

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

**Untersuchungen zur Kreuzreaktivität von Cytomegalievirus-
spezifischen T-Lymphozyten und Tumorassoziierten Antigenen**

Inaugural – Dissertation
Zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Ronja Weiß
aus Münster

Würzburg Juli 2020

Referent: Priv.-Doz. Dr. Götz Ulrich Grigoleit

Korreferent: Prof. Dr. Matthias Eyrich

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 05.12.2022

Die Promovendin ist Ärztin

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Haupthistokompatibilitäts-Moleküle.....	1
1.1.1 MHC-Klasse-I-Moleküle und CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	1
1.1.2 MHC-Klasse-II-Moleküle und CD4 ⁺ -T-Lymphozyten.....	2
1.1.3 Kreuzpräsentation.....	3
1.2 Entwicklung der CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	3
1.3 Alloreaktivität	4
1.4 Kreuzreaktivität.....	5
1.5 Entwicklung Dendritischer Zellen	7
1.6 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation.....	8
1.7.1 Graft-versus-Host-Disease	10
1.7.2 Graft-versus-Leukemia-Effekt	12
1.8 Humanes Cytomegalievirus	12
1.9 Die Rolle von CMV bei der Stammzelltransplantation.....	13
1.9.1 Zusammenhang von CMV und GvHD.....	14
1.9.2 Zusammenhang von CMV und GvL.....	15
1.10 Tumorassoziierte Antigene	16
1.11 Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Reagenzien	18
2.1.2 Verbrauchsmaterial	18
2.1.3 Geräte	19
2.1.4 Chemikalien und Kits.....	20
2.1.5 Lösungen	21
2.1.6 Monoklonale Antikörper	22
2.1.7 Peptide.....	23
2.2 Methoden	24
2.2.1 Spendermaterial.....	24
2.2.2 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	25
2.2.3 Ermitteln der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer	26
2.2.4. Herstellen von Allopool-Fütterzellen.....	26
2.2.5 Kryopräservation der Zellen und wieder auftauen	26

2.2.5.1 Zellen einfrieren	26
2.2.5.2 Zellen auftauen.....	27
2.2.6 Färbung HLA-A*0201 positiver und CMVpp65-spezifischer T-Zellen.....	27
2.2.7 Nachweis der T-Zell-Aktivierung im Durchflusszytometer anhand peptidinduzierter CD137- Expression.....	28
2.2.7.1 Aktivierung von T-Lymphozyten mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid.....	28
2.2.7.2 Färbung CD137-positiver T-Zellen für die Durchflusszytometrie.....	29
2.2.8 Selektion CD137-positiver T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS- System)	29
2.2.9 Kultivierung CMVpp65-spezifischer Lymphozyten.....	31
2.2.10 Selektion CD14-positiver mononukleärer Zellen mit Hilfe der Magnetischen Zellseparation (MACS- System)	32
2.2.11 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten	33
2.2.12 Nachweis der Differenzierung CD14-positiver peripherer mononukleärer Zellen zu Dendritischen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie.....	34
2.2.12.1 Charakterisierung dendritischer Zellen mittels Färbung für die Durchflusszytometrie	34
2.2.13 Nachweis von intrazellulärem Interferon- γ und CD107a- Expression.....	35
2.2.13.1 Stimulation der T-Lymphozyten durch Peptide und Nachweis von IFN- γ und CD107a	35
2.2.13.2 Stimulation der T-Lymphozyten durch Peptid-Präsentation mittels dendritischer Zellen und Nachweis von IFN- γ und CD107a.....	36
2.2.13.3 Färbung zur Charakterisierung der IFN- γ und CD107a produzierenden T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie	39
3. Ergebnisse	41
3.1 Spenderauswahl.....	41
3.2 Expansion, Aktivierbarkeit und Anreicherung CMVpp65-spezifischer T- Lymphozyten ...	41
3.2.1 Spezifische Expansion CMVpp65-spezifischer T-Lymphozyten	42
3.2.2 Aktivierbarkeit CMVpp65-spezifischer T-Lymphozyten	43
3.2.3 Selektive Anreicherung CMVpp65-spezifischer CD8 ⁺ -T-Lymphozyten	45
3.3 Generierung Dendritischer Zellen aus Monozyten	50
3.4 Spezifische Aktivierung CMVpp65-spezifischer T-Lymphozyten.....	52
3.4.1 IFN- γ - und CD107a-Produktion als Nachweis der Effektorfunktion von zytotoxischen T- Lymphozyten	52
3.4.2 CMVpp65-spezifische T-Zellen zeigen Effektorfunktion nach Stimulation mit CMVpp65- Einzelpeptid und CMVpp65-Peptidpool	53
3.5 Kreuzreaktivität von CMVpp65-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gegenüber Wilms-Tumor Protein 1	55

4. Diskussion	60
5. Zusammenfassung	67
6. Abkürzungen	69
7. Literaturverzeichnis	71

1. Einleitung

1.1 Haupthistokompatibilitäts-Moleküle

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) des Menschen liegt auf dem Chromosom 6. Dessen Gene kodieren unter anderem membrangebundene Glycoproteine, die an der Zelloberfläche Selbst- und Fremd-Peptidfragmente präsentieren. Diese über 200 Gene kodieren die humanen Leukozytenantigene (HLA). Der Name rührt daher, da die von ihnen kodierten Antigene auf Leukozyten besonders einfach nachzuweisen sind und dort entdeckt wurden [1]. Diese Glycoproteine lassen sich in MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterteilen. Es gibt drei verschiedene Gene für die MHC-Klasse-I-Moleküle: HLA-A, -B und -C, sowie drei verschiedene Gene für die MHC-Klasse-II-Moleküle: HLA-DR, -DP und -DQ, deren Allele alle codominant sind. Jedes Individuum exprimiert also auf seinen Zellen verschiedene MHC-Moleküle. Da der MHC außerdem sehr polymorph ist, d.h. mehrere Allele für die einzelnen Gene existieren, gibt es ein großes Repertoire an verschiedenen MHC-Molekül-Kombinationen unter den Individuen. Die MHC-Klasse-I und Klasse-II-Moleküle haben ihre Funktion bei der Initiierung einer T-Zell-abhängigen Immunantwort und spielen eine bedeutende Rolle bei der Gewebeverträglichkeit [2; 3].

1.1.1 MHC-Klasse-I-Moleküle und CD8⁺-T-Lymphozyten

MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert. Sie präsentieren zytosolische Peptide an zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), welche den Corezeptor CD8 exprimieren. Die präsentierten Peptide sind demnach zytosolische Eigenpeptide oder solche, die von Viren oder einigen sich im Zytosol replizierenden Bakterien stammen.

Das MHC-Klasse-I-Molekül besteht aus einer α -Kette, welche aus drei Domänen (α_1 , α_2 , und α_3) besteht, und einem β_2 -Mikroglobulin [4]. Diese Bausteine werden im Zytosol hergestellt, in das Endoplasmatische Retikulum eingeschleust und dort zusammen gebaut. Die Peptide, die durch Schneiden von Proteinen im Proteasom entstanden sind, werden

ebenfalls vom Zytosol in das Endoplasmatische Retikulum geschleust und hier ggf. noch am aminoterminalen Ende gekürzt, sodass die bisher instabilen MHC-Klasse-I-Moleküle mit meist acht bis zehn Aminosäuren langen Peptiden beladen werden. Die Bindung beruht auf dem Kontakt von Atomen zwischen den unveränderlichen Enden des peptidbindenden Spaltes des MHC-Moleküls und den Amino- und Carboxylenden des Peptids. Hinzu kommt die stabilisierende Wirkung von bestimmten Aminosäureseitenketten des Peptids, sogenannten Verankerungsresten, die in Taschen des peptidbindenden Spalts ragen.

Der so entstandene stabile Peptid:MHC-Klasse-I-Komplex wird nun im Vesikel an die Zelloberfläche transportiert.

Der CTL bindet mit seinem Rezeptor (T-Zell-Rezeptor, TCR) an den Peptid:MHC-Klasse-I-Komplex. Der TCR ist antigenspezifisch und bindet MHC-abhängig [5]. Letzteres Phänomen wird als MHC-Restriktion bezeichnet. Zusätzlich ist die Bindung des Corezeptors CD8 der T-Zelle an das MHC-Klasse-I-Molekül erforderlich.

Der aktivierte CTL leitet die Lyse derjenigen Zellen, welche das pathogene Antigen präsentieren, in die Wege [6].

1.1.2 MHC-Klasse-II-Moleküle und CD4⁺-T-Lymphozyten

MHC-Klasse-II-Moleküle werden auf Antigenpräsentierenden Zellen (APZ; B-Lymphozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen und epithelialen Zellen des Thymus) exprimiert. Sie präsentieren extrazelluläre oder intravesikuläre Pathogene. Extrazelluläre Partikel werden von B-Zellen durch rezeptorvermittelte Endozytose oder von anderen APC durch Phagozytose oder Makropinozytose aufgenommen. In den Vesikeln werden die Proteine pH-abhängig gespalten. Diese Vesikel fusionieren mit Vesikeln, die MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten. Dort werden die mindestens 13 Aminosäure langen Peptide gebunden. Die Bindung des Peptids erfolgt über Aminosäureseitenketten, die in Bindungstaschen innerhalb der Bindungsfurche des MHC-Moleküls ragen [7]. Der Peptid:MHC-Klasse-II-Molekül-Komplex wird an die Zelloberfläche transportiert, wo entsprechende TCR der CD4⁺-Helfer-T-Zellen spezifisch binden. Der Corezeptor CD4 bindet ebenfalls an das MHC-Klasse-II-Molekül. CD4⁺-Helfer-T-Zellen werden aktiviert

und veranlassen die B-Lymphozyten zur Antikörper-Synthese und die Makrophagen zur Zerstörung der aufgenommenen Pathogene [8; 9]. Ungeprägte T-Zellen werden dagegen von dendritischen Zellen (DC) aktiviert.

1.1.3 Kreuzpräsentation

Die Kreuzpräsentation beschreibt die Präsentation von exogenen Proteinen über MHC-Klasse-I-Moleküle an naive $CD8^+$ -T-Lymphozyten. Bei den exogenen Proteinen kann es sich um virale, bakterielle oder Tumorantigene handeln.

Exogene Proteine, die in das endoplasmatische Retikulum gelangt sind, können über den Vorgang der retrograden Translokation ins Zytosol befördert werden. Ab hier kann der gewöhnliche Weg wie in 1.1.1. beschrieben – inklusive des Proteinabbaus im Proteasom zu Peptidstücken bis zum Einbau der Peptide in die MHC-Klasse-I-Moleküle – im endoplasmatischen Retikulum ablaufen.

Dieser Vorgang funktioniert besonders gut bei DC, welche unter anderem ungeprägte T-Zellen aktivieren. So können auch die naiven T-Zellen durch Viren aktiviert werden, welche die präsentierende Zelle nicht befallen [10].

1.2 Entwicklung der $CD8^+$ -T-Lymphozyten

Die naiven $CD8^+$ -T-Zellen, die den Thymus verlassen, müssen bestimmte Signale zur Entwicklung bis zur zytotoxischen $CD8^+$ -T-Effektorzelle empfangen. Die Aktivierung naiver $CD8^+$ -T-Zellen im Lymphgewebe und Lymphorganen erfordert zum einen die Bindung zwischen dem TCR der T-Zelle und spezifischem Antigen:MHC-Klasse-I-Komplex der APZ und zum anderen ein costimulatorisches Signal. Dieses kann über zwei Wege erfolgen. Reife DC können besonders stark costimulieren und die $CD8^+$ -T-Zellen so direkt zur Interleukin-2-Synthese (IL-2-Synthese) stimulieren. Bei der anderen Variante bindet eine $CD4^+$ -T-Zelle mit ihrem TCR spezifisch an den Antigen:MHC-II-Komplex und mit dem CD40-Ligand an CD40 der APZ und stimuliert so die costimulatorische Aktivität. Die APZ exprimiert B7-Moleküle, welche an den CD28-

Rezeptor der CD8⁺-T-Zellen binden und costimulatorisch wirken [11]. Zusätzlich produzieren die CD4⁺-T-Zellen IL-2. Die aktivierten CD8⁺-T-Zellen proliferieren und differenzieren sich unter IL-2-Einfluss zu zytotoxischen T-Effektorzellen [12]. Diese benötigen nun keine Costimulation mehr für die Ausschüttung ihrer zytotoxischen Granula und Zytokine wie Interferon- α (IFN- α) und Interferon- γ (IFN- γ), wenn sie auf einer Zielzelle das spezifische Antigen erkennen. Die Granula bestehen aus Perforin, Granzymen und Granulosin und bewirken die Apoptose von ausschließlich der identifizierten Zielzelle [13].

1.3 Alloreaktivität

Die Alloreaktivität von T-Zellen beschreibt ihre Stimulierung durch die Bindung ihres TCR an Peptid:Fremd-MHC-Komplexe. 1-10% der T-Zellen reagieren alloreaktiv [14; 15].

Das Vorhandensein von alloreaktiven T-Zellen lässt sich dadurch erklären, dass bei der negativen Selektion, die die T-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus durchlaufen, nur in jenen T-Zellen die Apoptose initiiert wird, welche präsentierte Eigen-MHC-Moleküle zu stark binden. Fremd-MHC-Moleküle werden nicht präsentiert. So überleben T-Zellen, die potentiell Fremd-MHC-Moleküle fest binden können.

Es gibt zwei Modelle, die die alloreaktive Erkennung beschreiben – die peptidabhängige und die peptidunabhängige Bindung. Die T-Zelle kann demnach entweder nur das präsentierte Peptid spezifisch erkennen oder bindet den MHC-Komplex unabhängig vom Peptid [16]. Im Rahmen ihrer physiologischen Funktion erkennt sie an einem Fremd-Peptid:Selbst-MHC-Komplex beide Teile spezifisch.

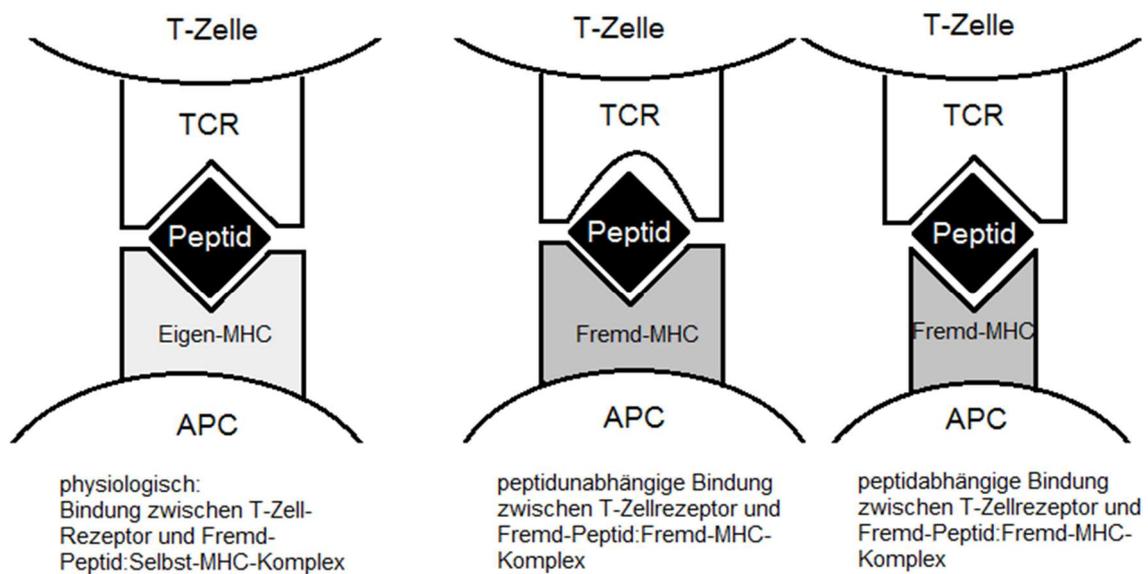


Abb. 1.1: Alloreaktivität von T-Zell-Rezeptoren

Physiologischerweise bindet der T-Zell-Rezeptor (TCR) an den Fremd-Peptid:Selbst-MHC-Komplex einer körpereigenen Antigenpräsentierenden Zelle (APZ) und erkennt dabei MHC-Komplex sowie Peptid spezifisch. (links) Bei der Alloreaktivität kann der TCR entweder peptidunabhängig (Mitte) oder peptidabhängig (rechts) an den Fremd-Peptid:Fremd-MHC-Komplex einer fremden Zelle binden.

Die alloreaktive Reaktion stellt eine Grundlage der Graft-versus-Host-Disease (GvHD, s. 1.6.1) und möglicherweise des Graft-versus-Leucemia-Effekts (GvL, s.1.6.2) dar [17].

1.4 Kreuzreaktivität

Die Kreuzreaktivität eines TCR beschreibt seine Fähigkeit verschiedene Peptide spezifisch zu binden.

In der Umwelt bestehen weit mehr immunogene Peptide als sich T-Zellen in einem Individuum befinden. Dies impliziert die Notwendigkeit von kreuzreaktiven T-Zellen, um eine ausreichende Immunantwort gewährleisten zu können [18].

Der TCR besteht aus einer T-Zell-Rezeptor- α -Kette und einer T-Zell-Rezeptor- β -Kette. Beide sind über eine Transmembranregion in der Zellwand verankert und über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Die β -Kette besitzt jeweils eine variable (V)-, diverse (D), und verbindende (J, joining) Domäne, die α -Kette nur eine V- und eine J-

Domäne. Die Domänen werden durch die V(D)J-Segmente kodiert, welche über P- und N-Nucleotide verbunden sind. Die Vielzahl der TCR ist zurück zu führen auf die V(D)J-Rekombination, mit einer großen Zahl an V- und J-Segmenten. Die P- und N-Nucleotide tragen zu einer noch größeren Vielfalt der TCR bei. Diese Nucleotide werden bei der Verknüpfung der V-, D- und J-Gensegmente zwischen diesen eingefügt. Die P-Nucleotide zeigen eine palindromische Sequenz und werden an die Enden der Gensegmente angebaut. Anschließend entstehen die N-Nucleotide durch das Anfügen einer zufälligen Anzahl an Nucleotiden an den codierenden DNA-Strang durch die terminale Desoxynucleotidyltransferase, Die Bezeichnung N-Nukleotid rührt daher, da sie nicht in der DNA-Matrize kodiert werden (engl. nontemplated).

Die Antigenbindungsstelle lässt sich in drei komplementaritätsbestimmende Regionen (CDR) auf beiden Ketten unterteilen. Die CDR1- und CDR2-Schleife, die von den V-Segmenten kodiert werden, sind an der Bindung an das MHC-Molekül beteiligt. Die hypervariable CDR3-Schleife, welche durch die (D)J-Segmente kodiert wird, stellt das Zentrum der Antigenbindungsstelle dar und ist an der Bindung des Peptids beteiligt [19]. Yin und Mariuzza haben in einem Review fünf unterschiedliche Mechanismen der kreuzreaktiven Erkennung durch TCR, die von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben wurden, zusammengestellt [20].

Bei dem Modell der Induzierten Anpassung passt sich die TCR-Bindungsfurche strukturell an das Peptid an. Besonders die CDR3-Schleife zeigt eine Konformationsänderung [21].

Bei dem Modell der unterschiedlichen Bindungsorientierung positioniert sich der TCR anders an der Oberfläche verschiedener Liganden [22].

Des Weiteren wird das Modell der strukturellen Degeneration erwähnt. Bei der Bindung des degenerierten TCR an den vorgesehenen Peptid:MHC-Komplex liegt ein Mangel an spezifischen und festen Bindungen vor. Somit bestehen noch viel Raum bzw. viele Möglichkeiten, dass der TCR ähnliche Peptide mit anderen Aminosäureresten und anderen Konformationen ebenfalls bindet [23].

Die schon viel beschriebene molekulare Mimikry besagt, dass verschiedene Liganden an den gleichen TCR binden können, wenn sie an der Bindungsstelle die gleichen Schlüsselstrukturen mit gleichen chemischen Eigenschaften aufweisen [24].

Zuletzt wird die peptidabhängige Anpassung des TCR an den flexiblen Peptid-MHC-Komplex beschrieben. Peptid-MHC-Komplexen wird von Grund auf eine unterschiedliche Flexibilität zugesprochen. Sie interagieren so unterschiedlich mit dem TCR. Einige Komplexe können in der Bindung an den TCR noch deutlich ihre Struktur verändern und anpassen [25].

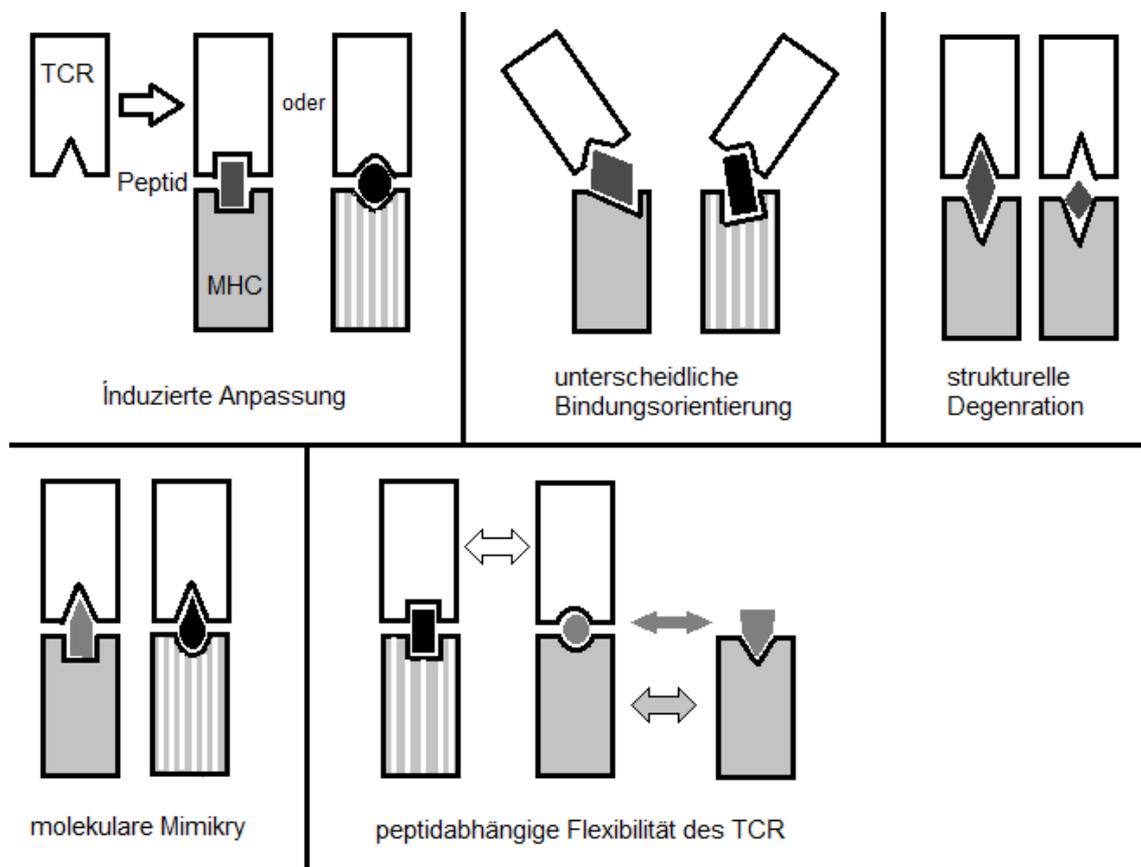


Abb. 1.2 Schemata der Kreuzreaktivität nach Review von Yin und Mariuzza 2009

1.5 Entwicklung Dendritischer Zellen

CD14⁺-Monozyten können zu DC differenzieren und in das Gewebe einwandern. CD14 wird auf myelomonozytischen Zellen exprimiert und fungiert als Rezeptor für den

Komplex aus bakteriellen Liposacchariden und dem Lipoprotein-bindenden-Protein. Die unreifen und phagozytosefähigen DC befinden sich zunächst im peripheren Gewebe. Durch den Einfluss von Toll-like-Rezeptor-Signalen und Zytokinen reifen die Zellen. Sie wandern entlang der Lymphgefäße zu den Lymphknoten und T-Zell-Zonen lymphatischer Organe und verändern ihr Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle. In den lymphatischen Organen angekommen haben sie bereits den Status einer reifen DC erreicht. Sie sind nicht mehr phagozytosefähig [26]. Ihre Funktion ist nun die Antigenpräsentation an T-Zellen und sie wirken dabei als besonders starke Aktivatoren naiver T-Zellen. Eine besondere Bedeutung kommt den reifen DC bei der Präsentation viraler Antigene zu. Während die meisten Zellen nur für ein begrenztes Spektrum an Viren anfällig sind, können DC ein breites virales Repertoire aufnehmen und dies mittels ihrer großen Anzahl an MHC-Molekülen präsentieren [27].

Reife DC tragen unter anderem die im Folgenden beschriebenen Oberflächenmoleküle [28; 29].

CD1a präsentiert ähnlich wie MHC-Moleküle Antigene an T-Zellen.

CD40 bindet u.a. an den CD40-Liganden auf T-Zellen. Als Folge wird die T-Zelle selbst aktiviert sowie die Expression von B7-Molekülen auf APZ angeregt, was wiederum die Proliferation von T-Zellen stimuliert.

CD80 (Transmembranglycoprotein B7.1) und CD86 (Transmembranglycoprotein B7.2) treten als costimulierende Moleküle mit naiven T-Zellen in eine Interaktion.

Membrangebundenes CD83 spielt eine Rolle bei der T-Zellaktivierung.

CCR7 steuert die Wanderung der DC aus peripherem Gewebe in lymphatisches Gewebe. HLA-DR ist ein HLA-Molekül der Klasse II und präsentiert Teile phagozitiertes Antigene.

HLA-ABC stellen die MHC-Klasse I-Moleküle dar, welche die reifen DC ebenfalls auf ihrer Oberfläche tragen – allerdings in geringerem Ausmaß als die der Klasse II.

1.6 Allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation

Die Übertragung von hämatopoetischen Stammzellen eines humanen Spenders auf einen humanen Empfängerorganismus bezeichnet man als allogene und findet Anwendung bei

der Therapie maligner und einiger nicht-maligner Erkrankungen der Zellen des Blutbildenden Systems.

Je nachdem welcher Zelltyp bzw. welche Zellreihe des hämatopoetischen Systems entartet bzw. insuffizient ist, entstehen verschiedene Krankheitsbilder.

Bei den Leukämien entarten Zellen der lymphatischen oder myeloischen Zellreihe, sodass eine erhöhte Anzahl funktionsunfähiger und unreifer Leukozyten im Knochenmark und im Blut auftritt. Diese werden je nach Verlaufsform in akute myeloische Leukämie (AML), chronische myeloische Leukämie (CML), akute lymphatische Leukämie (ALL) und chronische lymphatische Leukämie (CLL) eingeteilt. Das klinische Bild ergibt sich unter anderem daraus, dass die malignen Zellen die Produktion der übrigen gesunden Zellen im Knochenmark verdrängen. Die verminderte Anzahl an Erythrozyten äußert sich in einer Anämie mit Müdigkeit und Schwäche, die verminderte Anzahl an funktionsfähigen Leukozyten insbesondere der neutrophilen Granulozyten äußert sich in einer erhöhten Infektanfälligkeit und die verminderte Anzahl an Thrombozyten äußert sich in einer erhöhten Blutungsneigung, die zur Petechienbildung führen kann.

Lymphome entstehen durch die Entartung von B- oder T-Lymphozyten, die an verschiedenen Punkten ihrer Zelldifferenzierung auftreten kann. Dementsprechend können Lymphome in allen Orten des lymphatischen Systems (Lymphknoten, Tonsillen, Milz, Knochenmark) lokalisiert sein.

Myelodysplastische Syndrome (MDS) sind eine Gruppe von Erkrankungen, die auf der Schädigung der pluripotenten Stammzellen beruhen. Somit ist auch hier die Anzahl funktionsfähiger Zellen aller drei Zellreihen eingeschränkt, welches sich in Anämie, Leukozytopenie und Thrombozytopenie äußern kann.

Eine hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) stellt eine potentiell kurative Therapieoption dieser meist letal verlaufenden Krankheiten dar, indem das hämatopoetische System inklusive maligner Zellen des Patienten weitgehend vernichtet und durch das eines gesunden Spenders ersetzt wird [30].

Vor der eigentlichen Stammzelltransplantation erfolgt die Konditionierung des Empfängers mittels Chemotherapie und/oder Ganzkörperbestrahlung. Sie dient dazu möglichst viele maligne Zellen zu zerstören und eine Immunsuppression zu induzieren für ein erfolgreiches Anwachsen des Transplantats. Zudem wirkt sie myeloablativ, um Raum für die Ansiedlung des Transplantats zu schaffen [31].

Zur Gewinnung des Spendermaterials erfolgt entweder eine Knochenmarkentnahme aus dem Beckenkamm oder durch eine heutzutage üblichere Methode, bei der die Stammzellen aus dem peripheren Blut entnommen werden. Dazu wird dem Spender vier bis sechs Tage lang Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF) subkutan verabreicht, welcher die Stammzellproduktion stimuliert und die Ausschwemmung der hämatopoetischen Stammzellen in die Blutbahn bewirkt. Dort werden diese mittels Aphaese abgesammelt [32].

Die Stammzellen werden dem Empfänger intravenös zugeführt und siedeln sich im Knochenmark an, wo sie neue Blutzellen bilden. Diese sind in der Regel ab dem zehnten bis zwanzigsten Tag nach der Transplantation im Blut messbar.

Eine bedeutende Rolle spielt die HLA-Kompatibilität von Spender und Empfänger. Sie sollten nach Möglichkeit vollständig HLA-kompatibel sein. Dies ist gegeben, wenn 10 von 10 relevanten Allelen, nämlich jeweils beide Allele der Antigene HLA-A, -B, -C, -DRB1 und -DQB1 zwischen Spender und Empfänger übereinstimmen (HLA match). Stimmt ein Teil nicht überein (HLA mismatch) sinken die Erfolgchancen und das Risiko der GvHD (s.1.6.1) steigt [30].

Zur Prophylaxe einer GvHD wird meist Cyclosporin A oder Tacrolimus ggf. kombiniert mit Methotextrat oder Mycofenolat Mofetil, welche sich gegen das Immunsystem des Spenders richten, verabreicht [33; 34].

Da die Patienten zeitweilig kein Immunsystem besitzen, besteht ein besonderes Risiko für Infektionen und Reaktivierungen von latenten Infektionen wie z. B. einer Cytomegalievirus-Infektion (CMV-Infektion) [35]. Es werden Antimykotika, Antibiotika und Virustatika zur Infektionsprophylaxe verabreicht und der Patient in einer keimreduzierten Umgebung, einer sogenannten Umkehrisolation, untergebracht.

1.7.1 Graft-versus-Host-Disease

Die Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung (Graft-versus-Host-Disease, GvHD) ist eine der häufigsten Komplikationen der allogenen HSZT (alloHSZT), deren Stärke mit steigender transplantationsassoziiertes Mortalität korreliert [36]. Es handelt sich um eine entzündliche, systemische Reaktion, bei der sich die T-Zellen des Spenders gegen das

Gewebe des Empfängers richten. Neben dem Hauptrisikofaktor von nicht übereinstimmenden HLA-Molekülen zwischen Spender und Empfänger (HLA mismatch), wurden periphere Blutstammzelltransplantationen gegenüber Knochenmarkstransplantationen [37] höheres Alter von Spender und Empfänger sowie Infektionen als Risikofaktoren identifiziert [38]. Speziell für die akute GvHD erhöhen das Verhältnis von weiblicher Spenderin zu männlichem Empfänger, weibliche Spenderin mit vorangegangener Schwangerschaft und bestimmte Konditionierungsschemata das Risiko [39; 40]. Eine T-Zell-Depletion dagegen senkt das Risiko [41]. Eine vorangegangene akute GvHD stellt einen Risikofaktor für eine chronische GvHD dar [38].

Zwischen akuter und chronischer GvHD wird anhand von zeitlichem Auftreten und klinischem Bild unterschieden.

Die klassische akute GvHD tritt innerhalb der ersten 100 Tage nach der Transplantation auf – ist allerdings auch zu einem späteren Zeitpunkt möglich. Sie betrifft zwischen 35 und 80% der allogenen Stammzelltransplantierten – abhängig von der Anzahl der übereinstimmenden HLA-Moleküle [42]. Die im Transplantat mittransferierten reifen T-Zellen des Spenders erkennen entsprechende HLA-Moleküle oder Nebenhistokompatibilitätsantigene (minor histocompatibility antigens, mHag) im Empfängergewebe als fremd [42; 43]. Die durch alloreaktive Zellen (s. 1.3) ausgelöste zytotoxische T-Zell-Antwort betrifft vor allem Haut (makulopapulöses Exanthem, Erythrodermie, Juckreiz), Leber (Ikterus), und Darm (Diarrhö, abdominelle Schmerzen, Gewichtsverlust). Die Einteilung der akuten GvHD in vier Grade erfolgt anhand des Ausmaßes der Betroffenheit an den genannten Organen (GvHD I-IV) ggf. mit Allgemeinreaktionen wie Fieber und Inappetenz.

Bei 60-70% der Transplantierten tritt die chronische GvHD 2-18 Monate nach der Transplantation de novo auf oder entwickelt sich aus der akuten GvHD [38]. Die chronische GvHD beruht auf gestörten Toleranzmechanismen und chronischer Entzündung. Meist sind Haut, Schleimhäute (oral, genital), Speicheldrüsen, Augen, Darm, Leber und Lunge betroffen. Die chronische GvHD ist die Hauptursache der nicht durch ein Rezidiv verursachten Todesfälle nach alloHZST [44].

1.7.2 Graft-versus-Leukemia-Effekt

Der Transplantat-gegen-Leukämie-Effekt (Graft-versus-Leukemia, GvL) oder allgemeiner formuliert Transplantat-gegen-Malignität-Effekt (Graft-versus-Malignancy, GvM) ist ein erwünschter Effekt nach alloHSZT, bei dem sich das Immunsystem des Spenders gegen Empfängerzellen malignen Ursprungs richtet. Dementsprechend ist das Risiko ein Rezidiv der Grunderkrankung zu erleiden geringer.

Auf zellulärer Ebene gibt es dafür verschiedene mögliche Erklärungen. Eine Erklärung macht die CD8⁺-T-Zellen verantwortlich. Zum einen wurden für bestimmte tumorassoziierte Antigene (TAA) wie z.B. Proteinase 3 (PR 3), Mucin 1 (MUC1), Wilms-Tumor-Protein 1 (WT1-Protein) spezifische CTL und deren Assoziation mit einem niedrigeren Rezidiv-Risiko nachgewiesen [45–47]. Zum anderen können zytotoxische gegen mHag gerichtete T-Zellen den GvL-Effekts erklären. mHag sind an MHC-Moleküle gebundene Peptide, die aus zelleigenen Proteinen stammen. So können nach alloHSZT alloreaktive Spender-T-Zellen eine GvHD und/oder einen GvL-Effekt auslösen, wenn sie mHag des Empfängers als fremd erkennen. Ein GvHD unabhängiger GvL-Effekt vermittelt über mHag kann dann auftreten, wenn die alloreaktiven Zellen sich gegen die mHag HA-1 und HA-2 richten. Diese befinden sich nur auf hämatopoetischen – also auch auf den malignen hämatopoetischen Zellen des Empfängers, aber nicht auf den Zellen anderer Organe [48]. Ergebnisse, die zeigen, dass eine HSZT mit vorheriger T-Zell-Depletion mit einer niedrigen Wahrscheinlichkeit eines GvL-Effekts und damit einer höheren Rezidiv-Wahrscheinlichkeit einhergeht, bekräftigen die Aussage, dass die T-Zellen maßgeblich am GvL-Effekt beteiligt sind [49].

Eine andere mögliche Erklärung besagt, dass Natürliche-Killer-Zellen (NK-Zellen) den GvL-Effekt vermitteln. Maggs et. al haben gezeigt, dass eine hohe NK-Zellzahl im Transplant mit einer reduzierten Rezidiv-Rate assoziiert ist [50].

1.8 Humanes Cytomegalievirus

Das humane Cytomegalievirus (HCMV), auch humanes Herpesvirus 5 (HHV-5)

genannt, gehört zur Familie der Herpesviridae. Namensgebend ist die Eigenschaft in infizierten Zellen eine Zellvergrößerung hervor zu rufen. Es besitzt eine doppelsträngige DNA. Zwischen Kapsid und Virushülle, welche virustypische Glykoproteine enthält, liegt eine Tegumentschicht, welche u. a. das Tegumentprotein pp65 enthält.

Die Prävalenz liegt in Industrienationen wie Westeuropa und den USA zwischen 40 und 70%. In einigen Dritte-Welt-Ländern erreicht sie bis zu 100% [51]. Die Durchseuchung erfolgt zweiphasig, zum einen während der ersten drei Lebensjahre bei engem Körperkontakt und zum anderen zwischen dem 16. bis 30. Lebensjahr durch Sexualkontakte [52].

Das Virus kann in Speichel, Tränenflüssigkeit, Urin, Genitalsekret, Muttermilch und Blut enthalten sein. Die Infektion kann intrauterin, peri- und postnatal, sexuell, durch Transplantationen und Schleimhautkontakte stattfinden [35]. Die Inkubationszeit beträgt vier bis sechs Wochen. Eine Ansteckung ist dann möglich, wenn eine Virusreplikation stattfindet.

Es muss unterschieden werden zwischen einer latenten CMV-Infektion und einer CMV-Erkrankung. In der Regel verläuft die Infektion bei immunkompetenten Personen asymptomatisch, seltener geht sie mit unspezifischen grippeähnlichen Symptomen wie Fieber, Übelkeit, Kopf- und Halsschmerzen einher [53]. Das Virus persistiert lebenslang im Körper und verbleibt in der Latenzphase in hämatopoetischen Vorläuferzellen und Monozyten [54; 55].

Immunsupprimierte wie z. B. Transplantierte oder Infizierte des Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) sind besonders gefährdet für eine CMV-Reaktivierung bei latenter Infektion. Dabei und auch bei Erstinfektion von Immungeschwächten und Neugeborenen zeigt sich meist ein deutlicheres klinisches Bild mit Komplikationen, die Lunge, Leber, Darm und Netzhaut betreffen können. Intrauterine Infektionen können dieselben Organe betreffen sowie Wachstumsverzögerungen, Hörschäden und neurologische Spätschäden zur Folge haben [35; 56].

1.9 Die Rolle von CMV bei der Stammzelltransplantation

Der CMV-Serostatus von Spender und Empfänger vor der Stammzelltransplantation

sowie deren Konstellation ist entscheidend. Wenn Spender und Empfänger CMV-seronegativ sind, ist die Inzidenz der CMV-Infektion nach alloHSZT sehr niedrig, sofern auch CMV-negative Blutprodukte für anschließende Transfusionen verwendet werden. Bei CMV-seropositivem Spender/Empfänger liegt die Inzidenz bei 50-60% [57]. Als Risikofaktoren einer CMV-Infektion nach alloHSZT wurden eine Hochdosis-Kortikosteroid-Therapie, T-Zell-Depletion, akute und chronische GvHD, unverwandte Spender sowie HLA-mismatch identifiziert [57–61].

Die Inzidenz der CMV-Erkrankung nach alloHSZT lag früher bei 20-35%, konnte aber Dank präventiver antiviraler Maßnahmen mittlerweile auf unter 5% gesenkt werden [62]. Früher war die CMV-Erkrankung eine Hauptursache der transplantatassoziierten Mortalität. Heutzutage beträgt diese allerdings weniger als 2% [62].

Ebenfalls verändert hat sich das klinische Bild der CMV-Erkrankung. Während früher die CMV-Pneumonie in der frühen Phase (bis Tag 100 nach Transplantation) dominierte, führten neue diagnostische und therapeutische Möglichkeiten zu einer Verschiebung hin zu einer späteren Krankheitsmanifestation (ab Tag 100 nach Transplantation) meist in Form einer gastrointestinalen CMV-Erkrankung [62].

1.9.1 Zusammenhang von CMV und GvHD

Sowohl akute als auch chronische GvHD stellen einen Risikofaktor für eine CMV-Reaktivierung bzw. -Erkrankung dar [57; 58; 60; 63].

Eine CMV-Reaktivierung nach allo-HSZT führt zu einem raschen Anstieg der CMV-spezifischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen [64]. Virusspezifische T-Zellen sind in der Lage alloPeptid:alloHLA-Komplexe spezifisch zu binden [65].

In Amir et al.'s Untersuchungen zeigten 80% der untersuchten virusspezifischen (Ebstein-Barr-Virus (EBV), CMV, Varizella-Zoster-Virus, Influenza-Virus) T-Zelllinien und 45% der virusspezifischen T-Zellklone alloreaktives Verhalten gegenüber den häufigsten HLA-Molekülen [65].

1.9.2 Zusammenhang von CMV und GvL

In mehreren Studien wurde eine Assoziation von CMV-seropositivem Spender bzw. CMV-Replikation nach alloHSZT und einem niedrigerem Rückfall-Risiko bei Leukämie- und Lymphompatienten gezeigt [66–69]. Die Ergebnisse unterscheiden sich jedoch hinsichtlich der Auswirkung auf das Gesamtüberleben. Nachbaur et al. und Green et al. haben ebenfalls eine Korrelation mit einer erhöhten transplantationsassoziierten Mortalität gezeigt, woraus dann letztendlich kein signifikanter Unterschied im Gesamtüberleben resultierte [66; 68]. Die Ergebnisse von Elmaagalci et al. dagegen zeigen keine Erhöhung der Nicht-Rezidiv-Mortalität durch einen CMV-positiven Spender oder CMV-Replikation, sodass die CMV-Replikation mit einem höheren Gesamtüberleben korreliert [67].

Verschiedene Mechanismen, die den GvL-Effekt erklären können, werden diskutiert.

Im Abschnitt „Graft-versus-Leukämie-Effekt“ (s. 1.6.1) wurde bereits beschrieben, dass alloreaktive bzw. kreuzreaktive CTL diesen vermitteln können.

Melenhorst et al. haben einem ALL-Patienten nach der alloHSZT virusspezifische (für CMV, EBV und Adenovirus) CTL verabreicht. Zum Zeitpunkt der maximalen Expansion dieser T-Zellen war ein deutlicher klinischer GvL-Effekt sichtbar. Ex vivo erkannten die virusspezifischen T-Zellen die leukämieassoziierten TAA WT1, Preferentially Expressed Antigen in Melanoma (PRAME) und Melanoma-associated Antigen 3 (MAGEA3) [70].

Hermout et al. haben in großen Teilen der von ihnen untersuchten Tumorzellen von Leukämie-Patienten eine verhältnismäßig hohe CMV-Viruslast gefunden. Diese können damit Zielzellen der CMV-spezifischen CD8⁺-T-Zellen darstellen [71].

Weitere denkbare Mechanismen wären direkte cytotoxische Effekte der CMV-Infektion oder der antiviralen Therapie. So haben Erlach et al. 2002 einen direkten antitumoralen Effekt des CMV in knochenmarkstransplantierten Mäusen mit B-Zell-Lymphom nachgewiesen [72].

1.10 Tumorassoziierte Antigene

Das B-Zell-Lymphom 2-Protein (Bcl-2-Protein) wirkt apoptosehemmend und ist damit an der Regulierung der Apoptose beteiligt. Das Bcl-2-Gen ist ein Protoonkogen, dessen Mutation zu einem Onkogen zur Proliferation des entsprechenden Gewebes und damit zur Entstehung verschiedener Lymphome führen kann [73].

Mucin-1 (MUC1) ist ein transmembranöses Mucin, das physiologisch im Epithel aller Organe vorkommt. Eine Überexpression ist in bestimmten Karzinomen und in einigen Lymphom-, AML-, CML- und MM-Zelllinien bzw. Primärzellen aus Patienten nachzuweisen [74].

New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1 (NY-ESO-1) ist ein Tumorantigen aus der Gruppe der Tumor-Hoden-Antigene, welches in MM-Patienten nachgewiesen wurde [75]. In AML-Patienten konnte mittels Gabe des Zytostatikums 5-Aza-2'-desoxycytidin eine NY-ESO-Expression auf den Leukämiezellen induziert werden [75]. Dies stellt einen potentiellen Angriffspunkt für eine Immuntherapie dar.

Preferentially Expressed Antigen in Melanoma (PRAME) ist ein Tumorantigen der Gruppe der Tumor-Hoden-Antigene, dessen Überexpression sowohl in soliden Tumoren als auch in Leukämien (AML, ALL, CML und CLL) und Mantelzell-Lymphomen vorkommt. In Leukämien induziert es Apoptose und hemmt die Zellproliferation [76].

Proteinase 3 (PR3) oder Myeloblastin ist eine antimikrobiell wirkende Serinprotease und Bestandteil der Granula von neutrophilen Granulozyten und Lysosomen der Monozyten. Sie kommt nur in Zellen der myeloischen Reihe, nicht in anderen hämatopoetischen Zellreihen vor. Somit findet man in einigen myeloischen Leukämien Überexpression von PR3, nicht aber in anderen hämatologischen Neoplasien [77].

Wilms Tumor Protein (WT-Protein) wird durch das Wilms-Tumorsuppressorgen-1 (WT1-Gen) codiert. Das WT-Protein wird in der Niere und auf Teilen der hämatopoetischen Zellen exprimiert. Mutationen im WT1-Gen verursachen zum einen den Wilmstumor, einen Nierentumor bei Kindern, und zum anderen AML, MM und MDS [78; 79].

1.11 Zielsetzung

Es besteht ein stetiges Interesse die alloHSZT als Therapie von malignen Erkrankungen des hämatopoetischen Systems zu optimieren. Dafür müssen die gewünschten Effekte wie das GvL-Phänomen oder eine niedrige Rezidivrate der Grunderkrankung gefördert werden, so wie negative Effekte wie z.B. die GvHD oder Komplikationen durch Infektionen möglichst gering gehalten werden. Faktoren, die diese Effekte beeinflussen, müssen bekannt sein und zugrundeliegende Mechanismen verstanden sein, um sich diese Faktoren zu Nutze machen zu können. Diese Arbeit fokussiert sich diesbezüglich auf den GvL-Effekt. In verschiedenen Untersuchungen konnte eine positive Korrelation von CMV-Reaktivierung und einer niedrigeren Rezidivrate nachgewiesen werden. Diese Arbeit widmet sich darauf aufbauend der Frage welche Effekte CMV auf das rezidivfreie Überleben von hämatogen Stammzelltransplantierten hat. Der konkrete Versuchsaufbau untersucht, ob CMV-spezifische CTL TAA kreuzreaktiv erkennen können. Eine positive Antwort auf diese Frage würde die Möglichkeit bieten konstruktiver auf den Verlauf der Therapie einwirken zu können. Zudem ist das Ergebnis von Bedeutung, da das CMV eine relativ hohe Durchseuchung in der Bevölkerung vorweist und der CMV-Status, welcher bereits ein entscheidendes Kriterium bei der Spenderwahl ist, müsste dann auch vor dem Hintergrund eines GvL-Effekts betrachtet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Reagenzien

Aqua ad injectabilis	Braun, Melsungen
Biocoll	Biochrom Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen
Dulbecco´s-PBS 1x (D-PBS)	Gibco, USA
EDTA (AppliChem)	Hartenstein, Würzburg
Foetales Kälberserum (FCS)	Sigma, Taufkirchen
FACS-flow	Becton Dickinson (BD), Heidelberg
FACS-clean	BD, Heidelberg
FACS-rinse	BD, Heidelberg
Gentamycin 50mg/ml	Gibco, Darmstadt
Humanes Serum	Sigma, Taufkirchen
RPMI 1640 Glutamax	Gibco, USA
Trypanblau	Gibco, USA

2.1.2 Verbrauchsmaterial

LS-Magnetsäulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Combitips	Eppendorf Hamburg
Pasteurpipetten	Biosigma, Italien
Serologische Pipetten	Greiner, Frickenhausen
Einfrierröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Polystyrol Röhrchen 4,5ml	Falcon/BD, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen 15ml	Greiner, Frickenhausen
Zentrifugenröhrchen 50ml	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatte 6-well	Falcon, USA

Zellkulturplatte 12-well	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatte 24-well	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturplatte 96-well Rundboden	Falcon, USA

2.1.3 Geräte

Brutschrank; Heraeus Typ: Thermo BBD 6220	Thermo Scientific, Dreieich
Bestrahlungsgerät RT 200 (FA. Müller)	Philips Medizin Systeme, Hamburg
Durchflusszytometer: FACS-Calibur	
Programm: „cell quest”	BD, Heidelberg
Gefrierschrank -80°C; Typ: Forma	Thermo Scientific, Dreieich
Kühl- und Gefrierschrank; Typ: Premium	Liebherr, Schweiz
Lichtmikroskop	Leica, Wetzlar
Pipetten; Typ Research	Eppendorf, Hamburg
Pipette; Typ Multipette	Eppendorf Hamburg
Pipetus, “Pipetboy”	Hirschmann, Eberstadt
QuadroMACS Miltenyi,	Bergisch Gladbach
Sterile Werkbank; Hera safe: KS12	Thermo Scientific, Dreieich
Stickstofftank; Typ: K10 Taylor	Wharton, Husum
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zählkammer Neubauer	Hartenstein, Würzburg
Zentrifuge; Typ Rotanta 46 RC	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge; Heraeus, Typ Multifuge 3 S-R	Thermo Scientific, Langenselbold

2.1.4 Chemikalien und Kits

Tab. 2.1 Chemikalien und Kits

Chemikalien	Stammlösung	Firma
Benzonase	50U/ml in RPMI	Sigma, Taufkirchen
BrefeldinA	5mg/ml in DMSO	Invitrogen, Darmstadt
FACS Lysing Solution 10x		BD, Heidelberg
Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF) (Leukine sargramostim)	500 µg/ml in Aqua	Sanofi, USA
GolgiStop		BD Bioscience, Heidelberg
Interleukin 2 (IL2)	100U/µl in Aqua	Novartis, Schweiz
Interleukin 4 (IL4)	10 µ/ml Aqua	Milteny
Interleukin 7 (IL7)	10ng/µl in Aqua/ 0,1% humanes Serum	PeptoTech, Hamburg
Interleukin 15 (IL15)	10ng/µl in Aqua/ 0,1% humanes Serum	PeptoTech, Hamburg
Ionomycin	1mg/ml in DMSO	Sigma, Taufkirchen
Perm2 10x		BD, Heidelberg
Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA)	1mg/ml in DMSO	Sigma, Taufkirchen
Phytohämagglutinin-L (PHA-L)	1 m g /ml in D-PBS	Sigma, Taufkirchen
Tumornekrosefaktor-α (TNF-α)	10 µg/µl in PBS 0,1% HSA	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Trypanblau	0,4%ig	Gibco, Darmstadt
Kits		
CD14 Microbeads		Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD137 Microbeads		Miltenyi, Bergisch Gladbach

2.1.5 Lösungen

Lysing Solution	Verdünnung 1:10 mit Aqua ad injectabilis
Trypanblau (0,4%ig)	Verdünnung 1:10 mit D-PBS, Gebrauchslösung 0,04%ig
MACS- Puffer	D-PBS/1% FCS/ 2mM EDTA
Waschpuffer	D-PBS/1% FCS
Fixierungslösung	D-PBS/2% Formaldehyd
Einfriermedium	50% FCS/ RPMI 1640 L-Glutamax/ 10%DMSO
Zellkulturmedium	RPMI 1640/Glutamax/10%FCS/ 0,1%Gentamycin

2.1.6 Monoklonale Antikörper

Tab. 2.2 monoklonale Antikörper

Antigen	Konjugat	Isotyp	Herkunft	Klon	Hersteller	Verdünnung
Humanes-						
CD3	FITC	IgG1 κ	Maus	SK7	BD	1:20
CD8	FITC	IgG1 κ	Maus	SK1	BD	1:20
HLA-A2	FITC	IgG2b, κ	Maus	BB7.2	BD	1:40
IgG1	FITC	IgG1 κ	Maus	X40	BD	1:20
CD80	PE	IgG1 κ	Maus	B7.5	BD	1:20
CD86	PE	IgG1 κ	Maus	2331 (FUN-1)	BD	1:20
CD137	PE	IgG1 κ	Maus	4B4-1	BD	1:20
HLA-ABC	PE	IgG1 κ	Maus	G46-2.6	BD	1:20
IFN-γ	PE	IgG1	Maus	45.15	Beckmann Coulter	1:20
IgG1	PE	IgG1 κ	Maus	X40	BD	1:20
CD3	PerCP	IgG1 κ	Maus	SK7	BD	1:20
CD4	PerCP	IgG1 κ	Maus	SK3	BD	1:20
HLA-DR	PerCP	IgG2a, κ	Maus	L243 (G46-6)	BD	1:20
IgG1	PerCP	IgG1 κ	Maus	X40	BD	1:20
IgG2a	PerCP	IgG2a, κ	Maus	X39	BD	1:20
CD1a	APC	IgG1 κ	Maus	HI149	BD	1:20
CD8	APC	IgG1 κ	Maus	SK1	BD	1:200
CD14	APC	IgG1 κ	Maus	HCD14	BioLegend	1:20
CD40	APC	IgG1 κ	Maus	5C3	BD	1:20
CD83	APC	IgG1 κ	Maus	HB15e	BD	1:10
CD107a	APC	IgG1 κ	Maus	H4A3	BD	1:80
CCR7	APC	IgG2a κ	Maus	150503	R&D	1:7
IgG1	APC	IgG1 κ	Maus	X40	BD	1:20
IgG2a	APC	IgG2a κ	Maus	20102	R&D	1:20

Tab. 2.3 Fluorochrome

Fluorochrome	Abkürzung	Excitation	Emission
Fluoreszeinisothiocyanat	FITC	488nm	525nm
Phycoerythrin	PE	488nm	578nm
Peridinin Chlorophyll	PerCP	488nm	675nm
Allophycocyanin	APC	635nm	661nm

2.1.7 Peptide**Tab. 2.4 Verwendete Antigenpeptide**

Peptid	Sequenz	Position	HLA restringiert	Hersteller
CMVpp65	NLVPMVATV	495-503	HLA-A*0201	Universität, Tübingen
Bcl-2	SLALVGACI	222-230	HLA-A*0201	Universität, Tübingen
Bcl-2	WLSLKTLLSL	214-223	HLA-A*0201	Universität, Tübingen
Bcl-2	PLFDFSWLSL	208-217	HLA-A*0201	Universität, Tübingen
HIV-1-RT	ILKEPVHGV	476-484	HLA-A*0201	Universität, Tübingen
Proteinase 3	VLQELNVTV	169-177	HLA-A*0201	Universität, Tübingen
Proteinase 3	RLFDPFFTRV	186-195	HLA-A*0201	Universität, Tübingen
WT1	DFKDCERRF	356-364	HLA-A*2402	Universität, Tübingen
Peptidpool	Protein ID			
CMVpp65	P06725			jpt, Berlin
MUC1	P15941			jpt, Berlin
NY-ESO	P78358			jpt, Berlin
PRAME	P78359			jpt, Berlin
WT1	P19544			jpt, Berlin

Peptide

Stammlösung der Peptide: 10mg in 1ml DMSO, dann 1:10 mit Aqua weiterverdünnt

Endkonzentration: 1mg/ml

Die Bindungsstärke der Aminosäure-Sequenzen der Peptide an entsprechende HLA-Typen wurde mit der Datenbank SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) ermittelt (Rammensee et.al.1999). Die Peptide wurden am Institut für Immunologie der Eberhard Karls Universität Tübingen mit dem ABI 433A Peptid Synthesizer (Applied Biosystems, Darmstadt), mit der Fmoc/Bu Methode synthetisiert.

Ansprechpartner ist Prof. Dr. Stefan Stevanović (Immunologie, Tübingen).

Peptid-Pools

Stammlösung der Pools: 25µg/25µl DMSO entspricht 1µg/2µl DMSO

Aliquotiert zu Portionen á 2,5µl und 5µl

Die in den Pools enthaltenen Peptide sind 15mere mit einer Überlappung von 11 Aminosäuren, wurden chemisch hergestellt, aufgereinigt und mittels LC-MS (Liquid chromatography–mass spectrometry) analysiert.

Hergestellt wurden sie von jpt peptide technologies, Berlin.

2.2 Methoden

2.2.1 Spendermaterial

Es wurden mononukleäre Zellen des Peripheren Blutes (PBMC) aus dem Blut 50 gesunder Spender gewonnen. In 30 Fällen lag das Spendermaterial als sogenannter Buffy Coat vor, welche von dem Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes (DRK) in Frankfurt stammten. Der Buffy-Coat-Beutel entsteht bei der Separation der Blutbestandteile nach einer Vollblutspende und enthält Thrombozyten, Leukozyten sowie einige Erythrozyten. Das Spendermaterial 16 weiterer Spender stammte aus der Transfusionsmedizin des Uniklinikums Würzburg und lag in Form von Leukozytenreduktionskammern (LRSC) vor. Diese entstehen bei der Thrombozytenspende und enthalten leukozyten- und erythrozytenreiches Blut. Die Spender gaben dem DRK und der Transfusionsmedizin des Uniklinikums Würzburg ihr schriftliches Einverständnis, dass ihr Material unter anderem für Forschungszwecke verwendet werden darf. Eine explizite Aufklärung der genauen Verwendung ist nicht erforderlich, da das Material vollständig anonymisiert weitergegeben wurde, keine zusätzliche Punktion zur Probengewinnung der Spender notwendig war, kein zusätzliches Material für meine Forschungszwecke entnommen werden musste und sich durch die Verwendung des Materials im Rahmen dieser Arbeit keine gesundheitlichen oder sonstige Konsequenzen für die Spender ergaben. Bei vier Spendern wurden die PBMC

aus EDTA-Blut gewonnen. Es liegt ein Ethikvotum vor für die Nutzung von Proben gesunder Spender für ein Projekt der hiesigen Arbeitsgruppe, in dessen Rahmen auch die Erstellung dieser Arbeit erfolgte.

Einige der Spender, von denen die LRSC stammten, waren in der Spenderdatei bereits als HLA-A*0201 positiv und CMV-seropositiv typisiert. Diese gehen auf CMVpp65-Multimer-Färbung für die Messungen am FACS-Gerät in unserer Arbeitsgruppe zurück. Alle anderen Spender wurden nach positiver Testung dieser beiden Merkmale ausgewählt. Insgesamt konnten bei 9 der 50 Spender die Versuche bis zum Ende durchgeführt werden. Darunter fällt das Material von 4 Buffy Coats, 4 LRSC und einer Blutentnahme mittels EDTA-Röhrchen.

2.2.2 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) wurden von Erythrozyten und polymorphkernigen Leukozyten durch Ficoll-Hypaque (spezifische Dichte 1,077g/ml) mittels Dichtegradientenzentrifugation getrennt.

Das Blut der LRSC wurde in ein 50ml Röhrchen überführt und auf 50ml mit D-PBS aufgefüllt. Das Blut der Buffy Coats wurde jeweils zu gleichen Teilen in zwei 50ml Röhrchen überführt und auf 35ml mit D-PBS aufgefüllt. In weiteren 50ml Röhren wurden 15ml Ficoll-Trennlösung vorgelegt und jeweils 25ml bzw. 35ml Blut überschichtet. Anschließend wurden diese 20 Minuten mit 2000 rounds per minute (rpm) bei Raumtemperatur (RT) ohne Bremse zentrifugiert. Die Mononukleären Zellen befinden sich als helle dünne Trennschicht zwischen der Ficoll-Trennlösung und dem Plasmaüberstand. Diese wurde mit der Pasteurpipette abpipettiert und in ein 50ml Röhrchen überführt und dann zum Waschen mit D-PBS auf 50ml aufgefüllt und 10 Minuten mit 1500rpm bei RT zentrifugiert.

2.2.3 Ermitteln der Zellzahl in der Neubauer Zählkammer

Die PBMC-Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:100 mit einer 0,04%igen Tryptophanblaulösung verdünnt. Davon wurden 10µl in die Neubauer Zählkammer gegeben. Tote Zellen stellen sich blau gefärbt dar, da der Farbstoff in diese eindringt. Die ungefärbten Zellen wurden in vier Quadranten gezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter zu ermitteln, wurde die gezählte Zellzahl durch vier geteilt und mit dem Verdünnungsfaktor 100 sowie dem Faktor der Zählkammer 10^4 multipliziert.

2.2.4. Herstellen von Allopool-Fütterzellen

Aus Buffy Coats von 10 verschiedenen Vollblutspendern des Blutspendedienstes des DRK Frankfurt wurden PBMC isoliert (s. 4.2) und mit D-PBS jeweils auf 2×10^8 PBMC/5ml eingestellt. Diese wurden anschließend gepoolt zu 2×10^9 /50ml und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 50ml Einfriermedium resuspendiert und 6×10^7 Allo-PBMC in 1,5ml pro Kryoröhrchen eingefroren. (s. 4.5.1)

Bevor die Allopool-Fütterzellen zu der CD137⁺-Zellkultur gegeben wurden, wurden diese mit 35Gy radioaktiv bestrahlt.

2.2.5 Kryopräservierung der Zellen und wieder auftauen

2.2.5.1 Zellen einfrieren

Es wurden maximal 5×10^7 PBMC bzw. Kulturzellen und maximal $2,7 \times 10^6$ DC (minimal 9×10^5) pro Kryoröhrchen in 1,5ml Einfriermedium (RPMI 1640/ 50% FCS/ 10% DMSO) weggefroren. Nach dem Befüllen wurden die Kryoröhrchen sofort auf Eis gestellt und zur Lagerung in einen -80°C Kühlschrank gebracht.

2.2.5.2 Zellen auftauen

Die mit eingefrorenen Zellen gefüllten Kryoröhrchen wurden kurz im auf 37°C temperierten Wasserbad erwärmt. Anschließend wurden die Zellen in 20ml Medium, das in einem 50ml Röhrchen auf 37°C vorgewärmt wurde, überführt. Die Zellesuspension wurde auf 50ml mit Medium aufgefüllt und 10 Minuten bei 1500rpm bei RT zentrifugiert. Danach wurden die Zellen erneut mit 20ml Medium gewaschen, und wie zuvor zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 5 bis 10 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt. In den Fällen, in denen sich das Pellet nicht ausreichend resuspendieren ließ, wurde Benzonase (Verdünnung 1:5000) hinzugegeben, 2 Minuten inkubiert und zwei Mal mit 5ml Medium gewaschen. PBMC und Kulturzellen wurden vor weiterer Verwendung in 10ml Medium bei 37°C im Brutschrank über Nacht gelagert.

2.2.6 Färbung HLA-A*0201 positiver und CMVpp65-spezifischer T-Zellen

Das zu verwendende Spendermaterial wurde anhand der zwei Kriterien Tragen des Merkmals HLA-A*0201 und der Spezifität für das HLA-A*0201 restringierte CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid von CD8⁺-T-Zellen ausgewählt.

Zunächst wurden in FACS-Röhrchen 100µl Puffer (D-PBS/1% FCS) vorgelegt und 100µl des Spendermaterials dazu gegeben. Die Isotyp-Kontrolle wurde gleichermaßen mit einer beliebigen Spendermaterialprobe angelegt. Es wurden PE-markierte HCMV-HLA-A*02-Pentamer/Tetramer-Antikörper bzw. Isotyp-Kontroll-Antikörper hinzu gegeben (s. Tab. 2.5). Nach der Inkubationszeit von 10 Minuten bei RT im Dunkeln, wurden die Ansätze mit 1ml Puffer gewaschen und 5 Minuten bei 1500rpm und 4°C (Pentamer) bzw. RT (Tetramer) zentrifugiert. Das Pellet wurde im Rückfluss resuspendiert. Anschließend wurden zu den Proben und der Isotyp-Kontrolle die der Tabelle 5 zu entnehmenden markierten Antikörper gegeben. Nach der Inkubationszeit von 20 Minuten bei 4°C (Pentamer) bzw. RT (Tetramer) wurde wie oben beschrieben gewaschen und zentrifugiert. Zur Lyse der Erythrozyten wurden je Röhrchen 1ml Lysing-Solution (1:10 verdünnt mit Aqua ad injetabilis) hinzugegeben und 10 Minuten bei 4°C im Dunkeln

inkubiert. Anschließend wurde zweimal, erst mit 1ml dann mit 2ml Puffer gewaschen und jeweils 5 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 200µl Fixierungslösung (D-PBS/2%Formaldehyd) aufgenommen und bis zur Messung am Durchflusszytometer bei 4°C gelagert.

Tab. 2.5 Färbeschema zur Charakterisierung der Spender

	PE	FITC	APC
Isotyp-Kontrolle	IgG1	IgG1	IgG1
Proben	HCMV A2 Pentamer/Tetramer	Anti-HLA-A2	Anti-CD8
Verdünnung	1:20	1:40	1:200

2.2.7 Nachweis der T-Zell-Aktivierung im Durchflusszytometer anhand peptidinduzierter CD137- Expression

CD137 (auch 4-1BB) gehört zur Familie der TNF-Rezeptoren und wird nach antigenspezifischer Aktivierung auf CD8⁺ T-Zellen exprimiert.

Die CMVpp65-spezifischen T-Zellen wurden an bestimmten Zeitpunkten der Kultivierung mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid stimuliert und die CD137-Expression als Marker für deren Reaktivierbarkeit gemessen.

Das CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, um die optimale Konzentration für die Stimulierung vor der CD137-Selektion sowie der IFN-γ- und CD107a-Messung zu bestimmen.

2.2.7.1 Aktivierung von T-Lymphozyten mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid

Jeweils 5×10^5 frisch gewonnene Kulturzellen wurden pro Loch pro 200µl Medium in einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Stimuliert wurde mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid in den Konzentrationen 0,01/0,1/1,0µg/ml. Die negativ-Kontrolle wurde mit

HIV-1-RT-(ILKEPVHGV)-Einzelpeptid 1µg/ml stimuliert. Zur Isotyp-Kontrolle und zur 0-Kontrolle wurden keine Peptide hinzugegeben. Inkubiert wurde 20-22 Stunden bei 37°C und 5%CO₂.

2.2.7.2 Färbung CD137-positiver T-Zellen für die Durchflusszytometrie

Nach 20-22 Stunden Inkubation wurden die Zellen resuspendiert und in mit 1ml kaltem Waschpuffer (D-PBS/1% FCS) gefüllte FACS-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 1500rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde im Rückfluss resuspendiert. Anschließend wurden die der Tabelle 2.6 zu entnehmenden Fluorochrom-markierten Antikörper hinzugefügt und alles 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 1ml Waschpuffer gewaschen. Bei sofortiger Messung am Durchflusszytometer wurde das Pellet in 100ml Waschpuffer aufgenommen, andernfalls in 100ml Fixierlösung.

Tab. 2.6 Färbeschema zur Charakterisierung CD137⁺-T-Lymphozyten

	FITC	PE	perCP	APC
Isotyp-Kontrolle	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
0-Kontrolle/ Ansätze mit Peptid	CD3	CD137	CD4	CD8
Verdünnung	1:20	1:20	1:20	1:100

2.2.8 Selektion CD137-positiver T-Zellen mit Hilfe der magnetischen Zellseparation (MACS- System)

Die sterile CD137-Selektion wurde mittels Micro-Bread kit von Miltenyi durchgeführt. Dabei binden PE-konjugierte Antikörper CD137 exprimierende T-Zellen. Weitere Antikörper, die mit magnetischen Partikeln beladene sind, binden wiederum die PE-konjugierten Antikörper, sodass die CD137⁺-Zellen über eine Magnetsäule separiert werden können.

Zunächst wurden die Kulturzellen mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid in der jeweiligen Konzentration stimuliert, die bei der vorherigen Messung mittels

Durchflusszytometer den größten Anteil an CD8⁺/CD137⁺-T-Zellen nach Aktivierung angezeigt hatte. Zusätzlich wurden die Zytokine IL-2 (50U/ml), IL-7 (5ng/ml) und IL-15 (5ng/ml) hinzugegeben. Nach 20 bis 22 Stunden Inkubation bei 37°C und 5%CO² wurden die stimulierten Zellen geerntet, gezählt (s. 4.3), mit kaltem MACS-Puffer (D-PBS/1%FCS/2mM EDTA) 1:1 verdünnt und 10 Minuten bei 1500rpm und bei 4°C zentrifugiert. Dann wurde ein zweites Mal mit 5ml MACS-Puffer gewaschen, 10 Minuten bei 1500rpm und bei 4°C zentrifugiert und der Überstand anschließend komplett verworfen. Die folgenden Waschvorgänge liefen nach dem gleichen Schema ab. Das Pellet wurde pro 1x10⁷ Zellen mit 40µl kaltem MACS-Puffer resuspendiert und mit 10µl Anti-CD137-PE-Antikörper versetzt. Der Ansatz inkubierte 10 Minuten auf Eis. Dann wurde zweimal gewaschen. Das Pellet wurde in 80µl kaltem MACS-Puffer pro 1x10⁷ Zellen resuspendiert und 20µl pro 1x10⁷ Zellen Anti-PE-Micro-beads dazugegeben. Der Ansatz inkubierte erneut 10 Minuten auf Eis und wurde danach zweimal gewaschen. Das Pellet wurde in 2ml kaltem MACS-Puffer pro zu verwendender Säule resuspendiert. Auf eine Säule wurden maximal 1x10⁸ Zellen gegeben. Die entsprechende Anzahl an LS-Säulen von Miltenyi wurden am Magneten befestigt und mit 3ml kaltem MACS-Puffer vorgespült. Nachdem die 2ml Suspension der markierten Zellen auf die Säule gegeben wurden, wurde zweimal mit je 3ml kaltem MACS-Puffer nachgespült. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Anschließend wurde die Säule vom Magneten genommen und die Zellen mit 4ml kaltem MACS-Puffer eluiert. Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und in Kulturmedium resuspendiert.

Zur Kontrolle der Anreicherung der CD137-selektierten Zellen wurden Durchfluss und Eluat entsprechend des oben beschriebenen Vorgehens (s.2.2.7.2) und den der Tabelle 2.7 zu entnehmenden Antikörpern für die Durchflusszytometrie gefärbt.

Tab. 2.7 Färbeschema zur Kontrolle der CD137-Selektion

	FITC	PE	perCP	APC
Isotyp-Kontrolle	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Eluat, Durchfluss	CD8	CD137	CD3	CD4
Verdünnung	1:20		1:20	1:100

2.2.9 Kultivierung CMVpp65-spezifischer Lymphozyten

Die Zellen wurden bei 37°C, 5%CO₂ und 99% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank steril kultiviert.

Alle 2-3 Tage wurden die Zellen mit den Zytokinen IL-2 (50U/ml), IL-7 (5ng/ml) und IL-15 (5ng/ml) sowie frischem Kulturmedium (RPMI/10%FCS/0,1%Gentamycin) gefüttert.

Tag 1

Es wurden $2-2,3 \times 10^7$ frisch separierte PBMC pro Loch in einer 6-Loch-Platte in 2ml Kulturmedium ausgesät oder $3,7 \times 10^6$ bzw. $5,5 \times 10^6$ am Vortag aufgetaute PBMCs pro Loch in einer 12-Loch-Platte in 1 bzw. 1,5ml Kulturmedium ausgesät. Zur Stimulation wurde 0,01µg/ml CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid dazu gegeben.

Tag 2/3

Die Hälfte des Kulturmediums wurde abpipettiert und herunter zentrifugiert. Das Pellet wurde in der gleichen Menge Kulturmedium resuspendiert, 50U/ml IL-2, 5ng/ml IL-7 und 5ng/ml IL-15 hinzugegeben und alles wieder zur Zellkultur gegeben. Der Vorgang wurde alle 2 bis 3 Tage wiederholt.

Tag 10-14

Ein Teil der Zellen wurde mit verschiedenen Konzentrationen (0,01/0,1/1,0µg/ml) des CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptids stimuliert, um nach 20-22 stündiger Inkubation im Brutschrank die CD137- Expression zu messen. (s. 2.2.7)

Ab einer durch eine CD137-Selektion vermutlich zu gewinnenden Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen wurde diese durchgeführt. Die zu erwartende Zellzahl wurde berechnet aus dem Produkt der Gesamtzellzahl der Kulturzellen und dem jeweilig gemessenen Prozentsatz der CD8⁺/CD137⁺-Zellen aus dem Gate der Lymphozyten.

Tag 15/16

Die CD137-Selektion wurde durchgeführt (s. 2.2.8). Die gewonnen Zellen wurden entweder in 6-Loch-Platten mit $1-2,3 \times 10^6$ CD137⁺-T-Zellen mit der 6 bis 15-fachen

Menge Allopool-Fütterzellen in 2ml Medium oder in 24-Loch-Platten mit $3,7-5,8 \times 10^4$ CD137⁺-T-Zellen mit der 100 bis 136-fachen Menge Allopool-Fütterzellen in 1ml Medium in Kultur genommen. Hinzugefügt wurden einmalig 1µg/ml Phytohemagglutinin-L (PHA-L), sowie die Zytokine 50U/ml IL-2, 5ng/ml IL-7 und 5ng/ml IL-15.

Alle 2-3 Tage wurde das Medium mit der Zugabe der genannten Zytokine erneuert.

Tag 8-13 nach CD137-Selektion

Ein Teil der Zellen wurde erneut mit verschiedenen Konzentrationen (0,01/0,1/1,0µg/ml) des CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptids stimuliert, um nach 20-22 stündiger Inkubation im Brutschrank die CD137- Expression zu messen. (s. 2.2.7)

Tag 13-20 nach CD137-Selektion

Die Zellen wurden geerntet, gezählt und der benötigte Anteil zum Nachweis von intrazellulärem IFN-γ und CD107a- Expression stimuliert. Übrige Zellen wurden weggefroren. (s. 2.2.13)

2.2.10 Selektion CD14-positiver mononukleärer Zellen mit Hilfe der Magnetischen Zellseparation (MACS- System)

Die sterile CD14-Selektion wurde mittels Micro-Beads kit von Miltenyi durchgeführt. Durch Zugabe von Anti-CD40-Antikörper, die mit magnetischen Partikeln markiert sind, können die entsprechend markierten Zellen über eine magnetische Säule selektiert werden.

Die Selektion erfolgte minimal aus 6×10^7 und maximal aus $2,8 \times 10^8$ PBMCs, die wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben, gewonnen wurden. Zunächst wurden die Zellen in einem 50ml Röhrchen abzentrifugiert und das Pellet in 10ml kaltem MACS-Puffer (D-PBS/1%FCS/2mM EDTA) aufgenommen und 10 Minuten bei 1500rpm und 4°C zentrifugiert. Dann wurden pro 1×10^7 Zellen 80µl MACS-Puffer und CD14-Microbeads hinzugegeben. Der Ansatz wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und dabei immer wieder geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz auf 40ml mit MACS-Puffer aufgefüllt und

wie zuvor abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 2ml MACS-Puffer pro zu verwendender Säule resuspendiert. Auf eine LS-Säule wurden maximal 1×10^8 Zellen gegeben. Die am Magneten befestigte Säule wurde mit 6ml MACS-Puffer vorgespült, dann mit der 2ml Zellsuspension beladen und anschließend zweimal mit je 3ml MACS-Puffer gespült. Danach wurde die Säule vom Magneten genommen und die Zellen mit 4ml MACS-Puffer eluiert. Die Zellen wurden gezählt, abzentrifugiert und zur Kultivierung im Kulturmedium aufgenommen.

2.2.11 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten

Die Zellen wurden bei 37°C , $5\% \text{CO}_2$ und 99% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank steril kultiviert.

Tag 1

Nach der CD-14-Selektion wurden die Monozyten in 6-Loch-Platten mit jeweils $3-4 \times 10^6$ Zellen in 3ml Kulturmedium pro Loch ausgesät. Hinzu gegeben wurden 100ng/ml GM-CSF und 20ng/ml IL-4.

Tag 3

Pro Loch wurden 1ml Medium abpipettiert und 10 Minuten bei 1500rpm und RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in neuem Kulturmedium resuspendiert. Die folgenden Kulturmediumwechsel erfolgten nach dem gleichen Schema. Der Ansatz wurde mit 100ng/ml GM-CSF und 20ng/ml IL-4 versetzt.

Tag 5/6 und 7/8

Das Medium wurde erneut gewechselt und 100ng/ml GM-CSF, 20ng/ml IL-4 und 10ng/ml (TNF- α) hinzugefügt.

Tag 9/10

Die Zellen wurden gerntet, indem sie zunächst mindestens 30 Minuten auf Eis gestellt wurden, dann inklusive Kulturmedium aus der Platte genommen wurden und in ein 50ml

Röhrchen überführt wurden. Anschließend wurden die Löcher der Platte mit kaltem Puffer (D-PBS) nachgespült und die so gewonnenen Zellen ebenfalls in das 50ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden gezählt und runterzentrifugiert. Ein Teil wurde zur Charakterisierung mittels Färbung für die Durchflusszytometrie verwendet (s. 2.2.12) und der andere Teil weggefroren.

2.2.12 Nachweis der Differenzierung CD14-positiver peripherer mononukleärer Zellen zu Dendritischen Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Im Anschluss an die Kultivierung wurden die DC charakterisiert. Es wurde untersucht, welche der folgenden genannten Oberflächenmoleküle von den Zellen exprimiert wurden: CD1a, CD14, CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7, HLA-ABC und HLA-DR. Eine Erläuterung dieser Oberflächenmoleküle ist unter 1.5 zu finden.

2.2.12.1 Charakterisierung dendritischer Zellen mittels Färbung für die Durchflusszytometrie

Für die Färbung wurden mindestens $1,6 \times 10^6$ Zellen verwendet und zu gleichen Teilen in je 100µl Puffer in acht FACS-Röhrchen aufgenommen. Die Ansätze wurden mit den der Tabelle 2.8 zu entnehmenden Fluoreszenz-markierten Antikörpern versetzt und 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit 1ml Puffer (D-PBS/1%FCS) gewaschen und die Zellen im Überstand resuspendiert.

Tab. 2.8 Färbeschema zur Charakterisierung der DC

	PE	perCP	APC	Menge in µl	Verdünnung
Isotypkontrolle 1	IgG1	IgG2 α	IgG1	Je 5	1:20
Ansatz DC	CD80		CD1a	Je 5	1:20
Ansatz DC	CD86		CD14	Je 5	1:20
Ansatz DC	HLA-ABC		CD40	Je 5	1:20
Ansatz DC			CD83	10	1:10
Ansatz DC		HLA-DR		5	1:20
Isotypkontrolle 2			IgG2a	15	1:7
Ansatz DC			CCR7	15	1:7

2.2.13 Nachweis von intrazellulärem Interferon- γ und CD107a- Expression

1. nach Peptid-Stimulation

2. nach Stimulation durch Peptid-Präsentation mittels dendritischer Zellen

Zur Messung der zytotoxischen Aktivität der Zellen wurden die CD107a-Expression als Degranulationsmarker und IFN- γ gemessen.

2.2.13.1 Stimulation der T-Lymphozyten durch Peptide und Nachweis von IFN- γ und CD107a

In zwei Durchläufen wurde der Test ohne DC durchgeführt. Zunächst wurden die Einzelpeptide bzw. Peptidpools in den Vertiefungen einer 96-Loch-Platte vorgelegt. Dann wurden 5×10^5 bzw. 1×10^6 Zellen in 100µl Kulturmedium hinzugefügt, gemischt und alles eine Stunde bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 0,5µg/ml Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) und 1µg/ml Ionomycin (Iono) zur Positiv-Kontrolle hinzu gegeben. Zu allen Ansätzen wurden je in einer 1:80 Verdünnung APC-markierte Anti-CD107a-Antikörper gegeben. Die einzige Ausnahme bildete die Isotyp-Kontrolle, welche in gleicher Verdünnung mit einem APC-markiertem Anti-IgG1 versetzt wurde. Alle Ansätze wurden mit 10µg/ml Brefeldin A und GolgiStop in einer 1:15 Verdünnung versetzt und gemischt. Inkubiert wurde 17 bzw. 18,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂.

Tab. 2.9 Testansätze zum Nachweis von IFN- γ und CD107a in T-Lymphozyten nach Peptidstimulation

	Peptidkonzentration auf T-Zellen	PMA/ Iono	Anti-CD 107a-APC	Brefeldin A	Gogli Stop
Isotyp-Kontrolle				10 μ g/ml	1:15
Neg. Kontrolle HIV-1-RT	10 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
Pos. Kontrolle PMA/Iono		0,5 μ g/ml PMA 1 μ g/ml Iono	1:80	10 μ g/ml	1:15
CMVpp65 Einzelpeptid	0,01 μ g/ml/ 0,1 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
WT1 Einzelpeptid	10 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
Proteinase 3 Einzelpeptide	je 10 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
Bcl2 Einzelpeptide	je 10 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
WT1 Peptidpool	1 μ g/ml/ 5 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
NY-ESO Peptidpool	5 μ g/ml/ 10 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
MUC1 Peptidpool	5 μ g/ml/ 10 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
PRAME Peptidpool	5 μ g/ml/ 10 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15
CMVpp65 Peptidpool	1 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15

2.2.13.2 Stimulation der T-Lymphozyten durch Peptid-Präsentation mittels dendritischer Zellen und Nachweis von IFN- γ und CD107a

Bei den Durchläufen, in denen die Peptidpräsentation mittels DC durchgeführt wurde,

wurden 5×10^5 CMVpp65-spezifischen Kulturzellen pro Ansatz in 100 μ l Kulturmedium in ein Loch einer 96-Loch-Platte gesät. Die Platte wurde für mindestens 3 Stunden in den Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ gestellt.

Die DC desselben Spenders wurden aufgetaut und gezählt. In 15ml Röhren wurden pro Ansatz zwischen $5,5 \times 10^4$ und $1,3 \times 10^5$ Zellen in 1ml Kulturmedium mit den entsprechenden Einzelpeptiden oder Peptid-Pools versetzt (s. 2.1.8). Zu den Ansätzen der Isotyp-Kontrolle und der Positiv-Kontrolle wurden keine Peptide dazu gegeben. Die Ansätze wurden 2 bis 2,5 Stunden bei 37°C und 5%CO₂ im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden diese zweimal mit 5ml RPMI gewaschen und 5 Minuten bei 1500rpm und RT zentrifugiert. Nach dem zweiten Mal wurde der Überstand komplett abzentrifugiert und das Pellet in 100 μ l resuspendiert. Die beladenen DC wurden zu den vorgelegten CMVpp65-spezifischen Zellen in die 96-Loch-Platte gegeben. In vier Durchläufen wurden die T-Zellen nur über CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid Zugabe (ohne Präsentation mittels DC) stimuliert. In den anderen vier Durchläufen gab es jeweils einen Ansatz, bei dem den T-Zellen das CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid über DC präsentiert wurde und einen, bei dem das CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid einzeln dazu gegeben wurde. Inkubiert wurde alles eine Stunde im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurden 0,5 μ g/ml PMA und 1 μ g/ml Iono zur Positiv-Kontrolle hinzu gegeben. Zu allen Ansätzen wurden je in einer 1:80 Verdünnung APC-markierte Anti-CD107a-Antikörper gegeben. Die einzige Ausnahme bildete die Isotyp-Kontrolle, welche in gleicher Verdünnung mit einem APC-markiertem Anti-IgG1 versetzt wurde. Alle Ansätze wurden mit 10 μ g/ml Brefeldin A und GolgiStop in einer 1:15 Verdünnung versetzt und gemischt. Inkubiert wurde 16-18,5 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂.

Tab. 2.10 Testansätze zum Nachweis von IFN- γ und CD107a in T-Lymphozyten nach Peptidstimulation mittels Dendritischer Zellen

	Peptidkonzentration auf DC	Peptidkonzentration auf T-Zellen	PMA/Iono	Anti-CD 107a-APC	Brefeldin A	Gogli Stop
Isotyp-Kontrolle					10 μ g/ml	1:15
Neg. Kontrollen HIV-1-RT	10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
Pos. Kontrolle PMA/Iono			0,5 μ g/ml PMA 1 μ g/ml Iono	1:80	10 μ g/ml	1:15
CMVpp65 Einzelpeptid	10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
WT1-A24 Einzelpeptid	10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
Proteinase 3 Einzelpeptide	je 10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
Bcl2 Einzelpeptide	je 10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
WT1 Peptidpool	1 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
NY-ESO Peptidpool	5 μ g/ml/ 10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
MUC1 Peptidpool	5 μ g/ml/ 10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
PRAME Peptidpool	5 μ g/ml/ 10 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
CMVpp65 Peptidpool	1 μ g/ml			1:80	10 μ g/ml	1:15
CMVpp65 Einzelpeptid ohne DC		0,1 μ g/ml/ 0,01 μ g/ml		1:80	10 μ g/ml	1:15

2.2.13.3 Färbung zur Charakterisierung der IFN- γ und CD107a produzierenden T-Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Nach der Inkubation wurden die Zellen der Ansätze resuspendiert und in FACS-Röhrchen überführt, in denen kalter Puffer (PBS/1%FCS) vorgelegt wurde. Die Zellen wurden 5 Minuten bei 1500rpm und 4°C runterzentrifugiert und im Überstand resuspendiert. Die gegen die Oberflächenmoleküle gerichteten Fluoreszenz markierten Antikörper wurden entsprechend der Tabelle 2.11 hinzugefügt. Inkubiert wurde 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit je 1ml kaltem Puffer gewaschen und 5 Minuten bei 1500rpm bei 4 °C zentrifugiert. Nach dem zweiten Mal wurde der Überstand komplett entfernt. Die folgenden Waschschrte liefen nach dem gleichen Schema ab. Zur Permeabilisierung der Zellen wurde pro Ansatz 250 μ l von der 1:10 mit Aqua dest. verdünnten FACS Permeabilizing Solution (Perm2) dazu gegeben und 12 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Danach wurde wie zuvor beschrieben zweimal gewaschen. Die PE markierten Anti-IFN- γ -Antikörper wurden hinzu gegeben und 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde wie zuvor gewaschen und die Zellen für die Messung am Durchflusszytometer in 100-200 μ l Puffer oder 250 μ l Formalin (2%) aufgenommen.

Tab. 2.11 Färbeschema zur Charakterisierung IFN- γ und CD107a produzierender T-Lymphozyten

Fluoreszenzmarker/ Ansätze	FITC extrazellulär	PE intrazellulär	PerCP extrazellulär	APC extrazellulär
Isotyp-Kontrolle	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Negativ-Kontrolle HIV-1-RT	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
Positiv-Kontrolle PMA/Iono	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
CMVpp65 Einzelpeptid	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
WT1-A24 Einzelpeptid	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
Proteinase 3 Einzelpeptide	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
Bcl2 Einzelpeptide	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
WT1 Peptidpool	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
NY-ESO Peptidpool	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
MUC1 Peptidpool	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
PRAME Peptidpool	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
CMVpp65 Peptidpool	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)
CMVpp65 Einzelpeptid ohne DC	CD8 (1:20)	IFN- γ (1:20)	CD3 (1:20)	CD107a (1:80)

3. Ergebnisse

3.1 Spenderauswahl

Insgesamt stand das Material von 281 freiwilligen und gesunden Spendern zur Verfügung. Auswahlkriterien für die Verwendung des Spendermaterials waren zum einen das Tragen von HLA-A2*0201 sowie die Seropositivität für CMV. Es erfolgte die Färbung der Zellen mit FITC-markierten Anti-HLA-A2-Antikörpern. Die Spezifität der T-Zellen der Spender für CMVpp65 wurde durch Färbung mit PE-markierten HCMV-HLA-A2-MHC-Klasse-I-Multimeren und Messung am Durchflusszytometer bestimmt. So wurden aus den 281 Spender lediglich 50 für die folgenden Versuche ausgewählt und mit einer Kultivierung deren PBMC zur Expansion begonnen. Bei 9 dieser 50 Spender wurden CMVpp65-spezifische T-Zellen soweit erfolgreich expandiert und angereichert, dass der abschließende Zytotoxizitätstest durchgeführt werden konnte. In acht dieser neun Fälle konnten ebenfalls erfolgreich DC generiert und für die Versuche verwendet werden. Im Folgenden werden die Verläufe und Ergebnisse der Versuche mit den Zellen dieser neun Spender dargestellt.

Grund für den Abbruch der anderen Durchläufe war vor allem eine zu niedrige Frequenz an Zellen, die sich durch das CMVpp65-Peptid stimulieren ließen, sodass die zu erwartende Zellzahl nach einer Selektion zu gering gewesen wäre. Weitere Gründe waren eine zu geringe Zellzahl der isolierten PBMC, der CD14⁺-Zellen nach der spezifischen Selektion und der CD137⁺-Zellen einige Tage nach ihrer spezifischen Selektion sowie Kontaminationen der Zellkulturen.

3.2 Expansion, Aktivierbarkeit und Anreicherung CMVpp65-spezifischer T-Lymphozyten

Aus den PBMC neun gesunder Spender wurden erfolgreich CMVpp65-spezifische CTL in Kultur expandiert und angereichert, um deren Effektorfunktion nach Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV) -Peptid und verschiedenen TAA zu testen.

Tab. 3.1: Übersicht über die Zellzahlen bzw.-anteile im Verlauf

Zellzahl zu folgendem Zeitpunkt:	Start der spezifischen Expansion	Nach CD137-Selektion	Anteil der selektierten CD137⁺-Zellen	Zugefügte Allopool-Fütterzellen	Nach unspezifischer Expansion
Spender 1	3,4*10 ⁷	2,7*10 ⁵	11,0%	3*10 ⁷	2,3*10 ⁷
Spender 2	1,8*10 ⁶	6,4*10 ⁶	3,2%	9*10 ⁷	2,2*10 ⁸
Spender 3	7,0*10 ⁷	2,1*10 ⁶	1,9%	3*10 ⁷	7,4*10 ⁷
Spender 4	1,2*10 ⁸	3,1*10 ⁶	9,4%	1,4*10 ⁷	9,3*10 ⁷
Spender 5	2,6*10 ⁸	7,1*10 ⁶	7,6%	5,1*10 ⁷	5,1*10 ⁷
Spender 6	1,9*10 ⁸	2,1*10 ⁶	1,1%	1,2*10 ⁷	2,2*10 ⁷
Spender 7	4,4*10 ⁷	2,4*10 ⁵	0,8%	2,4*10 ⁷	2,5*10 ⁷
Spender 8	1,0*10 ⁸	8,1*10 ⁶	7,4%	1,2*10 ⁸	6,3*10 ⁷
Spender 9	3,3*10 ⁷	1,5*10 ⁵	17,4%	1,8*10 ⁷	2,1*10 ⁷

Zu Beginn wurden die PBMC durch Zugabe des CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptids spezifisch expandiert. Anschließend wurde nach Restimulation mit dem zuvor genannten Peptid eine CD137-spezifische Selektion durchgeführt. Danach wurden die Zellen unter Zugabe von Allopool-Fütterzellen weiter unspezifisch expandiert.

3.2.1 Spezifische Expansion CMVpp65-spezifischer T-Lymphozyten

Bei den Spendern mit unbekanntem CMV-Serostatus wurde der prozentuale Anteil der Zellen an CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen, die das CMVpp65-Peptid erkennen und binden, ermittelt. Dieser lag bei den verwendeten Spendern zwischen 0,11% und 36,87%.

Daneben lag ebenso Material von Spendern vor, deren CMV-Spezifität bereits im Vorfeld durch die Arbeitsgruppe mit der oben beschriebenen Methode (s.2.2.6) positiv getestet wurde. Hier wurde der prozentuale Anteil der Zellen an CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen, die das CMVpp65-Peptid erkennen und binden, vor Beginn der Expansion nicht erneut ermittelt. Die PBMC wurden kultiviert und durch Zugabe von CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid und Zytokinen CMVpp65-spezifische T-Zellen expandiert.

Nach 10-14 Tagen spezifischer Expansion wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid restimuliert. Anschließend wurde die CD137-Expression auf CD3⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten und CD3⁺/CD8⁺-T-Lymphozyten gemessen.

CD137 (auch 4-1BB) ist ein TNF-Rezeptor, wird unter anderem auf aktivierten T-Zellen exprimiert und fungiert als Costimulator für deren Proliferation. Der 4-1BB-Ligand wird auf APZ exprimiert.

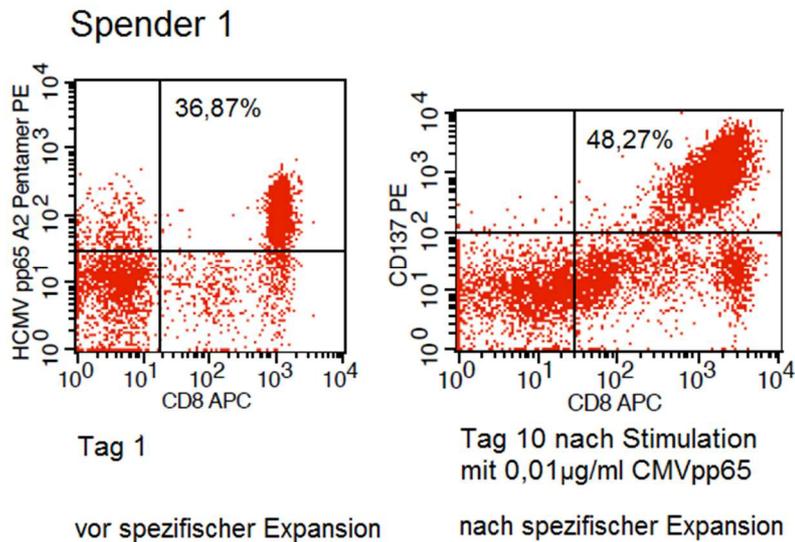


Abb. 3.1 HCMVpp65-HLA-A2-Pentamer-Messung vor spezifischer Expansion und CD137-Expression nach spezifischer Expansion unter CD8⁺-T-Lymphozyten

„Dot Blots“ der Lymphozyten des Spender 1. Verglichen werden jeweils CD8⁺-T-Zellen an Tag 1, die das PE-markierte, HCMVpp65-HLA-A2-MHC-Klasse-I-Pentamer binden, mit den CD8⁺-T-Zellen, die nach 10 Tagen spezifischer Expansion mit 0,01µg/ml CMVpp65 zur Expression von CD137 restimuliert wurden. Auf der x-Achse werden die APC-markierten CD8⁺-Zellen dargestellt. Auf der y-Achse werden jeweils links die PE-markierten, an das HCMVpp65-HLA-A2-MHC-Klasse-I-Pentamer gebundenen Zellen und jeweils rechts die PE-markierten CD137⁺-Zellen dargestellt. Die doppelt positiven Zellen befinden sich im oberen rechten Quadranten. Deren prozentualer Anteil an den Lymphozyten ist angegeben.

Nach den 10-14 Tagen Kultivierung war unter den Lymphozyten aller neun Spender die Frequenz der CD8⁺-T-Zellen, die sich durch das CMVpp65-Peptid zur CD137-Expression stimulieren ließen, höher als die Frequenz der CD8⁺-T-Zellen, die an Tag 1 das CMVpp65-Peptid erkannten.

3.2.2 Aktivierbarkeit CMVpp65-spezifischer T-Lymphozyten

Nach der Stimulation der Kulturzellen mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid konnte

eine CD137-Expression auf CD3⁺/CD4⁺-T-Lymphozyten und CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten aller neun Spender gemessen werden. Damit konnte die Aktivierbarkeit der CMV-spezifischen T-Lymphozyten durch das CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid gezeigt werden.

Die Aktivierbarkeit der virusspezifischen T-Zellen unterschied sich je nach Zellart (T-Helfer-Zelle oder Zytotoxische T-Zelle) und nach verwendeter Peptidkonzentration zur Stimulation.

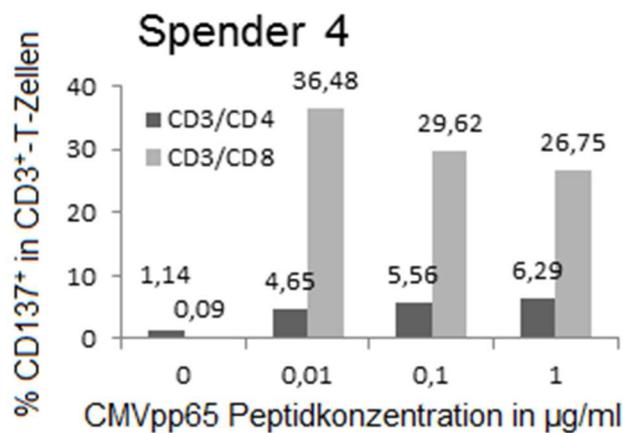


Abb. 3.2 CD137-Expression nach Stimulation mit CMVpp65-Peptid nach spezifischer Expansion

Darstellung der CD137-Expression nach 14 Tagen spezifischer Expansion nach Peptidrestimulation

Auf der x-Achse sind die verschiedenen Konzentrationen des CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptids eingetragen, mit denen die Zellen stimuliert wurden. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der CD137⁺-T-Zellen an CD3⁺/CD4⁺-Lymphozyten (dunkelgrau) bzw. CD3⁺/CD8⁺-Lymphozyten (hellgrau) abzulesen.

Wie zu erwarten zeigten die CD4⁺-T-Lymphozyten durchweg eine deutlich geringere CD137-Expression als die CD8⁺-T-Lymphozyten.

Die Induktion der CD137-Expression zeigt unter den CD8⁺-T-Zellen teilweise sehr deutliche teilweise nur geringe Unterschiede in Abhängigkeit von der CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptidkonzentration. Jede der drei verwendeten Konzentrationsstufen war als Ursache der maximalen induzierten CD137-Expression bei verschiedenen Spendern zu finden. Die Induktion von CD137 in CD8⁺-T-Zellen durch das CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid ist also individuell sehr unterschiedlich.

Unter den CD4⁺-T-Zellen waren bei keinem Spender deutliche Unterschiede in der CD137-Expression im Hinblick auf die verschiedenen CMVpp65-Peptidkonzentrationen, die zur Stimulation verwendet wurden, fest zu stellen.

3.2.3 Selektive Anreicherung CMVpp65-spezifischer CD8⁺-T-Lymphozyten

Nach der spezifischen Expansion wurden die CMVpp65-spezifischen T-Zellen mit einem CD137-spezifischem Selektionsverfahren angereichert, um eine möglichst hohe Frequenz an CMVpp65-spezifischen T-Zellen für den abschließenden Zytotoxizitätstest zu gewinnen.

Dazu wurden die Kulturzellen mit der zuvor ermittelten optimalen Konzentration an CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid restimuliert. Anschließend wurden die Zellen, die aktiviert wurden und CD137 auf ihrer Oberfläche trugen, markiert und selektiert. Das Verfahren ist detailliert unter 2.2.8 beschrieben.

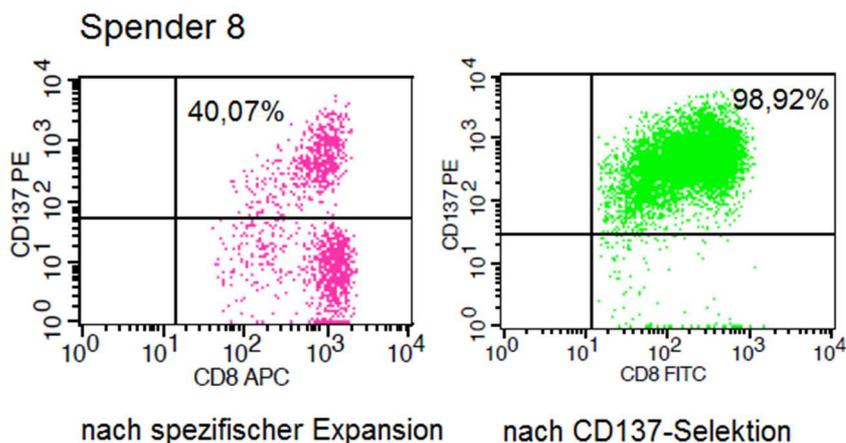


Abb. 3.3 CMVpp65-spezifische CD8⁺-T-Zellen vor und nach der CD137-Selektion

Ein Teil der Kulturzellen wurden nach 10 Tagen spezifischer Expansion mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid restimuliert. In den „Dot Blots“ (pink) ist die CD137-Expression der CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit 1,0µg/ml dargestellt. An Tag 15 wurden alle Kulturzellen mit dem CMVpp65-Peptid restimuliert und die CD137-spezifische magnetische Zellseparation durchgeführt. Die im Rahmen dessen PE-markierten und selektierten CD137⁺-Zellen sind in „Dot Blots“ (grün) dargestellt.

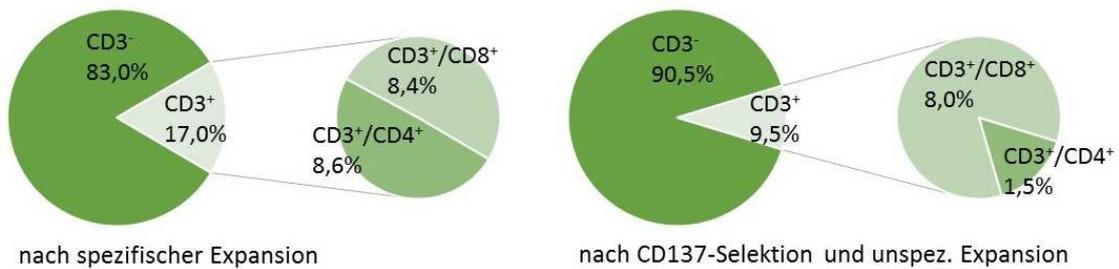
Auf der x-Achse werden die APC- bzw. FITC-markierten CD8⁺-T-Zellen dargestellt. Auf der y-Achse werden die PE-markierten CD137⁺-Zellen dargestellt. Die doppelt positiven befinden sich im oberen rechten Quadranten. Angegeben ist ihr prozentualer Anteil an den CD3⁺-Lymphozyten.

Die Anteile der CD137⁺-Zellen unter den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen lagen nach der Selektion zwischen 87,24% und 98,87%.

Die Zellen wurden anschließend weiter unspezifisch expandiert. Dafür wurden unter anderem einmalig bestrahlte Allopool-Fütterzellen hinzugegeben. Das genaue Protokoll ist unter 2.2.9 zu finden. Danach wurde erneut die Aktivierbarkeit mittels Messung der CD137-Expression nach Restimulierung mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid gemessen (s. 2.2.7).

Spender 7

prozentualer Anteil der jeweiligen Zellpopulation an der Gesamtzellzahl



prozentualer Anteil der jeweiligen Zellpopulation an den Lymphozyten

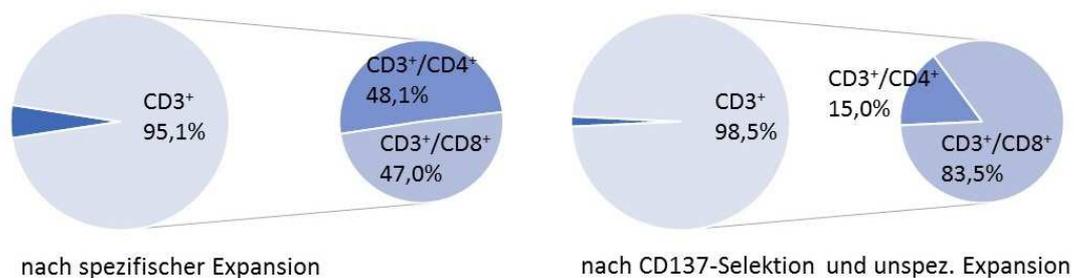


Abb 3.4.1 Verteilung der CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nach der spezifischen Expansion und nach der CD137-Selektion mit anschließender unspezifischer Expansion (Spender 7)

Die großen Kreisdiagramme stellen in der oberen Zeile die Gesamtzellzahl und in der unteren Zeile alle Lymphozyten zum darunter stehenden Zeitpunkt dar. Die kleinen Diagramme stellen alle CD3⁺-Zellen dar und zeigen die Verteilung von CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen. Alle Prozentangaben beziehen sich in der oberen Zeile auf die Gesamtzellzahl und in der

unteren auf die Lymphozyten. Die Daten stammen aus den Messungen, die nach Stimulation mit 0,1 µg/ml CMVpp65-Einzelpeptid zur Detektion der CD137-Expression erhoben wurden.

Tab. 3.2 Verteilung der CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen im Verlauf

		Prozentualer Anteil an der Gesamtzellzahl in %		Prozentualer Anteil an den Lymphozyten in %	
		nach spez. Expansion	nach CD137-Selektion und unspez. Expansion	nach spez. Expansion	nach CD137-Selektion und unspez. Expansion
Spender 1*	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	3,6	2,6	21,6	32,9
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	11,0	7,5	65,4	95,2
Spender 2	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	33,2	0,8	49,9	8,2
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	28,6	8,5	43,0	90,4
Spender 3	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	39,6	0,4	56,2	4,2
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	26,5	9,7	37,6	95,3
Spender 4	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	17,5	0,9	47,3	9,0
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	11,9	0,83	32,0	87,1
Spender 5	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	16,4	2,0	52,7	14,0
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	12,0	12,0	38,6	85,0
Spender 6	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	39,5	1,7	52,8	15,6
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	13,3	8,3	17,8	76,5
Spender 7	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	8,6	1,5	48,1	15,0
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	8,4	8,0	47,0	83,5
Spender 8	CD3 ⁺ /CD4 ⁺	5,3	5,7	36,6	60,3
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺	1,4	3,7	9,7	39,4
Spender 9	CD3 ⁺ /CD4 ⁺		0,8		49,0
	CD3 ⁺ /CD8 ⁺		0,6		37,4

Die Tabelle zeigt die Entwicklung der Anteile der CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzellzahl (3. und 4. Spalte) und den Lymphozyten (5. und 6. Spalte) zu zwei verschiedenen Zeitpunkten, und zwar nach spezifischer Expansion (3. und 5. Spalte) und nach anschließender CD137-Selektion und weiterer unspezifischer Selektion (4. und 6. Spalte). Die Daten stammen aus den Messungen, die nach Stimulation mit 0,1 µg/ml CMVpp65-Einzelpeptid zur Detektion der CD137-Expression erhoben wurden. *Für Spender 1 sind die Messergebnisse nach Stimulation mit 0,01µg/ml CMVpp65-Peptid dargestellt.

Im Falle des Spender 9 standen nach spezifischer Expansion nicht ausreichend Zellen zur Verfügung, um die erste Messung der CD137-Expression nach Stimulation mit dem CMVpp65-Peptid durchzuführen.

Die zwei Messungen der CD137-Expression nach Restimulation mit dem CMVpp65-Peptid nach der spezifischen Expansion und nach der CD137-Selektion und weiterer Expansion wurden ebenfalls genutzt, um die CD3⁺/CD8⁺-T-Zellzahlen im Vergleich zu den CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen zu beurteilen. Wie zu erwarten verlagerte sich im Verlauf der Kultivierung einschließlich der CD137-Selektion innerhalb der CD3⁺-Lymphozytenpopulation die Verteilung immer deutlicher zu Gunsten der CD8⁺ CTL. Während bei dem Großteil der Spender nach der spezifischen Expansion zunächst noch mehr CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen als CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen vorhanden waren, machten bei fast allen Spendern im Verlauf nach der CD137-Selektion und weiterer Expansion anschließend die CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen den größeren Anteil aus. Im Vergleich zum ersten Messzeitpunkt war der Anteil der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen an der Gesamtzellzahl zwar zum zweiten Messzeitpunkt bei fast allen Spendern geringer. Dafür war bei allen Spendern ihr Anteil an den Lymphozyten zum zweiten Messzeitpunkt deutlich größer. Zudem muss bedacht werden, dass beim zweiten Messzeitpunkt die Gesamtzellzahl auch noch vorhandene Allopool-Fütterzellen mit umfasst. Es zeigte sich, dass nach der CD137-Selektion und weiterer Expansion ein großer Teil der CTL CMV-spezifisch war und deren Anteil sich im Verlauf deutlich vergrößert hatte.

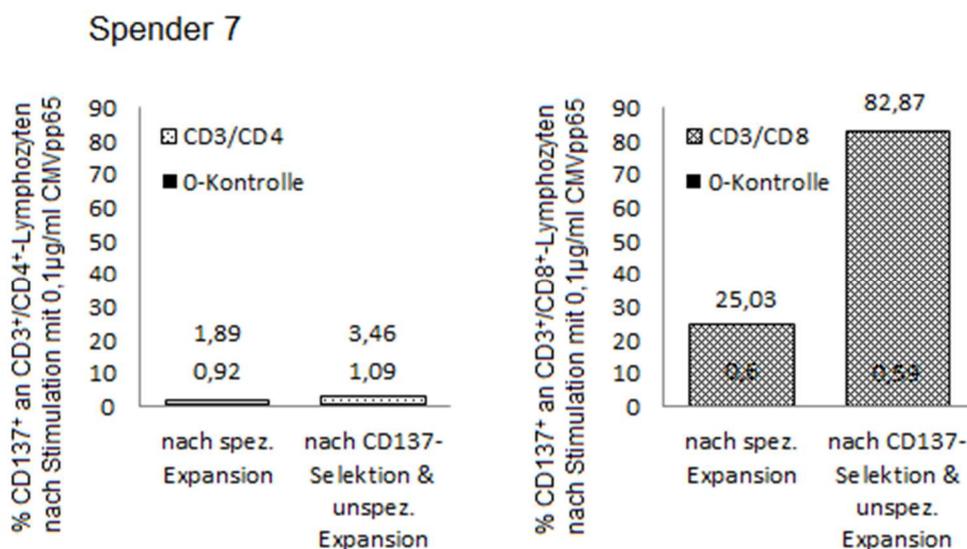


Abb. 3.4.2 CD137- Expression auf CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen im Verlauf (Spender 7)

Sowohl nach der spezifischen Expansion als auch nach CD137-Selektion und anschließender unspezifischer Expansion wurden ein Teil der Kulturzellen mit drei verschiedenen Konzentrationen des CMVpp65-Peptids restimuliert und anschließend die CD137-Expression sowie die der Oberflächenmarker CD3, CD4 und CD8 im Durchflusszytometer bestimmt. Dargestellt sind hier die Messergebnisse nach der Stimulation mit 0,1µg/ml CMVpp65-Peptid. Auf der y-Achse ist auf der linken Seite der Anteil der CD137⁺-Zellen an den CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen und auf der rechten Seite der Anteil der CD137⁺-Zellen an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen dargestellt. Auf der x-Achse ist der Zeitpunkt des Messergebnisses abzulesen. Den Säulen ist jeweils als schwarze Säule die zugehörige 0-Kontrolle vorgelagert. Die untere Zahl innerhalb oder oberhalb der Säule gibt den Wert der 0-Kontrolle an. Bei der 0-Kontrolle wurde kein Peptid hinzugefügt.

Tab. 3.3: CD137- Expression auf CD3⁺/CD4⁺- und CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen im Verlauf

	Prozentualer Anteil der CD137⁺-Zellen nach Stimulation mit 0,1µg/ml CMVpp65-Peptid in %			
	an den CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen		an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen	
	nach spez. Expansion	nach CD137-Selektion & unspez. Expansion	nach spez. Expansion	nach CD137-Selektion & unspez. Expansion
Spender 1*	6,35 (0,06)	73,98 (0,02)	78,67 (0,02)	81,20 (0,02)
Spender 2	1,55 (0,48)	21,24 (0,17)	3,91 (1,00)	90,76 (1,43)
Spender 3	1,49 (0,66)	4,75 (0,72)	3,04 (0,65)	82,06 (0,19)
Spender 4	5,56 (1,14)	3,85 (1,27)	29,62 (0,09)	85,43 (0,08)
Spender 5	0,69 (0,35)	17,82 (0,60)	9,94 (0,11)	79,37 (0,20)
Spender 6	0,98 (1,07)	3,82 (4,51)	1,21 (1,20)	89,78 (0,88)
Spender 7	1,89 (0,92)	3,46 (1,09)	25,03 (0,60)	82,87 (0,11)
Spender 8	3,06 (0,63)	1,40 (2,07)	38,62 (1,45)	73,52 (0,59)
Spender 9		4,27 (1,15)		72,82 (0,05)

Die Tabelle zeigt den Verlauf der CD137-Expression, welche durch Darbietung von 0,1µg/ml CMVpp65-Peptid stimuliert wurde, für die CD3⁺/CD4⁺-T-Zellen (Spalte 2 und 3) und die CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen (4. und 5. Spalte) – anhand zwei verschiedener Zeitpunkte: nach spezifischer Expansion (2. und 4. Spalte) und nach anschließender CD137-Selektion und weiterer unspezifischer Selektion (3. und 5. Spalte) * Für Spender 1 sind die Messergebnisse nach Stimulation mit 0,01µg/ml CMVpp65-Peptid dargestellt. In den Klammern befinden sich die Werte der 0-Kontrollen, d.h. die gemessene CD137-Expression – ohne Zugabe eines Peptids. Im Falle des Spender 9 standen nach spezifischer Expansion nicht ausreichend Zellen zu Verfügung,

um die erste Messung der CD137-Expression nach Stimulation mit dem CMVpp65-Peptid durchzuführen.

Es zeigte sich, dass ein Teil der CTL sowohl nach der spezifischen Expansion als auch nach der CD137-Selektion und weiterer Expansion CMVpp65-spezifisch war. Bei allen Spendern war – gemessen an der Aktivierbarkeit zur CD137-Expression – eine deutliche Zunahme der CMVpp65-spezifischen CTL sichtbar. In nahezu allen Fällen hatte keine Anreicherung der CMVpp65-spezifischen Helferzellen stattgefunden.

3.3 Generierung Dendritischer Zellen aus Monozyten

Aus den PBMC der Spender wurden mit einem CD14-spezifischen Selektionsverfahren (s. 2.2.10) Monozyten isoliert. Der Anteil der isolierten CD14⁺-Zellen lag zwischen 12 und 35%. Die Zellen wurden unter Zugabe von Zytokinen kultiviert (s. 2.2.10).

Es werden exemplarisch die Messergebnisse der Expressionsmuster der DC zweier Spender nach Generierung dargestellt.

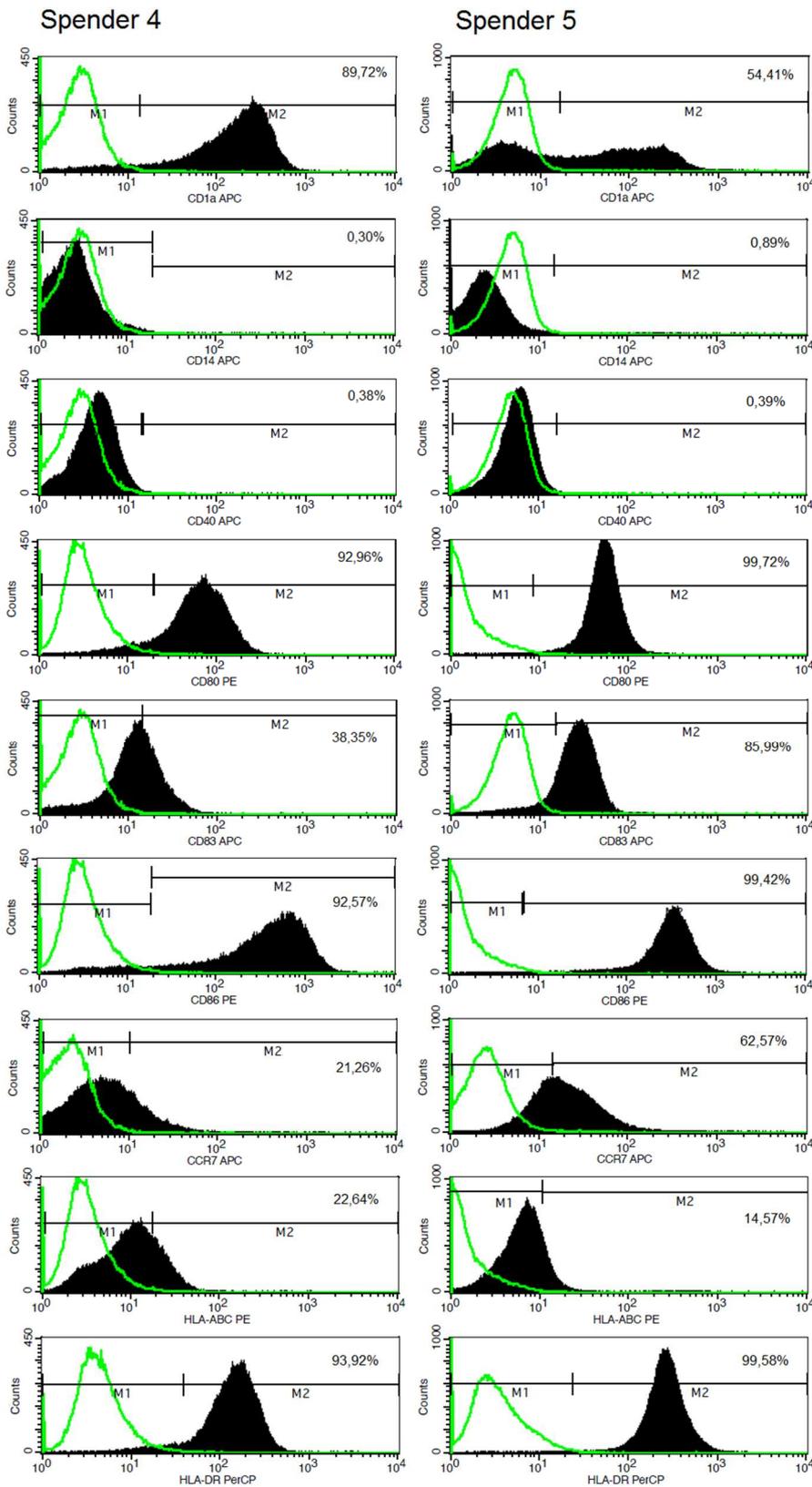


Abb. 3.5 Charakterisierung der dendritischen Zellen

Die DC wurden an Tag 9 (Spender 4) bzw. Tag 10 (Spender 5) auf ihre Expression der zuvor genannten Oberflächenmoleküle (s. 1.5) hin am Durchflusszytometer überprüft. Auf der x-Achse

wird die Fluoreszenzintensität und damit die Expression der Oberflächenmoleküle, mit denen die x-Achse jeweils beschriftet ist, dargestellt. Die y-Achse gibt die Zellanzahl (Counts) an. Verglichen werden die Populationen der DC (schwarz) mit den Isotyp-Kontrollen (grün), die mit Anti-IgG1-PE, Anti-IgG1-PerCP, Anti-IgG1-APC und Anti-IgG2a-APC gefärbt wurden. Die Prozentzahlen geben den Anteil der Zellen an, die das an der x-Achse stehende Oberflächenmolekül tragen.

Die beispielhafte Darstellung der Messergebnisse der Zellen von Spender 4 und von Spender 5 zeigen, dass die Generierung der DC aus Monozyten erfolgreich war. Die Zellen zeigten mit kleinen Ausnahmen das Expressionsmuster, welches bei reifen DC zu erwarten ist. Die Zellen beider Spender trugen nahezu kein CD14 mehr. Über 90% der Zellen beider Spender exprimierten HLA-DR und die Costimulatoren CD80 und CD86. CD1a, CD83 und HLA-ABC waren auf den Zelloberflächen beider Spender zu finden. Wider Erwarten exprimierten beide Spender nahezu kein CD40.

3.4 Spezifische Aktivierung CMVpp65-spezifischer T-Lymphozyten

3.4.1 IFN- γ - und CD107a-Produktion als Nachweis der Effektorfunktion von zytotoxischen T-Lymphozyten

CTL werden über die Bindung ihres TCR an einen spezifischen Peptid:MHC-Klasse-I-Molekül-Komplex zur Ausführung ihrer Effektorfunktion gebracht. Dazu zählt die Synthese und Freisetzung ihrer zytotoxischen Effektormoleküle Perforin, Granzyme und Granulysin sowie IFN- γ , TNF- α und Lymphotoxin- α .

IFN- γ vermag die Expression von MHC-Molekülen und damit auch die Präsentation von intrazellulären Pathogenen oder Viruspeptiden an Immunzellen zu erhöhen. Im Zusammenhang mit CTL ist vor allem auch die antivirale Wirkung von IFN- γ bedeutsam. IFN- γ hemmt die Virusreplikation und sorgt für die Elimination von Viren aus infizierten Zellen ohne diese dabei zu töten [80].

CD107a, welches auch als auch Lysosomen assoziiertes Membranprotein 1 (LAMP1) bezeichnet wird, dient als Degranulationsmarker und zeigt den Perforinverlust eines aktivierten CTL an. Perforin macht die Zielzelle durchlässig, sodass die zytotoxischen Moleküle eindringen und ihre Apoptose herbeiführen können. CD107a ist ein

Membranprotein der Lysosomen, die zytotoxische Granula enthalten. Wenn der Inhalt der Lysosomen freigegeben wird, wird die Lysosomenmembran inklusive CD107a an die Zelloberfläche verlagert. Wenn also CD107a auf der Oberfläche exprimiert wird, hat eine peptidspezifische zytotoxische Reaktion stattgefunden.

3.4.2 CMVpp65-spezifische T-Zellen zeigen Effektorfunktion nach Stimulation mit CMVpp65-Einzelpeptid und CMVpp65-Peptidpool

Nach der CD137-Selektion und Expansion mit Allopool-Fütterzellen wurde ein Test der CMVpp65-spezifischen T-Zellen erneut mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid stimuliert. Dies erfolgte, indem das Peptid direkt dem Ansatz hinzugefügt wurde und in einigen Fällen zusätzlich, indem den Zellen in einem separaten Ansatz das Peptid über DC präsentiert wurde. Außerdem wurde den Zellen in einem weiteren Ansatz der CMVpp65-Peptidpool ebenfalls über DC oder direkt präsentiert. Anschließend wurde die CD107a-Expression auf den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen und deren IFN- γ -Produktion gemessen. Die detaillierte Beschreibung ist unter 2.2.13 nach zu lesen. Die Tabelle 3.2 gibt eine Übersicht über diese Messergebnisse und die Abbildung 3.6. stellt diese graphisch exemplarisch anhand eines Spenders dar.

Tab.3.4: Anteil der Zellen mit IFN- γ -Produktion und CD107a-Expression an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen in %

Spender → Stimulation mit ↓	1 a	1 b	2	3	4	5	6	7	8	9
CMVpp65-Peptid ohne DC	74,5	29,0	67,3	74,4	85,9	81,2	79,7	84,9	51,0	68,7
CMVpp65-Peptid mit DC			75,6	77,3			64,8		48,9	
CMV-Peptidpool ohne DC								80,0		
CMV-Peptidpool mit DC		45,7	62,1	77,3	89,5	37,2	33,9		41,2	71,0

Der Prozentuale Anteil derjenigen Zellen, bei denen sowohl eine IFN- γ -Produktion als auch eine CD107a-Expression vorhanden war, an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen wird für Spender 1 bis 9

genannt. In den verschiedenen Zeilen ist abzulesen wie die Zellen zuvor stimuliert wurden, ob mit CMVpp65-Einzelpeptid oder CMVpp65-Peptidpool, ob mittels Präsentation über DC oder direkter Zugabe. Bei Spender 1 wurden mit den Zellen aus der gleichen Kultur zwei Versuchsdurchläufe des Zytotoxizitätstests ohne und mit DC durchgeführt (Spalte 1a und 1b).

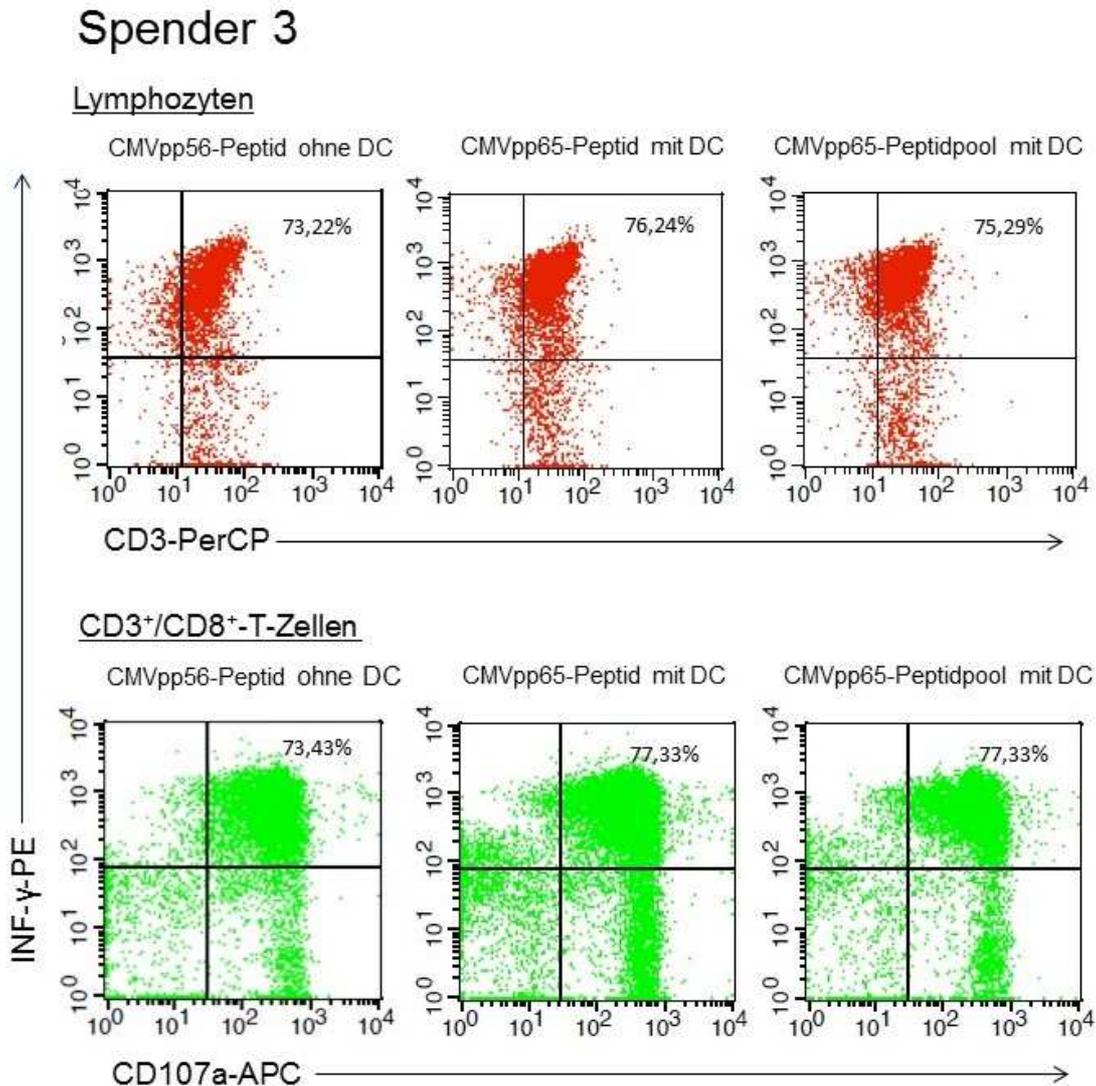


Abb. 3.6 CD3-Expression und IFN- γ -Produktion in Lymphozyten und CD107a-Expression und IFN- γ -Produktion in CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen jeweils nach Stimulation mit CMVpp65-Einzelpeptid und CMVpp65-Peptidpool

Die CMV-spezifischen Kulturzellen wurden nach der CD137-Selektion und Expansion mit Allopool-Fütterzellen mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid (jeweils linke Spalte), mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid über DC präsentiert (jeweils mittlere Spalte) und mit CMVpp65-Peptidpool über DC präsentiert (jeweils rechte Spalte) stimuliert. Anschließend wurden nach Färbung mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern die CD3-, CD8-, CD107a-Expression und die IFN- γ -Produktion der Zellen am Durchflusszytometer gemessen. Dargestellt

sind in der oberen Zeile die Lymphozyten und in der unteren die CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen. Auf der x-Achse sind die mit Anti-CD3-PerCP-Antikörpern (obere Zeile) bzw. Anti-CD107a-APC-Antikörpern (untere Zeile) markierten Zellen und auf der y-Achse die mit Anti-IFN- γ -PE-Antikörpern markierten Zellen dargestellt. Im oberen rechten Quadranten sind die doppelt positiven Zellen dargestellt und ihr prozentualer Anteil an den Lymphozyten (obere Zeile) bzw. an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen (untere Zeile) benannt.

Der Großteil der Lymphozyten produzierte nach CMVpp65-Einzelpeptid- und CMVpp65-Peptidpool-Stimulation IFN- γ und ist damit als CMVpp65-spezifisch zu bewerten. Betrachtet man die im Interesse dieser Arbeit stehenden CTL, zeigten diese bei allen Spendern sowohl eine deutliche CD107a-Expression als auch eine IFN- γ -Produktion als Reaktion auf die Darbietung des CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptids und des CMVpp65-Peptidpools. Das bedeutet, dass die Anreicherung funktionsfähiger CMVpp65-spezifischer T-Zellen erfolgreich war.

Vergleicht man die Ergebnisse der Einzelpeptidstimulation mit und ohne DC, stellt sich keine der beiden Methoden als die durchgehend erfolgreichere dar.

Im Vergleich dazu lagen in sieben von neun Fällen die Anteile der CD107a-exprimierenden und IFN- γ -produzierenden CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit dem CMVpp65-Peptidpool über DC jeweils nahe und wichen größtenteils nur zu kleinen Anteilen sowohl nach oben als auch nach unten ab (s. Tab. 3.4).

3.5 Kreuzreaktivität von CMVpp65-spezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten gegenüber Wilms-Tumor Protein 1

Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität wurden die Kulturzellen nach der CD137-Selektion und unspezifischer Expansion neben dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid ebenfalls mit dem WT1-(DFKDCERRF)-Einzelpeptid stimuliert und anschließend die CD107a-Expression und die IFN- γ -Produktion gemessen.

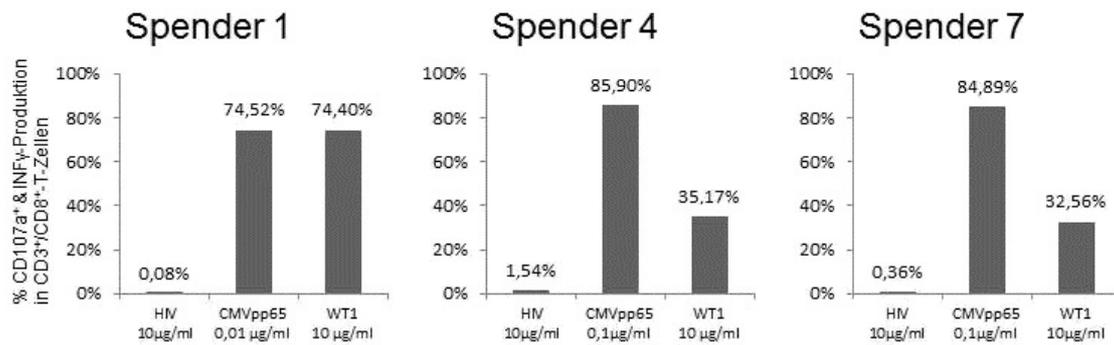


Abb. 3.7 CD107a-Expression und IFN- γ -Produktion in CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit CMVpp65- und WT1-Peptid

Die CMVpp65-spezifischen Kulturzellen wurden nach CD137-Selektion und unspezifischer Expansion mit 0,01 µg/ml (Spender 1) bzw. 0,1 µg/ml (Spender 4 und 7) CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid, 10 µg/ml WT1-(DFKDCERRF)-Peptid und 10 µg/ml HIV-(ILKEPVHGV)-Peptid als Negativ-Kontrolle stimuliert. Bei Spender 4 wurden das WT1-Peptid und das HIV-Peptid über DC dargeboten. Anschließend wurde die CD3-, CD8-, und die CD107a-Expression sowie die IFN- γ -Produktion mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper am Durchflusszytometer gemessen. Auf der x-Achse sind die Peptide mit der verwendeten Konzentration angegeben. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der doppelt positiven Zellen für CD107a-Expression und IFN- γ -Produktion an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen angegeben.

Bei den Kulturzellen dreier Spender konnte die Stimulation durch direkte Zugabe von WT1-(DFKDCERRF)-Peptid oder durch die Zugabe von WT1-präsentierenden DC bei einem großen Anteil der CTL eine Effektorfunktion (im Sinne von CD107a-Expression und IFN- γ -Produktion) ausgelöst werden. Vergleicht man hier die Zahl der CTL, die CMVpp65-spezifisch ihre zytotoxische Funktion entfalteten, mit denen, die dies WT1-spezifisch taten, ergibt sich eine gemeinsame Schnittmenge. Dies bedeutet, dass mindestens so viele Zellen wie die gemeinsame Schnittmenge ergibt, kreuzreaktiv sind und sowohl das CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid als auch das WT1-(DFKDCERRF)-Peptid spezifisch erkennen und daraufhin ihre zytotoxische Funktion entfalten.

Bei Spender 1 fiel dies sehr deutlich aus. 74,52% der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen zeigten nach Stimulation mit 0,01 µg/ml CMVpp65-Peptid und 74,40% der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen zeigten nach Stimulation mit 10 µg/ml WT1-Peptid zytotoxische Aktivität. Daraus resultiert eine gemeinsame Schnittmenge von 48,92% der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen. Bei Spender 4 und Spender 7 fiel dieser Anteil geringer aus. Die gemeinsame Schnittmenge

fiel bei Spender 4 mit 21,07% und bei Spender 7 mit 17,45% der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen aus.

Die in diesen Fällen festgestellte kreuzreaktive Erkennung bezieht sich ausschließlich auf das hier verwendete WT1-(DFKDCERRF)-Einzelveptid. Bei keinem der drei Spender zeigte sich nach Stimulation mit dem WT1-Peptidpool eine Effektorfunktion.

Die CMV-spezifischen Kulturzellen aller anderen Spender reagierten weder auf das WT1-Einzelveptid noch auf den WT1-Peptidpool, welche ihnen jeweils über DC präsentiert wurden. Die Anteile an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen, die CD107a exprimierten und IFN- γ produzierten, lagen nach Stimulation mit dem Einzelveptid lediglich zwischen 0,58% und 6,42%. Nach Stimulation mit dem Peptidpool lag dieser Anteil zwischen 0,03% und 1,54% und überstieg damit nicht einmal den Wert der Negativ-Kontrolle.

CMVpp65-spezifische T-Lymphozyten zeigen keine Effektorfunktion nach Stimulation mit weiteren tumorassoziierten Antigenen. Bei keinem der Spender zeigte sich nach Inkubation der CMVpp65-spezifischen T-Zellen mit den getesteten TAA bzw. TAA-Pools eine kreuzreaktive Erkennung. Die CMVpp65-spezifischen T-Zellen wurden nach der CD137-Selektion und unspezifischer Expansion mit den Einzelveptiden Bcl2 und Proteinase 3 sowie den Peptidpools MUC1, NY-ESO, PRAME und WT1 stimuliert (für die Sequenzen der Einzelveptide s. Tab. 2.4). In der Regel war weder eine IFN- γ -Produktion noch eine CD107a-Expression messbar. In den wenigen Fällen, in denen die IFN- γ -Produktion und die CD107a-Expression im Vergleich zur Negativ-Kontrolle leicht erhöht war, war jedoch nie eine gemeinsame Schnittmenge mit den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen vorhanden, die eine Kreuzreaktivität der CMVpp65-spezifischen T-Zellen sichert.

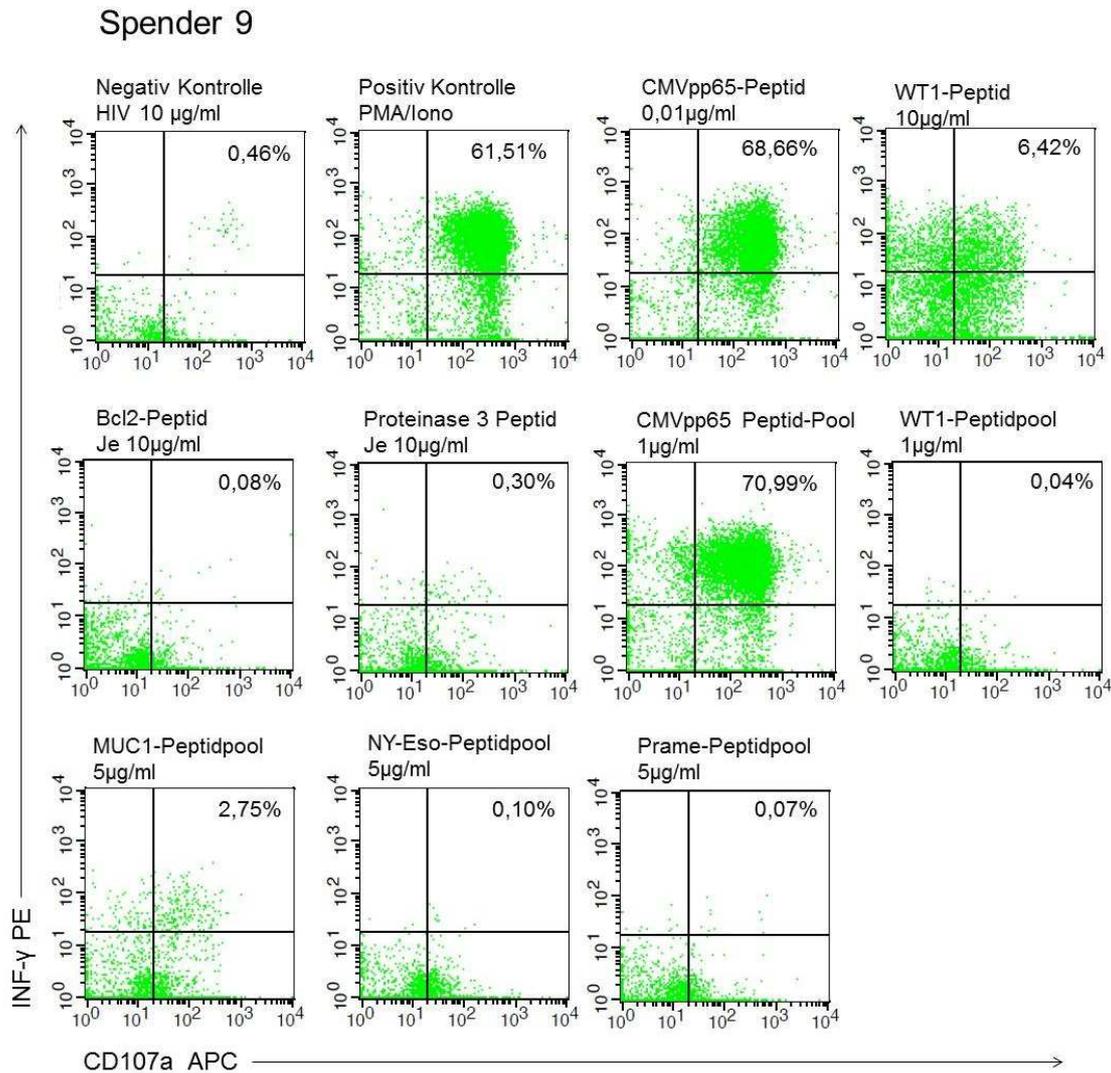


Abb. 3.8 CD107a-Expression und IFN- γ -Produktion in CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit CMVpp65-Peptid(pool) und TAA(-Pools)

Die CMVpp65-spezifischen T-Zellen wurden nach der CD137-Selektion und unspezifischer Expansion mit dem CMVpp65-Peptid und -Peptidpool sowie den TAA Bcl2, Proteinase 3, WT1, WT1-Pool, MUC1-Pool und PRAME-Pool stimuliert. Das HIV-Peptid diente als Negativ-Kontrolle. Die Stimulation mit PMA und Ionomycin stellte die Positiv-Kontrolle dar. PMA/Ionomycin und das CMVpp65-Peptid wurden direkt zu den Zellen gegeben. Alle anderen Peptide wurden in genannter Konzentration zu DC gegeben und diese wurden dann wiederum mit den CMVpp65-spezifischen T-Zellen inkubiert. Anschließend wurde die CD3-, CD8-, und die CD107a-Expression sowie die IFN- γ -Produktion mittels fluoreszenzmarkierter Antikörper am Durchflusszytometer gemessen. Die Graphik zeigt alle CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen. Auf der x-Achse ist die CD107a-Expression und auf der y-Achse ist die IFN- γ -Produktion dargestellt. Im oberen rechten Quadranten befinden sich die doppelt positiven Zellen und ihr prozentualer Anteil an den CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen ist benannt.

Insgesamt stand das Material von 281 gesunden Spendern zu Verfügung. Davon entsprachen 50 den Kriterien eines positiven CMV-Serostatus und HLA*A0201 positiv zu sein. Von diesen 50 begonnenen Versuchsabläufen konnten in neun Fällen erfolgreich CMVpp65-spezifische CTL expandiert und angereichert werden und in acht Fällen DC generiert werden, um den anschließenden Zytotoxizitätstest durch zu führen. In drei Fällen wurden kreuzreaktive CTL entdeckt, die sowohl das CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid als auch das WT1-(DFKDCERRF)-Peptid spezifisch erkennen.

4. Diskussion

Zur Erklärung des GvL-Effekts bei Patienten nach alloHSZT gibt es verschiedene Erklärungsmodelle, die bereits untersucht wurden.

In dieser Doktorarbeit wurde die immunologische Grundlage für den positiven Einfluss der CMV-Reaktivierung auf die Rezidivrate von Patienten nach alloHSZT untersucht. Konkret wurde die These geprüft, dass CMV-spezifische CTL einen GvL-Effekt hervorrufen, indem sie entsprechende TAA auf Leukämiezellen kreuzreaktiv erkennen und ihnen gegenüber ihre Zytotoxizität entfalten.

CMVpp65-spezifische CTL wurden expandiert und angereichert, um sie auf eine mögliche kreuzreaktive Erkennung und Funktion gegenüber verschiedenen TAA hin zu untersuchen. Wegweisend für diesen Ansatz war eine mehrfach beschriebene Assoziation von CMV-seropositivem Spender und/oder Empfänger [66; 69] bzw. CMV-Replikation nach HSZT [67; 68; 81–85] und einem niedrigerem Rückfallrisiko bei Leukämie- und Lymphompatienten nach alloHSZT.

Als zentrales Ergebnis dieser Doktorarbeit, lässt sich herausstellen, dass ein deutlicher Teil der CMVpp65-spezifischen CTL dreier Spender (Spender 1, 4 und 7) nach Stimulation mit dem WT1-Protein eine zytotoxische Effektorfunktion zeigte. Es wurde eine kreuzreaktive Erkennung von CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid und WT1-(DFKDCERRF)-Peptid durch CTL dieser drei Spender festgestellt, wobei bei einem Spender im Vergleich eine deutlich größere Menge an kreuzreaktiven CTL detektiert wurde. Um für die Beweisführung eine möglichst große Reinheit an CMVpp65-spezifischen CTL zu erreichen, wurden PBMC von gesunden, HLA-A*0201 positiven und CMV-seropositiven Spendern unter Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid und Zugabe der Zytokine IL2, IL7 und IL15 15-16 Tage kultiviert. Darauf folgte eine selektive Anreicherung der CMVpp65-spezifischen CTL, indem mittels magnetischer Zellseparation die Zellen isoliert wurden, die nach Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid das Oberflächenmolekül CD137 exprimierten. CD137 ist auf aktivierten T-Zellen zu finden, vor Allem auf den CD8⁺-T-Zellen. Anschließend wurden die CMVpp65-spezifischen T-Zellen für weitere 13-20 Tage unter einmaliger Zugabe von Allopool-Fütterzellen und PHA-L sowie unter regelmäßiger Zugabe der Zytokine IL2, IL7 und IL15 expandiert. Bei Spender 1 zeigten

sich nach der CD137-Selektion und weiterer unspezifischer Expansion 82% der CTL durch Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid reaktivierbar, indem sie CD137 exprimierten – bei Spender 4 taten dies 85% und bei Spender 7 83% der CTL. Abschließend wurde die Peptiderkennung und zytotoxische Effektorfunktion durch Messung der IFN- γ -Produktion und der CD107a-Expression bestimmt. IFN- γ ist eines der wichtigsten Effektormoleküle der CTL, welches diese nach Stimulation durch spezifische Bindung an ein Peptid über ihren TCR synthetisieren und freigeben. CD107a ist ein Molekül, der Lysosomenmembran und befindet sich erst dann an der Zelloberfläche des CTL, wenn dieser aktiv wurde und die Inhaltsstoffe der Lysosomen nach außen abgegeben hat und die Lysosomenmembran mit der Zellmembran verschmolzen ist. Ein positives Messergebnis beider Parameter zeigt dementsprechend an, dass die CTL nach spezifischer Peptidbindung in der Lage sind ihre Effektormoleküle zu produzieren und diese auch frei zu geben. Dies entspricht einem Nachweis der spezifischen Zytotoxizität. Dies traf bei Spender 1 nach der CD137-Selektion und weiterer Expansion auf 75% der CMVpp65-spezifischen CTL sowohl nach der Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid als auch dem WT1-(DFKDCERRF)-Peptid zu. Bei Spender 4 konnte nach Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid bei 86% und nach Stimulation WT1-(DFKDCERRF)-Peptid bei 35% der CTL eine spezifische Zytotoxizität nachgewiesen werden. Bei Spender 7 konnte nach Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid bei 85% und nach Stimulation WT1-(DFKDCERRF)-Peptid bei 33% der CTL eine spezifische Zytotoxizität nachgewiesen werden. Eine unspezifische Stimulation lässt sich dadurch ausschließen, dass eine Stimulation mit dem HIV-1-RT-(ILKEPVHGV)-Peptid bei Spender 1 nur bei 0,08%, bei Spender 4 bei 1,54% und bei Spender 7 bei 0,36% der CMVpp65-spezifischen CTL zu einer IFN- γ -Produktion und CD107a-Expression führte. Das verwendete WT1-(DFKDCERRF)-Peptid wurde mittels der Datenbank SYFPEITHI zwar als HLA-A*2402-restringiert berechnet. In Versuchen der Arbeitsgruppe wurde zufällig eine HLA-A*0201-assoziierte Präsentation nachgewiesen, weshalb dieses Peptid auch für die Versuche dieser im Kontext von HLA-A*0201 stehenden Arbeit verwendet wurde.

Der in dieser Arbeit erbrachte eindeutige Nachweis von drei kreuzreaktiven Spendern für das Viruspeptid CMVpp65 (NLVPMVATV) und das TAA WT1 (DFKDCERRF) ist

höchst interessant, da er einen möglichen GvL-Effekt von virusspezifischen CTL beschreibt, welcher bisher wenig Gegenstand von Untersuchungen war. Zudem ist dieses Ergebnis der Arbeit bedeutsam, wenn sich der beschriebene Mechanismus des GvL-Effekts im Rahmen von Stammzelltransplantationen zu Nutze gemacht werden kann. Ausführungen zu denkbaren Verfahren der klinischen Anwendung folgen an späterer Stelle. Allerdings müsste zur Validierung der Ergebnisse mit einer größeren Anzahl an Spendern eine Reproduktion der Ergebnisse gezeigt werden.

Die Wiederholung der Ergebnisse bei gleichem Spender konnte nicht getestet werden, da nicht ausreichend Material für einen weiteren kompletten Durchlauf des Versuchs zur Verfügung stand. Da es sich größtenteils um Material von anonymisierten Spendern handelte und deren Identifikation daher nicht möglich war, konnten also keine weiteren Zellen zur Wiederholung des Versuchs gewonnen werden. Im Falle eines identifizierbaren Spenders wünschte dieser keine weitere Spende.

Bei der Bewertung der Ergebnisse müssen auch die verwendeten Peptidkonzentrationen bedacht werden. Bei dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Peptid, als Vertreter der Viruspeptide, ist eine hohe Avidität von Seiten der T-Zellen zu erwarten [86]. So wurden hier zur Stimulation nur geringe Konzentrationen (0,01µg/ml, 0,1µg/ml und 1,0 µg/ml) eingesetzt. Während bei dem WT1-(DFKDCERRF)-Protein, als Vertreter der TAA, eine deutlich geringere Avidität der T-Zellen zu erwarten ist, wurde hier mit einer Konzentration von 10µg/ml gearbeitet [86]. Van den Heuvel et. al konnten in ihren Untersuchungen 2018 dagegen nur die Darbietung des Antigens als ausschlaggebenden Faktor für die Avidität der virusspezifischen T-Zellen ausmachen; der Vergleich einer virusspezifischen CTL zur kreuzreaktiven Erkennung eines Peptids oder des eigentlichen viralen Peptids machte keinen grundlegenden Unterschied [87]. Hinterfragt werden muss, ob die verwendete Konzentration des WT1-Peptids auch möglichen in vivo-Verhältnissen entspricht. Möglicherweise wäre die zytotoxische Reaktion bei einer höheren Konzentration des WT1-(DFKDCERRF)-Peptids bei den drei Spendern deutlicher ausgefallen oder überhaupt eine Effektorfunktion messbar gewesen bei den Spendern, die so keine zeigten. Bei den verwendeten Peptidpools muss ebenfalls hinterfragt werden, ob die verwendeten Konzentrationen nicht zu gering waren, um eine ausreichende Antwort der T-Zellen hervorzurufen. Eingesetzt wurden die Peptidpools in häufig verwendeten Konzentrationen von 1µg/ml, 5µg/ml oder 10µg/ml, somit lagen die Konzentrationen, der

darin enthaltenen Einzelpeptide noch deutlich unter der des WT1-(DFKDCERRF)-Peptids.

Des Weiteren muss die verwendete Peptidsequenz bedacht werden. Das WT-Peptid enthält nachweislich die hier verwendete Sequenz (DFKDCERRF). Allerdings gilt es zu prüfen, ob das WT1-Tumorprotein in vivo tatsächlich so prozessiert wird, dass diese Sequenz auch über MHC präsentiert wird. Somit würde - im Falle eines positiven Nachweises der Präsentation der genannten Peptidsequenz in vivo - dies eine Validierung der Ergebnisse dieser Arbeit darstellen. Für den Fall, dass die genannte Sequenz in vivo nicht exprimiert wird, würde dies bedeuten, dass in vitro beschriebene kreuzreaktive CTL sich in vivo nicht gegen Tumorzellen richten, die positiv für das getestete Tumorantigen sind. Andererseits bleibt somit noch eine Vielzahl an Peptiden, die hier nicht untersucht wurden und potenziell kreuzreaktiv von den CMVpp65-spezifischen T-Zellen erkannt werden könnten. Diese Tatsache wurde in der Arbeit insofern bedacht, dass neben Einzelpeptiden auch Peptid-Pools getestet wurden, welche verschiedene Peptidsequenzen eines Tumorantigens beinhalten.

Dass CTL einen GvL-Effekt vermitteln können, indem sie sich spezifisch gegen TAA richten, wurde schon mehrmals gezeigt [88; 45]. Rezvani et al. haben 2003 die Existenz von CTL, die sich gegen WT1, Pathogenesis related protein 1 (PR1) und BCR-ABL richten, anhand desselben Markers IFN- γ , aber mit einem sensitiveren Messverfahren als der Durchflusszytometrie nämlich der quantitativen PCR nachgewiesen [46].

Kapp et. al haben 2009 gezeigt, dass das Vorhandensein von TAA-spezifischen CTL mit einer signifikant niedrigeren Rezidivrate bei AML-/ALL-/MM-Patienten nach HSZT einhergeht [47]. In beiden Arbeiten ließen sich Unterschiede zwischen Gesunden und Patienten nach alloHSZT erkennen. So konnten Kapp et al. in Patienten nach alloHSZT TAA-spezifische CTL nachweisen; in gesunden Spendern dagegen nicht, sie ließen sich allerdings durch mehrmalige TAA-Präsentation und -Stimulation über DC induzieren. Rezvani et al. haben in Gesunden entweder keine TAA-spezifischen CTL oder in geringerer Frequenz gemessen. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden nur Zellen von gesunden Spendern untersucht. Interessant wäre auch für diesen Versuchsaufbau zum Vergleich die PBMC von Patienten nach alloHSZT zu verwenden. Zum einen wäre es möglich, dass eine höhere Frequenz an CMV-spezifischen CTL vorläge [89; 90]. Zum

anderen könnte ein Vergleich der Frequenz an kreuzreaktiven CMV-spezifischen CTL gezogen werden.

Im Falle der Viruspeptide ist noch zu erwähnen, dass in Leukämiezellen im Vergleich zu Zellen gesunder Spender deutlich höhere CMV-Lasten auftreten können und verbliebene Blasten so möglicherweise ein prominenteres Ziel für die CMV-spezifischen CTL darstellen [71].

Die Theorie, dass den GvL-Effekt insbesondere die virusspezifischen bzw. CMV-spezifischen CTL, die mit TAA kreuzreagieren, vermitteln können, wurde bisher wenig untersucht. Melenhorst et al. haben 2014 beschrieben, dass in einem stammzelltransplantiertem ALL-Patienten der Anstieg von CMVpp65-spezifischen CTL, die vom Spender generiert und dem Patienten verabreicht wurden, zeitlich mit dem Rückgang der Tumorzellen bis zur Remission korrelierte. In vitro ließ sich eine spezifische Reaktion der CMV-spezifischen T-Zellen gegenüber der TAA WT1 und MAGEA3 zeigen. Dementsprechend schien der antileukämische Effekt durch die CMV-spezifischen T-Zellen des Spenders vermittelt worden zu sein [70].

E. Baumeister konnte 2014 in ihrer Arbeit zeigen, dass allogene CMV-IE-spezifische CTL über ihren TCR kreuzreaktiv das TAA Bcl-2 erkennen und die entsprechende Zielzelle lysieren können [91]. Die als Zielzellen dienenden B-Lymphoblasten (C1R-B7) und Myelom-Zelllinien (L363 und U266) wurden mit einem Fluoreszenz markierten Vitalfarbstoff gefärbt, sodass die Lyse über die Abnahme der Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen werden konnte.

Auf molekularer Ebene sind diese Ergebnisse noch nicht beschrieben. Zur weiteren Beweisführung müssten die TCR der beschriebenen kreuzreaktiven CMV-spezifischen CTL analysiert werden, um zu belegen, dass ein und derselbe T-Zell-Klon das CMV-Peptid und das TAA im Kontext von HLA-B*0702 spezifisch bindet. Jeder T-Zell-Klon hat eine spezifische Konstellation der VDJ-Segmente seines Rezeptors, die die Bausteine ihrer zwei Ketten darstellen (s. 1.4). Yin und Mariazza haben 2009 einen Überblick über verschiedene Theorien zum Mechanismus der kreuzreaktiven Bindung von Peptiden durch T-Zellen zusammengestellt (s. 1.4) [20]. Darunter fällt unter anderem die „molekular mimikry“ (s.1.4). McDonald et al. haben 2009 einen kreuzreaktiven TCR beschrieben, der sowohl ein Eigen-HLA-restringiertes EBV-Peptid als auch ein Allo-Peptid spezifisch bindet [24].

Daneben gibt es weitere denkbare Mechanismen, die ebenfalls CTL für einen GvL-Effekt verantwortlich machen. So könnten die CTL nur mHag oder virale Antigene, die (nur) auf den Leukämie- bzw. Tumorzellen exprimiert werden, als Zielstruktur der CTL fungieren. mHag sind an MHC-Moleküle gebundene Peptide, die aus zelleigenen Proteinen stammen. Der GvL-Effekt würde unabhängig von der GvHD auftreten, wenn die mHag nur auf den hämatopoetischen Zellen des Empfängers sitzen und von den alloreaktiven CTL des Empfängers erkannt werden. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass mHag-spezifische CTL mit einem GvL-Effekt assoziiert sind. So haben de Rijke et al. 2005 und Marijt et al. 2003 bei MM- und Leukämie-Patienten nach alloHSZT, die bei einem Rezidiv mit Transfusion von Spender-Lymphozyten (donor lymphocyte infusion, DLI) behandelt wurden, einen Zusammenhang der kompletten Remission der Erkrankung und dem Auftreten von mHag-spezifischen CTL beschrieben. Die entsprechenden mHag wurden lediglich auf hämatopoetischen Zellen der Empfänger exprimiert [92; 93]. Franssen et al. haben in ihrer 2017 veröffentlichten Phase I/II Studie gezeigt, dass es möglich ist, in MM-Patienten nach alloHSZT mHag-spezifische CTL zu generieren. Die zu Grunde liegende Methode war eine Impfung mit peptidbeladenen DC, welche aus den Monozyten der Spender generiert wurden. Zusätzlich erfolgte zuvor und danach eine DLI. Die entstandenen CTL haben als Zielstruktur mHag, die hämatopoetisch-restringiert und tumorassoziiert sind [94].

Die Fragestellung dieser Doktorarbeit beruht auf der mehrfach beschriebenen Assoziation von CMV-seropositivem Spender und/oder Empfänger [66; 69] bzw. CMV-Replikation nach HSZT [67; 68; 81–85] und einem niedrigerem Rückfallrisiko bei Leukämiepatienten nach alloHSZT. Demgegenüber stehen Ergebnisse von Erard et al. 2006 und der 2001 veröffentlichten Untersuchungen des National Marrow Donor Programms, die keinen signifikanten Zusammenhang von dem CMV-Status des Spenders und der Rezidivrate oder Mortalität zeigen konnten [95; 96]. Der Zusammenhang von CMV-Reaktivierung und Rezidivrate oder Mortalität wurde dort nicht untersucht.

Der Gedanke für die Anwendung in der Klinik besteht darin, die kreuzreaktiven CMV-spezifischen CTL im Rahmen einer HSZT dafür zu nutzen den GvL-Effekt zu verstärken und damit das Rezidivrisiko der Grunderkrankung zu senken ohne das GvHD-Risiko zu erhöhen oder Komplikationen einer CMV-Infektion zu riskieren.

Der einfachste grundlegendste Schritt wäre einen CMV-positiven Spender zu wählen, damit nach Anwachsen des Transplantats und Neubildung der T-Zellen CMV-spezifische CTL im Körper des Patienten vorhanden sind – allerdings müsste immer noch das Risiko der CMV- Infektion bedacht werden.

Möchte man gezielt die Zahl der CMV-spezifischen CTL im Empfängerorganismus erhöhen, sind verschiedene Mechanismen denkbar, wobei in den meisten Fällen ein CMV-positiver Spender als Voraussetzung gegeben sein muss.

Zum einen könnte man vom Spender Lymphozyten entnehmen, um daraus CMV-spezifische CTL zu selektieren oder ex vivo zu expandieren und diese dem Empfänger zu transfundieren. Diese Verfahren wurde bereits erprobt zur Verbesserung der Therapie einer CMV-Infektion in Patienten nach HSZT [97; 98]. Zweitens könnte man die CMV-spezifischen T-Gedächtniszellen des HSZ-Transplantierten in vivo boosten. Dabei ist möglicherweise die Verwendung von CMV-Peptid-beladenen DC hilfreich [99]. Drittens wäre eine Kombination von DLI mit der Transfusion von CMV-Peptid-beladenen DC denkbar. Diese Form der Impfung wurde bereits verwendet, indem hämatopoetisch restringierte mHag-Peptide über DC präsentiert wurden [94]. Allerdings muss bedacht werden, dass mit einer unselektierten DLI das GvHD-Risiko steigt [100].

5. Zusammenfassung

Bei Patienten mit Erkrankungen des blutbildenden Systems ist die hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSZT) eine häufig eingesetzte kurative Therapie. Im Rahmen dieser Transplantation werden nicht nur vom Spender gewonnene hämatopoetische Stammzellen auf den Empfänger übertragen, sondern immer auch im peripheren Blut vorhandene T-Zellen. Dies kann zum einen einen positiven Effekt zum anderen aber auch negative Folgen für den transplantierten Patienten mit sich bringen. Eine negative Auswirkung wäre die sogenannte Graft-versus-Host Disease (GvHD), bei der die T-Zellen des Spenders Zellen des Empfängers als fremd erkennen und angreifen. Klinisch manifestiert sich dies vor allem an Leber, Haut und Darm mit Ikterus, Dermatitisen und Diarrhoen. Einen gewünschten Effekt, den die übertragenen T-Zellen vor allem bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) mit sich bringen können, ist der sogenannte Graft-versus-Leukemia (GvL) Effekt. Dabei richten sich vom Spender stammende Immunzellen gegen die Tumorzellen des Empfängers und senken damit das Rezidivrisiko der Leukämie.

In verschiedenen Studien konnte eine positive Korrelation von CMV-Reaktivierung nach HSZT und einem niedrigerem Rezidivrisiko der hämatopoetischen Grunderkrankung gezeigt werden. Diese Doktorarbeit widmet sich auf Grundlage dessen der Frage, ob Cytomegalievirus (CMV)-spezifische cytotoxische T-Zellen (CTL) direkt durch Kreuzreaktivität zum GvL-Effekt beitragen.

Zunächst wurden periphere mononukleäre Zellen (PBMC) aus dem Blut neun gesunder Spender isoliert, die als CMV-seropositiv ausgetestet wurden. Diese wurden mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelperptid stimuliert und in Kultur angereichert. Zusätzlich wurden die expandierten CMV-spezifischen CTL durch eine spezifische Selektion über den Aktivierungsmarker CD137 weiter angereichert. Nach Expansion und Anreicherung zeigten jeweils 75% (Spender 1), 67% (Spender 2), 74% (Spender 3), 86% (Spender 4), 81% (Spender 5), 80% (Spender 6), 84% (Spender 7), 51% (Spender 8) und 69% (Spender 9) der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen eine IFN- γ -Produktion und CD107a-Expression nach Stimulation mit dem CMVpp65-Einzelperptid. IFN- γ als Effektormolekül der zytotoxischen Granula der CTL und CD107a als Degranulationsmarker beweisen die spezifische Zytotoxizität. Somit konnte die

erfolgreiche Anreicherung funktionsfähiger CMVpp65-spezifischer CTL gezeigt werden. Um zu untersuchen, ob diese nun kreuzreaktiv tumorassoziierte Antigene (TAA) erkennen, wurden sie ebenfalls mit folgenden TAA stimuliert: WT1, Proteinase 3, PRAME, NY-ESO, Muc1 und Bcl-2. Die Stimulation erfolgte entweder über die direkte Zugabe von Einzelpeptiden bzw. Peptidpools oder über die Beladung und Präsentation dieser Peptide bzw. Peptidpools über dendritische Zellen (DC). Die DC wurden aus Monozyten des jeweiligen Spenders generiert. Im Falle von drei Spendern zeigt sich ebenfalls eine deutliche zytotoxische Funktion nach Stimulation mit dem WT1-(DFKDCERRF)-Einzelpeptid durch IFN- γ -Produktion und CD107a-Expression bei 75% (Spender 1), 35% (Spender 4) und 33% (Spender 7) der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen. Wie zuvor erwähnt lag der Anteil der CD3⁺/CD8⁺-T-Zellen mit spezifischer Zytotoxizität nach Stimulation mit dem CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid bei diesen drei besagten Spendern bei 74% (Spender1), 86% (Spender 4) und 84% (Spender7). So ergab sich für diese drei Spender eine gemeinsame Schnittmenge von 48,92% (Spender 1), 21,07% (Spender 4) und 17,45% (Spender 7) derjenigen Zellen, die sowohl nach Stimulation mit CMVpp65-(NLVPMVATV)-Einzelpeptid und WT-(DFKDCERRF)-Einzelpeptid eine zytotoxische Funktion zeigten, sodass von einer kreuzreaktiven Erkennung dieser beiden Peptide in diesen drei Spendern ausgegangen werden muss. Die für diese Spender gezeigte kreuzreaktive Erkennung könnte zum GvL-Effekt bei Leukämie/Myelom-Patienten nach HSZT beitragen.

6. Abkürzungen

AML	Akute myeloische Leukämie
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APC	Allophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
Bcl-2	B-Zell-Lymphom 2
CD	Cluster of Differentiation
CDR	Complementary Determining Region
CML	Chronische myeloische Leukämie
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
HCMV	humanes Cytomegalievirus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CTL	Cytotoxic T-Lymphocyt, Zytotoxischer T-Lymphocyt
D	divers
DC	dendritic cells, Dendritische Zellen
DLI	Donor Lymphocyte Infusion, Spenderlymphocyten-Infusion
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
EBV	Ebstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
G(M)-CSF	Granulozyten-(Monozyten)-Kolonie-stimulierender Faktor
GvHD	Graft versus Host Disease, Transplantat gegen Wirt-Erkrankung
GvL	Graft versus Leucemia, Transplantat gegen Leukämie
HLA	Human Leucocyte Antigen, humanes Leukozyten Antigen
HSZT	hämatopoetische Stammzelltransplantation
IL	Interleukin
IFN	Interferon
J	joining, verbindend
LRSC	Leucoreduction system chamber, Leukozyten-Reduktionskammer
mHag	minor histocompatibility antigen, Nebenhistokompatibilitätsantigen

MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MAGEA3	Melanoma Associated Antigen 3
MHC	Major Histocompatibility Complex
MUC1	Mucin-1
NK-Zellen	Natürliche-Killer-Zellen
NY-ESO	New York esophageal squamous cell carcinoma
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll
PHA-L	Phytohaemagglutinin Leucoagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pp65	Phosphoprotein 65
PRAME	Preferentially Expressed Antigen in Melanoma
PR3	Proteinase 3
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
TAA	tumorassozierte Antigene
TCR	T-Cell Receptor, T-Zell-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
V	variable
WT1-Protein	Wilms Tumor Protein 1
WT1-Gen	Wilms-Tumorsuppressergen

7. Literaturverzeichnis

- 1 DAUSSET, J. (1958) "Iso-leuco-anticorps". *Acta haematologica*. (20) 1-4 :156–166
- 2 Parker, D. C. (1993) "T cell-dependent B cell activation". *Annual review of immunology*. (11) :331–360
- 3 Gemsa, Diethard; Vorlaender, Karl Otto; Albert, Ekkehard (1997) "Immunologie". Kapitel: Immungenetik. Thieme
- 4 Madden, D. R. (1995) "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes". *Annual review of immunology*. (13) :587–622
- 5 Zinkernagel, R. M.; Doherty, P. C. (1974) "Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system". *Nature*. (248) 5450 :701–702
- 6 Morrison, L. A.; Lukacher, A. E.; Braciale, V. L.; Fan, D. P.; Braciale, T. J. (1986) "Differences in antigen presentation to MHC class I-and class II-restricted influenza virus-specific cytolytic T lymphocyte clones". *The Journal of experimental medicine*. (163) 4 :903–921
- 7 Cresswell, P. (1994) "Assembly, transport, and function of MHC class II molecules". *Annual review of immunology*. (12) :259–293
- 8 Woodland, R.; Cantor, H. (1978) "Idiotype-specific T helper cells are required to induce idiotype-positive B memory cells to secrete antibody". *European journal of immunology*. (8) 8 :600–606
- 9 Stout, R. D.; Bottomly, K. (1989) "Antigen-specific activation of effector macrophages by IFN-gamma producing (TH1) T cell clones. Failure of IL-4-producing (TH2) T cell clones to activate effector function in macrophages". *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. (142) 3 :760–765
- 10 den Haan, J. M.; Lehar, S. M.; Bevan, M. J. (2000) "CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo". *The Journal of experimental medicine*. (192) 12 :1685–1696
- 11 Rudd, C. E. (1996) "Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function". *Immunity*. (4) 6 :527–534
- 12 Lindstein, T.; June, C. H.; Ledbetter, J. A.; Stella, G.; Thompson, C. B. (1989) "Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway". *Science (New York, N.Y.)*. (244) 4902 :339–343
- 13 Henkart, P. A. (1994) "Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules". *Immunity*. (1) 5 :343–346

- 14 Suchin, E. J.; Langmuir, P. B.; Palmer, E.; Sayegh, M. H.; Wells, A. D.; Turka, L. A. (2001) "Quantifying the Frequency of Alloreactive T Cells In Vivo: New Answers to an Old Question". *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950). (166) 2 :973–981
- 15 Lindahl, K. F.; Wilson, D. B. (1977) "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. I. Estimates of the absolute frequency of killer cells generated in vitro". *The Journal of experimental medicine*. (145) 3 :500–507
- 16 Nesić, D.; Marić, M.; Santori, F. R.; Vukmanović, S. (2002) "Factors influencing the patterns of T lymphocyte allorecognition". *Transplantation*. (73) 5 :797–803
- 17 D'Orsogna, L. J. A.; Roelen, D. L.; Doxiadis, I. I. N.; Claas, F. H. J. (2010) "Alloreactivity from human viral specific memory T-cells". *Transplant immunology*. (23) 4 :149–155
- 18 Mason, D. (1998) "A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor". *Immunology today*. (19) 9 :395–404
- 19 Bentley, G. A.; Mariuzza, R. A. (1996) "The structure of the T cell antigen receptor". *Annual review of immunology*. (14) :563–590
- 20 Yin, Y.; Mariuzza, R. A. (2009) "The multiple mechanisms of T cell receptor cross-reactivity". *Immunity*. (31) 6 :849–851
- 21 Mazza, C.; Auphan-Anezin, N.; Gregoire, C.; Guimezanes, A.; Kellenberger, C.; Roussel, A.; Kearney, A.; van der Merwe, P. Anton; Schmitt-Verhulst, A.-M.; Malissen, B. (2007) "How much can a T-cell antigen receptor adapt to structurally distinct antigenic peptides?". *The EMBO journal*. (26) 7 :1972–1983
- 22 Colf, L. A.; Bankovich, A. J.; Hanick, N. A.; Bowerman, N. A.; Jones, L. L.; Kranz, D. M.; Garcia, K. Christopher (2007) "How a single T cell receptor recognizes both self and foreign MHC". *Cell*. (129) 1 :135–146
- 23 Li, Y.; Huang, Y.; Lue, J.; Quandt, J. A.; Martin, R.; Mariuzza, R. A. (2005) "Structure of a human autoimmune TCR bound to a myelin basic protein self-peptide and a multiple sclerosis-associated MHC class II molecule". *The EMBO journal*. (24) 17 :2968–2979
- 24 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. J.; Crawford, F.; Stadinsky, B.; Jackson, D.; Brooks, A. G.; Purcell, A. W.; Kappler, J. W.; Burrows, S. R.; Rossjohn, J.; McCluskey, J. (2009) "T cell allorecognition via molecular mimicry". *Immunity*. (31) 6 :897–908
- 25 Borbulevych, O. Y.; Piepenbrink, K. H.; Gloor, B. E.; Scott, D. R.; Sommese, R. F.; Cole, D. K.; Sewell, A. K.; Baker, B. M. (2009) "T cell receptor cross-reactivity directed by antigen-dependent tuning of peptide-MHC molecular flexibility". *Immunity*. (31) 6 :885–896
- 26 Steinman, R. M. (1991) "The dendritic cell system and its role in immunogenicity". *Annual review of immunology*. (9) :271–296

- 27 Janeway, Charles; Travers, Paul; Hunt, Simon; Beginnen, Kurt (1997) "Immunologie". Kapitel: "7. Die T-Zellvermittelte Immunität". Spektrum Akad. Verl.
- 28 Liu, K.; Nussenzweig, M. C. (2010) "Origin and development of dendritic cells". *Immunological reviews.* (234) 1 :45–54
- 29 Dilioglou, S.; Cruse, J. M.; Lewis, R. E. (2003) "Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells". *Experimental and molecular pathology.* (75) 3 :217–227
- 30 Sureda, A.; Bader, P.; Cesaro, S.; Dreger, P.; Duarte, R. F.; Dufour, C.; Falkenburg, J. H. F.; Farge-Bancel, D.; Gennery, A.; Kröger, N.; Lanza, F.; Marsh, J. C.; Nagler, A.; Peters, C.; Velardi, A.; Mohty, M.; Madrigal, A. (2015) "Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015". *Bone marrow transplantation.* (50) 8 :1037–1056
- 31 Kröger, N.; Burchert, A.; Niederwieser, D.; Schmid, C.; Wulf, G. (2016) "DAG-KBT Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation von der Deutschen Arbeitsgemeinschaft für Knochenmark- und Blutstamzelltransplantation"
- 32 Deotare, U.; Al-Dawsari, G.; Couban, S.; Lipton, J. H. (2015) "G-CSF-primed bone marrow as a source of stem cells for allografting: revisiting the concept". *Bone marrow transplantation.* (50) 9 :1150–1156
- 33 Hamilton, B. K.; Bolwell, B.; Kalaycio, M.; Rybicki, L.; Hanna, R.; Sobecks, R.; Pohlman, B.; Andresen, S.; Dean, R.; Duong, H.; Hill, B.; Copelan, E. (2013) "Long-term follow-up of a prospective randomized trial comparing CYA and MTX with CYA and mycophenolate mofetil for GVHD prophylaxis in myeloablative sibling donor hematopoietic cell transplantation". *Bone marrow transplantation.* (48) 12 :1578–1580
- 34 Cutler, C.; Logan, B.; Nakamura, R.; Johnston, L.; Choi, S.; Porter, D.; Hogan, W. J.; Pasquini, M.; MacMillan, M. L.; Hsu, J. W.; Waller, E. K.; Grupp, S.; McCarthy, P.; Wu, J.; Hu, Z.-H.; Carter, S. L.; Horowitz, M. M.; Antin, J. H. (2014) "Tacrolimus/sirolimus vs tacrolimus/methotrexate as GVHD prophylaxis after matched, related donor allogeneic HCT". *Blood.* (124) 8 :1372–1377
- 35 Arbeitskreis Blut des Bundesministeriums für Gesundheit (2000) "Humanes Cytomegalovirus (HCMV) Humanes Cytomegalovirus (HCMV) Stellungnahmen des Arbeitskreises Blut des Bundesministeriums für Gesundheit". *Bundesgesundheitsblatt* 70 :653–659
- 36 Gratwohl, A.; Hermans, J.; Apperley, J.; Arcese, W.; Bacigalupo, A.; Bandini, G.; Di Bartolomeo, P.; Boogaerts, M.; Bosi, A.; Carreras, E. (1995) "Acute graft-versus-host disease: grade and outcome in patients with chronic myelogenous leukemia. Working Party Chronic Leukemia of the European Group for Blood and Marrow Transplantation". *Blood.* (86) 2 :813–818
- 37 Cutler, C.; Giri, S.; Jeyapalan, S.; Paniagua, D.; Viswanathan, A.; Antin, J. H. (2001) "Acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic peripheral-blood stem-cell and

bone marrow transplantation: a meta-analysis". *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. (19) 16 :3685–3691

38 Lee, S. J.; Vogelsang, G.; Flowers, M. E. D. (2003) "Chronic graft-versus-host disease". *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. (9) 4 :215–233

39 Flowers, M. E.; Pepe, M. S.; Longton, G.; Doney, K. C.; Monroe, D.; Witherspoon, R. P.; Sullivan, K. M.; Storb, R. (1990) "Previous donor pregnancy as a risk factor for acute graft-versus-host disease in patients with aplastic anaemia treated by allogeneic marrow transplantation". *British journal of haematology*. (74) 4 :492–496

40 Clift, R. A.; Buckner, C. D.; Appelbaum, F. R.; Bearman, S. I.; Petersen, F. B.; Fisher, L. D.; Anasetti, C.; Beatty, P.; Bensinger, W. I.; Doney, K. (1990) "Allogeneic marrow transplantation in patients with acute myeloid leukemia in first remission: a randomized trial of two irradiation regimens". *Blood*. (76) 9 :1867–1871

41 Champlin, R.; Ho, W.; Gajewski, J.; Feig, S.; Burnison, M.; Holley, G.; Greenberg, P.; Lee, K.; Schmid, I.; Giorgi, J. (1990) "Selective depletion of CD8+ T lymphocytes for prevention of graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation". *Blood*. (76) 2 :418–423

42 Ferrara, J. L. M.; Levine, J. E.; Reddy, P.; Holler, E. (2009) "Graft-versus-host disease". *The Lancet*. (373) 9674 :1550–1561

43 Jacobsohn, D. A.; Vogelsang, G. B. (2007) "Acute graft versus host disease". *Orphanet journal of rare diseases*. (2) :35

44 Lee, S. J.; Klein, J. P.; Barrett, A. John; Ringden, O.; Antin, J. H.; Cahn, J.-Y.; Carabasi, M. H.; Gale, R. Peter; Giralt, S.; Hale, G. A.; Ilhan, O.; McCarthy, P. L.; Socie, G.; Verdonck, L. F.; Weisdorf, D. J.; Horowitz, M. M. (2002) "Severity of chronic graft-versus-host disease: association with treatment-related mortality and relapse". *Blood*. (100) 2 :406–414

45 Molldrem, J. J.; Lee, P. P.; Wang, C.; Felio, K.; Kantarjian, H. M.; Champlin, R. E.; Davis, M. M. (2000) "Evidence that specific T lymphocytes may participate in the elimination of chronic myelogenous leukemia". *Nature medicine*. (6) 9 :1018–1023

46 Rezvani, K.; Grube, M.; Brenchley, J. M.; Sconocchia, G.; Fujiwara, H.; Price, D. A.; Gostick, E.; Yamada, K.; Melenhorst, J.; Childs, R.; Hensel, N.; Douek, D. C.; Barrett, A. John (2003) "Functional leukemia-associated antigen-specific memory CD8+ T cells exist in healthy individuals and in patients with chronic myelogenous leukemia before and after stem cell transplantation". *Blood*. (102) 8 :2892–2900

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

- 48 Mutis, T.; Verdijk, R.; Schrama, E.; Esendam, B.; Brand, A.; Goulmy, E. (1999) "Feasibility of immunotherapy of relapsed leukemia with ex vivo-generated cytotoxic T lymphocytes specific for hematopoietic system-restricted minor histocompatibility antigens". *Blood*. (93) 7 :2336–2341
- 49 Apperley, J. F.; Jones, L.; Hale, G.; Waldmann, H.; Hows, J.; Rombos, Y.; Tsatalas, C.; Marcus, R. E.; Goolden, A. W.; Gordon-Smith, E. C. (1986) "Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukaemia: T-cell depletion with Campath-1 reduces the incidence of graft-versus-host disease but may increase the risk of leukaemic relapse". *Bone marrow transplantation*. (1) 1 :53–66
- 50 Maggs, L.; Kinsella, F.; Chan, Y. L. Tracey; Eldershaw, S.; Murray, D.; Nunnick, J.; Bird, J.; Craddock, C.; Zuo, J.; Malladi, R.; Moss, P. (2017) "The number of CD56dim NK cells in the graft has a major impact on risk of disease relapse following allo-HSCT". *Blood advances*. (1) 19 :1589–1597
- 51 Lamberson, H. V.; Dock, N. L. (1992) "Prevention of transfusion-transmitted cytomegalovirus infection". *Transfusion*. (32) 3 :196–198
- 52 Mocaski ES jr. (1994) "Cytomegaloviruses". Webster RG, Granoff A (eds.): *Encyclopedia of Virology Volume 1*. London Academic Press :292
- 53 Taylor, G. H. (2003) "Cytomegalovirus". *American family physician*. (67) 3 :519–524
- 54 Taylor-Wiedeman, J.; Sissons, J. G.; Borysiewicz, L. K.; Sinclair, J. H. (1991) "Monocytes are a major site of persistence of human cytomegalovirus in peripheral blood mononuclear cells". *The Journal of general virology*. (72 (Pt 9) :2059–2064
- 55 Zhuravskaya, T.; Maciejewski, J. P.; Netski, D. M.; Bruening, E.; Mackintosh, F. R.; St Jeor, S. (1997) "Spread of human cytomegalovirus (HCMV) after infection of human hematopoietic progenitor cells: model of HCMV latency". *Blood*. (90) 6 :2482–2491
- 56 Brown, H. L.; Abernathy, M. P. (1998) "Cytomegalovirus infection". *Seminars in perinatology*. (22) 4 :260–266
- 57 Ljungman, P.; Perez-Bercoff, L.; Jonsson, J.; Avetisyan, G.; Sparrelid, E.; Aschan, J.; Barkholt, L.; Larsson, K.; Winiarski, J.; Yun, Z.; Ringdén, O. (2006) "Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation". *Haematologica*. (91) 1 :78–83
- 58 Einsele, H.; Hebart, H.; Kauffmann-Schneider, C.; Sinzger, C.; Jahn, G.; Bader, P.; Klingebiel, T.; Dietz, K.; Löffler, J.; Bokemeyer, C.; Müller, C. A.; Kanz, L. (2000) "Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection". *Bone marrow transplantation*. (25) 7 :757–763
- 59 Martino, R.; Rovira, M.; Carreras, E.; Solano, C.; Jorge, S.; La Rubia, J. de; Caballero, M. D.; Oteyza, J. P. de; Zuazu, J.; Moraleda, J. M.; Ojeda, E.; Ferrá, C.; Serrano, D.; La Cámara, R. de; Urbano-Ispizua, A.; Brunet, S. (2001) "Severe infections after allogeneic

peripheral blood stem cell transplantation: a matched-pair comparison of unmanipulated and CD34+ cell-selected transplantation". *Haematologica*. (86) 10 :1075–1086

60 Walker, C. M.; van Burik, J.-A. H.; For, T. E. de; Weisdorf, D. J. (2007)

"Cytomegalovirus infection after allogeneic transplantation: comparison of cord blood with peripheral blood and marrow graft sources". *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. (13) 9 :1106–1115

61 Ljungman, P.; Aschan, J.; Lewensohn-Fuchs, I.; Carlens, S.; Larsson, K.; Lönnqvist, B.; Mattsson, J.; Sparrelid, E.; Winiarski, J.; Ringdén, O. (1998) "Results of different strategies for reducing cytomegalovirus-associated mortality in allogeneic stem cell transplant recipients". *Transplantation*. (66) 10 :1330–1334

62 La Cámara, R. de (2016) "CMV in Hematopoietic Stem Cell Transplantation". *Mediterranean journal of hematology and infectious diseases*. (8) 1 :e2016031

63 Dziedzic, M.; Sadowska-Krawczenko, I.; Styczynski, J. (2017) "Risk Factors for Cytomegalovirus Infection After Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation in Malignancies: Proposal for Classification". *Anticancer research*. (37) 12 :6551–6556

64 Foster, A. E.; Gottlieb, D. J.; Sartor, M.; Hertzberg, M. S.; Bradstock, K. F. (2002) "Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation". *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. (8) 9 :501–511

65 Amir, A. L.; D'Orsogna, L. J. A.; Roelen, D. L.; van Loenen, M. M.; Hagedoorn, R. S.; Boer, R. de; van der Hoorn, M. A. W. G.; Kester, M. G. D.; Doxiadis, I. I. N.; Falkenburg, J. H. Frederik; Claas, F. H. J.; Heemskerk, M. H. M. (2010) "Allo-HLA reactivity of virus-specific memory T cells is common". *Blood*. (115) 15 :3146–3157

66 Nachbaur, D.; Clausen, J.; Kircher, B. (2006) "Donor cytomegalovirus seropositivity and the risk of leukemic relapse after reduced-intensity transplants". *European journal of haematology*. (76) 5 :414–419

67 Elmaagacli, A. H.; Steckel, N. K.; Koldehoff, M.; Hegerfeldt, Y.; Trenchel, R.; Ditschkowski, M.; Christoph, S.; Gromke, T.; Kordelas, L.; Ottinger, H. D.; Ross, R. S.; Horn, P. A.; Schnittger, S.; Beelen, D. W. (2011) "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*. (118) 5 :1402–1412

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

69 Behrendt, C. E.; Rosenthal, J.; Bolotin, E.; Nakamura, R.; Zaia, J.; Forman, S. J. (2009) "Donor and recipient CMV serostatus and outcome of pediatric allogeneic HSCT for acute leukemia in the era of CMV-preemptive therapy". *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. (15) 1 :54–60

- 70 Melenhorst, J. J.; Castillo, P.; Hanley, P. J.; Keller, M. D.; Krance, R. A.; Margolin, J.; Leen, A. M.; Heslop, H. E.; Barrett, A. John; Rooney, C. M.; Bollard, C. M. (2015) "Graft versus leukemia response without graft-versus-host disease elicited by adoptively transferred multivirus-specific T-cells". *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. (23) 1 :179–183
- 71 Hermouet, S.; Sutton, C. A.; Rose, T. M.; Greenblatt, R. J.; Corre, I.; Garand, R.; Neves, A. M.; Bataille, R.; Casey, J. W. (2003) "Qualitative and quantitative analysis of human herpesviruses in chronic and acute B cell lymphocytic leukemia and in multiple myeloma". *Leukemia*. (17) 1 :185–195
- 72 Erlach, K. C.; Podlech, J.; Rojan, A.; Reddehase, M. J. (2002) "Tumor Control in a Model of Bone Marrow Transplantation and Acute Liver-Infiltrating B-Cell Lymphoma: an Unpredicted Novel Function of Cytomegalovirus". *Journal of Virology*. (76) 6 :2857–2870
- 73 Chao, D. T.; Korsmeyer, S. J. (1998) "BCL-2 family: regulators of cell death". *Annual review of immunology*. (16) :395–419
- 74 Stroopinsky, D.; Rajabi, H.; Nahas, M.; Rosenblatt, J.; Rahimian, M.; Pyzer, A.; Tagde, A.; Kharbanda, A.; Jain, S.; Kufe, T.; Leaf, R. K.; Anastasiadou, E.; Bar-Natan, M.; Orr, S.; Coll, M. D.; Palmer, K.; Ephraim, A.; Cole, L.; Washington, A.; Kufe, D.; Avigan, D. (2018) "MUC1-C drives myeloid leukaemogenesis and resistance to treatment by a survivin-mediated mechanism". *Journal of cellular and molecular medicine*
- 75 Atanackovic, D.; Arfsten, J.; Cao, Y.; Gnjatic, S.; Schnieders, F.; Bartels, K.; Schilling, G.; Faltz, C.; Wolschke, C.; Dierlamm, J.; Ritter, G.; Eiermann, T.; Hossfeld, D. Kurt; Zander, A. R.; Jungbluth, A. A.; Old, L. J.; Bokemeyer, C.; Kröger, N. (2007) "Cancer-testis antigens are commonly expressed in multiple myeloma and induce systemic immunity following allogeneic stem cell transplantation". *Blood*. (109) 3 :1103–1112
- 76 Xu, Y.; Yue, Q.; Wei, H.; Pan, G. (2015) "PRAME induces apoptosis and inhibits proliferation of leukemic cells in vitro and in vivo". *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*. (8) 11 :14549–14555
- 77 PRTN3 proteinase 3 [Homo sapiens (human)]. NCBI National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5657>. 12-Oct-2019
- 78 Vidovic, K.; Ullmark, T.; Rosberg, B.; Lennartsson, A.; Olofsson, T.; Nilsson, B.; Gullberg, U. (2013) "Leukemia associated mutant Wilms' tumor gene 1 protein promotes expansion of human hematopoietic progenitor cells". *Leukemia research*. (37) 10 :1341–1349
- 79 WT1 WT1 transcription factor [Homo sapiens (human)]. NCBI National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7490>. 14-Oct-2019
- 80 Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T.; Hume, D. A. (2004) "Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions". *Journal of leukocyte biology*. (75) 2 :163–189
- 81 Takenaka, K.; Nishida, T.; Asano-Mori, Y.; Oshima, K.; Ohashi, K.; Mori, T.; Kanamori, H.; Miyamura, K.; Kato, C.; Kobayashi, N.; Uchida, N.; Nakamae, H.; Ichinohe, T.;

Morishima, Y.; Suzuki, R.; Yamaguchi, T.; Fukuda, T. (2015) "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". *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*. (21) 11 :2008–2016

82 Bao, X.; Zhu, Q.; Xue, S.; Hu, X.; Ma, X.; Chen, F.; Chen, S.; Sun, A.; Wu, D.; Yu, J.; Wu, X.; Qiu, H. (2016) "Cytomegalovirus induces strong antileukemic effect in acute myeloid leukemia patients following sibling HSCT without ATG-containing regimen". *American Journal of Translational Research*. (8) 2 :653–661

83 Koldehoff, M.; Ross, S. R.; Dührsen, U.; Beelen, D. W.; Elmaagacli, A. H. (2017) "Early CMV-replication after allogeneic stem cell transplantation is associated with a reduced relapse risk in lymphoma". *Leukemia & lymphoma*. (58) 4 :822–833

84 Hilal, T.; Peterson, S.; Bodine, C.; Slone, S. A.; Hildebrandt, G.; Gul, Z. (2016) "Evaluation of cytomegalovirus (CMV) reactivation, relapse, and survival after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT) using two T cell depletion strategies". *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. (34) 15_suppl :7047

85 Kim, D. Hwan; Won, D. Il; Lee, N. Young; Sohn, S. Kyun; Baek, J. Ho; Kim, J. Gwang; Suh, J. Soo; Lee, K. Bo (2006) "Survival benefit of asymptomatic cytomegalovirus reactivation after HLA-identical allogeneic peripheral blood stem cell transplantation". *Transplantation*. (81) 1 :101–108

86 Aleksic, M.; Liddy, N.; Molloy, P. E.; Pumphrey, N.; Vuidepot, A.; Chang, K.-M.; Jakobsen, B. K. (2012) "Different affinity windows for virus and cancer-specific T-cell receptors: implications for therapeutic strategies". *European journal of immunology*. (42) 12 :3174–3179

87 van den Heuvel, H.; Heutinck, K. M.; van der Meer-Prins, E. M. W.; Franke-van Dijk, M. E. I.; van Miert, P. P. M. C.; Zhang, X.; Berge, I. J. M. ten; Claas, F. H. J. (2018) "The avidity of cross-reactive virus-specific T cells for their viral and allogeneic epitopes is variable and depends on epitope expression". *Human immunology*. (79) 1 :39–50

88 Yotnda, P.; Firat, H.; Garcia-Pons, F.; Garcia, Z.; Gourru, G.; Vernant, J. P.; Lemonnier, F. A.; Leblond, V.; Langlade-Demoyen, P. (1998) "Cytotoxic T cell response against the chimeric p210 BCR-ABL protein in patients with chronic myelogenous leukemia". *The Journal of clinical investigation*. (101) 10 :2290–2296

89 Cwynarski, K.; Ainsworth, J.; Cobbold, M.; Wagner, S.; Mahendra, P.; Apperley, J.; Goldman, J.; Craddock, C.; Moss, P. A. (2001) "Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation". *Blood*. (97) 5 :1232–1240

90 Lilleri, D.; Gerna, G.; Fornara, C.; Lozza, L.; Maccario, R.; Locatelli, F. (2006) "Prospective simultaneous quantification of human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+

T-cell reconstitution in young recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants". *Blood*. (108) 4 :1406–1412

- 91 Baumeister, E. (2014) "Untersuchungen zur Reaktivität von Virus- und Tumorspezifischen T-Zellen in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation"
- 92 Rijke, B. de; van Horssen-Zoetbrood, A.; Beekman, J. M.; Otterud, B.; Maas, F.; Woestenenk, R.; Kester, M.; Leppert, M.; Schattenberg, A. V.; Witte, T. de; van de Wiel-van Kemenade, E.; Dolstra, H. (2005) "A frameshift polymorphism in P2X5 elicits an allogeneic cytotoxic T lymphocyte response associated with remission of chronic myeloid leukemia". *The Journal of clinical investigation*. (115) 12 :3506–3516
- 93 Marijt, W. A. Erik; Heemskerk, M. H. M.; Kloosterboer, F. M.; Goulmy, E.; Kester, M. G. D.; van der Hoorn, M. A. W. G.; van Luxemburg-Heys, S. A. P.; Hoogeboom, M.; Mutis, T.; Drijfhout, J. Wouter; van Rood, J. J.; Willemze, R.; Falkenburg, J. H. Frederik (2003) "Hematopoiesis-restricted minor histocompatibility antigens HA-1- or HA-2-specific T cells can induce complete remissions of relapsed leukemia". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. (100) 5 :2742–2747
- 94 Franssen, L. E.; Roeven, M. W. H.; Hobo, W.; Doorn, R.; Oostvogels, R.; Falkenburg, J. H. F.; van de Donk, N. W.; Kester, M. G. D.; Fredrix, H.; Westinga, K.; Slaper-Cortenbach, I.; Spierings, E.; Kersten, M. J.; Dolstra, H.; Mutis, T.; Schaap, N.; Lokhorst, H. M. (2017) "A phase I/II minor histocompatibility antigen-loaded dendritic cell vaccination trial to safely improve the efficacy of donor lymphocyte infusions in myeloma". *Bone marrow transplantation*. (52) 10 :1378–1383
- 95 Erard, V.; Guthrie, K. A.; Riddell, S.; Boeckh, M. (2006) "Impact of HLA A2 and cytomegalovirus serostatus on outcomes in patients with leukemia following matched-sibling myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation". *Haematologica*. (91) 10 :1377–1383
- 96 Kollman, C.; Howe, C. W.; Anasetti, C.; Antin, J. H.; Davies, S. M.; Filipovich, A. H.; Hegland, J.; Kamani, N.; Kernan, N. A.; King, R.; Ratanatharathorn, V.; Weisdorf, D.; Confer, D. L. (2001) "Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age". *Blood*. (98) 7 :2043–2051
- 97 Xu, Z.; Huang, X.; Sun, Y.; Wang, F.; Yan, C.; Zhang, X.; Han, W.; Chen, Y.; Wang, J.; Chen, H.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Liu, K.; Xu, L. (2015) "Cytomegalovirus specific cytotoxic T lymphocytes for treatment of refractory cytomegalovirus infection in patients following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation". *Zhonghua nei ke za zhi*. (54) 2 :101–105
- 98 Blyth, E.; Clancy, L.; Simms, R.; Ma, C. K. K.; Burgess, J.; Deo, S.; Byth, K.; Dubosq, M.-C.; Shaw, P. J.; Micklethwaite, K. P.; Gottlieb, D. J. (2013) "Donor-derived CMV-specific T cells reduce the requirement for CMV-directed pharmacotherapy after allogeneic stem cell transplantation". *Blood*. (121) 18 :3745–3758
- 99 Badovinac, V. P.; Messingham, K. A. N.; Jabbari, A.; Haring, J. S.; Harty, J. T. (2005) "Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination". *Nature medicine*. (11) 7 :748–756

100 Scarisbrick, J. J.; Dignan, F. L.; Tulpule, S.; Gupta, E. D.; Kolade, S.; Shaw, B.; Evison, F.; Shah, G.; Tholouli, E.; Mufti, G.; Pagliuca, A.; Malladi, R.; Raj, K. (2015) "A multicentre UK study of GVHD following DLI: rates of GVHD are high but mortality from GVHD is infrequent". Bone marrow transplantation. (50) 1 :62–67

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater PD Dr. Götz Ulrich Grigoleit bedanken, dafür dass er mir die Anfertigung dieser Arbeit in seiner Arbeitsgruppe mit einem spannenden Thema ermöglichte sowie für inhaltliche Anregung und Diskussion, die Betreuung und Korrektur der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich dem Team der Arbeitsgemeinschaft Grigoleit mit Elke Baumeister, Anne Nehmer und Carolin Köchel danken, die mir bei der Einarbeitung in die Labormethoden geholfen haben und immer ein offenes Ohr sowohl bei methodischen als auch inhaltlichen Fragen für mich hatten. Danke auch an Katharina Merker für die kollegiale Zusammenarbeit. Ich habe die herzliche und freundliche Atmosphäre im Team immer sehr geschätzt.

Herrn Prof. Dr. Matthias Eyrich danke ich ebenfalls für die Korrektur meiner Arbeit.

Ein großes Dankeschön gilt allen Spendern und Spenderinnen, die diese Arbeit erst ermöglichten.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Kirsten und Dieter Weiß sehr, die mir das Studium ermöglichten und mich bei allen Vorhaben wie auch dieser Promotion immer unterstützen. Ebenso bin ich dankbar für jeden Form von Unterstützung und Begleitung, die ich von meinem Freund, meinen Freunden und Freundinnen während der praktischen Arbeit und dem Verfassen der schriftlichen Arbeit erhalten habe.