCs erfolgt die CD14 Isolation mit anschließender Ausreifung der dendritischen Zellen mittels Zytokinzugabe.

4.4 Expansion und Anreicherung der IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten

Nach der Isolation der PBMCs (Punkt 3.1) wurde das IE-1-A2 VLEETSVML Peptid in einer Konzentration zugegeben, die bei der intrazellulären Färbung beim Screening (Punkt 3.5.4) ermittelt wurde. Diese Konzentration lag bei allen Spendern bei 0,1 µg/ml bzw. 1,0 µg/ml, da bei dieser Peptidkonzentration die beste Aktivierbarkeit der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen gemessen wurde. Danach wurden die Lymphozyten, wie unter Punkt 3.6 beschrieben, durch Zytokin- und Mediumzugabe, weiter kultiviert. Die Zugabe der Zytokine ist wichtig, um die T-Zellen zur Proliferation und Differenzierung anzuregen.

4.4.1 Kontrolle der CD137 Expression der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen

Nach einer Kultivierungsdauer von 6-13 Tagen wurden die T-Lymphozyten der gesunden Spender durch Zugabe des IE-1 VLEETSVML Peptids restimuliert und die CD137 Expression mittels der Durchflusszytometrie bestimmt (Punkt 3.7). Die Restimulation der IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten ist wichtig, um die Hochregulation von CD137 zu erreichen. Aktivierte T-Zellen exprimieren CD137 (4-1BB), ein TNF-Rezeptor, auf ihrer Oberfläche und binden an den 4-1BB Liganden auf den antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Durch diese Wechselwirkung wird eine intrazelluläre Kaskade in den T-Zellen induziert, wodurch die Proliferation, Zytokinfreisetzung und das Überleben der T-Zellen beeinflusst wird (Vinay, Kwon, 1998). Die Induktion der CD137 Expression in CD8⁺/CD3⁺ T-Zellen war abhängig von der eingesetzten IE-1 VLEETSVML Peptidkonzentration. Die optimale Peptidkonzentration wurde beim Screening durch die intrazelluläre Färbung für jeden einzelnen Spender ermittelt und lag bei 0,1 µg/ml und 1,0 µg/ml. Wurde eine höhere oder niedrigere Peptidkonzentration an IE-1 VLEETSVML gewählt, so konnte man eine Runterregulierung bzw. Steigerung der CD137 Expression feststellen. Bei allen gezeigten Spendern konnten CMV IE-1-A2 VLEETSVML spezifische T-Lymphozyten expandiert werden. Beim Spender J56 beispielsweise konnte die Frequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten nach 10 Tagen Kultivierung von 0,69 % auf 11,62 % gesteigert werden. Selbst bei einer geringeren Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten, wie bei Spender Z16, konnte nach 6 Tagen Zellkultur der Anteil der IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten von 0,30 % auf 1,67 %, verfünffacht werden. Die Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen konnte bei allen Spendern mindestens um das 4-fache gesteigert werden.

Eine Übersicht aller Spender mit der Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen sowie nach Expansion liefert Tab. 4.4.1.

Tab. 4.4.1: Übersicht der CD137 Expression der IE-1 VLEETSVML T-Lymphozyten nach unterschiedlichen Kultivierungstagen im Vergleich zur Ausgangsfrequenz. Beim Spender W42 wurde 1,0 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptids zur Stimulation der T-Zellen in der intrazellulären Färbung in frischen PBMCs eingesetzt. Ausgangsfrequenz an IE-1 spezifischen T-Zellen bei diesem Spender lag bei 0,33 %. Nach 10 Tagen Kultivierung wurde die CD137 Färbung durchgeführt und die T-Zell Frequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen lag bei 10,94 %.

Spender	IE-1 VLEETSVML Konzentration, die zur Kultivierung eingesetzt wurde	CD137 – CD3/CD8 positive Lymphozyten nach Kultivierung	Tag der Messung	IE-1 Tetramer Ausgangsfrequenz
J56	1,0 µg/ml	11,62 %	10	0,69 %
W42	1,0 µg/ml	10,94 %	10	0,33 %
V66	0,1 µg/ml	3,42 %	8	0,80 %
O56	0,1 µg/ml	12,02 %	13	2,04 %
Z16	0,1 µg/ml	1,67 %	6	0,30 %

Die CD137 Färbung ist eine funktionelle Färbung und prüft – wie der Name schon sagt – die Funktionalität der IE-1-A2 VLEETSVML T-Zellen. Bei Zugabe des IE-1-A2 VLEETSVML Peptids werden spezifische T-Lymphozyten stimuliert und regulieren das CD137 hoch. Diese Hochregulierung des TNF-Rezeptors lässt sich durchflusszytometrisch detektieren und ist ein Ausdruck der spezifischen Erkennung des IE-1-A2 VLEETSVML Peptids durch die T-Zellen.

In der Abbildung 4.4.1 ist die Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten und nach einigen Tagen Kultivierung übersichtlich für alle Spender dargestellt.

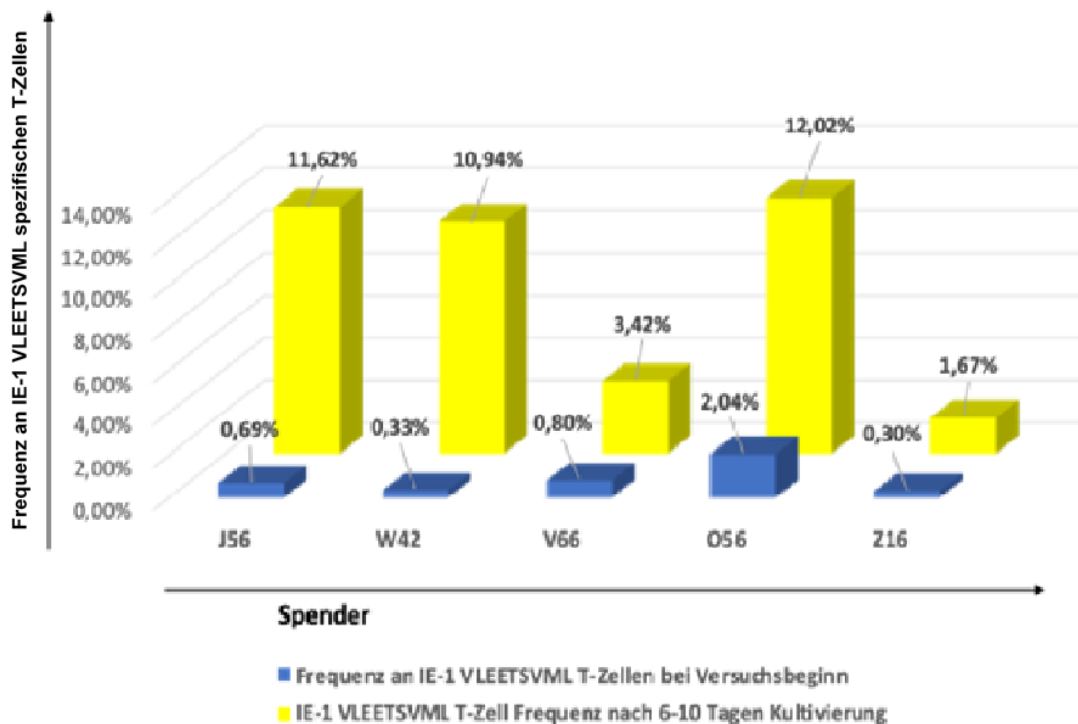


Abb. 4.4.1: Darstellung der IE-1 VLEETSVML T-Zell Frequenz bei Versuchsbeginn und nach 6-13 Tagen Kultivierung in verschiedenen Spendern. Beim Spender O56 lag die IE-1 VLEETSVML T-Zell Frequenz 10-fache höher Verglichen zur Ausgangsfrequenz.

4.4.2 CD137 Isolation der spezifischen IE-1 VLEETSVML Lymphozyten und die Expansion mit Allopool-Fütter-Zellen

Nachdem die CD137 Expression kontrolliert wurde (Punkt 4.4.1), erfolgte die Isolation der IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten mittels der magnetischen Zellseparation, um möglichst eine hohe Reinheit zu erreichen, damit IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten in ausreichender Anzahl für die Funktionalitätstests expandiert werden konnten. Vor der Zellseparation muss eine Restimulation der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen erfolgen, um die Hochregulation des CD137 zu erreichen, da die Isolation anhand des CD137 Antigens erfolgt. Die IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen des Spenders J56 wurden mit 1,0 µg/ ml IE-1-A2 VLEETSVML Peptid für 22 h restimuliert und wie in Punkt 3.8, ausführlich beschrieben isoliert. Vor der Isolation betrug der Anteil der IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen T-Zellen 11,62%, nach der Isolation wurde eine Reinheit von 92,01% der T-Lymphozyten erreicht. Die Abbildung 4.4.2 zeigt die Reinheit der CD137 positiven T-Zellen

nach Isolation mittels der magnetischen Zellseparation.

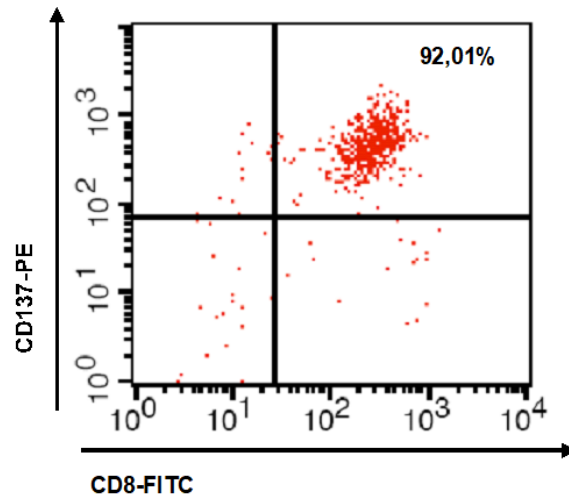


Abb. 4.4.2: Kontrolle der CD137 Expression nach Isolation der CD137 positiven Lymphozyten des Spenders J56 an Tag 10: Die IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen wurden durch Zugabe von 1,0 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptid restimuliert und nach 22 Stunden Inkubation mittels der magnetischen Zellseparation, anhand des hochregulierten CD137, isoliert.

Tab. 4.4.2: Übersicht der IE-1 VLEETSVML Frequenz vor und nach der CD137 Isolation; Nach Kultivierung der PBMCs und anschließender Restimulation mit dem IE-1 VLEETSVML Peptid wurde die CD137 Expression kontrolliert. Die CD137 positiven T-Zellen werden mit Hilfe der magnetischen Zellseparation isoliert und weiter kultiviert. Beispielsweise waren beim Spender W42 vor der Isolation 10 % IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen. Nach der Isolation lag der Anteil der IE-1 VLEETSVML T-Zellen bei 100 %.

Spender	Vor der Isolation der CD137/CD8/CD3 positiven Lymphozyten	Nach der Isolation der CD137/CD8/CD3 positiven Lymphozyten
J56	11,62 %	92,01 %
W42	10,94 %	100,00 %
V66	3,42 %	96,60 %
O56	12,02 %	91,09 %
Z16	1,67 %	83,87 %

Bei allen Spendern wurde nach der CD137 Isolation eine Reinheit an IE-1 VLEETSVML T-Zellen von mind. 80 % erreicht. Dies ist notwendig um eine Expansion anderer Zellen zu unterbinden und so unspezifische Bindungen zu vermeiden. Eine Übersicht der Frequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen aller Spender vor der CD137 Isolation und nach der Isolation liefert Tabelle 4.4.2.

Um die isolierten IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten weiter anzureichern, wurden Allopool-Fütter-Zellen in einem bestimmten Verhältnis zugesetzt. Diese führen zur unspezifischen Stimulation und zur weiteren Proliferation der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten. Genaue Vorgehensweise zur Herstellung der Allopool-Fütter-Zellen siehe Punkt 3.9.

4.4.3 Kontrolle der CD137 Expression der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen Tag 14 nach Expansion mit Allopool-Fütter-Zellen

Nach Isolation (Punkt 3.8) der CD137 positiven IE-1-A2 VLEETSVML T-Lymphozyten wurden diese, durch Zugabe von Zytokinen, weitere 14 Tage mit den Allopool-Fütter-Zellen expandiert und angereichert (Punkt 3.9). Die Zugabe der Zytokine bewirkt einen Proliferations- und Differenzierungsstimulus auf die T-Zellen. Die Allopool-Fütter-Zellen sorgen zusätzlich für einen unspezifischen Proliferationsstimulus auf die IE-1-A2 VLEETSVML T-Lymphozyten. Nach 14 Tagen Kultivierung der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mit den Allopool-Fütter-Zellen wurde erneut die CD137 Expression mittels Durchflusszytometrie überprüft, um sicher zu gehen, dass IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen kultiviert und angereichert wurden. Beim Spender J56 beispielsweise lag der Anteil der IE-1 VLEETSVML CD8/CD3 Lymphozyten nach 14 Tagen Expansion mit den Allopool-Fütter-Zellen bei 45,55 %. Verglichen mit der Ausgangsfrequenz von 1,79 % konnte der Anteil an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen auf mehr als das 25-fache erhöht werden.

Die Tabelle 4.4.3 stellt die ermittelten Ergebnisse der CD137 Färbung nach 12-14-tägiger Kultivierung der IE-1 VLEETSVML T-Zellen mit den Allopool-Fütter-Zellen aller Spender dar. Des weiteren liefert die Tabelle auch den Tag der Testung und die angewendete Methode.

Tab. 4.4.3: CD137 Expression der IE-1 VLEETSVML Lymphozyten nach Kultivierung mit den Allopool-Fütter-Zellen; Nach Isolation der CD137 positiven T-Zellen erfolgte die weitere Expansion mit den Allopool-Fütter-Zellen. Nach Restimulation der T-Zellen mit dem IE-1 VLEETSVML Peptid wurde die CD137 Expression erneut kontrolliert. Beim Spender W42 wurden 84,52 % der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen durch das IE-1 VLEETSVML Peptid aktiviert.

Spender	CD8 positive IE-1 -A2 VLEETSVML Lymphozyten	Tag der Testung	Methode
J56	45,55 %	14	ICS
W42	84,52 %	13	CD137 Färbung
V66	95,77 %	13	CD137 Färbung
O56	16,22 %	12	CD137 Färbung
Z16	66,41 %	6	IE-1-A2 Tetramer

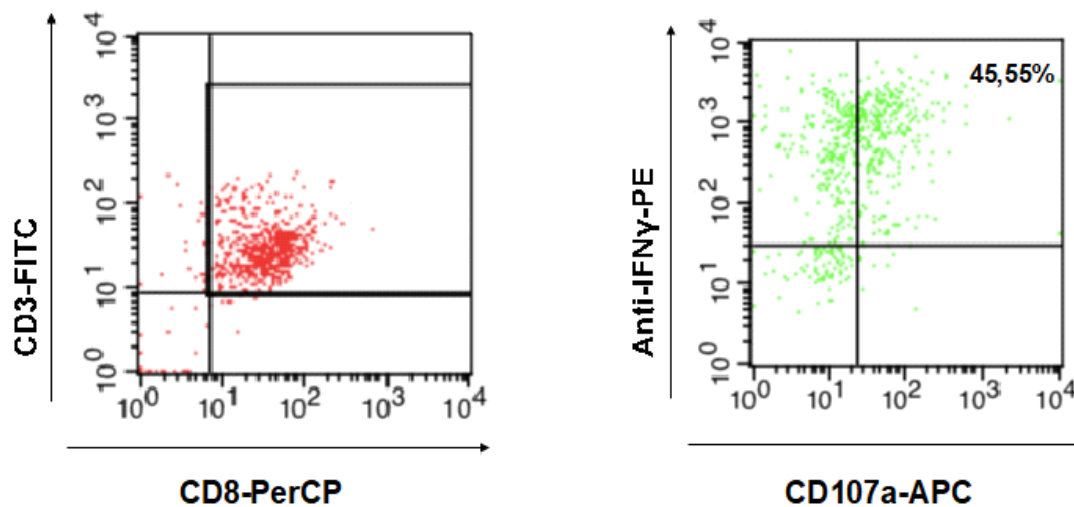


Abb. 4.4.3: Überprüfung der Funktionalität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten beim Spender J56 nach 14 Tagen Kultivierung mit den Allopool-Fütter-Zellen; Bei 45,55 % der CD3/CD8 positiven IE-1-A2 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten lässt sich IFN γ und CD107a nach Zugabe des IE-1 VLEETSVML Peptids nachweisen, als Hinweis für die spezifische Aktivierung der IE-1 T-Zellen durch das IE-1 Peptid

4.5 Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten mit Tumor assoziierten Antigenen

Die Funktionalität der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen wurde mit Hilfe einer intrazellulären Färbung und dem Nachweis von IFN γ und CD107a überprüft.

Die T-Zellen produzieren IFN γ nach Stimulation mit einem Antigen. Das IFN γ ist ein Glykoprotein, welches vom IFN γ -Rezeptor gebunden wird und auf allen

kernhaltigen Zellen zu finden ist. Die Bindung des IFN γ an den IFN γ -Rezeptor kernhaltiger Zellen führt zur vermehrten Expression an MHC-Molekülen, zur Chemotaxis und Ausschüttung weiterer Zytokine, die wiederum T-Zellen und andere Immunzellen aktivieren (Schroeder et. al, 2004). An die MHC-Komplexe von entarteten bzw. pathogenbefallenen Zellen binden CD8⁺ Lymphozyten, mit ihrem T-Zell-Rezeptor, und setzen neben IFN γ auch Perforine und Granzyme frei. Die Perforine durchsetzen die Zellmembran der befallenen Zielzelle mit Löchern. Das Granzyme, das als Serinprotease fungiert, dringt in die befallene Zelle ein und induziert die Apoptose der Zelle. CD107a ist ein Bestandteil der lysosomalen Membran, das bei Perforinausschüttung, durch Verschmelzung der lysosomalen und der Zellmembran der T-Zelle, auf die Oberflächenmembran der T-Zelle übertragen wird. Der Nachweis von CD107a, ist ein Nachweis der Degranulation von Antigen aktivierten T-Zellen und somit der zytotoxischen Funktion der T-Zelle. Sowohl IFN γ als auch Perforin sind wichtige Induktoren der direkten Lyse von entarteten und befallenen Zellen im Organismus (Street et. al, 2001).

Nach Beladung der dendritischen Zellen mit dem entsprechenden Peptid bzw. Pool in einer bestimmten Konzentration, wurden die dendritischen Zellen mit den IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Unter einem Peptid Pool versteht man eine Mischung aus verschiedenen Peptiden, die sich in einigen Aminosäuren überlappen. Der eingesetzte IE-Pool besteht aus Peptiden, die 15 Aminosäuren lang sind und sich in 11 Aminosäuren überlappen. Dadurch werden einerseits die T-Zellen optimal stimuliert und andererseits das gesamte IE-1 Protein als mögliches Antigen abgedeckt. Weitere Antikörper bzw. Reagenzien wie das PMA/Ionomycin, CD107a usw. wurden zugegeben und für 16–18 Stunden bei 37 °C inkubiert (siehe 3.14). PMA/Ionomycin wurden als Positivkontrolle eingesetzt, da die beiden Reagenzien die T-Lymphozyten unspezifisch stimulieren und die Produktion von IFN γ und die CD107a Expression induzieren. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Zugabe der Oberflächenantikörper, mit anschließender Permeabilisation sowie der Zugabe des IFN γ Antikörpers und schließlich der Messung am Durchflusszytometer. Die Permeabilisation ist wichtig um das IFN γ nachzuweisen, da es sich intrazellulär befindet. Die ausführlichen Schritte der Färbung sind den Punkten 3.14.1–3.14.3

zu entnehmen.

Bei keinem Spender konnte eine Kreuzreaktivität der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten mit den hier eingesetzten Tumor assoziierten Antigenen nachgewiesen werden. Einen Überblick über die Konzentrationen der eingesetzten Peptide bzw. Pools sowie die Ergebnisse der Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen bietet Tab. 4.5.

Spender J56

Als optimale Peptidkonzentration an IE-1 VLEETSVML wurde 1,0 µg/ml ermittelt, diese Konzentration wurde den frisch isolierten PBMCs des Spenders J56 sowie in eine andere Kavität 0,01 µg/ml des pp65 NLVPMVATV Peptids zugesetzt. Die Ausgangsfrequenz beim Screening an IE-1 spezifischen T-Zellen betrug 1,79% und 1,23 % der T-Zellen wurden durch das pp65 NLVPMVATV Peptid spezifisch aktiviert.

Nach 10-tägiger Kultivierung erfolgte eine Restimulation der T-Zellen mit 1,0 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptid. Die pp65 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen wurden mit 0,01 µg/ml Peptid restimuliert. Am darauffolgenden Tag wurde die CD137 Färbung durchgeführt. 11,62 % der Lymphozyten waren IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen und 41,10 % waren für das pp65 NLVPMVATV Peptid spezifisch. Im Vergleich zur Ausgangsfrequenz lag die Frequenz der IE-1 VLEETSVML spezifisch aktivierten T-Zellen 10-fach höher und die Frequenz an pp65 T-Zellen sogar 40-fach höher. Danach wurden die CD137 positiven T-Zellen mit einer Reinheit von 92,01 %. Isoliert. Nach 14-tägiger Expansion mit Allopool-Fütter-Zellen waren 57,37 % IE-1 spezifische T-Zellen. Der anschließende Funktionalitätstest mit Tumor assoziierten Antigenen zeigte keine Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mit den eingesetzten Tumorantigenen. Bei diesem Spender wurde ein Funktionalitätstest mit Antigenpräsentation durch die dendritischen Zellen durchgeführt und ein Versuch mit direkter Zugabe der Pools bzw. Einzelpeptide zu den T-Zellen. Es konnte kein Unterschied bei den Ergebnissen festgestellt werden. Die Frequenz reaktiver T-Zellen für das IE-1 VLEETSVML Einzelpeptid schwankte zwischen 31,57 % und 81,80 %.

Unabhängig von der Konzentration an Tumor assoziierten Antigenen lagen die

Werte immer unter den Werten der Negativkontrolle, sodass eine Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen in diesem Spender ausgeschlossen werden kann.

Spender W42

Die Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSMVL spezifischen T-Zellen lag bei diesem Spender in der intrazellulären Färbung bei 0,22 % bei 1,0 µg/ml eingesetztem Peptid und für das pp65 NLVPMVATV Peptid waren 0,54 % der T-Zellen spezifisch für pp65 bei Einsatz von 0,01 µg/ml Peptid.

Nach 10-tägiger Expansion wurden 10,94 % der T-Zellen durch das IE-1 VLEETSVML Peptid aktiviert. Mit einer 100 %-igen Reinheit nach der CD137 Isolation, lag der Anteil der IE-1 T-Zellen nach 13 Tagen Expansion mit den Allopool-Fütter-Zellen bei 84,52 %. Die Frequenz an IE-1 VLEETSVML spezifisch aktivierten T-Zellen konnte nach 24 Tagen Kultivierung um das 80-fache gesteigert werden.

Bei der intrazellulären Färbung mit den Tumor assoziierten Antigenen fiel auf, dass das IE-1 VLEETSVML Einzelpeptid sehr schlecht von den IE-1 T-Zellen sowohl auf den DCs als auch das direkt hinzugefügte Peptid erkannt wurde, da die Frequenz spezifisch aktivierter T-Zellen bei 7-9 % lag. Insgesamt lag die Frequenz spezifisch aktivierter T-Zellen beim Funktionalitätstest mit Tumor assoziierten Antigenen, genauso wie die Negativkontrolle, unter 1 %, sodass eine Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen ausgeschlossen werden kann.

Spender V66

In der intrazellulären Färbung wurde eine Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen von 1,92 % bei Zugabe von 0,1 µg/ml IE-1 Peptid ermittelt. Nach 8 Tagen Expansion konnte die Anzahl der IE-1 T-Zellen auf das 8-fach angereichert werden (3,42 %). Nach Isolation der CD137 positiven T-Zellen mit einer Reinheit von 96,59% wurden die T-Zellen mit den Allopool-Fütter-Zellen für weitere 13 Tage expandiert. Die nachfolgende CD137 Färbung zeigte einen 95,77 %-igen Anteil an IE-1 T-Zellen. Der anschließende Funktionalitätstest zeigte keine Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mit den eingesetzten Tumor assoziierten Antigenen.

Spender O56

Beim Screening in der CD137 Färbung erwies sich 0,1 µg/ml als die optimale Konzentration an IE-1 VLEETSVML Peptid bei der 0,16 % der T-Zellen aktiviert wurden.

Nach 13 Tagen Expansion konnte der Anteil an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen auf das 75-fache, auf 12,02 %, erhöht werden.

Es erfolgt die CD137 Isolation mit 91,09% Reinheit und weiterer Anreicherung mit den Allopool-Fütter-Zellen. Nach weiteren 12 Tagen Kultur wurden 16,22 % der T-Zellen spezifisch durch das IE-1 VLEETSVML Peptid aktiviert. Sowohl das IE-1 VLEETSVML Einzelpeptid als auch der IE-Pool wurden von 93-97 % der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten erkannt. Die Tumor assoziierten Antigene konnten hingegen von dem IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zell-Rezeptor nicht kreuzreaktiv gebunden werden und führten nicht zur Aktivierung der T-Zellen.

Spender Z16

Das Screening beim Z16 erfolgte mittels der Tetramerfärbung mit einer Ausgangsfrequenz an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen von 0,30 %. Nach 6-tägiger Kultivierung mit 0,1 µg/ml IE-1 VLEETSVML Peptid konnten die IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen auf das 8-fache (1,67 %) der Ausgangsfrequenz angereichert werden. Nach der CD137 Isolation wurde eine Reinheit von 88,17 % erreicht. Es folgte die weitere Expansion mit Allopool-Fütter-Zellen für 6 Tage. Der Anteil der spezifisch aktivierten T-Zellen durch das IE-1 VLEETSVML Peptid lag bei 66,41 % in der Tetramerfärbung.

Die intrazelluläre Färbung mit den Tumor assoziierten Antigenen zeigte keine Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen gegen die eingesetzten Tumor assoziierten Antigene.

Die Tabelle 4.5 liefert einen Überblick über die eingesetzten Tumor pools bzw. Einzelpeptide und deren Aktivierungsergebnisse.

Tab. 4.5: Kreuzreaktivität der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Lymphozyten; die Prozentangaben geben den Anteil der CD3/CD8 positiven Lymphozyten, die IFN γ produzieren und CD107a exprimieren, als Ausdruck der spezifischen Aktivierung durch das Peptid/Pool. Beim Spender J56 und W42 wurde das IE-1 Einzelpeptid für die Expansion der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen in einer Konzentration von 1,0 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt, bei den restlichen Spendern wurde 0,1 $\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Diese Peptidkonzentration wurde in der intrazellulären Färbung, beim Screening als optimale Konzentration ermittelt.

Beim Spender J56 lag die Positivkontrolle (PMA/Ionomycin) bei 71,80 % und die Negativkontrolle bei 0,00 %. Das IE-1 VLEETSVML Einzelpeptid, präsentiert von den dendritischen Zellen, wurde von 18,26 % der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen erkannt. Beim IE-1 VLEETSVML Einzelpeptid, das direkt zu den T-Zellen zugegeben wurde, wurden 50,49 % IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen aktiviert. 39,05 % der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen wurden durch den IE-Pool aktiviert. Die anderen eingesetzten Tumor assoziierten Antigene erreichten Werte <1 %.

Bei keinem der Spender konnte eine Kreuzreaktivität mit den eingesetzten Tumor assoziierten Antigenen beobachtet werden.

	Negativ Kontrolle HIV ILKEPV HGV	PMA/Ionomycin	CMV IE-1-A2 VLEET SVML mit DCS	CMV IE-1-A2 VLEET SVML ohne DCS	Proteinase 3 (PR2, 0322)	Bcl-2 (90311, 91164, 91166)	WT1-Pool	NY-ESO-Pool	MUC- 1 Pool	PRAME - Pool	IE- Pool
Konzentration auf den DCs	10 $\mu\text{g/ml}$	-	1,0 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Siehe Tab. 4.4.1 S. 53	1,0 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,1 $\mu\text{g/ml}$ Siehe Tab. 4.4.1 S. 53	10 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$	1,0 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	5 $\mu\text{g/ml}$	1,0 $\mu\text{g/ml}$
J56	0,00 %	71,80 %	18,26 %	50,49 %	0,08 %	0,03 %	0,08 %	0,19 %	0,29 %	0,05 %	39,05 %
W42	0,25 %	81,35 %	8,83 %	7,09 %	0,12 %	0,15 %	0,14 %	0,11 %	0,16 %	0,11 %	28,15 %
V66	0,03 %	78,98 %	67,70 %	4,12 %	0,13 %	0,12 %	0,14 %	0,13 %	0,08 %	0,12 %	68,59 %
O56	2,25 %	39,30 %	25,45 %	31,16 %	2,11 %	2,56 %	2,10 %	1,96 %	2,36 %	1,99 %	25,96 %
Z16	0,14 %	57,22 %	9,88 %	41,82 %	0,25 %	0,16 %	0,09 %	0,11 %	0,11 %	0,13 %	9,00 %

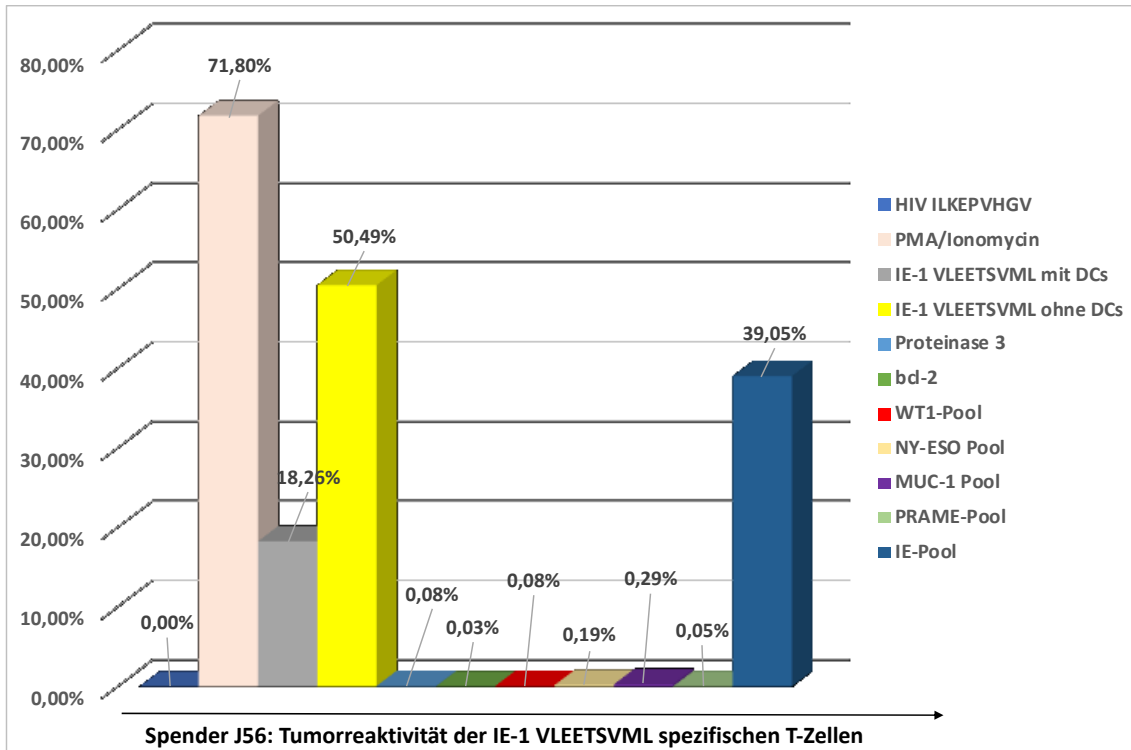


Abb. 4.5: Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVM spezifischen T-Zellen mit Tumor assoziierten Antigenen. DCs wurden mit verschiedenen Tumorantigenen beladen und mit den IE-1 spezifischen T-Zellen für 1 Stunde inkubiert. Nach Zugabe von weiteren Antikörpern wurde die $IFN\gamma$ Ausschüttung und das CD107a der IE-1 VLEETSVM T-Lymphozyten durchflusszytometrisch erfasst. Auf der y-Achse sind die verschiedenen tumorassoziierten Antigene bzw. Pools aufgetragen. Die x-Achse gibt in % den Anteil der IE-1 VLEETSVM spezifischen T-Zellen wieder, die spezifisch das Antigen erkannt haben.

Das HIV ILKEPVHGV Peptid diente als Negativkontrolle und wurde auf 0,00 % gesetzt. PMA/Ionomycin stimuliert unspezifisch die T-Zellen und diente als Positivkontrolle.

18,26 % der T-Zellen wurden durch das IE-1 VLEETSVM Peptid aktiviert, das auf den dendritischen Zellen präsentiert wurde. 50,49 % der IE-1 VLEETSVM spezifischen T-Zellen erkennen das direkt hinzugegebene IE-1 VLEETSVM Peptid, ebenso wird der IE-Pool von 39,05 % IE-1 T-Zellen erkannt. Die IE-1 VLEETSVM spezifischen T-Zellen zeigten keine Aktivierung auf die von den DCs präsentierten Tumor assoziierten Antigenen. Es besteht somit keine Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVM spezifischen T-Zellen mit den eingesetzten Tumor assoziierten Antigenen.

5. Diskussion

Eine frühe Reaktivierung des Cytomegalovirus nach einer Stammzelltransplantation stellt einerseits einen Risikofaktor für die transplantationsbezogene Mortalität dar, andererseits ist es ein positiver prognostischer Faktor für das rezidivfreie Überleben von Patienten.

Die ersten Hinweise gab es 1986 in der Studie von Lönnqvist B et. al, bei der Leukämiepatienten mit einer CMV Reaktivierung nach einer Knochenmarktransplantation seltener Rezidive entwickelten. Aktuellere Studien von Elmaagacli et. al, 2011 und Green et. al, 2013 zeigen ebenfalls eine Verlängerung des rezidivfreien Überlebens bei AML (=akute myeloische Leukämie) Patienten nach allogener Stammzelltransplantation, aufgrund einer CMV Reaktivierung. Auch Patienten mit einer chronisch myeloischen Leukämie profitieren von einer CMV Reaktivierung nach Stammzelltransplantation (Ito et. al, 2003). Welcher Mechanismus hinter diesem positiven Effekt steht, ist noch nicht geklärt. Scheinbar gibt es einen Zusammenhang zwischen der CMV Reaktivierung und einer erhöhten Aktivität der Graft-versus-Host Erkrankung, wodurch das „Outcome“ des Patienten verbessert wird (Jang et al, 2015). Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass eine Graft-versus-Host Erkrankung die Mortalität nach einer Stammzelltransplantation deutlich erhöht. Ist durch die CMV Reaktivierung im stammzelltransplantierten Patienten ein Virus- versus-Leukämie Effekt denkbar? Ist eine spezifische kreuzreaktive Peptiderkennung von Tumor assoziierten Antigenen durch IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen gegeben?

Seit langem wird die Hypothese der Kreuzreaktivität des T-Zell-Rezeptors und dem zugrundeliegenden Mechanismus diskutiert (Yin und Mariussa, 2009). Die Diversität des T-Zell-Rezeptors wird durch genetische Rekombination und somatische Hypermutation, einer Punktmutation in der variablen Region, ermöglicht. Das Repertoire an möglichen T-Zell-Rezeptor Varianten ist im Vergleich zu der Vielzahl der Antigene begrenzt, sodass die Möglichkeit einer kreuzreaktiven Erkennung mehrerer Antigene durch einen T-Zell-Rezeptor, ohne hohe Sequenzmorphologie der Peptide, anzunehmen ist (Regner, 2001).

In dieser Arbeit wurde die Hypothese der Kreuzreaktivität von IE-1 VLEETSVML

spezifischen T-Zellen mit 7 verschiedenen Tumor assoziierten Antigenen untersucht. Das IE-1 VLEETSVML Peptid ist, neben dem pp65 NLVPMVATV Peptid, ein wichtiges und immunogenes Epitop des CMV. Das VLEETSVML Fragment des IE-1 Peptids weist die höchste Immunogenität von allen IE-1 Peptiden auf (Khan et.al, 2002).

Von 332 Personen waren bei 10 Spendern CMV IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen nachweisbar. Die Durchseuchungsrate für CMV wird auf ca. 30-90 % geschätzt (Cannon et. al, 2010). Die geringe Spenderanzahl mit nachweisbaren IE-1 VLEETSVML T-Zellen könnte auf die unterschiedliche Expression der IE-Gene während der Infektion zurückzuführen sein. Bei der Primärinfektion bzw. Reaktivierung des Cytomegalovirus werden IE-Proteine exprimiert und bei latent infizierten Zellen wieder runterreguliert (Craigen et. al, 1996, Srivastava et. al, 1999), sodass ein Nachweis von CD8⁺ IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen erschwert ist.

Zur Expansion der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen wurde das IE-1 VLEETSVML Peptid direkt zu den frisch isolierten PBMCs hinzugesetzt. Nach Isolation und Selektion der CD137 positiven IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen fand die weitere Expansion mit den Allopool-Fütter-Zellen statt, die als unspezifischer Proliferationsstimulus fungierten. Anschließend wurde die Funktionalität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mittels der intrazellulären Färbung und dem Nachweis von IFN γ und CD107a überprüft, das als Ausdruck der Aktivierung der IE-1 spezifischen T-Zellen durch das IE-1 VLEETSVML Peptid ist.

Zum Screening geeigneter Spender wurde in der intrazellulären Färbung das IFN γ sowie das CD107a, nach Zugabe des IE-1 VLEETSVML Peptids, in den frischen PBMCs gemessen. Die intrazelluläre Färbung bot zwei Vorteile im Vergleich zu den Multimeren. Die Funktionalität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen wurde schon im Screeningverfahren getestet und die Peptidkonzentration zur weiteren Expansion der T-Zellen festgelegt. Zum anderen konnten IE-1 spezifische T-Zellen sicher expandiert werden, wenn in der intrazellulären Färbung eine Aktivierung der T-Zellen durch das IE-1 VLEETSVML Peptid gezeigt werden konnte. Vor allem das IE-Pentamer erwies

sich als unzuverlässig, da sehr hohe Ausgangsfrequenzen an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen ermittelt wurden, aber keine T-Zellen expandiert werden konnten. In der parallel durchgeführten intrazellulären Färbung waren keine IE-1 T-Zellen nachweisbar, sodass von einer unspezifischen Bindung des IE-Pentamers ausgegangen werden muss. In vielen Publikationen, wie beispielsweise Gratama et. al, 2008, wurden IE T-Zellen mit einem IE-Pool expandiert, wodurch die Spendersuche als auch die Expansion erleichtert wurden, da auch in dem Spenderkollektiv dieser Arbeit bei vielen Spendern T-Zellen gegen den IE-Pool vorhanden waren, jedoch keine IE-1 VLEETSVML spezifischen Lymphozyten.

Spender mit pp65 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen waren häufiger anzutreffen (108 von 332 getesteten Spendern) und die Ausgangsfrequenz an spezifischen T-Zellen war zumeist doppelt so hoch im Vergleich zum IE-1 VLEETSVML. Höhere Frequenzen an IE-1 spezifischen T-Zellen werden häufiger bei HLA-A2, -B7,-B18 oder -B8 und HLA-B35 Typ gemessen (Khan et. al, 2002 und 2008, Kern et. al, 2010). In der Arbeit von Wills et. al, 1996 werden 10-fach höhere Frequenzen an pp65 NLVPMVATV spezifischen T-Zellen im Vergleich zu den IE-1 VLEETSVML T-Zellen in gesunden Spendern beschrieben.

Im abschließenden Versuch wurden die IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen auf ihre Kreuzreaktivität gegenüber Tumor assoziierten Antigenen untersucht. Bei allen Spendern fallen die schwankenden Werte beim IE-1 VLEETSVML Einzelpeptid auf. Bei 2 von 5 Spendern ist die IE-1 Antwort stabil, unabhängig von der Antigenpräsentation, d. h. unabhängig davon, ob das IE-1 VLEETSVML Peptid auf den DCs präsentiert wurde oder ob das Peptid direkt zu den T-Zellen hinzugegeben wurde. Beim Spender J56 wurden etwa doppelt so viele IE-1 VLEETSVML spezifische T-Zellen durch das direkt hinzugegebene IE-1 VLEETSVML Peptid aktiviert als durch das Peptid, das von den DCs präsentiert wurde. Beim Spender Z16 liegt die IE-1 VLEETSVML Antwort beim direkt zugegebenen Peptid vierfach höher (41,82%) als auf den DCs präsentierte Peptid (9,88%). Eine mögliche Erklärung wäre eine unzureichende Beladung der DCs oder eine zu geringe Konzentration des Peptids auf den DCs. Auch ist eine fehlende Co-Stimulation der T-Zellen durch die DCs ist als Ursache denkbar. Es

ist ebenfalls in Betracht zu ziehen, dass CMV spezifische T-Zellen gegen andere CMV-Epitope eine Rolle beim Virus- versus-Leukämie Effekt spielen könnten.

Eine Kreuzreaktivität der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen gegen Tumor assoziierte Antigene (Proteinase 3, bcl-2, WT1-Pool, NY-ESO-Pool, MUC-1-Pool, PRAME-Pool) konnte bei keinem Spender nachgewiesen werden. Die Zellzahl an IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen war limitiert, weswegen die Anzahl der untersuchten Tumor assoziierten Antigene begrenzt sein musste.

Um die Hypothese der Kreuzreaktivität des T-Zell-Rezeptors weiter aufzuklären und den Mechanismus des Graft-versus-Leukämie Effektes zu verstehen, sollten natürliche Killerzellen und Monozyten untersucht werden, um die Rolle und den Einfluss dieser Zellen bei einer CMV Reaktivierung im stammzelltransplantierten Patienten beurteilen zu können. Im stammzelltransplantierten Patienten mit AML wurde bei einer CMV Virämie eine Erhöhung von IFN γ produzierenden natürlichen Killerzellen beobachtet (Foley et. al, 2012). Die natürlichen Killerzellen übernehmen eine entscheidende Rolle bei der adaptiven Immunantwort. Sie sind in der Lage virusbefallene Zellen zu erkennen und zu eliminieren. Außerdem interagieren sie mit dendritischen Zellen und produzieren eine Vielzahl an Zytokinen wie das IFN γ , mit denen die adaptive Immunantwort moduliert wird. Eine Proliferation der natürlichen Killerzellen bei stammzelltransplantierten Patienten mit CMV Reaktivierung, könnte zum Graft-versus-Leukämie Effekt sowie zur Kontrolle der CMV Infektion beitragen, denn die CMV Reaktivierung induziert eine schnellere Rekonstitution der natürlichen Killerzellen und verlängert das Überleben der Killerzellen, wodurch die adaptive Immunantwort positiv beeinflusst wird (Foley et. al, 2012).

In weiteren Untersuchungen sollte auch das Repertoire an Tumor assoziierte Antigenen erweitert werden. Die spezifische T-Zellen gegen andere Epitope des CMV wie beispielsweise das pp65 sollten untersucht werden.

Auch ist es von Interesse hämatologische Patienten als Spender heranzuziehen, um auch hier die Kreuzreaktivität der CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen zu untersuchen, da der Anteil der IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen, aufgrund der CMV Reaktivierung höher liegen müsste.

Des Weiteren sollten die $\gamma\delta$ T-Zellen näher untersucht werden, da eine Aktivität

dieser Zellen gegenüber Tumorzelllinien, wie das Daudi Burkitt Lymphom (Sturm E et.al, 1990) und einer Myelomzelllinie (Selin LK et. al, 1992), in früheren Arbeiten beschrieben wurde. Eine Kreuzreaktivität der multifunktionalen $\gamma\delta$ T-Zellen gegenüber CMV befallenen Zellen als auch gegen Leukämieblasten wurde bei stammzelltransplantierten Patienten nach CMV Reaktivierung beobachtet (Scheper et. al, 2013). Diese Zellpopulation stellt mit ca. 0,5-10 % die kleinste Fraktion im peripheren Blut dar (Casorati G. et. al, 1989) und ist gewebsspezifisch, meist auf der Haut, im Darm und in der Lunge, anzutreffen. Die $\gamma\delta$ T-Zellen besitzen, im Gegensatz zu den klassischen $\alpha\beta$ T-Zellen, einen T-Zell-Rezeptor, der aus einer γ - und δ -Untereinheit aufgebaut ist und exprimieren weder CD4- noch CD8 auf ihrer Oberfläche (Allison TJ et. al, 2002). Die kreuzreaktive Erkennung durch die $\gamma\delta$ T-Zellen könnte ebenfalls zum Graft-versus-Leukämie Effekt beitragen.

Denkbar wäre auch eine andere Theorie, die nichts mit der kreuzreaktiven Erkennung von Tumor assoziierten Antigenen zu tun hat. Das Cytomegalovirus beeinflusst die Apoptose der menschlichen Zelle, indem es in gesunden Zellen den Zelltod inhibiert, um die Virusreplikation aufrechtzuerhalten. In den Zelllinien Kasumi-1 (AML) und SD-1 (bcr-abl positive ALL) hingegen werden einige Gene herunterreguliert, sodass die infizierten AML bzw. ALL Zellen an ihrer Proliferation gehindert werden (Koldehoff et. al, 2015).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte mögliche Kreuzreaktivität von IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen konnte nicht bestätigt werden. Weitere Untersuchungen von CMV spezifischen T-Zellen, die gegen andere Antigene gerichtet sind und auch von natürlichen Killerzellen sowie $\gamma\delta$ T-Zellen sollten sich mit dem vorteilhaften Effekt der CMV Infektion auf die Rezidivrate von stammzelltransplantierten Patienten beschäftigen.

6. Zusammenfassung

Früher bedeutete eine maligne hämatologische Erkrankung immer den sicheren Tod. Heutzutage haben viele Patienten mit einer entsprechenden Erkrankung eine realistische Chance auf ein Leben, dank der Stammzelltransplantation. Doch die Stammzelltransplantation birgt auch Risiken. Viele der Patienten kämpfen mit der Graft-versus-Host Erkrankung. Bei dieser Erkrankung erkennen die übertragenen Lymphozyten des Spenders das Gewebe des Empfängers als fremd und es kommt zur Abstoßung des transplantierten Organs bzw. zu Entzündungen und pathologischen Veränderungen an Haut, Leber und im Magen-Darm-Trakt.

Die Spenderlymphozyten sind jedoch auch in der Lage, die noch verbliebenen malignen Tumorzellen des Empfängers zu erkennen und zu eliminieren. Dieser Effekt wird als Graft-versus-Leukämie Reaktion bezeichnet.

Neben den Abstoßungsreaktionen spielen Infektionen nach einer Stammzelltransplantation eine große Rolle, da das Immunsystem supprimiert ist. Eine sehr häufige Infektionserkrankung bei stammzelltransplantierten Patienten ist die Cytomegalovirus Infektion. Die weltweite Durchseuchung bei gesunden Menschen liegt bei 40-90 %. Auch wenn die CMV Infektion bei den meisten immunkompetenten Menschen asymptomatisch verläuft, kann sie bei Patienten mit Immundefekten schwerwiegende Folgen haben.

Neben den vielen negativen Folgen, die dieses Virus mit sich bringt, zeigen neuere Studien, dass stammzelltransplantierte Patienten mit einer Cytomegalovirus Reaktivierung eine längere Überlebenszeit, aufgrund der Senkung der Rezidivrate, haben.

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte eine virusinduzierte Graft-versus-Leukämie Reaktion sein, bei der die CMV-spezifischen Lymphozyten die Tumorantigene erkennen und eliminieren.

In dieser Arbeit wurde die Kreuzreaktivität von den CMV IE-1 VLEETSVML spezifischen T-Zellen mit verschiedenen Tumor assoziierten Antigenen (PRAME, NY-ESO, bcl-2, Proteinase 3, MUC-1 und WT1) analysiert. Hierfür wurden gesunde, CMV seropositive Spender herangezogen, die IE-1 VLEETSVML T-Zellen hatten, und mit dem IE-1-A2 VLEETSVML Peptid expandiert werden

konnten. Nach Anreicherung der spezifischen Lymphozyten über mehrere Wochen, erfolgte ein Funktionalitätstest, mit dem Nachweis von IFN γ und CD107a, als Zeichen der spezifischen Aktivierung der IE-1 VLEETSVML HLA-A*0201 T-Lymphozyten durch die Tumor assoziierten Antigene.

Bei keinem der eingesetzten Tumor assoziierten Antigene fand eine Aktivierung des T-Zell-Rezeptors der CMV IE-1 spezifischen T-Lymphozyten statt.

Summary

The detection of a malignant hematologic disease was in former times a death sentence. Today, stem cell transplantation make such a disease treatable, with a real chance of survival. A major risk of stem cell transplantation is the graft-versus-host reaction. This reaction is specified by inflammation of the recipients tissue induced by donor lymphocytes. This may lead to rejection of the transplant or to pathologic changes in skin, liver or the gastrointestinal tract. However, the donor lymphocytes are capable to track and eliminate the remaining malignant tumor cells of the recipient. This is called graft-versus-leukemia reaction. The main problems after a stem cell transplantation are graft rejection, GvHD and infections. An increased rate of infections occur because of the suppression of hosts immune system. A major cause of infection upon the group of stem cell transplanted patients is cytomegalovirus (CMV). The global infection rate in healthy subjects is between 40 and 90%.

The infection is in the most immunocompetent humans asymptomatic, but in immunodeficient humans CMV may cause fatal complications.

On the other hand new studies showed that stem cell transplanted patients with a cytomegalovirus reactivation have a longer survival, because of a reduced relapse rate. A possible explanation could be a virus induced graft-versus-leukemia reaction: The CMV-specific lymphocytes recognize and eliminate the tumor antigens.

In this thesis I tested the cross-reaction of CMV IE-1 VLEETSVML specific T-cells with different tumor associated antigens (PRAME, NY-ESO, bcl-2, proteinase 3, MUC-1 and WT-1). For this purpose healthy donors, which were CMV seropositive and have IE-1 VLEETSVML T-cells were analyzed. The IE-1 specific T-cells were expanded with the IE-1 VLEETSMVL HLA-A*0201 peptide. After enrichment, the T-cells, were analyzed for the presence of IFN γ and CD107a after stimulation with the relevant peptides. To none of the investigated tumor antigens an activation of the IE-1 VLEETSVML specific T-cells could be proved. In conclusion, crossreactivity at least of IE-1 VLEETSVML specific T-cells does not contribute to graft versus leukemia effect.

7. Literaturverzeichnis

Alarcon B, Swamy M, van Santen H.M, W. Schamel W: „T-cell antigen-receptor stoichiometry: pre-clustering for sensitivity.“ *EMBO Reports* 7 (2006), 490-495

Allison TJ, Garboczi DN: „Structure of gamma delta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens.“ *Mol. Immunol* (2002); 38:1051-61

Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu Y.J, Pulendran B and Palucka K: „Immunobiology of dendritic cells.“ *Annu Rev Immunol* (2000) 18: 767-811

Beltran P.M J, Christeas I.M: „The life cycle and pathogenesis of human cytomegalovirus infection: lessons from proteomics.“ *Expert Rev Proteomics* (2014), 11(6): 697-711

Boeckh M, Leisenring W, Riddell S.R, Bowden R.A, Huang M.L, Myerson D, Stevens-Ayers T, Flowers ME, Cunningham T, Corey L: „Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity.“ *Blood* (2003), 101: 407–414

Borbulevych, O.Y, Piepenbrink K.H, Gloor B.E, Scott D.R, Sommese R.F, Cole D.K , Sewell A.K and Baker B.M: "T cell receptor cross-reactivity directed by antigen-dependent tuning of peptide-MHC molecular flexibility." *Immunity* (2009) 31(6): 885-896

Broers A.E, van Der Holt R, van Esser J.W, Gratama J.W, Henzen-Logmans S, Kuenen-Boumeester V, Lowenberg B and Cornelissen J.J: "Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV-seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation." *Blood* (2000), 2240-2245.

Cannon M.J, Schmid DS, Hyde TB: "Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection. *Reviews in medical virology* (2010), 20:202–213. doi:10.1002/rmv.655. [PubMed: 20564615]

Casorati G, De Libero G, Lanzavecchia A, Migone N: "Molecular analysis of human gamma/delta + clones from thymus and peripheral blood." *J. Exp. Med.* (1989), 170:1521-35

Colf L. A, Bankovich A.J, Hanick N.A, Bowerman N.A, Jones L.L, Kranz D.M and Garcia K.C: "How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC." *Cell* (2007), 129(1): 135-146

Craig J.L, Grundy J.E: "Cytomegalovirus induced up-regulation of LFA-3 (CD58) and ICAM-1 (CD54) is a direct viral effect that is not prevented by ganciclovir or foscarnet treatment." *Transplantation* (1996), 62(8):1102-8

Cristea I.M, Moorman N.J, Terhune S.S, Cuevas C.D, O’Keefe E.S, Rout M.P, Chait B.T, Shenk T: "Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein." *Journal of virology* (2010), 84:7803–7814. doi:10.1128/JVI.00139-10. [PubMed: 20504932]

Crough, T. and R. Khanna: "Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside." *Clin Microbiol Rev* (2009), 22(1): 76-98

Crumpacker M.D, Clyde S: „Ganciclovir“. *Engl J Med* (1995), 335:721-729

DAG-KBT Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation

D'Orsogna L. J, Roelen D.L, Doxiadis I.I and Claas F.H: "Alloreactivity from human viral specific memory T-cells." *Transpl Immunol* (2010), 23(4): 149-155

Elmaagacli, A. H, Steckel N.K, Koldehoff M, Hegerfeldt Y, Trenschele R, Ditschkowski M, Christoph S, Gromke T, Kordelas L, Ottinger H.D, Ross R.S, Horn P.A, Schnittger S and Beelen D.W: "Early human cytomegalovirus replication after transplantation is associated with a decreased relapse risk: evidence for a putative virus-versus-leukemia effect in acute myeloid leukemia patients." *Blood* (2011), 118(5): 1402-1412.

Ferrara M.D, James L.M, Levine J.E, Reddy P and Holler E: (2009). "Graft-versus-Host Disease." *Lancet* (2009), 373(9674): 1550-1561

Foley B, Cooley S, Verneris M.R, Pitt M, Curtsinger J, Luo X, Lopez-Verges S, Lanier L.L, Weisdorf D, Miller J.S: "Cytomegalovirus reactivation after allogeneic transplantation promotes a lasting increase in educated NKG2C+ natural killer cells with potent function." *Blood* (2012), 119:2665–2674

Foster A.E, Gottlieb D.J, Sartor M, Hertzberg M.S, Bradstock K.F: "Cytomegalovirus-Specific CD4+ and CD8+ T-Cells Follow a Similar Reconstitution Pattern after Allogeneic Stem Cell Transplantation." *Biology of Blood and Marrow Transplantation* (2002), 8:501-511

Gilbert M.J, Riddell S.R, Plachter B, Greenberg P.D: "Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene products." *Nature* (1996), 383:720-2

Gratama J.W, Brooimans R.A, van der Holt B, Sinthnicolaas K, van Doornum F, Niesters H.G, Löwenberg B, Cornelissen J.J: "Monitoring Cytomegalovirus IE-1 and pp65-specific CD4+ and CD8+ T-Cell Responses after allogeneic stem cell transplantation may identify patients at risk for recurrent CMV reactivations." *Cytometry Part B* (2008), 74B: 211-220

Green M. L, Leisenring W.M, Xie H, Walter R.B, Mielcarek M, Sandmaier B.M, Riddell S.R and Boeckh M: "CMV reactivation after allogeneic HCT and relapse risk: evidence for early protection in acute myeloid leukemia." *Blood* (2013), 122(7): 1316-1324

Groothuis T. A and Neefjes J: "The many roads to cross-presentation." *J Exp Med* (2005), 202(10): 1313-1318

Hemmer B, Vergelli M, Gran B et al. „Predictable TCR antigenrecognition based on peptide scans leads to the identification of agonist ligands with no sequence homology.“ *J. Immunol.* (1998), 160: 3631–6

Horowitz, M.M., R. P.Gale, P.M. Sondel, J.M. Goldman, J. Kersey, H.J. Kolb, A.A. Rimm, O. Ringden, C. Rozmann, B. Speck, R.L. Truitt, F.E. Zwaan, M.M. Bortin (1990). "Graft-Versus-Leukemia Reactions after Bone Marrow Transplantation." *Blood* 75: 555-562

Hertenstein B, Hampl W, Bunjes D, Wiesneth M, Duncker C, Koszinowski U, Heimpel H, Arnold R, Mertens T: "In vivo/ex vivo T cell depletion for GVHD prophylaxis influences onset and course of active cytomegalovirus infection and disease after BMT." *Bone Marrow Transplantation* (1995), 15: 387-393

Ito S, Pophali P, Co Wu, Koklanaris E.K, Superata J, Fahle G.A, Childs R, Battiwalla M, Barrett J.: "CMV reactivation is associated with a lower incidence of relapse after allo-SCT for CML." *Bone Marrow Transplant.* (2013), 48(10):1313-1316

Jang J.E, Kim S.J, Cheong J.W, Hyun S.V, Kim Y.D, Kim Y.R, Kim J.S, Min V.H: "Early CMV replication and subsequent chronic GVHD have a significant anti-leukemic effect after allogeneic HSCT in acute myeloid leukemia." *Ann Hematol* (2015), 94(2):275-282

Kanda Y, Chiba S, Hirai H, Sakamaki H, Iseki T, Kodera Y, Karasuno T, Okamoto S, Hirabayashi N, Iwato K, Maruta A, Fujimori Y, Furukawa T, Mineishi S, Matsuo K, Hamajima N, Imamura M: "Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000)". *Blood* Nr. 102(4) (2003), 1541-1547, PMID 12714500

Kalejta R. F.: "Tegument proteins of human cytomegalovirus" *Microbiol Mol Biol Rev.* (2008), 72(2): 249-65

Kapp, M, Stevanovic S, Fick K, Tan S.M, Loeffler J, Opitz A, Tonn T, Stuhler G, Einsele H and Grigoleit G.U: "CD8+ T-cell responses to tumor-associated antigens correlate with superior relapse-free survival after allo-SCT." *Bone Marrow Transplant* (2009), 43(5): 399-410

Kern F, Surel I.P, Faulhaber, Frömmel C, Schneider-Mergener J, Schönemann C, Reinke P, Volk H-D "Target structures of the CD8(p)-Tcell response to human cytomegalovirus: the 72-kDa major immediateearly protein revisited." *J Virol* (1999), 73:8179-84

Khan N, Cobbold M, Keenan R, Moss P.A: "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: 1025-34.

Kolb H.J.: "Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes" *Blood.* (2008), 112(12):4371-83. doi: 10.1182/blood-2008-03-077974.

Kolb, H.J, Schattenberg A, Goldman J.M, Hertenstein B., Jacobsen N, Arcese W, Ljungman P, Ferrat A, Verdonck L, Niederwieser D, van Rhee F, Mittermueller J, de Witte T and Ansari H: "Graft-Versus-Leukemia Effect of Donor Lymphocyte Transfusions in Marrow Grafted Patients " *Blood* (1995), 2041-2050

Koldehoff M, Lindemann M, Opalka B, Bauer S, Ross R.S, Elmaagacli A.H: "Cytomegalovirus induces apoptosis in acute leukemia cells as a virus-versus-leukemia function." *Leuk Lymphoma.* (2015), 56(11): 3189-97

Lee S.J, Klein J.P, Barrett A.J, Ringden O, Antin J.H, Cahn J.V, Carabasi M.H, Gale R.P, Giralt S, Hale GA, Illhan O, McCarthy P.L, Socie G, Verdonck L.F, Weisdorf D.J, Horowitz M.M: "Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse." *Blood* (2002), 100: 406-14

Li Y, Huang Y, Lue J, Quandt J.A, Martin R and Mariuzza R: "Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule. *EMBO J.* (2005), 24, 2968-2979

Loönnqvist B, Ringde`n O, Ljungman P, Wahren B, Gahrton G. "Reduced risk of recurrent leukaemia in bone marrow transplant recipients after cytomegalovirus infection." *Br J Haematol.* (1986), 63(4): 671-679

Macdonald W. A, Chen Z, Gras S, Archbold J.K, Tynan F.E, Clements C.S, Bharadwaj M, Kjer-Nielsen L, Saunders P.M, Wilce M.C, Crawford F, Stadinsky B, Jackson D, Brooks A.G, Purcell A.W, Kappler J.W, Burrows S.R, Rossjohn J and McCluskey J: "T cell allorecognition via molecular mimicry." *Immunity* (2009), 31(6): 897-908

Manjappa S, Bhamidipati P.K, Stokerl-Goldstein K.E, DiPersio J.F, Uy G.L, Westervelt P, Liu J, Schroeder M.A, Vij R, Abboud C.N, Fehniger T.A, Cashen A.F, Pusic I, Jacoby M, Meera S.J, Romee R: "Protective effect of cytomegalovirus reactivation on relapse after allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia patients is influenced by conditioning regimen" *Biol Blood Marrow Transplant.* (2014), Ja. 20 (1): 46-52

Mazza, C, Auphan-Anezin N, Gregoire C, Guimezanes A, Kellenberger C, Roussel A, Kearney A, van der Merwe P.A, Schmitt-Verhulst A.M and B. Malissen: "How much can a T-cell antigen receptor adapt to structurally distinct antigenic peptides?" *EMBO J* 26 (2007), 1972- 1983

Mocarski, E. S, Shenk T and R. F. Pass RF: "Cytomegaloviruses." In Knipe DM and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia (2007), pp2701-2772

Modrow, Susanne et. al: "Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom". *Molekulare Virologie* (3. Auflage: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg) (2010a), 461-634.

Nesic D, Maric M, Santori F.R and Vukmanovic S:"Factors influencing the patterns of T lymphocyte allorecognition. " *Transplantation* (2002), 73(5): 797-803

Ottinger H. D. B, Beelen D.W, Scheulen B, Schäfer U.W and Grosse- Wilde H: "Improved immune reconstitution after allotransplantation of peripheral blood stem cells instead of bone marrow." *Blood* (1996), 88(7): 2775-2779

Paulus C and Nevels M: "The human cytomegalovirus major immediate-early proteins as antagonists of intrinsic and innate antiviral host responses." *Viruses* (2009), 1(3): 760-779

Regner, M: "Cross-reactivity in T-cell antigen recognition." *Immunology and Cell Biology* (2001), 79: 91-100.

Reddy P, Ferrara J.L: "Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev.*(2003), 17(4):187–194. [PubMed]

Rezvani K, Yong A.S, Savani B.N, Mielke S, Keyvanfar K, Gostick E, Price D.A, Douek D.C, Barrett A.J: "Graft-versus-leukemia effects associated with detectable Wilms tumor-1 specific T lymphocytes following allogeneic stem cell transplantation for acute lymphoblastic leukemia (ALL)." *Blood*(2007), 110: 1924–1932

Riddell S.R, Watanabe, K.S, Goodrich J.M, Li, C.R, Agha M.E und Greenberg P.D: "Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones." *Science* (1992), 257, 238-241.

Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch P.O, Steinman R.M and Schuler: "Proliferating dendritic cell progenitors in human blood." *J Exp Med* (1994), 180(1): 83-93.

Ruell J, Barnes C, Mutton K, Foulkes B, Chang J, Cavet J, Guiver M, Menasce L, Dougal M, Chopra R: "Active CMV disease does not always correlate with viral load detection." *Bone Marrow Transplant* (2007), 40(1):55–61

Scheper W, van Dorp S, Kersting S, Pietersma F, Lindemans C, Hol S, Heijhuurs S, Sebestyen Z, Gründer C, Marcu-Malina V, Marchant A, Donner C, Plachter B, Vermijilen D, van Baarle D, Kuball J: "γδT cells elicited by CMV reactivation after allo-SCT crossrecognize CMV and leukemia". *Leukemia*. (2013), 27(6): 1328-38

Schroder K, Hertzog P.J, Ravasi T and Hume D.A: "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions." *J Leukoc Biol* (2004), 75(2): 163-189

Selin L.K, Stewart S, Shen C, Mao H.Q, Wilkins J.A: "Reactivity of gamma delta T cells induced by the tumor cell line RPMI 8226: functional heterogeneity of clonal populations and role of GroEL

heat shock proteins." *Scand.J. Immunolog.* (1992), 36:107-17

Sinclair J and **Sissons P**: "Latency and reactivation of human cytomegalovirus." *J. Gen. Virol.* (2006), 87:1763–1779

Sissons J.G, **Carmichael A.J**: "Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection." *J Infect.* (2002), 44:78–83

Socinski M.A, **Cannistra S.A**, **Sullivan R**, **Elias A**, **Antman K**, **Schnipper L** and **Griffin J.D**: "Granulocyte- macrophage colony-stimulating factor induces the expression of the CD11b surface adhesion molecule on human granulocyte in vivo." *Blood* (1988), 72(2): 691-697

Srivastava R, **Curtis M**, **Hendrickson S**, **Burns W**, **Hosenpud J**: "Strain specific effects of Cytomegalovirus on endothelial cells: Implications for investigating the relationship between CMV and cardiac allograft vasculopathy1." *Transplantation* (1999), Volumen 68 Issue 10 p 1568-1573

Staras S. A, **Dollard S.C**, **Radford K.W**, **Flanders W.D**, **Pass R.F**, and **Cannon M.J**: "Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States 1988-1994." *Clin. Infect. Dis.* (2006), 43:1143–1151

Street S. E. A, **Cretney E**, **Smyth M.J**: "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." *Blood* 97 (2001) (1): 192-197

Sturm E, **Braakman E**, **Fisch P**, **Vreugdenhil R.J**, **Sondel P**, **Bolhuis R.L**: "Human V gamma 9-V delta 2 T cell receptor- gamma delta lymphocytes show specificity to Daudi Burkitt's lymphoma cells." *J. Immunol.* (1990), 145:3202-08

Takenaka K, **Nishida T**, **Asano-Mori Y**, **Oshima K**, **Ohashi K**, **Mori T**, **Kanamori H**, **Miyamura K**, **Kato C**, **Kobayashi N**, **Uchida N**, **Nakamale H**, **Ichinohe T**, **Morishima Y**, **Suzuki R**, **Yamaguchi T**, **Fukuda T**. "Cytomegalovirus reactivation after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is associated with a reduced risk of relapse in patients with acute myeloid leukemia who survived to day 100 after transplantation: The Japan Society for Hematopoietic Cell Transplantation Transplantation-related Complication Working Group." *Biol Blood Marrow Transplant* (2015), 21(11):2008-2016

Thomas E.D: "Bone marrow transplantation: prospects for leukemia and other conditions. " *Proc Inst Med Chic.* (1975), 30(8): 256-258

Vinay D.S, **Kwon B.S**: "Role of 4-1BB in immune responses. " *Semin Immunol.* (1998), 10(6): 481-489

Watanabe K, **Suzuki S**, **Kamei M**, **Toji S**, **Kawase T**, **Takahashi T**, **Kuzushima K** and **Akatsuka Y**: "CD137-guided isolation and expansion of antigen-specific CD8 cells for potential use in adoptive immunotherapy." *Int J Hematol* (2008), 88(3): 311-320

Wills M.R, **Carmichael A.J**, **Mynard K**, **Jin X**, **Weekes M.P**, **Plachter B**, **Sissons J.G**: "The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T cell receptor usage of pp65-specific CTL." *J Virol* (1996), 70: 7569–79

Wölfel M, **Kuball J**, **Ho W.J**, **Nguyen H**, **Manley T.J**, **Bleakley M** and **Greenberg P.D**: "Activation-induced expression of CD137 permits detection, isolation, and expansion of the full repertoire of CD8_ T cells responding to antigen without requiring knowledge of epitope specificities." *Blood* (2007), 110(1): 201-210

Yin Y and Mariuzza R.A: "The multiple mechanisms of T cell receptor crossreactivity." *Immunity* (2009), 31(6): 849-851

Abkürzungen

Abb	Abbildung
AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zellen
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BD	Becton Dickinson
CCR7	Chemokin (C-C motif) Rezeptor 7
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementarity Determing Region
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalovirus
DC	Dendritische Zellen (dendritic cells)
DMSO	Dimethylsulfoxid
D-PBS	Dulbecco 's Phosphat- Buffered Saline
DRK	Deutsches Rotes Kreuz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescein Associated Cell Sorter
FCS	Foetales Kälber (calf) Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulozyten Kolonien (colony) stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease
GvL	Graft versus Leukemia
HCMV	Humanes Cytomegalovirus
HHV	Humanes Herpesvirus
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
IE	Immediate Early
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IU	International Units
kDa	Kilodalton
LAMP-1	Lysosomal-Associated Membrane Protein-1
MACS	Magnetic Activated Cell System
MHC	Major Histocompatibility Complex
nm	Nanometer
NK	Natürliche Killerzellen
PCR	Poly Chain Reaction
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PE	Phycoerythrin
perCP	Peridinin Chlorophyll
PHA-L	Phytohämagglutinin- L
PMA	Phorbol 12-Myristat- 13- Acetat

RPMI	Rosswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
SZ	Stammzellen
SZT	Stammzelltransplantation
TH	T- Helfer
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	T- Zell-Rezeptor

Nun ist es an der Zeit für ein Danke..

Lieber *Uli* vielen Dank für unsere konstruktiven und interessanten Diskussionen, die mich immer wieder aufs Neue für diese Arbeit begeistert haben. Auch ein Dank für deine Hilfestellung und die Korrektur der Arbeit.

Vielen Dank an das Team *AG Grigoleit mit Anne, Elke und Caro* für die Hilfestellung im Labor.

Einen besonderen Dank an die *Spender*, ohne die, diese Arbeit gar nicht möglich gewesen wäre.

Für die Unterstützung und die Spendersuche möchte ich mich auch beim *Jörg Frieß* bedanken.

Auch einen großen Dank an meine *Familie und meinen Lebenspartner Alex*.

Lebenslauf

Studium

04.2014 - 06.2018 Universität Würzburg
Studiengang: Humanmedizin

04.2012 - 03.2014 Universität Tübingen
Vorklinik des Medizinstudiums

10.2011 - 03.2012 Universität Würzburg
Studiengang: Biologie

Berufserfahrung

12.2010 - 10.2011 ACC GmbH Analytical Clinical Concepts, Leidersbach
Biologisch-technische Assistentin in der Bioanalytik

08.2010 - 11.2010 Universitätsklinikum Frankfurt am Main
Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und
Schmerztherapie
Biologisch-technische Assistentin

09.2008 - 07.2010 Universitätskinderklinik Würzburg
Biologisch-technische Assistentin in der Tumorforschung

Schul- und Berufsausbildung

10.2008 - 06.2010 Studiengemeinschaft Darmstadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife (berufsbegleitend)

09.2005 - 07.2008 Institut Virion/Serion, Würzburg
Ausbildung zur Biologielaborantin - mit Abschluss

09.2001 - 07.2005 Realschule Marktheidenfeld
Abschluss: Mittlere Reife

Weitere Fähigkeiten und Kenntnisse

Publikation Wölfl M, Merker K, Morbach H, Van Gool S. W, Eyrich M, Greenberg P.
D, Schlegel G.P, (2010): „Primed tumor-reactive multifunctional CD62L+
human CD8+ T cells for immunotherapy“, 5. October 2010, Cancer Im-
munol Immunother

Würzburg, 01.07.2018