

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
genehmigte Dissertation

Gewinnung antigenspezifischer T-Zellen zum adoptiven Immuntransfer am Beispiel der Cytomegalievirusinfektion

von
Dipl.-Biol. Sylvia Borchers
geboren am 26. Oktober 1978 in Hannover

2008

Diese Arbeit wurde vom BMBF gefördert, Förderkennzeichen PTJ-BIO 0313425. Sie entstand in der Zeit vom August 2004 bis zum Februar 2008 in der Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation sowie im Institut für Biophysikalische Chemie an der Medizinischen Hochschule Hannover in Kooperation mit der Firma Cytonet.

Datum der Promotion: 26. September 2008

Disputation

Prüfungsvorsitz: Prof. Dr. Dr. R.G. Berger

1. Prüfer (Biochemie): Prof. Dr. J. Alves

2. Prüfer (Immunologie): Prof. Dr. K. Resch

3. Prüfer (Virologie): Prof. Dr. M. Messerle

Dissertation

Referent: Prof. Dr. Jürgen Alves, Institut für Biophysikalische Chemie, MHH

Korreferent: Prof. Dr. Klaus Resch, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, MHH

Unverzagt

3.

*Wo du stehst, grab tief hinein!
Drunten ist die Quelle!
Lass die dunklen Männer schrein:
"Stets ist drunten - Hölle!"*

Friedrich Nietzsche - Die fröhliche Wissenschaft

Danksagungen

Diese Arbeit entstand in der Zeit vom August 2004 bis zum Februar 2008 in der Abteilung Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und Stammzelltransplantation sowie im Institut für Biophysikalische Chemie an der MHH.

Zunächst möchte ich an dieser Stelle Prof. Arnold Ganser meinen Dank aussprechen. Ich konnte durch die Anstellung in der Abteilung nicht nur fachlich, sondern auch menschlich viel dazulernen, der enge Zusammenschluss von Klinik und Forschung motiviert und macht die Arbeit immer spannend. Vielen Dank auch an Prof. Bernd Hertenstein, der zu Beginn meine Arbeit mit betreut hat, für die Überlassung des spannenden Themas.

Desweiteren danke ich meinen Betreuern, Prof. Eva Maria Mischak-Weissinger und Prof. Jürgen Alves, ganz herzlich für die Begleitung meiner Arbeit, für ihre ständige Gesprächsbereitschaft, für die hilfreiche Kritik, ihren ansteckenden Optimismus und für das Vorantreiben dieser Arbeit. Außerdem danke ich Prof. Alves und Prof. Resch für die Erstellung der Gutachten.

Unserem Kooperationspartner, der Firma Cytonet (Hannover) unter Leitung von Dr. Lubomir Arseniev, und den dort am Projekt beteiligten Mitarbeitern, Carsten Griesel und Angelika Stucki, danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Meinen Kolleginnen und Kollegen sowie ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus der KMT-Ambulanz - ganz besonders Dr. Tanja Momot, Marion Heuer und Jana König - danke ich für das gute Arbeitsklima, ihre Hilfsbereitschaft und das produktive Miteinander. Desweiteren danke ich Marion Heuer für die Einarbeitung in die Zellkultur und DC-Generierung. Bei Susanne Luther und Birgit Grabow möchte ich mich außerdem für die zahlreichen Tetramermessungen bedanken, die sie in die tägliche Routine integriert haben, sowie für die gewissenhafte Pflege der zugehörigen Datenbank. Meinen Kolleginnen und Kollegen vom Institut für Biophysikalische Chemie, insbesondere Sarah Heissler, Rolf Mull-Grotfend und Hella Scharnhorst, danke ich für die freundliche Aufnahme als "Gastarbeiter", ihre unkomplizierte Art, sowie die theoretische und praktische Unterstützung.

Zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden danken, die immer an mich geglaubt und mich jahrelang unterstützt haben. Ohne die Hilfe meiner Eltern, Elvira und Heinrich Borchers, und auch Großeltern hätte ich es nie soweit gebracht, ihnen ist diese Arbeit gewidmet. Ganz besonders danke ich auch meinem Lebensgefährten Oliver Grünzel für seine Unterstützung und Geduld, wenn der Arbeitsfrust doch mal mit nach Hause gekommen ist – was Dank der guten Betreuung und des angenehmen Arbeitsklimas zum Glück selten der Fall war.

Zusammenfassung

Die Arbeit "Gewinnung antigenspezifischer T-Zellen zum adoptiven Immuntransfer am Beispiel der Cytomegalievirusinfektion" befasst sich mit der Herstellung, Austestung und dem therapeutischen Einsatz antigenspezifischer T-Zellen. Sie hatte die Etablierung eines Testverfahrens zur Patientenauswahl und -überwachung, die Austestung und Optimierung des Zytokinsekretionstests (im Labormaßstab), die Definition von Qualitätsmerkmalen für die aufgereinigten Zellen und die Etablierung geeigneter Tests für eine Umsetzung der Aufreinigung im klinischen Maßstab sowie die Gewinnung neuer CMV-Antigene zur Verbesserung der *in vitro* Stimulation von CMV-spezifischen T-Zellen zum Ziel.

Neben Transplantatabstoßung und Graft-versus-Host-Erkrankung (Transplantat gegen Wirt; GvHD) haben opportunistische Infektionen im Zuge der nötigen Immunsuppression einen großen Anteil an Komplikationen nach Organ- oder Stammzelltransplantation. Besonders das Cytomegalievirus (CMV) trägt zu erhöhter Morbidität und Mortalität bei. Es eignet sich aufgrund seiner weiten Verbreitung und der guten Charakterisierung als Modellsystem.

Im Rahmen der Arbeit wurde ein durchflusszytometrischer Test zur Quantifizierung von CMV-bindenden T-Zellen im peripheren Blut etabliert. Die Aussagekraft des Tests wurde durch Abgleich mit funktionellen Tests und klinischen Daten überprüft.

Die Methoden zur Herstellung und Bewertung der CMV-spezifischen T-Zellen sollen einfach durchführbar sein, um eine breite Anwendung zu gewährleisten. Deshalb wurden im Rahmen der Arbeit, neben der Optimierung des Aufreinigungsverfahrens mittels Zytokinsekretionstest, auch nicht radioaktive Tests für Proliferations- und Zytotoxizitätsmessungen aufgebaut und mit Primärzellen und einer Zelllinie getestet.

Eines der immundominanten Proteine des CMV ist pp65, ein Tegumentprotein, welches gut charakterisiert und auch als rekombinantes Protein verfügbar ist. Da das pp65 nicht das einzige immunogene Protein aus dem Cytomegalievirus ist, wurden Stimulationsversuche mit pp65 im Vergleich zu Viruslysat durchgeführt. Die Zusammensetzung der angereicherten Zellfraktionen wurde mit Durchflusszytometrie genauer untersucht. Um die Stimulation von virusspezifischen T-Zellen in seropositiven Spendern zu verbessern, wurden weitere, potentiell immunogene Proteine des CMV aus der Literatur ausgewählt, kloniert und ihre Expression in Insektenzellen angestrebt. Von den 8 ausgewählten Proteinen konnte für 5 erfolgreich cDNA kloniert werden, für 2 der Konstrukte wurde eine Expression nachgewiesen. Nach Modifikation des Aufreinigungsprotokolls ist bald eine Produktion dieser Proteine und die Austestung ihrer Stimulationswirkung möglich.

Schlagwörter: adoptiver Immuntransfer, Cytomegalievirus (CMV), T-Zellen

Summary

The thesis “Enrichment of antigen-specific T-cells for adoptive immune-transfer using CMV-infection as an example” deals with enrichment, characterisation and therapeutic use of antigen-specific T-cells. The aims of this study were to (1) establish an assay to select and monitor patients, (2) test and optimise the cytokine secretion assay (in small scale), (3) define the qualitative features of the enriched cells and establish assays to check these features (in clinical scale) and (4) optimise the *in vitro* stimulation of virus-reactive T-cells by production of new antigens.

In addition to graft rejection and graft-versus-host-disease (GvHD), opportunistic infections following the necessary immunosuppression are a major problem after solid organ or stem cell transplantation (SCT). In particular cytomegalovirus (CMV) contributes significantly to morbidity and mortality after SCT. As CMV is widely spread and well characterised it is suitable as a model.

A flow-cytometry-based assay was established to better understand restoration of CMV-immunity and to predict the risk of (recurrent) reactivations for each patient. The flow-cytometry data were checked against functional assay data and clinical data to evaluate whether our flow-cytometry assay can be predictive with regard to the patient’s risk to reactivate CMV.

In general, if a method is to have broad usefulness for clinical prediction of CMV reactivation or treatment of CMV reactivation, it is important that the method is easy to establish and easy to adapt for testing of various antigens. Therefore, in addition to optimisation of the cytokine secretion assay for purification of the cells, non-radioactive assays were tested to evaluate the functionality of enriched cells.

One immuno-dominant protein of CMV is the phosphorylated tegument protein encoded in *UL83*, the pp65. Apart from this, CMV contains other immunogenic proteins such as IE-1 or glycoprotein B. Stimulation with pp65 was compared to stimulation with viral lysate, and the composition of the enriched cytokine secreting cells was analysed. Since not every CMV-seropositive person responds to stimulation with pp65, a set of 8 additional potential immunogenic proteins was chosen from the literature. In order to optimise stimulation of CMV-reactive T-cells *in vitro*, we attempted to express these proteins in a baculo-virus-system. cDNAs were successfully cloned for five of the eight selected proteins, and we have already expressed two of these constructs. After some modifications in the purification protocol, production of these proteins will soon be possible and they will be tested for stimulation of CMV-reactive T-cells.

Keywords: adoptive immune-transfer, cytomegalovirus (CMV), T-cells

Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
7-AAD	7-amino-actinomycin D
AG	Antigen
AK	Antikörper
ALL	akute lymphatische Leukämie
α	vorangestellt als Kennzeichnung für Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
Amsa	Amsacrin
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
APZ / APC	antigenpräsentierende Zelle / antigen-presenting cell (engl.)
ATG	Antithymozytenglobulin; Chemotherapeutikum
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	bacterial artificial chromosome (engl.)
BFA	Brefeldin A
BFU	burst-forming unit
Bu	Busulfan
CD	Cluster of Differentiation (engl.)
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester; Vitalfarbstoff
CFU	colony-forming unit
Chl	Chloramphenicol
Cl	Clofarabin
CLL	chronische lymphatische Leukämie
CML	chronische myeloische Leukämie
CMV	Cytomegalievirus
CSA	Cyclosporin A
Cy	Cymeven
D	donor (engl.); Spender
DC / DZ	dendritic cell (engl.); Dendritische Zelle
DLI	donor lymphocyte (infusion) transfusion (engl.); Spenderlymphozytentransfusion
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA / DNS	Desoxyribonucleic acid (engl.); Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
E	Effektor; hier: angreifende Zelle, T-Zelle
E	erythroid; als Indizes bei Vorläuferzellen
ECD (PE-TR)	Phycoerythrin-TexasRed; ; Fluorochrom
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure; Chelatbildner
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay (engl.)
Eo	eosinophil
ER	Endoplasmatisches Reticulum
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting (engl.)
Fc	constant fragment
FITC	Fluoresceinisothiocyanat; Fluorochrom
FKS / FCS	fötales Kälberserum / fetal calf serum (engl.)
FL	Fluoreszenz; auch: Fluoreszenzkanal beim Durchflusszytometer
Flu	Fludarabin

Abkürzung	Bedeutung
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GCV	Ganciclovir
GEMM	granulocyte, erythroid, monocyte, megakaryocyte
Gen	Gentamycin
GM	granulocyte, monocyte
GMP	good manufacturing practice (engl.); Qualitätsstandard
gp	Glycoprotein
GST	Gluthathion-S-Transferase
GvHD	graft versus host disease (engl.); Transplantat gegen Wirt Erkrankung
GvL	graft versus leukemia (engl.); Transplantat gegen Leukämie (-Reaktion)
HLA	humanes Leukozytenantigen
HSA	humanes Serumalbumin
HSCT / HSZT	hematopoietic stem cell transplantation (engl.); (Blut-) Stammzelltransplantation
HSV	Herpes simplex virus
IE	immediate early (engl.); bei der Virusreplikation sehr früh exprimierte Gene
IFN- γ	Interferon-gamma; Zytokin
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin; Zytokin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITAM	immunoreceptor tyrosine-based activation motif
Kan	Kanamycin
KM	Knochenmark
LAMP	lysosome associated membrane protein (engl.)
m	männlich
MACS	magnetic activated cell sorting (engl.)
MCM	monocytes conditioned medium (engl.); monozytenkonditioniertes Medium
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
Meg	megakaryocyte
MHC	major histocompatibility complex (engl.)
MMF	Mycophenolsäure
MMUD / MMRD	mismatched.... (engl.); nicht-übereinstimmender ... Spender
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MPS	Myeloproliferatives Syndrom
MRD	matched related donor; übereinstimmender Familienspender
MTX	Methrothreaxat
MUD	matched unrelated donor (engl.); übereinstimmender (bezüglich des HLA) / gematchter Fremdspender
NHL	Non-hodgkin Lymphom
NK	natural killer (engl.); Natürliche Killer(-Zelle)
ORF	open reading frame (engl.); offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMNCs	peripheral blood mononuclear cells (engl.); mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline; physiologischer Puffer
PC-5 (auch: PE-Cy5) ..	Phycoerythrin-Cy5; Fluorochrom
PC-7 (auch: PE-Cy7) ..	Phycoerythrin-Cy7; Fluorochrom
PCR	polymerase chain reaction (engl.); Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin; Fluorochrom
Pen / Strep	Penicillin / Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid; Lebend-tot-Farbstoff
PMA	Phorbol 12-myristat 13-acetat
R	recipient (engl.); Empfänger
RE	Restriktionsenzym

Abkürzung	Bedeutung
RNA / RNS	Ribonucleic acid (engl.); Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
sAML	sekundäre AML
SDS	Sodium.... (engl.); Natriumdodecylsulfat
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
ssDNA	single-stranded (engl.); einzelsträngige DNA
STR	short tandem repeat
T	Target; hier: Zielzelle, antigenpräsentierende Zelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA (Pufferlösung)
TBI	total body irradiation (engl.); Ganzkörperbestrahlung
TCD	t-cell-depletion (engl.); Entfernung von T-Zellen
TCR	T-cell receptor (engl.); T-Zell-Rezeptor
TE	Tris-EDTA (Pufferlösung)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan
Tet	Tetracyclin
TEV	tobacco etch virus (engl.)
ü. N.	über Nacht
UPN	unique patient number (engl.); einzigartige Patientenkennummer
(v/v)	volume per volume (engl.); Volumen pro Volumen
V-D-J	variable-diversity-joining (engl.)
VP16	Vincristin
w	weiblich
(w/v)	weight per volume (engl.); Gewicht pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	XIV
1 Einleitung	1
1.1 Überblick über das Immunsystem	1
1.1.1 Hämatopoese	1
1.1.2 Angeborene Immunität	2
1.1.3 Erworbene Immunität	3
1.1.4 Antigenpräsentation	8
1.1.5 Das HLA-System	9
1.2 Knochenmark- und Blutstammzelltransplantationen	11
1.2.1 Anwendungsgebiete	11
1.2.2 Ablauf einer Stammzelltransplantation	14
1.2.3 Komplikationen nach HSCT	17
1.3 Cytomegalie als Modell	19
1.3.1 Das Cytomegalievirus	19
1.3.2 Therapie	25
1.4 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen	27
1.4.1 Methodenüberblick	27
1.4.2 Tetramerfärbung	27
1.4.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung	29
1.4.4 Zytokinsekretionstest	29
1.4.5 Degranulationstest	30
1.5 Definition der Fragestellung und Ziele dieser Arbeit	31
2 Materialien und Methoden	33
2.1 Übersicht über alle verwendeten Materialien	33
2.1.1 Antibiotika	33
2.1.2 Antigene	33

2.1.3	Antikörper und Farbstoffe	34
2.1.4	Bakterien	35
2.1.5	Chemikalien (Salze, Lösungsmittel, Puffersubstanzen)	35
2.1.6	Desinfektionsmittel	37
2.1.7	Komplettsysteme (Kits)	37
2.1.8	Medien	37
2.1.9	Enzyme	37
2.1.10	Vektoren	38
2.1.11	Zelllinien	38
2.1.12	Zytokine	38
2.1.13	Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte	38
2.1.14	Geräte	40
2.1.15	Software	41
2.2	Allgemeine Methoden	42
2.2.1	Separation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut über Dichtegradientenzentrifugation	42
2.2.2	Herstellung von autologem Plasma	44
2.2.3	Kultivierung von humanen PBMNCs	45
2.2.4	Kryokonservierung von Zellen	47
2.2.5	Intrazelluläre Zytokinfärbung	49
2.2.6	Immuno-magnetische Selektion von Zellen	51
2.2.7	Immuno-magnetische Aufreinigung zytokinsezernierender Zellpopu- lationen	53
2.2.8	Generierung dendritischer Zellen aus mononukleären Zellen des pe- riperen Blutes	57
2.2.9	Durchflusszytometrie	61
2.3	Quantifizierung CMV-bindender T-Zellen mit Tetrameren	64
2.3.1	Markierung von PBMNCs mit Tetrameren	64
2.3.2	Quantifizierung Tetramer-positiver Zellen im Durchflusszytometer .	67
2.3.3	Überprüfung der Funktionalität	68
2.4	Stimulation und Aufreinigung CMV-reaktiver Zellen - Vorversuche	69
2.4.1	Aufreinigung IFN- γ sezernierender Zellen nach <i>in vitro</i> Stimulation mit Viruslysat oder rekombinantem pp65	69
2.4.2	Analyse der verschiedenen Zellfraktionen im Durchflusszytometer .	70
2.5	Nachweis transfundierter CMV-Zellen <i>in vivo</i>	71

2.5.1	Transfusion der Zellen	71
2.5.2	Nachweis der transfundierten antigenspezifischen Zellen	72
2.6	Etablierung von funktionellen Tests zur Beurteilung angereicherter anti- genspezifischer Zellen	73
2.6.1	Vitalfärbung mit CFSE	73
2.6.2	Proliferationstest mit CFSE	75
2.6.3	Degranulationstest	79
2.7	Austestung verschiedener GMP-Medien bei der Stimulation, Anreicherung und Expansion	81
2.7.1	Isolierung mononukleärer Zellen für den Medienvergleich	81
2.7.2	Vergleich verschiedener Medien bei der Gewinnung von CMV- spezifischen, IFN- γ sezernierenden T-Zellen	83
2.7.3	Expansion und Überprüfung der Funktionalität	85
2.8	Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionsassay	88
2.8.1	Aufreinigung IFN- γ sezernierender Zellen	88
2.8.2	Analyse im Durchflusszytometer	89
2.9	Allgemeine molekularbiologische Methoden	91
2.9.1	Kultivierung von Bakterien	91
2.9.2	Herstellung kompetenter Zellen	92
2.9.3	Transformation mittels Hitzeschock	94
2.9.4	Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten über Agarosegelelektro- phorese	95
2.9.5	Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA	97
2.9.6	Auftrennung von Proteinen über Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	98
2.10	Klonierung und Expression viraler Proteine des CMV in einem Baculovi- russystem	101
2.10.1	Auswahl der Zielproteine und des Expressionssystems	101
2.10.2	Isolation viraler Gene mittels PCR	102
2.10.3	Klonierung in den Vektor <i>pCRblunt</i>	107
2.10.4	Restriktionsspaltung und Klonierung in den Vektor <i>pENTR1a</i> . . .	110
2.10.5	Rekombination in den Vektor <i>pDest20</i>	114
2.10.6	Herstellung und Aufreinigung von Bacmiden für die Transfektion .	115
2.10.7	Anzucht von Insektenzellen	118
2.10.8	Herstellung von Virusüberständen für die Infektion	121

2.10.9	Proteingewinnung	123
3	Ergebnisse	127
3.1	Quantifizierung CMV-erkennender T-Zellen mit Tetrameren	127
3.1.1	Klinische Daten zur Patientenkohorte	127
3.1.2	Abdeckung des Patientenaufkommens	135
3.1.3	CMV-spezifische Immunrestitution nach HSCT	137
3.2	Stimulation und Aufreinigung CMV-reaktiver Zellen - Vorversuche	144
3.3	Nachweis transfundierter CMV-Zellen <i>in vivo</i>	147
3.3.1	Fallvorstellung	147
3.3.2	Nachweis der transfundierten Zellen mittels Zytokinsekretionstest .	148
3.3.3	Korrelation mit klinischen Daten	150
3.4	Etablierung von funktionellen Tests zur Beurteilung angereicherter anti- genspezifischer Zellen	151
3.4.1	Proliferationstest mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester	151
3.4.2	Degranulationstest	154
3.5	Austestung verschiedener GMP-Medien	155
3.5.1	Stimulation und Aufreinigung	155
3.5.2	Expansion und Überprüfung der Funktionalität	162
3.6	Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionstest	165
3.6.1	Verwendete Proben und Zellausbeute	165
3.6.2	Zellzahlen in den einzelnen Aufarbeitungsschritten und Verdünnung in der Sekretionsphase	165
3.6.3	T-Zell-Subpopulationen	167
3.6.4	NK-Zellen	176
3.6.5	B-Zellen	177
3.6.6	CD14-positive Zellen	178
3.6.7	Vergleich der Werte für IFN- γ -produzierende Zellen bei Sekretions- test und intrazellulärer Färbung	178
3.6.8	Zusammensetzung der aufgereinigten Population	179
3.7	Klonierung und Expression viraler Proteine des CMV in einem Baculovi- russystem	182
3.7.1	Vorstellung der ausgewählten immunogenen CMV-Proteine	182
3.7.2	Isolation viraler Gene mittels PCR	183
3.7.3	Klonierung in den Vektor <i>pCRblunt</i> und Sequenzierung	186
3.7.4	Restriktionsspaltung und Klonierung in den Vektor <i>pENTR1a</i> . . .	188

3.7.5	Rekombination in den Vektor <i>pDest20</i> und Transformation in <i>E. coli DH10Bac</i>	190
3.7.6	Herstellung und Aufreinigung von Bacmiden für die Transfektion	191
3.7.7	Herstellung von Virusüberständen für die Infektion	192
3.7.8	Proteinaufreinigung	193
4	Diskussion	195
4.1	Quantifizierung CMV-erkennender T-Zellen mit Tetrameren	195
4.1.1	Anwendbarkeit der Tetrameranalyse bei Patienten nach HSCT	195
4.1.2	Überwachung der CMV-spezifischen Immunrekonstitution nach HSCT	195
4.1.3	Einfluss der Konditionierung auf die CMV-spezifischen Immunrekonstitution nach HSCT	202
4.2	Stimulation und Aufreinigung CMV-reaktiver Zellen - Vorversuche	202
4.3	Gewinnung und therapeutischer Einsatz von CMV-spezifischen T-Zellen	203
4.3.1	Methoden zur Gewinnung antigenspezifischer T-Zellen	203
4.3.2	Heilversuch mit CMV-spezifischen T-Zellen und Nachweis der transfundierten Zellen <i>in vivo</i>	204
4.4	Generierung von dendritischen Zellen	205
4.4.1	Anwendungen von DC	205
4.4.2	Verschiedene Methoden der DC-Generierung	206
4.5	Etablierung von funktionellen Tests zur Beurteilung angereicherter antigenspezifischer Zellen	207
4.5.1	Proliferationstest	207
4.5.2	Degranulationstest	209
4.6	Austestung verschiedener GMP-Medien	210
4.6.1	Analyse im Durchflusszytometer	210
4.6.2	Vergleich von intrazellulärer Färbung und Sekretionstest	211
4.6.3	Expansion in den verschiedenen Medien	211
4.6.4	Zusammenfassende Beurteilung der getesteten Medien	212
4.7	Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionstest	212
4.7.1	Reinheit der IFN- γ -positiven Zellen	212
4.7.2	T-Zellen	214
4.7.3	NK-Zellen	215
4.7.4	B-Zellen	215
4.7.5	CD14-positive und CD25-positive Zellen	216
4.7.6	Vorteile des IFN- γ -Sekretionstests	216

4.8	Klonierung und Expression viraler Proteine des CMV in einem Baculovirus- system	218
4.8.1	CMV-Antigene	218
4.8.2	Herstellung von CMV-Proteinen	220
4.9	Zusammenfassung und Ausblick	224
	Literatur	A
	Abbildungsverzeichnis	O
	A Lebenslauf, Publikationsliste, Erklärung zur Dissertation	Q

1 Einleitung

1.1 Überblick über das Immunsystem

1.1.1 Hämatopoese

Die Blutbildung (Hämatopoese) findet im Knochenmark (KM) statt und geht auf die pluripotente hämatopoetische Stammzelle zurück. Diese Zellen sind sehr selten, schätzungsweise 1 in 20 Millionen Zellen des Knochenmarks [1]. Aus den Stammzellen entwickeln sich die Vorläufer für die myeloiden und lymphathischen Linien. Aus der gemischten myeloiden Vorläuferzelle entwickeln sich rote Blutzellen (Erythrozyten), Blutplättchen (Thrombozyten), Monozyten, Makrophagen, Neutrophile, Eosinophile und Basophile, aus der lymphatischen Vorläuferzelle die B-Zellen, T-Zellen und natürlichen Killerzellen (vgl. Abb.1.1, S. 2). Nach neuesten Untersuchungen muss die - auch hier gezeigte - Entwicklung der einzelnen Linien jedoch eventuell korrigiert werden [2]. Die Teilung, Entwicklung und Reifung der Zellen wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren gesteuert, dazu gehören z. B. Erythropoetin oder G-CSF. Die Leukozyten sind Teil des Immunsystems, sie schützen vor Viren, Bakterien und Toxinen. Es gibt dabei zwei große Gruppen von Abwehrmechanismen, die angeborene Immunität und die erworbene bzw. adaptive Immunität.

Während die pluripotente Stammzelle sich ständig selbst erneuert, haben die ausgereiften Zellen des peripheren Blutes nur eine beschränkte Lebensdauer, diese reicht von einigen Stunden (Granulozyten) über Tage (Erythrozyten) bis hin zu Jahren (Gedächtnis-T-Zellen oder *memory*-T-Zellen und B-Zellen).

Die Zellen des peripheren Blutes tragen charakteristische Moleküle auf der Zelloberfläche, sogenannte CD (engl. *cluster of differentiation*). So exprimieren alle kernhaltigen Zellen des Blutes CD45 auf ihrer Oberfläche, mobilisierte Stammzellen zeichnen sich durch CD34 und CD133 Expression aus. Mit Hilfe von Antikörpern, die diese Strukturen erkennen,

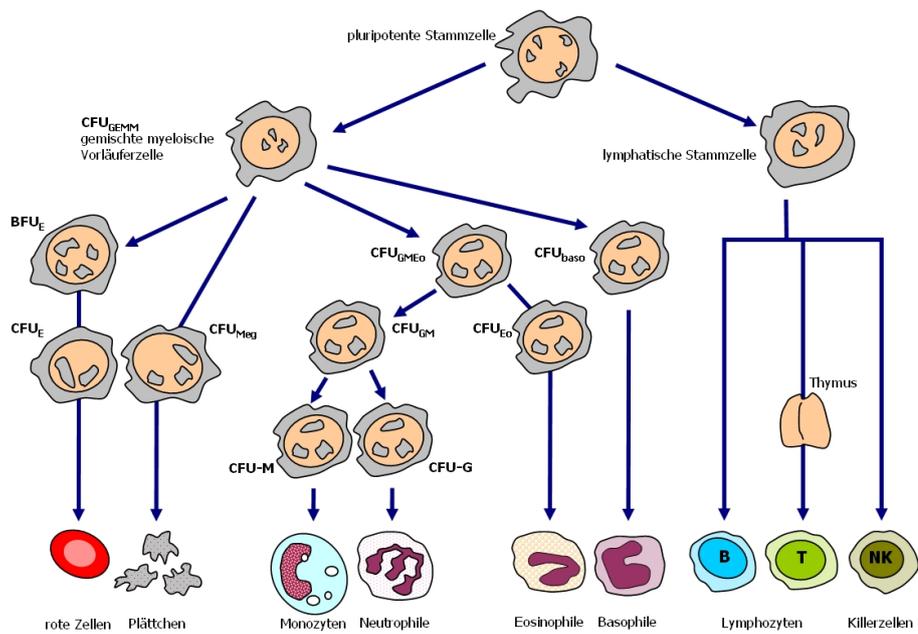


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der pluripotenten Stammzelle des Knochenmarks und der daraus entstehenden Zelllinien. Diverse Vorläuferzellen können in Kultur durch Koloniebildungstests identifiziert werden, daher unterteilt man die Vorläufer in verschiedene sogenannte *colony-forming units* (CFUs) [1].

können so Zellen z. B. im Durchflusszytometer qualitativ und quantitativ gemessen werden. Bestimmte Zellpopulationen sind selten mit nur einem Marker identifizierbar, vielmehr sind Kombinationen von mehreren CDs typisch für einen bestimmten Zelltyp. Im Folgenden werden die für diese Arbeit relevanten Zellen einschließlich ihrer charakteristischen CDs beschrieben, da diese bei den Durchflusszytometeranalysen zur Identifizierung einzelner Populationen herangezogen werden.

1.1.2 Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität umfasst Abwehrmechanismen, die sich gegen konservierte Strukturen von Pathogenen richten. Sie bildet die erste Abwehrlinie gegen Krankheitserreger, die auf Phagozytose beruht und über die Aktivierung des Komplementsystems zur Lyse der Zellen führt. Angeborene Immunität wirkt durch Makrophagen sowie das Komplementsystem: sie erkennen z. B. Lipopolysaccharid in den Zellwänden von Bakterien, nehmen die Bakterien auf und beginnen mit der Ausschüttung von Zytokinen, vor allem Entzündungsmediatoren. Diese verursachen die typischen Entzündungssymptome

(lat. *calor, dolor, rubor, tumor*; Wärme, Schmerz, Rötung, Schwellung), weitere Immunzellen werden angezogen. Die Zellen der angeborenen Immunität dienen nicht nur der spontanen Verteidigung des Körpers, sie bilden durch Aufnahme und Prozessierung von Antigenen auch die Grundlage für die adaptive Immunität [3].

1.1.3 Erworbene Immunität

Die angeborene Immunität bietet keinen Schutz vor Viren oder solchen Bakterien, die ihre Oberflächenmoleküle durch Kapselbildung verschleiern. Außerdem können sich die erkannten Oberflächenstrukturen auf Mikroorganismen schnell verändern und damit der angeborenen Immunantwort entziehen. Lymphozyten sind Zellen des adaptiven Immunsystems, deren hochvariable Oberflächenrezeptoren ihnen die Erkennung und Bekämpfung verschiedenster Antigene ermöglichen. Während die angeborene Immunität konservierte Antigene z. B. in Form bestimmter Kohlenhydrate erkennt, sind die Zielstrukturen erworbener Immunität meist Proteinantigene. Je nach Wirkmechanismus spricht man bei der erworbenen Immunität von humoraler und zellulärer (adaptiver) Immunität. Bei den Mechanismen der zellulären Immunität werden intrazelluläre und exogen aufgenommene Antigene über den *major histocompatibility complex* (MHC) bzw. das humane Leukozytenantigen (HLA) (siehe 1.1.4, S. 8 und 1.1.5, S. 9) an Lymphozyten präsentiert, dies schließt die Erkennung körpereigener Zellen, entarteter Zellen und infizierter Zellen ein. Die Benennung MHC bzw. HLA begründet sich in der Entdeckung des für sie kodierenden Genclusters im Zusammenhang mit der Immunantwort auf transplantierte Gewebe.

Jeder Lymphozyt kann nur ein bestimmtes Antigen, d. h. einen kleinen Teilbereich eines Proteins erkennen, sein sogenanntes Epitop, eine kurze Peptidkette. Die Gestalt der Epitop-bindenden Oberflächenrezeptoren wird durch mehrere Gensegmente kodiert, diese erzeugen durch verschiedene Kombination der Allele und Mutationen in den Antigenbindenden Bereichen eine große Vielfalt von unterschiedlichen Oberflächenrezeptoren auf Lymphozyten, die alle jeweils ein bestimmtes Antigen erkennen. Zellen, die körpereigene Epitope erkennen, können nicht ausreifen (Selbsttoleranzüberprüfung). Zirkulierende Lymphozyten, die ein passendes Antigen treffen, beginnen mit einer klonalen Expansion, und produzieren somit viele, aktivierte Zellen [3]. Nach Ablauf einer Immunreaktion verbleiben die Gedächtnis-Zellen und führen im Falle einer Restimulation mit ihrem Antigen zu einer raschen, neuerlichen klonalen Expansion.

1.1.3.1 V-D-J-Rekombination

Die antigenbindenden Rezeptoren der Lymphozyten, sowohl der Rezeptor der T-Zellen (vgl. 1.1.3.3) als auch die Antikörper (membranständig oder sezerniert) der B-Zellen (vgl. 1.1.3.2), werden durch mehrere Gensegmente codiert. Die Gensegmente für die variablen, antigenbindenden Bereiche werden bei der V-D-J-Rekombination zufällig zusammengefügt und erzeugen so eine große Vielfalt an Rezeptoren. Das "V" steht für variabel, die Segmente aus diesem Bereich werden im ersten Rekombinationsschritt zusammengefügt, dann werden die *diversity* Segmente eingefügt. Das "J" steht für *joining*, dieser Bereich liegt zwischen variablem und konstantem Bereich der leichten Kette, die Gensegmente dieses Bereichs werden als letztes rekombiniert. Danach wird die RNA gespleißt und als reife mRNA translatiert. Die Abbildung 1.2, S. 4 gibt einen Überblick über die V-D-J-Rekombination. Der fertige Rezeptor besteht dann aus 2 schweren und 2 leichten Ketten, die jeweils einen konstanten und einen variablen Bereich haben.

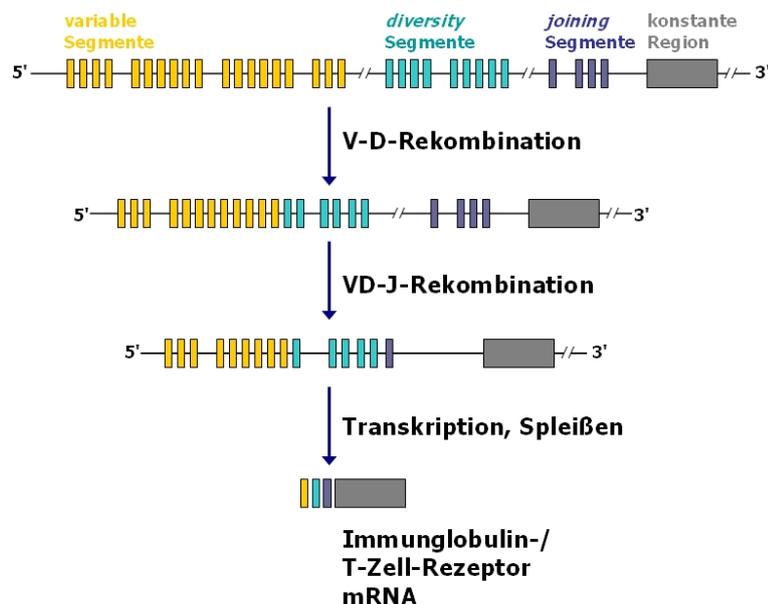


Abbildung 1.2: Schema des Ablaufs der V-D-J-Rekombination [3].

1.1.3.2 B-Lymphozyten

B-Lymphozyten bzw. B-Zellen sind wichtig bei der humoralen Immunantwort, also bei Antigenabwehr in Körperflüssigkeiten (Blut, Lymphe, Speichel). Die B-Zellen wurden zuerst bei Vögeln entdeckt und erhielten die Bezeichnung B-Zelle aufgrund ihrer Entstehung

in der *Bursa Fabricii*. Naive B-Zellen stammen beim Menschen aus dem Knochenmark, daher wurde die Bezeichnung B-Zelle hier nachträglich mit *bone marrow* assoziiert. Die B-Zellen produzieren Y-förmige Antikörpermoleküle, deren Arme (Fab - engl. *fragment antigen binding*) haben variable Epitopbindungsstellen und der konstante Fuss (Fc - engl. *fragment constant*) vermittelt den Kontakt zwischen gebundenem Pathogen und z. B. einer Fresszelle (Makrophagen o. ä.) mittels deren Fc-Rezeptor. Abbildung 1.3 zeigt schematisch den Aufbau eines Antikörpers.

Die produzierten Antikörper liegen zunächst in gebundener Form (IgM) als B-Zell-Rezeptor auf der Oberfläche der B-Zelle vor. Durch Kontakt mit ihrem Antigen reifen B-Zellen weiter und passen die sogenannten hypervariablen Regionen, die für die Erkennung des Antigens zuständig sind, durch Genmutationen den vorliegenden Strukturen an, diesen Vorgang nennt man Affinitätsreifung. Je nach Antigen und Lokalisation der B-Zelle wird nach der Reifung statt den niedrig-affinen IgM-Antikörpern, die zur Erhöhung der Avidität als Pentamere vorliegen, z. B. IgA (Speichel, Darm) oder IgG (Plasma, Gewebe) produziert. Diese Antikörper sind in der Lage, das jeweilige Antigen mit extrem hoher Affinität zu binden. Im Zuge der Rearrangierung der Antikörpergene reifen die prä-B-Zellen zu Plasmazellen, diese enddifferenzierten Zellen sind dann für die Antikörperproduktion zuständig.

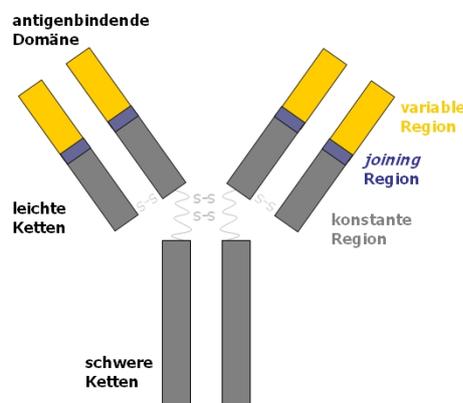


Abbildung 1.3: Schema eines Antikörpermoleküls.

1.1.3.3 T-Lymphozyten

Die T-Lymphozyten oder T-Zellen vermitteln die sogenannte zelluläre Immunantwort, sie reifen im Thymus. Wie bei den B-Zellen wird der variable, Antigen-erkennende Bereich durch V-D-J-Rekombination zusammengesetzt und eine große Anzahl verschiedener

Spezifitäten erzeugt. Alle T-Zellen werden während der Reifung auf Bindungsfähigkeit und auf Selbsttoleranz überprüft, d. h. eine T-Zelle, die kein MHC bindet, entwickelt sich nicht weiter, sondern stirbt ab, genau wie solche, die auf ein mit normalen Autoantigenen beladenes MHC-Molekül reagieren. So gelangen nur T-Zellen zur Reifung, die Fremdantigene oder entartete Autoantigene (z. B. Tumorzellen) erkennen [4]. Die naiven T-Zellen werden durch Kontakt mit dem passenden Antigen, das ihnen z. B. von dendritischen Zellen (DC) oder Monozyten präsentiert wird, aktiviert und proliferieren. Dabei machen die einzelnen T-Zellklone eine Affinitätsreifung durch. Anders als bei B-Zellen können T-Zellen den TCR nicht mehr so stark variieren, wie die B-Zellen das Antikörpermolekül. Aktivierte T-Zellen nehmen als Effektorzellen Einfluss auf andere Zellen, so töten zytotoxische T-Zellen virusinfizierte Zellen ab, T-Helferzellen unterstützen die Immunantwort durch Sekretion immunmodulatorischer Zytokine, regulatorische T-Zellen kontrollieren die Immunreaktion. Nachdem ein Infekt erfolgreich bekämpft wurde, nimmt die zunächst gestiegene Anzahl der antigenspezifischen T-Zellen wieder ab, ein Teil wird zu Gedächtniszellen, die dauerhafte Immunität gegen das Antigen vermitteln. Der Kontakt zwischen T-Zelle und der antigenpräsentierenden Zelle (APZ bzw. engl. APC) wird durch den T-Zell-Rezeptorkomplex (TCR) und ein MHC-Molekül (siehe dazu 1.1.4, S. 8 sowie 1.1.5, S. 9) auf der APC sowie durch kostimulatorische Elemente wie CD28 / B-7 vermittelt.

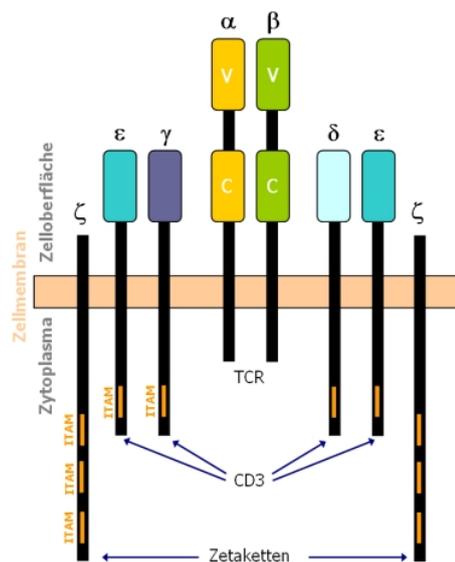


Abbildung 1.4: Schema des T-Zell-Rezeptors [4].

Der T-Zellrezeptor besteht aus einer α - und einer β -Kette, diese sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Jede Kette besitzt einen cytoplasmatischen Schwanz,

eine Transmembrandomäne, ein extrazelluläres Segment, an dem die Disulfidbrücke ausgebildet wird, sowie eine konstante und eine variable Domäne. Die beiden nebeneinander gelagerten variablen Domänen bilden die Antigenbindungsstelle. Neben dem variablen T-Zellrezeptor liegen invariante Signalproteine, CD3 γ , CD3 δ und CD3 ϵ , diese tragen am cytoplasmatischen Schwanz eine ITAM (engl. *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*) Region. In der Transmembranregion der T-Zellrezeptor α - und β -Kette sind 2 ζ -Ketten verankert, diese tragen je 3 weitere ITAM. Insgesamt hat also jeder T-Zellrezeptorkomplex 10 ITAMs. Die Abbildung 1.4, S. 6 zeigt schematisch den Aufbau des TCR.

Alle T-Zellen tragen im T-Zellrezeptorkomplex CD3. Die Subtypen werden durch CD4, CD8 und andere Marker definiert. CD4 ist der Co-Rezeptor für das MHC-II-Molekül, es findet sich auf etwa zwei Dritteln der peripheren T-Zellen, außerdem auf Makrophagen und Monozyten. CD8 ist der Co-Rezeptor für das MHC-I-Molekül, ca. ein Drittel der peripheren T-Zellen exprimiert ihn. T-Zellen haben zytotoxisch-lytische, stimulierende, kontrollierende (regulatorische T-Zellen; CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) und veto (CD8⁺CD6⁻) Eigenschaften. Die zytotoxischen T-Zellen lysieren entartete oder infizierte Zellen, um sie aus dem Körper zu entfernen. Über den T-Zell-Rezeptor bindet die T-Zelle an ein MHC-Molekül der Zielzelle, in dem ein bestimmtes Epitop präsentiert wird (zur Epitopherkunft siehe 1.1.4, S. 8 und zum MHC 1.1.5, S. 9). Erkennt eine zytotoxische T-Zelle ihr Antigen, schüttet sie IL-2, IFN- γ , Granzym B und Perforin aus, dadurch wird die Apoptose der Zielzelle induziert.

1.1.3.4 Natürliche Killerzellen

Im Gegensatz zu T-Zellen wird die zytotoxische Wirkung von Natürlichen Killerzellen (NK) nicht über den Kontakt mit einem MHC-Molekül vermittelt. NK-Zellen werden gehemmt, wenn sich MHC-I auf der Oberfläche einer Zielzelle befindet. Trägt eine Zelle jedoch keine oder zu wenig MHC-I-Moleküle auf der Oberfläche, kann sie von NK-Zellen angegriffen und zerstört werden. Dieser Mechanismus dient der Vernichtung von Zellen, die durch Mutation oder nach Infektion mit einem Virus keine MHC-I-Präsentation mehr vornehmen. Viele Viren z. B. auch das Cytomegalievirus (siehe 1.3, S. 19) unterdrücken Beladung und Präsentation von MHC-Molekülen auf der Zelloberfläche, daher sind NK-Zellen für eine funktionierende Immunabwehr sehr wichtig [3].

1.1.3.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) prozessieren und präsentieren Antigene für B- und T-Zellen. DC können am Anfang ihrer Entwicklung besonders gut Antigene aufnehmen, zu diesem Zeitpunkt tragen sie wenig MHC-II auf der Zelloberfläche; sie sind noch positiv für CD14 (typischer Monozytenmarker). Im Zuge der Reifung verändern sich die Oberflächenmarker der DC, die Fähigkeit zur Antigenaufnahme nimmt ab, dafür werden zahlreiche MHC-Peptid-Komplexe auf der Oberfläche präsentiert; reife DCs sind negativ für CD14, hochpositiv für HLA-DR, CD83 und CD86.

1.1.4 Antigenpräsentation

Das MHC (engl. *major histocompatibility complex*) oder HLA (engl. *human leucocyte antigen*) ist für die Präsentation von Antigenen zuständig. Alle Zellen präsentieren unabhängig von Infektionen Antigene auf ihrer Oberfläche, dabei werden Antigene (bzw. die Epitope daraus) aus dem Intrazellularraum über MHC-I präsentiert, solche aus dem Extrazellularraum, die über Vesikel in die Zelle aufgenommen werden, üblicherweise über MHC-II (vgl. Tab. 1.1, S. 8).

Pathogen/ Prozessierung	cytosolische Pathogene	<i>cross- presentation</i> von exogenen Antigenen	intravesikuläre Antigene	extrazelluläre Pathogene und Toxine
Spaltung	Zytosol	Zytosol (durch Retrotransloca- tion)	endozytische Vesikel (niedriger pH)	endozytische Vesikel (niedriger pH)
Peptid bindet an	MHC-Klasse-I	MHC-Klasse-I	MHC-Klasse-II	MHC-Klasse-II
Präsentation	CD8 ⁺ T-Effektorzelle	naive CD8 ⁺ T-Zelle	CD4 ⁺ T-Effektorzelle	CD4 ⁺ T-Effektorzelle
Effekt auf präsentierende Zelle	Zelltod	die präsentierende Zelle, üblicherweise eine DC, aktiviert die CD8 ⁺ T-Zelle	Aktivierung, intravesikuläre Bakterien und Parasiten zu töten	Aktivierung der Ig-Sekretion durch B-Zellen zur Eliminierung extrazellulärer Bakterien oder Toxine

Tabelle 1.1: Überblick über die Präsentation von zytosolischen und vesikulären Antigenen

Das MHC-I-Molekül wird im endoplasmatischen Reticulum (ER) zusammengesetzt. Die Peptidketten zur Beladung des MHC-I werden von einem Heterodimerenkomplex aus den Proteinen TAP-1 und TAP-2 (engl. *transporters associated with antigen processing*) ins ER transportiert. Zuvor werden die Quellproteine vom Proteasom degradiert. Die Expression von MHC-I und den TAP-Molekülen sind durch Interferone induzierbar, genauso bestimmte Untereinheiten im Proteasom, diese substituieren dann konstitutiv vorhandene Untereinheiten [5], [6], [7], [8], [9]. Das Proteasom kann dadurch in 2 Zuständen vorliegen: als konstitutives Proteasom in allen Zellen, oder als induzierbares Immunproteasom. Das Immunproteasom in Interferon-stimulierten Zellen schneidet Polypeptide eher nach hydrophoben als nach sauren Resten, die so entstehenden Peptide werden bevorzugt vom TAP-Apparat transportiert und vom MHC-I gebunden. Bei der sogenannten Kreuzpräsentation (engl. *cross-presentation*) werden exogene bzw. vesikuläre Antigene auf dem MHC-I präsentiert [10], [11]. Dies wird durch einen Prozess möglich, der sich retrograde Translokation nennt. Dabei werden Proteine, die im ER waren, wieder ins Cytosol zurücktransportiert .

Die Peptide zur Beladung des MHC-II werden in sauren endozytischen Vesikeln erzeugt. Das MHC-II wird ebenfalls im ER zusammengefügt, an die neu erzeugten MHC-II-Moleküle wird eine invariante Kette gebunden, um die Bindung von Peptiden zu vermeiden. Erst wenn die MHC-II-Moleküle in ein saures Vesikel gewandert sind, werden ihre Peptidbindungsstellen freigegeben [4].

1.1.5 Das HLA-System

Die Transplantation von Stammzellen und Organen wäre ohne Kenntnis des HLA-Systems nicht möglich. Um Komplikationen wie die Graft-versus-Host-Erkrankung (GvHD; siehe 1.2.3.2, S. 18) oder Transplantatabstoßung zu vermeiden, werden Spender und Empfänger HLA-typisiert. Je größer die Übereinstimmung, desto besser die Erfolgschancen der Transplantation. Das als MHC- bzw. HLA-Region bezeichnete Gencluster auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 kodiert für die Klasse I Antigene HLA-A, -B und -C (MHC-I), sowie für die Klasse II Antigene HLA-DR, -DQ und -DP (MHC-II).

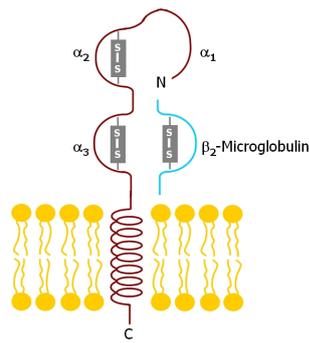


Abbildung 1.5: Aufbau des MHC-I-Moleküls [12].

Die beiden HLA-Klassen unterscheiden sich in Molekülgestalt und Vorkommen: Klasse I Antigene sind auf fast allen kernhaltigen Zellen zu finden, sie bestehen aus einer α -Kette mit 3 Domänen und einer Transmembranregion und sind mit dem β_2 -Mikroglobulin assoziiert (vgl. Abb. 1.5). Klasse II Antigene finden sich auf B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und aktivierten T-Zellen, sie bestehen aus einer α -Kette und einer β -Kette mit je 2 Domänen und Transmembranregion.

Nomenklatur	Bedeutung
HLA	die HLA-Region und Prefix für ein HLA-Gen
HLA-DRB1	ein bestimmter HLA Locus/Genort, hier DRB1
HLA-DRB1*13	eine Gruppe von Allelen die das DR13 Antigen kodieren
HLA-DRB1*1301	ein spezifisches HLA Allel
HLA-DRB1*1301N	ein Null-Allel
HLA-DRB1*130102	ein Allel, das sich durch eine synonyme Mutation unterscheidet (stille Mutation)
HLA-DRB1*13010102	ein Allel mit einer Mutation außerhalb des kodierenden Bereiches (Intronpolymorphismus)
HLA-A*2409N	ein Null-Allel
HLA-A*3014L	ein Allel, das für ein Protein mit signifikant reduzierter oder niedriger (engl. <i>low</i>) Präsentation an der Zelloberfläche kodiert
HLA-A*24020102L	ein Allel mit einer Mutation außerhalb der kodierenden Region, das für ein Protein mit signifikant reduzierter oder niedriger (engl. <i>low</i>) Präsentation an der Zelloberfläche kodiert
HLA-B*44020102S	ein für ein nur als sezerniert (engl. <i>secreted</i>) vorkommendes Protein kodierendes Allel
HLA-A*3211Q	ein Allel, für das gezeigt wurde, das die Mutation keinen Einfluss auf die Oberflächenpräsentation haben sollte, dies aber noch fragwürdig (engl. <i>questionable</i>) ist

Tabelle 1.2: HLA-Nomenklatur am Beispiel verschiedener HLA-DRB1 und HLA-A Subtypen

Bei der Typisierung werden mittels PCR die einzelnen 6 HLA-Typen bestimmt, die Angabe des HLA-Typs erfolgt in unterschiedlichen Formaten: bei der Bezeichnung HLA-A*0201 geben die ersten 2 Stellen (engl. *digits*) den Typ des Alleles an, die folgenden 2 den Subtyp.

HLA-A2 umschreibt alle HLA-A2-Allele von HLA-A*0201 bis HLA-A*0230. Die Tabelle 1.2, S. 10 gibt einen Überblick über die HLA-Nomenklatur. Die Liste der bekannten HLA-Subtypen wächst ständig. Der häufigste HLA-A-Typ in Europa ist HLA-A*02.

1.2 Knochenmark- und Blutstammzelltransplantationen

1.2.1 Anwendungsgebiete

Die Knochenmark- und Blutstammzelltransplantation (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*, HCT) wird hauptsächlich zur Behandlung von Leukämien durchgeführt. Sie kann aber auch nach starken Schädigungen des Knochenmarks (Strahlenunfälle) oder bei bestimmten Autoimmunerkrankungen indiziert sein. Die Tabelle 1.3, S. 11 gibt einen Überblick über die Indikationen für eine Stammzelltransplantation.

Allogen	Autolog
akute lymphoblastische/myeloische Leukämie	Hodgkin und non-Hodgkin Lymphome
andere malignen Erkrankungen des Knochenmarks (z. B. Myelodysplasie, Multiple Myelome, Lymphome, chronische lymphatische Leukämie)	Multiple Myelome
	akute und chronische Leukämien
	schwere Autoimmunerkrankungen
schwere aplastische Anämie	Amyloidose
vererbte Erkrankungen (z. B. Sichelzellanämie)	kombiniert mit Gentherapie bestimmter genetisch bedingter Erkrankungen (z. B. Adenosindeaminasedefizienz)
andere erworbene, schwere Knochenmarkserkrankungen	

Tabelle 1.3: Indikationen für Stammzelltransplantation [1]

In Deutschland blieb die Anzahl der Leukämieerkrankungen in den letzten Jahren etwa konstant, so erkrankten pro Jahr ca. 10250 Menschen neu an Leukämie, davon sind der größere Teil Männer (5500), das mittlere Erkrankungsalter liegt bei ca. 63 Jahren [13].

1.2.1.1 Definition der Leukämie und allgemeine Informationen

Leukämie bezeichnet allgemein eine bösartige Erkrankung aller blutbildenden Organe des Körpers. Dabei ist das Gleichgewicht zwischen Zellneubildung und Zellsterben durch Ausfallen bestimmter Tumor-Suppressoren und Aktivierung von Onkogenen gestört. Genetische

Schäden, die mit der Entstehung von Leukämien assoziiert sind, führen zu Veränderungen in Schlüsselschritten der Zellbiochemie: (1) einer erhöhten Proliferationsrate, (2) einer verminderten Apoptose und (3) einer Blockade der Zelldifferenzierung. Der Körper wird mit unreifen Leukämiezellen, sogenannten Blasten, überschwemmt. Die sich unkontrolliert teilenden Blasten verdrängen die gesunden Zellen, die so ihre Funktion nicht mehr ausüben können. Daraus ergeben sich typische Symptome: zu wenig Erythrozyten führen zu Anämie und allgemeiner Leistungsminderung, das Absinken der Thrombozytenzahl kann zu vermehrten Blutungen führen, ein Ausfall der Lymphozyten begünstigt häufige und schwere Infektionen.

Auftreten, Verlauf, Prognose und Therapie sind je nach Leukämie unterschiedlich. Man unterscheidet zwischen akuten und chronischen Leukämien sowie zwischen lymphatischen und myeloischen, wobei das erste Begriffspaar den Krankheitsverlauf, das andere den Ursprung der malignen Zellen beschreibt, damit ergeben sich die 4 Grundtypen: ALL, AML, CLL und CML. Akute Leukämien (lymphatisch oder myeloisch) sind aggressiv verlaufende Erkrankungen, ohne Behandlung führen sie innerhalb weniger Wochen zum Tod. Akute Leukämien sind durch Symptome wie Luftnot oder vermehrte Infekte gekennzeichnet. Chronische Leukämien werden hingegen meist zufällig diagnostiziert, da anfangs kaum Symptome auftreten.

1.2.1.2 ALL

Die akute lymphatische Leukämie ist die häufigste Leukämie bei Kindern, im Alter von 3 bis 7 Jahren ist die Inzidenz am Höchsten und fällt bei 10 Jahren stark ab. Ab einem Alter von 40 Jahren steigt sie wieder an. Die Pathogenese ist unterschiedlich. Cytogenetische Analysen zeigen unterschiedliche Muster bei Kindern und Erwachsenen, die Einzelfälle werden nach der Chromosomenanzahl und spezifischen molekularen Abnormalitäten der Tumorzelle beurteilt. Während bei hyperploiden Zellen (über 50 Chromosomen) die Prognose gut ist, haben hypoploide Fälle meist eine schlechte Prognose. Grundsätzlich werden im Kindesalter akute Leukämien mit Radio- und Chemotherapie behandelt, bei B-ALL können auch kurze, hochdosierte Gaben von Anti-B-Zell-Medikamenten (z. B. Rituximab) genügen. Bei Erwachsenen wird bei Vorhandensein eines Spenders nach vorausgehenden Chemotherapiezyklen zur Reduktion der Zellzahlen eine Stammzelltransplantation angestrebt.

1.2.1.3 AML

Die akute myeloische Leukämie ist die häufigste akute Leukämieform bei Erwachsenen, die Inzidenz steigt mit zunehmendem Alter. Bei Kindern tritt AML eher selten auf (10-15% der Leukämien im Kindesalter). Man unterscheidet zwischen einer primären AML, die sich *de novo* entwickelt, und einer sekundären AML, die sich aus einer Vorerkrankung wie z. B. einem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) entwickeln kann. Primäre und sekundäre AML haben unterschiedliche Ursachen und Prognosen. Einer AML liegen häufig bestimmte Chromosomenveränderungen zu Grunde (z. B. internale *tandem repeats* von *FLT-3*, *inv(16)* und *t(8; 21)*). AML mit normalen Karyotyp tragen oft Mutationen (z. B. im Nucleophosmin (NPM) Gen). Je nach AML-Typ können ca. 50% der Patienten bis 70 Jahre dauerhaft geheilt werden, in der Altersgruppe über 70 Jahren können unter 10% langfristig geheilt werden. Die Therapie ähnelt der der ALL.

1.2.1.4 CML

Die chronisch myeloische Leukämie kann in jedem Alter auftreten, sie trifft aber meistens Menschen ab dem 50. Lebensjahr, auch hier ist wie bei der AML die Anzahl der myeloischen Zellen krankhaft erhöht, allerdings sind die Zellen weiter ausgereift. Die CML machen etwa 15% aller Leukämien aus. 95% der CML-Patienten sind positiv für das sogenannte Philadelphia-Chromosom, welches zytogenetisch oder mit PCR nachgewiesen werden kann. Das Philadelphia-Chromosom ist das Ergebnis der *t(9; 22)(q34;q11)* Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22, wobei Teile des Protoonkogens *c-abl* mit dem *bcr* Gen auf dem Chromosom 22 verbunden werden, es entsteht das 210 kDa Fusionsprotein Bcr-Abl, das eine konstitutive Tyrosinkinaseaktivität hat. Das für die unkontrollierte Zellproliferation verantwortliche Bcr-Abl ist Zielprotein des Medikaments Imatinib (hemmt kompetitiv die Bindung von ATP), daher wird heute vorerst mit diesem Medikament behandelt, was die Krankheit langfristig kontrolliert und zur Remission bringt. Die einzige Heilungsmöglichkeit für CML ist eine HSCT, allerdings wird diese nur in jüngerem Lebensalter und bei Versagen der Imatinib-Therapie durchgeführt.

1.2.1.5 CLL

Mehrere Krankheiten sind in der Gruppe der chronischen lymphatischen Leukämien zusammengefasst, ihnen ist die Anreicherung reifer T- oder B-Lymphozyten im Blut gemein,

die chronische, persistierende Lymphozytose. Die Subgruppierung erfolgt über Morphologie, Immunphänotyp und Zytogenetik. Die Unterscheidung zwischen CLL und Lymphomen ist oft willkürlich. Die Tabelle 1.4, S. 14 fasst die unterschiedlichen Erkrankungen in der Gruppe der CLL zuzusammen. Im Allgemeinen sind die Erkrankungen nicht heilbar und haben chronische, wechselhafte Verläufe.

B-Zell	T-Zell
<i>Chronische lymphatische Leukämien</i>	
Chronische lymphatische Leukämie (CLL) Prolymphozytäre Leukämie (PLL) Haarzell Leukämie (engl. <i>hairy cell</i> , HCL) Plasmazell Leukämie	große granuläre lymphozytäre Leukämie T-Zell prolymphozytäre Leukämie (T-PLL)
<i>Leukämie/Lymphom Syndrome</i>	
Milz Lymphome mit villeusen Leukozyten Follikuläre Lymphome Mantelzell Lymphome Lymphoplasmazytäre Lymphome Großzellige Lymphome	Sézary Syndrom T-Zell Leukämien/Lymphome bei Erwachsenen Großzellige Lymphome

Tabelle 1.4: Klassifizierung der chronischen lymphatischen Leukämien und der Leukämie- und Lymphom-Syndrome [1]

1.2.2 Ablauf einer Stammzelltransplantation

1.2.2.1 Spendersuche

Die HSCT ist die einzige kurative Maßnahme bei Erwachsenen, die zu einer dauerhaften Heilung führt. Es gibt die Möglichkeit einer autologen oder allogenen Transplantation. Bei der autologen Transplantation erhält der Patient seine eigenen, zuvor gesammelten Stammzellen zurück, nachdem ein Großteil der malignen Zellen aus dem Körper entfernt wurde. Bei der allogenen Transplantation stammen die Zellen von einem anderen Menschen (Ausnahme: identischer Zwilling: syngen). Dabei unterscheidet man zwischen MRD (engl. *matched related donor* - passender verwandter Spender) - die Chance auf einen passenden Spender in der Familie liegt bei etwa 30%, MUD (engl. *matched unrelated donor* - passender nicht-verwandter bzw. fremder Spender) und MMUD bzw. MMRD (engl. *mismatched (un)related donor* - nicht-passender (nicht-)verwandter Spender). Bei der haploidenten Transplantation stimmt nur die Hälfte des Chromosomensatzes überein. Es gibt weltweit Spenderdateien in denen über 10 Millionen freiwillige Spender registriert

sind. Außer dem HLA-Typ bzw. dem MHC (vgl. 1.1.5, S. 9) sind bei der Spenderauswahl auch Faktoren wie das Alter, das Geschlecht und der CMV-Serostatus von Bedeutung.

1.2.2.2 Konditionierung

Die Konditionierung umschreibt die Vorbereitung des Patienten auf eine Transplantation, dabei wird eine hochdosierte Chemotherapie eventuell in Kombination mit einer Ganzkörperbestrahlung (engl. *total body irradiation* - TBI) gegeben, um die Leukämiezellen stark zu reduzieren. Außerdem muss das Immunsystem des Patienten ausgeschaltet werden, damit die transplantierten Zellen nicht durch die Immunzellen des Wirtes abgetötet werden (engl. *host-versus-graft-reaction*).

Eine wichtige Entwicklung bei der Konditionierung in den letzten Jahren ist der Wechsel von hochdosierten (myeloablativen) und sehr toxischen zu niedrig-dosierten, Toxizitätsreduzierten Konditionierungsprotokollen. Während bei der myeloablativen Konditionierung hochdosierte Chemotherapie und Bestrahlung das Knochenmark des Empfängers vollständig abtöten und eine hohe Belastung für den ganzen Körper bedeuten, zerstören nicht-myeloablative Konditionierungen das Knochenmark nicht völlig, dadurch werden konditionierungsbedingte Morbidität und Mortalität gesenkt. Das Ziel der Dosisreduzierten Konditionierung ist die Toxizität der Konditionierung zu reduzieren, dennoch sind manche Protokolle (z. B. "Flamsa") myeloablativ, in späteren Phasen nach der Transplantation werden Lymphozytentransfusionen bzw. DLIs (engl. *donor lymphocyte transfusion*, vgl. 1.2.2.5, S. 16) gegeben, um die Bekämpfung der Tumorzellen durch Spenderzellen – den GvL-Effekt (engl. *graft-versus-leukemia*) – auszunutzen.

1.2.2.3 Stammzellgewinnung

Stammzellen können aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut gesammelt werden. Bei Knochenmark als Quelle werden dem Spender unter Narkose ca. 1200 ml Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen. Das Knochenmark wird heparinisiert und die mononukleären Zellen zur Bestimmung der Ausbeute gezählt, es werden ca. $2 - 4 \times 10^8$ Zellen pro kg Körpergewicht des Empfängers benötigt.

Zur Gewinnung von Stammzellen aus dem peripheren Blut wird eine Aphaese durchgeführt, dabei wird das Blut durch einen Zellseparator in kernhaltige Zellen und Erythrozyten aufgetrennt, die weißen Zellen werden gesammelt, die Erythrozyten werden zurückge-

führt. Der Prozess dauert mehrere Stunden. Damit genügend Stammzellen im peripheren Blut zu finden sind, müssen sie mobilisiert werden, d. h. sie sollen aus dem Knochenmark auswandern. Dazu wird G-CSF (engl. *granulocyte colony stimulating factor*) verabreicht, typischerweise 10 µg pro kg Körpergewicht pro Tag für 4 bis 6 Tage. Für eine Transplantation werden mindestens $2,5 \times 10^6$ CD34-positive Zellen pro kg Körpergewicht benötigt, eventuell ist mehr als eine Aphaese nötig, um diese Zellmenge zu gewinnen [1].

1.2.2.4 Prozessierung und Transplantation

Das Transplantat kann vor der Gabe weiter aufgereinigt werden, d.h. bestimmte Zellpopulationen werden angereichert oder abgereichert (depletiert): Es gibt kommerzielle Systeme zur Anreicherung CD34- oder CD133-positiver Stammzellen. Auch die Depletion von CD3- und CD19-positiven Zellen wird derzeit untersucht. Diese Maßnahmen sollen das Risiko einer akuten GvHD (engl. *graft-versus-host-disease*) vermindern (siehe 1.2.3.2, S. 18). Bei autologen Transplantaten kann das Transplantat mit Chemotherapeutika oder Antikörpern behandelt werden, um eventuell verbliebene maligne Zellen zu entfernen.

Die Stammzellen können bis zur Gabe in flüssigem Stickstoff gelagert werden - dies geschieht auch bei autologen Transplantationen, da hier oft die Zellen lange vor der Rücktransfusion gewonnen werden. Desweiteren werden Routinetests auf bakterielle und andere Kontaminationen durchgeführt. Direkt vor der Gabe wird nochmals die Zusammensetzung der Zellpopulationen und die Vitalität der Zellen geprüft.

1.2.2.5 Transfusion von Spenderlymphozyten

Die Anreicherung von Stammzellen senkt zwar das GvHD-Risiko, allerdings ergeben sich dadurch neue Probleme: Der GvL-Effekt ist stark vermindert, da keine Immunzellen im Transplantat enthalten sind, dies begünstigt auch das Auftreten schwerer rezidivierender Infekte, auch erhöht sich das Risiko einer Transplantatabstoßung. GvL steht für *graft-versus-leukemia* und bezeichnet das Bekämpfen der malignen Empfängerzellen durch die Immunzellen des Spenders. Daher werden, nachdem ein bestimmter Grad an Chimärismus im blutbildenden System erreicht ist, sogenannte DLIs (engl. *donor lymphocyte transfusion* - Spender-Lymphozyten-Transfusion) gegeben. Die Lymphozyten tragen zu einer schnelleren Immunrekonstitution bei, der durch sie induzierte GvL-Effekt kann entscheidend für den Erfolg der Therapie sein. Das Risiko einer DLI ist unter anderem eine GvHD,

selbst wenn Spender und Empfänger perfekt passen und ein hoher Grad an Chimärismus erreicht wurde. Daher wird an der Gabe von modifizierten DLIs geforscht, die sich mittels eines Suizidgens im Falle einer GvHD ausschalten lassen [14], [15], und es wird eine Anreicherung von bestimmten, z. B. Virus- oder Leukämie-spezifischen T-Zelllinien, untersucht.

1.2.3 Komplikationen nach HSCT

Nach HSCT können verschiedene Komplikationen auftreten. Abbildung 1.6 gibt einen Überblick über den zeitlichen Ablauf einer HSCT und dem Auftreten möglicher Komplikationen. Während in den ersten 2 Wochen nach HSCT vor allem bakterielle Infekte (vgl. 1.2.3.3) auftreten, können virale Infekte/Reaktivierungen bis weit nach Tag +100 Probleme bereiten. Eine andere Komplikation ist die *graft-versus-host-disease* (vgl. 1.2.3.2).

Verlauf der Hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSCT)

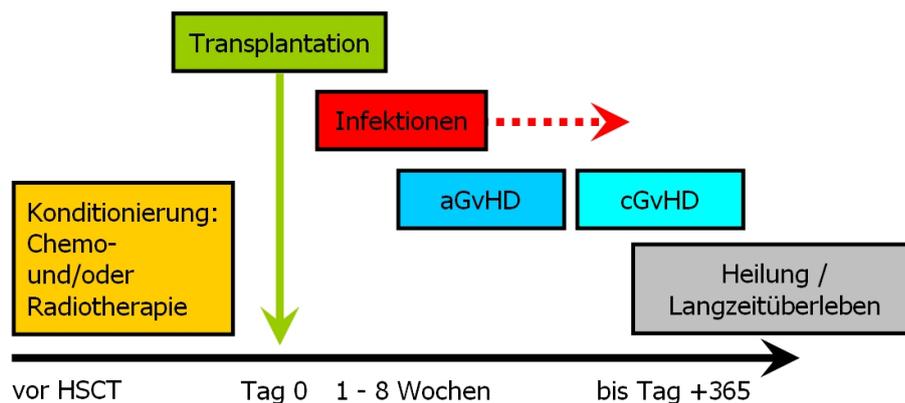


Abbildung 1.6: Zeitlicher Verlauf einer HSCT und Auftreten von Komplikationen; aGvHD = akute GvHD; cGvHD = chronische GvHD

1.2.3.1 Transplantatabstoßung

Das Transplantat kann unter Umständen nicht anwachsen und keine neuen Blutzellen produzieren (*graft failure*). Bei einer Transplantatabstoßung greifen die verbliebenen Immunzellen des Wirtes die Spenderzellen an und töten sie ab. Auch Infektionen können zu einem entzündlichen Milieu führen und die Abstoßung begünstigen, andererseits können die transfundierten Stammzellen nicht ausreichend proliferieren, dies kann z. B. auch

durch eine CMV-Infektion bzw. deren Behandlung verursacht werden. Eine Erhöhung der Immunsuppression bzw. ein “Stammzellboost” werden zur Bewältigung dieser Komplikationen erfolgreich eingesetzt.

1.2.3.2 Graft-versus-host-disease

Die GvHD, *graft-versus-host-disease* (engl., “Transplantat-gegen-Wirt-Erkrankung”), ist eine häufige, manchmal lebensbedrohliche Komplikation nach Stammzelltransplantation. Die Inzidenz nimmt mit Alter von Spender und Empfänger und mit jeder Art von *HLA-mismatch* zu. Hier greifen Immunzellen des Spenders die gesunden Körperzellen des Empfängers an. Der Pathophysiologie der GvHD ist noch nicht abschließend geklärt. Prinzipiell geht man von einem dreischrittigen Prozess aus: (1) Gewebeschädigung beim Empfänger durch Radio- und Chemotherapie, (2) Aktivierung von Spenderlymphozyten und deren Expansion und (3) Einflussnahme zellulärer und inflammatorischer Faktoren [16], [17]. Die Symptome reichen von Hautrötungen, Ausschlag, Juckreiz, Durchfall etc. bis hin zu schweren Schädigungen der Haut, des Darms, der Leber und Lunge. Man unterscheidet zwischen der akuten und der chronischen GvHD, von einer akuten GvHD spricht man während der ersten 100 Tage nach Transplantation. Nach Tag 100 bzw. bei Befall von Lunge, eventuell auch Leber und einem weniger fulminanten Verlauf, der Muskelfasern etc. schädigt, spricht man von chronischer GvHD (cGvHD). Behandelt wird die GvHD mit Steroiden, andere immunsuppressive Medikamente (z. B. Cyclosporin) werden zusätzlich gegeben, was wiederum zu einem erhöhten Infektionsrisiko führt. Das Ansprechen auf Steroide ist oft nicht zufriedenstellend [18]. Bei einer schweren GvHD kann die Steroidgabe allein nicht ausreichend sein, hier werden Antikörper (wie Antithymozytenglobulin, anti-IL-2-R-Antikörper etc.) eingesetzt.

1.2.3.3 Infektionen

Infektionen stellen bei Transplantationen besonders in der Phase der Konditionierung sowie in den ersten 100 Tagen nach Transplantation eine Gefahr dar. Auch bei fortgesetzter Immunsuppression des Patienten, z. B. aufgrund einer GvHD, können infektiöse Komplikationen hinzukommen. Da der Patient vor und ca. 14 Tage nach der Transplantation keine Immunzellen bildet, ist auch keine Abwehrwirkung gegen Keime vorhanden, Bakterien, Viren und Pilze können sich ungehindert im Körper ausbreiten. So stellen auch Keime, die für gesunde Personen harmlos sind, eine Gefahr dar. Als Teil der Infektprophylaxe

werden die Patienten in den besonders kritischen Phasen auf speziellen Stationen isoliert, es wird besonders auf Hygiene geachtet (Bereichskleidung, Mundschutz etc.), Nahrungsmittel müssen entsprechend ausgewählt werden (z. B. keine Rohmilch, keine Nüsse).

T-Zellen repopulieren langsamer als Granulozyten, daher ist die Gefahr einer Virusreaktivierung in dieser Zeit besonders hoch. Bei Auftreten von Fieber werden empirisch Antibiotika verabreicht, die bei Persistenz des Fiebers angepasst werden. Sind Keime isoliert und sprechen im Antibiogramm auf die Antibiotika an, wird bei persistierendem Fieber zusätzlich eine antimykotische Therapie eingeleitet. Virusinfektionen hingegen können, besonders im Fall von persistierenden Viren, sehr problematisch sein. Im Wesentlichen liegen das Cytomegalievirus (CMV), das Epstein-Barr-Virus (EBV) und Adenoviren (ADV) persistierend vor. Während CMV besonders wegen der Darm- bzw. Lungenerkrankung gefürchtet ist und wiederholte CMV-Reaktivierungen aufgrund der teils schweren Verläufe zur Sterblichkeit nach Transplantation beitragen [19], entstehen im Falle von EBV zirkulierende, EBV-immortalisierte B-Zellen, die ohne oder bei unzureichender T-Zell-Kontrolle Überhand nehmen können. Obwohl CMV-Reaktivierungen recht gut durch präemptiven Einsatz von Ganciclovir (GCV) zu kontrollieren sind, kommt es häufig zur "Myelosuppression", einer gefürchteten und unerwünschten Wirkung des GCV [20]. ADV können zu schweren Hautveränderungen, aber auch zu Lungenschädigungen führen. Bei der Reaktivierung dieser Viren ist ein Zusammenhang mit der fehlenden T-Zell-Kontrolle nachweisbar [21], [22], [23].

1.3 Cytomegalie als Modell

1.3.1 Das Cytomegalievirus

Das Cytomegalievirus (CMV) gehört zu der Gruppe der Herpesviren. Herpesviren befallen alle Wirbeltiergruppen, während sich die ausgelöste Symptomatik unterscheidet, gleichen sich bei allen Vertretern dieser Virusfamilie die Partikelmorphologie sowie die biologischen Eigenschaften. Alle Herpesviren persistieren nach der Erstinfektion latent im Organismus und können unter bestimmten Umständen reaktiviert werden. Die Herpesviren werden aufgrund von Pathogenität und Wirtsspektrum in 3 Unterfamilien eingeteilt. Am Besten charakterisiert ist das *Herpes simplex* Virus (HSV), aber auch das CMV ist in der Literatur sehr ausführlich beschrieben [24]. Es gehört zur Gruppe der β -Herpesviren, die im

Vergleich zu den α -Herpesviren ein engeres Wirtsspektrum und längeren Vermehrungszyklus haben.

1.3.1.1 Aufbau

Die Virionen der Herpesviren bestehen aus mehr als 30 Strukturproteinen. Im Inneren befindet sich das ikosaedrische Viruscapsid, damit assoziiert ist das doppelsträngige DNA-Genom. Zwischen Capsid und Membran liegt das sogenannte Tegument, eine unstrukturierte Proteinmatrix. Mit einer Größe von 230 kbp und über 150 Genprodukten gehört das CMV zu den humanpathogenen Viren mit der größten Codierungskapazität [24]. Während die Capsidproteine Homologien zu denen beim *Herpes simplex* Virus zeigen, unterscheiden sich die Tegument- und Hüllproteine deutlich von denen der α - und γ -Herpesviren [25].

1.3.1.2 Genom

Das Genom des HCMV (humanen Cytomegalievirus) enthält weit über 100 ORF (engl. *open reading frames*; Leseraster), die in 3 funktionelle Gruppen unterteilt werden können. Es gibt essentielle, nicht-essentielle und augmentative ORF. Die Abb. 1.7, S. 21 gibt einen Überblick über die funktionelle Genomorganisation des HCMV.

Die funktionelle Beurteilung erfolgt durch die Beobachtung, ob die Mutation eines ORF die Replikation des Virus in Fibroblasten beeinflussen. 41 ORF sind laut Yu *et al.* essentiell für die virale Replikation, darunter solche, deren Sequenz und Funktion homolog zu anderen Herpesviren sind, z. B. Proteine für die DNA-Replikation oder das Zusammensetzen (engl. *assembly*) des Virions. Allerdings wurden auch 11 neue essentielle ORF gefunden, die entweder neue Aspekte der HCMV-Replikation zeigen könnten, oder die funktionell homolog zu divergenten Sequenzen in anderen Herpesviren sind [26].

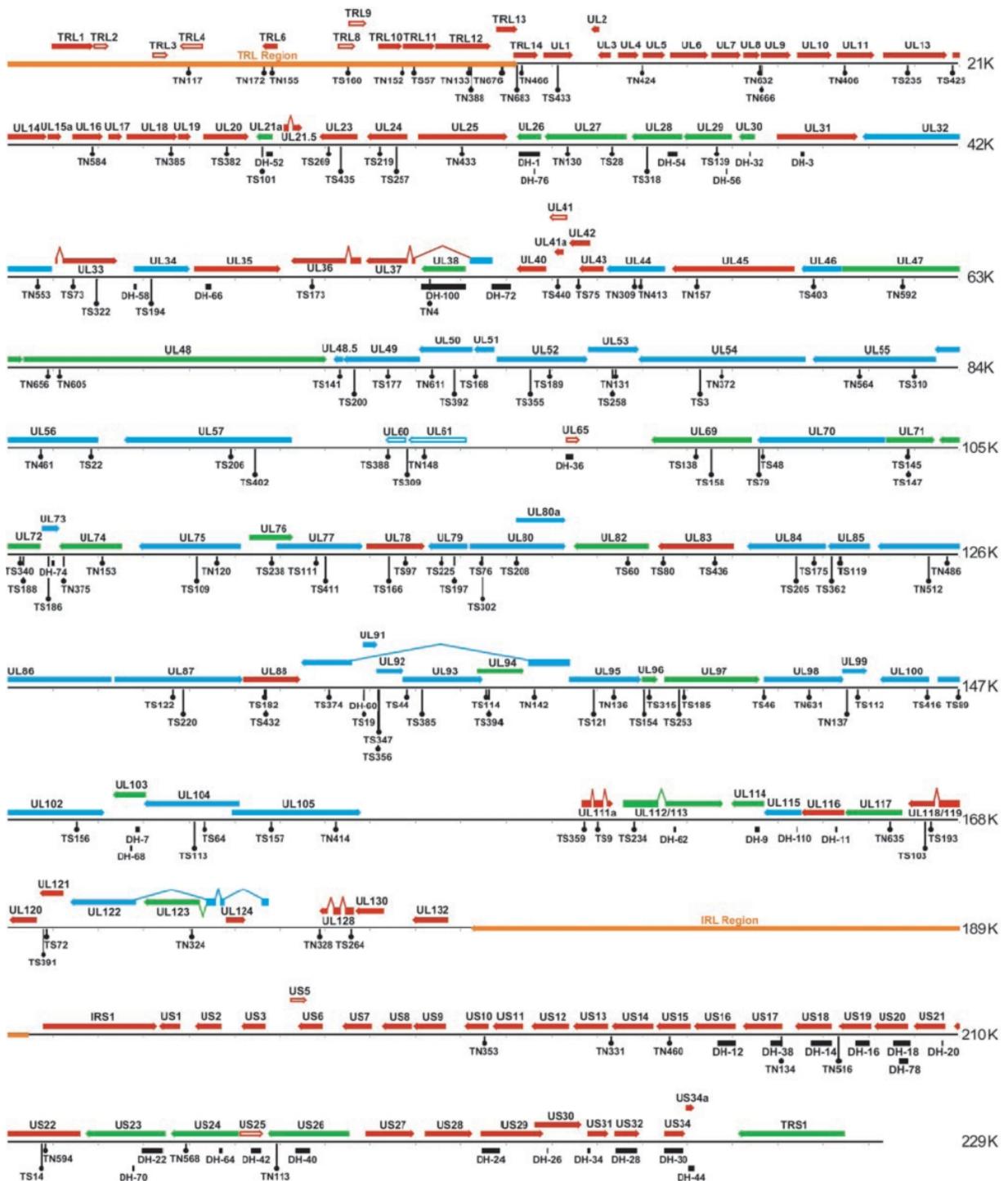


Abbildung 1.7: Funktionelle Genomkarte des HCMV nach Yu *et al.* (2003) [26]: Das Genom des HCMV Stamm AD169 (attenuierter Laborstamm) wird durch Linien (schwarz) repräsentiert, die Zahlen rechts geben die ungefähre Position in der Nucleotidsequenz in Kilobasenpaaren an. Darüber werden durch Pfeile die ORF für die jeweiligen Genprodukte markiert, die Farbkodierung gibt dabei die funktionelle Gruppe an: essentiell (blau), nicht-essentiell (rot) oder augmentativ (grün).

1.3.1.3 Strukturproteine

Zu den Strukturproteinen gehören die Proteine im Capsid, Tegument und der Membran. Das Hauptcapsidprotein des CMV ist UL86. Im Tegument findet sich das als besonders immunogen bekannte pp65/UL83, eine phosphorylierte Proteinkinase. Ebenfalls zum Tegument gehören UL48 und UL82, letzteres ist ein transaktives Protein, das die Transkription der *immediate early* Gene induziert. Das Membranprotein UL55, auch Glykoprotein B (gB) genannt, ist mitverantwortlich für die Penetration der Zelle und die Partikelaufnahme. Es ist ein Dimer, bei proteolytischer Spaltung zerfällt es in gp55 und gp93.

1.3.1.3.1 Membranproteine

In die Hüllmembran der Herpesviren sind verschiedene Glykoproteine eingelagert. Beim HSV binden die Glykoproteine gE und gI Immunglobuline, sie wirken wie Fc-Rezeptoren. Das verhindert die Interaktion der Antikörper mit Effektorzellen, außerdem maskieren die gebundenen Antikörper anscheinend B-Zell-Epitope auf der Virusoberfläche. Auch beim CMV finden sich solche Fc-ähnlichen Strukturen in der Membran. Die Glykoproteine gB, gD und gH sind an der Aufnahme des Virus ins Zytoplasma beteiligt. Jedes dieser Proteine induziert die Bildung neutralisierender Antikörper, welche die Infektion im Stadium der Penetration hemmen. Die gB, gD und gH Proteine induzieren auch die Fusion von Membranen gesunder und infizierter Zellen, so dass sich Herpesviren auch ohne infektiöse Partikel im Organismus ausbreiten können. Nach der Fusion von Zell- und Virusmembran wird das Capsid mit Tegument direkt ins Zytoplasma entlassen (nicht wie bei anderen Viren über saure Vesikel).

1.3.1.3.2 Tegumentproteine

Mehrere Proteine im Tegument beeinflussen die Expression der *immediate early* Gene, z. B. pp71 oder pp65. Das pp71 ist ein Transaktivator, es wird durch eine mit den Viruspartikeln assoziierte Proteinkinase phosphoryliert. Zusammen mit zellulären Faktoren bindet es und beeinflusst die AP-1- oder CRE/AFT-Erkennungsstellen im *Enhancer*, der die *immediate early* Gene kontrolliert. Desweiteren finden sich zumindest beim HSV im Tegument Komponenten, die für Abbau und Destabilisation der zellulären mRNA verantwortlich sind.

1.3.1.4 Nichtstrukturproteine

1.3.1.4.1 Enzyme und Funktionen bei der Genomreplikation

Neben zellulären Proteinen sind sieben virale Proteine für die Genomreplikation notwendig: (1) Die virale DNA-Polymerase (UL54), ihre Sequenz ist bei allen Herpesviren hochkonserviert. Im Gegensatz zur zellulären DNA-Polymerase kann sie durch Phosphonoessigsäure und -ameisensäure gehemmt werden. (2) Ein sogenannter *processivity factor* (UL44), der doppelsträngige DNA bindet und im Komplex mit der Polymerase vorliegt. (3) bis (5) Der Helicase-Primase-Komplex aus drei Proteinen (UL105, UL102, UL70), er entwindet die Doppelhelix und ist für die Bildung der RNA-Primer verantwortlich. (6) Ein einzelsträngige DNA-bindendes Protein (UL57), das die DNA-Einzelstränge an der Replikationsgabel streckt und lesbar macht. (7) Ein Ori_{Lyt}-bindendes Protein, also ein Protein, das an den Replikationsursprung beim lytischen Zyklus bindet.

Herpesviren verfügen über weitere Enzyme, die in den Nucleinsäurestoffwechsel eingreifen, das bekannteste ist die Thymidinkinase. Im Gegensatz zu den anderen Herpesviren verfügen Cytomegalieviren nicht über eine Thymidinkinase. Dennoch kann ihre Replikation mit dem Nucleosidanalogon Ganciclovir gehemmt werden. Dies ist vermutlich auf die Bildung dessen Monophosphats durch eine virale Kinase, die im Leserahmen UL97 kodiert wird, zu erklären.

1.3.1.4.2 Transaktivatoren

Fast alle *immediate early*-Proteine der Herpesviren sind Transaktivatoren, sie regulieren den Ablauf der lytischen Funktion durch Aktivierung der *delayed early* und der späten (*late*) Gene. Beim CMV kennt man vier Genomregionen, die sehr früh im lytischen Infektionszyklus durch pp71 aktiviert werden. Dazu zählen auch *ie-1/ie-2* und *ul36*. Das phosphorylierte IE-1-Protein ist das am meisten gebildete *immediate early*-Protein, es wird von einer mehrfach gespleißten mRNA aus 4 Exons translatiert. IE-1 stimuliert die Expression von NF κ B (engl. *nuclear factor* - NF), einem zellulären Transaktivator. Mit ihm komplexiert verstärkt IE-1 seine eigene Expression und die der *delayed early* und der späten Gene.

1.3.1.4.3 Proteine mit Homologien zu zellulären Genprodukten

Alle Herpesviren kodieren für Proteine mit Ähnlichkeiten zu zellulären Proteinen, dies dient dem Entkommen vor der Immunantwort. Beim CMV kodiert *ul18* für ein MHC-I-homologes Protein. Es kann das β_2 -Mikroglobulin binden und behindert so die Bildung regulärer MHC-I-Moleküle. Es gibt allerdings noch andere Mechanismen, mit denen das CMV der Immunantwort entgeht oder das Immunsystem fehlleitet [27]. Andere Virusgene (*ul33*, *us27*, *us28*) haben Ähnlichkeiten mit Rezeptoren zellulärer Wachstumsfaktoren, sie verschaffen den infizierten Zellen einen Wachstumsvorteil. Alle diese Gene sind für den Infektionsverlauf nicht essentiell.

1.3.1.5 Übertragung und Verbreitung

Die Bevölkerung weist eine hohe Durchseuchung mit CMV auf, zwischen 40 und 80% der jungen Erwachsenen sind damit infiziert. Ursprünglich assoziierte man CMV hauptsächlich mit Schädigungen bei Embryonen oder Neugeborenen, die sich prä- oder perinatal infiziert hatten. Bei gesunden, immunkompetenten Personen verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch, das Virus persistiert danach jedoch lebenslang im Körper und wird sporadisch reaktiviert. Bei immunsupprimierten Personen, z. B. Transplantatempfängern, Tumorkranken, HIV-infizierten etc., kann das CMV Erkrankungen mit schweren Verläufen verursachen. CMV-Erkrankungen sind sehr schwer zu behandeln, etwa 80% der Patienten, die eine CMV-Pneumonie entwickeln, sterben trotz Therapie. Das Virus wird durch infizierte Zellen im Speichel, seltener durch Muttermilch oder durch Schmierkontamination mit Blut oder Urin übertragen. Auch sexuelle Übertragung ist möglich, genauso können Organtransplantate und Blutprodukte zur Ansteckung führen.

1.3.1.6 Klinik

Beim Primärinfekt liegt die Inkubationszeit bei vier bis acht Wochen, bei immunkompetenten Personen verläuft die Primärinfektion meist asymptomatisch, es können Symptome wie Fieber, Lymphknotenschwellung, Gastritis, Ösophagitis oder grippeähnliche Beschwerden auftreten. Auch Leuko- und Thrombozytopenien und atypische CD8-positive Lymphozyten und erniedrigte CD4-Zellzahl können vorkommen. Bei der pränatalen Infektion sind die gefürchteten Komplikationen vor allem Entwicklungsdefekte im ZNS oder

Hörschädigungen. Perinatale Infektionen zeigen eine ähnliche, aber schwächere Symptomatik. Bei immunsupprimierten Personen können durch organotypische Viruslokalisation Lungenentzündungen, Hepatitiden, Chorioretinitis, gastrointestinale Ulcerationen oder Encephalitis ausgelöst werden; häufigste Todesursache bei AIDS-Patienten und Transplantierten ist die interstitielle CMV-Pneumonie. Außerdem kann das CMV bei Organtransplantationen zu Entzündungen des Transplantates und zu teilweise fulminanten Abstoßungsreaktionen führen.

1.3.1.7 Pathogenese

Die Übertragung erfolgt meist durch Tröpfcheninfektion, von den Speicheldrüsen aus wird das Virus hämatogen und auch zellgebunden verbreitet, dabei spielen Zellen des Gefäßendothels eine wichtige Rolle. Die cytomegalen Zellen sind in vielen Organen zu finden, besonders in den Speicheldrüsen, in Nieren und Nebennieren, im Rahmen des lytischen Zyklus entstehen dort Nekrosen. Die virale DNA läßt sich auch in histologisch unauffälligem Gewebe nachweisen. Im latent-persistierenden Zustand ruht das Virus vermutlich in vielen Organen. Die Ausbreitung der CMV-Infektion wird wesentlich durch den Funktionszustand des Immunsystems bestimmt, dementsprechend sind die Schädigungen bei Embryonen und Neugeborenen mit ihrem noch nicht voll entwickelten Immunsystem oder bei immunsupprimierten Personen am Schwersten. Die Diagnose einer CMV-Infektion bzw. Reaktivierung erfolgt entweder über den Nachweis von pp65 (immunhistopathologisch) in den Leukozyten, oder aufgrund von CMV-DNA-Nachweis im Serum der Betroffenen.

1.3.2 Therapie

1.3.2.1 Klassische medikamentöse Therapie

CMV-Reaktivierungen werden üblicherweise sowohl präemptiv als auch curativ mit Ganciclovir oder Foscarnet behandelt [28], auch eine supportive Behandlung mit IgG ist möglich. Ganciclovir ist ein Nukleosidanalogen, es wird von einer viralen Kinase initial phosphoryliert und bei der DNA-Replikation in den wachsenden Strang mit eingebaut, dadurch wird der Anbau weiterer Nucleotide terminiert, es kommt zum Strangabbruch. Foscarnet ist Phosphonoameisensäure, diese hemmt kompetitiv die virale DNA-Polymerase. Beide Medikamente unterdrücken die Virusreplikation und können das latent vorliegende Virus nicht aus dem Organismus entfernen. Bei häufiger Anwendung kann es zur Ausbildung

von Resistenzen kommen. Gerade in hohen Dosen oder bei Langzeittherapie, wie sie bei wiederholten Reaktivierungen in Immunsupprimierten nötig sein kann, können schwere Nebenwirkungen auftreten: Ganciclovir hat negative Einflüsse auf das Knochenmark (Myelosuppression) [20], Foscarnet hat eine hohe Nephrotoxizität. Die Gabe von humanem IgG führt zur Beladung der Viruspartikel mit Antikörpern. Dadurch werden diese zum Teil neutralisiert und auch leichter von Makrophagen erkannt und abgetötet. Da sich hierdurch die Präsentation der viralen Antigene verbessert, kann die Gabe von IgG das Entstehen einer Immunantwort durch das Immunsystem begünstigen. In sehr frühen Phasen nach Transplantation oder bei gleichzeitiger Gabe von Immunsuppressiva werden zur Therapie jedoch nur die Virostatika eingesetzt.

1.3.2.2 Experimentelle Therapien

Neben den klassischen medikamentösen Behandlungsansätzen wurden in den letzten Jahren gerade für rezidivierende Infektionen neue Therapieansätze erforscht. Eine Möglichkeit der Vakzinierung gegen CMV [29] wären z. B. sogenannte *dense bodies*, fast ausschließlich aus Tegumentprotein bestehende, nicht infektiöse Partikel. Da CMV für immunkompetente Personen jedoch keine Bedrohung darstellt, ist das Interesse an einem Impfstoff eher gering. Sowohl präventiv als auch curativ kann der sogenannte adoptive Immuntransfer eingesetzt werden. Wie bereits erwähnt, kann die Gabe von Spender-T-Zellen (DLI) die Immunrestitution verbessern, dies birgt jedoch das Risiko einer GvHD. Statt Gesamt-Lymphozyten werden beim adoptiven Immuntransfer nur bestimmte antigenspezifische T-Zellen übertragen, am Häufigsten wurde dies für die CMV-Infektion getestet. Als erste verabreichten Riddell und Kollegen CMV-spezifische CD8⁺-T-Zellklone [30], [31]. Die Möglichkeiten zur Isolation antigenspezifischer T-Zellen haben sich verbessert: Neben der Herstellung von Zelllinien und Klonen mittels wiederholter Restimulation durch mit Virusantigen(en) beladene APZ [32], [33], gibt es inzwischen auch Systeme zur direkten Aufreinigung aktivierter T-Zellen wie z. B. den *“cytokine capture assay”* oder zur Aufreinigung epitopbindender T-Zellen mit Tetrameren [34], Pentameren oder Streptameren und immuno-magnetischen Säulen. Eine andere Möglichkeit, die Immunantwort gegen CMV zu verbessern, ist die Vakzinierung mit DC, die zuvor mit CMV-Antigenen beladen wurden. Allerdings hilft diese nur, wenn schon wieder ausreichend T-Zellen im Körper des Patienten gebildet werden. Auch die Anzahl der bekannten und verfügbaren CMV-Antigene wächst, neben CMV-Lysat, das potentiell noch infektiöse Partikel enthalten kann und sich daher nicht für den klinischen Einsatz eignet, sind immunogene Proteine wie pp65 oder überlappende Peptidgemische sowie Einzelepitope kommerziell erhältlich.

1.4 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen

1.4.1 Methodenüberblick

Es gibt unterschiedliche Verfahren, um antigenspezifische T-Zellen nachzuweisen, diese unterscheiden sich in Prinzip, Aufwand, Sensitivität und Informationsgehalt [35]. In Abbildung 1.8, S. 28 sind die bei der Durchführung dieser Arbeit verwendeten Testsysteme skizziert. Die Voraussetzung zum Nachweis antigenspezifischer T-Zellen ist das Vorhandensein eines geeigneten Antigens, z. B. infizierte APZ, Viruslysate, bakterielle oder virale Proteine oder Peptide. Auch die Auswahl des Antigens hat Einfluss auf die Aussagekraft des Testsystems, während Viruslysate das gesamte Spektrum der jeweiligen viralen Antigene beinhalten und viele verschiedene T-Zellklone aktivieren können, aktivieren einzelne Proteine oder Peptidepitope nur einen Teil der antigenspezifischen Zellen gegen den jeweiligen Erreger, dafür ist hier eine Zuordnung der Zellen zu ihrem Epitop möglich. Je nach Fragestellung ergeben sich Vor- und Nachteile, so kann man bei Verwendung von Lysat eher die Gesamtanzahl an reaktiven T-Zellen finden, kennt aber nicht deren Zielstruktur. Mit Peptiden und Proteinen findet man nicht alle antigenspezifischen T-Zellen gegen einen Erreger, kann aber entweder die gegen besonders immunogene Proteine bzw. gegen die Hauptepitope finden oder anhand des Ansprechens der T-Zellen Zielstrukturen identifizieren, z. B. um ein Vakzin zu entwickeln.

1.4.2 Tetramerfärbung

Die Methode ermöglicht den direkten Nachweis antigenbindender T-Zellen: die sogenannten Tetramere bestehen aus 4 (rekombinanten) MHC-I-Molekülen, die über einen Biotinrest an Avidin gekoppelt werden, daher die Bezeichnung Tetramer (*tetra*, gr.; vier). Die MHC-Moleküle können mit kurzen Proteinketten (8 bis 9 Aminosäuren) beladen werden. Der Komplex aus MHC-Molekül und gebundenem Peptid wird von einer T-Zelle mit dem passenden TCR erkannt und gebunden.

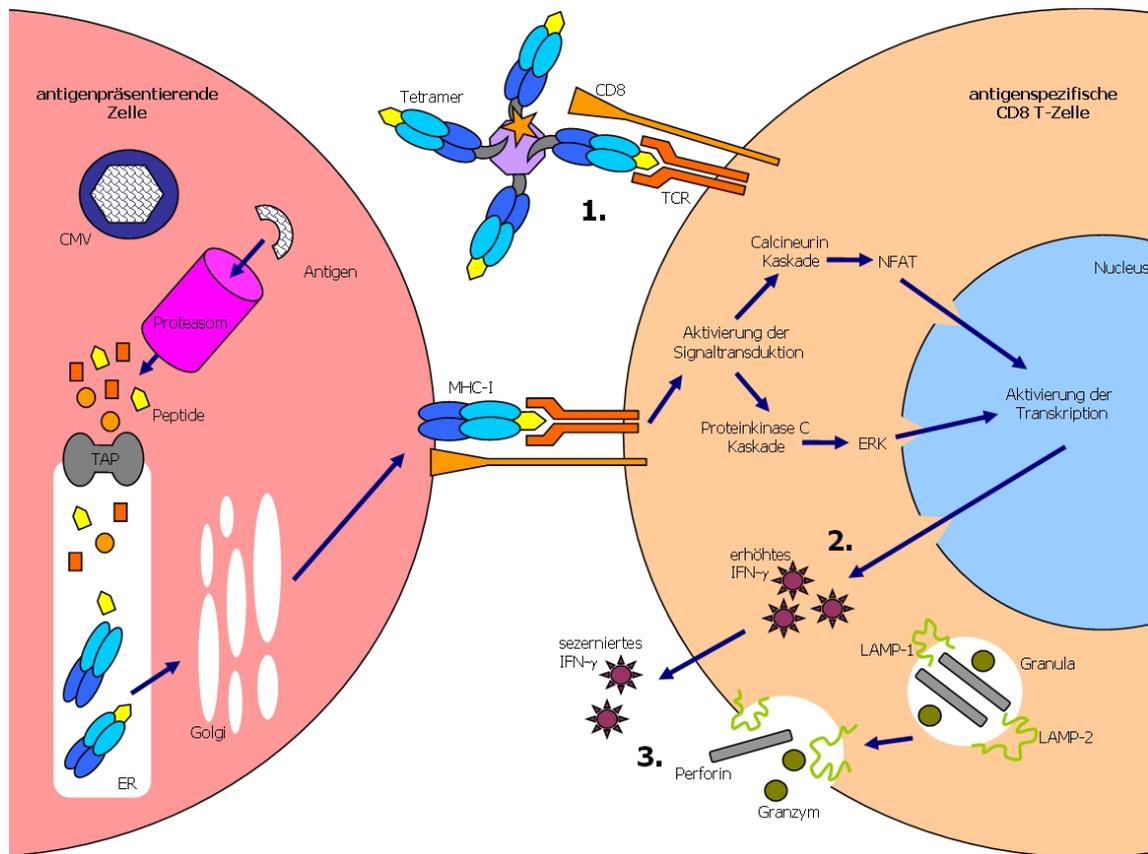


Abbildung 1.8: Darstellung der Angriffspunkte verschiedener Nachweismethoden für Antigenerkennung durch T-Zellen [35]: 1. Bindung eines Epitops an passenden TCR (Tetramerfärbung); 2. Reaktion der T-Zelle, z. B. vermehrte Bildung von Zytokinen wie IFN- γ oder TNF- α (Intrazelluläre Zytokinfärbung); 3. Wirkung auf andere Zellen durch Sekretion von Zytokinen (Sekretionsassay) oder Degranulation (CD107a Nachweis).

Vorteile der Methode sind direkte Bindung und somit direkter Nachweis der antigenbindenden T-Zellen (im Gegensatz zu indirekten Nachweisen der Antigenespezifität wie z. B. über Zytokinsekretion). Nachteilig sind die aus dem Prinzip resultierenden Einschränkungen: Rekombinante MHC-Moleküle müssen vorhanden sein, die von den T-Zellen erkannten Epitope müssen bekannt sein, daher sind nur Tetramere für die häufigsten HLA-Typen und gut charakterisierte Erreger kommerziell erhältlich. Die Tetramere können zur Anfärbung gebundener Zellen durch Kopplung eines Fluorochroms an das Avidin im Tetramer-Komplex und/oder zur Aufreinigung gebundener Zellen z. B. über Zellsortierung oder immunomagnetische Säulen verwendet werden. Zur genaueren Phänotypisierung der Zellen werden je nach Fragestellung zusätzliche Antikörper, z. B. gegen CD3 und CD8, verwendet.

1.4.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Bei der intrazellulären Zytokinfärbung werden die T-Zellen mit Antigen stimuliert und indirekt anhand ihrer Reaktion nachgewiesen. T-Zellen, die ihr Antigen erkannt haben, beginnen mit der Produktion und Sekretion verschiedener Zytokine, u. a. IFN- γ und IL-2. Damit man die Zytokine nachweisen kann, wird deren Sekretion durch Zugabe von Brefeldin A (BFA) verhindert. BFA lässt den Stofftransport durch das ER zusammenbrechen. Nach einer gewissen Inkubationszeit werden die Zellen permeabilisiert und die im Zellinneren angesammelten Zytokine mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gefärbt.

Ein Vorteil der Intrazellulären Zytokinfärbung ist der Nachweis der Funktionalität der antigenspezifischen T-Zellen, der Test kann gut mit anderen Färbungen (Tetramer, CD107a) kombiniert werden. Allerdings führt die Färbemethode letztendlich zum Tod der Zellen, sie können außer zum Nachweis der Reaktivität für nichts mehr verwendet werden. Desweiteren werden auch vorstimulierte Zellen mitgemessen, es muss also wie bei allen anderen Tests immer eine unstimulierte Kontrolle mitgeführt werden. Wird ein Protein oder Viruslysat als Antigen verwendet, so kann keine Aussage über die genaue Zielstruktur der reaktiven Zellen getroffen werden, wird Peptid verwendet, werden nicht alle reaktiven Zellen stimuliert.

1.4.4 Zytokinsekretionstest

Der Zytokinsekretionstest - auch *cytokine capture assay* (Produktlinie für klinische Anwendungen) oder *cytokine secretion assay* (Produktlinie Forschung) - ähnelt der Intrazellulären Zytokinfärbung, auch hier werden reaktive Zellen indirekt über die von ihnen produzierten Zytokine nachgewiesen. Es ist ein kommerzielles Testsystem, das von der Firma Miltenyi entwickelt wurde [36].

Das System basiert auf einem bispezifischen Antikörper, der mit einer Seite an die Zelloberfläche bindet und mit der anderen ein Zytokin binden kann. Die T-Zellen werden mit Antigen stimuliert und mehrere Stunden (4 bis 16 h) inkubiert, dann werden die bisher abgegebenen Zytokine ausgewaschen. Nachdem der bispezifische Antikörper an die Zellen gebunden wurde, werden diese für weitere 45 Minuten inkubiert, in dieser sogenannten Sekretionsphase werden von reaktiven Zellen abgegebene Zytokinmoleküle von den Antikörpern auf der Zelle gebunden. Die Zytokine können dann mit einem weiteren Antikörper

zum Nachweis der Zellen gefärbt werden oder mit Hilfe immunmagnetischer Partikel aufgereinigt werden. Neben allen Vorteilen der Intrazellulären Zytokinfärbung ist hier eine Anreicherung von viablen antigenspezifischen T-Zellen möglich.

1.4.5 Degranulationstest

Der Degranulationstest ist ebenfalls ein indirekter Nachweis antigenspezifischer, zytotoxischer T-Zellen [37]. Um eine infizierte Zielzelle lysieren zu können, schütten zytotoxische T-Zellen Perforine auf sie aus. Diese lagern in Lysosomen innerhalb der T-Zellen und werden durch Fusion von Lysosommembran mit der Zellmembran freigesetzt. Dabei gelangen mit dem Lysosom assoziierte Proteine – LAMP (engl. *lysosome associated membrane protein*) – an die Zelloberfläche. Ein solches Protein ist das CD107a, das mittels Antikörperfärbung nachgewiesen werden kann.

Da zytotoxische T-Zellen zur Beherrschung einer Virusreaktivierung essentiell sind, hat ihr Nachweis eine gute Aussagekraft bezüglich des Schutzes vor dem Erreger. Es wurde gezeigt, dass die Freisetzung von CD107a mit der Anzahl der abgetöteten antigenbeladenen Zielzellen korreliert [38]. Der Degranulationstest kann auch in Kombination mit einer Feststellung der Apoptoseinduktion durchgeführt werden.

1.5 Definition der Fragestellung und Ziele dieser Arbeit

In dieser Arbeit sollen die molekularen und biologischen Voraussetzungen für den adoptiven Immuntransfer von spezifischen Spender-T-Zellen untersucht und die Umsetzung unter Verwendung des *cytokine capture assay* evaluiert werden, als Beispiel dient die CMV-Infektion. Prinzipiell soll die Methode auch für andere Antigene wie z. B. EBV [39], ADV [40], minor Histokompatibilitäts-Antigene oder Tumorantigene nutzbar sein. Im Einzelnen sollen folgende Ziele erreicht werden:

(1) Etablierung eines Testverfahrens zur Patientenauswahl und -überwachung

Die Verwendung von MHC-I-Peptidkomplexen, sogenannten Tetrameren, soll etabliert und im Hinblick auf ihre Aussagekraft und Anwendbarkeit im klinischen Alltag getestet werden. Nachdem der Test mit gesunden, CMV-positiven Spendern etabliert ist, sollen routinemäßig Patienten nach HSCT in bestimmten Intervallen auf die Anzahl der CMV-erkennenden T-Zellen im Blut getestet werden. Die Ergebnisse dieser Messungen sollen mit klinischen Parametern (CMV-Reaktivierung, Medikation etc.) abgeglichen und eventuell durch zusätzliche funktionelle Tests ergänzt werden.

(2) Austestung und Optimierung des Zytokinsekretionstests (im Labormaßstab)

Der Zytokinsekretionstest soll zur Aufreinigung CMV-spezifischer T-Zellen aus dem Blut gesunder, CMV-seropositiver Spender benutzt werden. Dabei soll der generelle Ablauf nach dem Protokoll des Herstellers überprüft und wenn möglich oder nötig optimiert werden. Ziel ist, eine möglichst große Anzahl CMV-reaktiver T-Zellen mit großer Reinheit zu gewinnen. Für die spätere Durchführung im klinischen Maßstab unter GMP-Bedingungen sollen verschiedene Medien verglichen werden. Neben Anreicherungsgrad und Ausbeute soll außerdem die Zusammensetzung der Verunreinigung, also der Zellen in der IFN- γ -positiven Population, die gemeinsam mit den erwünschten T-Zellen vorliegen, untersucht werden.

(3) Definition von Qualitätsmerkmalen und Etablierung geeigneter Tests für Umsetzung der Aufreinigung in klinischem Maßstab

Für eine klinische Anwendung müssen die gewonnenen T-Zellen nicht nur wirksam gegen das CMV sein, sie dürfen auch keine negativen Effekte haben. Zum einen müssen Tests etabliert werden, die die Funktionalität der aufgereinigten Zellen zeigen, zum anderen muss eine Alloreaktivität ausgeschlossen werden. Hierzu bieten sich Proliferations- und Zytotoxizitätstests an. Damit können sowohl die CMV-Spezifität und die Funktionalität der

Zellen gezeigt, als auch gleichzeitig über Ansätze gegen allogene Zellen die Alloreaktivität abgeschätzt werden. Die verwendeten Tests sollen ebenfalls auf zytometrischen Messungen basieren, auf radioaktive Tests wie Chrom⁵¹-Freisetzung oder H³-Thymidineinbau soll verzichtet werden. Die Zellen sollen später ohne weitere Expansion dem Empfänger gegeben werden, eine Expansionsphase nach der Anreicherung ist nicht geplant. Sie bedeutet höheren Zeitaufwand, höhere Kosten und größeres Risiko von Kontaminationen. Um dies zu erreichen, sollen Testsysteme etabliert werden, die mit geringen Zellzahlen durchgeführt werden können.

(4) Gewinnung neuer Antigene zur Verbesserung der *in vitro* Stimulation von CMV-spezifischen T-Zellen

Damit das hier untersuchte Anreicherungsverfahren für CMV-spezifische T-Zellen für möglichst viele Patienten geeignet ist, ist langfristig eine breitere Auswahl an Antigenen von Vorteil. Bisher sind pp65 und IE-1 kommerziell erhältlich, außerdem Teilfragmente aus anderen potentiell immunogenen Proteinen, wobei nur für das pp65 eine "GMP-ähnliche" Herstellung stattfindet. Dieses Protein ist aber nicht für alle CMV-seropositiven Spender als stimulierendes Antigen geeignet, abhängig vom HLA-Typ kann das pp65 nur geringe oder gar keine CMV-spezifischen T-Zellen zur Zytokinproduktion anregen. Eine größere Auswahl an Proteinen bzw. ein Proteingemisch, das mehrere immunogene Proteine des CMV enthält und somit eine breitere Anwendbarkeit und/oder höhere Stimulationsraten verspricht [41], wäre von Nutzen. Daher sollen immunogene Proteine des CMV ausgewählt und überexprimiert werden, die gereinigten Proteine sollen dann auf ihre Stimulationswirkung hin mit dem kommerziell erhältlichen pp65 verglichen werden. Allerdings ist bei Verwendung von Gesamtprotein im Gegensatz zu den Peptidgemischen allgemein eine niedrigere CD4-Antwort zu erwarten, da die *cross-presentation* nicht bei allen Proteinen zu so guten CD4-Antworten führt wie beim pp65. Ein Fernziel ist die Rekrutierung CMV-spezifischer T-Zellen aus dem Blut CMV-seronegativer Spender, hierzu sollen mit Genen für gut stimulierende CMV-Proteine DCs transduziert werden, so dass sie immunogene Proteine des CMV exprimieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Übersicht über alle verwendeten Materialien (alphabetisch geordnet), Verbrauchsmaterialien und Geräte

2.1.1 Antibiotika

Bezeichnung	Qualität	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	≥99%, für die Molekularbiologie und Biochemie	ROTH
Chloramphenicol	≥99%, Ph. Eur., für die Biochemie	ROTH
Gentamycin, 40 mg / ml	1 ml Ampullen; für i. V. Injektion	Ratiopharm
Kanamycinsulfat	≥750 I. E., für die Mikrobiologie und Zellkultur	ROTH
Penicillin / Streptomycin, 100 ×	5000 U / ml Penicillin, 5000 µg / ml Streptomycin	Gibco
Tetracyclin-Hydrochlorid	≥95%, für die Biochemie und Molekularbiologie	ROTH

2.1.2 Antigene

Antigen	Anbieter
CEF20 (Peptid NLVPMVATV)	tebu-bio
CMV-Lysat (Stamm AD 169)	tebu-bio
pp65	Miltenyi Biotec Biotec

2.1.3 Antikörper und Farbstoffe

2.1.3.1 Antikörperkonjugate und Belegung der Fluoreszenzkanäle im verwendeten Durchflusszytometer

Fluoreszenzkanal	Abkürzung	Farbstoff
FL1	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL1	CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
FL2	PE	Phycoerythrin
FL3	ECD (PE-TR)	Phycoerythrin-TexasRed
FL4	PC-5 (auch: PE-Cy5)	Phycoerythrin-Cy5
FL4	7-AAD	7-amino-actinomycin D
FL4 (roter Laser)	APC	Allophycocyanin
FL5	PC-7 (auch: PE-Cy7)	Phycoerythrin-Cy7

2.1.3.2 Liste aller verwendeten Antikörper und Farbstoffe

Spezifität	Konjugat	Hersteller
Annexin (Apoptosefärbung)	PE	Beckman Coulter
CD107a	PC-5	BD
CD14	FITC	Beckman Coulter
CD14	PC-7	Beckman Coulter
CD16	FITC	Beckman Coulter
CD19	FITC	Beckman Coulter
CD20	PC-7	Beckman Coulter
CD25	FITC	Beckman Coulter
CD3	PC-5	Beckman Coulter
CD3	PC-7	Beckman Coulter
CD3	ECD	Beckman Coulter
CD4	PE	Beckman Coulter
CD4	FITC	Miltenyi Biotec
CD4	FITC	Beckman Coulter
CD56	PC-7	Beckman Coulter
CD8	FITC	Miltenyi Biotec
CD8	FITC	Beckman Coulter
CD8	PE	Beckman Coulter
CD8	PC-5	Beckman Coulter
CD8	PC-7	Beckman Coulter
CD8 (T8)	FITC	Beckman Coulter
CD80	FITC	Beckman Coulter

Spezifität	Konjugat	Hersteller
CD83	PE	Beckman Coulter
CD86	PE	Beckman Coulter
CD86	FITC	Beckman Coulter
HLA-DR	FITC	Beckman Coulter
IFN- γ	PE	Beckman Coulter
IFN- γ	APC	Beckman Coulter
lebend-tot Farbstoff	7-AAD	Beckman Coulter
Vitalfarbstoff	CFSE	Sigma Aldrich

2.1.4 Bakterien

Stamm	Anbieter
<i>E. coli</i> DB3.1	Invitrogen
<i>E. coli</i> DH10Bac	Invitrogen
<i>E. coli</i> Top10	Invitrogen

2.1.5 Chemikalien (Salze, Lösungsmittel, Puffersubstanzen)

Substanz	Qualität	Hersteller
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	PUFFERAN [®] , $\geq 99\%$	ROTH
5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactosid (X-Gal)	$\geq 99\%$, für die Biochemie	ROTH
Acrylamid- (AA) 30% und Bisacrylamid (BisAA) 0,8% Lösung	gasstabilisierte, wässrige Lösung (Verhältnis AA-BisAA 37,5 : 1)	ROTH
Agar-Agar	Kobe I, pulverisiert	ROTH
Agarose GTQ	gentechnologische Qualität	ROTH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	$\geq 98\%$, p. a.	ROTH
Brefeldin A (BFA)	$\geq 99\%$, für die Molekularbiologie	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	für die Elektrophorese	ROTH
Calciumchlorid	$\geq 99\%$, Zellkulturqualität	ROTH
Cellfectin		Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	$\geq 99,7\%$, HybriMax [™] , steril filtriert, Hybridoma getestet	Sigma Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	$\geq 99\%$, p. a.	ROTH
dNTP-Set (Nucleotid-Einzellösungen: dATP, dTTP, dGTP, dCTP)	$\geq 98\%$, 100 mM	ROTH
Eisessig	100%, Ph. Eur., reinst	ROTH

Substanz	Qualität	Hersteller
Ethanol, absolut	≥99,8%, p. a.	ROTH
Ethanol, vergällt	≥96%, reinst, DAB	ROTH
Ethidiumbromidlösung (3,8-Diamino-5-Ethyl-6-Phenylphenanthridinium-Bromid)	1%-Lösung	ROTH
Ethylendiamintetraacetat, Natriumsalz (EDTA)	≥99%, für die Biochemie	ROTH
Glycerin	≥99,5%, p. a., wasserfrei	ROTH
Glycin (α -Aminoessigsäure)	PUFFERAN [®] , ≥99%, p. a.	ROTH
GST-Agarose	75% Säulenmaterial in Ethanol	G-Biosciences
Hefeextrakt	pulv., für die Bakteriologie	ROTH
Ionomycin Calciumsalz	1 mM in DMSO, steril filtriert	Sigma Aldrich
Isopropanol	≥99,8%, p. a.	ROTH
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	≥99%, für die Biochemie	ROTH
Kaliumacetat	≥99%, p. a.	ROTH
Kaliumhydroxid	≥85%, p. a., in Plätzchen	ROTH
Magnesiumsulfat	≥99%, p. a.	ROTH
Mangan(II)-chlorid	reinst	Merck
Methanol	≥99,9%, p. a.	ROTH
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan (TEMED)	99%, p. a., für die Elektrophorese	ROTH
N,N-Dimethylformamid (DMF)	≥99,8%, p. a.	ROTH
Natriumchlorid	≥99,8%	ROTH
Natriumdodecylsulfat (SDS ultra pure)	≥99%, für die Elektrophorese	ROTH
Natriumhydroxid	≥99%, p. a., in Plätzchen	ROTH
Pepton aus Casein	tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie	ROTH
Phorbol 12-myristat 13-acetat (PMA)	99%, für die Molekularbiologie	Sigma Aldrich
Rubidiumchlorid	≥99%, p. a.	ROTH
Serva Blue G (Acid Blue 90)	für die Elektrophorese	Serva
Serva Blue R (Acid Blue 83)	für die Elektrophorese	Serva
Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)	aus <i>Staphylococcus aureus</i> , ca. 25%, mit Natriumphosphat	Sigma Aldrich
Trichloressigsäure (TCA)	p. a., 20%ige wässrige Lösung	ROTH
TRIS	PUFFERAN [®] , ≥99,9%, p. a.	ROTH
Wasser	HPLC-Qualität	ROTH
Xylencyanol	für die Elektrophorese	ROTH

2.1.6 Desinfektionsmittel

Desinfektionsmittel	Einsatzgebiet	Hersteller
Bacillol	Flächen, Geräte	Bode
Incidin	Flächen, Geräte	ecolab
Incidin perfect	Flächen, Geräte (nach Arbeiten mit Viren)	ecolab
Sterillium	Händedesinfektion	Bode

2.1.7 Komplettsysteme (Kits)

Set	Hersteller
FIX+PERM Zellpermeabilisierungskit	ADG
MinElute Gel Extraction Kit	QIAGEN
Plasmid Mini Kit	QIAGEN
CD3 Microbeads	Miltenyi Biotec Biotec
IFN- γ Secretion Assay - Cell Enrichment and Detection Kit	Miltenyi Biotec Biotec

2.1.8 Medien

Medium	Hersteller
RPMI1640	Gibco
BacVector Insect Medium	Novagen
CellGro	CellGenix
S.O.C.	Invitrogen
X-Vivo 15	BioWhittaker

2.1.9 Enzyme

Enzym	Hersteller
<i>AcTEV</i> -Protease	Invitrogen
<i>BsmBI</i>	New England Biolabs
<i>KpnI</i>	New England Biolabs
<i>NotI</i>	New England Biolabs
<i>Pfx</i> DNA-Polymerase	Invitrogen
<i>Phusion</i> DNA-Polymerase	Finnzymes
<i>XhoI</i>	New England Biolabs

2.1.10 Vektoren

Vektor	Hersteller
<i>pCRblunt</i>	Invitrogen
<i>pDest20</i>	Invitrogen
<i>pENTR1a</i>	Invitrogen

2.1.11 Zelllinien

Zelllinie	Quelle
<i>Sf9</i>	Novagen
T-Zelllinie gegen NLVPMVATV-Epitop	proimmune
T2	Transfusionmedizin, MHH

2.1.12 Zytokine

Zytokin	Verwendung	Hersteller
GM-CSF	DC-Generierung	immunttools
Interleukin-4	DC-Generierung	immunttools
Proleukin (Interleukin-2)	T-Zell-Expansion	Novartis

2.1.13 Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte

Artikel	Hersteller
0,2 ml Reaktionsgefäße, 8er Streifen	Biozym
1,5 ml Reaktionsgefäße	Brand
10 ml Plastikspritzen	Sarstedt
15 ml Röhrchen	Greiner; Sarstedt
2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
20 ml Plastikspritzen	Sarstedt
24-Loch-Platten, F-Boden	Greiner
25 cm ² Flaschen mit Filterdeckel	Greiner
5 ml Plastikröhrchen (FACS-Röhrchen)	BD Falcon
50 ml Plastikspritzen	Sarstedt
50 ml Röhrchen	Greiner; Sarstedt
6-Loch-Platte, F-Boden	Greiner
6-Loch-Platte, F-Boden (DC-Generierung)	BD

Artikel	Hersteller
75 cm ² Flaschen mit Filterdeckel	Greiner
96-Loch-Platten, U-Boden	Greiner
Alufolie	ROTH
Bechergläser 1 L	Brand
Bechergläser 2 L	Brand
Dewar-Gefäß	KGW Isotherm
Einweghandschuhe, nitril ("Safe Skin")	Kimberly Clark
Einwegpipette 10 ml	Sarstedt
Einwegpipette 2 ml	Sarstedt
Einwegpipette 25 ml	Sarstedt
Einwegpipette 5 ml	Sarstedt
Eisbehälter	ROTH
Entsorgungsbehälter ("grüne Tonne")	
Entsorgungsbeutel	ROTH
Erlenmeyerkolben 1 L	Brand
Erlenmeyerkolben 2 L	Brand
Erlenmeyerkolben 250 ml	Brand
Erlenmeyerkolben 500 ml	Brand
Indikatorband (Autoklavierband)	ROTH
MACS MS columns (Minisäulen)	Milteny Biotech
Messkolben, 1 L	Brand
Messkolben, 2 L	Brand
Messzylinder, 1 L	Brand
Messzylinder, 250 ml	Brand
Pasteurpipetten	Brand
Petrischale (Bakterienkultivierung)	Sarstedt
Petrischale (DC-Generierung)	BD
Pipettenspitzen mit Filter, 0,1 - 10 µl	Brand
Pipettenspitzen mit Filter, 10 - 100 µl	Brand
Pipettenspitzen mit Filter, 100 - 1000 µl	Brand
Pipettenspitzen mit Filter, 20 - 200 µl	Brand
Pipettenspitzen, 0,1 - 10 µl (kristall)	Sarstedt
Pipettenspitzen, 100 - 1000 µl (blau)	Sarstedt
Pipettenspitzen, 20 - 200 µl (gelb)	Sarstedt
Plastikküvetten (UVette)	Eppendorf
Reagenzgläser	Brand
Reagenzglaskappen	
Reaktionsgefäßständer	ROTH
Roller Bottles	Sarstedt
S-Monovetten [®] , Li-Heparin, 7,5 ml	Sarstedt

Artikel	Hersteller
Ständer für 15 ml Röhren	Brand
Ständer für 50 ml Röhren	Brand
Sterilfilter, 0,22 µm	BD Falcon
Wischtücher ("KimTech")	Kimberly Clark

2.1.14 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller / Bezugsquelle
-80 °C Gefrierschrank	VIP Series -86 °C	Sanyo / HLL
Autoklav	h + p	H + P Labortechnik AG
Brutschrank		Heraeus / OMNILAB
Brutschrank (mit CO ₂ Begasung)	HERA cell 150	Heraeus / OMNILAB
Durchflusszytometer	FC 500	Beckman Coulter
Einfrierblock		
Eismaschine	eurfrigor ICE MAKERS	HLL; Langenhagen
elektrische Pipettierhilfe	accu jet	Brand / OMNILAB
Gefrierschrank (-20 °C)		Liebherr
Geldokumentationssystem		Vilber Lourment
Geldokumentationssystem	Kodak EDAS 290	Kodak / Fisher Scientific
Gelkammer	Sub-Cell GT DNA Electrophoresis Cell	BIO-RAD
Gelsystem für Proteingele (1 mm)	Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System	BIO-RAD
Heiz- und Magnetrührer	IKA-COMBIMAG RET	Janke + Kunkel
Heizblock	Dri-block DB-3	Techne
Heizblock mit Vortexfunktion	Thermomixer comfort	Eppendorf / OMNILAB
Kühlschrank		Liebherr
Magnet für Minisäulen	MACS magnet MS	Miltenyi Biotec
Magnetwand	MACS multi stand	Miltenyi Biotec
Mehrfachpipette	HandyStep	Brand / OMNILAB
Mehrkanalpipette (8-Kanal, 5-100 µl)	eppendorf research	Eppendorf / OMNILAB
Mikroskop	Axiovert 40 CFL	Zeiss
N ₂ -Tank	MVE XLC 1520HE mit MVE Tec 2000 System Monitor	CHART
Netzgerät (Agarosegele)	Power Pack Basic	BIO-RAD
Netzgerät (Proteingele)	Pharmacia LKB ECPS 3000/15	Pharmacia
Photometer	BioPhotometer6131	Eppendorf / OMNILAB

Gerät	Typ	Hersteller / Bezugsquelle; Ort
Pipette 0,1 - 2,5 µl	eppendorf research	Eppendorf / OMNILAB
Pipette 1,0 - 10,0 µl	eppendorf research	Eppendorf / OMNILAB
Pipette 10 - 100 µl	eppendorf research	Eppendorf / OMNILAB
Pipette 100 - 1000 µl	eppendorf research	Eppendorf / OMNILAB
Pipette 20 - 200 µl	eppendorf research	Eppendorf / OMNILAB
Pumpe	Köhler Mobil-Absaugsystem	OMNILAB
Reaktionsgefäßständer	ROTH	Carl ROTH
Rotationsmischer	MACSmix	Miltenyi Biotec
Schüttelinkubator	innova 44	New Brunswick Scientific
Schüttelwasserbad	Typ 1086 GFL	Gesellsch. f. Labortechnik mbH
Ständer für 15 ml Rörchen	Brand	Brand / OMNILAB
Ständer für 50 ml Rörchen	Brand	Brand / OMNILAB
sterile Werkbank	HERA safe	Heraeus / OMNILAB
Stoppuhr / Kurzzeitmesser		Oregon Scientific / OMNILAB
Thermocycler	T3	Biometra
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus / OMNILAB
Tischzentrifuge, kühlbar	Centrifuge 5415R	Eppendorf / OMNILAB
Ultraschall	Branson Sonifier 250	G. Heinemann
Vortexer	MS2 Minishaker	IKA
Waage	TE313S	Sartorius
Zellzählgerät	AcT	Beckman Coulter
Zentrifuge	Multifuge 3S	Heraeus / OMNILAB
Zentrifuge, kühlbar	Multifuge 3S-R	Heraeus / OMNILAB

2.1.15 Software

Anwendung	Software	Herausgeber / Quelle
Bildbearbeitung (Erstellung)	Power Point	Microsoft
Bildbearbeitung (Nachbearbeitung)	KolourPaint	Open Source
Bildbearbeitung (Nachbearbeitung)	The Gimp	Open Source
Datenerfassung	Excel	Microsoft
Durchflusszytomrie (Messung und Auswertung)	CXP	Beckman Coulter
Primererstellung	Primer 3	Open Source [42]
Sequenzanalyse (RE-Karten)	Lasergene	DNA*
Sequenzanalyse (Sequenzierungen)	Chromas Lite	Freeware
Sequenzanalyse (Alignments)	ClustalW	Online-Tool, EMBL-EBI
Tabellenkalkulation	Excel	Microsoft
Textsatz	L ^A T _E X	Open Source

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 Separation mononukleärer Zellen aus dem peripheren Blut über Dichtegradientenzentrifugation

2.2.1.1 Prinzip

Die kernhaltigen Zellen des peripheren Blutes – PBMNC (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) – lassen sich über Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll separieren [43]. Ficoll ist ein ungeladenes Sucrose-Polymer, die Dichte (1077 g/ml) ist so eingestellt, dass Erythrozyten sowie tote Zellen unter das Ficoll sinken. Die Abbildung 2.1, S. 42 zeigt schematisch die einzelnen Phasen vor und nach der Zelltrennung über Ficoll.

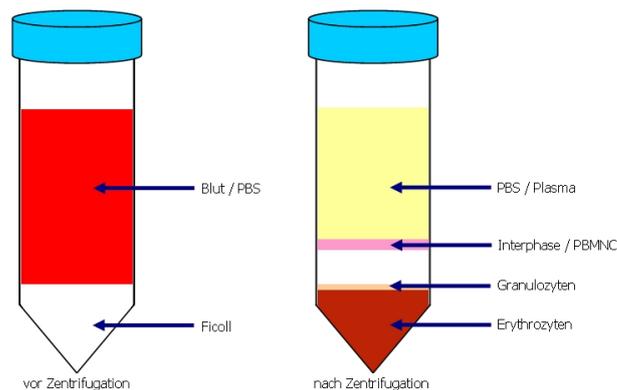


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der einzelnen Schichten vor (links) und nach (rechts) Dichtegradientenzentrifugation: die Granulozyten (beige) dringen in die Ficollphase (farblos) ein und lagern sich über den Erythrozyten (dunkelrot) am Grund ab. Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich in der Interphase (rosa) an. Die kernlosen Thrombozyten befinden sich im Überstand (gelb) oder in der Erythrozytenphase.

2.2.1.2 Materialien

2.2.1.2.1 Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation

Ficoll (Biocoll, Gibco)

PBS (Gibco)

2.2.1.2.2 Verbrauchsmaterial

15 ml Röhren
50 ml Röhren
LeukoSep™-Röhren
Plastikpipetten, 10 ml und 25 ml

2.2.1.2.3 Geräte

sterile Werkbank
Zentrifuge
Zellzählautomat
elektrische Pipettierhilfe

2.2.1.3 Durchführung

Peripheres Blut (mit EDTA oder Heparin als Antikoagulanz) wird 1 : 1 oder 1 : 2 mit PBS (physiologischer Puffer; engl. *phosphate buffered saline*) verdünnt. Je 40 ml des verdünnten Blutes in einem 50 ml Röhren mit 10 ml Ficoll (Biocoll® , Gibco) unterschichten, 20 min $1200 \times g$ bei RT (Raumtemperatur) zentrifugieren. Die Interphase in ein neues Röhren überführen und zweimal mit PBS waschen, jeweils 10 min, $220 \times g$, RT zentrifugieren. Danach die Zellzahl bestimmen.

2.2.1.4 Verwendung von LeukoSep™-Röhren

Das grundsätzliche Prinzip gleicht dem bei der Dichtegradientenzentrifugation (2.2.1, S. 42). Die sogenannten LeukoSep™-Röhren enthalten eine Filtermembran. Das Ficoll wird eingefüllt und durch Anzentrifugieren unter den Filter gebracht, das Blut-PBS-Gemisch kann dann zügig zupipettiert oder gegossen werden, da der Filter eine Durchmischung verhindert.

2.2.1.5 Änderungen in der Durchführung bei der Verwendung LeukoSep-Röhren

Die Röhren bis zur 35 ml Marke mit Ficoll füllen, kurz anzentrifugieren, überschüssiges Ficoll über dem Filter abnehmen. Blut 1:2 mit PBS verdünnen und in LeukoSep-Röhren füllen. 20 min bei $740 \times g$, RT zentrifugieren. Den Überstand bis ca. 1 cm über der Interphase absaugen. Den restlichen Überstand über Filter mit Interphase in 50 ml Röhren überführen, drei LeukoSep-Röhren pro 50 ml Röhren vereinigen, mit PBS auffüllen

und zentrifugieren, 10 min, $700 \times g$, RT (1. Waschschrift). Das weitere Vorgehen entspricht dem bei der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation.

2.2.2 Herstellung von autologem Plasma

2.2.2.1 Prinzip

Durch Abtrennung der zellulären Bestandteile des Blutes wird Plasma bzw. Serum gewonnen (ca. ein Drittel bis die Hälfte des Blutvolumens). Als Plasma wird der Überstand bei antikoaguliertem Blut bezeichnet, bei Blut ohne Antikoagulanz ist es Serum. Das Plasma/Serum enthält Nährstoffe und wird bei der Kultivierung von PBMNCs als Mediumzusatz verwendet. Varianten sind autologes Plasma (vom gleichen Spender wie die Zellen), AB-Serum (Gemisch aus mehreren Spendern) oder ersatzweise auch HSA (humanes Serumalbumin) oder FKS (fötales Kälberserum). Alle Plasmen bzw. Sera enthalten neben Nährstoffen auch Zytokine, Antikörper und Komplementkomponenten. Um eine Beeinflussung der kultivierten Zellen zu vermeiden, muss eine Inaktivierung dieser Bestandteile erfolgen, dies geschieht durch thermische Inaktivierung.

2.2.2.2 Materialien

2.2.2.2.1 Ausgangsmaterial

Blut mit Antikoagulanz (Plasma)
oder
Blut ohne Antikoagulanz (Serum)

2.2.2.2.2 Verbrauchsmaterial

15 ml Röhrchen
50 ml Röhrchen
Plastikpipetten, 10 ml und 25 ml
Sterilfilter, $0,2 \mu\text{m}$
20 ml Spritzen

2.2.2.2.3 Geräte

sterile Werkbank
Zentrifuge
elektrische Pipettierhilfe
Wasserbad

2.2.2.3 Durchführung

40 ml Blut für 20 min, $1200 \times g$, RT abzentrifugieren. Den klaren Überstand (Plasma / Serum) abnehmen, 30 min bei 56°C hitzeinaktivieren. Erneut abzentrifugieren, Überstand in neues Röhrchen überführen und nochmals zentrifugieren. Den Überstand steril filtrieren und in Aliquots bei -20°C lagern.

2.2.3 Kultivierung von humanen PBMNCs

2.2.3.1 Prinzip

Zellen können *in vitro* kultiviert werden, wobei Primärzellen wie z. B. isolierte PBMNCs nur eine gewisse Lebensdauer von einigen Tagen bis zu mehreren Wochen haben und begrenzt expandierbar sind, während immortalisierte Zelllinien nahezu unbegrenzt vermehrt werden können. Es gibt diverse Standardmedien, die auf die Bedürfnisse bestimmter Zelltypen abgestimmt sind. Bei Bedarf können Zytokine zugesetzt werden, um die Zellen am Leben zu halten, zu differenzieren oder zu expandieren. Die übrigen Kulturbedingungen wie Temperatur, CO_2 -Gehalt, Luftfeuchte etc. werden ebenfalls den Bedürfnissen der Zellen angepasst.

2.2.3.2 Materialien

2.2.3.2.1 Zellen/Zelllinien

humane PBMNCs
T2-Zelllinie
CTL_{NLVP}-Linie

2.2.3.2.2 Medien

RPMI-GlutaMAX (Gibco)
CellGro (CellGenix)
X-Vivo 15 (BioWhittaker)

2.2.3.2.3 Medienzusätze

autologes Plasma
20% HSA
FKS, hitzeinaktiviert (Biochrom AG)

2.2.3.2.4 Antibiotika

Penicillin / Streptomycin (PenStrep), 100 × (Gibco)

Gentamycin, Ampulle 40 mg / ml

2.2.3.2.5 Zytokine

IL-2 (Proleukin)

2.2.3.2.6 Standardmedium

Medium (vgl. 2.2.3.2.2)

Antibiotikum (vgl. 2.2.3.2.4)

5% HSA oder autologes Plasma

2.2.3.2.7 T-Zellmedium

Standardmedium (vgl. 2.2.3.2.6)

5 U / ml IL-2

2.2.3.2.8 T-Zellmedium zur Expansion

Standardmedium (vgl. 2.2.3.2.6)

50 U / ml IL-2

2.2.3.2.9 T2-Medium

RPMI1640

1 × PenStrep

10% FKS

2.2.3.2.10 Verbrauchsmaterial

15 ml Röhrchen

50 ml Röhrchen

Plastikpipetten, 10 ml und 25 ml

96-Loch-Platten

24-Loch-Platten

6-Loch-Platten

2.2.3.2.11 Geräte

sterile Werkbank

Zentrifuge

elektrische Pipettierhilfe

Wasserbad

Brutschrank

Neubauerzählkammer

Zellzählgerät

Mikroskop

2.2.3.3 Durchführung

Humane PBMNCs werden bei einer Temperatur von 37 °C (Körpertemperatur), bei 100% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gehalten. Medium für PBMNCs immer auf 37 °C vorwärmen (außer es wird ausdrücklich anders beschrieben). Die Zelldichte ist versuchsabhängig, allgemein sind Zelldichten um 1×10^6 Zellen pro 1 ml anwendbar. Die Zellen alle 2 bis 3 Tage im Mikroskop kontrollieren, bei Bedarf Medienwechsel bzw. Zugabe von frischem Medium.

2.2.4 Kryokonservierung von Zellen

2.2.4.1 Prinzip

2.2.4.1.1 Einfrieren

Vorteile der Kryokonservierung von vitalen Zellen sind der geringere Aufwand bei der Erhaltung der Zellen im Vergleich zur Zellkultur, die Bevorratung von Zellen, sowie der Erhalt einer homogeneren Ausgangspopulation, weil Altern und / oder Differenzierung in Kultur minimiert werden. Bereits bei Kühlung auf 0 °C sinkt der Zellmetabolismus, ab -130 °C sind keine Veränderungen an den Zellen mehr feststellbar. Zwischen 0 °C und -20 °C bilden sich Eiskristalle im umgebenden Medium, dadurch erhöht sich die Konzentration der noch gelösten Mediumbestandteile und Wasser diffundiert aus der Zelle nach außen [44]. Das Einfrieren muss so langsam erfolgen, dass sich innerhalb der Zelle keine Eiskristalle bilden, und schnell genug, dass die Dehydratation die Zellen nicht tötet, für eukaryotische Zellen -1 °C bis -3 °C pro Minute. Bei eukaryotischen Zellen wird ein sogenanntes kryoprotektives Agens zugegeben, üblicherweise DMSO (Dimethylsulfoxid) in einer Konzentration von 5 bis 15 Prozent (v/v). Die Zugabe von Serum erhöht auch die Vitalität der Zellen.

2.2.4.1.2 Auftauen

Das Auftauen sollte zügig erfolgen, um eine Kristallbildung während der Rehydratation zu verhindern. Die Zellen müssen danach sofort in einem vielfachen Volumen an Medium mit autologem Serum, fötalem Kälberserum (FKS) oder humanem Serumalbumin (HSA) aufgenommen werden, um das DMSO herauszuverdünnen.

2.2.4.2 Materialien

2.2.4.2.1 Einfriermedium PBMNCs

RPMI 1640 GlutaMAX (Gibco)

10% (v/v) DMSO, Hybridoma-getestet (Sigma)

20% (v/v) FKS, hitzeinaktiviert

2.2.4.2.2 Auftaumedium

vorgewärmtes Medium

10% FKS oder HSA

2.2.4.2.3 Verbrauchsmaterial

15 ml Rörchen

50 ml Rörchen

Plastikpipetten, 10 ml und 25 ml

Kryorörchen

2.2.4.2.4 Geräte

sterile Werkbank

Zentrifuge

elektrische Pipettierhilfe

Wasserbad

Isopropanolbad / Kühlblock

−80 °C Kühlschranks

N₂-Tank

2.2.4.3 Durchführung

2.2.4.3.1 Einfrieren

Nach Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen pelletiert und in Einfriermedium resuspendiert, die Konzentration pro 1 ml auf mindestens 0,5 bis maximal 2×10^7 einstellen. Pro Cryorörchen wird 1 ml Zellsuspension eingefroren. Die Cryorörchen in einen Kühlblock stellen und über Nacht im −80 °C Gefrierschrank einfrieren. Für Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff umsetzen.

2.2.4.3.2 Auftauen

Für jedes 1 ml Cryorörchen ein 15 ml Rörchen mit 10 ml auf RT angewärmten Medium mit 10 % FKS oder HSA vorbereiten. Die Rörchen im Wasserbad bei 37 °C antauen. Die

aufgetauten Zellen vorsichtig in das 15 ml Röhrchen überführen, eventuell noch gefrorene Teile durch Zugabe von etwas Medium lösen und umpipettieren. Die 15 ml Röhrchen zum Durchmischen der Zellen ein- bis zweimal umdrehen. Die Zellen bei $300 \times g$ 10 min, RT zentrifugieren. In 10 ml PBS aufnehmen, ein Aliquot zum Zählen entnehmen, erneut zentrifugieren. Je nach Bedarf weiter verwenden.

2.2.5 Intrazelluläre Zytokinfärbung

2.2.5.1 Prinzip

Aktiviert T-Zellen produzieren neben anderen Zytokine wie IFN- γ , IL-2. Die Produktion dieser Zytokine läßt sich z. B. durch eine intrazelluläre Färbung nachweisen. Dazu wird den Zellen Brefeldin A, ein Metabolit aus *Penicillium brefeldianum*, zugegeben, es verhindert den Transport von Stoffen aus dem Zellinneren nach außen. Bei der Inkubation reichern sich so Zytokine im Zellinneren an. Die Zellen werden fixiert und nach einer Permeabilisierung ihrer Membran auf das Zytokin gefärbt. Die Fixierung geschieht mit (Para-) Formaldehyd, die Permeabilisierung wird mit Detergenzien wie z. B. Saponin erreicht.

Um das Ergebnis der Färbung zu beurteilen, werden immer eine unstimulierte Kontrolle (Negativkontrolle) und eine Positivkontrolle (mit Superantigen wie z. B. SEB stimuliert) mitgefärbt, um unspezifische Färbungen genau zu ermitteln und den Hintergrund auszuschließen.

2.2.5.2 Materialien

2.2.5.2.1 SEB-Lösung

Staphylococcus Enterotoxin B (SEB)

DMSO

1 mg SEB in 1 ml DMSO auflösen, in Aliquots bei -20°C lagern

2.2.5.2.2 PMA-Lösung, $1000 \times \text{SL}$

Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)

Ethanol

0,5 mg PMA in 1 ml Ethanol lösen, in Aliquots bei -20°C lagern

2.2.5.2.3 Ionomycinlösung, $10 \times SL$

Ionomycincalciumsalz

Ethanol

1 mg Ionomycin in 1 ml Ethanol lösen, in Aliquots bei 4 °C lagern

2.2.5.2.4 Antigene

rekombinantes pp65 (Miltenyi Biotec)

SEB-Lösung (vgl. 2.2.5.2.1)

PMA-Lösung (vgl. 2.2.5.2.2)

Ionomycinlösung (vgl. 2.2.5.2.3)

2.2.5.2.5 Brefeldin A Lösung

Brefeldin A (BFA) von Sigma

in DMSO 1 mg/ml einstellen

Lösung bei -20 °C lagern;

1 μ l pro 100 μ l Zellsuspension verwenden

2.2.5.2.6 Antikörper

α CD3-PC7

α CD8-FITC

α IFN- γ -PE (keine Tetramermessung parallel)

α IFN- γ -APC (Tetramermessung im gleichen Ansatz)

2.2.5.2.7 Lösungen für Fixierung und Permeabilisierung

FIX + PERM Set (ADG):

Lösung A (Fixierungslösung)

Lösung B (Permeabilisierungslösung)

PBS

2.2.5.2.8 Verbrauchsmaterial

15 ml Röhren

50 ml Röhren

Plastikpipetten, 10 ml und 25 ml

1,5 ml Reaktionsgefäße

Pipettenspitzen

Mehrfachpipettenspitze (*Multistep*-Spitzen)

96-Loch-Platten

2.2.5.2.9 Geräte

sterile Werkbank

Zentrifuge

elektrische Pipettierhilfe

Pipetten, 0,1 -2,5 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l

Mehrkanalpipette

Mehrfachdosierpipette (*Multistep*)

Wasserbad

Brutschrank

2.2.5.3 Durchführung

Die PBMNCs (Aufreinigung von PBMNCs siehe 2.2.1, S. 42) in einer 96-Loch-Platte mit 10^6 Zellen pro Loch aussähen. In die Testansätze jeweils 2 μ l pp65 pipettieren, SEB und PMA (5 ng/ml) + Ionomycin(500 ng/ml) in die Positivkontrollen geben. Die Platte 1-2 h bei 37 °C unter CO₂-Begasung inkubieren. Zu jedem Ansatz BFA (10 μ g/ml) geben, durch Pipettieren mischen und mindestens 4 h (oder ü. N.) weiter inkubieren.

Färbelösung aus PBS und Antikörpern vorbereiten, dazu pro Loch je 5 μ l Antikörper (CD3 und CD8) und je 90 μ l PBS einsetzen. Die Platte bei 150 \times g 5 min zentrifugieren, Überstand abkippen, Zellen in 100 μ l Färbelösung resuspendieren. 15 min bei RT färben, dabei dunkel halten - das gilt auch für alle weiteren Inkubationsschritte. Die Platte erneut zentrifugieren, Überstand abkippen. Jedes Pellet in 100 μ l FIX+PERM Lösung A resuspendieren, 15 min bei RT inkubieren. Für jeden Ansatz je 10 μ l IFN- γ -PE-Antikörper (Beckman Coulter) verwenden, *ad* 100 μ l mit FIX+PERM Lösung B. Die Platte zentrifugieren, Überstand abkippen und die Pellets in Lösung B (mit Antikörper) resuspendieren. 20 min bei RT färben, dann abzentrifugieren, 100 μ l PBS pro Loch zugeben und erneut zentrifugieren. In Zytometerröhrchen 400 μ l PBS vorlegen. Die Zellpellets nach dem Waschen gründlich in 100 μ l PBS resuspendieren und in ein Zytometerröhrchen überführen. Die Proben (Endvolumen 500 μ l) im Durchflusszytometer messen.

2.2.6 Immuno-magnetische Selektion von Zellen

2.2.6.1 Prinzip

Durch die Kopplung von Antikörpern an paramagnetische Mikroisenkugeln, sogenannte *Beads*, können von dem Antikörper gebundene Zellen über eine Säule isoliert werden. Die

Säule ist mit Eisenwolle oder Eisenpartikeln gefüllt, durch Einhängen in einen starken Magneten wird in der Säule ein Magnetfeld induziert, so dass die *Beads* hängen bleiben. Unmarkierte Zellen werden ausgewaschen, nach Entfernung des Magnetfeldes wird die Zielpopulation von der Säule eluiert. Um die Zellen zu schonen, werden alle Inkubationsschritte auf Eis durchgeführt, alle Puffer, Zellsuspensionen usw. werden gekühlt, wann immer es möglich ist.

Mit diesem einfachen System sind Positiv- und Negativ-Selektionen von Zellen möglich, je nach Antikörper(n) an den *Beads*. Das Säulenmaterial bindet unspezifisch tote Zellen und Zelltrümmer. Gerade bei der Anreicherung von Zellen, die nur in niedriger Frequenz vorkommen, oder bei Proben mit niedriger Vitalität werden tote Zellen mitangereichert. Um die Reinheit der Zellen zu erhöhen, kann die Zellsuspension über mehrere Säulen gegeben werden.

Positivselektionen werden hier für CD3-positive Zellen durchgeführt. Der entsprechende Antikörper ist direkt an die Beads gebunden, die Zellen müssen nur einmal inkubiert und gewaschen werden und können dann auf eine Säule aufgebracht werden. Üblicherweise sind CD3-positive Zellen in Mengen in den PBMNCs enthalten, die eine gute Anreicherung (über 90%) und wenig unspezifische Anreicherung toter Zellen bereits nach einer Säule erlauben.

2.2.6.2 Materialien

2.2.6.2.1 MACS-Puffer

PBS

0,5% (v/v) HSA

2 mM EDTA

2.2.6.2.2 CD3-Selektion

CD3-Microbeads, human (Miltenyi Biotec)

2.2.6.2.3 Verbrauchsmaterial

15 ml Röhrchen

50 ml Röhrchen

Plastikpipetten, 10 ml und 25 ml

1,5 ml Reaktionsgefäße

Pipettenspitzen, 0,1-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl

MACS-Säulen, MS (Miltenyi Biotec)

2.2.6.2.4 Geräte

sterile Werkbank

Zentrifuge

elektrische Pipettierhilfe

Pipetten, 0,1 -2,5 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl

MACS-Magneten für MS-Säulen

MACS-Magnetwand

Eismaschine

Eisbad

2.2.6.3 Durchführung

Frisch isolierte (vgl. 2.2.1) oder aufgetaute (vgl. 2.2.4.3.2) PBMNCs in eiskaltem MACS-Puffer resuspendieren, 80 µl MACS-Puffer pro 1×10^7 Zellen verwenden. Pro 1×10^7 Zellen 20 µl CD3-Microbeads zugeben, 15 min auf Eis inkubieren. Pro Aufreinigung 2 MS-Säulen in Magneten einhängen und jeweils mit 500 µl MACS-Puffer vorspülen. Proben mit 10 ml MACS-Puffer waschen, abzentrifugieren bei 4 °C, $300 \times g$, in 500 µl MACS-Puffer aufnehmen und auf die erste Säule geben. Säule dreimal mit 500 µl MACS-Puffer waschen, dann Säule aus dem Magnetfeld entfernen und Zellen mit 1 ml MACS-Puffer eluieren. Eluat auf die zweite Säule aufbringen, wie gehabt waschen und eluieren.

2.2.7 Immuno-magnetische Aufreinigung zytokinsezernierender Zellpopulationen

2.2.7.1 Prinzip

Das grundsätzliche Prinzip bei der Verwendung magnetischer *Beads* wurde bereits erläutert (vgl. 2.2.6.1). Der *Cytokine Capture Assay* bzw. Sekretionstest ist eine Reagenzienzusammenstellung zur Anreicherung zytokinsezernierender Zellen unter Verwendung von magnetischen *Beads*. Bei der Aufreinigung von zytokinproduzierenden Zellen ist ein mehrschrittiges Vorgehen nötig, da die sezernierten Zytokine nicht an den Zellen verbleiben. Zunächst werden die Zellen stimuliert und je nach Antigen 4 h (Peptide) bis 16 h (Proteine) inkubiert, bis eine ausreichende Menge an Zytokinen produziert wird. Nachdem vorhandene Zytokine ausgewaschen wurden, werden in der "Sekretionsphase" mit Hilfe eines bispezifischen Antikörpers, der einerseits ein Oberflächenmolekül auf der Zelle (z. B. CD45) und andererseits das gesuchte Zytokin bindet, die sezernierten Zytokine an der

Zelloberfläche gehalten. Mit einem weiteren Zytokinantikörper und / oder *Beads* (mit Antikörper gegen den Farbstoff am Zytokinantikörper oder direkt gegen das Zytokin) kann die Isolation der aktivierten bzw. zytokinausschüttenden Zellen stattfinden.

2.2.7.2 Materialien

2.2.7.2.1 Isolation der Zellen

siehe 2.2.1.2, S. 42

2.2.7.2.2 Antigene

pp65 (Miltenyi Biotec)

CMV-Lysat (Stamm AD 169) (tebu-bio)

2.2.7.2.3 Superantigen(e)

SEB-Lösung

2.2.7.2.4 Medien

RPMI1640 GlutaMAX (Gibco)

X-Vivo 15, mit Gentamycin (Cambrex)

CellGro (Cellgenix)

2.2.7.2.5 Antibiotika

Penicillin / Streptomycin 100 × Lösung (Gibco)

Gentamycin, 1 ml Ampullen, 40 mg/ml (Ratiopharm)

2.2.7.2.6 MACS-Puffer

PBS

0,5% (v/v) HSA

2 mM EDTA

2.2.7.2.7 Aufreinigung IFN- γ sezernierender Zellen

IFN- γ Detection and Enrichment Kit (Miltenyi Biotec)

MiniMACS-Säulen (für maximal 10^8 Zellen mit $\leq 10^7$ positiven/bindenden Zellen)

MACS-Puffer

2.2.7.2.8 Verbrauchsmaterial

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.2, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.10, S. 46

vgl. Materialien bei CD3-Selektion 2.2.6.2.3, S. 52

2.2.7.2.9 Geräte

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.3, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.11, S. 46

vgl. Materialien bei CD3-Selektion 2.2.6.2.4, S. 53

2.2.7.3 Durchführung

Tabelle 2.17 fasst die unterschiedlichen Ansätze des IFN- γ -Sekretionstest zusammen. Allgemein wurden die Proben minimal 12 h und maximal 16 h inkubiert, die Zellen geerntet und mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen, alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4 °C, 300 \times g, 10 min durchgeführt.

Die Zellen werden 5 min auf Eis mit dem bispezifischen Antikörper gefärbt, es folgt die 45 min Sekretionsphase (Volumen, Röhrchen, Medium siehe Tab. 2.17). Danach werden die Zellen zweimal gewaschen, beim ersten Waschen werden die Röhrchen aus der Sekretionsphase mit eiskaltem MACS-Puffer aufgefüllt. Beim 2. Waschschrift werden die aufgeteilten Ansätze wieder in 15 ml-Röhrchen vereinigt und erneut mit mindestens 10 ml MACS gewaschen. Danach erfolgt die Markierung mit anti-IFN- γ -PE (10 min, 4 °C) und je nach Versuch das Binden an PE-Microbeads (15 min, 4 °C) sowie die Aufreinigung über Mini-MACS-Säulen. Dazu werden die Zellen in 1 ml MACS-Puffer aufgenommen und auf die mit 500 μ l MACS-Puffer vorgespülte Säule gegeben. Sobald die Flüssigkeit durchgetropft ist, wird 3 \times mit 500 μ l MACS-Puffer gespült. Die Säule aus dem Magneten entfernen und auf ein sauberes Röhrchen aufsetzen, 1 ml MACS-Puffer zugeben und mit Stempel eluieren. Den Vorgang bei der zweiten Säule wiederholen. Zellen nach Bedarf weiter verarbeiten.

Vorversuche	Nachweis transfundierter Zellen <i>in vivo</i>	Testlauf für Proliferations-test	Medienvergleich	Kontrolle der angereicherten Fraktion
Ausgangsmaterial: Blutmenge, HLA-Typ, CMV-Serostatus				
50 ml PBL, CMV-positive Spender	40 ml PBL von Patientin	200 ml PBL, HLA-A*02-positive, CMV-positive Spender	450 ml PBL, HLA-A*02-positive, CMV-positive Spender	450 ml PBL, HLA-typisierte, CMV-positive Spender
Negativkontrolle, Platte / Zellzahl				
24-LP / 1×10^7	24-LP / 1×10^7	24-LP / $0,5 \times 10^7$	24-LP / $0,5 \times 10^7$	24-LP / $0,5 \times 10^7$
pp65, Platte / Zellzahl				
24-LP / 1×10^7	—	24-LP / 4×10^7	6-LP / 1×10^8	6-LP / 1×10^8
Lysat, Platte / Zellzahl				
24-LP / 1×10^7	24-LP / 1×10^7	—	6-LP / 1×10^8	6-LP / 1×10^8
Positivkontrolle (SEB), Platte / Zellzahl				
24-LP / 1×10^7	24-LP / 1×10^7	24-LP / $0,5 \times 10^7$	24-LP / $0,5 \times 10^7$	24-LP / $0,5 \times 10^7$
Reagenzien: bispezifischer Antikörper, αIFN-γ-PE, αPE-Microbeads				
20 μ l oder 10 μ l pro 1×10^7	10 μ l pro 1×10^7	10 μ l pro 1×10^7	20 μ l pro 1×10^7	10 μ l pro 1×10^7
Verdünnung in Sekretionsphase, pp65/Lysat (oben) und Kontrollen (unten)				
1 : 10, später 1 : 100 (4 \times 25 ml pro Ansatz in 50 ml Röhrchen)	1 : 100 (4 \times 25 ml pro Ansatz in 50 ml Röhrchen)	1 : 100 (4 \times 25 ml pro Ansatz in 50 ml Röhrchen)	1 : 50 (2 \times 25 ml pro 2×10^7 Zellen in 50 ml Röhrchen)	1 : 20 (10 \times 25 ml pro 1×10^8 Zellen in 50 ml Röhrchen)
1 : 10, später 1 : 100 (4 \times 25 ml pro Ansatz in 50 ml Röhrchen)	1 : 10 (10 ml im 15 ml Röhrchen)	1 : 10 (10 ml im 15 ml Röhrchen)	1 : 10 (10 ml im 15 ml Röhrchen)	1 : 10 (10 ml im 15 ml Röhrchen)
Medium				
RPMI1640, 5% HSA, Pen/Strep	RPMI1640, 5% HSA, Pen/Strep	RPMI1640, 5% HSA, Pen/Strep	RPMI1640, 5% HSA, Pen/Strep; CellGro, 5% HSA, Gentamycin; X-Vivo 15, 5% HSA	CellGro, Gentamycin

Tabelle 2.17: Überblick über die verschiedenen Ansätze des Sekretionstests; von links nach rechts: verschiedene Versuche; von oben nach unten: Ausgangsmaterial, Ansätze, verwendete Reagenzienmengen, Verdünnung und Medien; PBL = peripheres Blut (mit Heparin oder EDTA); LP = Loch-Platte; HSA = humanes Serumalbumin; Pen/Strep = Penicillin / Streptomycin

2.2.8 Generierung dendritischer Zellen aus mononukleären Zellen des peripheren Blutes

2.2.8.1 Prinzip

2.2.8.1.1 Gewinnung der Ausgangspopulation über Plastikadhärenz

Die Anzucht von dendritischen Zellen *in vitro* ist in diversen Veröffentlichungen beschrieben [45], [46]. Als Ausgangsmaterial dienen aufgereinigte Monozyten oder die adhärenente Fraktion der PBMNC, eine Abtrennung dieser Zellen ist über sogenannte Plastikadhärenz möglich. Eine modifizierte Variante der Plastikadhärenz ist das Beschichten der Plastikoberfläche mit humanem IgG: Die an das Plastik gebundenen Immunglobuline binden effektiv adhärenente, antigenpräsentierende Zellen und deren Vorläufer.

2.2.8.1.2 Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen und Kryokonservierung

Die Differenzierung der Zellen zu DC wird mit GM-CSF und IL-4 eingeleitet. Die spätere Ausreifung kann entweder mit Zytokinkombinationen wie PGE₂, TNF- α und IL-6 [47], [48] oder mit sogenanntem monozytenkonditioniertem Medium (MCM) [49], [50] erreicht werden. Das MCM wird aus dem Mediumüberstand der adhärenenten Zellfraktion vor Zytokinzugabe gewonnen. Unreife DC können eingefroren und für spätere Beladung und Ausreifung wieder aufgetaut werden. Nach der Ausreifung sterben DC relativ schnell ab, sie tolerieren kein Einfrieren bzw. können nach dem Auftauen nicht mehr ihre antigenpräsentierenden Funktionen ausüben.

2.2.8.1.3 Ausreifen und Beladen dendritischer Zellen

Die Zellen müssen nach dem Auftauen ca. 1 Tag ruhen. Eine Beladung mit Proteinantigenen erfolgt vor der Ausreifung, Peptide können auf reife DCs gegeben werden. Die Ausreifung wird durch MCM eingeleitet. Während der Differenzierung zu reifen DC verändert sich neben den Oberflächenmarkern - CD14 verschwindet, CD86 nimmt zuerst zu und bei der Ausreifung ab, während CD83 und HLA-DR mit dem Reifegrad stark zunehmen - auch deutlich das Erscheinungsbild der Zellen: Die adhärenenten, eventuell leicht fibroblastischen Zellen kugeln sich ab und werden größer; diese unreifen DC bilden dann im Zuge der Ausreifung die typische Aststruktur aus, die Zellen sind semiadhärenent. Daher

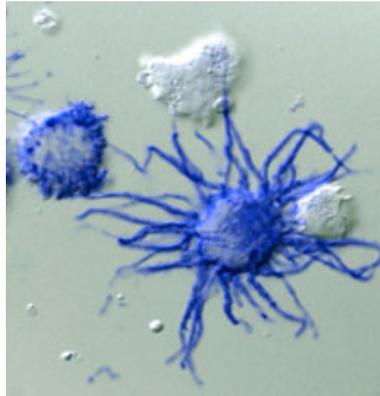


Abbildung 2.2: Bild einer auf HLA-DR (blaue Färbung) gefärbten DC, von C. M. Chalouni [51]

kann der Reifegrad und die Qualität der DC rein mikroskopisch beurteilt werden. Das Bild 2.2 zeigt eine reife, auf HLA-DR gefärbte DC.

2.2.8.1.4 Kontrolle der Differenzierung und Reifung

Die Kontrolle der Differenzierung und Reifung erfolgt mikroskopisch und/oder über durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmoleküle, die sich im Zuge der Reifung verändern. Die Kontrolle im Durchflusszytometer erfordert eine höhere Zellzahl, so dass nach anfänglicher Überprüfung mit beiden Methoden auf reine Mikroskopie umgestellt wurde.

2.2.8.2 Materialien

2.2.8.2.1 DC-Medium

RPMI 1640 GlutaMAX

2% autologes Plasma (Herstellung vgl. 2.2.2.3)

2.2.8.2.2 Zytokine

GM-CSF

IL-4

2.2.8.2.3 DC-Medium mit Zytokinen

DC-Medium (vgl. 2.2.8.2.1)

800 U/ml IL-4

500 U/ml GM-CSF

2.2.8.2.4 Sonstige Lösungen und Reagenzien

PBS

eventuell Einfriermedium (vgl. 2.2.4.2.1, S. 48)

humanes IgG (Sandoglobulin)

Monozytenkonditioniertes Medium (MCM), siehe 2.2.8.3.1, S. 59

2.2.8.2.5 Antikörper

α CD14-PE (Beckman Coulter)

α CD83-FITC (Beckman Coulter)

α HLA-DR-FITC (Beckman Coulter)

α CD86-PE (Beckman Coulter)

2.2.8.2.6 Verbrauchsmaterial

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.2, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.10, S. 46

vgl. Materialien bei CD3-Selektion 2.2.6.2.3, S. 52

Petrischalen, 10 cm Durchmesser (BD)

2.2.8.2.7 Geräte

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.3, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.11, S. 46

2.2.8.3 Durchführung

2.2.8.3.1 Gewinnung der Ausgangspopulation über Plastikadhärenz und Herstellung des MCM

Zellen wie unter 2.2.1, S. 42 beschrieben aufarbeiten. Autologes Plasma wie unter 2.2.2, S. 44 erklärt herstellen.

Zur Beschichtung der 10 cm Plastikschalen (unmodifizierte Oberfläche, BD Falcon) pro Schale 10 ml PBS mit 30 μ l Sandoglobulin mischen, Lösung in die Schalen geben und diese 30 min bei RT stehen lassen. Medium mit 2% autologem Plasma versetzen. Die PBMNCs zählen und in Medium auf 5×10^7 Zellen in 10 ml einstellen (bei Verwendung von kleinen Platten 1 bis $1,5 \times 10^7$ in 4 ml). PBS/IgG-Gemisch aus den Platten entfernen, Platten einmal mit kaltem PBS spülen. In jede Platte 10 ml Zellsuspension pipettieren, durch vorsichtiges Schwenken verteilen und für 1 h im Brutschrank inkubieren (Tag 0). Nach 1 h werden die nicht-adhärenenten Zellen abgenommen und frisches Medium zugegeben und die Platten unter dem Mikroskop kontrolliert. Bei Bedarf den Vorgang wiederholen. Die adhärenenten Zellen ü. N. kultivieren. Am nächsten Tag das Medium abnehmen, steril filtrieren und in Aliquots einfrieren - dies ist das MCM.

2.2.8.3.2 Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen und Konservierung

Nach der Abnahme des MCM frisches Medium mit 800 U/ml IL-4 und 500 U/ml GM-CSF zugeben (Tag 1). Am übernächsten Tag (Tag 3) die Hälfte des Mediums vorsichtig abnehmen und durch frisches Medium (mit Zytokinen) ersetzen, 24 h weiter inkubieren. Die Zellen unter dem Mikroskop kontrollieren: unreife DC sind semi-adhären. Das Medium abnehmen, Platte einmal leicht mit PBS nachspülen, die Platte mit den adhären Zellen verwerfen. Ein Aliquot der Zellsuspension zum Zählen entnehmen, unreife DC mit Trypanblau in Neubauer-Zählkammer zählen. Dabei nur die lebenden DC zählen (deutlich größer als Lymphozyten). Die unreifen DC bei $220 \times g$, RT, 10 min zentrifugieren und entweder in Medium auf 2×10^6 Zellen in 3 ml einstellen (Ausreifung) oder in Einfriermedium aufnehmen und einfrieren, 1 bis 5×10^6 pro 1 ml Röhrchen (Tag 4).

2.2.8.3.3 Auftauen, Beladen und Ausreifen dendritischer Zellen

Zum Auftauen der DCs für jedes Röhrchen ein 15 ml Röhrchen mit Medium (10% HSA) vorbereiten. Röhrchen im 37°C -Wasserbad auftauen. Zum Medium geben, abzentrifugieren und einmal mit 10 ml Medium waschen, ein Aliquot zum Zählen entnehmen. In Medium (mit Zytokinen) auf 2×10^6 Zellen in 3 ml einstellen. Jeweils 3 ml Zellsuspension in ein Loch einer 6-Loch-Platte geben, ü. N. inkubieren. Wenn die DCs mit Proteinen beladen werden sollen, diese jetzt zugeben. Am nächsten Tag (Tag 5) in jedes Loch 1 ml MCM geben, vorsichtig mischen. Die DCs weitere 48 h inkubieren (Tag 7), Reifung täglich unter dem Mikroskop überprüfen. Peptidantigene an Tag 6 zugeben.

2.2.8.3.4 Kontrolle der Differenzierung und Reifung

Der Phänotyp reifer DCs ist wie folgt: die Zellen sind semi-adhären mit astartigen Ausläufern. Die DC werden durch Abnehmen des Mediums geerntet, dabei vorsichtig jedes Loch ein- bis zweimal mit dem Medium abspülen. Die DCs zählen und nach Bedarf weiter verwenden. Für die Analyse der Reifung mit Antikörpern gegen CD14, HLA-DR, CD83 und CD86 färben: ca. 5×10^5 DCs in 100 μl PBS aufnehmen, Antikörper nach Herstellerangaben zugeben, 20 min bei 4°C färben. Einmal mit PBS waschen, in 400 μl PBS resuspendieren und messen.

2.2.9 Durchflusszytometrie

2.2.9.1 Prinzip

Ein synonym verwendeter Begriff für Durchflusszytometer ist FACS (engl. *fluorescence activated cell sorting*), obwohl meistens die Zellen nur detektiert und nicht sortiert und aufgefangen werden, alternativ steht die Abkürzung FACS daher auch für *fluorescence activated cell scanning*. Im Durchflusszytometer können in sehr kurzer Zeit sehr viele Zellen charakterisiert werden. Die Zellsuspension wird eingesaugt und die einzelnen Zellen hydrodynamisch focussiert, d. h. der Flüssigkeitsstrom wird so geleitet, dass in der sogenannten Durchflusszelle, in der auch die Anregung und Messung stattfindet, eine Zelle nach der anderen in einem dünnen Flüssigkeitsstrahl an der Lichtquelle und dem Detektor vorbei läuft. Als Lichtquelle werden Laser verwendet, je nach Laser können unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe angeregt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden an Antikörper gebunden, die Antikörper binden hochspezifisch an Zellen und ermöglichen so deren Charakterisierung. Antikörper werden im Folgenden durch ein vorangestelltes "α" gekennzeichnet.

Gleichzeitig zu einer oder mehreren Fluoreszenzen wird im Zytometer auch das Streulicht gemessen, das von der Zelle zurückgeworfen wird. Das Vorwärtsstreulicht hängt davon ab, wie stark das Licht im flachen Winkel gebeugt wurde, und lässt Rückschlüsse auf die Größe der Zelle zu. Das Seitwärtsstreulicht dagegen hängt von der rechtwinkligen Beugung ab und gibt u. a. Aufschluss über die Granularität der Zelle. Die häufig verwendeten Abkürzungen für diese beiden Parameter kommen aus dem Englischen: FS oder FSC steht für *forward scatter*, SS oder SSC für *side scatter*.

Die Anzahl der Fluoreszenzkanäle ist von Zytometer zu Zytometer verschieden, sie hängt von der Lichtquelle und dem verwendeten Filtersystem ab, hier wurde ein 5-Kanal-Durchflusszytometer mit einem blauen und einem roten Laser verwendet. Fällt eine Zelle, an deren Oberfläche fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden wurden, durch die Durchflusszelle, regt der Laser den Fluoreszenzfarbstoff zur Emission an. Das Licht geht durch ein Filtersystem, so wird in jedem Fluoreszenzkanal nur ein bestimmter Ausschnitt aus dem Spektrum gemessen. Am Detektor, meist einem Photomultiplier, wird dann die Fluoreszenzintensität gemessen, sie kann linear oder logarithmisch verstärkt und dargestellt werden. Über einen an das Zytometer angeschlossenen Computer können die Messergebnisse in Echtzeit beobachtet und ausgewertet werden, die Signalverstärkung kann verändert und die Durchflussgeschwindigkeit variiert werden. Unterschiedliche Zelltypen be-

dürfen unterschiedlicher Verstärkereinstellungen, vor allem im FS/SS. Wird mehr als ein Fluoreszenzfarbstoff verwendet, muss eine Kompensation vorgenommen werden, um die Überstrahlung der einzelnen Farben rechnerisch zu korrigieren. Obwohl durch den Filterblock nur ein enger Wellenlängenbereich einem bestimmten Fluoreszenzkanal zufällt, können Störsignale aus anderen Fluoreszenzen die Ergebnisse verfälschen: Jeder Farbstoff emittiert Licht in einem bestimmten Wellenlängenbereich, er wird lediglich dem Fluoreszenzkanal zugeordnet, in den das Emissionmaximum fällt, die Randbereiche der Emissionsspektren können sich mit denen von anderen Farbstoffen überschneiden. Die Abbildung 2.3, S. 62 zeigt schematisch die Überlappung der Emissionsspektren am Beispiel der Farbstoffe FITC und PE: Die Spektren der beiden Farbstoffe überlappen sich, bei der Kompensation wird diese Überstrahlung - im Bild durch die blau gekennzeichneten Bereiche repräsentiert - von den Messwerten in FL1 und FL2 abgezogen. Um sich einen Eindruck von den Überstrahlungen und der nötigen Kompensation zu machen, werden bei der Neuerstellung von Färbungen und Messprotokollen für jeden Antikörper Einzel-färbungen vorgenommen und damit das Protokoll eingemessen.

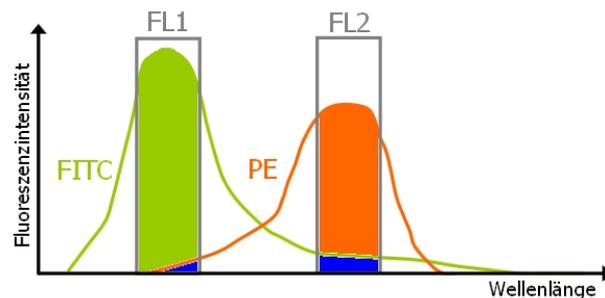


Abbildung 2.3: Schema zur Überlappung der Emissionsspektren von Fluoreszenzfarbstoffen am Beispiel von FITC (grüne Linie) und PE (orangene Linie): Die Maxima fallen in die gefilterten Bereiche für die Fluoreszenzen 1 und 2 (graue Kästen), das Spektrum von FITC reicht jedoch auch noch in FL2 hinein, das von PE in die FL1. Die blau gekennzeichneten Bereiche sind Überlagerungen und werden durch Kompensation von den Messwerten in FL1 und FL2 subtrahiert

2.2.9.2 Begriffserklärungen

2.2.9.2.1 Plots

Das Wort *plot* umschreibt hier ein Diagramm, in dem einer oder mehrere Parameter der durchflusszytometrischen Messung dargestellt werden. In einem *Dot Plot* werden 2 Kanäle, z. B. FS/SS oder 2 Fluoreszenzintensitäten, gegeneinander aufgetragen. Die Ereignisse

werden als *dots*, also Einzelpunkte dargestellt. Eine Variation des Dot Plot ist der *density plot*, bei der nicht Einzelpunkte gezeigt werden, sondern wie bei einem Hitzebild Bereichen im Plot je nach Ereignisanzahl verschiedene Farben zugewiesen werden. Im *Histogram Plot* wird nur ein Parameter betrachtet, die Zellgröße (FS), Granularität (SS) oder eine Fluoreszenzintensität wird auf der X-Achse aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Anzahl der Ereignisse.

2.2.9.2.2 Region

Eine Region ist eine definierte Ereignismenge innerhalb eines Plots. Anstatt Region könnte man auch von einer Eingrenzung einer bestimmten Zellpopulation sprechen. Regionen sind die Grundlage für *gating*. Hier typischerweise gesetzte Regionen sind z. B. "Lymphozyten" im FS/SS oder "tote Zellen" im Histogrammplot der Fluoreszenz, in die der lebend/tot Farbstoff fällt. Eine Region kann gleichzeitig auch ein Gate sein, nämlich genau das, welches die selbe Ereignismenge enthält.

2.2.9.2.3 Gate

Ein *gate* (engl.: Tor, Anschnitt, Verschluss, Schleuse) ist im Prinzip ein Filter, der bestimmte Zellen ausfiltert oder einschließt. Ein Gate ist ein logischer Ausdruck aus einer oder mehreren Regionen. Sollen z. B. nur lebende Lymphozyten in eine Messung mit einbezogen werden, so werden die Regionen "Lymphozyten" und "tote Zellen" als Gate wie folgt miteinander verknüpft: [lebende Lymphozyten = (Lymphozyten) und nicht (tote Zellen)]. Beim sogenannten sequentiellen Gating wird eine Zellpopulation nach und nach durch Setzen neuer Gates immer mehr eingegrenzt.

2.2.9.3 Allgemeine Materialien für die Durchflusszytometrie

2.2.9.3.1 Verschiedene FACS-Puffer

MACS-Puffer (vgl. 2.2.6.2.1, S. 52)

PBS mit 0,01% (w/v)

2.2.9.3.2 Antikörper

komplette Antikörperliste vgl. 2.1.3.2, S. 34

2.2.9.3.3 Zellen

ungefärbte und gefärbte PBMNCs

eventuell Zählbeads

2.2.9.3.4 Lösungen für den Betrieb des Durchflusszytometers

Sheath-Flüssigkeit

Cleanse, Spülflüssigkeit

2.2.9.3.5 Verbrauchsmaterial

5 ml Plastikröhrchen

2.2.9.3.6 Geräte

Durchflusszytometer FC500 (Beckman Coulter)

2.2.9.4 Durchführung

Bei jeder Messung zunächst FS/SS einstellen. Dann die benötigten Diagramme, Regionen und Gates erstellen. Die Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe von einzeln gefärbten Proben einstellen. Bei mehr als einem Farbstoff Kompensation durchführen.

2.3 Quantifizierung CMV-bindender T-Zellen mit Tetrameren

2.3.1 Markierung von PBMNCs mit Tetrameren

2.3.1.1 Prinzip

Um die Rekonstitution bzw. den Aufbau der Immunantwort gegen CMV in Patienten nach HSCT (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*) zu verfolgen, sollen die CMV-bindenden CD8⁺-T-Zellen mit Tetrameren quantifiziert werden. Parallel wird die Anzahl der CD3⁺-, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen bestimmt. Der CD8-Antikörper sollte nicht die Bindung des Tetramers blockieren, eine Liste der geeigneten CD8-Antikörper ist beim Hersteller der Tetramere (Beckman Coulter) oder Pentamere (Proimmune) erhältlich. Zur Bestimmung der Tetramer-bindenden Zellen wird pro passendem Tetramer (hier maximal 4, je nach HLA-Typ) ein Ansatz mit CD3- und CD8-Antikörpern, sowie dem jeweiligen Tetramer gefärbt, zusätzlich wird eine Negativkontrolle mitgeführt. Das sogenannte Negativtetramer ist eine Mischung aus allen MHC-I-Molekülen (beladen mit nicht relevanten Peptiden), diese Komplexe sollten von keiner T-Zelle erkannt werden. Durch Verwendung fluoreszierender *beads* als interner Standard kann die Anzahl der verschiedenen T-Zellen

pro Mikroliter Blut bestimmt werden. Die Anzahl der Tetramer-bindenden $CD8^+$ -T-Zellen pro Mikroliter Blut errechnet sich nach folgender Formel: $(\% \text{ spezifisches Tetramer bindende } CD8^+ \text{-T-Zellen} - \% \text{ Negativtetramer bindende } CD8^+ \text{-T-Zellen}) \times CD8^+ \text{-T-Zellen pro Mikroliter}$. Blutproben werden von Spender und Empfänger vor HSCT, und beim Empfänger nach HSCT an den Tagen +50, +100, +180 und +365 genommen, im Falle einer CMV-Reaktivierung oder bei gesteigerter Immunsuppression z. B. aufgrund einer GvHD werden in kürzeren Intervallen (mindestens wöchentlich) Proben genommen.

2.3.1.2 Materialien

2.3.1.2.1 PE-makierte MHC-I-Peptidkomplexe / Tetramere

Tetramere (von Beckman Coulter)		
HLA-Typ	Epitop aus CMV-Protein	Peptidsequenz
HLA-A*0101	pp50	VTEHDTLLY
HLA-A*0201	pp65	NLVPMVATV
HLA-A*2402	pp65	QYDPVAALF
HLA-B*0702	pp65	TPRVTGGGAM
HLA-B*0801	IE-1	ELRRKMMYM
HLA-B*3501	pp65	IPSINVHHY
Negativtetramer	—	—

Tabelle 2.18: Liste der verwendeten Tetramere und Herkunft der darin gebundenen Epitope

2.3.1.2.2 Antikörper

α CD4-PE (Beckman Coulter)
 α CD8-FITC (T8; Beckman Coulter)
 α CD3-PC7 (Beckman Coulter)
 FlowCount™ (Beckman Coulter)

2.3.1.2.3 Puffer und sonstige Reagenzien

VersaLyse (Beckman Coulter)
 Fixierungslösung (Beckman Coulter)
 PBS

2.3.1.2.4 Probenpuffer

PBS
 Paraformaldehyd (PFA) 0,01% (w/v)
 zum Lösen des PFA Lösung kurz auf 80 °C erhitzen

2.3.1.2.5 Lösungen für den Betrieb des Durchflusszytometers

siehe 2.2.9.3.4, S 64

2.3.1.2.6 Verbrauchsmaterial

siehe 2.2.9.3.5, S 64

2.3.1.2.7 Geräte

siehe 2.2.9.3.6, S 64

2.3.1.3 Durchführung

An den festgelegten Zeitpunkten werden nach Kontrolle der Zellzahl mindestens 2 ml EDTA-Blut entnommen. Der Test muss innerhalb von 24 h erfolgen. Vor Beginn der Färbung die FlowCount-Lösung kurz vortexen und bis zum Gebrauch wieder kalt stellen. Die Antikörper α CD3-PC7, α CD4-PE und α CD8-FITC werden nach Herstellerangaben eingesetzt, hier jeweils 10 μ l. Nach einigen Testversuchen zeigte sich, dass anstatt 10 μ l pro Ansatz 5 μ l Tetramer ausreichen, daher wurden 5 μ l verwendet. Zunächst in Zytometer-röhrchen die Antikörper bzw. Antikörper und Tetramere vorlegen. Beim Immunphänotyp CD3/CD4/CD8 (Röhrchen 1 - R1) werden 100 μ l Blut zugegeben, nicht auf- und abpipettieren. Für die Negativkontrolle (R2) und jedes zu testende Tetramer (R3-R6) 100 bis 400 μ l Blut in das jeweilige Zytometerröhrchen geben. Die Proben vortexen und 30 min bei RT (Raumtemperatur) inkubieren, vor Licht schützen.

Erythrozyten in allen Ansätzen wie folgt lysieren: Für Lyselösung pro 10 ml VersaLyse 250 μ l Fixierlösung zugeben, gut mischen, Lösung immer frisch ansetzen. Pro 100 μ l Blut wird 1 ml Lyse verwendet. Das Zytometerröhrchen auf Vortexer halten und während des Schüttelns die Lyse zugeben. Die Proben 15 min abgedunkelt bei RT inkubieren.

Ansatz R1 bleibt unverändert. Die Ansätze R2-R6 10 min bei $150 \times g$ abzentrifugieren, Überstand verwerfen. Mit 3 ml Probenpuffer (PBS mit 0,01% PFA) waschen, erneut zentrifugieren. Die Pellets in R2-R6 für die Zytometeranalyse in 400 μ l Probenpuffer (vgl. 2.3.1.2.4) aufnehmen. Die FlowCount-Lösung aus dem Kühlschrank nehmen und zwei- bis dreimal schwenken. Mit der selben Pipette, mit der das Blut pipettiert wurde, und dem gleichen Spitzentyp 100 μ l FlowCount in R1 geben, dabei darauf achten, dass weder Schaum noch Tropfen der Lösung an der Pipettenspitze haften. Die Proben bis zur Messung, maximal jedoch 24 h, im Kühlschrank aufbewahren. Alle Proben vor der Messung kurz vortexen.

2.3.2 Quantifizierung Tetramer-positiver Zellen im Durchflusszytometer

2.3.2.1 Prinzip

Bei der Zytometeranalyse wird durch sequentielles *gating* die Population der CD8⁺-T-Zellen festgelegt. Dazu wird zunächst eine Region um die Lymphozytenwolke im FS/SS (engl. *forward scatter/side scatter*; Trennung Zellgröße vs. Granularität) gesetzt. Beim Immunphänotyp werden zusätzlich die fluoreszierenden Beads ausgeschlossen. Dann wird die Population der CD3⁺-CD8⁺-T-Zellen eingegrenzt. Innerhalb dieser Population wird der prozentuale Anteil an Tetramer-positiven Zellen gemessen. Die Abbildung 2.4, S. 67 gibt einen Überblick über den Aufbau der Messprotokolle.

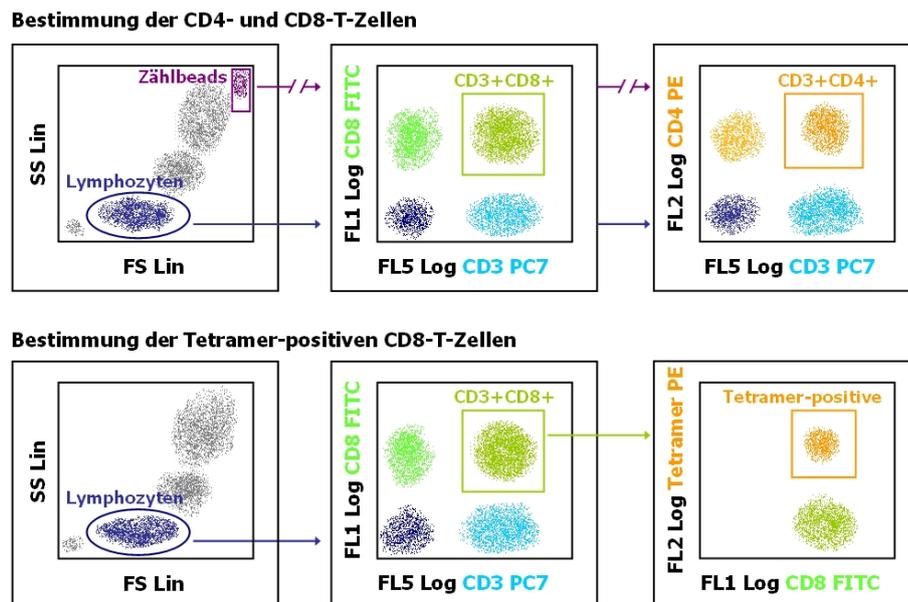


Abbildung 2.4: Ereignisfilterung (*gating*) bei der Bestimmung des Immunphänotyps (obere Reihe) und der Bestimmung der Tetramer-bindenden CD8-T-Zellen (untere Reihe): Im FS/SS Lin wird die Region “Lymphozyten” (blau) erstellt, sowie die Region “Beads” (lila). Die Beads werden ausgefiltert, innerhalb der Lymphozytenpopulation werden die CD3⁺-CD4⁺- (orange) und CD3⁺-CD8⁺-T-Zellen (grün) bestimmt (obere Reihe) bzw. innerhalb der CD3⁺-CD8⁺-T-Zellen die Tetramer-bindenden Zellen (orange; untere Reihe); FSLin/SSLin = *forward scatter versus side scatter*, lineare Darstellung, FL* Log = Fluoreszenzkanal, logarithmische Darstellung

2.3.2.2 Materialien

Proben R1 bis R6 (siehe 2.3.1.3)

2.3.2.3 Durchführung

Bei der Messung der Proben für den Immunphänotyp mindestens 1100 FlowCount-Beads und mindestens 10000 Lymphozyten akquirieren. Bei der Bestimmung der Tetramer-positiven Zellen mindestens 10000 Lymphozyten, 1000 CD3-CD8-T-Zellen und 100 Tetramer-positive Zellen akquirieren. Bei Bedarf Position der Gates anpassen.

2.3.3 Überprüfung der Funktionalität

2.3.3.1 Prinzip

Die Bindung eines Tetramers an eine T-Zelle bedeutet lediglich, dass dieser T-Zell-Klon eine Zelle mit dem entsprechenden MHC-I-Molekül und passendem CMV-Epitop auf einer infizierten Zelle binden kann. Die Funktionalität der Tetramer-bindenden T-Zellen kann festgestellt werden, wenn die Tetramerfärbung mit einer Aktivierung der T-Zellen und Bestimmung der Zytokinproduktion kombiniert wird. Zur Aktivierung der T-Zellen können entweder Gesamtprotein (pp65 oder Viruslysat) oder Peptidantigene (die gleichen wie im jeweiligen Tetramer) und Kostimulatoren - Antikörper oder Chemikalien, die an Rezeptoren an der T-Zelloberfläche binden - zugegeben werden. Der Nachweis der Zytokinproduktion durch funktionelle T-Zellen erfolgt durch intrazelluläre Färbung.

2.3.3.2 Materialien

siehe 2.2.5.2, S. 49

2.3.3.3 Durchführung

Unstimulierte Zellen dienen als Negativkontrolle, mit Superantigen stimulierte als Positivkontrolle. Als Antigen zur Stimulation der CMV-spezifischen T-Zellen wurde pp65 verwendet. Die intrazelluläre Färbung wie in 2.2.5.3, S. 51 beschrieben ansetzen und durchführen, mit folgenden Modifikationen: Für die Bestimmung IFN- γ -sezernierender Zellen

einen Ansatz, für jedes parallel zu messende Tetramer einen weiteren Ansatz machen. Die Tetramere vor Zugabe der Antigene zu den jeweiligen Ansätzen pipettieren und 10 min bei RT inkubieren. Die intrazelluläre Färbung kann auch durchgeführt werden, wenn kein Tetramer gebunden wird, dann wird wie bei den anderen IFN- γ -Bestimmungen ein IFN- γ -PE-Antikörper verwendet. Sollen IFN- γ und Tetramere im gleichen Ansatz gemessen werden, muss ein IFN- γ -Antikörper in einer anderen Farbe verwendet werden, hier APC. Proben 15 min abgedunkelt bei RT färben. Im Permeabilisierungsschritt für jeden Ansatz 10 μ l IFN- γ -PE-Antikörper (Beckman Coulter) oder 2 μ l IFN- γ -APC-Antikörper (BD Biosciences) einsetzen, *ad* 100 μ l mit FIX+PERM Lösung B.

2.4 Stimulation und Aufreinigung CMV-reaktiver Zellen - Vorversuche

2.4.1 Aufreinigung IFN- γ sezernierender Zellen nach in vitro Stimulation mit Viruslysat oder rekombinantem pp65

2.4.1.1 Prinzip

Der sogenannte "IFN- γ Detection and Enrichment Kit" (Miltenyi Biotec) wird verwendet, um CMV-reaktive T-Zellen aus dem Blut CMV-seropositiver Blutspender aufzureinigen. Zunächst wird der allgemeine Ablauf der Aufreinigung überprüft, optimiert und ein Analyseprotokoll im Durchflusszytometer erstellt. Dazu wurden CMV-positiven freiwilligen Blutspendern (nach Erläuterung der Untersuchung und Zustimmung der Probanden) ca. 50 ml Heparin-Blut abgenommen. Die PBMNCs werden durch Inkubation mit CMV-Antigenen aktiviert und anschließend aufgereinigt.

2.4.1.2 Materialien

Die Materialien für den Sekretionstest wurden bereits unter 2.2.7.2, S. 54 genannt.

2.4.1.3 Durchführung

Die Aufreinigung erfolgte zunächst nach Angaben des Herstellers (Miltenyi Biotec). Zellzahlen und Ansätze siehe Tabelle 2.17, S. 56. Bei späteren Aufarbeitungen wurde das Protokoll modifiziert, anstatt der angegebenen 20 μl pro 1×10^7 Zellen wurden 10 μl verwendet. Die Verdünnung in der Sekretionsphase wurde von ursprünglich 1 : 10 auf 1 : 100 erhöht. Vor der Bindung der anti-PE-Microbeads wurde ein Aliquot aus jedem Ansatz entnommen, um den Anteil der IFN- γ -sezernierenden Zellen zu bestimmen. Eine Anreicherung über 2 Säulen wurde angestrebt, wenn zu wenig Material gewonnen wurde, wurde auf die zweite Säule verzichtet. Das Eluat wurde für die Analyse im Durchflusszytometer in 2 Aliquots von 500 μl geteilt.

2.4.2 Analyse der verschiedenen Zellfraktionen im Durchflusszytometer

2.4.2.1 Prinzip

Die Menge der mit pp65 oder Viruslysat stimulierbaren Zellen wird anhand der Produktion von IFN- γ nachgewiesen. Dazu werden mit dem "IFN- γ Detection and Enrichment Kit" bzw. dem Sekretionstest die IFN- γ -sezernierenden Zellen mit einem Antikörper, hier PE, angefärbt und aufgereinigt. Um Unterschiede in der Rekrutierung von CD4⁺- oder CD8⁺-T-Zellen bei den verschiedenen Antigenen zu sehen, werden die Ansätze zusätzlich mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 gefärbt. Tote Zellen werden durch die Verwendung des Lebend-tot-Farbstoffes 7-AAD ausgeschlossen. Die Zellen werden im Durchflusszytometer gemessen, dabei kann durch Filtern bestimmter Populationen ihre Zusammensetzung genauer bestimmt werden.

2.4.2.2 Materialien

2.4.2.2.1 Proben und Probenpuffer

verschiedene Zellaliquots (aus 2.4.1.3)

MACS-Puffer

2.4.2.2.2 Antikörper und andere Farbstoffe

α CD4-FITC (Miltenyi Biotec)

α CD8-FITC (Miltenyi Biotec)

7-AAD

2.4.2.2.3 Analyse der Zellen im Durchflusszytometer

Lösungen/Puffer für den Betrieb des Durchflusszytometers siehe 2.2.9.3.4, S. 64

Probenröhrchen siehe 2.2.9.3.5, S. 64

Zytometer siehe 2.2.9.3.6, S. 64

2.4.2.3 Durchführung

Die stimulierten Ansätze vor Aufreinigung sowie das geteilte Eluat (vgl. 2.4.1.3) mit je 20 μ l α CD4-FITC bzw. α CD8-FITC versetzen, 20 min dunkel auf Eis inkubieren. Die Proben mit 2 ml MACS-Puffer waschen. Die Pellets in 500 μ l MACS-Puffer aufnehmen, jeweils 10 μ l 7-AAD zugeben und im Durchflusszytometer messen.

Für die Analyse der Zellen nach dem IFN- γ -Sekretionstest im FS/SS eine Region für die Lymphozyten anlegen, in dieser Region mindestens 20000 Ereignisse zählen lassen. Die maximale Ereigniszahl für den FS/SS als Stoppbedingung auf 100000 Ereignisse setzen. Einen Histogrammplot für FL4 erstellen, hier gibt das 7-AAD-Signal die Anzahl der toten bzw. apoptotischen Zellen wieder. Eine Region für die toten Zellen (positives Signal in FL4) anlegen. Danach ein Gate für lebende Lymphozyten anlegen. Einen Histogrammplot für die FL2 (Signal des anti-IFN- γ -PE) anlegen, außerdem einen *Dot Plot* mit FL1 vs. FL2, um den Anteil der CD4- bzw. CD8-positiven Zellen in der IFN- γ -positiven Population zu ermitteln, alle diese Plots auf lebende Lymphozyten filtern lassen. Im Histogramm für die FL2 eine Region für die IFN- γ -positiven Zellen erstellen.

Die vorbereiteten Proben messen. Für die Auswertung eines Spenders die Regionen anhand der Negativkontrolle einstellen, alle weiteren Proben dieses Spenders mit diesen Einstellungen analysieren.

2.5 Nachweis transfundierter CMV-Zellen *in vivo*

2.5.1 Transfusion der Zellen

Die Zellen wurden in Zusammenarbeit mit Prof. Einsele (ehemals Universität Tübingen) in der GMP-Einheit der Universität Tübingen hergestellt. Die Ethikkommission erteilte unter der Nr. 3588 am 23.08.2004 ihre Genehmigung. Die Aufreinigung erfolgte am ClinMACS (Miltenyi Biotec) mit dem "IFN- γ Cytokine Capture Assay". Als Antigen wurde

rekombinantes pp65 (Miltenyi Biotec) verwendet, die Behandlung lief als Heilversuch. Die Zellen wurden per Kurier nach Hannover gesendet und transfundiert. Das zur Aufreinigung angewandte Protokoll glich dem von Einsele *et al.* publizierten [52].

2.5.2 Nachweis der transfundierten antigenspezifischen Zellen

2.5.2.1 Prinzip

Zum Nachweis der transfundierten Zellen werden an verschiedenen Zeitpunkten nach Transfusion Blutproben entnommen. Zur Gewinnung der Zellen wurde bei der Stimulation pp65 verwendet, im Organismus werden sie jedoch mit dem ganzen Virus konfrontiert. Beim Nachweis der transfundierten Zellen wird Viruslysate als Antigen verwendet, um erstens den Nachweis der Zellen mit einem anderen Antigen durchzuführen, als es bei der Stimulation verwendet wurde, und zweitens die CD4-Antwort besser beobachten zu können. Der Nachweis der ansprechenden Zellen erfolgte mit dem Sekretionstest und anschließender Analyse der Zellen im Durchflusszytometer.

2.5.2.2 Materialien

siehe 2.2.7.2, S. 54

2.5.2.3 Durchführung

Die PBMNCs über Ficoll (vgl. 2.2.1, S. 42) aufreinigen, Zellzahl bestimmen und in RPMI mit 5% HSA auf 1×10^7 / 1 ml einstellen. Den Sekretionsassay durchführen (vgl. 2.2.7.3, S. 55), jeweils 10 µl der Reagenzien verwenden, im Sekretionsschritt 1:100 verdünnen (vgl. 2.17, S. 56). Die Proben zusätzlich mit α CD4-FITC und α CD8-FITC sowie 7-AAD färben (vgl. 2.4.2.3, S. 71) und im Durchflusszytometer messen. Zur Bewertung des klinischen Ansprechens die Messwerte mit den klinischen Daten vergleichen, insbesondere der Anzahl der pp65-positiven Leukozyten.

2.6 Etablierung von funktionellen Tests zur Beurteilung angereicherter antigenspezifischer Zellen

2.6.1 Vitalfärbung mit CFSE

2.6.1.1 Prinzip

Vitalfarbstoffe sind Reagenzien, die ausschließlich lebende Zellen anfärben. Die Funktion der Zellen soll dadurch möglichst wenig beeinträchtigt werden. Anwendungsbeispiele sind der Nachweis transfundierter Zellen *in vivo*, die Abtrennung von Populationen bei Mikroskopie und FACS-Analytik oder Untersuchungen der Zellteilung oder des Absterbens von Zellen. Je nach Anwendung sind Eigenschaften wie Erhaltungsdauer der Färbung, Weitergabe des Farbstoffs an Tochterzellen und Zerstörung des Farbstoffes / Signals beim Absterben der Zelle wichtig.

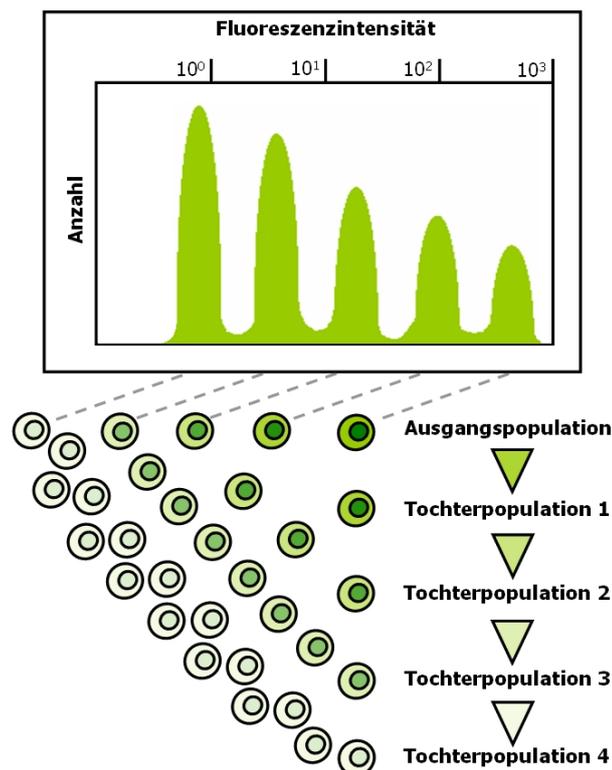


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Weitergabe des Vitalfarbstoffes CFSE (Carboxyfluoresceinsuccinimidylester) an die Tochterpopulationen (unten) und den daraus resultierenden Signalen im Durchflusszytometer (oben).

Für durchflusszytometrische Tests und *in vivo tracking* wird Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE) verwendet. Die geeignete Konzentration des Farbstoffes muss für jeden Zelltyp und die jeweilige Anwendung experimentell festgestellt werden, da die Zellen je nach Art (humane Zellen, Mauszellen, Zelllinie etc.) und Zustand (frisch, kultiviert, aufgetaut etc.) unterschiedlich stark gefärbt werden. Das CFSE bzw. eigentlich CFDA SE (Carboxy-Fluorescein-Di-Acetat Succinimidylester), diffundiert passiv in die Zellen. Es bleibt farblos und fluoresziert nicht, bis die Acetatgruppen von interzellulären Esterasen abgespalten werden. Dadurch entsteht das stark fluoreszierende CFSE. Die Succinimidylestergruppen reagieren mit intrazellulären Aminen und bilden so fluoreszierende Konjugate. Diese können z. B. mit Formaldehyd fixiert werden. Überschüssiges CFDA SE diffundiert wieder aus der Zelle ins umgebende Medium und kann ausgewaschen werden. Die angefärbten Zellen behalten ihre Fluoreszenz und geben die Konjugate bei Teilungen gleichmäßig an die Tochterzellen weiter. Dadurch bilden sich nach längere Kulturdauer unterschiedlich stark fluoreszierende Populationen aus, wobei mit jeder Teilung die Signalintensität halbiert wird (vgl. Abb. 2.5, S.73). Werden die Zellen abgetötet, so werden auch die fluoreszierenden Konjugate zerstört. Der Farbstoff erfährt dabei keine Rekonstitution, so dass er andere Zellen nicht erneut färben kann.

2.6.1.2 Materialien

2.6.1.2.1 Reagenzien

CFSE (Sigma)

DMF (*N,N*-Dimethylformamid)

PBS

RPMI-Medium

20% HSA-Lösung

2.6.1.2.2 CFSE-Stammlösung

10 mM in DMF

2.6.1.2.3 CFSE-Färbelösung

CFSE-Stammlösung

1:1000 in PBS

2.6.1.2.4 Blocken der Färbung

20% HSA-Lösung

2.6.1.2.5 Verbrauchsmaterial

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.2, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.10, S. 46

2.6.1.2.6 Geräte

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.3, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.11, S. 46

Rotationsmischer "MACS-Mix"

Eisbad

2.6.1.3 Durchführung

10 mM Stammlösung in DMF ansetzen, in Aliquots bei -20°C lagern. Zwischen 10 und 20 μl CFSE-SL mit 10 ml PBS mischen (1:500 oder 1:1000, ergibt 20 bzw. 10 μM Färbelösung), für geringere Konzentrationen entsprechend weiter verdünnen (für humane PBMNCs 0,2 bis 2 μM), auf 37°C erwärmen. Zellen vor der Färbung mindestens einmal mit PBS waschen, um Serumrückstände zu entfernen. Die zu färbenden Zellen pelletieren und in der warmen Färbelösung resuspendieren, 10 bis 15 min bei 37°C inkubieren. Nach der Inkubation die Färbung durch Zugabe von 2 ml 20% HSA (oder FKS) abstoppen, Ansatz 2 min auf Eis stellen, dann bei ca. $300 \times g$ abzentrifugieren. Zellen noch ein- bis zweimal mit 10 ml kaltem PBS waschen. Das Zellpellet weist je nach Färbeintensität eine zarte bis deutliche hellgrüne Färbung auf. Die Zellen je nach Verwendungszweck weiter verarbeiten.

2.6.2 Proliferationstest mit CFSE

2.6.2.1 Prinzip

T-Zellen beginnen bei Kontakt mit einer APZ mit passendem Antigen nicht nur mit der Produktion von Zytokinen, aktivierte Klone beginnen auch zu proliferieren. Die Proliferation gilt als deutliches Zeichen der Antigenpezifität und Aktivität des jeweiligen Klons. Die *mixed-lymphocyte-cultures* (MLC) werden verwendet, um bei Stammzellspenden die Verträglichkeit zwischen Spender- und Empfängerzellen im Hinblick auf HLA-II zu überprüfen: kommt es bei der Kokultivierung von Lymphozyten beider Personen zu einer Proliferation, deutet dies auf eine Alloreaktion hin. Die Zellproliferation wird klassisch über H^3 -Thymidineinbau bestimmt, nicht radioaktive Methoden unter Verwendung von

Vitalfarbstoffen lösen diese aber immer mehr ab, vor allem weil sie mehr Möglichkeiten zur Charakterisierung der proliferierenden Zellen geben [53], in Mäusen auch *in vivo* anwendbar [54] und sensitiver sind [55].

Um die Testmethode zu etablieren, soll die Mitogen-induzierte Proliferation von PBMNCs mit CFSE-Färbung verfolgt werden, dieser Ansatz kann später auch als Positivkontrolle dienen. Danach wird zur Simulation der späteren Testbedingungen mit aufgereinigten T-Zellen eine kommerziell erhältliche Zelllinie gegen das HLA-A*02-Epitop NLVPMVATV mit CFSE angefärbt und die Proliferation mit NLVPMVATV-Peptid beladenen T2-Zellen angeregt. Die T2-Zellen sind positiv für HLA-A2 und B5, allerdings wird das B5-Molekül nicht auf der Oberfläche exprimiert [56], [57]. Da die T2 TAP-defizient sind, können sie keine Proteinantigene prozessieren, sondern nur exogen mit Peptiden beladen werden; dabei werden die A2-Moleküle durch die Bindung passender Epitope stabilisiert.

2.6.2.2 Materialien

2.6.2.2.1 CFSE-Färbung

CFSE-SL (siehe 2.6.1.2.2, S. 74)

Blocken der Färbung (siehe 2.6.1.2.4, S. 74)

2.6.2.2.2 Zytokine und andere Mediumzusätze

IL-2 (Proleukin), 1000 × Lösung, steril filtriert

PMA (vgl. 2.2.5.2.2, S. 49) Ionomycin (vgl. 2.2.5.2.3, S. 50)

2.6.2.2.3 Medien

T-Zellmedium (siehe 2.2.3.2.7, S.46)

T-Zellmedium zur Expansion (siehe 2.2.3.2.8, S.46)

(T-Zellmedien mit RPMI und HSA ansetzen)

T2-Medium (siehe 2.2.3.2.9, S.46)

2.6.2.2.4 Verbrauchsmaterial

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.2, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.10, S. 46

25 cm² Flaschen mit Filterdeckel

2.6.2.2.5 Geräte

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.3, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.11, S. 46

Rotationsmischer "MACS-Mix"

Eisbad

2.6.2.3 Durchführung

2.6.2.3.1 Austesten der geeigneten Farbstoffkonzentration

Es werden für beide Versuche jeweils ca. 20 ml Blut benötigt. Zur Etablierung der CFSE-Färbung werden verschiedene Farbstoffkonzentrationen von 0,5 bis 10 μM ausgetestet, dabei werden humane PBMNCs jeweils 15 min gefärbt. In einer 24-Loch-Platte werden pro Loch 1×10^6 gefärbte PBMNCs ausgesät, pro Konzentration 4 Löcher, zusätzlich 4 Löcher mit ungefärbten PBMNCs. An Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 10 wird jeweils ein Loch der ungefärbten Zellen und von jeder CFSE-Konzentration geerntet. Die Zellen werden mit 5 ml PBS gewaschen, in 400 μl PBS resuspendiert und mit 20 μl 7-AAD gefärbt. Dann wird die Fluoreszenzintensität der CFSE-Färbung und der Anteil der toten bzw. apoptotischen Zellen im Durchflusszytometer gemessen.

2.6.2.3.2 Etablierung des Proliferationstests an proliferierenden PBMNCs

Zur Etablierung des Proliferationstests werden (nachdem die optimale Konzentration der Färbelösung ermittelt worden ist) ca. 7×10^6 frisch isolierte PBMNCs mit 1 mM CFSE 15 min gefärbt. Die Zellen werden gewaschen und in RPMI mit 5% HSA und 5 U/ml IL-2 auf 10^6 Zellen / 1 ml eingestellt. In einer 24-Loch-Platte werden 6 Löcher mit 1 ml der gefärbten Zellen ausgesät, als Kontrolle außerdem 3 Löcher mit ungefärbten Zellen. Zu 3 Ansätzen der gefärbten Zellen werden PMA/Ionomycin und 50 U/ml IL-2 gegeben. Die restlichen gefärbten und ungefärbten Zellen werden noch am gleichen Tag (Tag 0) im Durchflusszytometer gemessen (Färbung mit 7-AAD wie oben). An den Tagen 1, 4, und 7 werden ungefärbte Zellen, CFSE-gefärbte, unstimulierte Zellen und CFSE-gefärbte stimulierte Zellen (PMA/Ionomycin und IL-2) geerntet, mit 7-AAD gefärbt und gemessen, dabei wird zusätzlich zur Simulation der späteren Situation, in der gefärbte und ungefärbte Zellen gleichzeitig messbar sein sollen, ein Ansatz aus CFSE-gefärbten und ungefärbten Zellen gemischt.

2.6.2.3.3 Testlauf mit expandierten CMV-spezifischen T-Zellen

Von zwei CMV-seropositiven Blutspendern werden aus jeweils 200 ml Vollblut PBMNCs isoliert. Ein Teil ($1,5 \times 10^7$ Zellen) wird zur Herstellung von DCs verwendet (vgl. 2.2.8.3, S. 59). Die DCs zur Ausreifung in mindestens 3 Ansätze aufteilen, in 2 Ansätze an Tag

5 je 20 μ l bzw. 40 μ l pp65 geben. 4×10^7 PBMNCs werden für eine Anreicherung von CMV-T-Zellen mittels IFN- γ -Sekretionstest verwendet, dabei werden in die Positiv- und Negativkontrolle jeweils nur 10^6 Zellen in einer 96-Loch-Platte verwendet. Die Ansätze mit pp65 werden steril aufgearbeitet und ein Aliquot zur Analyse im Zytometer entnommen. Die übrigen Zellen werden in T-Zellmedium zur Expansion (RPMI 1640, mit HSA) in einer 24-Loch-Platte bei maximal 10^6 /Loch ausgesät. In die Hälfte der Ansätze werden als Fütterzellen jeweils 5×10^6 bestrahlte Zellen (30 Gy) aus dem Säulendurchfluss gegeben. Die Zellen alle 48 h im Mikroskop kontrollieren, bei Bedarf teilen und frisches Medium zugeben. Nach einer Expansion von 7 Tagen die Zellen ernten. Einen Proliferationstest mit 1×10^5 expandierten CMV-T-Zellen 1×10^4 DC durchführen.

2.6.2.3.4 Proliferationstest mit kommerzieller Zelllinie

2.6.2.3.5 Kultivierung von T2-Zellen

Die Zellen in RPMI1640 mit 20% FKS und Gentamycin in 25 cm² Flaschen kultivieren, alle 2 bis 3 Tage 1:4 splitten

2.6.2.3.6 Auftauen der Zelllinie

Zelllinie gegen das HLA-A02-Epitop NLVPMVATV (proimmune, UK; im Folgenden als CTL_{NLVP} bezeichnet) nach Herstellerangaben auftauen, dazu die Zellen kurz bei 37 °C auftauen, in 50 ml Röhrchen überführen und langsam 9 ml warmes Medium (hier CellGro) zutropfen. Dann 10 ml kaltes Medium zugeben und bei $450 \times g$ 10 min abzentrifugieren. Überstand verwerfen und Zellen in 3 ml Medium (mit 5 U/ml IL-2) aufnehmen, über Nacht im Brutschrank ruhen lassen.

Messung	T-Zellen, ungefärbt, allein	T-Zellen, CFSE, allein	T-Zellen, CFSE vs. unbeladene T2	T-Zellen, CFSE vs. beladene T2
Tag 1	5×10^5 CTL	5×10^5 CTL	5×10^5 CTL + 5×10^4 T2	5×10^5 CTL + 5×10^4 T2
Tag 4	5×10^5 CTL	5×10^5 CTL	5×10^5 CTL + 5×10^4 T2	5×10^5 CTL + 5×10^4 T2
Tag 7	5×10^5 CTL	5×10^5 CTL	5×10^5 CTL + 5×10^4 T2	5×10^5 CTL + 5×10^4 T2
Bedarf an Zellen				
CTL	$1,5 \times 10^6$ CTL	$1,5 \times 10^6$ CTL	$1,5 \times 10^6$ CTL	$1,5 \times 10^6$ CTL
T2	—	—	$1,5 \times 10^5$ T2	$1,5 \times 10^5$ T2

Tabelle 2.19: Ansatz des Proliferationstests mit Zelllinie gegen das HLA-A02-Epitop NLVPMVATV (CTL) gegen Peptid-beladene T2-Zellen (T2)

2.6.2.3.7 Beladung der T2 und Ansetzen des Tests

T2-Zellen abzentrifugieren, in frischem Medium (RPMI1640, 10% FCS, Gentamycin) aufnehmen, mit Peptid NLVPMVATV beladen, dazu $10 \mu\text{g/ml}$ Peptid zugeben und ü. N. im Brutschrank inkubieren. Die T2-Zellen am nächsten Tag bei $300 \times g$ abzentrifugieren, auf $5 \times 10^4/50 \mu\text{l}$ einstellen und bestrahlen (30 Gy). Die Zelllinie CTL_{NLVP} mit CFSE färben, auf $5 \times 10^5/50 \mu\text{l}$ einstellen und Proliferationstest in 24-Loch-Platte ansetzen (Endvolumen $100 \mu\text{l/Loch}$), 5×10^5 T-Zellen gegen 5×10^4 T2. Die Tabelle 2.19 gibt einen Überblick über die Beladung der Platte und den Bedarf an Zellen.

2.6.3 Degranulationstest

2.6.3.1 Prinzip

Wird eine zytotoxische Zelle aktiv und beginnt mit der Ausschüttung ihrer Granula, gelangen Lysosom assoziierte Proteine, LAMP (engl. *lysosome associated membran protein*) an die Zelloberfläche. Daher kann das LAMP-1 bzw. CD107a zum Nachweis einer zytotoxischen Reaktion einer Zelle dienen. Kombiniert man die Färbung gegen CD107a mit einer Färbung zur Feststellung von Apoptose, kann gleichzeitig das Absterben der angegriffenen Zellen beobachtet werden [37], [38]. Wichtig ist bei dem Test, dass der CD107a-Antikörper bereits in der Lösung vorhanden ist, bevor das Antigen zugegeben wird, damit er dann

sofort binden kann. Außerdem muss den Ansätzen nach 1 h Brefeldin A oder Monensin zugegeben werden, beide verhindern die vollständige Ablösung der zur Oberfläche gewanderten Membranen und Proteine.

2.6.3.2 Materialien

2.6.3.2.1 Zelllinien

vgl. Zelllinien beim Proliferationstest mit kommerzieller Zelllinie 2.6.2.2.3, S. 76

2.6.3.2.2 CFSE-Färbung

CFSE-SL (siehe 2.6.1.2.2, S. 74)

Blocken der Färbung (siehe 2.6.1.2.4, S. 74)

2.6.3.2.3 Färbung auf CD107a

BFA-SL (siehe 2.2.5.2.5, S. 50)

α CD107a-PC5 (BD Biosciences)

2.6.3.2.4 Färbung für Analyse im Durchflusszytometer

Annexin-V-PE, mit Annexinbindepuffer (Beckman Coulter)

α CD3-PC7 (Beckman Coulter)

2.6.3.2.5 Verbrauchsmaterial

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.2, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.10, S. 46

25 cm² Flaschen mit Filterdeckel

2.6.3.2.6 Geräte

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.3, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.11, S. 46

Rotationsmischer "MACS-Mix"

Eisbad

2.6.3.3 Durchführung

Die Zelllinie CTL_{NLVP} und die T2-Zellen wie beim Proliferationstest vorbereiten (vgl. 2.6.2.3.4, S. 78). Am nächsten Tag die CTL mit CFSE färben, um die Effektorpopulation von den Zielzellen abzugrenzen. Danach auf 2×10^6 Zellen in 200 μ l Medium einstellen. Die T2-Zellen bei $300 \times g$ abzentrifugieren, auf $1 \times 10^5/100 \mu$ l einstellen. In einer 96-Loch-Platte jeweils ein Loch mit 200 μ l CTL füllen, seriell verdünnen und 20 μ l CD107a-PC5 zugeben. Beladene und unbeladene T2 zugeben, außerdem je ein Loch nur mit den T2 füllen (Kontrolle der maximalen Vitalität) und die Platte 1 h im Brutschrank inkubieren.

Die Abbildung 2.6 gibt einen Überblick über die Beladung der 96-Loch-Platte. Danach BFA (10 µg/ml) zu jedem Ansatz geben und ü. N. weiter inkubieren. Am nächsten Tag die Zellen nach Herstellerangaben (Beckman Coulter) mit Annexin-V-PE und αCD3-PC7 färben.

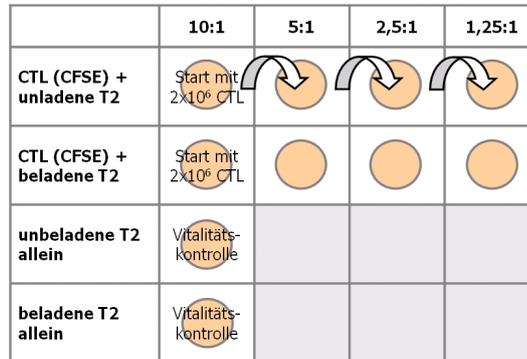


Abbildung 2.6: Beladung der Platte für den Degranulationstest: in den Löchern für die 1:10, 1:5 und 1:2,5 Ansätze 100 µl Medium vorlegen, in die Löcher für 1:20 Verdünnung 200 µl Zellsuspension mit 1 × 10⁶/100 µl CTL_{NLVP} geben, jeweils 100 µl von links nach rechts in nächste Loch geben und mischen (serielle Verdünnung); anschließend die Zielzellen (T2) zugeben

2.7 Austestung verschiedener GMP-Medien bei der Stimulation, Anreicherung und Expansion CMV-spezifischer T-Zellen

2.7.1 Isolierung mononukleärer Zellen für den Medienvergleich

2.7.1.1 Prinzip

Das Prinzip der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation wurde bereits unter 2.2.1.4, S. 43 erläutert. Für die Aufarbeitung einer Blutkonserve sind die LeukoSepTM-Röhrchen besser geeignet, da die Aufreinigung so schneller und einfacher ist. Die isolierten PBMNCs werden sowohl für den Sekretionstest, als auch zur Isolierung von CD3⁺-T-Zellen und zur Generierung von DCs verwendet.

2.7.1.2 Materialien

2.7.1.2.1 Isolierung von PBMNCs

Ficoll und PBS (siehe 2.2.1.2.1, S. 42)

2.7.1.2.2 DC-Generierung

DC-Medium (siehe 2.2.8.2.1, S. 58)

DC-Medium mit Zytokinen (siehe 2.2.8.2.3, S. 58)

autologes Plasma (siehe 2.2.2.2.1, S. 44)

Zytokine (siehe 2.2.8.2.2, S. 58)

humanes IgG (siehe 2.2.8.2.4, S. 59)

MCM (siehe 2.2.8.2.4, S. 59)

2.7.1.2.3 CD3-Selektion

CD3-Microbeads (siehe 2.2.6.2.2, S. 52)

MACS-Puffer (siehe 2.2.6.2.1, S. 52)

2.7.1.2.4 Kryokonservierung

Einfriermedium (siehe 2.2.4.2.1, S. 48)

Auftaumedium (siehe 2.2.4.2.2, S. 48)

2.7.1.2.5 Verbrauchsmaterial

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.2, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.10, S. 46

vgl. Einfrieren von Zellen 2.2.4.2.3, S. 48

vgl. Gewinnung von Plasma 2.2.2.2.1, S. 44

Petrischalen, 10 cm Durchmesser (BD)

2.7.1.2.6 Geräte

vgl. Gewinnung von PBMNCs 2.2.1.2.3, S. 43

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.11, S. 46

Schere

2.7.1.3 Durchführung

Autologes Plasma, wie unter 2.2.2.3, S. 45 beschrieben, herstellen. Die Isolation der PBMNCs durchführen (vgl. 2.2.1.4, S. 43), 2×10^7 für eine spätere CD3-Isolation einfrieren oder CD3-Anreicherung wie unter 2.2.6.3, S. 53 durchführen und die CD3-positiven Zellen einfrieren. Zur Isolation der CD3-Zellen 2×10^7 PBMNCs verwenden. 1 bis $1,5 \times 10^7$ PBMNCs zur Generierung von DCs wie unter 2.2.8.3, S. 59 verwenden.

2.7.2 Vergleich verschiedener Medien bei der Gewinnung von CMV-spezifischen, IFN- γ sezernierenden T-Zellen

2.7.2.1 Prinzip

Um die Aufreinigung von CMV-spezifischen T-Zellen über IFN- γ Sekretion für den klinischen Einsatz zu optimieren, werden die Medien X-Vivo15 und CellGro, beide GMP-konform hergestellt und für den klinischen Einsatz geeignet, parallel mit dem sonst für die Kultur von PBMNCs eingesetztem RPMI1640 verwendet. Die Zellzahl in verschiedenen Aufreinigungsschritten, die Vitalität der Zellen sowie Reinheit/Anreicherungsgrad der IFN- γ -sezernierenden Population werden für die verschiedenen Ausgangsmaterialien verglichen. Als Ausgangsmaterial dienen frische Blutkonserven HLA-A*02-positiver, CMV-positiver Blutspender.

Die aufgereinigten CMV-T-Zellen werden auf ihre Funktionalität hin überprüft, dazu werden als Vergleich CD3⁺-Zellen aus der selben Blutspende isoliert. Außerdem werden DC generiert, die dann mit CMV-Antigen beladenen und zur Stimulation der aufgereinigten CMV-T-Zellen und CD3⁺-Zellen benutzt werden. Um die Alloreaktivität abzuschätzen, werden außerdem DC von einem vierten, nicht HLA-A*02-positiven Blutspender generiert.

Da die Anzahl der aufgereinigten T-Zellen bei der Durchführung im Labormaßstab nicht für funktionelle Untersuchungen ausreicht, wird eine unspezifische Expansion der aufgereinigten CMV-T-Zellen mit IL-2 durchgeführt. Die verschiedenen Medien werden dabei auch auf ihre Eignung für die Expansion getestet.

Um herauszufinden, ob auch kryokonserviertes Material für den Sekretionstest geeignet ist, wird der Sekretionstest mit kryokonservierten Zellen wiederholt. Zum Vergleich wird parallel zur Kontrolle eine intrazelluläre Färbung angesetzt, die auch bei eingefrorenen Zellen Ergebnisse liefert.

2.7.2.2 Materialien

2.7.2.2.1 Sekretionstest

siehe 2.2.7.2, S. 54

2.7.2.2.2 Antikörper und Farbstoffe für Analyse im Zytometer

α CD3-PC7 (Beckman Coulter)

α CD4-FITC (Beckman Coulter)

α CD8-FITC (Beckman Coulter)

7AAD (Beckman Coulter)

2.7.2.2.3 Analyse der Zellen im Durchflusszytometer

Lösungen/Puffer für den Betrieb des Durchflusszytometers siehe 2.2.9.3.4, S. 64

Probenröhrchen siehe 2.2.9.3.5, S. 64

Zytometer siehe 2.2.9.3.6, S. 64

2.7.2.3 Durchführung

Der Versuchsablauf beim Medienvergleich erstreckt sich über minimal 7 Tage bis 2 Wochen, je nach Ausbeute an CMV-T-Zellen und der nötigen Expansionsphase. Die eingesetzten Zellmengen, Medien und Verdünnungen etc. sind der Tabelle 2.17, S. 56 zu entnehmen.

Nach der ü.N. Stimulation ein Aliquot der Zellen zum Zählen entnehmen. Vor der Sekretionsphase und nach der Sekretionsphase ca. 1×10^6 Zellen für Analyse im Zytometer entnehmen. Aus dem 1 ml Eluat 200 μ l für Analyse im Zytometer entnehmen, die Zellzahl bestimmen, die übrigen Zellen pelletieren und in dem jeweiligen Medium mit 10% autologem Plasma und 50 U/ml IL-2 aufnehmen und expandieren, bis ausreichend Zellen für den Proliferationstest zur Verfügung stehen. Die Färbung für die Analyse im Zytometer ist der Tabelle 2.20, S. 85 zu entnehmen.

Zur Generierung der "alloDC" wurde eine nicht HLA-A*02-positive Blutkonserve verwendet, unreife DCs in Aliquots zu 2×10^4 eingefroren und bei Bedarf wieder aufgetaut (siehe 2.2.8.3, S. 59).

Für die Wiederholung des Sekretionstests (mit jeweils 1×10^7 Zellen pro Ansatz) und zum Ansetzen der intrazellulären Färbung Zellen auftauen (2.2.4.3.2, S. 48), intrazelluläre Färbung (2.2.5.3, S. 51) durchführen und Zellen im Durchflusszytometer analysieren.

Färbung der Proben für die Analyse im Durchflusszytometer					
Nr.	Probe	FL1	FL2	FL4	FL5
1	-K 7AAD	—	—	7AAD	—
2	-K CD4/CD8	α CD4-FITC	—	7AAD	α CD8-PC7
3	pp65 7AAD	—	—	7AAD	—
4	SEB 7AAD	—	—	7AAD	—
5	-K vor Säule	—	α IFN- γ -PE	7AAD	—
6	pp65 vor Säule	—	α IFN- γ -PE	7AAD	—
7	SEB vor Säule	—	α IFN- γ -PE	7AAD	—
8	pp65 aufgereinigt CD4/CD8	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	7AAD	α CD8-PC7

Tabelle 2.20: Überblick über die Färbung der verschiedenen Proben aus dem Sekretionstest beim Medienvergleich: -K = Negativkontrolle, SEB = Positivkontrolle, pp65 = mit pp65 stimulierte Zellen; 1-4 vor der Sekretionsphase, “vor Säule” Ansätze nach Sekretionsphase vor Aufreinigung, “aufgereinigt” nach Anreicherung über 2 Säulen, 7AAD = Lebend-tot-Farbstoff.

2.7.3 Expansion und Überprüfung der Funktionalität

2.7.3.1 Prinzip

Durch Anfärben der aufgereinigten T-Zellen mit CFSE und der anschließenden Kokultur mit beladenen autologen DCs oder unbeladenen allogenen DCs kann deren Antigen-spezifität bestimmt bzw. Alloreaktivität ausgeschlossen werden. Als Vergleich zu aufgereinigten, antigenspezifischen T-Zellen können nicht stimulierte CD3⁺-T-Zellen dienen. Die aufgereinigten CMV-T-Zellen proliferieren optimaler Weise nur in der Kokultur mit den CMV-Antigen-beladenen DCs (hier pp65), nicht jedoch bei den unbeladenen DC. Die CD3⁺-T-Zellen können Hinweise auf alloreaktive T-Zell-Klone geben, im direkten Vergleich sollten die aufgereinigten CMV-T-Zellen mehr spezifische Proliferation und wenig bis keine Alloreaktivität im Vergleich zu den CD3⁺-T-Zellen zeigen.

2.7.3.2 Materialien

2.7.3.2.1 Expansion der T-Zellen

T-Zellmedium für Expansion (siehe 2.2.3.2.8, S. 46)
mit RPMI1640, CellGro und X-Vivo 15 ansetzen

2.7.3.2.2 Verbrauchsmaterial

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.10, S. 46

vgl. Materialien bei CD3-Selektion 2.2.6.2.3, S. 52

2.7.3.2.3 Geräte

vgl. Kultur von PBMNCs 2.2.3.2.11, S. 46

vgl. Materialien bei CD3-Selektion 2.2.6.2.4, S. 53

2.7.3.2.4 Proliferationstest

CFSE-Färbung siehe 2.6.1.2, S. 74 α CD3-PC7 (Beckman Coulter)

α CD4-PE (Beckman Coulter)

α CD8-PC5 (Beckman Coulter)

CFSE-SL

2.7.3.3 Durchführung

2.7.3.3.1 Beladung der DC mit Antigenen

Die unreifen DCs werden entweder aufgetaut oder an Tag vier aus der Petrischale entnommen und in 3 Löcher einer 6-Loch-Platte verteilt. Je 2×10^6 unreife DC pro Loch aussähen und mit 20 μ l bzw. 40 μ l pp65 beladen. Ein Ansatz mit autologen DC und die "alloDC" bleiben als Kontrollansätze unbeladen: die unbeladenen autologen DCs dienen zur Bestimmung der Hintergrundproliferation, die "alloDC" haben einen anderen HLA-Typ (sogenannte *3rd party* Kontrolle) und sollen alloreaktive T-Zellen zur Proliferation bringen. Am nächsten Tag MCM zum Ausreifen zugeben, Details zur DC-Generierung unter 2.2.8.3 ab S. 59.

2.7.3.3.2 CFSE-Färbung

Die CFSE-Färbung wurde bereits unter 2.6.1.3, S. 75 erläutert. Die T-Zellen werden mit 2 μ M CFSE-Lösung für 30 min gefärbt.

2.7.3.3.3 Proliferationstest

Der Test wird in einer 96-Loch-Platte durchgeführt, eine Übersicht zur Beschickung der Platte findet sich in Abbildung 2.7. Folgende Ansätze werden für jedes Medium getestet:

1. Negativpopulation: nicht CFSE gefärbte CMV-T-Zellen oder CD3+ (allein)
2. Negativkontrolle: CFSE-gefärbte CMV-T-Zellen oder CD3+ vs. autologe, unbeladene DCs
3. Spezifitätstest: CFSE-gefärbte CMV-T-Zellen oder CD3+ vs. autologe, pp65-beladene DCs
4. allo Kontrolle: CFSE-gefärbte CMV-T-Zellen oder CD3+ vs. allogene, unbeladene DCs
5. Positivpopulation: CFSE-gefärbte CMV-T-Zellen oder CD3+ (allein)
6. Positivkontrolle: CFSE-gefärbte CMV-T-Zellen oder CD3+ mit PMA + Ionomycin (+ allo DCs)

2.7. Austestung verschiedener GMP-Medien bei der Stimulation, Anreicherung und Expansion

Platten-Setup 96-Loch-Platte												
Datum:	Versuch: Proliferatiostest		Zellzahl(en): Responder: 10 ⁵ /well Stimulatoren: 10 ⁴ /well			Medien: RPMI / Pen Strep / 10% autologes Plasma CellGro / 50 µg/ml Gentamycin / 10% autologes Plasma X-Vivo 15 / 10% autologes Plasma						
	1 CMV-T	2 CD3+	3	4 CMV-T	5 CD3+	6	7 CMV-T	8 CD3+	9	10	11	12
	RPMI			CellGro			X-Vivo 15					
A ungef.	allein	allein		allein	allein		allein	allein				ungef. Kontrolle
B CFSE	allein	allein		allein	allein		allein	allein				CFSE Kontrolle
C CFSE	auto. DCs unbel.	auto. DCs unbel.		auto. DCs unbel.	auto. DCs unbel.		auto. DCs unbel.	auto. DCs unbel.				Negativkontrolle
D CFSE	auto. DCs pp65	auto. DCs pp65		auto. DCs pp65	auto. DCs pp65		auto. DCs pp65	auto. DCs pp65				Spezifitätstest
E CFSE	allo. DCs unbel.	allo. DCs unbel.		allo. DCs unbel.	allo. DCs unbel.		allo. DCs unbel.	allo. DCs unbel.				allo Kontrolle
E CFSE	allo. DCs PHA	allo. DCs PHA		allo. DCs PHA	allo. DCs PHA		allo. DCs PHA	allo. DCs PHA				Positivkontrolle
G												
H												

Abbildung 2.7: Beschickung der 96-Loch-Platte für den Proliferationstest beim Medienvergleich: links ist vermerkt, ob die T-Zellen mit CFSE gefärbt wurden (grün), rechts sind die einzelnen Ansätze benannt; in den einzelnen Löchern werden die verwendeten DCs und Antigene genannt: autologe DCs (hellblau), allogene DCs (orange), pp65 (blau) und PMA/Ionomycin ("PHA", rot). Alle Ansätze werden sowohl für die CMV-T-Zellen als auch für die CD3⁺-T-Zellen in jedem Medium gemacht.

Pro Loch werden 50 µl T-Zell-Suspension mit 50 µl DC-Suspension gemischt. Für die Positivkontrolle die PMA-SL (0,5 mg/ml) 1:1000 mit Medium verdünnen, 1 µl davon auf 100 µl Kulturmedium (= 5 ng/ml) geben, die Ionomycin-SL (1 mg/ml) 1:10 mit Medium verdünnen, 0,5 µl davon auf 100 µl Kulturmedium geben (= 500 ng/ml), außerdem 50 U/ml IL-2 zugeben. Die Platte 7 Tage bei 37 °C inkubieren, dann die Zellen ernten, in 5 ml Röhrchen überführen und mit 2 ml PBS waschen. In 100 µl PBS resuspendieren und gegen CD3, CD4 und CD8 färben (15 min, RT), erneut waschen, in 500 µl PBS resuspendieren und im Durchflusszytometer messen.

2.8 Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionsassay

2.8.1 Aufreinigung IFN- γ sezernierender Zellen

2.8.1.1 Prinzip

Neben den IFN- γ -produzierenden T-Zellen und toten Zellen sind auch noch andere lebende Zellen im Eluat nach der Anreicherung der IFN- γ -produzierenden Zellen vorhanden, die IFN- γ -positive Population besteht nicht ausschließlich aus T-Zellen. Um die Zusammensetzung des Eluates genauer zu bestimmen und später Qualitätsstandards zu definieren, werden CMV-T-Zellen mittels IFN- γ -Sekretionstest angereichert und das Eluat mit Antikörpern gegen Oberflächenmarker verschiedener wichtiger Immunzellen (B-Zellen, NK-Zellen) charakterisiert.

Die verwendeten Proben stammen von CMV-seropositiven, HLA-typisierten Blutspendern. Der HLA-Typ soll in die Auswertung mit einbezogen werden, um eine potentielle HLA-Abhängigkeit der Stimulationswirkung des pp65 abzuschätzen. Außerdem werden PBMCs dieser gut charakterisierten Proben kryokonserviert, um Material für weitere Tests (Degranulationstest; Stimulation mit rekombinanten Proteinen) zur Verfügung zu haben.

2.8.1.2 Materialien

2.8.1.2.1 Sekretionstest

siehe 2.2.7.2, S. 54

2.8.1.3 Durchführung

Es werden 10 CMV-seropositive, HLA-typisierte Blutspender einbestellt, einer pro Woche. 450 ml Blut werden aufgearbeitet, ein Teil der Zellen wird für den Sekretionstest verwendet, der Rest wird vital eingefroren. Den Sekretionstest mit je 1×10^8 Zellen für den Ansatz mit pp65 und den Ansatz mit CMV-Lysat durchführen (vgl. 2.2.7.3, S. 55 und Tabelle 2.17, S. 56), Positiv- und Negativkontrolle mit 1×10^7 Zellen. Parallel eine

intrazelluläre Färbung mit 1×10^6 PBMNCs für die Ansätze mit pp65 bzw. Lysat und $0,5 \times 10^6$ PBMNCs für die Kontrollen (vgl. 2.2.5.3, S. 51) ansetzen.

2.8.2 Analyse im Durchflusszytometer

2.8.2.1 Prinzip

Die mit unterschiedlichen Antigenen stimulierten Zellen vor und nach Anreicherung werden in 4 Aliquots aufgeteilt und zusätzlich zu der Färbung auf IFN- γ mit Antikörpern gegen die typischen Oberflächenmarker für T-Zellen (CD3, CD4 oder CD8), B-Zellen (CD19, CD20), NK-Zellen (CD16, CD56) und Monozyten / Makrophagen (CD14), außerdem mit einem Antikörper gegen den Aktivierungsmarker CD25 gefärbt. Durch sequentielles Gating werden die Zusammensetzung der IFN- γ -positiven und -negativen Populationen, sowie die Gesamtverteilung der einzelnen Zelltypen untersucht.

2.8.2.2 Materialien

2.8.2.2.1 Antikörper

α CD4-FITC (Beckman Coulter)
 α CD16-FITC (Beckman Coulter)
 α CD19-FITC (Beckman Coulter)
 α CD25-FITC (Beckman Coulter)
 α IFN- γ -PE (Miltenyi Biotec)
 α CD3-ECD (Beckman Coulter)
 α CD8-PC7 (Beckman Coulter)
 α CD56-PC7 (Beckman Coulter)
 α CD20-PC7 (Beckman Coulter)
 α CD14-PC7 (Beckman Coulter) 7AAD (Beckman Coulter)

2.8.2.2.2 Analyse der Zellen im Durchflusszytometer

Lösungen/Puffer für den Betrieb des Durchflusszytometers siehe 2.2.9.3.4, S. 64

Probenröhrchen siehe 2.2.9.3.5, S. 64

Zytometer siehe 2.2.9.3.6, S. 64

2.8.2.3 Durchführung

Die Tabelle 2.21 gibt einen Überblick über die gemessenen Ansätze. Es werden mindestens 50000 Ereignisse im FS/SS, mindestens 1000 CD3-positive Zellen und 100 IFN- γ -positive

Zellen in den stimulierten Ansätzen gemessen. Nur lebende Zellen werden in die Auswertung mit eingeschlossen, die CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen, die B-Zellen, NK-Zellen sowie die Monozyten und aktivierten Zellen werden durch entsprechendes Filtern jeweils für alle lebenden Zellen, in der IFN- γ -positiven und in der IFN- γ -negativen Population bestimmt.

Färbung der Proben für die Analyse im Durchflusszytometer						
Nr.	Probe	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5
1	Negativkontrolle	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
2	Negativkontrolle	α CD16-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD56-PC7
3	Negativkontrolle	α CD19-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD20-PC7
4	Negativkontrolle	α CD25-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD14-PC7
5	Positivkontrolle (SEB)	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
6	pp65 vor Säule	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
7	pp65 vor Säule	α CD16-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD56-PC7
8	pp65 vor Säule	α CD19-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD20-PC7
9	pp65 vor Säule	α CD25-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD14-PC7
10	Eluat pp65	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
11	Eluat pp65	α CD16-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD56-PC7
12	Eluat pp65	α CD19-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD20-PC7
13	Eluat pp65	α CD25-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD14-PC7
14	FT pp65	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
15	FT pp65	α CD16-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD56-PC7
16	FT pp65	α CD19-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD20-PC7
17	FT pp65	α CD25-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD14-PC7
18	Lysat vor Säule	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
19	Lysat vor Säule	α CD16-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD56-PC7
20	Lysat vor Säule	α CD19-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD20-PC7
21	Lysat vor Säule	α CD25-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD14-PC7
22	Eluat Lysat	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
23	Eluat Lysat	α CD16-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD56-PC7
24	Eluat Lysat	α CD19-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD20-PC7
25	Eluat Lysat	α CD25-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD14-PC7
26	FT Lysat	α CD4-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD8-PC7
27	FT Lysat	α CD16-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD56-PC7
28	FT Lysat	α CD19-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD20-PC7
29	FT Lysat	α CD25-FITC	α IFN- γ -PE	α CD3-ECD	7AAD	α CD14-PC7
Antikörper pro Ansatz:		jeweils 20 μ l	20 μ l für 10 ⁷ Zellen	jeweils 20 μ l	jeweils 10 μ l	jeweils 10 μ l

Tabelle 2.21: Überblick über die Färbung der verschiedenen Proben aus dem Sekretionstest bei der Charakterisierung der aufgereinigten Zellen: FT = *flow through* bzw. nicht IFN- γ -produzierende Zellen, Eluat = Zellen nach 2. Säule, pp65 = mit pp65 stimulierte Zellen, “vor Säule” Ansätze nach Sekretionsphase vor Aufreinigung, “aufgereinigt” nach Anreicherung über 2 Säulen.

2.9 Allgemeine molekularbiologische Methoden

2.9.1 Kultivierung von Bakterien

2.9.1.1 Prinzip

Mikroorganismen können in großer Zahl in geeigneten Nährmedien herangezogen werden. Es gibt diverse Laborstämme z. B. von *Escherischia coli* (*E. coli*), die sich durch einen definierten, modifizierten Genotyp auszeichnen. Pathogene Eigenschaften wurden entfernt und z. B. Antibiotikaresistenzen hinzugefügt, um eine Selektion zu ermöglichen.

2.9.1.2 Materialien

2.9.1.2.1 Bakterienstämme

E. coli DB3.1 (Invitrogen)

E. coli DH10Bac (Invitrogen)

E. coli Top10

2.9.1.2.2 LB-Medium

pro Liter LB-Medium:

10 g Pepton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

20 min bei 121 °C autoklavieren

2.9.1.2.3 LB-Agar

pro Liter LB-Agar:

10 g Pepton

10 g Hefeextrakt

5 g NaCl

15 g Agaragar

20 min bei 121 °C autoklavieren

2.9.1.2.4 Antibiotika

Ampicillin, SL 25 mg/ml in ddH₂O; Zielkonzentration: 100 µg/ml

Tetracyclin, SL 25 mg/ml in 50% Ethanol; Zielkonzentration: 10 µg/ml

Kanamycin, SL 25 mg/ml in ddH₂O; Zielkonzentration: 50 µg/ml

Gentamycin, SL 40 mg/ml in ddH₂O; Zielkonzentration: 7 µg/ml

Chloramphenicol, SL 30 mg/ml in 100% Ethanol; Zielkonzentration: 30 µg/ml

2.9.1.2.5 Verbrauchsmaterial und Glasgefäße

Reagenzgläser
Reagenzglaskappen
Erlenmeyerkolben, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 L und 2 L
Plastikpetrischalen
Alufolie (zum Verschließen von Gefäßen)
Zahnstocher
Pipettenspitzen 0,1 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl, 100 µl - 1000 µl
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße

2.9.1.2.6 Geräte

Schüttelwasserbad
Brutschrank
Kühlschrank
Autoklav
Pipetten 0,1 µl - 2,5 µl, 0,5 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl, 100 µl - 1000 µl
Bunsenbrenner

2.9.1.2.7 Sterilisation

Incidin-Lösung, 0,5% (zum Ausspülen/Einweichen von Glasgeräten)
70% Ethanol, vergällt (zur Flächen- und Gerätedesinfektion)
Sterillium (zur Händedesinfektion)

2.9.1.3 Durchführung

Für die Anzucht von Bakterien nur autoklavierte Lösungen, Gefäße und Verbrauchsmaterialien verwenden. Benötigte Antibiotika erst zum Medium oder Agar geben, wenn die Lösung auf ca. 40 °C abgekühlt ist. Impfösen gründlich abflammen.

Alle Zellen vor dem Entsorgen abtöten, entweder durch Behandlung mit Incidinlösung oder durch Autoklavieren bei 121 °C mit gespanntem Dampf für 30 min. Das Selbe gilt für alle Geräte, Gefäße etc., die mit den Zellen in Berührung gekommen sind.

2.9.2 Herstellung kompetenter Zellen

2.9.2.1 Prinzip

Als kompetent wird eine Zelle bezeichnet, die in der Lage ist, ein DNA-Molekül aufzunehmen und dadurch transformiert zu werden. Für *E.coli* wurde gezeigt, dass es durch Behandlung mit einer hohen Konzentration an Calciumionen kompetent wird. Der Grund

für diese "Chemische Kompetenz" ist nicht bekannt. Neben Calciumchlorid kann man auch Rubidiumchlorid zur Kompetenzinduktion nutzen. Die behandelten *E.coli* nehmen danach dsDNA auf und können so mit Plasmiden transformiert werden. Die Kompetenz kann wieder verlorengehen. Sollen die Zellen vor der Transformation längere Zeit aufbewahrt werden, müssen sie bei -80°C gelagert werden und dürfen nicht zwischendurch aufgetaut werden [58].

2.9.2.2 Materialien

2.9.2.2.1 Salze, Puffer und andere Lösungen

bidestilliertes Wasser

1 M CaCl_2

0,1 M Essigsäure

Glycerin

1 M Kaliumacetatlösung

1 N KOH

1 M MgSO_4

1 M MnCl_2

1 M MOPS, pH 6,5

RbCl

1 M RbCl

flüssiger Stickstoff

2.9.2.2.2 TFB I

30 mM Kaliumacetat; 5 g RbCl

100 mM RbCl; 12,3 ml 1 M Kaliumacetatlösung

10 mM CaCl_2 ; 4,1 ml 1 M CaCl_2

50 mM MnCl_2 ; 20,5 ml 1 M MnCl_2

15% Glycerin; 61,5 g Glycerin

pH 5,8 mit Essigsäure; 8 ml 0,1 M Essigsäure

auf 410 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen, in 100 ml aliquotieren, autoklavieren

1 Aliquot (100 ml) für 250 ml Bakterienkultur verwenden

2.9.2.2.3 TFB II

10 mM MOPS; 1,5 ml 1 M MOPS pH 6,5

75 mM CaCl_2 ; 11,25 ml 1 M CaCl_2

10 mM RbCl; 1,5 ml 1 M RbCl

15% Glycerin; 22,5 g Glycerin

pH 6,5 mit KOH; mit 1 N KOH einstellen

auf 150 ml mit bidestilliertem Wasser auffüllen, in 10 ml aliquotieren, autoklavieren

1 Aliquot (10 ml) für 250 ml Bakterienkultur verwenden

2.9.2.2.4 Kulturmedium

LB-Medium

20 mM MgSO₄; 20 ml 1 M MgSO₄ pro Liter

2.9.2.2.5 Verbrauchsmaterial und Glasgefäße

siehe 2.9.1.2.5, S. 92

Photometerküvetten (Einwegküvetten)

50 ml Röhrchen

2.9.2.2.6 Geräte

siehe 2.9.1.2.6, S. 92

Zentrifuge, kühlbar

Photometer

Eisbad

Dewar-Gefäß

-80 °C Gefrierschrank

Schutzbrille

Schutzhandschuhe

2.9.2.3 Durchführung

Mit einer einzelnen Kolonie 3 ml LB-Medium (je nach Bakterium mit entsprechendem Antibiotikum) animpfen, ü.N. bei 37 °C, 200 rpm schütteln. Mit 2 ml der Übernachtskultur 250 ml LB mit 20 mM MgSO₄ animpfen, bei 37 °C, 200 rpm wachsen lassen bis OD_{590nm} = 0,4 bis 0,6. Alle Geräte, Gefäße etc. vorkühlen, Zellen bei der Aufarbeitung ständig auf Eis halten. Die Zellen bei 5000 rpm, 4 °C, 5 min abzentrifugieren, Überstand verwerfen. Zellen vorsichtig in 100 ml TFB I resuspendieren und 5 min auf Eis inkubieren. Erneut zentrifugieren, das Pellet in 10 ml TFB II resuspendieren und 30 min auf Eis inkubieren. Je 100 µl der Zellsuspension in vorgekühlte 1,5 ml Gefäße pipettieren und die Aliquots in flüssigem Stickstoff schockfrieren. Danach sofort bei -80 °C lagern.

2.9.3 Transformation mittels Hitzeschock

2.9.3.1 Prinzip

Die Mechanismen, die beim Hitzeschock für die Transformation der Bakterien sorgen, sind nicht bekannt. Die optimale Dauer richtet sich nach Stamm und einzubringendem Plasmid, bei Bedarf muss sie experimentell festgestellt werden. Es ist zu beachten, dass zu große DNA-Mengen sich eher negativ auf die Transformationseffizienz auswirken [59].

2.9.3.2 Materialien

2.9.3.2.1 Transformation

Kompetente Zellen (vgl. 2.9.2, S. 92)

DNA (Plasmid)

S.O.C. Medium (Invitrogen)

Agarplatten (vgl. 2.9.1.2.3, S. 91)

2.9.3.2.2 Verbrauchsmaterialien

vgl. 2.9.1.2.5, S. 92

2.9.3.2.3 Geräte

vgl. 2.9.2.2.6, S. 94

Heizblock

2.9.3.3 Durchführung

Die kompetenten Zellen auf Eis stellen, bis sie antauen. Dann sofort DNA zugeben, vorsichtig mischen und 1 h auf Eis inkubieren. Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C, danach sofort für 2 min auf Eis abkühlen. Die Zellsuspension mit 900 µl S.O.C. Medium auffüllen, 1 bis 2 h bei 37 °C, 200 rpm inkubieren. Verschiedene Volumina von 50 µl bis 250 µl auf selektiven Agarplatten ausplattieren und ü. N. wachsen lassen.

2.9.4 Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten über Agarosegelelektrophorese

2.9.4.1 Prinzip

Als Elektrophorese bezeichnet man die Wanderung geladener Teilchen in einem elektrischen Feld, dabei bewirken die unterschiedlichen Ladungen und Größen der Teilchen eine unterschiedliche elektrophoretische Beweglichkeit. Mittels Elektrophorese lassen sich Substanzgemische in einzelne Zonen auftrennen. In stabilisierenden Matrices wie Gelen hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von Größe und Ladung der Teilchen ab, da sie je nach Größe eine unterschiedlich starke Retardation durch die Matrix erfahren. Zur Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten werden meistens Agarosegele verwendet. Agarose ist ein Polysaccharid aus roten Meeresalgen, für einen Einsatz in der Gelelektrophorese wird daraus das Agaropektin entfernt. Agarosen unterscheiden sich im Schmelzpunkt (35 bis

95 °C) und im Grad der Elektroendosmose. Die Agarose wird durch Aufkochen gelöst und geliert beim Erkalten: Aus dem Polysaccharidsol bilden sich Doppelhelices aus, die sich zu Fäden zusammen lagern. Agarosegele haben bei 1% (w/v) eine Porengröße von 150 nm. Für die Auftrennung kleinerer oder größerer Fragmente kann die Konzentration entsprechend erhöht oder verringert werden [60].

2.9.4.2 Materialien

2.9.4.2.1 50 × TAE-Puffer

Eisessig

0,5 M EDTA

TRIS

NaCl

bidestilliertes Wasser

2.9.4.2.2 1 × TAE-Puffer

VE-Wasser

40 ml 50 × TAE-Puffer

im 2 L Messkolben ansetzen

2.9.4.2.3 6 × Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau (w/v)

0,25% Xylencyanol (w/v)

30% (v/v) Glycerin

bidestilliertes Wasser

2.9.4.2.4 Agarosegel

140 ml 1 × TAE-Puffer

0,8 bis 1,2% Agarose (GTQ; ROTH)

6 µl Ethidiumbromidlösung (ROTH)

2.9.4.2.5 Verbrauchsmaterial und Glasgefäße

Erlenmeyerkolben, 250 ml

Nitrilhandschuhe

Klebeband (zum Abdichten der Gelträger)

Pipettenspitzen 0,1 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl

2.9.4.2.6 Geräte

Kühlschrank

Mikrowelle

Pipetten 0,5 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl

Netzgerät "Power Pack Basic" (BIORAD)

Gelträger (BIORAD)

Kämme (10, 15 oder 20 Zähne)

Gelkammern (BIORAD)

Geldokumentationssystem mit UV-Transilluminator (EDAS-System, Kodak)

UV-Schutzbrille

2.9.4.3 Durchführung

Agarose einwiegen und 1 × TAE mit Agarose in 250 ml Erlenmeyerkolben in Mikrowelle aufkochen, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Abkühlen lassen, bis die Lösung handwarm ist, das Ethidiumbromid zugeben und schwenken. Gel gießen und erstarren lassen. Proben auftragen und Gel bei 10 V pro 1 cm Gellänge laufen lassen.

2.9.5 Konzentrationsbestimmung von gelöster DNA

2.9.5.1 Prinzip

Die Konzentration von Nucleinsäuren kann photometrisch bestimmt werden. Die Basen der Nucleinsäuren enthalten aromatische Ringe, die für Absorption von Licht im UV-Bereich verantwortlich sind. Das Absorptionsmaximum liegt für DNA und RNA bei 260 nm, bei dieser Wellenlänge entspricht ein 1 E_{260 nm} 50 µg/ml dsDNA, 40 µg/ml ssDNA und 33 µg/ml ssRNA. Die niedrigere Konzentration von einzelsträngigen Nucleinsäuren im Vergleich zu doppelsträngigen bei gleicher Extinktion ist ein als Hyperchromie bekannter Effekt. Für die Messung wird die Nucleinsäure in Wasser oder TRIS-Puffer gelöst und ggf. verdünnt. Die Reinheit von Nucleinsäurelösungen ist am Quotient der E₂₆₀ durch E₂₈₀ messbar. Die E₂₈₀ repräsentiert den Gehalt an Proteinen in der Lösung, die aromatischen Aminosäurereste in den Proteinen verursachen hier die Absorption. Für reine DNA-Lösungen sollte der Quotient E_{260 nm}/E_{280 nm} bei ca. 1,8 liegen, für reine RNA-Lösungen bei 2. Die Bestimmung der Reinheit kann bei neueren Photometern meist gleichzeitig mit der Konzentrationsbestimmung erfolgen [60].

2.9.5.2 Materialien

2.9.5.2.1 Probe

in Wasser gelöste DNA

2.9.5.2.2 Verbrauchsmaterial und Glasgefäße

UV-vette™(Eppendorf)

Pipettenspitzen 0,1 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl

2.9.5.2.3 Geräte

Photometer

Pipetten 0,5 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl

2.9.5.3 Durchführung

Ein Aliquot der Probe entnehmen und mit destilliertem Wasser verdünnen. Wasser als Blindprobe verwenden, dann DNA-Probe(n) messen, die OD bei 260 nm und bei 280 nm bestimmen, die Konzentration ($1 \text{ OD}_{260 \text{ nm}} = 50 \text{ ng DNA}$) und den Quotienten $\text{OD}_{260 \text{ nm}}/\text{OD}_{280 \text{ nm}}$ berechnen.

2.9.6 Auftrennung von Proteinen über Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

2.9.6.1 Prinzip

Polyacrylamidgele werden durch chemische Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren und einem Vernetzer hergestellt. Sie sind sehr stabil und klar, im Gegensatz zu Agarose haben sie fast keine Elektroendosmose. Sie bieten eine gute Auftrennung über einen weiten Trennbereich und eignen sich für viele Färbemethoden. Bei der sogenannten SDS-PAGE (engl. *sodiumdodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) werden die Eigenladungen der Proteine vom anionischen Detergenz SDS überdeckt, es entstehen Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit. So wandern die Proteine im Gel (fast) nur in Abhängigkeit ihrer Größe. Die SDS-PAGE soll hier benutzt werden, um die Expression der CMV-Proteine in den Insektenzellen nachzuweisen, sowie die Aufreinigung der Proteine zu überprüfen.

2.9.6.2 Materialien

2.9.6.2.1 Proteinfällung

20% Trichloressigsäure (TCA)
2 M TRIS, pH nicht eingestellt

2.9.6.2.2 5 × Probenpuffer

50 mM TRIS, pH 6,8
100 mM Dithiotreitol (DTT)
2% Natriumdodecylsulfat (SDS)
0,1% (w/v) Bromphenolblau
10% (v/v) Glycerin

2.9.6.2.3 Standard

PageRuler™, vorgefärbte Proteinleiter (Fermentas); 5 µl pro Spur

2.9.6.2.4 6% Sammelgel

30% Acrylamid (AA), 0,8% Bis-Acrylamid (bAA); 20 ml
1 M TRIS, pH 6,8; 12,5 ml
1% SDS; 10 ml
ddH₂O; 57,5 ml
Verbrauch ca. 2 ml pro Gel

2.9.6.2.5 Trenngel, 17,5%

30% Acrylamid (AA), 0,8% Bis-Acrylamid (bAA); 58 ml
1 M TRIS, pH 6,8; 28 ml
1% SDS; 10 ml
ddH₂O; 4 ml
Verbrauch ca. 5 ml pro Gel

2.9.6.2.6 Polymerisieren

40% APS; 20 µl für Trenngel, 10 µl für Sammelgel
TEMED; 20 µl für Trenngel, 10 µl für Sammelgel

2.9.6.2.7 10 × Laufpuffer

0,25 M TRIS, pH nicht eingestellt
1% SDS
1,9 M Glycin

2.9.6.2.8 Coomassie-Färbelösung

1 g Serva Blue R
0,25 g Serva Blue G
426 ml Ethanol
50 ml Methanol
100 ml Eisessig
ad 1 L mit ddH₂O

2.9.6.2.9 Entfärber

7% Essigsäure; 140 ml Eisessig auf 2 L Wasser

2.9.6.2.10 Verbrauchsmaterial und Glasgefäße

2 L Bechergläser

10 ml Bechergläser

1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße

Pipettenspitzen 0,1 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl, 100 µl - 1000 µl

Pasteurpipetten

2.9.6.2.11 Geräte

Netzgerät "Power Pack Pro" (BIORAD)

Proteingelsystem "MiniProtean TetraCell" (System) (Gelkammer, Glasplatten, Gelgießstand)

Kämme (mit 10 oder 15 Zähnen)

Pipetten 0,5 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl, 100 µl - 1000 µl

Heizrührer

2.9.6.3 Durchführung

2.9.6.3.1 Proteinfällung

Gelöste Proteine (Kulturüberstand, Zellaufschluß) mit 10% (v/v) 20% TCA versetzen, 30 min auf Eis stellen. Dann 15 min bei höchster Geschwindigkeit in Tischzentrifuge abzentrifugieren, Überstand absaugen. In Probenpuffer aufnehmen und 2 min kochen. Im Falle einer Übersäuerung (Probenpuffer gelb) 1 bis 2 µl 2 M TRIS zugeben.

2.9.6.3.2 PAGE

Die PAGE wurden mit dem Mini-Protean Gel-System durchgeführt. Gel(e) vorbereiten, zunächst das Trenngel gießen und mit Ethanol überschichten. Nachdem das Trenngel polymerisiert ist, Ethanol absaugen, Kamm einsetzen und Sammelgel zugießen. Die Gele (oder 1 Gel und Pufferdamm) in Laufkammer einsetzen, Laufpuffer einfüllen und Kämme entfernen. Die Taschen wenn nötig mit Laufpuffer ausspülen. Proben auftragen und auftrennen, für 1 Gel 30 mA, für 2 Gele 50 mA, Laufzeit ca. 2 h. Den Lauf stoppen, wenn die Lauffront mit dem Bromphenolblau aus dem Gel herausgelaufen ist.

2.9.6.3.3 Färben der Proteinbanden

Gel(e) in 2 L Becherglas legen und Coomassie-Färbelösung zugeben, Glas mit Alufolie verschließen, aufkochen und 5 Minuten abkühlen lassen. Färbelösung abgießen (mehrfach verwendbar), Gel(e) mit Leitungswasser spülen. Zum Entfärben 7% Essigsäure zugeben, erneut aufkochen, kurz abkühlen lassen und Essigsäure abgießen. Je nach Hintergrundfärbung den Vorgang wiederholen, bis Banden sichtbar werden. Gele fotografieren und bei Bedarf in 7% Essigsäure lagern.

2.10 Klonierung und Expression viraler Proteine des CMV in einem Baculovirussystem

2.10.1 Auswahl der Zielproteine und des Expressionssystems

Aus den von Sylwester *et al.* [41] gelisteten Proteinen werden solche ausgewählt, die erstens eine gute CD4 und/oder CD8-Anwort auslösten und zweitens auch bei Proben, in denen die Hauptantigene pp65 und IE-1 keine oder nur eine schwache Immunantwort erzeugten, eine Antwort auslösten.

Ist das vollständige Protein nicht verfügbar, können mit Hilfe von Peptidgemischen Zielstrukturen von antigenspezifischen T-Zellen gegen Viren wie CMV, EBV, ADV etc. gefunden werden. Dazu werden Proben von Personen mit positivem Serostatus gesammelt, die T-Zellen isoliert und z. B. mit Tetrameren, intrazellulärer Färbung oder anderen Methoden getestet. Die bekannten Proteine des Erregers werden durch überlappende Peptidgemische simuliert. In mehreren Schritten werden die verschiedenen *pools* getestet, zeigt sich eine Reaktion der T-Zellen, so kann der *pool* weiter verkleinert werden, bis die besonders immunogenen Proteine oder sogar die einzelnen Peptide gefunden sind. Über diese Methode wurden auch die viralen Proteine des CMV auf ihre Immunogenität hin überprüft [41].

Als Expressionssystem bieten sich neben den häufig verwendeten bakteriellen Systemen Insektenzellen an, da diese im Gegensatz zu bakteriellen Systemen glykosylieren, die Proteinfaltung und somit Aufnahme und Prozessierung durch die Zelle näher am Naturzustand sind, außerdem liefern sie höhere Ausbeuten und sind gut für eine eventuelle GMP-Produktion geeignet, da sie keine humanpathogenen Erreger enthalten und keine Giftstoffe

produzieren. Auch eventuelle toxische Effekte der Proteine auf eukaryotische Zellen lassen sich so abschätzen, bevor mit Expressionversuchen in humanen Zellen begonnen wird.

Die Klonierungen und die Transfektion der Insektenzellen soll mit dem *Gateway*TM-System durchgeführt werden. Wurde einmal ein sogenannter Eingangsklon oder Startklon mit der gewünschten cDNA erzeugt, kann die cDNA über Rekombination in diverse andere Vektoren übertragen werden. Das System bietet eine Vielzahl an Expressionsvektoren für verschiedene Zellen und ist gut dokumentiert.

2.10.2 Isolation viraler Gene mittels PCR

2.10.2.1 Prinzip

Die PCR (engl. *polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur Amplifikation von Nucleinsäuren. Theoretisch können damit aus einem einzelnen DNA-Molekül bis zu 10^{12} identische Kopien erzeugt werden. Bei PCRs wird ausgenutzt, dass DNA-Polymerasen freie 3'-OH-Enden an dsDNA als Ansatzpunkt nutzen, um die DNA zu duplizieren. In der PCR wird ein solcher Ansatzpunkt künstlich geschaffen, und zwar durch künstliche Oligonucleotide, sogenannte Primer, die an eine bestimmte Stelle der DNA binden. Damit dies möglich ist, muss die dsDNA zunächst im Denaturierungsschritt der PCR zu ssDNA geschmolzen werden, dann wird schnell auf eine Temperatur abgekühlt, bei der die Primer sich spezifisch anlagern können (engl. *annealing*). Nach dem Anlagerungsschritt wird die Temperatur auf das Temperaturoptimum der genutzten DNA-Polymerase erhöht. Gibt man einen Primer für jeden Strang, einen für den *sense*-Strang und einen für den *antisense*-Strang, hinzu, erhält man nach einem Durchlauf für jedes vorhandene ein neues Stück der DNA zwischen den Primern. Die Prozedur lässt sich angefangen mit der Denaturierung des Doppelstranges, über die Primeranlagerung, bis zur Verlängerung (engl. *extension*) wiederholen. Dabei wächst die Anzahl der DNA-Stücke zwischen den Primern exponentiell [60].

Da das CMV-Genom (für den Stamm AD 169) bzw. die Virusproteine weitgehend bekannt sind, können mit Hilfe sequenzspezifischer Primer die cDNAs für die ausgesuchten immunogenen Proteine aus dem Genom herausamplifiziert werden. Über die sequenzspezifischen Primer werden Restriktionsschnittstellen für die Klonierung und eine Proteaseschnittstelle an die cDNAs angehängt, die Primer werden so gestaltet, dass die cDNA im Leseraster des

Expressionsvektors liegt. Um Fehler durch die PCR zu minimieren, werden ausschließlich DNA-Polymerasen mit sogenannten *proof reading* Eigenschaften verwendet.

2.10.2.2 Materialien

2.10.2.2.1 Polymerasen

Platinum *Pfx* (Invitrogen)

Phusion Polymerase (Finnzymes)

2.10.2.2.2 Virus-DNA

CMV-DNA (BAC; ca. 100 ng/µl)

zur Verfügung gestellt von der AG Messerle, Institut für Virologie, MHH

2.10.2.2.3 Primer zur Klonierung von CMV-cDNAs in den Vektor *pENTR1a*

Primer zur Klonierung von CMV-cDNAs in den Vektor <i>pENTR1a</i>	
Primer	Sequenz
36fw	5' atc cggtaccat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG GAC GAC CTA CGG GAC ACG C 3'
36rv	5' ata tctcgagag TCA GTT GTT CAT GTA AAC GTG TGG CGG GGT 3'
48fw	5' atc cgaattcat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG AAA GTC ACA CAG GCC AGC TGC 3'
48rv	5' ccg cgaattcct cgg TTA CAA AAG ATA GAG AAA CCG CAT GTG TTG 3'
55fw	5' atc cggtaccat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG GAA TCC AGG ATC TGG TGC CT 3'
55rv	5' ata tctcgagct ggt TCA GAC GTT CTC TTC TTC GTC GG 3'
83fw	5' atc cggtaccat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG GAG TCG CGC GGT CGG 3'
83rv	5' ata tctcgaggt ggc TCA ACC TCG GTG CTT TTT GGG 3'
86fw	5' atc cggtaccat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG GAG AAC TGG TCG GCG CT 3'
86rv	5' ga gtgcggccgctg acg gcc TCA CGA GTT AAA TAA CAT GGA TTG CTG 3'
94fw	5' atc cggtaccat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG GCT TGG CGC AGC GG 3'
94rv	5' ata tctcgagcc ccg TTA GTG CAC TAG GTT CTT AAG CAC CG 3'
122fw	5' atc cggtaccat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG CTG CCC CTC ATC AAA CAG G 3'
122rv	5' ga gtgcggccgctt cac TTA CTG AGA CTT GTT CCT CAG GTC CTG 3'
123fw	5' atc cggtaccat <i>gaaaacctgtacttccaagc</i> ATG GAG TCC TCT GCC AAG AGA AAG A 3'
123rv	5' ata tctcgagat agt TTA CTGGTCAGCCTTGCTTCTAGTC 3'

Tabelle 2.22: Liste der zur Isolierung der cDNA erstellten Primer; NNNN = sequenzspezifische Basen, **NNNN** = Start-/Stopp-Codon, **nnnn** = RE-Erkennungssequenz, *nnnn* = TEV-Schnittstelle, *nnnn* = Basen zum Auffüllen

2.10.2.2.4 Primer zur Entfernung der Introns in UL36 und UL123 durch Spaltung mit *BsmBI*

Primer zur Entfernung der Introns in UL36 und UL123 durch Spaltung mit <i>BsmBI</i>	
Primer	Sequenz
36-i1cut-rv	5' aca aca CGTCTC <i>tgc gaa cag acg gtg ccc at</i> 3'
36-i1cut-fw	5' aca aca CGTCTC ttc gca <i>agg tgc tta cgt ctg ctg tca gga g</i> 3'
123-i1cut-rv	5' aca aca CGTCTC <i>gtg gca cct tgg agg aag gg</i> 3'
123-i1cut-fw	5' aca aca CGTCTC tgc cac <i>ggc ceg aga cac ccg tga c</i> 3'
123-i2cut-rv	5' aca aca CGTCTC <i>gag ttc tgc cag gac atc ttt ctc ggg</i> 3'
123-i2cut-fw	5' aca aca CGTCTC gaa ctc <i>gtc aaa cag att aag gtt cga gtg gac atg</i> 3'

Tabelle 2.23: Liste der zur Heraustrennung der Introns erstellten Primer; NNNN = Erkennungssequenz des RE, *nnnn* = sequenzspezifische Basen, **nnnn** = Basen zum Auffüllen der Sequenz, *nnnn* = Basen zum Auffüllen

2.10.2.2.5 sonstige Reagenzien

steriles destilliertes Wasser

dNTPs

2.10.2.2.6 Verbrauchsmaterial

1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße

200 µl Gefäße, Streifen zu 8 Stück mit anhängendem Deckel

Pipettenspitzen 0,1 µl - 10 µl, 20 µl - 200 µl, 100 µl - 1000 µl

2.10.2.2.7 Geräte

Thermocycler T3 (Biometra)

Vortexer

Tischzentrifuge

Pipetten 0,1 µl - 2,5 µl, 0,5 µl - 100 µl, 20 µl - 200 µl, 100 µl - 1000 µl

2.10.2.2.8 Spezielle Programme

DNA-Star / Lasergene (Programm zur Sequenzanalyse)

Primer3 (Programm zur Erstellung von Oligonucleotiden)

Clustal (Alignmentprogramm)

2.10.2.3 Durchführung

2.10.2.3.1 PCR mit Platinum *Pfx* (Invitrogen)

Die PCRs mit Platinum *Pfx* wurde in 2 Schritten durchgeführt, da die Ausbeuten gering waren. Für alle PCRs wurde die mitgelieferte *Enhancer*-Lösung für GC-reiche Produkte verwendet.

20 µl PCR-Ansatz für 1. Schritt		
Substanz	1 ×	10 ×
CMV-DNA	0,5 µl	5 µl
10 × Puffer	2 µl	20 µl
dNTPs	2 µl	20 µl
MgSO ₄	0,4 µl	4 µl
Enhancer	2 µl	20 µl
<i>Pfx</i> Polymerase	0,5 µl	5 µl
Wasser	10,6 µl	106 µl
Aliquotvolumen: 18 µl		
Primer 1 (10 µM)		1 µl
Primer 2 (10 µM)		1 µl

Protokoll für für 1. PCR mit <i>Pfx</i> bei Fragmenten ≤2 kbp					
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	5 min	5	94 °C	30 s
2	94 °C	30 s	6	68 °C	10 min
3	56 °C	30 s	5-6		10 ×
4	68 °C	10 min	7	68 °C	15 min
2 - 4		5 ×	8	4 °C	∞

Protokoll für für 1. PCR mit <i>Pfx</i> bei Fragmenten >2 kbp					
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	5 min	5	94 °C	60 s
2	94 °C	60 s	6	68 °C	20 min
3	56 °C	60 s	5-6		10 ×
4	68 °C	20 min	7	68 °C	30 min
2 - 4		5 ×	8	4 °C	∞

20 µl PCR-Ansatz für 2. Schritt mit <i>Pfx</i>		
Substanz	1 ×	10 ×
10 × Puffer	2 µl	20 µl
dNTPs	2 µl	20 µl
MgSO ₄	0,4 µl	4 µl
Enhancer	2 µl	20 µl
<i>Pfx</i> Polymerase	0,5 µl	5 µl
Wasser	6,1 µl	61 µl
Aliquotvolumen: 18 µl		
1. PCR-Ansatz		5 µl
Primer 1 (10 µM)		1 µl
Primer 2 (10 µM)		1 µl

Protokoll für für 2. PCR mit <i>Pfx</i> bei Fragmenten ≤2 kbp					
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	5 min	2 - 3		15 ×
2	94 °C	30 s	4	68 °C	15 min
3	68 °C	10 min	5	4 °C	∞

Protokoll für für 2. PCR mit <i>Pfx</i> bei Fragmenten >2 kbp					
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	94 °C	5 min	2 - 3		15 ×
2	94 °C	60 s	4	68 °C	1 h
3	68 °C	20 min	5	4 °C	∞

2.10.2.3.2 PCR mit *Phusion* Polymerase (Finnzymes)

Die *Phusion* Polymerase wurde für die Gewinnung der langen cDNAs (UL48, UL55) verwendet. Nach der Klonierung in den Vektor *pCRblunt* wurde nur noch die *Phusion* Polymerase verwendet, da sie deutlich bessere Ausbeuten in kürzerer Zeit liefert.

20 µl PCR-Ansatz mit <i>Phusion</i>		
Substanz	1 ×	10 ×
CMV-DNA	0,2 µl	2 µl
5 × GC-Puffer	4 µl	40 µl
dNTPs	1 µl	10 µl
<i>Phusion</i> Polymerase	0,2 µl	2 µl
Wasser	12,6 µl	126 µl
Aliquotvolumen: 18 µl		
Primer 1 (10 µM)		1 µl
Primer 2 (10 µM)		1 µl

Protokoll für PCR mit <i>Phusion</i> Polymerase					
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	98 °C	5 min	6	6 °C	20 s
2	98 °C	10 s	7	72 °C	4 min
3	55 °C	20 s	5 - 7		30 ×
4	72 °C	4 min	8	72 °C	10 min
2 - 4		10 ×	9	4 °C	∞
5	98 °C	10 s			

2.10.3 Klonierung in den Vektor pCRblunt

2.10.3.1 Prinzip

Alle Polymerasen mit *proof reading* Funktion produzieren dsDNA mit glatten Enden (*blunt ends*). Solche *blunt end* Fragmente können mit dem Enzym T4-Ligase an andere glatte Enden, z. B. in einem Vektor, angefügt werden. Der Prozess benötigt Energie in Form von ATP. Die Effizienz dieser Ligation ist geringer als bei überlappenden, komplementären Enden (*sticky ends*). Bei größeren Fragmenten kann es auch zum Ringschluß der Einzelfragmente mit sich selbst kommen. Die meisten käuflichen Vektoren werden daher dephosphoryliert, um einen Wiederverschluss zu verhindern und die Ausbeute der Ligation zu verbessern, so auch beim hier verwendeten Vektor. Bei der *blunt end* Ligation gibt es außerdem keine Möglichkeit, die Richtung der eingefügten DNA zu beeinflussen. Viele käufliche Vektoren bieten die Möglichkeit, die eingefügte DNA über Standardprimer (hier M13) zu amplifizieren, so also auch sequenzieren zu können.

Die Klonierung in den Vektor *pCRblunt* soll hier lediglich der Amplifikation der CMV-cDNAs dienen. Die PCR-Ausbeuten sind für eine Restriktionsspaltung und direkte *sticky*

ends Ligation in den Vektor *pENTR1a* zu niedrig. Der Vektor enthält das Suizidgen *ccdB*, es kodiert für eine Helikase, deren Überexpression zum Tod der Zellen führt. Eine Kanamycin-Resistenz ermöglicht die spätere Selektion positiver Klone.

2.10.3.2 Materialien

2.10.3.2.1 cDNAs

PCR-Produkt aus Schritt 2. mit *Pfx*- oder aus PCR mit *Phusion*-Polymerase
 1% Agarosegel
 Gelextraktionskit (QIAGEN)
 steriles Wasser zum Eluieren

2.10.3.2.2 Vektor für die *blunt end* Ligation

pCRblunt (Invitrogen)
 steriles Wasser
 über Gelelution aufgereinigte CMV-cDNAs

2.10.3.2.3 Transformation

chemisch kompetente *E. coli Top10*
 S.O.C. Medium
 Agarplatten (mit Kanamycin)

2.10.3.2.4 Plasmidislolation

3 ml LB Kulturen (mit Kanamycin)
 Plasmidisolationskit (QIAGEN Plasmid MiniKit)
 steriles Wasser

2.10.3.2.5 Sequenzierung der Inserts in *pCRblunt*

Sequenzierprimer	
Primer	Sequenz
M13-RP	5' cag gaa aca gct atg acc 3'
M13-FP	5' tgt aaa acg acg gcc agt 3'
UL55-544	5' ttt gct caa tgc tac agt tcc t 3'
UL55-879	5' cgc cga caa gtt ttt cat tt 3'
UL55-1577	5' cca ttc tet cgg cca ttt ac 3'
UL86-670	5' ctg gcc acg ctc ttt ttg 3'
UL86-1336	5' cgc tca aga cgc tgt gc 3'
UL86-1995	5' gcc cta cca ccg cag tt 3'
UL86-2653	5' aat tcg tgg gcg agc a 3'

2.10.3.2.6 Ligation

T4-Ligase
 Puffer mit ATP
 steriles Wasser

2.10.3.3 Durchführung

Zwei 20 µl PCR-Ansätze auf ein präparatives 1% Agarosegel (siehe 2.9.4.2.4, S. 96) auftragen, die Zielbanden ausschneiden und Gelextraktion mit *MinElute Gel extraction Kit* (QIAGEN) durchführen. Die DNA mit 60 µl Wasser eluieren. 5 µl dieser Lösung mit 95 µl Wasser verdünnen und photometrisch die DNA-Konzentration bestimmen, 5 µl der DNA auf ein Agarosegel auftragen, um die Reinheit (Bandengröße) zu überprüfen. Die übrigen 50 µl bis zur Verwendung bei -20°C lagern.

Alle Materialien für die Ligation auf Eis oder im Kühlschrank auftauen. Die Ansätze wie folgt zusammen pipettieren:

Ligation in den Vektor <i>pCRblunt</i>		
Substanz	1 ×	10 ×
10 × Puffer mit ATP	1 µl	10 µl
<i>pCRblunt</i>	1 µl	10 µl
steriles Wasser	2 µl	20 µl
Aliquotvolumen: 4 µl		
cDNA		5 µl
T4 DNA-Ligase (4 U/µl) .		1 µl

Die Ligation über mindestens 1 h (oder über Nacht) bei 16°C inkubieren. Die fertige Ligation kann bei -20°C gelagert werden. Jeweils 5 µl der Ligationsansätze in chemisch kompetente *E. coli Top10* transformieren (vgl. Herstellung kompetenter Zellen 2.9.2, S. 92 und Hitzeschock 2.9.3.3, S. 95) und auf selektiven Platten anziehen. Mit drei separiert wachsenden Klonen 3 ml Schüttelkulturen animpfen und das Plasmid isolieren, dabei mit 60 µl sterilem Wasser eluieren. Die Konzentration der isolierten Plasmide prüfen, 5 µl auf ein 0,8% Agarosegel (siehe 2.9.4.2.4, S. 96) auftragen.

Die Vektoren mit der UL36-DNA und der UL123-DNA in PCRs mit den Primern zum Heraustrennen der Introns einsetzen, ca. 20 ng Vektor pro PCR-Ansatz einsetzen, eine Gelelution durchführen (2% Agarosegel) und die einzelnen Exons erneut in *pCRblunt* ligieren.

Für die Sequenzierung der integrierten CMV-DNA 30 µl mit einer DNA-Konzentration von 50 ng µl an die Firma "GATC" schicken, mit M13-RP und M13-FP sequenzieren lassen. Für die UL55- und UL86-DNA zusätzlich Primer innerhalb der cDNA synthetisieren lassen, um die Sequenz über die gesamte Länge überprüfen zu können.

2.10.4 Restriktionsspaltung und Klonierung in den Vektor pENTR1a

2.10.4.1 Prinzip

2.10.4.1.1 Restriktionsspaltung

Als Restriktionsenzyme (RE) bezeichnet man Endonucleasen bakteriellen Ursprungs. Sie spalten hydrolytisch das Phosphodiester-Rückgrat auf beiden Strängen der DNA. Die Unterscheidung und Benennung der RE erfolgt nach Ursprungsorganismus, Erkennungssequenz und Spaltstelle. Die ursprüngliche Funktion von Restriktionsenzymen ist die Zerstörung von eingedrungener Fremd-DNA, während die eigene DNA an möglichen Erkennungsstellen für das Restriktionsenzym durch Methylierung geschützt wird.

Häufig verwendet werden Restriktionsenzyme mit nur einer einzigen Spaltaktivität, sie spalten oft innerhalb ihrer palindromen Erkennungssequenz. Mittels solcher Restriktionsenzyme lassen sich definierte stumpfe Enden, 5'- oder 3'-Überhänge erzeugen. Vor allem letztere werden zur gezielten Klonierung von Nucleinsäuren, wie hier bei Ligation eines sogenannten Inserts in einen Vektor, genutzt. Insert und Vektor werden separat mit dem gleichen RE gespalten, die gewünschten Fragmente z.B. durch Elektrophorese getrennt und gereinigt. Durch Verwendung von 2 (oder mehr) Restriktionsenzymen kann auch die Ausrichtung des Inserts im Vektor gelenkt werden, was bei Expressions-Konstrukten eine große Rolle spielt.

Restriktionsansätze enthalten generell Puffersubstanzen (z.B. Tris), ein divalentes Kation für die Enzymaktivität (z.B. Mg^{2+}) und ein Sulfhydrylreagenz (z.B. DTT oder 2-Mercaptoethanol) zur Stabilisierung des Enzyms. Da viele RE aus Bakterien wie *E. coli* stammen, liegt das Temperaturoptimum meist bei 37 °C, aber auch höhere und niedrigere Temperaturoptima sind - in Abhängigkeit vom Ursprungsorganismus der RE - möglich [60].

2.10.4.1.2 Ligation in *pENTR1a*

Der Vektor *pENTR1a* ist an das Gateway™-System adaptiert und enthält Rekombinationsstellen, die ein einfaches Umklonieren in diverse Vektoren dieses Systems ermöglicht. Er enthält eine Helikase als Suizidgen in der MCS und vermittelt eine Kanamycinresistenz. Aufgrund des Suizidgens *ccdB* kann der Vektor ohne Insert nur in bestimmten Stämmen wie *E. coli* *DB3.1* angezogen werden, die resistent gegen das Suizidgen sind.

Das Gateway™-System beruht auf dem Rekombinationssystem des Bakteriphagen λ , der seine DNA sequenzspezifisch ins Wirtsgenom einbaut, dies geschieht mit Hilfe von sogenannten "Klonasen", also Enzymen, die die Rekombination vermitteln. Hat man die gewünschte cDNA in einen Eingangsvektor ("Entry"-Vektor) eingebaut, z. B. wie hier über RE-Spaltung und Ligation, kann mit Hilfe von Klonasen unter Nutzung der Rekombinationsstellen hineinrekombiniert werden. Die Rekombinationssequenzen in *pENTR1a* sind *attL1* und *attL2*, sie flankieren die MSC.

2.10.4.2 Materialien

2.10.4.2.1 Plasmidislolation

3 ml LB Kulturen (mit Kanamycin)
Plasmidisolationskit (QIAGEN Plasmid MiniKit)
steriles Wasser

2.10.4.2.2 RE-Spaltung

KpnI
XhoI
NotI
BsmBI

steriles Wasser
10 × Enzympuffer

2.10.4.2.3 Ligation

siehe 2.10.3.2, S. 109

2.10.4.3 Durchführung

2.10.4.3.1 Anzucht, Vermehrung und Aufreinigung des Vektors *pENTR1a*

Chemisch kompetent gemachte *E. coli* *DB3.1* mit 50 ng Vektor *pENTR1a* transformieren, mit positiven Klonen 3 ml Schüttelkulturen animpfen und eine Plasmidisolation durchfüh-

ren. Die Konzentration des aufgereinigten Vektors bestimmen, Reinheit und Qualität der Plasmide außerdem auf einem 0,8% Agarosegel überprüfen. Den Vektor mit den verschiedenen RE-Kombinationen aufschneiden.

2.10.4.3.2 Analytische Spaltung

Analytische Spaltung der cDNAs im Vektor <i>pCRblunt</i>					
	Plasmid	Enzym 1	Enzym 2	10 × Puffer	Wasser
1	2 µl UL36-1	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>BsmBI</i>	2 µl	13 µl
2	2 µl UL36-2	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	2 µl	13 µl
3	3 µl UL55	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	2 µl	12 µl
4	2 µl UL83	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	2 µl	13 µl
5	2 µl UL86	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>NotI</i>	2 µl	13 µl
6	5 µl UL94	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	2 µl	10 µl
7	3 µl UL122	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>NotI</i>	2 µl	12 µl
8	5 µl UL123-1	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>BsmBI</i>	2 µl	10 µl
9	6 µl UL123-2	1 µl <i>BsmBI</i>		2 µl	11 µl
10	4 µl UL123-3	1 µl <i>BsmBI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	2 µl	11 µl
Endvolumen: 20 µl					
Puffer für Ansätze mit <i>KpnI</i> : "Kpn-buffer"					
Puffer für <i>BsmBI</i> + <i>XhoI</i> : "R+"					
Puffer für <i>BsmBI</i> allein: "NEB buffer 3"					

Für eine analytische Spaltung 300 bis 400 ng DNA einsetzen. Wird bei einer Doppelspaltung ein Puffer benutzt, in dem eines der RE schlecht arbeitet, die Menge dieses RE verdoppeln. Die Ansätze ü. N. bei 37 °C inkubieren, auf einem 1% Agarosegel analysieren.

2.10.4.3.3 Präparative Spaltung

Präparative Spaltung der cDNAs im Vektor <i>pCRblunt</i>					
	Plasmid	Enzym 1	Enzym 2	10 × Puffer	Wasser
1	5 µl UL36-1	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>BsmBI</i>	5 µl	37 µl
2	5 µl UL36-2	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	5 µl	37 µl
3	5 µl UL55	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	5 µl	37 µl
4	5 µl UL83	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	5 µl	37 µl
5	10 µl UL94	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	5 µl	32 µl
6	5 µl UL122	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>NotI</i>	5 µl	37 µl
7	6 µl UL123-1	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>BsmBI</i>	5 µl	36 µl
8	8 µl UL123-2	1 µl <i>BsmBI</i>		5 µl	35 µl
9	7 µl UL123-3	1 µl <i>BsmBI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	5 µl	35 µl
V1	20 µl <i>pENTR1a</i>	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>XhoI</i>	5 µl	22 µl
V2	20 µl <i>pENTR1a</i>	1 µl <i>KpnI</i>	2 µl <i>NotI</i>	5 µl	22 µl
Endvolumen: 50 µl					
Puffer für Ansätze mit <i>KpnI</i> : "Kpn-buffer"					
Puffer für <i>BsmBI</i> + <i>XhoI</i> : "R+"					
Puffer für <i>BsmBI</i> allein: "NEB buffer 3"					

Für eine präparative Spaltung ca. 2 µg DNA einsetzen. Den Vektor *pENTR1a* mit den verschiedenen RE-Kombinationen aufspalten. Die cDNAs aus *pCRblunt* herauspalten. Die Fragmente über ein 1% Agarosegel auftrennen, die Fragmente UL36-1, UL123-1 und UL123-2 über ein 2% Agarosegel, und die gesuchten Fragmente ausschneiden, eine Gel-elution durchführen.

2.10.4.3.4 Ligation in *pENTR1a*

Für die Ligation Vektor und Insert im Verhältnis 1 : 2 mischen, hier wurden 3 µl Vektor *pENTR1a* und 6 µl Insert verwendet, bei UL36 und UL123 jeweils 3 µl jedes Inserts verwenden. Jeweils 2 µl 10 × Ligasepuffer zugeben, mit sterilem Wasser auf 19 µl auffüllen und 1 µl T4-Ligase zugeben. Über Nacht bei 16 °C inkubieren, am nächsten Tag in chemisch kompetente *E. coli TOP10* transformieren. Von jeder Platte 3 Klone benutzen, um 3 ml Schüttelkulturen anzupflegen und eine Plasmidisolierung durchzuführen. Die Konzentration des aufgereinigten Vektors bestimmen, Reinheit und Qualität der Plasmide außerdem auf einem 0,8% Agarosegel überprüfen. Eine PCR mit den sequenzspezifischen Primern (vgl. 2.10.2.2, S. 103) und *Phusion*-Polymerase (vgl. 2.10.2.3, S. 105) durchführen.

2.10.5 Rekombination in den Vektor *pDest20*

2.10.5.1 Prinzip

Die sogenannten *destination*- oder Bestimmungs-Vektoren im Gateway™-System sind Vektoren, die entweder direkt für die Expression genutzt werden können oder die in einen Expressionvektor umgewandelt werden können. Der hier verwendete *pDest20* enthält ein Gluthation-S-Transferase-Tag, das später die Aufreinigung der rekombinanten Proteine erleichtern soll. Über L-R-Rekombination (der Vektor *pENTR1a* trägt die *attL*-Sequenzen, der Vektor *pDest20* *attR*-Sequenzen) wird die CMV-cDNA in den Bestimmungsvektor einkloniert, dazu wird Klonase benutzt. Der Vektor *pDest20* trägt 2 Resistenzen, gegen Ampicillin und Chloramphenicol, bei einer erfolgreichen Rekombination geht die Chloramphenicolresistenz verloren.

2.10.5.2 Materialien

2.10.5.2.1 Gewinnung und Kontrolle des Vektors *pDest20*

Agarplatten mit Ampicillin und Chloramphenicol

Agarplatten mit Ampicillin

Agarplatten mit Chloramphenicol

LB-Medium

Agarplatten, Medium und Antibiotika siehe 2.9.1.2, S. 91

Vektor *pDest20* (Invitrogen)

2.10.5.2.2 L-R-Rekombination

Clonase II Mix (Invitrogen)

Vektor *pDest20* (Invitrogen)

CMV-cDNAs in Vektor *pENTR1a*

TE-Puffer, pH 8,0

2.10.5.2.3 Gewinnung von *pDest20*-Expressionsklonen

CMV-cDNAs in Vektor *pDest20*

chemisch kompetente *E. coli TOP10*

selektive Agarplatten und 3 ml LB-Kulturen

Plasmidisolationskit (QIAGEN)

2.10.5.3 Durchführung

2.10.5.3.1 Gewinnung des Vektors *pDest20*

Den Vektor in chemisch kompetent gemachte *E. coli* *DB3.1* mittels Hitzeschock (siehe 2.9.3.3, S. 95) transformieren. Auf selektiven Platten mit Ampicillin und Chloramphenicol ausplattieren (vgl. 2.9.1.2.3, S. 91 und 2.9.1.2.4, S. 91). Mit 3 Kolonien 3ml Schüttelkulturen animpfen. Eine Plasmidisolation durchführen, Konzentration und Reinheit photometrisch und auf einem 0,8% Agarosegel (siehe 2.9.4.2.4, S. 96) kontrollieren. Zur Überprüfung des Suizidgens chemisch kompetent gemachte *E. coli* *TOP10* transformieren, es dürfen keine Zellen wachsen.

2.10.5.3.2 Rekombination in den Vektor *pDest20*

Für die L-R-Rekombination ca. 50 bis 150 ng vom Eingangsvektor mit 150 ng Bestimmungsvektor einsetzen. Die Rekombination wird in TE-Puffer durchgeführt, der ClonaseII-Mix (Invitrogen) zugegeben und laut Herstellerangaben für mindestens 1 h bei 25 °C inkubiert. Bei größeren Fragmenten ist eine Verlängerung der Inkubationszeit empfohlen, hier wurde ü. N. bei RT inkubiert. Die Klonase wird danach durch Spaltung mit Proteinase K für 10 min bei 37 °C inaktiviert.

2.10.6 Herstellung und Aufreinigung von Bacmiden für die Transfektion

2.10.6.1 Prinzip

Das Bacmid wird durch Transformation des Bestimmungsvektors *pDest20* in chemisch kompetente *E. coli* *DH10Bac* gewonnen. Der *E. coli* *DH10Bac* trägt zum einen das Bacmid *pMON14272* (Kanamycinresistenz), zum anderen noch ein Helferplasmid *pMON7124*, das die Transposition vom Destinationsvektor (Gentamycinresistenz) in das Bacmid ermöglicht. Verschiedene Antibiotikaresistenzen in den Plasmiden gewährleisten bei Anzucht in selektivem Medium, dass keines der 3 verloren geht. Außerdem ist eine Blau-Weiß-Selektion von positiven Kolonien möglich. Des Bacmid trägt *lac*-Promoter und das *LacZ'*-Gen, darin liegt die Zielsequenz der Transposition. Das Wirtsbakterium trägt *LacZΔ*.

Transponiert das Insert in das Bacmid, so kann das *LacZ'*-Gen nicht exprimiert werden. Ist das *LacZ'*-Gen nicht unterbrochen, so kommt es zur α -Komplementierung von N-terminalem α -Fragment und C-terminalen ω -Fragment. Bakterienkolonien mit aktiver β -Galactosidase werden bei Inkubation mit IPTG und X-Gal blau: Das IPTG dient zur Induktion des *lac*-Promoters. Die β -Galactosidase hydrolysiert dann X-Gal zu einem wasserunlöslichen, blauen Farbstoff [59].

2.10.6.2 Materialien

2.10.6.2.1 Stammlösungen für Blau-Weiss-Selektion

20 mM IPTG
 20 mg/ml X-Gal (in DMF)

2.10.6.2.2 Selektive Agarplatte für Blau-Weiss-Selektion

LB-Agar
 Tetracyclin, 10 μ g/ml
 Kanamycin, 50 μ g/ml
 Gentamycin, 7 μ g/ml
 IPTG, pro 20 ml Platte 20 μ l
 X-Gal, pro 20 ml Platte 40 μ l

2.10.6.2.3 Bacmidisolierung

3 ml Schüttelkulturen
 Puffer P1 und P2 aus PlasmidMini-Kit (QIAGEN)
 Puffer P3 aus PlasmidMidi-Kit (QIAGEN)
 Isopropanol
 70% Ethanol
 Puffer AE (QIAGEN; 10 mM Tris-HCl, 0,5 M EDTA, pH 9,0)

2.10.6.2.4 Kontrolle der Bacmide mit PCR

Kontrollprimer	
Primer	Sequenz
pDest20fw	5' tcc agc aag tat ata gca tgg cct tt 3'
sequenzspezifische revers-Primer (siehe 2.10.2.2, S. 103)	

2.10.6.3 Durchführung

Die fertigen *pDest20*-Vektoren mit den CMV-cDNAs in chemisch kompetente *E. coli DH10Bac* transformieren. Verschiedene Volumina (z. B. hier 50 und 250 μ l) ausplattieren. Am nächsten Tag die Platten aus dem Brutschrank entnehmen und für 1-2 h in den

Kühlschrank stellen. Von jeder Platte 5 weiße Kolonien auf selektiven Platten ausstreichen (als Kontrolle und Erhaltungsplatte) und 3 ml Schüttelkulturen animpfen.

Die Schüttelkulturen ca. 16 h wachsen lassen. Zellen für 3 min bei 8000 rpm abzentrifugieren, Pellet in 200 µl P1 resuspendieren, 200 µl P2 zum Lysieren der Zellen zugeben und 5 min bei RT inkubieren. Dann 300 µl P3 zugeben und bei maximaler Geschwindigkeit (13000 rpm) 10 min zentrifugieren, Überstand in ein sauberes, autoklaviertes 1,5 ml Gefäß überführen und Zentrifugation wiederholen. Den klaren Überstand abnehmen und ca. zwei Drittel Volumen (hier 500 µl) Isopropanol zugeben. Bei maximaler Geschwindigkeit, 4 °C, 30 min zentrifugieren. Den Überstand verwerfen und das DNA-Pellet mit 70% Ethanol waschen, erneut 10 min, 4 °C, 13000 rpm zentrifugieren. Das Ethanol abnehmen und Pellet 5 min trocknen lassen. Dann in 60 µl Puffer AE aufnehmen, 20 min bei RT stehen lassen, nicht durch Auf- und Abpipettieren mischen, sondern umrühren.

Aliquots der Bacmid-DNA entnehmen, 1 : 100 verdünnen und die Konzentration im Photometer messen. Eine Kontroll-PCR mit einem Primer am Ende der GST (pDest20fw) und dem hinteren sequenzspezifischen Primer (vgl. 2.10.2.2, S. 103) durchführen, in einem 1% Agarosegel analysieren.

20 µl Kontroll-PCR-Ansatz		
Substanz	1 ×	6 ×
5 × GC-Puffer	4 µl	24 µl
dNTPs	2 µl	12 µl
<i>Phusion</i> Polymerase	0,3 µl	1,8 µl
Primer pDest20fw	1 µl	6 µl
Wasser	10,7 µl	64,2 µl
Aliquotvolumen: 18 µl		
Primer 2 (10 µM)		1 µl
Bacmid (1:100 verd.)		1 µl

Protokoll für Kontroll-PCR					
Schritt	Temperatur	Dauer	Schritt	Temperatur	Dauer
1	98 °C	5 min	2-4		30 ×
2	98 °C	30 s	5	72 °C	5 min
3	55 °C	30 s	5 - 7	4 °C	∞
4	72 °C	60 s	8		

2.10.7 Anzucht von Insektenzellen

2.10.7.1 Prinzip

Erste Insektenzelllinien wurden in den siebziger Jahren hergestellt [61]. Insektenzellen werden häufig als Expressionssystem benutzt, wenn große Mengen an Proteinen hergestellt werden sollen. Hier werden *Sf9-Zellen*, immortalisierte Zellen aus dem Ovar des Nachtfalters *Spodoptera frugiperda*, verwendet. Andere Insektenzelllinien sind z. B. *Sf21* oder *Tn-5* (*HighFive*).

Die Zellen wachsen sowohl semi-adhärenent als auch in Suspension, Suspensionskulturen können dabei mehr Zellen enthalten und auch mehr Protein liefern. Die Zellen müssen je nach Aussaatdichte alle 2 bis 4 Tage geteilt (adhärenente Kultur) oder verdünnt werden (Suspensionskultur). Die *Sf9-Zellen* wachsen optimal bei 27 °C, sie benötigen keine CO₂-Begasung, sondern eine ausreichende Sauerstoffzufuhr, daher sollten Kulturflaschen mit Filterdeckel verwendet werden, bei der Kultivierung in geschlossenen Gefäßen sollte maximal ein Fünftel des Volumens mit Zellsuspension gefüllt werden.

2.10.7.2 Materialien

2.10.7.2.1 Insektenzellen

InsectDirect™ System *Sf9-Zellen* (Novagen)

2.10.7.2.2 Medium

BacVector Insect Cell Medium™ (Novagen)

2.10.7.2.3 Kryokonservierung

BacVector Insect Cell Medium™ (Novagen)

5% hitzeinaktiviertes FKS

20% DMSO, Hybridoma-getestet (Sigma)

2.10.7.2.4 Sonstige Reagenzien

Trypanblaulösung

70% Ethanol

2.10.7.2.5 Verbrauchsmaterial

Zellschaber (Sarstedt)

25 cm² Flaschen (Greiner)

75 cm² Flaschen (Greiner)

Roller Bottles (Sarstedt)

2.10.7.2.6 Geräte

Mikroskop
Neubauer-Zählkammer
Brutschrank (mit befeuchteter Atmosphäre)
Zentrifuge
sterile Werkbank

2.10.7.3 Durchführung

2.10.7.3.1 Allgemeines

Alle Arbeiten mit *Sf9*-Zellen müssen unter der sterilen Werkbank erfolgen. Das Medium wird aliquotiert, Aliquots, die während Arbeiten mit Virus verwendet wurden, werden nicht gleichzeitig für die Erhaltungskulturen benutzt. Die *Sf9*-Zellen werden nicht gleichzeitig mit anderen Zellen (Bakterien, PBMNCs) bearbeitet, zentrifugiert etc., wurden zuvor andere Proben unter der sterilen Werkbank bearbeitet, die Arbeitsfläche mit Bacillol oder 70% Ethanol abwischen. Zellkulturflaschen, Röhrchen mit Medium etc. nicht offen stehen lassen, sondern Deckel auflegen. Nach Arbeiten mit Baculoviren werden Oberflächen und Geräte mit einem zur Virusinaktivierung geeigneten Reinigungsmittel (hier "Incidin perfekt") gesäubert.

2.10.7.3.2 Auftauen der Stammkultur

Das Medium (BacVector Insect Cell Medium™) in 50 ml Röhrchen aliquotieren. Ein Aliquot bei 27 °C warmstellen, das übrige Medium kalt und dunkel aufbewahren. Ein Aliquot der *Sf9*-Zellen (Lieferumfang: 3 Röhrchen mit je 1×10^7 Zellen) bei 27 °C auftauen. Das Röhrchen mit 70% Ethanol reinigen. Die Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführen und langsam 10 ml warmes Medium zutropfen lassen. Die Zellsuspension vorsichtig durchmischen und in eine 75 cm² Flasche geben, vorsichtig schwenken, bis der gesamte Flaschenboden benetzt ist. Die Zellen 1 h bei 27 °C inkubieren. Adhärenz der Zellen unter dem Mikroskop überprüfen. Das Medium absaugen und durch 10 ml frisches, warmes Medium ersetzen. Die Zellen weiter inkubieren, bis das Monolayer zu ca. 90 bis 95% konfluent ist. Medium alle 2 Tage wechseln.

2.10.7.3.3 Adhärenente Kultur

Kulturen, die über 80% konfluent sind, können zwischen 1:2 bis zu 1:20 geteilt werden. Zum Teilen der Zellen das alte Medium absaugen und durch warmes, frisches Medium ersetzen. Frisches Medium in neuen Flaschen vorlegen. Mit einem Zellschaber die Zellen vorsichtig vom Flaschenboden lösen, mit einer Pipette resuspendieren und in ein 15 ml Röhrchen überführen. Ein Aliquot entnehmen und mit Trypanblau versetzen, in der Neubauerzählkammer die lebenden Zellen zählen. Die Konzentration der Zellsuspension einstellen und auf die neuen Flaschen verteilen, z. B. auf 1×10^6 Zellen pro 1 ml. In einer 25 cm² Flasche sollten ca. 1×10^6 Zellen in 5 ml ausgesäht werden, in einer 75 cm² Flasche 3×10^6 Zellen in 10 bis 12 ml.

2.10.7.3.4 Suspensionskultur

Für eine Suspensionskultur werden die Zellen bei einer Dichte von 1×10^6 pro 1 ml ausgesäht. Die Zelldichte sollte nicht unter 5×10^5 und nicht über 4×10^6 Zellen pro 1 ml liegen. Die Suspensionskulturen müssen geteilt bzw. verdünnt werden, wenn die Zelldichte zwischen 3 bis 4×10^6 pro 1 ml liegt. Wie bei der adhärenenten Kultur die Zellen mit Trypanblau zählen und die Verdünnung auf die lebenden Zellen bezogen berechnen.

2.10.7.3.5 Kryokonservierung

Sobald nach dem Auftauen der gekauften Ursprungkultur genügend Zellen vorhanden sind, sollten Zellen für spätere Kulturen eingefroren werden. Die Zellen sind ca. für 20 Passagen in Kultur zu halten, danach nimmt die Wachstumsrate und die Vitalität stark ab. Daher sollten möglichst Zellen aus einer frühen Passage eingefroren werden. Dazu eine exponentiell wachsende Kultur in frischem Medium ernten. Die Zellzahl und Vitalität bestimmen, die Vitalität sollte über 90% liegen. Die Zellen in Medium auf 2×10^7 Zellen pro 1 ml einstellen. Das gleiche Volumen an Einfriermedium vorbereiten: Medium mit 5% hitzeinaktiviertem FKS und 20% DMSO versetzen (z. B. für 50 ml Einfriermedium 10 ml DMSO, 2,5 ml FKS und 37,5 ml Medium), Zellsuspension und Einfriermedium 1:1 mischen und in 1 ml Aliquots einfrieren. Dabei zunächst im Propanolbad auf -80 °C stellen, nach spätestens 2 Wochen für Langzeitlagerung in flüssigen Stickstoff überführen.

2.10.8 Herstellung von Virusüberständen für die Infektion

2.10.8.1 Prinzip

2.10.8.1.1 Transfektion

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNA in eine Zelle eingebracht, diese wird dadurch transfiziert. Es gibt unterschiedlichste Transfektionsmethoden, diese lassen sich nach dem Mechanismus einteilen, durch den die DNA in die Zelle gelangt: durch Endo- bzw. Phagozytose, durch Fusion mit der Zelle, durch Diffusion, durch physikalische Verfahren (z. B. Mikroinjektion oder Beschuss) oder durch virale Aufnahmemechanismen [59]. Hier wird eine auf Lipofektion beruhende Methode verwendet. Die DNA wird dabei mit der Lipidlösung inkubiert, es bilden sich DNA-Lipid-Komplexe. Diese Komplexe gibt man zu den Zellen und inkubiert mehrere Stunden, durch Fusion der Lipide mit der Zellmembran gelangt die DNA ins Zellinnere. Im Falle der hier transfizierten Baculovirus-DNA beginnen die Zellen nach ca. 72 h mit der Produktion von Virus, dabei sterben die Zellen ab und das Virus wird in den Überstand entlassen. Es kann dann zur Neuinfektion von Zellen verwendet werden.

2.10.8.1.2 Expressionstest

Um festzustellen, ob die infizierten Zellen das gewünschte Protein exprimieren, wird ein Expressionstest durchgeführt. Dabei wird eine relativ kleine Zellmenge mit dem aus der Transfektion gewonnenen Virus infiziert, eine uninferierte Kontrolle wird parallel angesetzt. Nach 48 h werden die Zellen geerntet, in Probenpuffer aufgenommen, kurz aufgekocht und auf einem Acrylamidgel aufgetrennt. Im Vergleich mit der Negativkontrolle sollten sich in den Proteinbanden der infizierten Zellen zusätzliche und/oder stärkere Banden anfinden, auch große Tags wie das GST können als Extrabande auftauchen.

2.10.8.1.3 Herstellung von größeren Virusüberstandsvolumina

Zeigt sich eine Proteinexpression bei den infizierten Zellen, so muss zur Gewinnung des rekombinanten Proteins eine größere Zellmenge infiziert werden. Dazu muss zuvor mehr Virusüberstand gewonnen werden. Zu diesem Zweck werden schrittweise immer größere

Volumina infiziert. Nach mehreren Vermehrungszyklen ist genug Virus vorhanden, allerdings sollte nach einigen Vermehrungen der Expressionstest wiederholt werden, um sicher zu stellen, dass weiterhin Proteinexpression stattfindet.

2.10.8.2 Materialien

2.10.8.2.1 Transfektion

Sf9-Zellen, >90% Vitalität (vgl. 2.10.7.3, S. 119)

Bacmid-DNA

Cellfectin™ (Invitrogen)

2.10.8.2.2 Expressionstest

Sf9-Zellen, >90% Vitalität (vgl. 2.10.7.3, S. 119)

Virusüberstände aus Transfektion

Probenpuffer und weitere Materialien für PAGE (siehe 2.9.6.2, S. 99)

2.10.8.3 Durchführung

2.10.8.3.1 Transfektion

Die Transfektion mit Cellfectin™ wurde nach Angaben des Herstellers (Invitrogen) durchgeführt. In einer 6-Loch-Platte pro Loch 1×10^6 *Sf9*-Zellen aussähen, 1 h adhären lassen. Ungefähr 2 µg Bacmid-DNA in 100 µl Medium mit 5 µl und 2 µl Cellfectin 100 µl Medium mischen, 30 min bei RT inkubieren. Mit 800 µl Medium auf 1 ml auffüllen. Das Medium von den Insektenzellen absaugen und durch die Transfektionsansätze ersetzen, 5 h bei 27 °C inkubieren. Dann den Überstand abnehmen und 2 ml frisches Medium zugeben. Für 72 h weiter inkubieren, Infektion und Lyse der Zellen im Mikroskop überprüfen, Virusüberstand abnehmen.

2.10.8.3.2 Expressionstest

In einer 24-Loch-Platte 5×10^5 vitale *Sf9* aussähen, 1 h absitzen lassen, Adhärenz der Zellen im Mikroskop prüfen. Das Medium abnehmen, 300 µl frisches Medium und 200 µl Virus (aus der Transfektion) zugeben. Neben den Ansätzen mit unterschiedlichen Cellfectinmengen im Komplexierungsschritt (2 µl und 5 µl), wurden noch Testansätze mit 1% FCS und in Sf900-Medium (Invitrogen) gemacht. Für ca. 48 h inkubieren, es sollten sich

Zeichen einer Infektion (vergrößerte, granuläre Zellen, später auch abgelöste Zellen) zeigen. Die Überstände abnehmen und für eine eventuelle Analyse aufbewahren (Protein im Überstand für PAGE mit TCA fällen). Zu jedem Loch 200 µl 5 × Probenpuffer (vgl. 2.9.6.2, S. 99) geben. Die Proben in 1,5 ml Gefäße überführen, aufkochen und 10 µl pro Spur in einem Polyacrylamidgel auftrennen (vgl. 2.9.6.3, S. 100). Ergebnis der Auftrennung mit einem Photo dokumentieren.

2.10.8.3.3 Herstellung von größeren Virusüberstandvolumina

Zunächst adhärente Kulturen infizieren, sobald ausreichend Virus vorhanden ist, Suspensionskulturen infizieren, ca. 10 bis 20% des Kulturvolumens an Virus zugeben. Nach zwei bis drei Vermehrungszyklen nochmal Expressionstest durchführen.

2.10.9 Proteingewinnung

2.10.9.1 Prinzip

Um eine ausreichende Menge an Protein für weitere Versuche (hier Stimulationsversuche) zu gewinnen, werden große Mengen an *Sf9*-Zellen infiziert, nach 48 h werden die Zellen geerntet und aufgeschlossen, um die rekombinanten Proteine zu isolieren. Große Zellmengen lassen sich gut in Suspensionskultur anziehen, allerdings bedürfen die *Sf9*-Zellen einer ausreichenden Sauerstoffzufuhr und können verglichen mit Bakterien nur langsam geschüttelt werden.

Der Zellaufschluß kann mit Detergenzien oder mechanisch erfolgen, hier werden die Zellen durch Ultraschall aufgeschlossen. Aufgrund der Hitzeentwicklung beim Ultraschallen muss gekühlt werden, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern. Je nach Eigenschaften des zu isolierenden Proteins können verschiedene Aufschlusspuffer verwendet werden, die z. B. die Proteine in Lösung halten.

Um die rekombinanten von den zellulären Proteinen zu trennen, sind sie mit einem GST-Tag versehen. Nachdem die festen Bestandteile abgetrennt wurden, können die rekombinanten Proteine durch Affinitätschromatographie aus der Lösung entfernt werden. Eine TEV-Schnittstelle zwischen GST-Tag und Zielprotein ermöglicht die Abspaltung vom Säulenmaterial. Bei Bedarf kann die verwendete Protease, die ein 6 × His-Tag trägt, ebenfalls durch Affinitätschromatographie entfernt werden.

Um den Aufreinigungsprozess zu beurteilen (Verluste, Anreicherung), werden in mehreren Schritten der Aufreinigung Aliquots gesammelt und mit PAGE analysiert.

2.10.9.2 Materialien

2.10.9.2.1 Expression von Proteinen

Materialien für Insektenzellkultur (vgl. 2.10.7.2, S. 118)

Sf9-Zellen, >90% Vitalität (vgl. 2.10.7.3, S. 119)

Virusüberstände (mindestens 20 ml)

2.10.9.2.2 Aufreinigung der Proteine

PBS

GST-resin (G-biosciences)

AcTEV-Protease, mit 20 × Puffer und 0,1 M DTT (Invitrogen)

2.10.9.2.3 Kontrolle der Aufreinigung

Probenpuffer und weitere Materialien für PAGE (siehe 2.9.6.2, S. 99)

2.10.9.3 Durchführung

2.10.9.3.1 Animpfen *Sf9*-Kulturen

Für jedes der Proteine (UL55, UL83, UL94, UL122, UL123) eine *Roller Bottle* mit 200 ml Zellsuspension mit 1×10^6 Zellen pro 1 ml vorbereiten. 10% (v/v) Virus zugeben. Bei 60 rpm 27 °C 48 h kultivieren.

2.10.9.3.2 Ernte und Aufschluß der Zellen

Ein Aliquot der Zellsuspension zur Analyse entnehmen. Die Zellen in 50 ml Röhrchen bei $300 \times g$, 4 °C abzentrifugieren, Überstand verwerfen. Zellen in 25 ml PBS resuspendieren und mit Ultraschall aufschließen, dabei auf Eis kühlen, dreimal für 20 sec beschallen, dazwischen 2 min auf Eis abkühlen lassen. Die Zelltrümmer abzentrifugieren. Von den Zelltrümmern und aus dem Überstand ein Aliquot zur Analyse entnehmen.

2.10.9.3.3 Aufreinigung der Proteine über die GST und Abtrennen der GST

Zunächst die GST-Agarose nach Herstellerangaben vorbereiten: 1,33 ml des 75% Säulenmaterials bei $500 \times g$ für 5 min abzentrifugieren, Überstand abgießen. Mit 10 ml kaltem

PBS waschen, nochmals zentrifugieren und mit 1 ml PBS mischen, dies ergibt das 50% Säulenmaterial für die Aufreinigung. 2 ml des 50% Säulenmaterials pro 100 ml Zellüberstand nach Ultraschallaufschluss verwenden.

Die Überstände für 30 min unter leichtem Schütteln mit der GST-Agarose inkubieren. Danach abzentrifugieren, Überstand abnehmen und Säulenmaterial zweimal mit 10 ml kaltem PBS waschen. Aliquots des Säulenmaterials und der Überstände entnehmen.

Pro Ansatz 200 µl TEV-Puffer vorbereiten, 10 µl AcTEV-Protease zugeben, Säulenmaterial damit versetzen und ü.N. bei 4 °C inkubieren. Säulenmaterial abzentrifugieren und Überstand komplett abnehmen.

2.10.9.3.4 Kontrolle der Aufreinigung

Folgende Proben mit PAGE (vgl. 2.9.6.3, S. 100) analysieren:

1. 500 µl Zellsuspension; Pellet in 100 µl 5 × Probenpuffer aufnehmen
2. 500 µl Überstand nach Ultraschallaufschluss; fällen, in 100 µl 5 × Probenpuffer aufnehmen
3. 500 µl Überstand nach Inkubation mit GST-Agarose; fällen, in 100 µl 5 × Probenpuffer aufnehmen
4. 200 µl Zelltrümmer; 100 µl 5 × Probenpuffer mischen
5. Spatelspitze GST-Agarose (nach Inkubation mit TEV); 20 µl 5 × Probenpuffer zugeben
6. 5 µl abgespaltenes Protein; 15 µl 5 × Probenpuffer zugeben

Die Proben 2 min aufkochen, abzentrifugieren und jeweils 10 µl auf Gel auftragen, bei der GST-Agarose und gespaltenem Protein 20 µl auftragen. Das Ergebnis der PAGE mit Photo dokumentieren.

3 Ergebnisse

3.1 Quantifizierung CMV-erkennender T-Zellen mit Tetrameren

Im Zeitraum von Juli 2006 bis Februar 2008 wurden 97 Patienten, die in der Hämatologischen Klinik der MHH in Behandlung waren, eingeschlossen. 87 Patienten konnten sowohl vor, als auch nach Transplantation auf vorhandene CMV-erkennende T-Zellen hin untersucht werden. Ein Patient (UPN1329) wurde erst ca. 1 Jahr nach HSCT (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*) in die Messungen aufgenommen, als eine Behandlung aufgrund eines Rezidivs erfolgte. Ein weiterer (UPN1439) wurde ca. 1 Monat nach HSCT eingeschlossen. Von den übrigen Patienten waren 6 zum Zeitpunkt dieser Auswertung noch nicht transplantiert, 2 sind vor Transplantation verstorben. Im Folgenden werden die klinischen Daten der Patientenkohorte zusammengefasst. Alle Daten beziehen sich auf die in die Tetramermessung eingeschlossenen Patienten im genannten Zeitraum, außer es ist ausdrücklich anders vermerkt.

3.1.1 Klinische Daten zur Patientenkohorte

3.1.1.1 Alter

Alter der Patienten zum Zeitpunkt der HSCT	
Mittelwert	49 Jahre
Median	54 Jahre
Wertebereich	18 - 70 Jahre

Tabelle 3.1: Alter der im Zeitraum Juli 2006 bis Februar 2008 eingeschlossenen Patienten

Die Tabelle 3.1, S. 127 gibt einen Überblick über das Patientenalter. Das Alter in der Patientenkohorte reichte von 18 bis 70 Jahren, der Median lag bei 54, das mittlere Alter bei 49 Jahren. Die meisten Patienten waren zwischen 51 und 60 Jahre alt ($n=33$), die jüngeren Patienten unter 30 Jahren waren in der Minderheit ($n=14$), ebenso die älteren Patienten über 60 Jahre ($n=18$). Das Alter der Spender ist nicht für alle Spender bekannt. Bei den Spendern, deren Alter bekannt war ($n=91$), lag der Wertebereich zwischen 17 und 71 Jahren, der Mittelwert war 38, der Median 39 Jahre.

3.1.1.2 Diagnose

Diagnose		
Erkrankung	n	%
AA	2	2,2%
ALL	7	7,9%
AML	36	40,4%
CLL	2	2,2%
CML	3	3,4%
MDS	13	14,6%
MDS / MPS	1	1,1%
MPS	4	4,5%
NHL	6	6,7%
sAML	15	16,9%

Tabelle 3.2: Diagnose der im Zeitraum Juli 2006 bis Februar 2008 eingeschlossenen Patienten; AA = aplastische Anämie, ALL = akute lymphatische Leukämie, AML = akute myeloische Leukämie, CLL = chronische lymphatische Leukämie, CML = chronische myeloische Leukämie, MDS = Myelodysplastisches Syndrom, MDS/MPS = Mischform aus beiden Erkrankungen, MPS = Myeloproliferatives Syndrom, NHL = non-Hodgkin Lymphom, sAML = sekundäre AML (z. B. aus MDS)

Die Tabelle 3.2 gibt einen Überblick über die Erkrankungen der eingeschlossenen Patienten. Die Patientenkohorte setzt sich aus Personen mit unterschiedlichen hämatologischen Erkrankungen zusammen, diese entsprechen in der Verteilung aber den üblichen Patientengruppen, die für eine HSCT in Frage kommen. Den größten Anteil haben mit 40,4% die AML ($n=36$), gefolgt von sekundären AML ($n=15$) mit 16,9%. Den nächstgrößeren Anteil stellen mit 14,6% Patienten mit MDS ($n=13$). In der Gruppe der AML-Patienten wurden 3 Patienten aufgrund fehlender HLA-identer Spender mit haploidenten Spendern transplantiert (vgl. Tabelle 3.4, S. 129).

3.1.1.3 Spender

Alter, Geschlecht [62], HLA-Typ [63], [64], Stammzellquelle (PBSCT oder KM) und CMV-Serostatus [65] des Spenders haben Einfluss auf die Erfolgchancen einer Transplantation [66]. Das Geschlecht, die Transplantatquelle und der CMV-Serostatus von Spender und Empfänger wird für alle Patienten dokumentiert.

Geschlecht von Empfänger (R) und Spender (D)		
R/D	n	%
w / w	16	18,0%
w / m	20	22,5%
m / w	17	19,1%
m / m	36	40,4%

Tabelle 3.3: Geschlecht von Empfänger (R, engl. *recipient*) und Spender (D, engl. *donor*) in der Patientenkohorte von Juli 2006 bis Februar 2008; w = weiblich, m = männlich

Tabelle 3.3 fasst die Geschlechterkombination zwischen Spender und Empfänger zusammen. Die meisten Patienten waren männlich ($n = 53$). Für einen Großteil der männlichen Patienten konnten männliche Spender gefunden werden, insgesamt wurden 36 Männer mit Stammzellen von Männern transplantiert, 17 Männer hatten eine weibliche Stammzellspenderin, diese Kombinationen machen 40,4% (m/m) bzw. 19,1% (m/w) der Kohorte aus. Bei den Patientinnen erhielten 16 Stammzellen von Frauen, 20 hatten einen Mann als Spender.

Spender		
Typ	n	%
HAPLO	3	3,4%
MRD	32	37,1%
MUD	38	42,6%
MMUD	15	16,9%

Tabelle 3.4: Herkunft des Transplantates für die eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008; HAPLO = haploidenter Spender, MRD = *matched related donor* / Familienspender, MUD = *matched unrelated donor* / Fremdspender; MMUD = *mismatched unrelated donor* / nicht HLA-identer Fremdspender

Wie bereits erläutert (1.1.5, S. 9 und 1.2.2.1, S. 14), spielt die Übereinstimmung der HLA-Moleküle eine große Rolle im Rahmen von Transplantationen. Über 70% der hier behandelten Patienten erhielten Zellen von einem Spender mit übereinstimmendem HLA-Typ,

dabei hatten 37% einen Familienspender ($n = 33$), während 42% Stammzellen von HLA-identen Fremdspendern ($n = 38$) erhielten. Desweiteren wurden 17% der Patienten von einem nicht HLA-identen Fremdspender ($n = 15$) transplantiert. 3,4% der Patienten ($n = 3$) wurden haploident transplantiert, alle diese Patienten hatten eine AML.

3.1.1.4 CMV-Serostatus

CMV-Serostatus von Empfänger (R) und Spender (D)		
CMV-Serostatus	n	%
R ⁻ / D ⁻	28	31,8%
R ⁻ / D ⁺	8	9,1%
R ⁺ / D ⁻	9	10,2%
R ⁺ / D ⁺	43	48,9%

Tabelle 3.5: CMV-Serostatus von Empfänger (R, engl. *recipient*) und Spender (D, engl. *donor*) in der Patientenkohorte von Juli 2006 bis Februar 2008; – = negativ, + = positiv

Die Kenntnis des CMV-Serostatus spielt sowohl für das Gesamtüberleben der Patienten nach HSCT als auch bei der Verfolgung der CMV-spezifischen Immunrestitution eine zentrale Rolle. In dieser Patientenkohorte ist über die Hälfte der Patienten CMV-seropositiv ($n = 52$). Da heute bevorzugt eine Übereinstimmung im CMV-Serostatus gesucht wird, lag der Anteil der seropositiven Patienten mit seropositivem Spender bei 48,9% ($n = 43$) total, auf die CMV-seropositiven Patienten bezogen hatten 82% einen positiven Spender. Der Anteil an seropositiven Patienten, die Stammzellen von einem seronegativen Spender erhielten, machte hingegen nur 10,2% ($n = 9$) der gesamten Kohorte aus. Die Beobachtung der CMV-spezifischen Immunrestitution in letzteren Patienten könnte dazu dienen, den Einfluss der Konditionierung auf die CMV-Immunität abzuschätzen. Ca. ein Drittel der Patienten (31,8%, $n = 28$) ist CMV-seronegativ und wurde bevorzugt von seronegativen Spendern transplantiert. Diese Gruppe ist nur durch *de novo* CMV-Infektionen gefährdet. 9,1% der Patienten waren vor Transplantation CMV-seronegativ und erhielten Stammzellen von einem CMV-positiven Spender ($n = 8$).

3.1.1.5 Konditionierung

Konditionierung					
Protokoll	n	%	Protokoll	n	%
Bu/Cy	3	3,4%	Flu/Cy/TBI/ATG	2	2,2%
Bu/Cy/ATG	5	5,6%	Flu/Melph/Thiotepa/ATG	2	2,2%
ClAraC/TBI/ATG	14	15,7%	Flu/TBI	5	5,6%
FlAmsA	33	37,1%	Flu/TBI/ATG	2	2,2%
Flu/Bu/ATG	3	3,4%	TBI/Cy	4	4,5%
Flu/Bu/Cy	2	2,2%	TBI/Cy/ATG	4	4,5%
Flu/Bu/Cy/ATG	1	1,1%	TBI/VP16/ATG	1	1,1%
Flu/Cy	1	1,1%	Zevalin/Flu/TBI	3	3,4%
Flu/Cy/ATG	1	1,1%			

Tabelle 3.6: Konditionierung der eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008; ATG = Antithymozytenglobulin, Bu = Busulfan, ClAraC = Clofarabin / AraC, Cy = Cymeven, FlAmsA = Fludarabin / AraC / Amsacrin, Melph = Melphalan, TBI = Ganzkörperbestrahlung, VP16 = Vincristin

Die angewendeten Konditionierungsverfahren variierten, da in der Patientenkohorte unterschiedliche Grunderkrankungen vorlagen. Dies sowie das Alter des Empfängers und die Eigenschaften des gewählten Spenders (MUD oder MRD, HLA-ident oder nicht ident, u. a.) beeinflusst die Wahl des Konditionierungsverfahrens. Tabelle 3.6 gibt eine Übersicht über alle verwendeten Konditionierungsprotokolle bzw. Medikamentenkombinationen. Die Konditionierungen sind zu zahlreich im Vergleich zur Patientenanzahl (19 verschiedene Verfahren bei 89 Patienten), um den Einfluss eines speziellen Verfahrens auf die Anzahl der CMV-bindenden T-Zellen zu untersuchen. Das “FlAmsA”-Protokoll [67] wurde bei 37% der Patienten (n = 33) angewendet, allerdings wird auch für diese Gruppe keine einzelne Betrachtung der CMV-bindenden T-Zellen durchgeführt, statt dessen werden die Konditionierungen in Hochdosis- und Dosis-reduzierte-Verfahren (vgl. Tabelle 3.7, S. 131) unterschieden.

Konditionierung mit verringerter Intensität (RIC)		
RIC	n	%
ja	72	80,9%
nein	17	19,1%

Tabelle 3.7: Verwendung von dosis-reduzierten Konditionierungen (RIC) und hochdosierten Konditionierungen bei den eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008

Wie aus Tabelle 3.7 zu entnehmen ist, wurden über 80% der Patienten mit dosis-reduzierten Konditionierungsverfahren (RIC; engl. *reduced intensity conditioning*) behandelt.

3.1.1.6 Immunsuppression

Immunsuppression		
Medikation	n	%
CSA/MMF	54	60,7%
CSA/MTX	30	33,7%
CSA/MTX/MMF	1	1,1%
Tacrolimus/MMF/CSA	1	1,1%
TCD	2	2,2%
Tacrolimus/MMF	1	1,1%

Tabelle 3.8: Immunsuppression zur GvHD-Prophaxe in der Patientenkohorte von Juli 2006 bis Februar 2008; CSA = Cyclosporin A, MMF = Mycophenolsäure, MTX = Methotrexat, TCD = *T-cell depletion* / T-Zell-Depletion

Die Immunsuppression zur GvHD-Prophylaxe ist in Tabelle 3.8 zusammengefasst. Am Häufigsten wurde Cyclosporin A (CSA) in Kombination mit Mycophenolsäure (MMF) oder Methothrexat (MTX) gegeben, die Kombination CSA / MMF macht dabei 60,7% (n = 54), die CSA / MTX 33,7% (n = 30) aus. Diese Immunsuppression mit CSA / MMF wird im Rahmen der FlAmsA- und ClAraC-Protokolle verwendet. Andere GvHD-Prophylaxen, die bei weniger als 10% der Patienten Anwendung fanden, waren z. B. Tacrolimus oder eine T-Zell-Depletion des Transplantates.

3.1.1.7 CMV-Reaktivierungen

CMV Reaktivierungen					
CMV Reaktivierung	n	%	Mittelwert	Median	Wertebereich
nein	64	71,9%			
ja	25	28,1%			
Anzahl der CMV-Reaktivierungen bei den Patienten, die CMV reaktivierten:					
eine	25	28,1%	Tag +43	Tag +38	Tag +11 bis +136
zwei	6	6,7%	Tag +209	Tag +80	Tag +47 bis +809*
drei	2	2,2%	Tag +497	Tag +497	Tag +136 bis +858*
*Zeiträume über 607 Tage (01.07.2006 bis 28.02.2008) kommen durch die nach HSCT eingeschlossenen Patienten zustande					

Tabelle 3.9: CMV-Reaktivierungen bei den eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008

Wenn CMV reaktiviert, bedeutet dies, dass keine ausreichende Kontrolle des Virus durch virusspezifische T-Zellen vorliegt. Um die Aussagekraft der Tetramermessungen hinsichtlich eines Schutzes vor CMV bzw. einem erhöhten Risiko einer Reaktivierung zu bestimmen, werden die Daten mit den klinischen Daten über CMV-Reaktivierungen, insbesondere dem pp65-Wert aus den immunhistopathologischen Untersuchungen, abgeglichen. Tabelle 3.9 zeigt die Anzahl der CMV-Reaktivierungen sowie den medianen Zeitraum, in dem sie auftraten. In dieser Patientenkohorte reaktivierten 28,1% der Patienten CMV mindestens einmal ($n = 25$). 6,7% ($n = 6$) reaktivierten zweimal, 2,2% ($n = 2$) dreimal. Der Zeitpunkt der ersten Reaktivierung lag zwischen Tag +11 und Tag +136 nach Transplantation, im Mittel fand die erste Reaktivierung an Tag +43 statt. 71,9% der Patienten reaktivierten CMV nicht ($n = 64$).

Schlüsselt man die Reaktivierungen nach anderen Eigenschaften der jeweiligen Patienten auf, zeigt sich, dass von 25 CMV-Reaktivierungen 6 auf die Gruppe CMV-seropositiver Empfänger mit CMV-seronegativen Spendern (R^+ / D^-) fallen. Von diesen 6 Patienten haben 3 mehrfach reaktiviert. Von den 8 Mehrfachreaktivierungen sind also 3 Patienten aus der Gruppe R^- / D^+ , ein weiterer wurde haploident transplantiert. Betrachtet man die haploident transplantierten Patienten, reaktivierten 2 von 3 CMV, einer davon zweimal.

3.1.1.8 Rezidive

Rezidive					
rezidiert	n	%	Mittelwert	Median	Wertebereich
ja	13	14,6%	Tag +188	Tag +105	Tag +55 bis +579
nein	61	68,5%			
n. n.	15	16,9%			

Tabelle 3.10: Rezidive bei den eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008; n. n.: zu früh nach HSCT für eine Aussage bezüglich eines Rezidivs

Die Tabelle 3.10 zeigt die Anzahl der Rezidive in der Patientenkohorte. 68,5% der Patienten ($n = 61$) hatten bis zum Zeitpunkt dieser Datenerhebung kein Rezidiv. Bei 14,6% ($n = 13$) kam es zu einem Wiederauftreten der Grunderkrankung (Rezidiv), bei 16,9% ($n = 15$) der Patienten war noch nicht genügend Zeit nach der Transplantation verstrichen, um eine Aussage über den Erfolg der Transplantation zu treffen. Von den 13 Patienten mit Rezidiv waren 8 an AML, 3 an sAML, 1 an MDS und 1 an CLL erkrankt, nur einer dieser AML-Patienten wurde haploident transplantiert. Im Mittel trat das Rezidiv an Tag +188 nach Transplantation auf, der Wertebereich erstreckte sich von Tag +55 bis Tag +579.

3.1.1.9 Überleben

Überleben					
Überlebensstatus	n	%	Mittelwert	Median	Wertebereich
lebend	71	79,8%	Tag +184	Tag +187	Tag +4 bis +930*
tot	18	20,2%	Tag +130	Tag +133	Tab +18 bis +292
*Zeiträume über 607 Tage (01.07.2006 bis 28.02.2008) kommen durch die nach HSCT eingeschlossenen Patienten zustande					

Tabelle 3.11: Überleben in der eingeschlossenen Patientenkohorte von Juli 2006 bis Februar 2008; im Falle des Todes geben die Daten den Todeszeitpunkt wieder, bei lebenden Patienten den Zeitpunkt der letzten hier einbezogenen Datenaufnahme / Untersuchung

Tabelle 3.11 gibt Aufschluss über das Überleben der Patienten. 79,8% ($n = 71$) der Patienten lebten zum Zeitpunkt der Auswertung, während 20,2% ($n = 18$) bereits verstorben waren.

3.1.1.10 Zeitraum der Datenerfassung

Datenerfassung nach HSCT	
Mittelwert	Tag +173
Median	Tag +149
Wertebereich	Tag +4 bis +930

Tabelle 3.12: Zeitraum der Datenerfassung und klinischen Betreuung nach HSCT für die eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008

Für die in diese Auswertung einbezogenen Patienten wurden im Mittel Daten bis Tag +173 nach Transplantation erhoben. Der Wertebereich erstreckt sich von Tag +4 bis Tag +930, gerade für die über einen längeren Zeitraum beobachteten Patienten ergaben sich z. T. sehr detaillierte Verläufe für die Rekonstitution der CMV-Immunität. Lässt man die beiden erst nach HSCT eingeschlossenen Patienten außer Acht, wurden von 87 vor HSCT eingeschlossenen Patienten 16,1% (n = 14) länger als Tag +100, 12,6% (n = 11) Patienten länger als Tag +150 und 35,6% (n = 31) Patienten länger als Tag +200 überprüft.

3.1.2 Abdeckung des Patientenaufkommens

3.1.2.1 HLA-Verteilung in der Patientenkohorte

2-digit HLA-Aallele, die zu einem Tetramer passen (bezogen auf die eingeschlossenen Patienten)		
HLA-A	n	%
*01	31	17,4%
*02	60	33,7%
*24	16	9,0%
HLA-B	n	%
*07	25	14,0%
*08	24	13,5%
*35	11	6,2%

Tabelle 3.13: Verteilung der HLA-Aallele mit passendem Tetramer bei den eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008

Betrachtet man die Verteilung für die HLA-Aallele, für die ein Tetramer zur Verfügung stand, in der Patientenkohorte (vgl. Tabelle 3.13), zeigt sich, dass HLA-A*02 am Häu-

figsten vorkam, was in etwa der HLA-Verteilung im europäischen Raum entspricht. Das HLA-A*02-Allel machte 33,7% der HLA-A-Typen in der Patientenkohorte aus (Gesamtzahl = Patientenzahl \times 2; für jedes HLA-A, -B, -Cw, usw. trägt eine Person 2 Allele, diese können gleich sein), gefolgt von 17,4% mit HLA-A*01 und 14,0% HLA-B*07, sowie 13,5% mit HLA-B*08, dementsprechend sind die entsprechenden Tetramere gut einsetzbar. HLA-A*24 und HLA-B*35 kamen mit 9,0% bzw. 6,2% eher selten vor.

Im Zeitraum von Juli 2006 bis Februar 2008 wurden insgesamt 110 Patienten transplantiert, davon konnten 97 aufgrund mindestens eines passenden Tetramers in die Messungen einbezogen werden. Mit den eingesetzten Tetrameren konnten 88,2% aller Patienten auf die Entwicklung der CMV-Immunität hin untersucht werden. Die Restlichen können bei Bedarf z. B. mit einer intrazellulären Färbung auf IFN- γ -Produktion (nach Stimulation mit CMV-Antigen) auf CMV-reaktive Zellen hin untersucht werden.

3.1.2.2 Anzahl der passenden Tetramere pro Patient

Anzahl der passenden Tetramere pro Patient		
passende(s) Tetramer(e)	n	%
1	37	41,6%
2	41	46,1%
3	9	10,1%
4	2	2,2%

Tabelle 3.14: Anzahl der Tetramere, mit denen die eingeschlossenen Patienten von Juli 2006 bis Februar 2008 messbar waren

Je mehr Tetramere zu den verschiedenen HLAs der jeweiligen Patienten passen, desto genauer lassen sich die CMV-bindenden T-Zellen im Blut eines Patienten quantifizieren. Die Tabelle 3.14 zeigt, mit wievielen Tetrameren die Patientenproben maximal untersucht werden konnten: Für 46,1% waren 2 passende Tetramere verfügbar ($n = 41$), den nächstgrößeren Anteil mit 41,6% machen Patienten aus, deren Zellen mit einem Tetramer gefärbt werden konnten ($n = 37$). Für 10,1% der Patienten standen 3 Tetramere zur Verfügung ($n = 9$), für 2,2% konnten 4 Tetramere verwendet werden ($n = 2$).

3.1.3 CMV-spezifische Immunrekonstitution nach HSCT

3.1.3.1 Seropositive Patienten mit seropositiven Spendern

In CMV-seropositiven Patienten mit CMV-seropositiven Spendern (R^+ / D^+) könnten sowohl CMV-spezifische T-Zellen des Patienten, die die Konditionierung überlebt haben, als auch Spender-CMV-T-Zellen einen Schutz vor Reaktivierungen vermitteln. Von den 43 Patienten in der R^+ / D^+ Gruppe reaktivierten 17 CMV, nur 2 Patienten aus dieser Gruppe reaktivierten ein zweites Mal, einer davon war haploident transplantiert worden. Im Folgenden werden beispielhaft einige Patienten vorgestellt. Die Anzahl der CMV-bindenden T-Zellen ist auf 1 μ l Blut bezogen, die Anzahl der pp65-positiven Zellen auf 400.000 Leukozyten.

Bei den R^+ / D^+ Patienten können teilweise schon sehr früh nach Transplantation (vor Tag +50) CMV-bindende T-Zellen detektiert werden. Die Patienten reaktivieren CMV gar nicht oder sind nach einer CMV-Reaktivierung und einer dadurch ausgelösten Proliferation der CMV-bindenden T-Zellen geschützt.

3.1.3.1.1 Beispiele für Patienten mit CMV-Reaktivierung

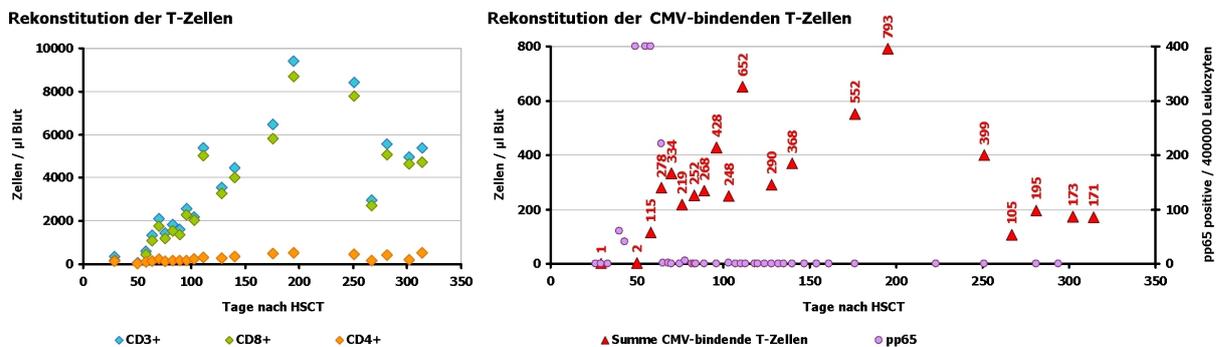


Abbildung 3.1: Rekonstitution der $CD3^+$ -, $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen (links) und Rekonstitution der CMV-bindenden T-Zellen im Vergleich zu den pp65 Werten (rechts) bei Patient UPN1482: Auf der X-Achse sind die Tage nach Transplantation (HSCT) aufgetragen, auf der linken Y-Achse die Zellen pro Mikroliter Blut, auf der rechten Y-Achse im rechten Bild die Anzahl der pp65-positiven Zellen pro 400000 Leukozyten. $CD3^+$ -T-Zellen = blaue Raute, linkes Bild $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen = grüne Raute; linkes Bild; $CD3^+CD4^+$ -T-Zellen = orangefarbene Raute, linkes Bild; CMV-bindende $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen = rotes Dreieck, rechtes Bild; pp65-Werte = lila Kreis, rechtes Bild

Ein repräsentatives Beispiel für die R⁺ / D⁺-Gruppe ist UPN1482 (MDS; MMUD, *mis-match* in HLA-Cw1; letzte Untersuchung: Tag +397; 2 passende Tetramere). Die Abb. 3.1, S. 137 verdeutlicht den Ablauf der CMV-spezifischen Immunrekonstitution in Patient UPN1482. Im Blut des Patienten wurde an Tag +29 eine CMV-bindende CD8⁺-T-Zelle detektiert. An Tag +40 kam es zu einer CMV-Reaktivierung mit zunächst 60 pp65-positiven Leukozyten. Ihre Anzahl stieg an Tag +49 über die Detektionsgrenze von 400 pp65-positiven Leukozyten, dies blieb bis Tag +58 so. An diesem Tag kam es zu einem deutlichen Anstieg der CMV-bindenden Zellen, es wurden 115 CMV-bindende CD8⁺-T-Zellen detektiert, an Tag +64 war die Anzahl der pp65-positiven Zellen auf 221 reduziert, während die Anzahl der CMV-bindenden CD8⁺-T-Zellen auf 278 anstieg. Ab Tag +70 waren keine pp65-positiven Zellen mehr nachweisbar, die CMV-bindenden CD8⁺-T-Zellen waren bis auf 334 angestiegen. In der Chimärismusanalyse wurde bei UPN1482 an Tag +28 eine Spenderanteil von 100% (bezogen auf alle PBMNCs) gemessen und blieb bei allen weiteren Messungen bei diesem Wert. Während die CD3⁺CD8⁺-T-Zellen (grüne Raute, linkes Bild) um Tag +100 bereits wieder über 2000 pro Mikroliter Blut lagen, blieb die Zahl der CD3⁺CD4⁺-T-Zellen (orangene Raute, linkes Bild) bis nach Tag +300 unter 1000 pro Mikroliter Blut. Der Anstieg der CD3⁺-T-Zellen (blaue Raute, linkes Bild) war also vor allem auf den Anstieg der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen zurückzuführen. Bei der Messung der CMV-bindenden T-Zellen zeigte sich, dass gerade früh nach Transplantation ein großer Teil der CD8⁺-T-Zellen CMV-bindend sein kann, bei UPN1482 machten die CMV-bindenden CD8⁺-T-Zellen an Tag +29 nur 0,7% der CD8⁺-T-Zellen aus. Nach der CMV-Reaktivierung waren an Tag +58 25,1% der CD8⁺-T-Zellen CMV-bindende. Der Anteil sank im Zuge der Normalisierung der Leukozytenzahlen weiter ab, obwohl weiterhin mehr als 100 CMV-bindende CD8⁺-T-Zellen im Blut des Patienten gemessen wurden, und pendelte sich 1 Jahr nach Transplantation um 3,5% der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen ein.

Patient UPN1517 (ALL; MUD; letzte Untersuchung: Tag +221; 2 passende Tetramere) reaktivierte an Tag +22 zum ersten Mal CMV, bis Tag +30 stieg die Anzahl der pp65-positiven Leukozyten auf 10, sank dann an Tag +31 auf 2 pp65-positiven, an Tag +34 wurde eine Tetramermessung für diesen Patient durchgeführt und dabei 22 CMV-bindende CD8⁺-T-Zellen detektiert. An Tag +48 wurden zum 2. Mal pp65-positiven Zellen nachgewiesen, an Tag +51 war ihre Anzahl von 4 wieder auf 1 gesunken. Auf diese Reaktivierung hin stieg die Anzahl der CMV-bindenden T-Zellen, von einem Einbruch an Tag +98 mit nur 10 CMV-bindenden CD8⁺-T-Zellen abgesehen, kontinuierlich bis auf über 100 Zellen (147 an Tag +170) an. Bei UPN1517 war der Spenderanteil im Chimärismus außer an Tag +120, wo er kurzzeitig bei 99% lag, immer bei 100%.

3.1.3.1.2 Beispiele für Patienten ohne CMV-Reaktivierung

Der Schutz von Patienten vor CMV-Reaktivierungen durch bereits frühzeitig vorhandene CMV-bindende Zellen konnte z. B. bei UPN1458 (AML; MUD; letzte Untersuchung: Tag +407; 2 passenden Tetramere) und UPN1557 (MDS; MRD; letzte Untersuchung: Tag +225; 2 passende Tetramere) beobachtet werden. Patient UPN1458 hatte keine CMV-Reaktivierung, an Tag +64 wurden insgesamt 324 CMV-bindende CD8⁺-T-Zellen gemessen. Ein Beispiel für das frühe Vorhandensein von CMV-bindenden CD8⁺-T-Zellen ist UPN1557, bei dem bereits an Tag +29 2 CMV-bindende CD8⁺-T-Zellen gefunden wurden, an Tag +50 waren es 22, an Tag +63 60 CMV-bindende CD8⁺-T-Zellen, diese Zellzahlen wurden ohne eine vorhergehende CMV-Reaktivierung erreicht.

3.1.3.2 Seropositive Patienten mit seronegativen Spendern

Von 9 CMV-seropositiven Patienten, die mit Zellen von CMV-seronegativen Spendern transplantiert wurden, reaktivierten 6 CMV. Das Risiko von rekurrenten CMV-Infektionen ist für diese R⁺/D⁻-Gruppe erhöht. Von den 3 Patienten ohne CMV-Reaktivierung war einer nur grenzwertig CMV-positiv, bei diesem und einem weiteren konnten mit dem jeweils einen einsetzbaren Tetramer keine CMV-spezifischen Zellen detektiert werden. Im Gegensatz dazu hatte UPN1270 (NHL; MRD; letzte Untersuchung: Tag +405; 2 passende Tetramere) an Tag +50 bereits 18 CMV-bindende Zellen, die ihn vor einer CMV-Reaktivierung schützten. Dieser Wert ähnelte den Werten, die bei UPN1270 vor Transplantation gemessen worden waren (z. B. 20 an Tag -42).

Bei UPN1528 (sAML; MMUD, *mismatch* in HLA-Cw1; letzte Untersuchung: Tag +205; 2 passende Tetramere) fanden insgesamt 3 CMV-Reaktivierungen statt (Tag +38, +88, +136). Die Chimärismusanalysen für UPN1528 zeigten, bis auf Tag +97 mit 99%, immer einen Spenderanteil von 100%. Abb. 3.2, S. 140 zeigt die Immunrekonstitution in diesem Patienten. Die erste CMV-Reaktivierung begann an Tag +38 mit 139 pp65-positiven Zellen, der Wert stieg auf 351 pp65-positive Zellen an Tag +40 an. pp65-positive Zellen waren bis Tag +65 vorhanden. Im Zuge der Therapie waren keine pp65-positiven Zellen mehr nachweisbar. Während dieser Zeit konnten keine CMV-bindenden Zellen gefunden werden. Nach der 3. CMV-Reaktivierung wurden an Tag +150 erstmals 9 CMV-bindende CD8⁺-T-Zellen detektiert, ab Tag +192 pendelten sich die Werte um ca. 20 Zellen ein (18 an Tag +192, 28 an Tag +205, 15 an Tag +220, 20 an Tag +290). An Tag +240 wurden mittels intrazellulärer Färbung die IFN- γ -sezernierenden Zellen nach Stimulation

mit pp65 bestimmt, ihr Anteil lag bei 1,3%. Ein ähnliches Beispiel ist UPN1514 (AML; MRD; letzte Untersuchung: Tag +187; 2 passende Tetramere), hier wurden ebenfalls erst nach Tag +100 CMV-bindende T-Zellen gefunden, zuvor fanden 2 CMV-Reaktivierungen statt.

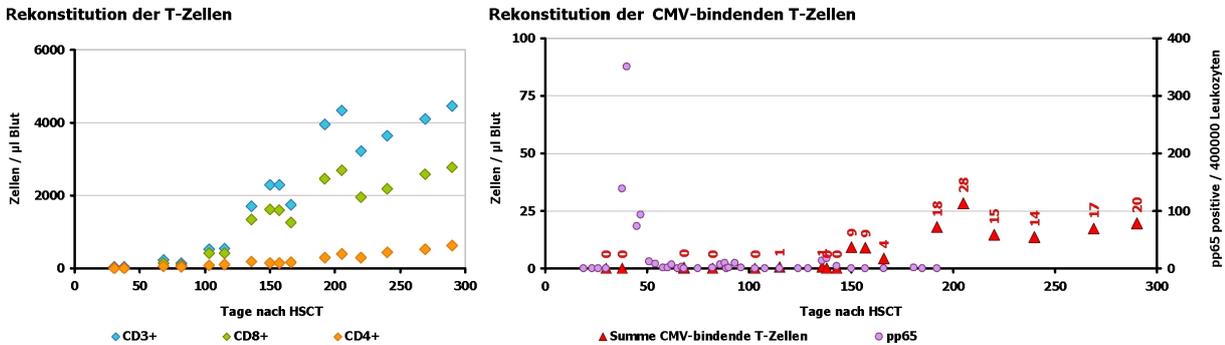


Abbildung 3.2: Rekonstitution der $CD3^+$ -, $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen (links) und Rekonstitution der CMV-bindenden T-Zellen im Vergleich zu den pp65 Werten (rechts) bei Patient UPN1528: Auf der X-Achse sind die Tage nach Transplantation (HSCT) aufgetragen, auf der linken Y-Achse die Zellen pro Mikroliter Blut, auf der rechten Y-Achse im rechten Bild die Anzahl der pp65-positiven Zellen pro 400000 Leukozyten. $CD3^+$ -T-Zellen = blaue Raute, linkes Bild $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen = grüne Raute; linkes Bild; $CD3^+CD4^+$ -T-Zellen = orangene Raute, linkes Bild; CMV-bindende $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen = rotes Dreieck, rechtes Bild; pp65-Werte = lila Kreis, rechtes Bild UPN1528 erlitt 3 CMV-Reaktivierungen, erkennbar an den gestiegenen pp65 Werten (lila Kreis, rechtes Bild).

Bei Patienten, die CMV reaktivierten, konnte auch in dieser Gruppe eine Proliferation der CMV-bindenden T-Zellen gezeigt werden. Bei UPN1457 (aAML; MUD; Rezidiv Tag +105; verstorben Tag +128; 2 passende Tetramere) wurden an Tag +26 und +36 jeweils 2 pp65-positiv Leukozyten detektiert, zwischenzeitlich waren die Werte wieder bei 0. An Tag +43 konnten 59 und an Tag +70 117 CMV-bindende Zellen festgestellt werden, danach kam es zu keiner weiteren CMV-Reaktivierung.

Sind keine CMV-spezifischen T-Zellen nach der Konditionierung und Transplantation im Blut des Patienten vorhanden, kann es zu rekurrenten CMV-Infektionen kommen, die erst von den virusspezifischen Spenderzellen kontrolliert werden. Bei UPN1506 (AML; MMUD, *mismatch* in HLA-A1; Rezidiv Tag +44; verstorben Tag +144; 1 passendes Tetramer) konnten sehr wenig CMV-bindende T-Zellen (1 an Tag +47 und 3 an Tag +58) nachgewiesen werden. Dieser Patient reaktivierte CMV, ein Anstieg der CMV-bindenden T-Zellen wurde hier nicht beobachtet.

3.1.3.3 Seronegative Patienten mit seropositiven Spendern

Die R⁻ / D⁺-Gruppe ist weniger durch CMV-Reaktivierungen gefährdet. Von 8 Patienten in dieser Gruppe reaktivierte bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung nur einer CMV: UPN1329 (AML; MMUD, *mismatch* in HLA-Cw1; Rezidiv +579; 2 passende Tetramere). UPN1329 wurde nach HSCT in die Messungen eingeschlossen. Die erste CMV-Reaktivierung fand an Tag +53 statt, zu diesem Zeitpunkt war die Tetramermessung noch nicht etabliert. Die beiden weiteren Reaktivierungen fanden an Tag +809 und +858 statt, zu dieser Zeit litt UPN1329 an GvHD nach DLIs zur Behandlung des Rezidivs und erhielt im Zuge dessen eine Immunsuppression. An Tag +868 konnten mit IFN- γ -Sekretionstest 1% reaktive Zellen (% lebende Zellen) nach Stimulation mit pp65 und insgesamt 18 CMV-bindende Zellen mit der Tetramermessung detektiert werden.

Anzahl der Tetramer-bindenden Zellen um Tag +50, +100 und +150			
Patient	Tag +50	Tag +100	Tag +150
UPN1455	0	0	0
UPN1473	1	3	4
UPN1476	0	0	0
UPN1511	0	0	0
UPN1530	3	0	0
UPN1570	0	0	0
UPN1607	1		

Tabelle 3.15: Übersicht über die Anzahl der Tetramer-bindenden CD3⁺CD8⁺-T-Zellen bei den Patienten ohne CMV-Reaktivierung in der R⁻ / D⁺-Gruppe; Werte von Tagen ± 15 Tage

Bei den anderen Patienten UPN1455 (AML; haploidenter Spender; verstorben Tag +246; 2 passende Tetramere), UPN1473 (MDS; MRD; letzte Untersuchung: Tag +426; 2 passende Tetramere), UPN1476 (AA; MRD; letzte Untersuchung: Tag +248; 2 passende Tetramere), UPN1511 (AML; MRD; Rezidiv Tag +216; 1 passendes Tetramer), UPN1530 (AML; MRD; letzte Untersuchung: Tag +195; 2 passende Tetramere), UPN1570 (sAML; MRD; letzte Untersuchung: Tag +173; 3 passende Tetramere) und UPN 1607 (AML; MRD; letzte Untersuchung: Tag +22; 1 passendes Tetramer) wurden keine oder nur sehr wenige CMV-bindende T-Zellen detektiert. Die Tabelle 3.15 fasst die Werte für diese Patienten an den Tagen +50, +100 und +150 zusammen. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass nur für den mit dem jeweiligen Tetramer messbaren HLA-Typ keine CMV-bindenden Zellen vorhanden waren.

3.1.3.4 Seronegative Patienten mit seronegativen Spendern

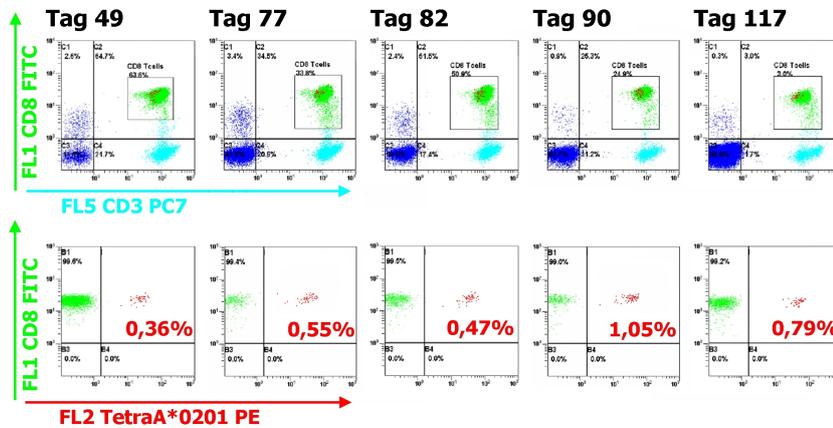


Abbildung 3.3: Nachweis CMV-bindender Zellen im Durchflusszytometer bei UPN1491: obere Reihe: Eingrenzung der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen; untere Reihe: Bestimmung der Tetramer-bindenden Zellen in den CD3⁺CD8⁺-T-Zellen; grün = CD8-positiv; hellblau = CD3-positiv; rot = Tetramer-positiv

Bei der R⁻ / D⁻-Gruppe ist keine CMV-Reaktivierung zu erwarten, allerdings ist eine *de novo* Infektion möglich. Ein Beispiel für eine mögliche Neuinfektion ist Patient UPN1491 (sAML aus MDS; MUD; Rezidiv Tag +69; verstorben Tag +149; 1 passendes Tetramer). Durch engmaschige Beobachtung konnte die Entwicklung der Immunantwort gegen CMV verfolgt werden. Die Abb. 3.3 zeigt die durchflusszytometrische Analyse der Tetramerfärbung bei UPN1491 an verschiedenen Tagen. An Tag +15 wurden noch keine CMV-bindenden CD3⁺CD8⁺-T-Zellen gefunden. An Tag +42 wurde eine CMV-Infektion festgestellt, bei der nächsten Bestimmung der CMV-bindenden Zellen an Tag +49 waren bereits 6 Zellen vorhanden (dies entsprach 0,36% der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen). An den Tagen +77 und +82 wurden mit 3 bzw. 8 CMV-bindenden Zellen niedrigere Werte gemessen, danach stiegen die Werte wieder an auf 19 an Tag +90, 12 an Tag +98 und 14 an Tag +117. Es fand keine weitere CMV-Reaktivierung statt.

3.1.3.5 Bestimmung funktioneller CMV-T-Zellen

Um die Funktionsfähigkeit der Tetramer-positiven Zellen zu überprüfen, wurde parallel oder in Kombination mit der Tetramerfärbung eine intrazelluläre Färbung auf IFN- γ durchgeführt. Die funktionellen Messungen dienen einem genaueren Verständnis der Aussagekraft der Tetramermessung.

Bei UPN1528 (vgl. Abb. 3.2, S.140) wurden an Tag +240 1,3% IFN- γ -sezernierende Zellen nach Stimulation mit pp65 gefunden. In Kombination mit einer Tetramerfärbung zeigte sich, dass über 50% der Tetramer-bindenden Zellen (90% beim A*24 und 71% beim B*35 Tetramer) auch IFN- γ produzierten. Damit war die Funktionsfähigkeit der CMV-bindenden Zellen für diesen Patienten gezeigt.

CMV-bindende Zellen, pp65-Werte und funktionelle Zellen bei UPN1627				
Tag	CMV-bindend	pp65	IFN- γ ⁺	CD107a ⁺
-68	9	-	-	-
+27	9	-	-	-
+34	9	-	-	-
+41	-	0	-	-
+48	38	2	-	-
+51	-	8	-	-
+55	385	-	-	-
+56	-	3	-	-
+58	218	120	1,2%	3,8%
+64	-	23	-	-
+65	253	-	-	-
+71	300	-	-	-

Tabelle 3.16: Werte für UPN1627, von links nach rechts: Tag nach HSCT; CMV-bindende CD3⁺CD8⁺-T-Zellen; pp65-positive pro 400000 Leukozyten; IFN- γ -positive CD3⁺CD8⁺-T-Zellen; CD107a-positive CD3⁺CD8⁺-T-Zellen

Bei UPN1627 (MDS; MUD, *mismatch* in HLA-A1; CMV-Serostatus: R⁺ / D⁺; 2 passende Tetramere) zeigte sich, dass sowohl Tetramermessung als auch funktionelle Tests (intrazelluläre Färbung, CD107a-Bestimmung) nicht immer aussagekräftig sind. UPN1627 gehört nicht zur Kohorte vom Juli 2006 bis Februar 2008, sondern wurde danach eingeschlossen. Die Tabelle 3.16, S. 143 fasst die bisher vorhandenen Messwerte zu UPN1627 zusammen. Zwar hatte der Patient wie für die R⁺ / D⁺-Gruppe typisch CMV-bindende Zellen und es konnte auch IFN- γ -Produktion sowie Degranulation (CD107a) nach *in vitro* Stimulation mit pp65 nachgewiesen werden, dennoch stiegen die pp65-positiven Zellen stark an (von 8 an Tag +48 auf 120 an Tag +58) während gleichzeitig die Zahl der CMV-bindenden Zellen wuchs (38 an Tag +48 und 218 an Tag +58). Die CMV-Reaktivierung wurde dennoch nur unter Medikation beherrscht.

3.2 Stimulation und Aufreinigung CMV-reaktiver Zellen - Vorversuche

Im Folgenden werden die Vorversuche zum Sekretionstest (Produktname *Cytokine Capture Assay* oder *Cytokine Secretion Assay*), sowie seine klinische Anwendung (vgl. 3.3) und Versuche zu seiner Optimierung (vgl. 3.5) beschrieben.

Wie im Material- und Methodenteil bereits erläutert (siehe 2.2.7.1, S. 53), ist zur Aufreinigung zytokinsezernierender Zellen ein mehrschrittiges Vorgehen nötig. Zunächst werden die Zellen mit Antigen, hier pp65 oder CMV-Lysat, stimuliert. Dann wird zur Entfernung der bisher sezernierten Zytokine gewaschen und mit einem bispezifischen Antikörper, der auf der einen Seite CD45 auf der Zelloberfläche und auf der anderen das gesuchte Zytokin, hier IFN- γ , bindet, gefärbt. Es folgt eine 45 min Inkubationsphase, während der die aktivierten Zellen Zytokine sezernieren, die dann durch den bispezifischen Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden werden. Im Anschluss an diese "Sekretionsphase" wird zunächst auf das Zytokin gefärbt, dann wird mit Hilfe von immuno-magnetischen Säulen die positive (zytokinproduzierende) Population aufgereinigt.

Nachdem sich in einigen Vorversuchen zeigte, dass bei Verwendung der vorgeschlagenen 1 : 10 Verdünnung in der Sekretionsphase unspezifische Färbungen auftreten können, wurde die Verdünnung in der Sekretionsphase auf 1 : 100 erhöht. Die Tabelle 3.17 fasst die Ergebnisse aus den Vorversuchen (VV) zusammen. Für 3 der 9 Proben war bekannt, dass sie HLA-A*02 positiv waren. Bei den Werten für die IFN- γ -positiven Zellen nach Aufreinigung wurde der Mittelwert aus den Ansätzen mit α CD4-FITC bzw. α CD8-FITC gebildet, die Abweichung der Werte betrug zwischen $\pm 0,05$ - 5%. Teilweise wurde nur über 1 Säule aufgereinigt, um eine größere Zellzahl für die Durchflusszytometeranalyse hinsichtlich der CD4⁺-CD8⁺-Verteilung zu erhalten. Die Messergebnisse von VV9 wurden in die Betrachtung der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen nicht einbezogen, es handelte sich um eine Patientenprobe von einem Patienten kurz nach HSCT, die Zellen streuten stark und die Zellzahlen waren gering.

Probe	IFN- γ positive, lebende Lymphozyten						Faktor	
	-K	+K	Ly v. S.	Ly n. A.	65 v. S.	65 n. A.	Lysat	pp65
Aufreinigung über 2 Säulen, HLA-Typ unbekannt								
VV1	0,02%	9,26%	0,67%	89,25%	0,04%	26,55%	133	664
VV2	0,01%	99,40%	0,25%	76,97%	0,05%	51,83%	308	1037
VV3	0,02%	7,34%	0,25%	77,2%	0,04%	25,43%	309	636
Aufreinigung über 1 Säule, HLA-Typ unbekannt								
VV4	0,02%	97,37%	1,14%	47,53%	0,43%	41,49%	42	96
VV5	0,02%	10,36%	0,29%	32,22%	0,10%	11,77%	111	118
VV6	0,01%	96,57%	1,06%	50,37%	4,68%	44,18%	48	9
Aufreinigung über 1 Säule, HLA-A*02 positiv								
VV7	0,05%	40,61%	1,36%	56,48%	3,96%	76,62%	42	19
VV8	0,00%	94,94%	1,09%	64,74%	0,91%	33,99%	59	37
VV9	0,00%	32,12%	2,64%	78,90%	4,50%	72,91%	30	16

Tabelle 3.17: Ergebnisse der Vorversuche zum IFN- γ -Sekretionstest: Anteil an IFN- γ -positiven Zellen in Prozent und Faktor der Anreicherung; -K: Negativkontrolle, +K: Positivkontrolle, Ly v. S.: Lysat vor Säule, Ly n. A.: Lysat nach Aufreinigung, 65 v. S.: Lysat vor Säule, 65 n. A.: Lysat nach Aufreinigung, Faktor: Anreicherungsfaktor der IFN- γ -positiven Zellen

Es wurden mit pp65 Stimulationsraten zwischen 0,04% und 4,5% erreicht, mit CMV-Lysat zwischen 0,25% und 2,64% (vgl. Tab. 3.17). Je höher der Anteil der IFN- γ -sezernierenden Zellen vor Säule, desto reiner (bezogen auf den Anteil IFN- γ -sezernierenden Zellen) war die angereicherte Fraktion. Auch bei sehr niedrigen Stimulationsraten konnten noch recht gute Anreicherungen erzielt werden, z. B. bei Probe VV2, wo die 0,05% IFN- γ -sezernierenden Zellen vor Säule auf über 50% (51,83%) angereichert werden konnten. Betrachtet man die HLA-A*02-positiven Proben VV7, VV8 und VV9, war hier die Stimulationswirkung des pp65 im Vergleich zum Lysat gleichwertig oder besser, während bei den anderen Ansätzen mit Lysat bessere Stimulationsraten erreicht wurden. Eine Ausnahme stellt VV6 dar, auch dort wurde mit pp65 eine höhere Stimulation als mit CMV-Lysat erreicht (4,68% pp65 und 1,06% Lysat). Diese Beobachtungen unterstützten die Hypothese, dass die Stimulationswirkung des pp65 HLA-abhängig sein könnte.

Da sowohl CD4- als auch CD8-positive T-Zellen für eine dauerhafte Immunität essentiell sind, wurde der Anteil der CD4- und CD8-positiven IFN- γ -sezernierenden T-Zellen in der aufgereinigten Fraktion bestimmt. Dabei zeigte sich (vgl. Tabelle 3.18), dass bei der Stimulation mit CMV-Lysat vor allem CD4-positive T-Zellen aktiviert und aufgereinigt werden, während bei der Stimulation mit pp65 ein höherer Anteil CD8-positiver T-Zellen aktiviert und angereichert wird.

Probe	CD4+ in IFN γ		CD8+ in IFN γ	
	Lysat	pp65	Lysat	pp65
Aufreinigung über 2 Säulen, HLA-Typ unbekannt				
VV1	94,25%	6,02%	17,91%	78,00%
VV2	82,85%	6,85%	22,63%	40,44%
VV3	62,74%	28,60%	25,00%	–
Aufreinigung über 1 Säule, HLA-Typ unbekannt				
VV4	38,94%	25,77%	14,92%	35,87%
VV5	53,41%	40,8%	17,05%	46,15%
VV6	53,93%	20,69%	11,08%	41,03%
Aufreinigung über 1 Säule, HLA-A*02 positiv				
VV7	74,41%	12,53%	9,36%	59,62%
VV8	38,03%	30,6%	19,51%	62,96%
VV9	2,33%	4,35%	0,00%	2,38%

Tabelle 3.18: Ergebnisse der Vorversuche zum IFN- γ Sekretionstest: Anteil der CD4- bzw. CD8-positiven Zellen in der IFN- γ -positiven Population (nach Anreicherung)

Das Verhältnis von CD4- und CD8-positiven Zellen ist teilweise bei den unterschiedlichen Antigenen fast umgekehrt, so waren bei VV1 in der mit Lysat stimulierten Probe nach Aufreinigung über 90% (94,25%) CD4-positive Zellen und unter 20% (17,91%) CD8-positive Zellen. Im Gegensatz dazu waren im pp65 stimulierten Ansatz nach Aufreinigung fast 80% (78,00%) CD8-positive Zellen enthalten. Abbildung 3.4, S. 146 zeigt die CD4⁺-CD8⁺-Verteilung bei den verschiedenen Proben für beide Antigene.

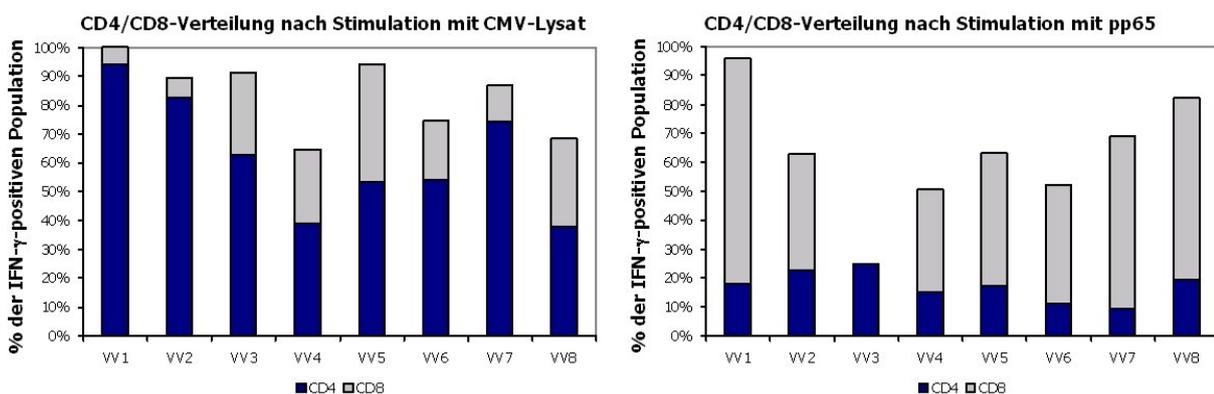


Abbildung 3.4: Verteilung der CD4- (blau) und CD8-positiven (grau) Zellen in der IFN- γ -positiven Population nach Stimulation mit CMV-Lysat (links) und pp65 (rechts)

Bei allen mit pp65 stimulierten Ansätzen war der CD8⁺-Anteil höher. Dies ist ungewöhnlich, da beide Antigene von außen in die Zelle gelangten und damit auf dem MHC-II präsentiert werden sollten (vgl. 1.1.4, S. 8). Die gemessenen Werte zeigten, dass pp65 eine Ausnahme darstellt: es wurden viele CD8-positive Zellen stimuliert, also lief die Präsentation der Epitope über das MHC-I. Dieser Effekt ließe sich mit dem Mechanismus der *cross presentation* erklären.

Bei Addition der Werte für CD4⁺- und CD8⁺-Zellen wurden z. T. nur 60% der IFN- γ -positiven Population abgedeckt (VV4, pp65: 35% und 25% oder VV6, Lysat: 11% und 54%), 100% wurden, außer bei VV1, Lysat, nie erreicht. Dies lässt darauf schließen, dass neben CD4⁺- und CD8⁺-Zellen noch andere Zellen zur Stimulation von IFN- γ angeregt und mit aufgereinigt wurden. Die Zusammensetzung der angereicherten Population wurde daher später genauer untersucht (siehe 3.6, S. 165).

3.3 Nachweis transfundierter CMV-Zellen *in vivo*

3.3.1 Fallvorstellung

Patient UPN1238 (weiblich, 47 Jahre zum Zeitpunkt der Transplantation) hatte eine *bcr-abl*-positive prä-B-ALL und wurde von einem Fremdspender mit *micro-mismatch* in HLA-DR transplantiert. Als Konditionierung wurde eine fraktionierte TBI (engl. *total body irradiation*) mit insgesamt 12 Gy und eine Gesamtdosis von 120 mg pro kg Körpergewicht Cyclophosphamid gegeben. Die GvHD-Prophylaxe bestand aus ATG, Methothrexate (MTX) und Cyclosporin A (CSA). Die erste CMV-Reaktivierung erfolgte bereits an Tag +12 und konnte initial mit Ganciclovir beherrscht werden. Es kam zu weiteren CMV-Reaktivierungen. Diese rekurrenten CMV-Reaktivierungen waren medikamentös nicht kontrollierbar, und da sich bereits Anzeichen einer Myelosuppression durch die Medikation zeigten, wurde ein Heilversuch mit adoptiver Immuntherapie gestartet.

Der Spender war CMV-positiv, so konnten in Zusammenarbeit mit der Universität Tübingen nach Stimulation mit rekombinantem pp65 am CliniMACS aufgereinigte CMV-spezifische T-Zellen hergestellt werden. Patient UPN1238 erhielt diese Zellen an Tag +65. Die Dosis lag bei ca. 1×10^4 Zellen pro kg Körpergewicht. Es gab zum Zeitpunkt der Transfusion keine unerwünschten Reaktionen. An Tag +69 wurde die Gabe von Ganciclovir eingestellt.

3.3.2 Nachweis der transfundierten Zellen mittels Zytokinsekretionstest

Die transfundierten CMV-spezifischen Zellen wurden im Blut von UPN1238 zwischen Tag +3 bis Tag +60 nach Gabe nachgewiesen. Der Nachweis der CMV-reaktiven T-Zellen erfolgte durch Nachweis IFN- γ -sezernierender T-Zellen nach Stimulation mit CMV-Antigen (CMV-Lysat). Die Ergebnisse der einzelnen Messungen sind in Abb. 3.5 und Abb. 3.6 dargestellt.

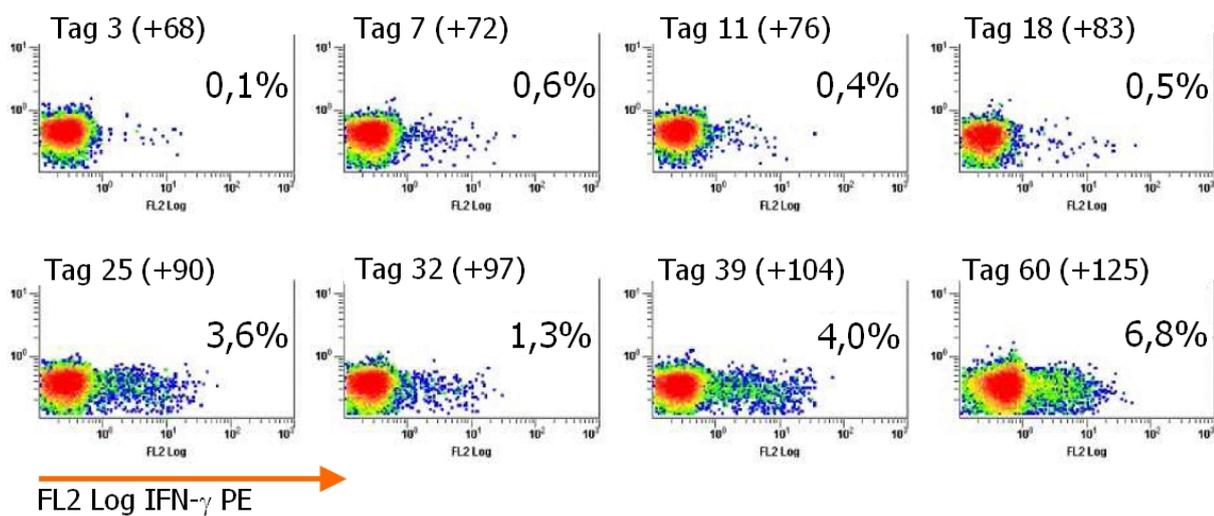


Abbildung 3.5: IFN- γ -sezernierende (PE-positive) lebende Lymphozyten nach Stimulation mit CMV-Lysat bei Patient UPN1238 an verschiedenen Tagen nach DLI (HSCT)

Bereits an Tag +68 waren 0,1% IFN- γ -sezernierende Zellen nachweisbar. Die Werte stiegen zunächst langsam an (0,5% an Tag +83), an Tag +90 waren dann 3,6% IFN- γ -sezernierende Zellen vorhanden. Nach einem Abfall auf 1,3% an Tag +97 stiegen die Werte weiter an, an Tag +104 auf 4,0% und an Tag +125 auf fast 7% (6,8%).

Da die Rekonstitution von virusspezifischen CD4⁺- und CD8⁺-positiven T-Zellen für eine dauerhafte Immunität wichtig sind, wurden die CD4⁺- und CD8⁺-Anteile in der IFN- γ -positiven Population (nach Anreicherung) bestimmt. Dabei zeigte sich, dass zunächst nur wenige CD4-positive-IFN- γ -positive T-Zellen vorhanden waren (vgl. Abb. 3.6).

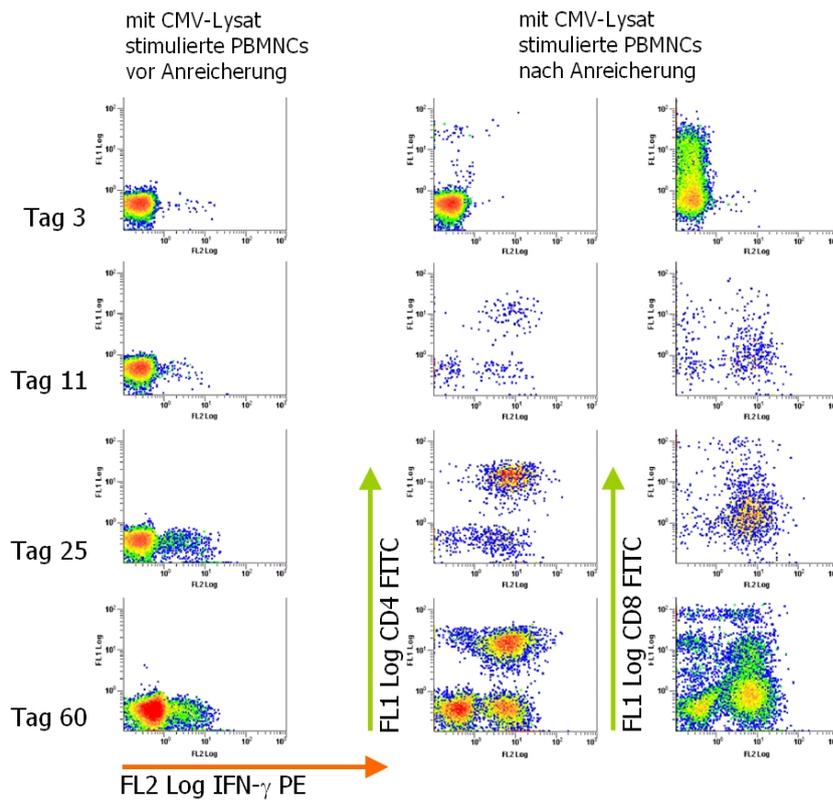


Abbildung 3.6: Nachweis IFN- γ -sezernierender Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Transfusion von CMV-T-Zellen, vor Anreicherung (links; PE-Signal=IFN- γ -positiv) und nach Anreicherung (rechts; PE-Signal = IFN- γ -positiv, FITC-Signal = CD4- bzw. CD8-positiv)

Bereits 11 Tage nach der Transfusion der CMV-T-Zellen, an Tag +76, war deutlich eine CD4-positive Population erkennbar, ca. 2 Monate nach Gabe der Zellen an Tag +125 sind sowohl CD4- als auch CD8-positive CMV-spezifische T-Zellen nachweisbar. Gleichzeitig kam es bei UPN1238 nach der Transfusion der CMV-T-Zellen zu einer schrittweisen Normalisierung der gesamten T-Zellen. Anfangs (vor Tag +60 nach Gabe der CMV-T-Zellen / Tag +125 nach HSCT) waren kaum CD4⁺-T-Zellen nachweisbar, mit Expansion der spezifischen Zellen normalisierte sich auch die T-Zellzahl. Tabelle 3.19 fasst die Werte der Immunphänotypisierung von Tag +65 bis Tag +97 nach HSCT zusammen. Es ist deutlich erkennbar, dass der Anteil an CD4-positiven Zellen langsam zunahm. Das Verhältnis von CD4-positiven zu CD8-positiven Zellen blieb zwar weiter pathologisch, zeigte aber auch einen Trend zur Normalisierung.

Tag nach HSCT	CD4 ⁺	CD8 ⁺	Verhältnis T4 / T8
+65	2,3%	41,9%	0,055
+72	3,6%	31,7%	0,114
+77	6,9%	38,1%	0,181
+83	7,2%	53,5%	0,13
+90	10,1%	58,5%	0,17
+97	15,3%	55,6%	0,275

Tabelle 3.19: Bestimmung der CD4⁺- und CD8⁺-Zellen (Immunphänotyp) bei UPN1238 zu verschiedenen Zeitpunkten nach HSCT; von links nach rechts: Tag nach Transplantation, CD4⁺-Zellen (% der Lymphozyten), CD8⁺-Zellen (% der Lymphozyten), Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺

3.3.3 Korrelation mit klinischen Daten

Die Korrelation der durchflusszytometrischen Bestimmung der IFN- γ -sezernierenden Zellen mit den klinischen Daten zeigte deutlich, dass die transfundierten Zellen die CMV-Reaktivierung kontrollierten und Patient UPN1238 vor weiteren Reaktivierungen schützten. In Abb. 3.7 werden die Menge der IFN- γ -sezernierenden Zellen und die pp65-Werte als Maß für die CMV-Reaktivierung miteinander abgeglichen, außerdem sind wichtige Änderungen in der Medikation vermerkt.

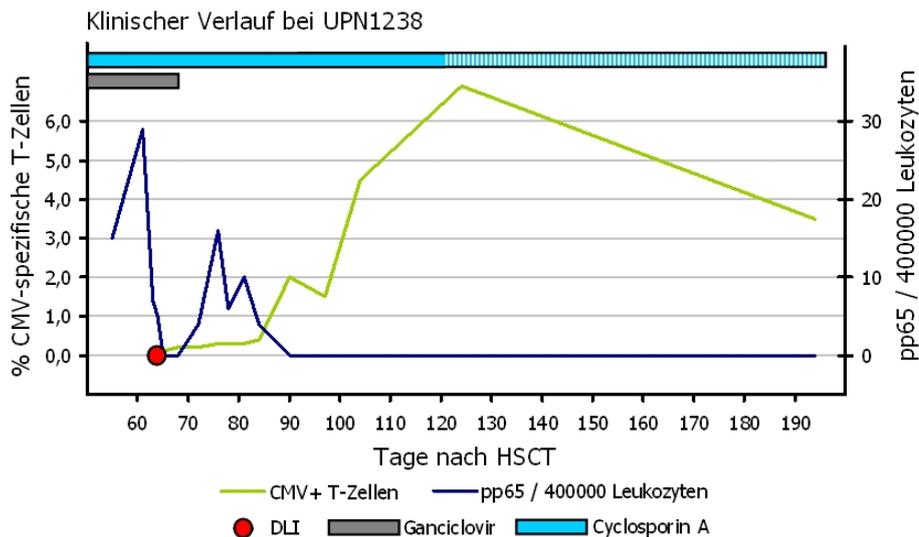


Abbildung 3.7: Korrelation der Messwerte für IFN- γ -sezernierende Zellen aus der Zytometeranalyse (grüne Linie) mit klinischen Daten: pp65-Werte (dunkelblaue Linie), DLI (roter Punkt), Medikation mit Ganciclovir (grauer Balken) und CSA (blauer Balken; gestreift: Dosis gesenkt)

Vor der Transfusion der CMV-T-Zellen konnten keine IFN- γ -sezernierenden Zellen (grüne Linie) detektiert werden. Nach der Transfusion (roter Punkt) der CMV-T-Zellen war ein Anstieg der IFN- γ -sezernierenden Zellen sichtbar. Nachdem an Tag +68 das Ganciclovir (grauer Balken) abgesetzt wurde, stieg zunächst der pp65-Wert (dunkelblaue Linie) an, sank dann aber parallel zum Anstieg der IFN- γ -sezernierenden Zellen ab. An Tag +90 wurden keine pp65-positiven Leukozyten mehr nachgewiesen. Zunächst sank auch die Anzahl der IFN- γ -sezernierenden Zellen ab, stieg aber nach Senkung der Immunsuppression mit Cyclosporin A (blauer Balken) nochmals an. Während der gesamten Behandlung konnten keine negativen Effekte der CMV-T-Zell-Transfusion festgestellt werden, es gab keinerlei Anzeichen einer GvHD. Die Ganciclovir-resistente CMV-Reaktivierung wurde effektiv durch die transfundierten Zellen bekämpft, die Patientin bedurfte auch im weiteren Verlauf keiner weiteren Behandlung gegen CMV.

3.4 Etablierung von funktionellen Tests zur Beurteilung angereicherter antigenspezifischer Zellen

3.4.1 Proliferationstest mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester

3.4.1.1 Austesten der geeigneten Farbstoffkonzentration

Zur Feststellung der geeigneten Carboxyfluoresceinsuccinimidylester- (CFSE-) Konzentration wurden frisch isolierte PBMCs (engl. *peripheral blood mononuclear cells*) mit 500 nM, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M und 10 μ M CFSE gefärbt. An Tag 1, Tag 4, Tag 7 und Tag 10 wurde die Signalstärke des Farbstoffes und die Vitalität der Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die höheren Konzentrationen von 5 μ M und 10 μ M weniger geeignet waren, das Signal war so stark, dass CFSE-gefärbte und nicht CFSE-gefärbte Zellen nicht bei gleichen Einstellungen (Verstärker für Fluoreszenzkanal 1) dargestellt werden konnten, weil sie zu weit voneinander entfernt waren. Außerdem war die Zellzahl in diesen Ansätzen ab Tag 7 stark reduziert, die Lymphozytenpopulation verschwand und es zeigten sich viele apoptotische / tote Zellen. Bei der Färbung mit 500 nM lagen die gefärbte Population und die ungefärbte Kontrolle zu nah aneinander, über die Zeit verloren die gefärbten Zellen etwas an Leuchtintensität. Die Konzentrationen von 1 μ M und 2 μ M zeigten keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen, gefärbte und ungefärbte Zellen waren

gut getrennt. Der folgende Nachweis der mitogen-induzierten Proliferation wurde daher mit 1 μ M Färbelösung durchgeführt.

Die mitogen-induzierte Proliferation (mit PMA / Ionomycin) konnte mit Hilfe der CFSE-Färbung gut nachverfolgt werden. Die Abb. 3.8, S.152 zeigt den zeitlichen Verlauf der Proliferation. An Tag 1 war erwartungsgemäß noch keine Zellteilung zu erkennen, an Tag 4 bildeten sich deutlich 4 neue Fluoreszenzsignale aus. An Tag 7 war die Anzahl der Ereignisse bei der Signalstärke der Ausgangspopulation (Population 0) deutlich gesunken und es hatten sich 7 Tochterpopulationen (1 bis 7) ausgebildet. Die mitogen-induzierte Proliferation diente bei weiteren Proliferationstests als Positivkontrolle.

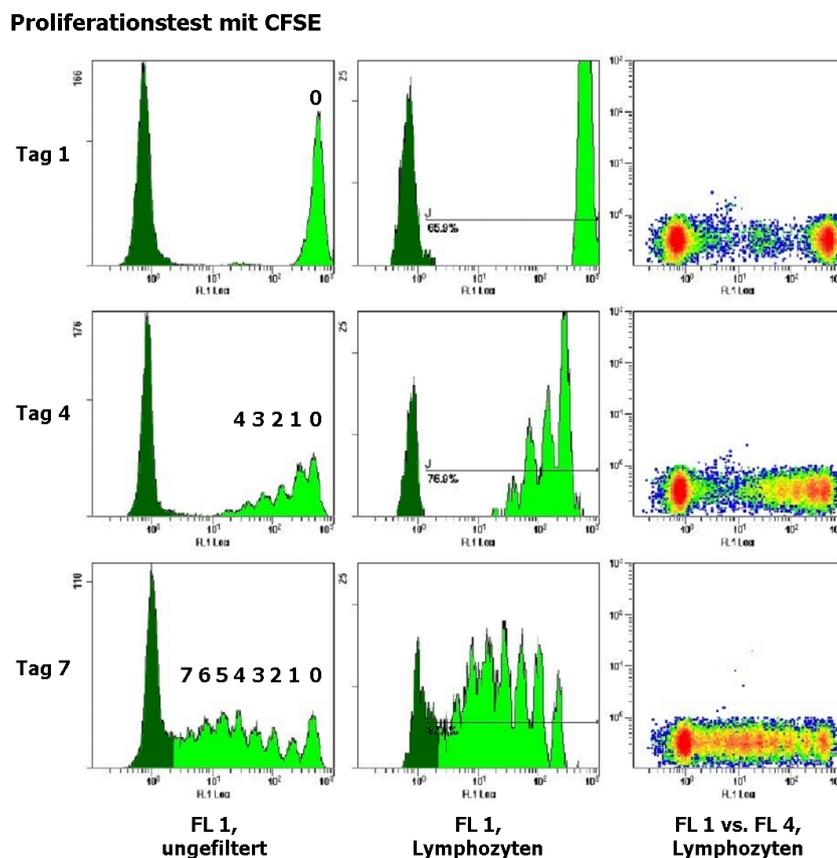


Abbildung 3.8: Nachweis der mitogen-induzierten Proliferation mit CFSE: von links nach rechts Histogramm FL 1 (Fluoreszenz 1, logarithmisch, CFSE-Signal), Histogramm FL 1 auf Lymphozyten gefiltert, DotPlot (als Hitzebild) FL 1 gegen FL 4 (Fluoreszenz 4; lebend-tot Farbstoff 7-AAD); von oben nach unten sind die Messungen an den Tagen 1, 4 und 7 nach CFSE-Färbung und Stimulation mit PMA / Ionomycin dargestellt. Die Zahlen in den mittleren Diagrammen geben die Zellgeneration an (0 = Ausgangspopulation, 1 bis 7 = Tochterpopulationen). CFSE-gefärbte Zellen sind hellgrün, die zum Vergleich zugegebenen ungefärbten Zellen dunkelgrün dargestellt.

3.4.1.2 Testlauf mit expandierten CMV-T-Zellen

Beim Testlauf des Proliferationsnachweises mit CFSE konnte eine CMV-spezifische Proliferation der aufgereinigten und expandierten CMV-T-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich auch bei Kokultur mit unbeladenen autologen DC eine Proliferation. Das Ergebnis der Analyse ist in Abb. 3.9, S. 153 dargestellt.

Proliferationstest mit unspezifisch expandierten CMV-T-Zellen

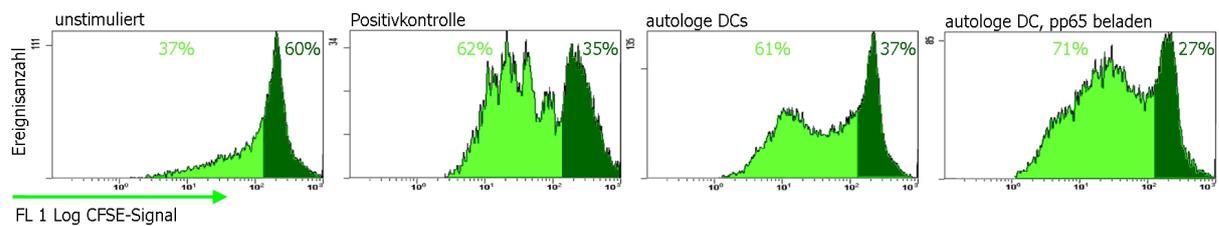


Abbildung 3.9: Proliferationstest mit unspezifisch expandierten CMV-T-Zellen: Histogramme der FL 1 (Fluoreszenzkanal 1, logarithmisch), das Wandern des CFSE-Signals von rechts nach links zeigt eine Proliferation der Zellen. Die Ausgangspopulation wurde dunkelgrün eingefärbt, die Tochterpopulationen hellgrün, die Prozentwerte geben den Anteil der jeweiligen Population an den CFSE-gefärbten CD3⁺-Zellen an.

Für die Analyse wurde zunächst im FS/SS auf Lymphozyten gefiltert. Bei allen Ansätzen lag der Anteil der CD3⁺-Zellen (bezogen auf die Lymphozytenpopulation) bei über 80%, der Anteil der CFSE-positiven Zellen bei über 90%. In der Negativkontrolle (gefärbte CMV-T-Zellen allein) proliferierten 37% der CFSE-positiven CD3⁺-Zellen (Bild links). In der Positivkontrolle (PMA/Ionomycin stimuliert) waren nach 7 Tagen noch 35% der Ausgangspopulation vorhanden, 62% hatten sich geteilt und dadurch an Fluoreszenzintensität verloren (Bild Mitte links). Das Bild Mitte rechts zeigt den Ansatz mit unbeladenen autologen DC. Auch hier proliferierte ein Großteil (61%) der Zellen. Dennoch ist im Vergleich eine CMV-spezifische Proliferation zu beobachten, bei der Kokultivierung mit pp65-beladenen autologen DC proliferierten 71% der CFSE-positiven CD3⁺-Zellen, 27% blieben unverändert (Bild rechts).

Bei der Messung des Ansatzes mit Fütterzellen zeigte sich, dass die Fütterzellen nach 7 Tagen Expansion noch nicht verschwunden waren. Sie wurden ebenfalls mit CFSE angefärbt, aufgrund der niedrigeren Vitalität durch die Bestrahlung allerdings schwächer als die CMV-T-Zellen. Dadurch erzeugten die Fütterzellen ein Störsignal, das in den Bereich fiel, in dem auch die Signale proliferierender CMV-T-Zellen gemessen wurden. Diese

Ansätze sind daher nicht auswertbar. Da als Fütterzellen die Zellen dienten, die beim Sekretionstest ausgespült worden waren (nicht IFN- γ -sezernierende Zellen), konnten die Fütterzellen auch nicht über einen bestimmten Oberflächenmarker ausgefiltert werden. Hier wurden für weitere Versuche bei der Expansion keine Fütterzellen benutzt.

3.4.1.3 Proliferationstest mit kommerzieller Zelllinie

Die Zelllinie, die zur Etablierung von Pentamer- (und Tetramer-) Färbungen vertrieben wird, ist für den Proliferationstest ungeeignet. Es zeigte sich keine Proliferation bei Kultivierung mit NLVPMVATV beladenen T2. Auch bei Stimulation mit PMA / Ionomycin proliferierten die Zellen nicht. Vergleicht man die Ansätze mit unbeladenen und beladenen T2, so blieben bei beiden an Tag 1, Tag 4 und Tag 7 ca. 80% der Ausgangspopulation erhalten, bei ca. 20% sank die Fluoreszenzintensität ab. Es bildeten sich allerdings keine eindeutigen Einzelpopulationen aus. Durch die Färbung auf tote / apoptotische Zellen mit 7-AAD zeigte sich, dass das Absinken eher auf ein Absterben der der CTL_{NLVP} zurückzuführen war als auf eine Proliferation.

3.4.2 Degranulationstest

Nach mehreren Versuchen zeigte sich, dass die CTL_{NLVP} auch beim Degranulationstest nicht zur Etablierung dienen können. Wie beim Proliferationstest zeigten die CTL_{NLVP} weder eine spezifische Reaktion (CD107a), noch wurden beladene T2 angegriffen und abgetötet (Annexin-V Färbung). Allerdings konnte die CD107a-Färbung erfolgreich bei der Überprüfung der Funktionalität bei den Tetramermessungen verwendet werden. So wurde z. B. für UPN1627 eine spezifische Degranulation der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit pp65 gezeigt (vgl. 3.1.3.5, S. 142).

3.5 Austestung verschiedener GMP-Medien

3.5.1 Stimulation und Aufreinigung

3.5.1.1 Zellzahlen in den einzelnen Aufarbeitungsschritten

Für den Medienvergleich verwendete Proben		
Probe	HLA-Typ	Zellausbeute
MV1	A*02, *02 B*38, *50	$6,9 \times 10^8$
MV2	A*02, *02 B*14, *18	$5,1 \times 10^8$
MV3	A*02, *02 B*51, *44	$6,5 \times 10^8$
MV4	A*02, *02 B*07, *60	$4,0 \times 10^8$
Mittelwert		$5,6 \times 10^8$

Tabelle 3.20: 450 ml Blutkonserven für den Medienvergleich und Ausbeute an PBMNCs

Es wurden viermal 450 ml Blut für den Medienvergleich aufgearbeitet, die Ausbeute an PBMNCs war dabei ähnlich, im Mittel wurden $5,6 \times 10^8$ isoliert. Die Zellausbeuten sind in Tabelle 3.20 zusammengefasst. Bei allen Ansätzen außer MV4 konnten Zellen für eine Wiederholung des Sekretionstest im Vergleich zur intrazellulären Färbung eingefroren werden.

Bei der Analyse im Durchflusszytometer zeigte sich, dass trotz der erhöhten Verdünnung in der Sekretionsphase unspezifische Färbungen und Aufreinigungen stattfanden. Die Abb. 3.10, S. 156 zeigt ein Beispiel für eine spezifische Färbung und Anreicherung (obere Reihe, MV2) und eine unspezifische Färbung (mittlere Reihe, MV3), sowie die Modifikation bei der Auswertung im Durchflusszytometer, um wenigstens die spezifische Aktivierung vor Anreicherung abschätzen zu können. Zur Verdeutlichung der Verschiebung der unspezifisch gefärbten Population wurde in der unteren Reihe in das Diagramm zum pp65-stimulierten Ansatz vor Aufreinigung das Signal der Negativpopulation eingefügt (Signal ganz links, unterste Reihe, mittleres Bild), der rote Pfeil zeigt die Richtung der Signalverschiebung an.

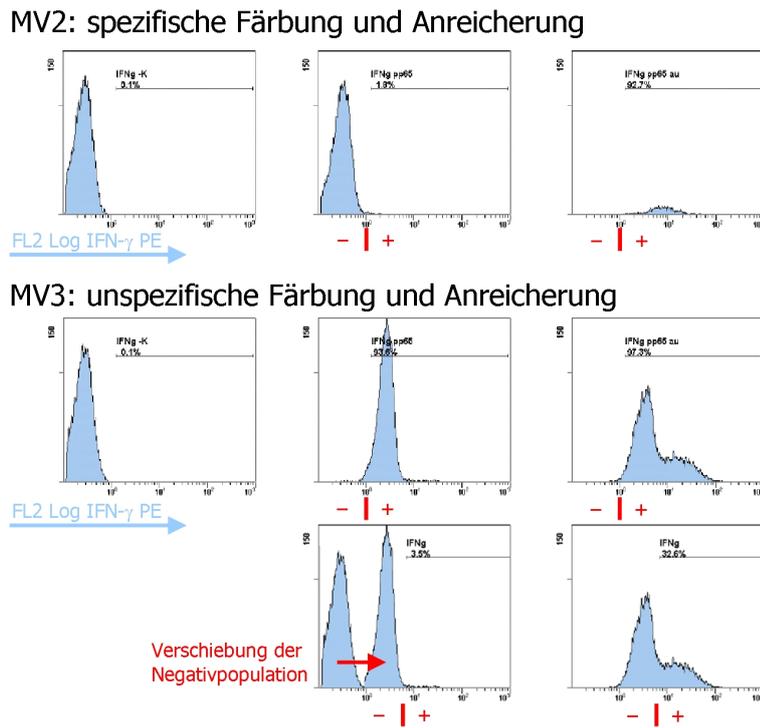


Abbildung 3.10: Spezifische und unspezifische Färbung beim Sekretionstest im Vergleich: von links nach rechts: Histogramme zu Fluoreszenz 2 mit dem α IFN- γ -PE-Signal; unstimulierte Kontrolle (links), pp65-stimulierter Ansatz vor Aufreinigung (mittig) und nach Aufreinigung über 2 Säulen (rechts). Die obere Reihe zeigt die spezifisch gefärbte und angereicherte Probe MV2, CellGro. Die mittlere Reihe zeigt die unspezifisch gefärbte und dadurch unspezifisch angereicherte Probe MV3, CellGro. Die untere Reihe zeigt MV3 nach Modifikation der *Gate*-Position. Der rote Strich markiert die Trennung zwischen der positiven (rotes +; IFN- γ -produzierenden) und negativen (rotes -) Population.

Während bei spezifischen Anreicherungen negative und positive Population deutlich voneinander getrennt waren und die Position der Negativpopulation auch im stimulierten Ansatz fast deckungsgleich mit der der Negativpopulation im unstimulierten Ansatz war (vgl. Abb. 3.10, obere Reihe, linkes und mittleres Bild), wanderte bei unspezifischen Färbungen die Negativpopulation im stimulierten Ansatz nach rechts (mittlere Reihe). Nach der Aufreinigung zeigte sich bei einer spezifischen Anreicherung ein Signal (obere Reihe, rechts), nach einer unspezifischen gab es zwei Signale (mittlere und untere Reihe, rechts). Durch Verschieben des *Gates* für die IFN- γ -positiven Ereignisse auf die hochpositiven Zellen wurde der Anteil der spezifisch aktivierten Zellen abgeschätzt. Bei den folgenden Auswertungen sind Werte aus unspezifisch stimulierten Proben durch graue Schrift gekennzeichnet.

Zellzahlen in den einzelnen Aufarbeitungsschritten					
Probe	Medium	eingesetzte Zellzahl je Medium	Zellzahl nach ü.N. Stimulation	Zellzahl im Eluat nach 2. Säule	Verlust nach ü. N. Stimulation
MV1	RPMI1640	$1,00 \times 10^8$	$7,30 \times 10^7$	$<1,00 \times 10^5$	27,0%
	X-Vivo 15	$1,00 \times 10^8$	$9,10 \times 10^7$	$<1,00 \times 10^5$	9,0%
	CellGro	$1,00 \times 10^8$	$8,85 \times 10^7$	$<1,00 \times 10^5$	11,5%
MV2	RPMI1640	$1,00 \times 10^8$	$6,60 \times 10^7$	$1,00 \times 10^5$	34,0%
	X-Vivo 15	$1,00 \times 10^8$	$7,00 \times 10^7$	$1,20 \times 10^5$	30,0%
	CellGro	$1,00 \times 10^8$	$7,90 \times 10^7$	$1,40 \times 10^5$	21,0%
MV3	RPMI1640	$7,80 \times 10^7$ *	$4,40 \times 10^7$	$1,00 \times 10^5$	34,0%
	X-Vivo 15	$1,00 \times 10^8$	$8,28 \times 10^7$	$3,10 \times 10^5$	17,2%
	CellGro	$1,00 \times 10^8$	$7,92 \times 10^7$	$4,60 \times 10^5$	20,8%
MV4	RPMI1640	$1,00 \times 10^8$	nicht gezählt	$4,60 \times 10^6$	
	X-Vivo 15	$1,00 \times 10^8$	nicht gezählt	$1,60 \times 10^6$	
	CellGro	$1,00 \times 10^8$	nicht gezählt	$7,50 \times 10^6$	
Mittelwert	RPMI1640	$9,45 \times 10^7$	$6,10 \times 10^7$	$1,00 \times 10^5$	31,7%
	X-Vivo 15	$1,00 \times 10^8$	$8,13 \times 10^7$	$1,70 \times 10^5$	18,7%
	CellGro	$1,00 \times 10^8$	$8,22 \times 10^7$	$2,20 \times 10^5$	17,8%

Tabelle 3.21: Zellzahlen in den einzelnen Aufarbeitungsschritten; *aufgetaute Zellen; graue Zahlen sind unspezifische Werte und werden in die Berechnung der Mittelwerte nicht mit einbezogen

Die Ausbeute der IFN- γ -spezifischen Anreicherung virusreaktiver T-Zellen spielt für den klinischen Einsatz eine große Rolle, daher wurden die Zellzahlen in verschiedenen Aufarbeitungsphasen dokumentiert. Tabelle 3.21 fasst die Werte zusammen. Bei allen 4 Versuchen wurden aus den Ansätzen mit CellGro und X-Vivo 15 mehr Zellen nach ü.N. Stimulation zurückgewonnen als bei denen mit RPMI1640. Da bei MV3 im Ansatz mit RPMI eine unspezifische Anreicherung zeigte, wurde dieser Ansatz aus eingefrorenem Material wiederholt. Bei Probe MV4 erfolgte auch eine unspezifische Anreicherung, allerdings konnten die spezifisch und unspezifisch gefärbten Zellen hier noch unterschieden und der Anteil der spezifisch aktivierten Zellen abgeschätzt werden.

3.5.1.2 Zusammenstellung der Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse

IFN- γ -positive Zellen in den einzelnen Schritten und CD4 ⁺ - und CD8 ⁺ -Anteil in der IFN- γ -positiven Population nach Aufreinigung						
Probe	Medium	IFN- γ ⁺ v. Säule	IFN- γ ⁺ n. 2. Säule	CD4 ⁺ n. 2. Säule	CD8 ⁺ n. 2. Säule	Faktor
MV1	RPMI1640	0,10%	34,10%	7,30%	60,40%	341
	X-Vivo 15	0,10%	60,10%	18,70%	38,70%	601
	CellGro	0,10%	44,40%	19,80%	31,80%	444
MV2	RPMI1640	1,20%	95,10%	5,10%	nicht gefärbt	79
	X-Vivo 15	1,17%	91,47%	20,10%	nicht gefärbt	78
	CellGro	1,60%	88,90%	14,94%	nicht gefärbt	56
MV3	RPMI1640	0,30%	79,80%	7,10%	73,80%	266
	X-Vivo 15	1,06%	88,70%	18,20%	54,60%	84
	CellGro	3,60%	81,00%	19,20%	49,30%	23
MV4	RPMI1640	4,80%	81,80%	3,30%	56,60%	17
	X-Vivo 15	1,40%	82,60%	6,10%	64,60%	59
	CellGro	3,60%	90,00%	8,40%	42,90%	25

Tabelle 3.22: Messergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der IFN- γ -positiven Zellen sowie der CD4⁺-/CD8⁺-Verteilung; *aufgetaute Zellen; die Werte sind bezogen auf lebende Lymphozyten bzw. für den CD4⁺- und CD8⁺-Anteil auf lebende, IFN- γ -positive Lymphozyten; graue Zahlen sind unspezifische Werte

In Tabelle 3.22 sind die Messergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der IFN- γ -positiven Zellen sowie der CD4⁺-/CD8⁺-Verteilung zusammengefasst. Es konnten bei allen Ansätzen IFN- γ -positive Zellen detektiert und angereichert werden. Allerdings variierten die Werte für die IFN- γ -positiven Zellen bei MV3 und MV4 stark, es kam zu einer unspezifischen Anreicherung. Die unspezifische Färbung zeigte sich durch ein Wandern aller Signale in dem Fluoreszenzkanal für die IFN- γ -Messung. Durch gezielte Positionierung des *Gates* für die IFN- γ -positiven Zellen konnte der Anteil der spezifisch aktivierten Zellen abgeschätzt werden (die spezifisch aktivierten Zellen binden mehr Antikörper und leuchten stärker), allerdings spiegelte sich die unspezifische Anreicherung deutlich in den Zellzahlen nach Anreicherung und im Anteil der toten Zellen (vgl. 3.23, S.160) wieder. Wie in Abbildung 3.11 deutlich wird, variierten die CD4⁺- und CD8⁺-Anteile bei den verschiedenen Medien.

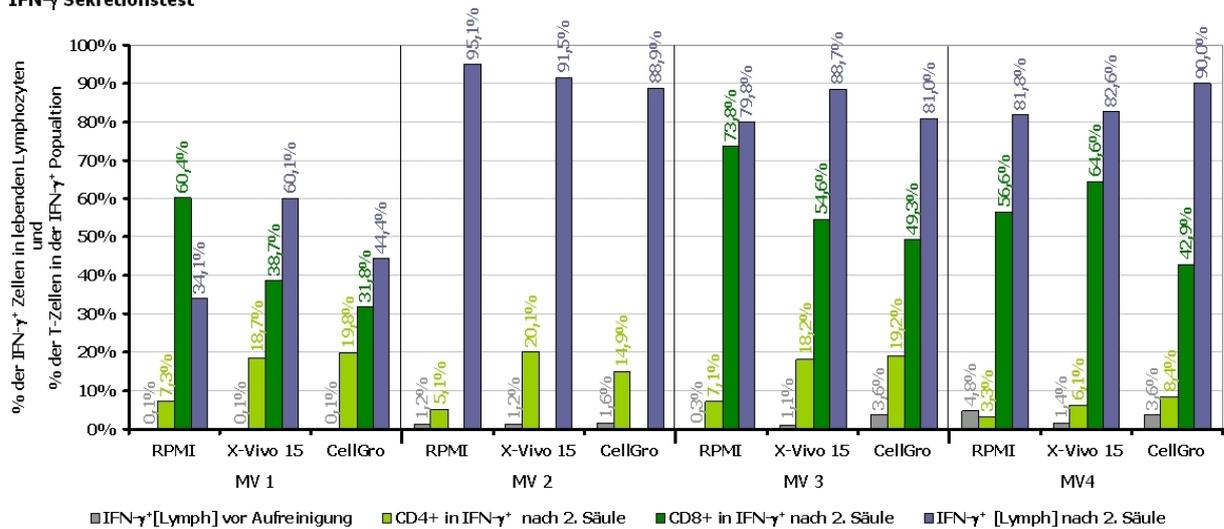
**Medienvergleich:
IFN- γ Sekretionstest**


Abbildung 3.11: Bestimmung der IFN- γ -positiven Zellen und der CD4- und CD8-positiven Zellen beim Medienvergleich: Von links nach rechts sind die 4 Proben aufgetragen. Für jede Probe sind die IFN- γ -positiven Zellen vor Aufreinigung (grau), die CD4-positiven (hellgrün), CD8-positiven (dunkelgrün) und die IFN- γ -positiven Zellen nach Aufreinigung (blau) aufgetragen. Die Y-Achse gibt Prozent der lebenden Lymphozyten (für IFN- γ -positive Zellen) bzw. Prozent der IFN- γ -positiven Zellen (für CD4⁺- und CD8⁺-Bestimmung) an.

Bei CellGro und X-Vivo 15 waren immer mehr CD4-positive Zellen in den aufgereinigten IFN- γ -positiven Zellen enthalten, dafür in den Ansätzen mit RPMI1640 mehr CD8-positive Zellen. Während in den Ansätzen mit RPMI1640 zwischen 3,3% (Probe 4) und 7,3% (Probe 1) CD4-positive Zellen enthalten waren, lagen die Werte bei X-Vivo 15 zwischen 6,1% (Probe 4) und 20,1% (Probe 2), bei CellGro zwischen 8,4% (Probe 4) und 19,8% (Probe 1). Der höchste CD8⁺-Anteil wurde im RPMI1640-Ansatz bei Probe 3 mit 73,8% gemessen.

Außer bei Probe MV1 wurden überall Reinheiten von über 80% erzielt, allerdings fand bei MV3 und MV4 eine unspezifische Anreicherung statt. MV1 war nur schlecht stimulierbar, es konnten nur 0,1% der Zellen mit pp65 aktiviert werden. Daher war eine Anreicherung auf über 80% nicht möglich, die Zellausbeute war in allen Ansätzen bei MV1 sehr gering.

Anteil der toten Zellen in der Negativkontrolle und den pp65-stimulierten Ansätzen vor und nach Aufreinigung				
Probe	Medium	–K	pp65 v. S.	pp65 n. S.
MV1	RPMI1640	2,7%	13,0%	70,9%
	X-Vivo 15	1,7%	13,5%	72,7%
	CellGro	1,9%	16,7%	72,1%
MV2	RPMI1640	6,3%	8,9%	73,1%
	X-Vivo 15	2,2%	6,9%	68,1%
	CellGro	2,1%	5,9%	40,1%
MV3	RPMI1640	1,7%	6,9%	8,8%
	X-Vivo 15	1,3%	4,8%	32,4%
	CellGro	1,5%	5,3%	20,7%
MV4	RPMI1640	4,9%	8,6%	25,0%
	X-Vivo 15	3,7%	6,5%	42,5%
	CellGro	3,1%	7,5%	12,0%
Mittelwert	RPMI1640	3,9%	9,4%	72,0%
	X-Vivo 15	2,2%	7,9%	70,4%
	CellGro	2,2%	8,9%	56,1%

Tabelle 3.23: Messergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse hinsichtlich der toten Zellen, die Ereignisse sind ungefiltert; –K = Negativkontrolle, pp65 v. S. = pp65 stimulierte Ansätze vor Aufreinigung, pp65 n. S. = pp65 stimulierte Ansätze nach Aufreinigung; graue Zahlen sind unspezifische Werte und werden in die Berechnung der Mittelwerte nicht mit einbezogen

Hinsichtlich der Vitalität zeigte sich, dass CellGro und X-Vivo 15 besser für die Stimulationsansätze geeignet sind. In fast allen Proben und Aufarbeitungsschritten waren in diesen Ansätzen weniger tote Zellen enthalten als bei denen mit RPMI1640 (außer MV1), allerdings sind die prozentualen Unterschiede eher gering. Tabelle 3.23 fasst die gemessenen Werte zusammen. Für den Anteil der toten Zellen nach der Anreicherung war weniger das verwendete Medium, als der Anteil der IFN- γ -positiven Zellen sowie die Dauer der Aufreinigung von Bedeutung. In den unstimulierten Ansätzen unterschieden sich die Werte bei CellGro und X-Vivo 15 nur um 0,1% bis 0,2%, während bei RPMI1640 zwischen 0,4% und 4,1% mehr tote Zellen enthalten waren. Bei den pp65-stimulierten Ansätzen waren die Unterschiede größer. Bei der Kontrolle der Zellen im Mikroskop vor und nach *in vitro* Stimulation sahen die mit CellGro inkubierten Ansätze besser aus, als die mit X-Vivo 15 oder RPMI1640 inkubierten. Dies spiegelt sich in den Messwerten nicht wieder, dort sind in den pp65-stimulierten Ansätzen mit X-Vivo 15 weniger tote Zellen enthalten, als in denen mit CellGro (außer bei MV2; im Mittel bei pp65 stimulierten Ansätzen 1% weniger tote in X-Vivo 15 als bei CellGro).

3.5.1.3 Wiederholung des Sekretionstest mit aufgetautem Material und Vergleich mit intrazellulärer Färbung

Die Eignung von kryokonservierten Zellen für den Sekretionstest wurde mit aufgetauten Aliquots der Proben MV1 bis MV3 überprüft, bei MV4 wurden alle isolierten PBMNCs für den Sekretionstest verbraucht, es waren keine für eine Kryokonservierung übrig. Gleichzeitig wurde eine intrazelluläre Färbung angesetzt, um die beiden Methoden (Sekretionstest und intrazelluläre Färbung) zu vergleichen. Die folgende Abb. 3.12 zeigt das Ergebnis der Messungen.

Medienvergleich:
Sekretionstest mit frischen und aufgetauten Zellen im Vergleich zur intrazellulären Färbung von aufgetauten Zellen

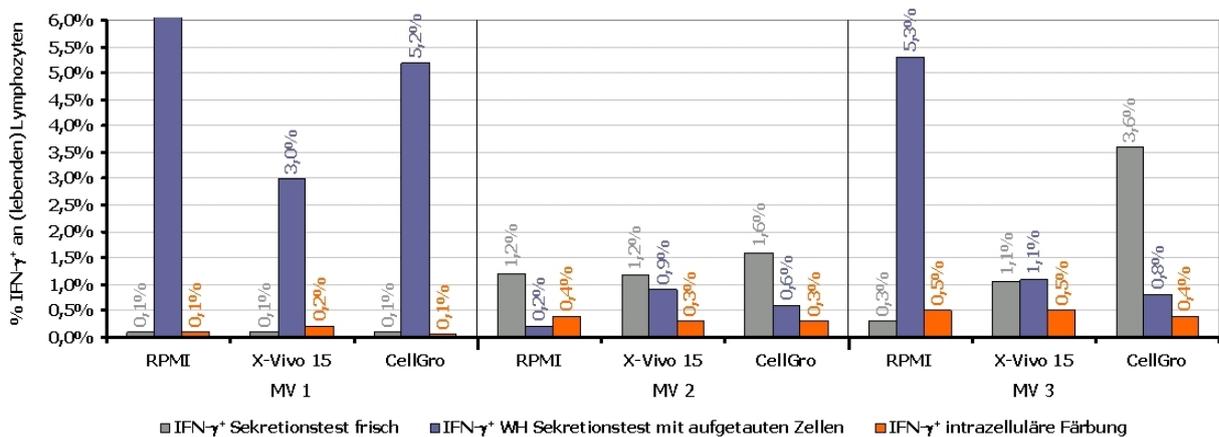


Abbildung 3.12: Vergleich zwischen Sekretionstest aus frischem Material mit Sekretionstest und intrazellulärer Färbung von kryokonservierten Zellen: Auf der Y-Achse wird der prozentuale Anteil der IFN- γ -positiven Zellen an den (lebenden) Lymphozyten gezeigt. Von links nach rechts sind die Proben MV1 bis MV3 dargestellt, jeweils nach den Medien RPMI1640, X-Vivo 15 und CellGro getrennt. Für jedes Medium wird der Anteil der IFN- γ -positiven Zellen beim Sekretionstest mit frischem Material (grau, links außen), aus aufgetauten Zellen (blau, mitte) und bei der intrazellulären Färbung von aufgetauten Zellen (orange, rechts) gezeigt.

Betrachtet man die Messwerte aus den intrazellulären Färbungen (orangene Balken), so variierten diese für die selbe Probe nur wenig ($\pm 0,1\%$), unabhängig vom Medium. Sie wichen jedoch von den Werten beim Sekretionstest aus frischen Zellen (graue Balken) ab. Teilweise ist dies darauf zurückzuführen, dass beim Sekretionstest die prozentualen Anteile an lebenden Lymphozyten angegeben wurden, während bei der intrazellulären Färbung auf die Lymphozyten gefiltert wurde.

Bei der Wiederholung des Sekretionstests mit aufgetauten Zellen bestätigte sich, dass zuvor kryokonservierte Zellen nicht für dieses Anreicherungsverfahren geeignet sind. Die Werte (blaue Balken) schwankten innerhalb jeder Probe stark, die Werte passen weder zu denen aus den Sekretionstest mit frischem Material, noch zu denen aus der intrazellulären Färbung. Nur bei MV2 waren die Werte in allen 3 Messungen ähnlich.

3.5.2 Expansion und Überprüfung der Funktionalität

3.5.2.1 Expansion in den verschiedenen Medien

Die unspezifische Expansion der angereicherten Zellen wurde untersucht, dabei sollte die Zellausbeute erhöht werden. Die expandierten Zellen wurden auf ihre Stimulierbarkeit und Spezifität getestet. Die Tabelle 3.24 stellt die Ergebnisse der Expansion dar.

Expansion der angereicherten Zellen in den verschiedenen Medien					
Probe	Medium	Ausgangsmenge	Dauer der Expansion	Zellzahl n. Expansion	Vermehrung um Faktor
MV1	RPMI1640	$<1,00 \times 10^5$	11 Tage	$7,00 \times 10^6$	70
	X-Vivo 15	$<1,00 \times 10^5$		$2,00 \times 10^6$	20
	CellGro	$<1,00 \times 10^5$		$2,20 \times 10^7$	220
MV2	RPMI1640	$1,00 \times 10^5$	11 Tage	$6,00 \times 10^5$	6
	X-Vivo 15	$1,20 \times 10^5$		$9,00 \times 10^6$	75
	CellGro	$1,40 \times 10^5$		$2,37 \times 10^7$	169
MV3	RPMI1640	$1,00 \times 10^5$	11 Tage	—	
	X-Vivo 15	$3,10 \times 10^5$		$2,60 \times 10^7$	84
	CellGro	$4,60 \times 10^5$		$4,20 \times 10^7$	91
MV4	RPMI1640	$4,60 \times 10^6$	7 Tage	$8,40 \times 10^6$	2
	X-Vivo 15	$1,60 \times 10^6$		$4,20 \times 10^6$	3
	CellGro	$7,50 \times 10^6$		$4,80 \times 10^7$	6

Tabelle 3.24: Unspezifische Expansion der aufgereinigten Zellen in den verschiedenen Medien mit 50 U/ml IL-2; graue Zahlen sind unspezifische Werte

Nach der 2. Säule waren im Eluat $<1,00 \times 10^5$ bis $4,80 \times 10^7$ Zellen enthalten. Allerdings kann nur bei den Werten unter $1,00 \times 10^6$ von einer spezifischen Anreicherung ausgegangen werden. Für 1×10^6 CMV-T-Zellen im Eluat hätten (bei einer Reinheit von 100%) 1% der eingesetzten 1×10^8 Zellen IFN- γ produzieren müssen, wenn die Verluste bei der Aufreinigung nicht berücksichtigt werden. Die erhöhten Zellzahlen in der

aufgereinigten Fraktion passen zur Durchflusszytometeranalyse: Bei allen Proben mit erhöhten Zellzahlen im Eluat zeigte sich eine unspezifische Färbung (siehe Abb. 3.10, S. 156).

Medienvergleich:

Expansion CMV-reaktiver T-Zellen

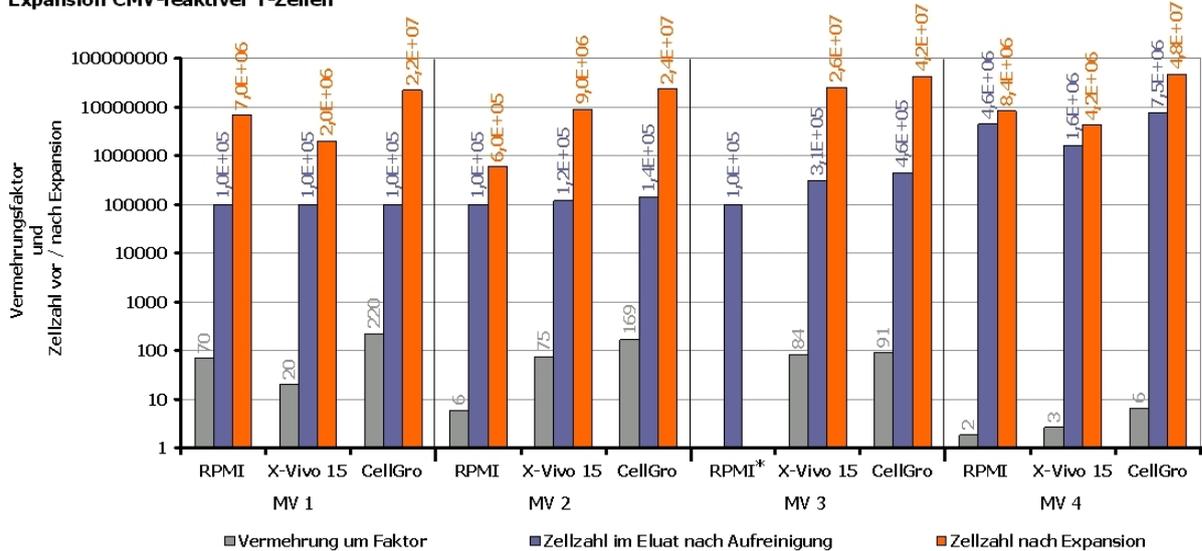


Abbildung 3.13: Unspezifische Expansion der CMV-T-Zellen beim Medienvergleich: von links nach rechts sind die einzelnen Proben MV1 bis MV4 dargestellt, jeweils nach Medien aufgeschlüsselt. Auf der Y-Achse sind der Faktor der Vermehrung (grauer Balken) und die Zellzahlen nach Aufreinigung vor Expansion (blaue Balken) und nach Expansion (orangener Balken) aufgetragen.

Für die Expansion der T-Zellen war das CellGro-Medium am Besten geeignet. Wie aus Abb. 3.13 ersichtlich wird, konnten mit CellGro in allen Ansätzen die höchsten Expansionsraten (grauer Balken) erreicht werden. Auch hier wird deutlich, dass kryokonservierte Zellen nicht für den Sekretionstest geeignet sind: Für MV3 wurde mit RPMI1640 ein Sekretionstest neu angesetzt, da der erste Ansatz eine starke unspezifische Aktivierung zeigte. Es konnten zwar Zellen aufgereinigt werden, doch waren diese nicht mehr expandierbar. Die anderen Ansätze konnten, von den unspezifisch aktivierten bei MV3 und MV4 abgesehen, um mindestens eine Zehnerpotenz expandiert werden. Bei den in CellGro expandierten Zellen wurde für MV1 und MV2 mehr als das Hundertfache der Ausgangsmenge erreicht.

3.5.2.2 Proliferationstest

3.5.2.2.1 Generierung von dendritischen Zellen

Die Generierung von DCs war bei allen Untersuchungen erfolgreich. Die DCs wurden unter dem Mikroskop und stichprobenartig im Durchflusszytometer analysiert, dabei zeigte sich, dass über 90% positiv für CD83 und CD86 waren.

3.5.2.2.2 Proliferationstest

Die Proliferationstests mit den expandierten CMV-T-Zellen waren nicht aussagekräftig. Zunächst ergab sich das Problem, dass die CMV-T-Zellen nur schlecht mit CFSE anfärben waren, was für eine geringe Vitalität spricht. Die Farbstoffkonzentration und die Färbedauer wurden daraufhin verdoppelt (2 μ M für 30 min). Bei MV2 und MV3 konnten nur in CellGro und X-Vivo 15 genügend Zellen zum Ansetzen des Tests expandiert werden. Nachdem beim Proliferationstest für MV1 unerwartet wenige CD3⁺-Zellen in den expandierten Zellen enthalten waren, wurden vor dem Ansetzen weiterer Proliferationstests Aliquots der expandierten Zellen auf CD3, CD4 und CD8 gefärbt. Dabei zeigte sich, dass etwa 50% CD3-positiv waren, der Anteil an CD3⁺CD4⁺-Zellen war unter 1%, der an CD3⁺CD8⁺-Zellen entsprechend um 50%. Neben T-Zellen können auch NK-Zellen durch IL-2 zur Proliferation angeregt werden. Bei MV4 wurde daher zusätzlich auf CD16 und CD56 gefärbt. Hier fanden sich in den verschiedenen Medien zwischen 25% bis zu 50% NK-Zellen (CD3⁻CD16⁺CD56⁺-Zellen). Bei der Aufreinigung der CMV-spezifischen T-Zellen waren also neben T-Zellen auch NK-Zellen im Eluat enthalten.

Alle Aussagen zu den Proliferationstests sind aufgrund der aufgetretenen Probleme nur als Tendenz anzusehen. Vergleicht man unspezifisch expandierte CMV-T-Zellen mit den CD3⁺-T-Zellen, so zeigten die CMV-T-Zellen eine geringere Reaktion auf die Stimulation mit PMA/Ionomycin. Bei der Kokultur mit allogenen DC zeigten CMV-T-Zellen und CD3⁺-T-Zellen eine Reaktion, die CD3⁺-T-Zellen proliferierten jedoch stärker. Bei der Kokultur mit pp65 beladenen autologen DC zeigten ebenfalls CMV-T-Zellen und CD3⁺-T-Zellen eine Reaktion, die CMV-T-Zellen proliferierten jedoch nicht stärker als die CD3⁺-T-Zellen. Dies könnte bedeuten, dass die CMV-T-Zellen durch die unspezifische Expansion an Reaktivität und Spezifität verlieren, besonders wenn wie hier die Ausgangspopulation auch unspezifisch angereicherte Zellen enthält.

3.6 Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionstest

3.6.1 Verwendete Proben und Zellausbeute

Für die Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ -Sekretionstest wurden 10 CMV-seropositive, HLA-typisierte Blutproben verwendet. Durchschnittlich wurden 6×10^8 PBMNCs aus 450 ml Vollblut gewonnen. Die Abb. 3.14 gibt einen Überblick über die HLA-Verteilung in den verwendeten Proben.

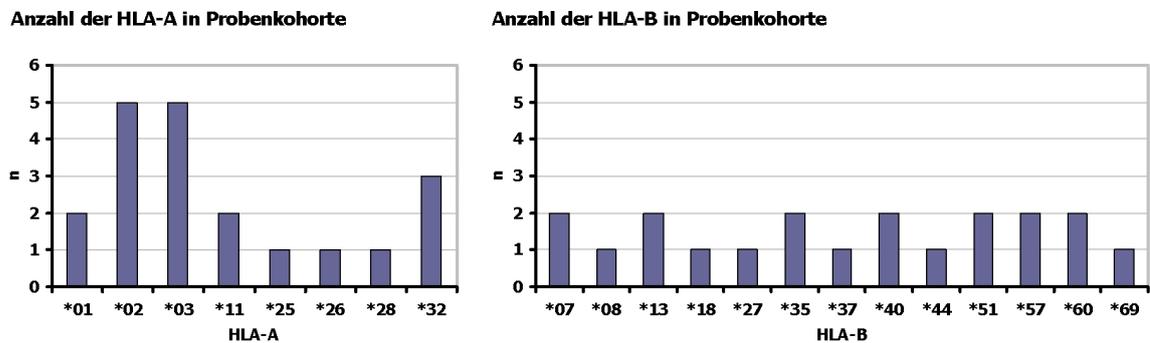


Abbildung 3.14: HLA-Verteilung bei der Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion: HLA-A- (links) und HLA-B- (rechts) Typen der Blutspender, die Y-Achse zeigt die Anzahl.

Bei dieser kleinen Kohorte war die HLA-Verteilung nicht repräsentativ, allerdings waren wie erwartet mehrere HLA-A*02-positive Proben enthalten. Bei allen Proben war die Zellausbeute so hoch, dass jeweils mindestens 10 Aliquots für spätere Versuche kryokonserviert werden konnten.

3.6.2 Zellzahlen in den einzelnen Aufarbeitungsschritten und Verdünnung in der Sekretionsphase

Um einen besseren Eindruck von den Zellverlusten in den einzelnen Aufarbeitungsschritten zu erhalten, wurden auch hier wie beim Medienvergleich die Zellzahlen nach *ü. N.* Stimulation und vor Aufreinigung über die Säulen bestimmt. Die folgende Tabelle 3.25 auf Seite 166 zeigt die Zellverluste.

Zellverluste während des Aufarbeitungsprozesses						
Probe	Zellzahl eingesetzt		Zellzahl nach ü. N.		Zellzahl n. Sekretionsphase	
	Lysat	pp65	Lysat	pp65	Lysat	pp65
1	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$8,0 \times 10^7$	$8,7 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
2	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$4,6 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$
3	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$6,6 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$	$3,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$
4	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$6,2 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$	$3,7 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$
5	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$7,3 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$	$2,9 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$
6	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$6,9 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$	$4,3 \times 10^7$	$3,4 \times 10^7$
7	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$7,8 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	$3,5 \times 10^7$	$4,7 \times 10^7$
8	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$7,0 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$	$5,0 \times 10^7$
9	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$7,7 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$	$3,3 \times 10^7$	$4,4 \times 10^7$
10	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$6,5 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$4,8 \times 10^7$
Ø	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^8$	$7,1 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$	$3,9 \times 10^7$	$4,2 \times 10^7$
% Verlust	n/a	n/a	29,1%	28,8%	60,8%	57,9%

Tabelle 3.25: Zellverluste in den einzelnen Aufarbeitungsschritten

Nach der ü. N. Stimulation lagen die Zellverluste bei ca. 30%. Nach der Sekretionsphase konnte mit ca. 40% der Ausgangsmenge weiter gearbeitet werden. Die Unterschiede zwischen den pp65 und Lysat stimulierten Ansätzen waren erwartungsgemäß gering.

Die Ergebnisse der Zellzahlbestimmung in den einzelnen Aufarbeitungsschritten wurde auch genutzt, um die tatsächliche Verdünnung in der Sekretionsphase zu berechnen. Gerade in diesem Schritt ist eine ausreichende Verdünnung kritisch, es kann zur unspezifischen Kopplung von IFN- γ an nicht CMV-reaktive Zellen kommen. Die Verdünnung wurde so geplant, das bei 100% der Ausgangszellmenge eine 1:20 Verdünnung anstatt der vom Hersteller angegebenen 1:10 Verdünnung erreicht wurde. Die Tabelle 3.26, S. 167 gibt die tatsächlichen Verdünnungen an.

Sowohl bei den Ansätzen mit pp65, als auch bei denen mit CMV-Lysat war die durchschnittliche Verdünnung während der Sekretionsphase 1:28, bzw. $3,5 \times 10^5$ Zellen pro 1 ml. Bei der parallel durchgeführten intrazellulären Färbung wurden nur bei Probe 1 und 3 nach Stimulation mit Lysat und bei Probe 1 und 6 nach Stimulation mit pp65 mehr als 1% IFN- γ -positive Zellen gemessen. Laut Herstellerangaben sollte die Verdünnung erhöht werden, wenn mehr als 5% positive Zellen erwartet werden bzw. enthalten sind.

Verdünnung in der Sekretionsphase							
Probe	Zellzahl nach ü. N.		Zielverd. (1 : 20) Zellen / ml	tatsächliche Verdünnung			
	Lysat Zellen / 10 ml	pp65 Zellen / 10 ml		Lysat Zellen / ml	Faktor	pp65 Zellen / ml	Faktor
1	$8,0 \times 10^7$	$8,7 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$4,0 \times 10^5$	25	$4,4 \times 10^5$	23
2	$6,9 \times 10^7$	$6,8 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	29	$3,4 \times 10^5$	29
3	$6,6 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	30	$3,6 \times 10^5$	28
4	$6,2 \times 10^7$	$6,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,1 \times 10^5$	32	$3,1 \times 10^5$	33
5	$7,3 \times 10^7$	$6,9 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,7 \times 10^5$	27	$3,5 \times 10^5$	29
6	$6,9 \times 10^7$	$7,6 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	29	$3,8 \times 10^5$	26
7	$7,8 \times 10^7$	$8,2 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	26	$4,1 \times 10^5$	24
8	$7,0 \times 10^7$	$6,2 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,5 \times 10^5$	29	$3,1 \times 10^5$	32
9	$7,7 \times 10^7$	$6,5 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,9 \times 10^5$	26	$3,3 \times 10^5$	31
10	$6,5 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^5$	31	$3,6 \times 10^5$	28
Ø	$7,1 \times 10^7$	$7,1 \times 10^7$	$5,0 \times 10^5$	$3,6 \times 10^5$	28	$3,6 \times 10^5$	28

Tabelle 3.26: Verdünnung in der Sekretionsphase: von links nach rechts sind die Zellzahlen nach ü. N. Kultur, die Zellen pro 1 ml bei der Zielverdünnung von 1 : 20 und die tatsächlichen Verdünnungen gezeigt.

3.6.3 T-Zell-Subpopulationen

3.6.3.1 T-Zell-Subpopulationen in den 10 gemessenen Proben

Da virusspezifische T-Zellen für eine Kontrolle der CMV-Reaktivierung unerlässlich sind und daher der Schwerpunkt der Betrachtung auf ihnen liegt, werden die T-Zell-Subpopulationen für alle 10 Proben im Detail dargestellt. Für die NK-Zellen, B-Zellen usw. wird hingegen nur ein Überblick gegeben.

Die Anteile der T-Zell-Subpopulationen werden dabei nach Anteilen an den lebenden Zellen total, d. h. im gesamten Ansatz, nach Anteilen an der IFN- γ -positiven und an der IFN- γ -negativen Population aufgeschlüsselt. Für die Negativkontrolle ist die Angabe bezogen auf IFN- γ -positive Zellen nicht sinnvoll, da es sich hier erstens um Hintergrundaktivierung handelt, zweitens nur wenige Ereignisse in den jeweiligen Regionen und Gates auftauchen, diese aber zu hohen prozentualen Anteilen führen können (bei 10 unspezifisch IFN- γ -sezernierenden Zellen sind z. B. 2 CD4-positive schon 20%). Dies ist auch daran erkennbar, dass sich in den unstimulierten Kontrollen die Werte bezogen auf die lebenden Zellen total und auf die IFN- γ -negativen lebenden Zellen gleichen, während durch Artefakte abweichende Werte für die T-Zell-Subpopulationen bezogen auf die IFN- γ -positiven Zellen entstehen, eigentlich sollten die Werte fast Null sein.

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
1	lebend	CD3+CD4+	40,92	32,94	38,72	52,01	56,94
1	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	21,82	31,82	37,95	81,50	71,59
1	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	40,94	32,97	38,74	14,32	47,52
1	lebend	CD3+CD8+	20,08	21,17	22,76	3,77	11,83
1	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	3,64	2,35	9,21	3,78	19,39
1	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	20,10	21,65	23,06	3,76	6,97
1	lebend	IFN- γ +	0,12	2,49	2,16	56,10	39,14
1	ungefiltert	tot	3,08	7,45	4,34	81,65	76,90
HLA-A *02 *32				HLA-B *51 *60			

Tabelle 3.27: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 1; Werte = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Die Messwerte zu Probe 1 sind in Tab. 3.27, S. 168 dargestellt. Nach Stimulation mit pp65 und CMV-Lysat wurden ähnliche Werte vor Aufreinigung erreicht, 2,5% nach Lysat und 2,2% nach pp65. Bereits vor der Anreicherung über die beiden Säulen zeigten sich deutliche Unterschiede bei der CD4⁺-CD8⁺-Verteilung innerhalb der IFN- γ -sezernierenden Population, mit 9,2% waren beim mit pp65 stimulierten Ansatz dreimal so viele CD3⁺CD8⁺-T-Zellen enthalten (Lysat: 2,4%).

Der Anteil an CD3⁺CD4⁺-T-Zellen war hingegen ähnlich (32% nach Stimulation mit Lysat und 38% nach Stimulation mit pp65). Nach Anreicherung auf 56% IFN- γ -positive beim Lysat stimulierten Ansatz und 40% beim pp65 stimulierten wurde der Unterschied bei der Aktivierung von CD3⁺CD8⁺-T-Zellen noch deutlicher. Während in der IFN- γ -sezernierenden Population nach Stimulation mit pp65 20% CD3⁺CD8⁺-T-Zellen enthalten waren, wurden im mit Lysat stimulierten Ansatz nur 3,8% gemessen.

3.6. Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionstest

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
2	lebend	CD3+CD4+	35,90	33,97	34,99	11,23	29,97
2	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	14,58	13,64	22,75	16,52	22,47
2	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	35,98	34,01	35,52	7,98	48,40
2	lebend	CD3+CD8+	20,77	19,95	21,58	32,65	31,94
2	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	35,42	43,18	19,61	60,31	32,48
2	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	20,71	19,90	21,66	15,62	30,59
2	lebend	IFN- γ +	0,41	0,21	4,15	38,11	71,08
2	ungefiltert	tot	11,40	5,15	16,60	59,87	44,61
HLA-A *02 *11				HLA-B *07 *35			

Tabelle 3.28: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 2; Werte = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Probe 2 (vgl. Tab. 3.28, S. 169) hatte mit HLA-A *02, *11 und HLA-B *07, *35 3 HLA-Typen (A*02, B*07 und B*35), bei denen CMV-spezifische CD8⁺-T-Zellen Epitope im pp65 erkennen. Dementsprechend war diese Probe mit pp65 sehr gut stimulierbar (4,2% IFN- γ -positive vor Aufreinigung), auch deutlich besser als mit Lysat (0,2% IFN- γ -positive vor Aufreinigung). Allerdings wurden hier nach Aufreinigung doppelt so viele CD3⁺CD8⁺-T-Zellen beim mit Lysat stimulierten Ansatz gemessen. Der Ansatz mit dem höheren Anteil an IFN- γ -positiven Zellen vor Aufreinigung ergab später auch eine höhere Reinheit: Der mit pp65 stimulierte Ansatz wurde von 4,2% IFN- γ -positiven auf 71% angereichert, der mit Lysat stimulierte von 0,2% auf 38%.

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
3	lebend	CD3+CD4+	32,31	34,31	38,52	61,29	40,57
3	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	20,32	61,73	80,52	86,23	79,87
3	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	32,41	33,42	38,38	17,52	23,25
3	lebend	CD3+CD8+	15,98	17,33	18,37	2,76	5,88
3	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	3,74	5,17	7,68	3,62	12,51
3	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	16,07	17,73	18,40	1,25	2,96
3	lebend	IFN- γ +	0,79	3,15	0,33	63,70	30,59
3	ungefiltert	tot	4,56	10,39	11,36	58,46	78,10
HLA-A *02 *26				HLA-B *27 *57			

Tabelle 3.29: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 3; Werte = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Bei Probe 3 (Tab. 3.29, S. 169) ergab sich hinsichtlich der Anreicherung genau das umgekehrte Bild, wie in Probe 2: Die Stimulation mit pp65 zeigte hier weniger Wirkung als das CMV-Lysat. Der pp65-stimulierte Ansatz konnte von 0,3% auf 30,6% angereichert werden, der mit Lysat stimulierte von 3,2% auf 63,7%. Dies verdeutlicht, dass die Reinheit der angereicherten Population durch den Gehalt an aktivierten Zellen vor der Aufreinigung mit bestimmt wird. Auch die Vitalität ist bei den zuvor stärker aktivierten besser, je mehr IFN- γ -sezernierende Zellen an die Säule gebunden werden, desto weniger werden tote Zellen unspezifisch gebunden. Die Anteile an CD3⁺CD4⁺-T-Zellen sind auch hier wieder ähnlich (86% und 80% in der IFN- γ -positiven Population). Dafür sind im pp65-stimulierten Ansatz CD3⁺CD8⁺-T-Zellen enthalten (13% im Gegensatz zu 4% beim Lysat).

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
4	lebend	CD3+CD4+	25,50	30,38	32,40	37,12	38,81
4	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	5,48	33,48	17,49	53,40	36,47
4	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	25,57	30,36	33,22	13,53	51,85
4	lebend	CD3+CD8+	15,95	17,73	18,65	4,35	25,10
4	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	6,85	2,09	9,23	2,91	24,76
4	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	15,98	17,82	19,17	6,43	27,00
4	lebend	IFN- γ +	0,38	0,59	5,22	59,17	84,79
4	ungefiltert	tot	1,45	2,42	5,25	58,85	29,49
HLA-A *02 *28				HLA-B *51 *60			

Tabelle 3.30: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 4; Werte = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Tabelle 3.30, S. 170 zeigt die Messergebnisse von Probe 4. Hier war die Stimulation mit pp65 deutlich besser als mit Lysat, auch wurden wieder mehr CD3⁺CD8⁺-T-Zellen durch die Stimulation mit pp65 aktiviert, vor Anreicherung waren es 9,2% der IFN- γ -positiven, lebenden Zellen, beim Lysat stimulierten Ansatz dagegen nur 2,1%. Nach der Aufreinigung waren beim pp65-stimulierten Ansatz dann mit fast 25% achtmal so viele CD3⁺CD8⁺-T-Zellen in den IFN- γ -positiven, lebenden Zellen wie beim Lysat-stimulierten Ansatz mit ungefähr 3%.

3.6. Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionstest

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
5	lebend	CD3+CD4+	19,75	17,68	19,75	10,9	17,62
5	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	23,85	21,04	34,31	7,22	20,88
5	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	19,74	16,39	19,58	18,69	12,21
5	lebend	CD3+CD8+	9,59	11,23	11,32	9,87	15,31
5	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	3,67	3,58	13,69	4,15	18,64
5	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	9,60	14,18	11,29	21,97	9,80
5	lebend	IFN- γ +	0,12	27,82	1,12	67,91	62,33
5	ungefiltert	tot	1,54	11,44	16,54	25,51	79,52
HLA-A *01				HLA-B *13			

Tabelle 3.31: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 5; ~~Werte~~ = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; Werte = Werte bei unspezifisch aktivierten Proben; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Bei Probe 5 (vgl. Tab. 3.31, S. 171) trat eine unspezifische Färbung und Anreicherung im mit CMV-Lysat stimulierten Ansatz auf. Dieser Ansatz kann daher nicht mit in die Auswertung einbezogen werden. Der pp65-stimulierte Ansatz wurde auf 62% IFN- γ -positive Zellen angereichert, allerdings waren unter 40% T-Zellen darunter. In der IFN- γ -positiven Population wurde ein Anteil von 19% CD3⁺CD8⁺- und 21% CD3⁺CD4⁺-T-Zellen gemessen.

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
6	lebend	CD3+CD4+	46,23	38,85	35,13	30,13	53,02
6	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	48,87	19,66	42,33	28,71	57,13
6	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	46,26	39,22	15,57	31,88	8,37
6	lebend	CD3+CD8+	13,46	11,97	10,38	6,13	17,91
6	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	9,43	1,30	5,18	2,84	11,39
6	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	13,47	12,18	24,51	10,18	88,82
6	lebend	IFN- γ +	0,10	1,93	73,09	55,28	91,57
6	ungefiltert	tot	2,37	2,01	5,86	28,09	6,48
HLA-A*03				HLA-B *40			

Tabelle 3.32: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 6; ~~Werte~~ = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; Werte = Werte bei unspezifisch aktivierten Proben; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Probe 6 (siehe Tab. 3.32, S. 171) wies ebenfalls eine unspezifische Färbung auf, diesmal im pp65-stimulierten Ansatz. Mit Lysat wurde zwar eine Stimulation von 1,9% erreicht, allerdings war die Anreicherung mit 55% IFN- γ -positiven Zellen eher schlecht. Der Gehalt an CD3⁺CD8⁺- betrug 2,8% und der an CD3⁺CD4⁺-T-Zellen 28,7% in der IFN- γ -positiven Population. Der T-Zellanteil war also eher niedrig.

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
7	lebend	CD3+CD4+	33,18	33,65	31,60	31,57	34,61
7	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	30,21	48,45	37,81	52,32	61,28
7	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	33,19	33,56	31,58	8,52	18,21
7	lebend	CD3+CD8+	22,39	25,26	24,84	3,63	6,51
7	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	37,5	15,17	8,86	4,05	5,68
7	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	22,38	25,32	24,91	3,16	7,02
7	lebend	IFN- γ +	0,10	0,60	0,39	52,62	38,07
7	ungefiltert	tot	4,30	6,67	13,73	76,48	87,71
HLA-A *03*32				HLA-B *37*60			

Tabelle 3.33: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 7; Werte = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Sowohl CMV-Lysat als auch pp65 führten bei Probe 7 (Werte in Tab. 3.33, S. 172) zu einer Aktivierung, beim Lysat wurden 0,6% und beim pp65 0,4% vor Anreicherung erreicht. Die Anreicherung lag bei 53% IFN- γ -positiven Zellen nach Stimulation mit Lysat und 38% nach Stimulation mit pp65. Die Werte für CD3⁺CD8⁺- und CD3⁺CD4⁺-T-Zellen waren bei pp65 und Lysat mit 5,7% zu 4,1% (CD3⁺CD8⁺) und 61,3% zu 52,3% (CD3⁺CD4⁺) ähnlich.

3.6. Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionstest

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
8	lebend	CD3+CD4+	18,52	21,42	20,77	17,48	42,84
8	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	25,69	25,94	31,05	22,42	49,7
8	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	18,51	21,40	11,46	11,22	9,95
8	lebend	CD3+CD8+	17,96	20,36	21,64	3,37	30,67
8	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	14,58	6,35	6,42	2,55	18,42
8	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	17,97	20,43	35,44	4,42	89,36
8	lebend	IFN- γ +	0,15	0,49	47,54	55,86	82,73
8	ungefiltert	tot	1,10	2,89	7,06	50,65	10,69
HLA-A *03*32				HLA-B*08*44			

Tabelle 3.34: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 8; **Werte** = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; **Werte** = Werte bei unspezifisch aktivierten Proben; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
9	lebend	CD3+CD4+	19,36	19,19	20,26	36,74	20,95
9	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	22,63	22,72	20,84	31,97	20,67
9	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	19,35	19,14	20,1	51,73	22,92
9	lebend	CD3+CD8+	15,34	16,50	17,14	49,83	28,28
9	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	15,79	27,57	10,84	57,51	22,67
9	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	15,33	16,34	18,93	25,67	67,45
9	lebend	IFN- γ +	0,11	1,37	22,09	75,88	87,47
9	ungefiltert	tot	3,37	5,37	10,59	43,41	19,13
HLA-A *02*03				HLA-B *07*57			

Tabelle 3.35: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 9; **Werte** = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; **Werte** = Werte bei unspezifisch aktivierten Proben; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Auch bei den Proben 8 (siehe Tab. 3.34, S. 173) und 9 (siehe Tab. 3.35, S. 173) kam es zu unspezifischen Färbungen und Anreicherungen in den Ansätzen mit pp65. Da auch bei diesen Proben pp65 und Lysat nicht bezüglich der Stimulationswirkung und der T-Zell-Subpopulationen verglichen werden können, sei hier nur kurz auf die stark unterschiedlichen CD4-CD8-Verhältnisse bei den Lysat-stimulierten Ansätzen nach Aufreinigung hingewiesen: Bei Probe 8 waren 2,6% CD3+CD8+- und 22,4% CD3+CD4+-T-Zellen in IFN- γ -positiven Zellen enthalten, bei Probe 9 hingegen 57,5% CD3+CD8+- und 31,9% CD3+CD4+-T-Zellen.

Probe	Bezugspopulation (Gate)	Phänotyp (Region)	-K (%Gated)	Lysat v. Säule (%Gated)	pp65 v. Säule (%Gated)	Lysat n. 2. Säule (%Gated)	pp65 n. 2. Säule (%Gated)
10	lebend	CD3+CD4+	27,59	25,76	27,96	13,34	50,74
10	IFN- γ + lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ +	33,33	31,40	57,01	53,58	93,98
10	IFN- γ - lebend	CD3+CD4+ in IFN- γ -	27,58	25,75	27,88	11,16	29,39
10	lebend	CD3+CD8+	8,80	8,38	8,70	1,14	1,54
10	IFN- γ + lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ +	6,23	5,37	1,33	7,92	0,83
10	IFN- γ - lebend	CD3+CD8+ in IFN- γ -	8,81	8,38	8,72	0,78	1,88
10	lebend	IFN- γ +	0,16	0,12	0,28	5,13	33,04
10	ungefiltert	tot	1,91	2,03	4,65	77,94	79,11
HLA-A *25*11				HLA-B *18*35			

Tabelle 3.36: Ergebnisse der Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen bei Probe 10; Werte = Werte für Anteile an der IFN- γ -positiven Population bei der Negativkontrolle; -K = unstimulierte Kontrolle; Lysat / pp65 v. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz vor Anreicherung; Lysat / pp65 n. 2. Säule = Lysat / pp65 stimulierter Ansatz nach Anreicherung über 2 Säulen

Probe 10 (vgl. Tab. 3.36, S. 174) war weder mit pp65 noch mit Lysat gut zu stimulieren. Diese Probe ist ein Beispiel dafür, dass auch Zellen von einem CMV-seropositiven Spender nicht oder nur unzureichend *in vitro* mit den verfügbaren CMV-Antigenen stimuliert werden können. Gerade für solche Fälle wären andere Antigene oder die Möglichkeit einer *in vitro* Immunisierung gegen CMV von Nutzen.

3.6.3.2 Verteilung der T-Zellsubpopulationen im Überblick

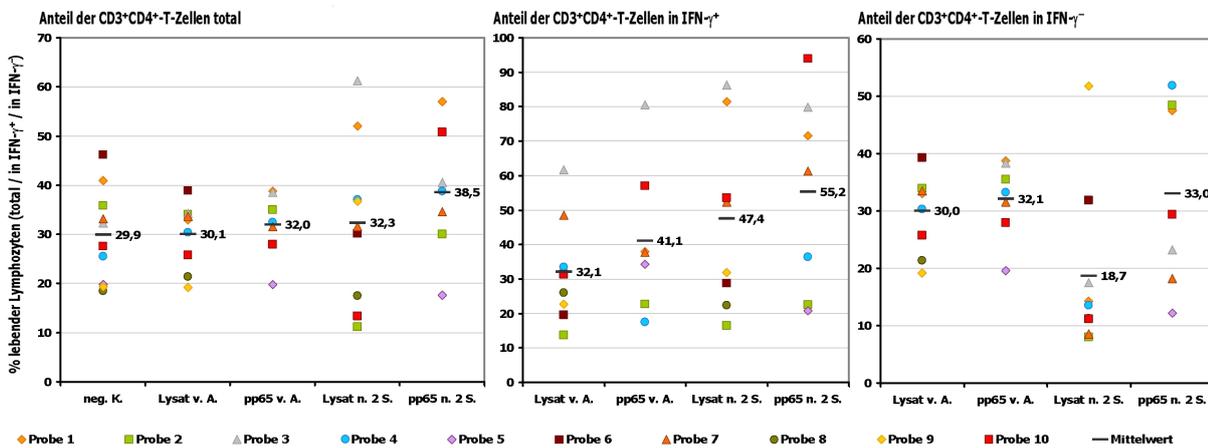


Abbildung 3.15: Verteilung der CD3⁺CD4⁺-T-Zellen nach Stimulation mit pp65 oder Lysat vor und nach Aufreinigung bezogen auf alle lebenden Zellen (links), auf lebende, IFN- γ -positive Zellen (mitte) und lebende, IFN- γ -negative Zellen (rechts); der schwarze Balken gibt den Mittelwert aus allen auswertbaren Proben an; neg. K. = unstimulierte Kontrollen; Lysat / pp65 v. A. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze vor Aufreinigung; Lysat / pp65 n. 2S. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze nach Aufreinigung über 2 Säulen

Die Abbildung 3.15, S. 174 zeigt die einzelnen Werte aus der Bestimmung der CD3⁺CD4⁺-T-Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen (links), auf lebende, IFN- γ -positive Zellen (mitte) und lebende, IFN- γ -negative Zellen (rechts). Während die totalen Werte in beiden Ansätzen vor Anreicherung nah beieinander lagen (19,2% bis 38,7%), streuten die Werte nach Aufreinigung stärker, obwohl sich die Mittelwerte ähnelten. Vor Aufreinigung waren in der Negativkontrolle im Mittel 29,9% CD3⁺CD4⁺-T-Zellen enthalten, in dem mit Lysat stimulierten Ansatz 30,1% und im pp65 stimulierten 32,0%. Diese Werte sollten gleich sein, die Abweichung bei den Mittelwerten lag hier bei maximal 2,1%. In den einzelnen Proben waren die Abweichungen größer. Betrachtet man die CD3⁺CD4⁺-Anteile an den IFN- γ -positiven Zellen (mittlere Graphik), so waren bereits vor der Anreicherung nach Stimulation mit pp65 mehr CD3⁺CD4⁺-T-Zellen enthalten (41,4%) als nach Stimulation mit CMV-Lysat (32,1%), nach Aufreinigung war der Unterschied noch deutlicher: im pp65-stimulierten Ansatz waren im Mittel 55,2% der lebenden IFN- γ -positive Zellen CD3⁺CD4⁺-T-Zellen, im Lysat stimulierten Ansatz 47,4%. Auch in der IFN- γ -negativen Population war der CD3⁺CD4⁺-Anteil beim pp65 stimulierten Ansatz deutlich höher (Bild rechts; 33,0% im Vergleich zu 18,7% beim Lysat).

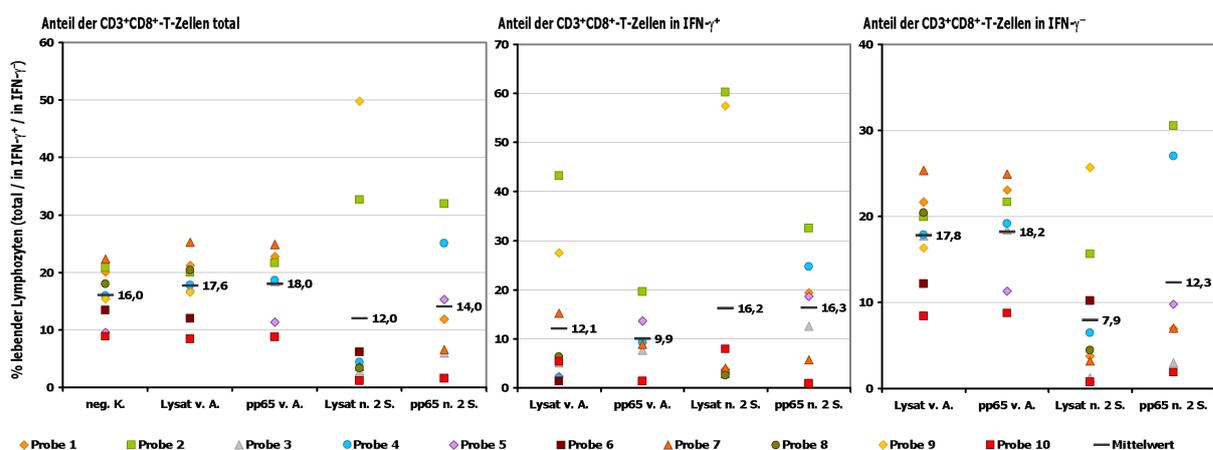


Abbildung 3.16: Verteilung der CD3⁺CD8⁺-T-Zellen nach Stimulation mit pp65 oder Lysat vor und nach Aufreinigung bezogen auf alle lebenden Zellen (links), auf lebende, IFN- γ -positive Zellen (mitte) und lebende, IFN- γ -negative Zellen (rechts); der schwarze Balken gibt den Mittelwert aus allen auswertbaren Proben an; neg. K. = unstimulierte Kontrollen; Lysat / pp65 v. A. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze vor Aufreinigung; Lysat / pp65 n. 2S. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze nach Aufreinigung über 2 Säulen

Betrachtet man die Anteile an CD3⁺CD8⁺-T-Zellen (vgl. Abb. 3.16) finden sich in den Ansätzen vor Aufreinigung bezogen auf alle lebenden Zellen (linke Graphik) ähnliche Mit-

telwerte (16,0% Negativkontrolle, 17,6% Lysat, 18,0% pp65), der Anteil ist ungefähr halb so groß wie der der $CD3^+CD4^+$ -T-Zellen – ein typisches Verhältnis bei gesunden Personen. In der lebenden IFN- γ -positiven Population (mitte) waren nach Aufreinigung bei beiden Antigenen die Werte für $CD3^+CD8^+$ -T-Zellen mit 16,2% und 16,3% fast gleich. Allerdings wurden nicht gleich viele Werte in die Berechnung des Mittelwertes miteinbezogen (Lysat: $n = 9$; pp65: $n = 7$).

3.6.4 NK-Zellen

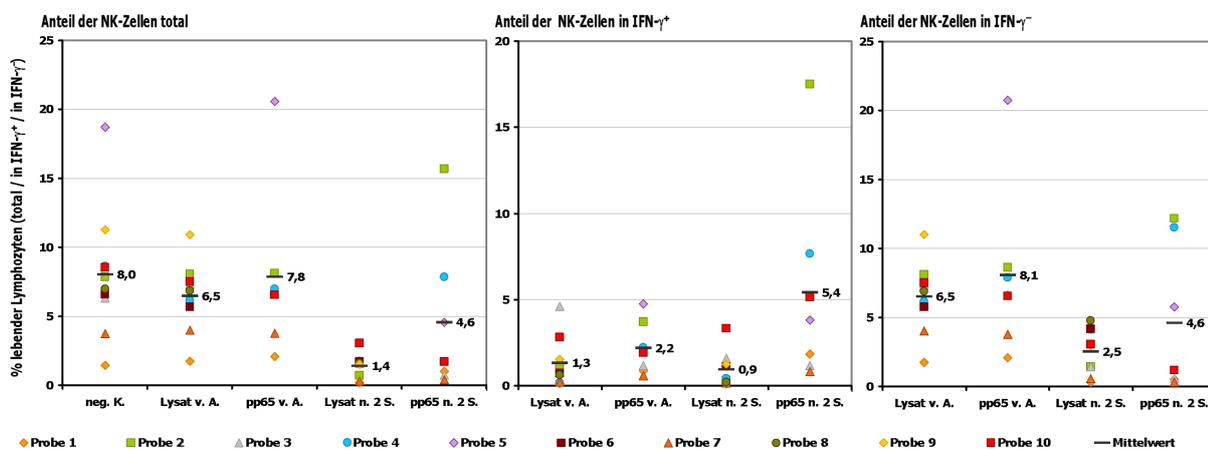


Abbildung 3.17: Verteilung der NK-Zellen nach Stimulation mit pp65 oder Lysat vor und nach Aufreinigung bezogen auf alle lebenden Zellen (links), auf lebende, IFN- γ -positive Zellen (mitte) und lebende, IFN- γ -negative Zellen (rechts); der schwarze Balken gibt den Mittelwert aus allen auswertbaren Proben an; neg. K. = unstimulierte Kontrollen; Lysat / pp65 v. A. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze vor Aufreinigung; Lysat / pp65 n. 2S. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze nach Aufreinigung über 2 Säulen

Bei den NK-Zell-Anteilen zeigten sich in Abhängigkeit des verwendeten Antigens deutliche Unterschiede nach Aufreinigung (siehe Abb. 3.17), besonders in der lebenden IFN- γ -positiven Population (mitte): Während nach Stimulation mit CMV-Lysat im Mittel 0,9% NK-Zellen vorhanden waren, wurden in den pp65-stimulierten Ansätzen im Mittel 5,4% NK-Zellen gefunden. Besonders deutlich ist der Unterschied bei den Proben 2 (grünes Quadrat) und 4 (blauer Kreis), bei denen die Werte beim pp65 weit über dem Mittelwert liegen, bei Lysat hingegen darunter.

3.6.5 B-Zellen

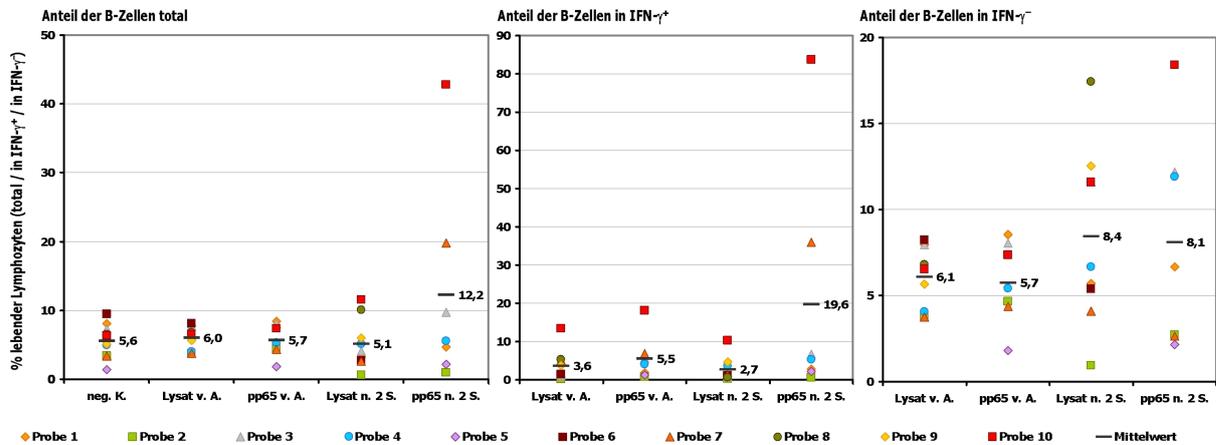


Abbildung 3.18: Verteilung der B-Zellen nach Stimulation mit pp65 oder Lysat vor und nach Aufreinigung bezogen auf alle lebenden Zellen (links), auf lebende, IFN- γ -positive Zellen (mitte) und lebende, IFN- γ -negative Zellen (rechts); der schwarze Balken gibt den Mittelwert aus allen auswertbaren Proben an; neg. K. = unstimulierte Kontrollen; Lysat / pp65 v. A. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze vor Aufreinigung; Lysat / pp65 n. 2S. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze nach Aufreinigung über 2 Säulen

Die Abbildung 3.18, S.177 zeigt die einzelnen Werte aus der Bestimmung der CD19⁺CD20⁺-B-Zellen bezogen auf alle lebenden Zellen (links), auf lebende, IFN- γ -positive Zellen (mitte) und lebende, IFN- γ -negative Zellen. Bei den Anteilen an lebenden Zellen (links) wurden vor Aufreinigung ähnliche Werte gemessen, die maximale Abweichung der Mittelwerte betrug 0,5%. Nach Anreicherung wurden im pp65-stimulierten Ansatz deutlich mehr B-Zellen gemessen, betrachtet man die IFN- γ -positive Population (mitte), so zeigte sich eine spezifische Anreicherung IFN- γ -positiver B-Zellen (19,5% gegen 2,7% beim Lysat stimulierten Ansatz). Im IFN- γ -negativen Anteil (rechts) bleiben die Werte auch nach Aufreinigung für beide Antigene ähnlich (8,4% und 8,1%).

3.6.6 CD14-positive Zellen

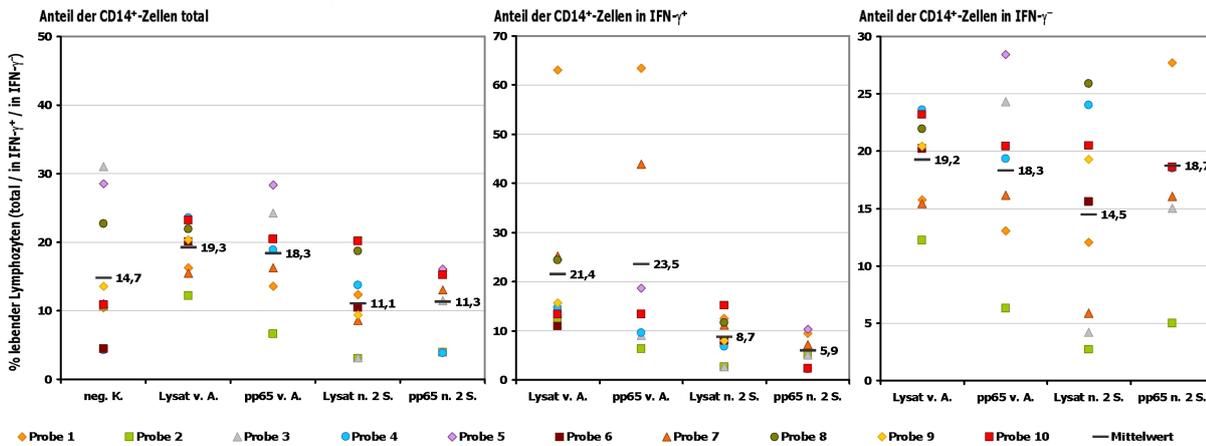


Abbildung 3.19: Verteilung der CD14⁺-Zellen nach Stimulation mit pp65 oder Lysat vor und nach Aufreinigung bezogen auf alle lebenden Zellen (links), auf lebende, IFN- γ -positive Zellen (mitte) und lebende, IFN- γ -negative Zellen (rechts); der schwarze Balken gibt den Mittelwert aus allen auswertbaren Proben an; neg. K. = unstimulierte Kontrollen; Lysat / pp65 v. A. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze vor Aufreinigung; Lysat / pp65 n. 2S. = Lysat bzw. pp65 stimulierte Ansätze nach Aufreinigung über 2 Säulen

Die Verteilung der CD14⁺-Zellen ist in Abb. 3.19 dargestellt. Die Mittelwerte vor Aufreinigung schwankten um maximal 4,6%, es wurden 14,7% CD14⁺-Zellen bezogen auf die lebenden Zellen in der Negativkontrolle, 19,3% im Lysat stimulierten Ansatz und 18,3% im pp65 stimulierten Ansatz gemessen. Nach Anreicherung befanden sich in der IFN- γ -positiven Population beim Lysat mehr CD14⁺-Zellen (mittleres Bild, 8,7%) als beim mit pp65 stimulierten Ansatz (5,9%).

3.6.7 Vergleich der Werte für IFN- γ -produzierende Zellen bei Sekretionstest und intrazellulärer Färbung

Beim Vergleich der Werte für die IFN- γ -produzierenden Zellen bei der Färbung auf CD3/CD4/CD8 bei Sekretionstest und intrazellulärer Färbung wurden nur die Proben einbezogen, für die spezifische Werte aus beiden Färbungen vorlagen (n = 4). Die Werte beziehen sich auf alle gemessenen Ereignisse, da bei der intrazellulären Färbung nicht zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden konnte. Nach Stimulation mit Lysat wurden im Mittel 1,1% der Zellen beim Sekretionstest und 1,9% der Zellen bei der

intrazellulären Färbung als IFN- γ -positiv gemessen, nach Stimulation mit pp65 im Mittel 0,8% beim Sekretionstest und 0,4% bei der intrazellulären Färbung. Die Anzahl der Proben ist zu klein, um verlässliche Aussagen zu den Abweichungen zwischen den beiden Messungen zu treffen.

3.6.8 Zusammensetzung der aufgereinigten Population

Population	Phänotyp	Mittelwert		Wertebereich	
		Lysat	pp65	Lysat	pp65
tote Zellen	7-AAD gefärbt	67,2%	64,3%	51,9% bis 85,8%	27,5% bis 90,7%
in lebenden Zellen:					
IFN- γ - positive	IFN- γ ⁺	57,9%	56,3%	24,1% bis 73,3%	21,8% bis 96,7%
CD4-T-Zellen	CD3 ⁺ CD4 ⁺	38,6%	40,2%	11,2% bis 61,3%	30,0% bis 56,9%
CD8-T-Zellen	CD3 ⁺ CD8 ⁺	9,4%	16,3%	2,8% bis 32,7%	5,9% bis 31,9%
NK-T	CD3 ⁺ CD56 ⁺	1,9%	2,8%	0,8% bis 5,5%	0,5% bis 6,3%
NK-Zellen	CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,9%	5,1%	0,2% bis 1,7%	0,4% bis 15,7%
B-Zellen	CD19 ⁺ CD20 ⁺	3,1%	8,1%	0,6% bis 5,1%	1,0% bis 19,8%
CD14-positive	CD14 ⁺	8,2%	9,6%	3,0% bis 13,8%	3,9% bis 15,8%
CD25-positive	CD25 ⁺	72,4%	83,6%	55,6% bis 90,1%	71,4% bis 90,4%
in der IFN-γ-positiven Population:					
CD4-T-Zellen	IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ CD4 ⁺	58,0%	54,3%	16,5% bis 86,2%	22,5% bis 79,9%
CD8-T-Zellen	IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ CD8 ⁺	14,9%	19,0%	2,9% bis 60,3%	5,7% bis 32,5%
NK-T	IFN- γ ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺	2,1%	3,6%	0,8% bis 5,4%	1,1% bis 6,4%
NK-Zellen	IFN- γ ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺	0,5%	5,8%	0,1% bis 1,6%	0,8% bis 17,5%
B-Zellen	IFN- γ ⁺ CD19 ⁺ CD20 ⁺	1,4%	10,3%	0,4% bis 3,6%	0,7% bis 36,0%
CD14-positive	IFN- γ ⁺ CD14 ⁺	7,4%	5,4%	2,7% bis 12,4%	2,2% bis 9,4%
CD25-positive	IFN- γ ⁺ CD25 ⁺	65,1%	89,2%	41,6% bis 90,8%	79,5% bis 97,0%
in der IFN-γ-negativen Population:					
CD4-T-Zellen	IFN- γ ⁻ CD3 ⁺ CD4 ⁺	12,4%	37,8%	8,0% bis 17,5%	18,2% bis 51,9%
CD8-T-Zellen	IFN- γ ⁻ CD3 ⁺ CD8 ⁺	6,0%	14,9%	1,3% bis 15,6%	3,0% bis 30,6%
NK-T	IFN- γ ⁻ CD3 ⁺ CD56 ⁺	1,5%	1,6%	0,2% bis 5,6%	0,1% bis 3,6%
NK-Zellen	IFN- γ ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺	1,6%	5,0%	0,3% bis 4,1%	0,3% bis 12,2%
B-Zellen	IFN- γ ⁻ CD19 ⁺ CD20 ⁺	5,8%	7,2%	0,9% bis 11,6%	2,7% bis 12,2%
CD14-positive	IFN- γ ⁻ CD14 ⁺	9,8%	16,5%	2,7% bis 24,0%	5,0% bis 27,7%
CD25-positive	IFN- γ ⁻ CD25 ⁺	81,1%	79,6%	59,4% bis 89,2%	51,0% bis 98,2%

Tabelle 3.37: Zusammensetzung der aufgereinigten Population: Mittelwerte aus den 5 Proben, die für beide Antigene auswertbar waren, bezogen auf alle lebenden Zellen (oben), auf die lebenden IFN- γ -positiven Zellen (mitte) und auf lebende, IFN- γ -negative Zellen (unten); neben der Population (ganz links) sind die zur Charakterisierung verwendeten Merkmale (Oberflächenmarker, Zytokinproduktion) angegeben; 7-AAD = lebend-tot Farbstoff

Nachdem für die T-Zellen einzelne Proben im Detail sowie für die T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen und CD14⁺-Zellen Werte aller auswertbaren Proben im Überblick gezeigt wurden, werden nun für die Zusammensetzung der aufgereinigten Population nur die Proben mit

einbezogen, bei denen für beide Antigene Werte vorhanden waren (Probe 1, 2, 3, 4 und 7), und die auch eine spezifische Aktivierung aufwiesen; d.h. Probe 10 wird nicht einbezogen, dort lag der Anteil der IFN- γ -positiven Zellen nach Abzug der Hintergrundaktivierung unter 0% nach Stimulation mit Lysat und bei 0,08% nach Stimulation mit pp65. In der Tabelle 3.37, S.179 sind die Mittelwerte sowie der Wertebereich für die verschiedenen Zellpopulationen angegeben.

Stimulationswirkung und Anreicherungsgrad waren bei beiden Antigenen im Mittel ähnlich, es wurden 57,9% (Lysat) und 56,3% (pp65) IFN- γ -positive Zellen in den Eluaten gemessen. Auch der Anteil an toten Zellen war mit 67,2% (Lysat) und 64,3% (pp65) vergleichbar. Den größten Anteil am Eluat nahmen bei beiden Antigenen die T-Zellen ein, dabei waren bezogen auf die IFN- γ -positive Population beim pp65 stimulierten Ansatz mit 54,3% weniger CD3⁺CD4⁺- aber mit 19,0% mehr CD3⁺CD8⁺-T-Zellen enthalten als nach Stimulation mit Lysat, wo 58,0% CD3⁺CD4⁺- und 14,9% CD3⁺CD8⁺-T-Zellen gemessen wurden. Anders verhielt es sich bei den übrigen betrachteten Zellpopulationen, hier zeigten sich in Abhängigkeit vom verwendeten Antigen deutliche Unterschiede. Die Abbildungen 3.20 und 3.21 visualisieren die Verteilung der Zellpopulationen.

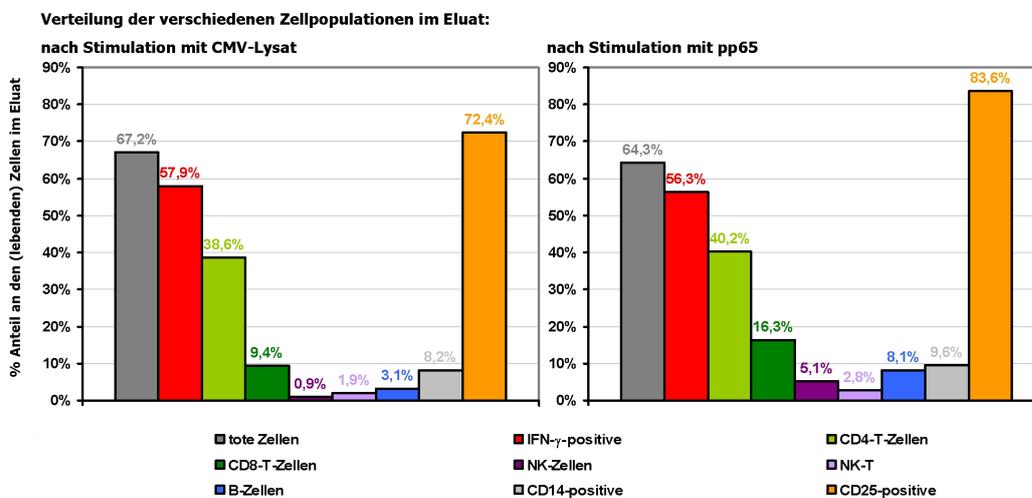
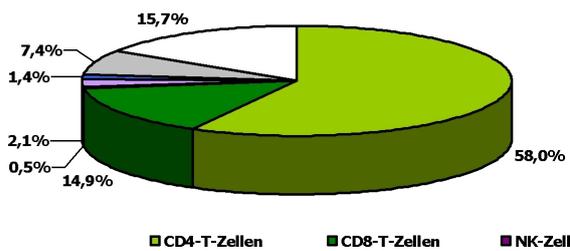


Abbildung 3.20: Zellpopulationen im Eluat: Mittelwerte aus den 5 Proben, die für beide Antigene auswertbar waren. Auf der Y-Achse sind die Anteile an den lebenden Zellen angegeben bzw. für die toten Zellen der Anteil an allen gemessenen Ereignissen; auf der X-Achse sind die verschiedenen Zellpopulationen aufgetragen: tote Zellen (dunkelgrau), IFN- γ -sezernierende Zellen (rot), CD3⁺CD4⁺-T-Zellen (hellgrün), CD3⁺CD8⁺-T-Zellen (dunkelgrün), NK-Zellen (lila), NK-T-Zellen (flieder), B-Zellen (blau), CD14⁺-Zellen (hellgrau) und CD14⁺-Zellen (orange). Der linke Graph zeigt die Werte nach Stimulation mit CMV-Lysat, der rechte nach Stimulation mit pp65.

Die Färbung auf CD25 zeigte, dass beim pp65-stimulierten Ansatz mehr aktivierte Zellen in der IFN- γ -positiven Population enthalten waren. CD25 (niedrig-affiner IL-2-Rezeptor, α -Kette) ist ein 55 kDa Glykoprotein, das auf aktivierten T- und B-Zellen sowie Monozyten / Makrophagen exprimiert wird, außerdem findet es sich auf (nicht aktivierten) regulatorischen CD4⁺-T-Zellen. Dieses Ergebnis passt zu den höheren Anteilen an B-Zellen in den pp65 stimulierten Ansätzen.

Im Vergleich zum mit CMV-Lysat stimulierten Ansatz sind im pp65-stimulierten Ansatz mit 5,1% deutlich mehr NK-Zellen enthalten, auch der Anteil an NK-T-Zellen war höher (vgl. Abb. 3.20). Auch der B-Zell-Anteil lag mit 8,1% im Vergleich zu 3,1% beim Ansatz mit pp65 höher. Noch deutlicher werden die Unterschiede, wenn man die IFN- γ -positiven Populationen (vgl. Abb. 3.21) betrachtet.

Verteilung der verschiedenen Zellpopulationen in der IFN- γ ⁺ Fraktion des Eluates:
nach Stimulation mit CMV-Lysat



nach Stimulation mit pp65

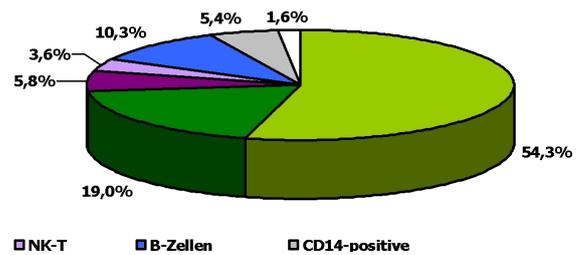


Abbildung 3.21: Zellpopulationen in der IFN- γ -positiven Fraktion im Eluat: Mittelwerte aus den 5 Proben, die für beide Antigene auswertbar waren. Die Teilstücke repräsentieren die CD3⁺CD4⁺-T-Zellen (hellgrün), CD3⁺CD8⁺-T-Zellen (dunkelgrün), NK-Zellen (lila), NK-T-Zellen (flüchtig), B-Zellen (blau), CD14⁺-Zellen (hellgrau) und CD14⁺-Zellen (orange). Links Werte nach Stimulation mit CMV-Lysat, rechts nach Stimulation mit pp65. Die weißen Bereiche zeigen die Differenz zu 100% bei Addition der Anteile aller gemessenen Zellpopulationen.

Bei pp65-stimulierten Ansätzen waren in der IFN- γ -positiven Population nach Aufreinigung über 2 Säulen mit 5,4% weniger CD14⁺-Zellen enthalten als bei CMV-Lysat stimulierten Ansätzen mit 7,4%. Dies kann ein Grund sein, warum bei den Vorversuchen ein höherer CD4⁺-Anteil in den CMV-Lysat stimulierten Ansätzen gefunden wurde. Auffällig ist auch, dass beim Lysat mehr der IFN- γ -positiven Population undefiniert blieb (weiße Bereiche), während beim pp65 (rechtes Diagramm) nur 1,6% undefiniert waren, wenn man alle Mittelwerte addiert.

Große Unterschiede zeigten sich im Gehalt an NK-, NK-T- und B-Zellen. Mit 8,1% im Vergleich zu 3,1% beim Lysat waren beim Ansatz mit pp65 mehr als doppelt so viele B-Zellen (blau) enthalten, der Anteil an NK-Zellen (lila) war mit 5,1% zu 0,9% mehr als fünfmal so hoch. Mit 1,9% beim Lysat und 2,8% beim pp65 wurden auch viele NK-T-Zellen gefunden. Insgesamt konnte die Zusammensetzung des Eluates gut charakterisiert werden. Allerdings wurden keine guten Anreicherungen von IFN- γ -positiven Zellen erreicht (im Mittel nur etwas über 55%).

3.7 Klonierung und Expression viraler Proteine des CMV in einem Baculovirussystem

3.7.1 Vorstellung der ausgewählten immunogenen CMV-Proteine

Anhand der Publikation von Sylwester *et al.* [41] wurden 8 immunogene Proteine bzw. die zugehörigen ORFs ausgewählt:

(1) *ul36* kodiert für Transaktivatoren, die die zelluläre und virale Transkription hochregulieren [68]. Es gehört zu den *immediate early*-Genen.

(2) *ul48* kodiert für ein 230 kDa Tegumentprotein. Es interagiert mit p180, einem humanen integralen Membranprotein im ER, diese Interaktion könnte eine Rolle beim Transport des Virus in der Zelle und beim Zusammenbau der Viruspartikel spielen [69].

(3) Das Genprodukt von *ul55* ist gB (Glykoprotein B), es wird spät im Infektionszyklus exprimiert. Als Modell zur Herstellung oral verabreichter Vakzine wurde UL55 in Pflanzensamen exprimiert [70]. Es spielt eine Rolle bei der Adhäsion an und dem Eindringen in die Zelle, desweiteren wird gB in HCMV-permissiven Zellen ins Trans-Golgi-Netzwerk transportiert, wo die Umhüllung des Virus stattfinden könnte [71].

(4) Im ORF von *ul83* wird pp65, das 65 kDa Phospho-Protein, kodiert, welches einen Großteil des Teguments ausmacht. pp65 gilt als das Hauptantigen des CMV, anhand des pp65-Gehaltes wird die Schwere einer CMV-Infektion gemessen. Kein anderes Protein des CMV ist hinsichtlich der Immunogenität so gut charakterisiert wie pp65. Für die verbreitetsten HLA-Typen sind an sie bindende Epitope aus dem pp65 bestimmt worden. Bei *in vitro* Stimulation führt es zu guten CD4⁺- und CD8⁺-T-Zell-Antworten, was durch die Kreuzpräsentation des Antigens ausgelöst wird. *In vivo* und bei Versuchen mit aktivem

Virus muss die Immunantwort allerdings früh im Replikationszyklus ausgelöst werden, sonst unterdrückt das CMV die Immunantwort [72].

(5) *ul86* kodiert für das *major capsid protein*. Es löst vor allem gute CD4⁺-T-Zell-Antworten aus [73].

(6) Das Produkt von *ul94* ist ein echtes *late* (spätes / spät exprimiertes) Gen - erkennbar daran, dass sein Produkt bei Inhibition der DNA-Replikation nicht detektiert werden kann - und kodiert für ein 36 kDa Protein [74]. Patienten mit systemischer Sklerose haben einen erhöhten Serumspiegel an UL94-spezifischem IgG [75].

(7) und (8) Die ORF *ul122* und *ul123* kodieren für die *immediatly early* Proteine IE-1 (UL123; 68 kDa) und IE-2 (UL122; 80 kDa), wobei die beiden Produkte durch unterschiedliches Spleißen entstehen. Gegen das 68 kDa IE-1 sind in seropositiven Personen ähnlich hohe Mengen an CD8⁺-T-Zellen vorhanden, wie gegen UL83 [76]. Es scheint auch 2 weitere, schwerere Proteine (91 und 102 kDa) zu geben, die von den ORFs UL122 und UL123 kodiert werden [77]. Hier wurden die beiden ORF *ul122* und *ul123* einzeln exprimiert.

3.7.2 Isolation viraler Gene mittels PCR

3.7.2.1 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial wurde von der AG Messerle, Institut für Virologie, MHH freundlicherweise ein künstliches CMV-Genom (BAC; engl. *bacterial artificial chromosom*) vom Stamm AD169 zur Verfügung gestellt [78], [79]. Bei dem verwendeten Konstrukt *pHG-1* fehlten die ORF *us2* bis *us6* und *ul1* bis *ul10*.

3.7.2.2 Kontrolle der PCR-Produkte

Die Beurteilung, ob die gesuchte DNA amplifiziert wurde, erfolgt zunächst über die Fragmentgröße in einem Agarosegel. Die erwarteten Fragmentgrößen sind in Tabelle 3.38 zusammengefasst.

Erwartete Fragmentgrößen	
Gen	Größe
UL36	1,4 kbp
UL48	6 kbp
UL55	2,8 kbp
UL83	1,7 kbp
UL86	4 kbp
UL94	1 kbp
UL122	1,2 kbp
UL123	1,4 kbp

Tabelle 3.38: Liste der erwarteten Banden für die CMV-cDNAs

Mit Hilfe der sequenzspezifischen Primer (vgl. 2.10.2.2.3, S. 103) konnten für alle gesuchten DNAs Nucleinsäurefragmente in der passenden Größe amplifiziert werden. Bei UL86 und UL48 gelang dies allerdings erst mit der *Phusion*-Polmerase. Abbildung 3.22 zeigt das Ergebnis einer PCR mit *Pfx*-Polymerase und 5 µl der 1. PCR als Ausgangsmaterial.

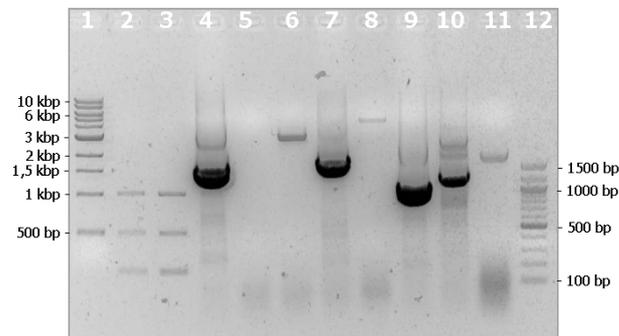


Abbildung 3.22: Kontrolle der PCR-Produkte nach 2. PCR-Schritt mit *Pfx* in präparativem 1% Agarosegel; Beladung der Spuren wie folgt: (1) 1 kbp-Leiter, (2) 20 ng 200 / 500 / 1000 bp Fragment, (3) 50 ng 200 / 500 / 1000 bp Fragment, (4) UL36, (5) UL48 (nicht vorhanden), (6) UL55, (7) UL83, (8) UL86, (9) UL94, (10) UL122, (11) UL123 und (12) 100 bp-Leiter; erwartete Größen siehe Tab. 3.38, S. 184

Die passenden Banden wurden ausgeschnitten und mittels Gelelution aufgereinigt, das Elutionsvolumen war 50 µl. Die aufgereinigten Nucleinsäuren wurden photometrisch quantifiziert. Es wurden folgende Mengen gewonnen:

Fragment	Konzentration
UL36	36,5 ng / μ l
UL48*	40,0 ng / μ l
UL55	39,7 ng / μ l
UL83	26,4 ng / μ l
UL86*	67,0 ng / μ l
UL94	63,0 ng / μ l
UL122	17,3 ng / μ l
UL123	30,0 ng / μ l

*mit *Phusion*-Polymerase zu einem späteren Zeitpunkt, alle übrigen mit *Pfx*

Die gewonnenen DNAs von UL36 (1 Intron) und UL123 (2 Introns) wurden in einen weiteren PCR-Schritt zur Heraustrennung der Introns bzw. zur Amplifikation der einzelnen Exons eingesetzt, die anderen (UL55, UL83, UL94, UL122) wurden nochmals hochamplifiziert. Da für eine Restriktionsspaltung und direkte Klonierung in den Vektor *pENTR1a* auch danach nicht genügend Material gewonnen worden war, wurde in *pCRblunt* zwischenkloniert (siehe 3.7.3, S. 186).

3.7.2.3 Gelisolation der cDNAs

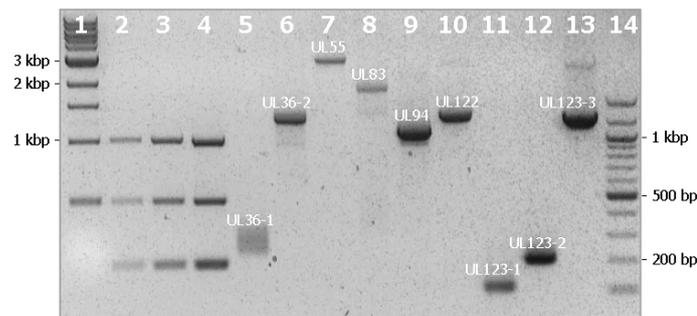


Abbildung 3.23: 1% Gel zur Kontrolle der Fragmente nach Gelelution; (1) 1 kbp-Leiter, (2) 20 ng 200 / 500 / 1000 bp Fragment, (3) 50 ng 200 / 500 / 1000 bp Fragment, (4) 100 ng 200 / 500 / 1000 bp Fragment, (5) UL36-1 (nicht in Ordnung), (6) UL-36-2, (7) UL55, (8) UL83, (9) UL94, (10) UL122, (11) UL123-1, (12) UL123-2, (13) UL123-3, (14) 100 bp-Leiter; 5 μ l Eluat pro Spur

Die Abb. 3.23 zeigt das Ergebnis der Gelelution zur Isolierung der Fragmente für die Klonierung in *pCRblunt*. Alle Banden hatten die erwartete Größe. Die PCR für UL36-1 wurde wiederholt, da statt einer scharfen Bande bei 220 bp eine breite, unscharfe Bande

sichtbar war, ein Phänomen, das für eine Degradation der DNA spricht. Es wurden folgende Mengen von den jeweiligen Fragmenten gewonnen:

Fragment	Konzentration	OD 260 / 280 nm
UL36-2	42,2 ng / μ l	1,65
UL55	18,9 ng / μ l	1,48
UL83	29,2 ng / μ l	1,51
UL94	71,6 ng / μ l	1,67
UL122	49,3 ng / μ l	1,65
UL123	38,1 ng / μ l	1,49
UL123	65,3 ng / μ l	1,60
UL123	105,1 ng / μ l	1,66

3.7.3 Klonierung in den Vektor pCRblunt und Sequenzierung

3.7.3.1 Ligation, Transformation und Auswahl positiver Klone

Für die Ligation in den Vektor *pCRblunt* wurden ca. 100 ng der cDNAs eingesetzt. Für UL36-1, UL48 und UL86 wurden 5 μ l PCR-Produkt ligiert. Jeweils 5 μ l der Ligationsansätze wurden in chemisch kompetente *E. coli Top10F* transformiert und auf selektiven Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden von jeder Platte mindestens 4 Klone in 3 ml LB-Medium überimpft und eine Plasmidisolierung durchgeführt. Die Einklonierung der CMV-cDNA-Fragmente wurde mittels PCR (mit M13-Primern) überprüft. Danach wurden die korrekten Plasmide neu transformiert und Plasmid für die Restriktionsspaltung und für Sequenzierung der Inserts isoliert.

Abb. 3.24 zeigt die erfolgreich klonierten und isolierten *pCRblunt*-Konstrukte. Alle Plasmide hatten die erwartete Größe und waren in ausreichender Menge und hoher Reinheit vorhanden, die OD 260 nm / 280 nm lag bei allen Proben zwischen 1,8 und 1,9. Im Folgenden sind die Konzentrationen der einzelnen Plasmide aufgelistet:

<i>pCRblunt</i> mit cDNA	Konzentration	OD 260 / 280 nm
UL36-1	438 ng / μ l	1,82
UL36-2	441 ng / μ l	1,82
UL48*	152 ng / μ l	1,88
UL55	409 ng / μ l	1,84
UL83	488 ng / μ l	1,83
UL86*	364 ng / μ l	1,87
UL94	234 ng / μ l	1,81
UL122	460 ng / μ l	1,85
UL123-1	396 ng / μ l	1,82
UL123-2	270 ng / μ l	1,84
UL123-3	326 ng / μ l	1,84

*zu einem späteren Zeitpunkt kloniert

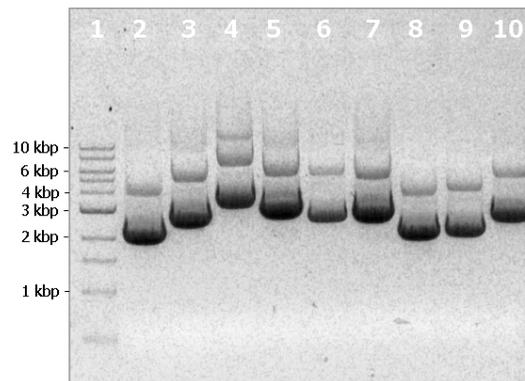


Abbildung 3.24: 0,8% Kontrollgel der *pCRblunt*-CMV-cDNA-Konstrukte; (1) 1 kbp-Leiter, (2) UL36-1, (3) UL-36-2, (4) UL55, (5) UL83, (6) UL94, (7) UL122, (8) UL123-1, (9) UL123-2, (10) UL123-3; 5 μ l Eluat pro Spur

3.7.3.2 Sequenzierung der integrierten cDNAs

Nachdem die Sequenzierung der Konstrukte im Vektor *pENTR1a* (vgl. 3.7.4) erfolglos war, wurden die *pCRblunt* Plasmide zur Sequenzierung geschickt, dabei wurden die die MCS flankierenden M13-Primer genutzt. Für größere Fragmente wurden weitere Primer innerhalb der cDNA erstellt (vgl. 2.10.3.2.5, S. 108), die erhaltenen Sequenzen überlappten um ca. 100 bp. Die Sequenzierungsergebnisse wurden mit den bekannten Sequenzen des Vektors, der Primer und der CMV-cDNA unter Verwendung des Programms *ClustalW* verglichen.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

UL36cDNA+Primer      -----ATCCGGTACC 10
UL36-1Seq_FP        GATGCATGCTNGAGCGGCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCAGAATTCAGGATCCGGTACC 60
                                     *****

UL36cDNA+Primer      ATGAAAACCTGTACTTCCAAGGCATGGACGACCTACGGGACACGCTGATGGCCTACGGCT 70
UL36-1Seq_FP        ATGAAAACCTGTACTTCCA-----TGGACGACCTACGGGACACGCTGATGGCCTACGGCT 115
*****
    
```

Abbildung 3.25: Sequenzierungsergebnis von UL36-1 (Ausschnitt): Die Sequenzierung zeigte eine Deletion von 5 Basen

Bei UL48 entsprach der einklonierte Bereich nicht der gesuchten CMV-DNA, obwohl die Größe des einklonierten Fragmentes passte. Bei UL36 gab es eine Deletion von 5 Basen (vgl. Abb. 3.25), die zu einem *frame shift* (Leserasterverschiebung) führte, damit war dieses Konstrukt unbrauchbar.

Insgesamt konnten für UL55, UL83, UL86, UL94, UL122 und UL123 erfolgreich cDNAs in den Vektor *pCRblunt* einkloniert werden. Die Sequenzierungen decken für einen Strang die gesamte Länge der jeweiligen Konstrukte (cDNA, TEV-Schnittstelle, RE-Schnittstelle) ab, es wurden keine Abweichungen zu den Referenzsequenzen gefunden.

3.7.4 Restriktionsspaltung und Klonierung in den Vektor pENTR1a

3.7.4.1 Restriktionsspaltung

Der Vektor *pENTR1a* und die Konstrukte in *pCRblunt* wurden mit den entsprechenden RE-Kombinationen gespalten (vgl. 2.10.4.3.3, S. 113). Anschließend wurden die entstandenen Fragmente in einem Agarosegel aufgetrennt, die zur gesuchten Fragmentgröße korrespondierenden Banden ausgeschnitten und mittels Gelelution aufgereinigt. Abb. 3.26 zeigt das präparative 1% Gel vor und nach Ausschneiden der Banden. Für die Fragmente UL36-1 und UL123-1 sowie UL123-2 wurde ein 2% Gel verwendet. Die Gele zu UL48 und UL86 werden nicht gezeigt, obwohl hier Banden mit korrekter Größe gewonnen wurden. Die spätere Sequenzierung zeigte jedoch, dass es sich bei UL48 nicht um die gesuchte CMV-DNA handelte (siehe 3.7.3.2, S. 187). UL86 konnte nicht erfolgreich in den Expressionvektor rekombiniert werden (siehe 3.7.5, S. 190).

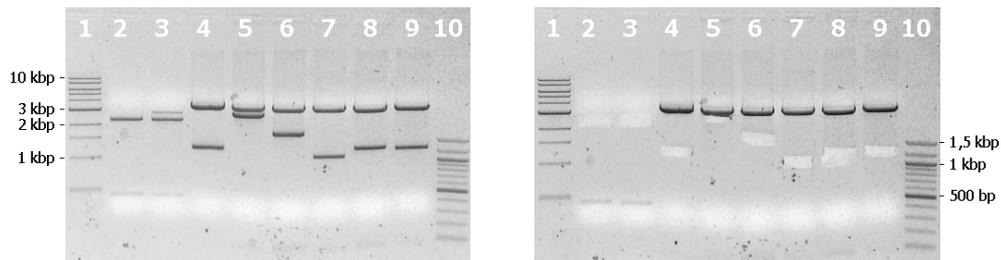


Abbildung 3.26: Präparatives 1% Gel nach RE-Spaltung, links vor und rechts nach Ausschneiden der Banden; (1) 1 kpb-Leiter, (2) *pENTR1a*, RE-Kombination 1, (3) *pENTR1a*, RE-Kombination 2, (4) UL36-2, (5) UL55, (6) UL83, (7) UL94, (8) UL122, (9) UL123-3, (10) 100 bp-Leiter; 50 µl RE-Spaltung pro Spur

Der Vektor *pENTR1a* ist ca. 2,7 kbp groß, der Vektor *pCRblunt* 3,5 kbp. Der Vektor *pENTR1a* wurde mit RE-Kombination 2 unvollständig gespalten, jedoch linearisiert, eine zusätzliche Bande bei ca. 2,7 kbp (Spur 3) ist sichtbar. Nach dem Ausschneiden der CMV-cDNAs ergaben sich bei allen Ansätzen zum linearisierten Vektor *pCRblunt* passende Banden zwischen 3 und 4 kbp. Die ausgeschnittenen und über Gelelektion aufgereinigten Fragmente hatten eine Konzentration von 17 bis 37 ng pro Mikroliter.

3.7.4.2 Ligation, Transformation und Auswahl positiver Klone

Für die Ligation wurden jeweils 6 µl cDNA und 3 µl Vektor eingesetzt. 10 µl dieser Ligationsansätze wurde in chemisch kompetente Zellen transformiert. Nach Anzucht auf selektiven Platten wurden mit positiven Klonen Schüttelkulturen zur Plasmidgewinnung angeimpft. Die isolierten Plasmide wurden durch PCR mit den CMV-sequenzspezifischen Primern auf das korrekte Insert hin überprüft, es wurden je 100 ng Plasmid eingesetzt (PCR-Bedingungen wie unter 2.10.2.3.2, S. 106). Das Ergebnis der PCR auf wurde auf einem Agarosegel überprüft (siehe Abb. 3.27).

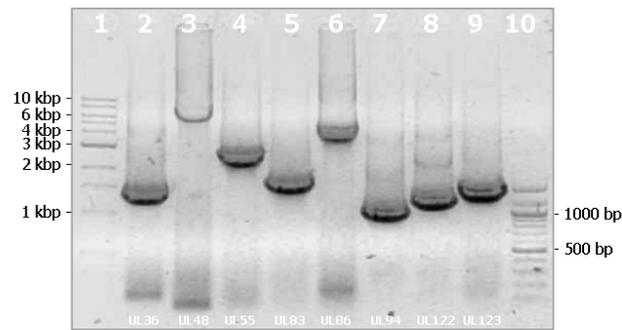


Abbildung 3.27: Qualitatives 1% Gel zur Kontrolle der PCR auf *pENTR1a*-Konstrukte; (1) 1 kbp-Leiter, (2) UL36, (3) UL48, (4) UL55, (5) UL83, (6) UL86, (7) UL94, (8) UL122, (9) UL123-3, (10) 100 bp-Leiter; 5 μ l PCR-Produkt pro Spur

Alle erhaltenen Fragmente hatten die Größe der gesuchten cDNAs (vgl. Tab. 3.38). Mit den durch Sequenzierung (vgl. 3.7.3.2, S. 187) als korrekt bestätigten Konstrukten wurde weiter gearbeitet, die Neuklonierung der anderen wurde aus Zeitgründen zurückgestellt.

3.7.5 Rekombination in den Vektor *pDest20* und Transformation in *E. coli* DH10Bac

Die DNA zu UL55, UL83, UL94, UL122 und UL123 wurde aus *pENTR1a* in *pDest20* rekombiniert, es wurden jeweils etwa 200 ng Vektor eingesetzt. Der gesamte Rekombinationsansatz wurde in chemisch kompetente *E. coli* DH10Bac transformiert. Positive Klone wurden durch Anzucht auf Platten mit IPTG und X-Gal (Blau-Weiß-Selektion; vgl. 2.10.6.1, S. 115) identifiziert.

Zur Kontrolle wurden mindestens 5 weiße Kolonien auf einer neuen Platte ausgestrichen. Die Platten wurden zur Verdeutlichung einer möglichen Blaufärbung 2 h im Kühlschrank inkubiert. Von jedem Klon wurde außerdem ein Kontrollausstrich auf einer Agarplatte mit Chloramphenicol (Chl) gemacht, bei erfolgreicher Rekombination geht die Chl-Resistenz verloren. Außer für UL86 (nach längerer Zeit Blaufärbung, 3 von 5 wuchsen auf Chl-Platten) wurden für alle Konstrukte mindestens 3 korrekte Klone erhalten.

3.7.6 Herstellung und Aufreinigung von Bacmiden für die Transfektion

Die im Bacmid enthaltenen cDNAs wurden nochmals mit PCR überprüft, dazu wurde das Bacmid 1 : 100 verdünnt und in eine PCR mit sequenzspezifischen Primern eingesetzt. Abb.3.28 zeigt das Kontrollgel zur PCR.

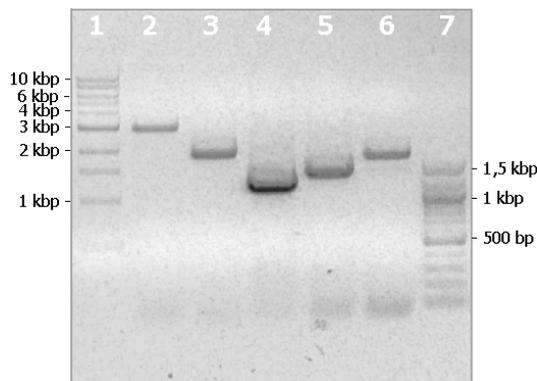


Abbildung 3.28: Kontrolle der Bacmide mit PCR; (1) 1 kbp-Leiter, (2) UL55, (3) UL83, (4) UL94, (5) UL122, (6) UL123, (7) 100 bp-Leiter; es wurden jeweils 2 μ l 1 : 100 verdünntes Bacmid in die PCR eingesetzt; pro Spur wurden 5 μ l PCR-Produkt aufgetragen; gesuchte Fragmentgrößen siehe 3.38, S. 184

Für die Transfektion wurden die Bacmide frisch angeimpft und isoliert. Reinheit und Konzentration wurden photometrisch abgeschätzt, dabei ergaben sich folgende Werte:

<i>pCRblunt</i> mit cDNA	Konzentration	OD 260 / 280 nm
Bacmid mit UL55	2327 ng / μ l	1,94
Bacmid mit UL83	3542 ng / μ l	1,99
Bacmid mit UL94	2468 ng / μ l	2,01
Bacmid mit UL122	2736 ng / μ l	1,98
Bacmid mit UL123	2226 ng / μ l	2,02

vorhandenes Gesamtvolumen: je 50 μ l

Die Ausbeute an Bacmid war bei allen Ansätzen ausreichend (für die Transfektion wird pro Ansatz ca. 1 μ g benötigt).

3.7.7 Herstellung von Virusüberständen für die Infektion

3.7.7.1 Transfektion

Es wurden jeweils ca. 1 µg Bacmid mit 2 µl und 5 µl Cellfectin komplexiert und *Sf9* damit transduziert. Nach 48 h waren deutliche Anzeichen einer Infektion an den Zellen erkennbar, die Zellgröße veränderte sich, es tauchten stark granuläre Zellen auf. Nach 72 h waren deutliche Unterbrechungen im Zellrasen sichtbar, viele Zellen lösten sich ab. In diesem Stadium wurde der erste Virusüberstand geerntet.

3.7.7.2 Expressionstest

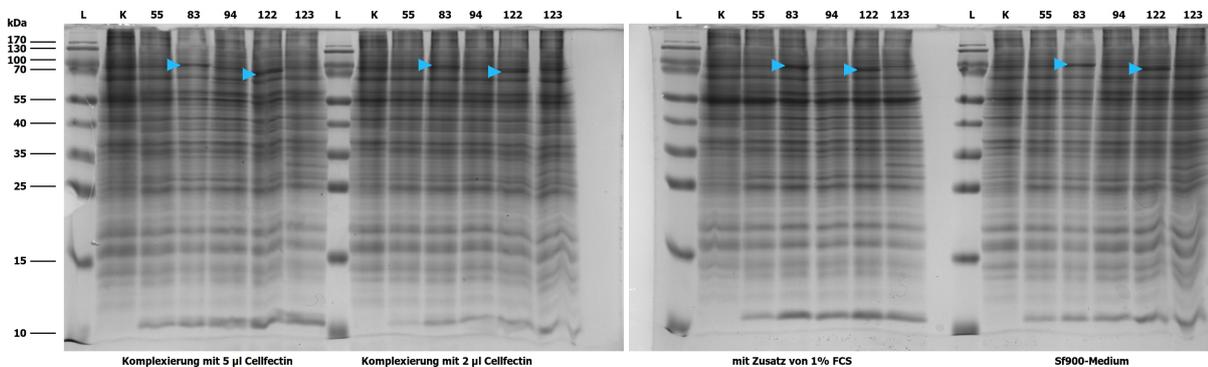


Abbildung 3.29: Kontrollgele nach Expressionstest mit den Virusüberständen aus der Transfektion; von links nach rechts: L = Leiter, K = Kontrolle: uninfierte *Sf9*, UL55, UL83, UL94, UL122, UL123; pro Spur wurden 10 µl der Proben aufgetragen; die Position der Expressionbanden wird durch die blauen Pfeile gekennzeichnet

Für den Expressionstest wurden wie unter 2.10.8.3.2, S. 122 beschrieben Zellen vorbereitet und mit den verschiedenen Virusüberständen getestet. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und mit PAGE analysiert. Die erwarteten Größen waren, ausgehend von der Länge der cDNAs, ohne Berücksichtigung von Modifikationen der Proteine und unter Addition der GST für UL55 ca. 130 kDa, für UL83 ca. 100 kDa, für UL94 ca. 65 kDa, für UL122 ca. 70 kDa und für UL123 ca. 82 kDa. Im Vergleich mit uninfierten *Sf9* konnten bei UL83 und UL122 Expressionbanden nachgewiesen werden. Abb. 3.29 zeigt das Ergebnis der PAGE.

Neben den Extrabanden in den Spuren mit UL83 und UL122 waren außer bei der Negativkontrolle etwas über 25 kDa zusätzliche Banden in allen Gelen erkennbar. Außer UL83

und UL122 wurde in allen infizierten Ansätzen auch das 28 kDa große GST exprimiert, die entsprechenden Banden waren im Gel sichtbar. Die unterschiedlichen Transfektions- und Kulturbedingungen ergaben keine sichtbaren Unterschiede für die Expression.

3.7.7.3 Herstellung von größeren Virusüberstandvolumina

Um eine größere Ausgangsmenge an Virusüberstand zur Verfügung zu haben, wurde zunächst eine Transfektion in größerem Maßstab durchgeführt, dabei wurden 8×10^6 *Sf9* mit Komplexierungsansätzen aus 15 μ l DNA und 40 μ l Cellfectin in 75 cm² Flaschen transduziert. Nach 72 h wurden bei deutlichen morphologischen Anzeichen von Infektion und Zellyse jeweils 10 ml Virusüberstand geerntet. Ausgehend von diesen Überständen wurden nach und nach größere Volumina infiziert, bis ca. 25 ml Virusüberstand vorhanden waren. Mit diesen Überständen wurde ein Expressionstest durchgeführt, um abzuschätzen, ob genügend Virus zur Infektion der 200 ml Suspensionkulturen enthalten war. Dabei zeigte sich, dass bei einer Zelldichte von 1×10^6 pro 1 ml 10% (v/v) Virusüberstand ausreichten, um eine Expressionsbande bei UL83 und UL122 zu erhalten.

3.7.8 Proteinaufreinigung

Zunächst wurde eine Aufreinigung der Proteine unter milden Bedingungen versucht, da bei der späteren Verwendung der Proteine zur Stimulation von PBMNCs die Zugabe von Fremdstoffen möglichst gering bleiben soll. Allerdings zeigte sich bei der Analyse der Einzelaktionen mittels PAGE, dass die Zielproteine nicht an die GST-Agarose gebunden wurden, sondern mit den Zelltrümmern assoziiert blieben.

Aus Zeitgründen konnte die Aufreinigung der Proteine im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr optimiert werden, wäre aber prinzipiell mit den vorhandenen Konstrukten möglich, wenn eine Anpassung des Aufreinigungsverfahrens an schwer lösliche Proteine oder *inclusion bodies* erfolgt.

4 Diskussion

4.1 Quantifizierung CMV-erkennender T-Zellen mit Tetrameren

4.1.1 Anwendbarkeit der Tetrameranalyse bei Patienten nach HSCT

Mit den derzeit verwendeten Tetrameren konnten 88,2% aller Patienten nach HSCT (engl. *hematopoietic stem cell transplantation*) untersucht werden. Mit funktionellen Tests könnte das gesamte Patientenaufkommen abgedeckt werden, wenn das entsprechende Antigen zur Verfügung steht. Im Fall von CMV würde das den Einsatz von CMV-Lysat bedeuten, denn pp65 führt in Abhängigkeit vom HLA-Typ nicht bei allen Personen zu einer Aktivierung von virusspezifischen T-Zellen. Die Herstellung neuer rekombinanter MHC-Moleküle ist also nur ein Teil des Problems, wenn eine noch größere Abdeckung mit Tetrameren erreicht werden soll. Es müssen zudem die passenden Epitope miteinbezogen werden.

4.1.2 Überwachung der CMV-spezifischen Immunrekonstitution nach HSCT

4.1.2.1 Erweiterte Überwachung der Immunrekonstitution mit Tetrameren

Die Immunphänotypisierung der Patienten gibt nur wenig Aufschluss über die virusspezifische Rekonstitution der Immunantwort. Hier kamen MHC-I-Peptid-Komplexe (Tetramere) mit CMV-Epitopen zum Einsatz, um engmaschig alle Patienten nach HSCT auf die Entwicklung der virusspezifischen Immunität zu untersuchen. Wie sich zeigte, kann der Anteil an virusspezifischen T-Zellen sehr unterschiedlich sein. Die Frage, wieviele CMV-spezifische T-Zellen vorhanden sein müssen, um tatsächlich Schutz vor einer

Virusreaktivierung zu bieten, ist noch nicht restlos geklärt. Patienten mit vielen T-Zellen können trotzdem CMV reaktivieren und Patienten mit wenigen T-Zellen können erhebliche Mengen an CMV-bindenden T-Zellen aufweisen (vgl. 3.1.3.1, S. 137). Die Messung pp65-positiver Leukozyten zeigt zwar eine CMV-Reaktivierung und ihre Schwere, aber kombiniert man diese und die Tetramermessung sind genauere Aussagen möglich. Zeigt sich z. B. nach der Reaktivierung keine Expansion der Tetramer-bindenden T-Zellen, so sind weitere Reaktivierungen wahrscheinlich. Für solche Patienten könnte dann frühzeitig z. B. ein adoptiver Transfer von CMV-T-Zellen geplant werden. Die im Rahmen dieser Arbeit etablierte Bestimmung der CMV-bindenden T-Zellen ist reproduzierbar, schnell und einfach durchführbar (Ergebnisse wenige Stunden nach Blutentnahme), deckt einen Großteil des Patientenaufkommens ab und kann somit – vor allem in Kombination mit funktionellen Tests und durch Korrelation mit klinischen Daten – eine wertvolle Ergänzung zur üblichen Überwachung der Immunrestitution nach HSCT sein, die auch in die Behandlung (Medikation, Intervall der pp65-Bestimmung etc.) miteinbezogen werden kann.

4.1.2.1.1 Seropositive Patienten mit seropositiven Spendern

Die R⁺ / D⁺-Gruppe ist allgemein weniger durch rezidivierende CMV-Reaktivierungen bedroht. 39% der Patienten in dieser Gruppe reaktivierten CMV, 4% reaktivierten zweimal. Die Patienten waren entweder schon früh nach Transplantation durch CMV-bindende T-Zellen geschützt, oder entwickelten nach einer CMV-Reaktivierung wieder eine CMV-spezifische Immunantwort.

Der vorgestellte Patient UPN1482 ist ein gutes Beispiel dafür, dass die Beobachtung der Immunrestitution durch Bestimmung der CD3-, CD4-, und CD8-positiven Zellen allein im Hinblick auf die Reconstitution der virusspezifischen Immunität nicht aussagekräftig ist. Dabei kann keine Aussage über den Anteil der virusspezifischen Zellen an den T-Zellen getroffen werden. Dieser Patient hatte nach Transplantation zunächst nur wenige CMV-bindende CD3⁺CD8⁺-T-Zellen, nachdem an Tag +40 eine CMV-Reaktivierung stattfand, stieg die Anzahl der CMV-bindenden CD3⁺CD8⁺-T-Zellen stark an und diese konnten im weiteren Verlauf zur Kontrolle des CMV beitragen. Zeitweise machten die CMV-bindenden CD3⁺CD8⁺-T-Zellen dabei ein Viertel aller CD3⁺CD8⁺-T-Zellen des Patienten aus (Tag +58, 25,1% CMV-bindende).

Allgemein zeigt sich in der R⁺ / D⁺-Gruppe eine frühe Reconstitution der CMV-bindenden Zellen. Die Proliferation der CMV-bindenden Zellen kann in Folge einer CMV-

Reaktivierung stattfinden, aber auch ein früher Schutz vor CMV ist möglich. Patienten dieser Gruppe, bei denen eine deutliche Proliferation der Zellen (mit oder ohne CMV-Reaktivierung) nachgewiesen werden kann, bedürfen eventuell weniger Vorsorge (z. B. pre-emptive Behandlung mit Medikamenten, pp65-Nachweis) gegen CMV-Reaktivierungen.

4.1.2.1.2 Seropositive Patienten mit seronegativen Spendern

In der R^+ / D^- -Gruppe treten häufiger rezidivierende CMV-Reaktivierungen auf. Die CMV-spezifische Immunantwort des Patienten wird im Zuge der Konditionierung zerstört, die transfundierten Spenderzellen sind mit dem Antigen noch nicht in Kontakt gekommen, es muss erst eine neue Immunisierung der Spender-T-Zellen gegen CMV erfolgen. Diese *in vivo* Immunisierung kann längere Zeit in Anspruch nehmen, so dass es meist zur Reaktivierung von CMV kurz nach Transplantation kommt, auch rekurrente Reaktivierungen sind möglich. Dies zeigte sich auch in der hier vorgestellten Patientenkohorte: mehr als 60% (6 von 9) Patienten der R^+ / D^- -Gruppe reaktivierten CMV. Bei UPN1528 konnte die *in vivo* Immunisierung beobachtet werden, sie dauerte bei diesem Patienten bis weit nach Tag +100. Der Patient hatte 3 CMV-Reaktivierungen, erst an Tag +150 entwickelte sich eine CMV-spezifische Immunantwort. Der vorhandene *mismatch* könnte die Entwicklung der Immunantwort noch weiter verzögert haben, die Immunsuppression nach HSCT im Sinne der GvHD-Prophylaxe bzw. im Rahmen der Therapie einer GvHD spielt hier ebenso eine Rolle – bei vorhandenem *mismatch* wird stärker immunsupprimiert. Auch die Beendigung der Immunsuppression hat einen Einfluss auf die Erhöhung der CMV-spezifischen Immunantwort – dies konnte nach dem adoptiven Transfer in UPN1238 beobachtet werden. Die Chimärismusanalyse zeigte, dass UPN1528 100% Spenderanteil im peripheren Blut hatte, somit sollten keine oder nur sehr wenige Empfänger-T-Zellen vorhanden sein. Bei einigen Patienten könnte man den Anstieg der CMV-bindenden T-Zellen auch auf verbliebene Empfängerzellen zurückführen, welche die Konditionierung überlebt haben [80], gerade wenn sehr früh nach HSCT CMV-bindende Zellen messbar sind. So hatte UPN1457 bereits an Tag +43 59 CMV-bindende $CD3^+ CD8^+$ -T-Zellen, die erste CMV-Reaktivierung fand an Tag +23 statt. Der Patient hatte im Chimärismus zunächst 100% Spenderanteil, an Tag +75 sank er allerdings auf 91% und an Tag +105 auf 56% ab (Rezidiv). Einerseits könnten CMV-spezifische Empfängerzellen in sehr geringer Anzahl überlebt und im Zuge der Reaktivierung proliferiert haben. Andererseits war in diesem Fall vielleicht auch die *in vivo* Immunisierung der Spenderzellen schneller, weil hier im Gegensatz zu dem bereits erwähnten Patienten UPN1528 ein HLA-identisches Spender-Empfänger-Paar vorlag.

Die Tetramermessungen bestätigen hier das klinische Bild: in der R^+ / D^- -Gruppe gibt es häufiger (rekurrente) CMV-Reaktivierungen auch weit nach Tag +100, weil die *in vivo* Immunisierung der Spenderzellen Zeit braucht. Zeigt sich bei einem Patienten der R^+ / D^- -Gruppe nach einer CMV-Reaktivierung keine Proliferation von CMV-bindenden T-Zellen, so sind weitere Reaktivierungen wahrscheinlich und der Patient sollte engmaschig auf Reaktivierungen hin untersucht werden.

4.1.2.1.3 Seronegative Patienten mit seropositiven Spendern

In der R^- / D^+ -Gruppe treten seltener CMV-Reaktivierungen auf. Dennoch ist für einen CMV-seronegativen Patienten ein seronegativer Spender zu bevorzugen [65]. In der vorgestellten Patientenkohorte reaktivierte einer von 8 Patienten dieser Gruppe CMV. Bei den übrigen fand keine CMV-Reaktivierung statt. Allerdings wurden nur sehr wenige CMV-bindende Zellen detektiert, bis Tag +150 waren bei keinem der Patienten mehr als 5 Zellen messbar. Dies kann zum einen daran liegen, dass ohne eine CMV-Reaktivierung keine ausreichende Stimulation der CMV-T-Zellen stattfindet und diese daher auch nicht proliferieren. Ebenso ist es möglich, dass entweder schon so wenige Zellen einen Schutz vermitteln oder für die nicht messbaren HLA-Typen eine ausreichende Anzahl an CMV-T-Zellen vorhanden war, um eine Reaktivierung zu verhindern. Für die Beobachtung der CMV-spezifischen Immunkonstitution in dieser Gruppe, aber auch zur Verbesserung der Aussagekraft bei allen übrigen Patienten, könnte an den Tagen +50, +100 und +150 routinemäßig ein funktioneller Test mit CMV-Lysat als Antigen durchgeführt werden.

4.1.2.1.4 Seronegative Patienten mit seronegativen Spendern

In der R^- / D^- -Gruppe sind keine CMV-Reaktivierungen zu erwarten. Patient UPN1491 hatte dennoch eine CMV-Infektion, hier handelte es sich wahrscheinlich um eine Neuinfektion. Vor Transplantation wurden sowohl Spender als auch Empfänger wie üblich auf CMV-IgG (Immunisierung) und CMV-IgM (laufende Infektion) untersucht und aufgrund fehlender CMV-Antikörper als CMV-seronegativ eingestuft. Nachdem an Tag +42 bei UPN1491 die CMV-Infektion anhand der pp65-positiven Leukozyten detektiert wurde, konnten bereits eine Woche später an Tag +49 CMV-bindende T-Zellen nachgewiesen werden. Dies zeigt, dass sich (bei HLA-identen Spender-Empfänger-Paaren) schnell eine CMV-spezifische Immunantwort entwickeln kann.

4.1.2.1.5 Besonderheiten bei nicht HLA-identen Spender-Empfängerpaaren

Für den GvL-Effekt ist ein nicht HLA-identer Spender zwar von Vorteil, aber jede Form von *mismatch* erhöht nicht nur das GvHD-Risiko, sie verzögert anscheinend auch die CMV-spezifische Immunantwort. Dies ist neben der gestörten Kommunikation von T-Zellen und APC auch in der höheren Immunsuppression begründet, die Patienten mit nicht HLA-identem Spender erhalten – z. B. führt ATG zu einer Entfernung der T-Zellen aus dem Empfänger, aber auch aus dem Transplantat, damit sind nur noch wenige T-Zellen vorhanden. Unter den hier vorgestellten Patienten konnte bei mehreren beobachtet werden, dass bei nicht HLA-identem Spender die Entwicklung der CMV-spezifischen Immunantwort lange dauert. Desweiteren zeigte sich, dass eventuell sogar funktionelle CMV-T-Zellen durch den vorliegenden *mismatch* nicht protektiv sind. So hatte z. B. UPN1506 (AML; MUD, *mismatch* in HLA-A; Rezidiv Tag +44; verstorben Tag +144; 1 passendes Tetramer) 3 Reaktivierungen, obwohl schon an Tag +47 1 CMV-bindende und Tag +58 3 CMV-bindende CD3⁺CD8⁺-T-Zellen detektiert wurden. Es kam jedoch im Zuge der CMV-Reaktivierungen nicht zu einer Proliferation dieser Zellen. Kommt es zu einer GvHD, unterdrückt die zur Behandlung gegebene Immunsuppression auch die Funktion der CMV-bindenden T-Zellen: Nachdem UPN1329 zur Behandlung eines Rezidivs DLIs erhalten hatte, entwickelte sich eine GvHD. Obwohl CMV-bindende Zellen vorhanden waren und *in vitro* auch IFN- γ -produzierende Zellen nach Stimulation mit pp65 nachgewiesen wurden, reaktivierte UPN1329 unter Immunsuppression CMV. Ungünstig schien sich der *mismatch* auch bei UPN1627 auszuwirken, es wurden CMV-bindende Zellen nachgewiesen, im Zuge der CMV-Reaktivierung proliferierten diese sogar, die pp65-Werte stiegen jedoch gleichzeitig weiter an. Obwohl *in vitro* sowohl IFN- γ -produzierende als auch zytotoxische (CD107a-Test) CD3⁺CD8⁺-T-Zellen nachgewiesen werden konnten, kam es *in vivo* nicht zu einer Kontrolle der CMV-Reaktivierung durch diese Zellen, sie konnte aber mit Ganciclovir behandelt werden.

4.1.2.2 Chimärismusuntersuchungen

Bei den Tetramermessungen zeigten sich bei einigen Patienten interessante Details in der CMV-spezifischen Immunrekonstitution. So gab es in R⁺/D⁻-Gruppe Patienten, die schon früh nach HSCT CMV-spezifische Zellen hatten, während bei anderen die CMV-spezifische Immunrekonstitution bis weit nach Tag +100 dauerte. Teilweise konnten bei Färbung mit einem einzelnen Tetramer unterschiedlich stark angefärbte Popu-

lationen (Doppelwolken) beobachtet werden. Diese Doppelwolken können aus verschiedenen Gründen entstehen. Sie weisen zunächst auf eine unterschiedliche Anfärbung der T-Zellen mit dem Tetramer hin. Es ist diskutierbar, dass solche Doppelwolken auch auf zwei unterschiedliche Populationen der CMV-spezifischen T-Zellen hinweisen könnten. Um dies genauer zu klären, wäre es notwendig, genauere Untersuchungen der Tetramer-bindenden Zellen durchzuführen. Betrachtet man die Veränderungen in der Anzahl der CMV-bindenden T-Zellen nicht nur in der Summe, sondern für jedes passende Tetramer einzeln, zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen HLA-Typen. Bei Patienten, deren Zellen mit mehreren Tetrameren messbar waren, wechselte z. T. auch das Tetramer, mit dem die meisten CMV-bindenden Zellen detektiert wurden. In der R⁺ / D⁻-Gruppe könnte dies einen Wechsel zwischen Spender- und Empfänger-vermittelter CMV-Immunität anzeigen – sofern CMV-spezifische Empfänger-T-Zellen nach der Konditionierung vorhanden bleiben.

Um festzustellen, ob im Patienten verbliebene CMV-T-Zellen einen Schutz vor CMV vermitteln können [80] und später von den CMV-spezifischen Spenderzellen ersetzt werden, könnten in weiteren Untersuchungen die CMV-bindenden CD3⁺CD8⁺-T-Zellen mittels immuno-magnetischer Aufreinigung oder durch *cell sorting* isoliert und ein Chimärismus für diese spezielle Population erstellt werden. Dies ist besonders im Hinblick auf die R⁺ / D⁻-Gruppe interessant, wo z. T. frühe Immunantworten gegen CMV beobachtet werden konnten.

4.1.2.3 Anwendungen der Tetramermessung und Vergleich mit anderen Tests

Da die Tetramermessung schnell und einfach durchführbar sowie gut reproduzierbar ist [81] und interessante Daten liefern kann [82], werden Tetramere und ähnliche Reagenzien (wie Pentamere, Streptamere) vielfach zur Quantifizierung von CMV-bindenden T-Zellen eingesetzt. Dabei bieten Streptamere zusätzlich die Möglichkeit, die gebundenen Zellen anzureichern und hinterher die gebundenen Streptamere wieder abzuspalten – die Möglichkeit, das Reagenz einfach auszuwaschen, ist ein Vorteil für klinische Applikationen. Die Problematik, dass nur CMV-bindende Zellen quantifiziert werden, über deren Funktion nichts gesagt werden kann, bleibt aber ein zentrales Problem dieser Nachweismethode. Daher werden vielfach funktionelle Test hinzugezogen [35]. Ein weiteres Problem liegt im Design der Tetramere an sich: die gebundenen Epitope werden nach Affinität zum MHC-Molekül, nicht zwangsläufig nach Immundominanz der einzelnen Epitope ausgesucht.

Beim Vergleich von ELISPOT, intrazellulärer Färbung auf IFN- γ und Tetramermessung zeigten Hobeika *et al.* [83], dass die Tests in Bezug auf die Quantifizierung vergleichbar in Genauigkeit und Spezifität sind, zumindest bei HLA-A*02 positiven Proben, die mit dem NLVPMVATV-Peptid stimuliert werden. Morita *et al.* [84] verglichen 2 Tetramere, A*0201 mit NLVPMVAT (A*02NLV) und A*2402 QYDPVAALF (A*24QYD), im Hinblick auf die Anzahl der gemessenen Zellen, deren Reaktivität und die Häufigkeit der CMV-Reaktivierungen bei den jeweiligen Patienten. Dabei zeigte sich, dass mit dem A*24QYD weitaus weniger Zellen detektiert wurden, diese Zellen zeigten *in vitro* auch weniger Reaktivität (Zytokinsekretion, Expansion) auf Stimulation mit ihrem Antigen hin als die A*02NLV-bindenden Zellen. Bei den A*24QYD waren aber trotz der geringeren Anzahl an Tetramer-bindenden Zellen CMV-Reaktivierungen nicht häufiger. Daher vermuteten Morita *et al.*, dass QYDPVAALF nicht das immundominante Epitop für A*2402 wäre. Die Messungen mit diesem Tetramer hatten also eine schlechtere Aussagekraft als die mit dem A*02NLV. Die im Tetramer gebundenen Epitope müssen also auch die immundominanten Epitope sein, wenn die gemessenen Werte für Aussagen über den Schutz vor CMV dienen sollen.

4.1.2.4 Korrelation mit klinischen Daten

Bezieht man klinische Daten mit ein, zeigen sich Schwächen des Tetramertest im Bezug auf die Vorhersagekraft: Ozdemir *et al.* [23] zeigten, dass bei Patienten, die trotz steigender Anzahl Tetramer-bindender Zellen CMV reaktivierten, viele nicht reaktive CMV-T-Zellen im Blut zirkulierten. Der Schutz vor CMV hängt also nicht nur von der Menge der CMV-bindenden Zellen ab, sondern von der Rekonstitution reaktiver Zellen. Neben der Anzahl der CMV-bindenden Zellen sollten vor allem klinische Daten wie ein vorhandener *mismatch*, Immunsuppression, Vorliegen einer GvHD usw. miteinbezogen werden – so wurde auch bei den hier vorliegenden Daten verfahren.

Allgemein lassen sich danach anhand der Tetramermessung folgende Schlüsse ziehen: Zeigt sich bei einer CMV-Reaktivierung eine Proliferation der CMV-bindenden Zellen und ein Rückgang der pp65-Werte (ohne Medikation), spricht dies für funktionell aktive CMV-bindende T-Zellen. Zeigt sich hingegen nach einer CMV-Reaktivierung keine Proliferation der CMV-bindenden Zellen, so sind die vorhanden CMV-bindenden Zellen nicht funktionsfähig. Werden nach einer CMV-Reaktivierung keine erhöhten Werte an CMV-bindenden Zellen gemessen, aber die pp65-Werte sinken trotzdem und es tritt keine weitere Reaktivierung auf, werden durch das verwendete Tetramer nicht die immundominanten T-Zellen

abgebildet (Präsentation und Immunantwort läuft über anderes MHC-I und / oder anderes Epitop).

4.1.3 Einfluss der Konditionierung auf die CMV-spezifischen Immunrekonstitution nach HSCT

Die hier betrachtete Patientenkohorte ist zu klein und im Bezug auf die verwendeten Konditionierungsprotokolle zu heterogen, um einen Einfluss des Konditionierungsverfahrens auf die CMV-spezifische Immunrekonstitution zu beobachten. Allerdings wurde bereits publiziert, dass die Konditionierung keinen Einfluss auf Häufigkeit und Schwere der CMV-Infektionen nach Transplantation hat [85].

4.2 Stimulation und Aufreinigung CMV-reaktiver Zellen - Vorversuche

Bei den Vorversuchen traten z. T. unspezifische Färbungen und Anreicherungen auf. Diese unspezifischen Anreicherungen konnten hier durch eine Erhöhung der Verdünnung in der Sekretionsphase (von 1 : 10 auf 1 : 100) verringert werden. In den Vorversuchen zeigte sich, dass eine Anreicherung über 2 Säulen bessere Ergebnisse bezüglich der Reinheit an IFN- γ -positiven Zellen brachte, als eine Anreicherung über eine Säule. Es wurden Unterschiede in der Stimulation und Anreicherung von IFN- γ -sezernierenden CD4⁺- und CD8⁺-Zellen beobachtet: Je nachdem, welches Antigen zur Stimulation der Zellen verwendet wurde, wurden mehr CD8⁺- (pp65) oder mehr CD4⁺-Zellen (CMV-Lysat) stimuliert und angereichert.

4.3 Gewinnung und therapeutischer Einsatz von CMV-spezifischen T-Zellen

4.3.1 Methoden zur Gewinnung antigenspezifischer T-Zellen

4.3.1.1 Erste Therapieansätze mit CD8⁺-T-Klonen

Schon bevor der Sekretionstest und damit die Möglichkeit, antigenspezifische Zellen anhand ihrer Zytokinsekretion zu selektieren, bestand, wurde auf verschiedene Art und Weise versucht, antigenspezifische Zellen zu selektieren und zu transfundieren. Die ersten Versuche in dieser Richtung führte die Gruppe um Riddell *et al.* bereits in den neunziger Jahren durch. So befassten sie sich mit der Optimierung der *in vitro* Stimulation von T-Zellen zum adoptiven Transfer [86], dabei konzentrierten sie sich vor allem auf die CD8⁺-T-Zellen, deren Fehlen sie mit einer erhöhten Anzahl an Reaktivierungen in Verbindung brachten, und wollten das Problem durch Transfer von virusspezifischen CD8⁺-T-Zellklonen lösen [87]. Grundsätzlich zeigte der Transfer von virusspezifischen CD8⁺-T-Zellen auch Erfolg [31], allerdings ist der Schutz bei Fehlen von virusspezifischen CD4⁺-T-Zellen nur von kurzer Dauer, da die Zahl der virusspezifischen CD8⁺-T-Zellen schnell wieder absinkt. Riddell *et al.* verglichen auch verschiedene Methoden beim adoptiven Immuntransfer (retroviraler Gentransfer von Antigenen, T-Zelllinien, modifizierte T-Zellklone) [88], später wurden sowohl CD8⁺- als auch CD4⁺-T-Zellen als essentiell für einen dauerhaft protektiven Immuntransfer angesehen [89] und speziell bei für CMV genauer untersucht [90].

4.3.1.2 Verschiedene Methoden zur Gewinnung von CMV-T-Zellen

Viele Methoden zur Gewinnung von CMV-spezifischen T-Zellen basieren auf einer spezifischen Expansion der Zellen, indem sie *in vitro* mit dem entsprechenden Antigen konfrontiert werden, auf diese Weise wurden z. B. von Einsele *et al.* virusspezifische T-Zellen zur Behandlung von CMV erzeugt und erfolgreich eingesetzt [91]. Im Hinblick auf die spätere Transfusion sind Viruslysate, die noch aktives Virus enthalten können, als Antigen ungünstig, wurden aber dennoch verwendet, z. B. wurden zur Gewinnung ADV-spezifischer T-Zellen ADV-Isolate aus den jeweiligen Patienten benutzt [40], dies vermied zumindest die Einschleppung eines neuen Stammes mit den transfundierten Zellen, oder es wurde CMV-Lysat bei der Herstellung CMV-spezifischer T-Zellen verwendet [52]. Andere Ansätze sind spezifische Expansion durch Kokultur mit DC [92], [34], die CMV-Antigen(e)

präsentieren. Dabei wurden die DC z. B. mit Peptiden gepulst [33] oder mit Viren infiziert, die zu einer Expression von CMV-Antigenen in den DCs führen [93], und über 3-4 Wochen CMV-spezifische Zellen expandiert. Auch künstliche Antigen-präsentierende Zellen (engl. *artificial antigen presenting cells*, AAPC) wurden zur Generierung CMV-spezifischer T-Zelllinien genutzt [94]. Ein Expansionsschritt bedeutet jedoch einen größeren Zeit- und Materialaufwand, das Kontaminationsrisiko ist höher, außerdem sind solche Protokolle eher für vorbeugende Therapieansätze nützlich - bei einer schweren CMV-Erkrankung sollte der Patient schnellstmöglich viruspezifische T-Zellen erhalten, nicht Wochen später.

Die Gruppe Einsele *et al.* testete den Sekretionstest als Methode zur schnellen Generierung von virusspezifischen CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen [52], im Anschluss an die Aufreinigung der IFN- γ -sezernierenden Zellen fand eine unspezifische Expansion der Zellen mit IL-2 statt. Die expandierten Zellen wurden dann hinsichtlich ihrer Funktionalität und Spezifität mit Proliferations- und Zytotoxizitätstests überprüft.

Eine andere Methode zur schnellen, einfachen Gewinnung von CVM-T-Zellen ist die Verwendung von HLA-Peptid-Komplexen (Tetramere, Streptameren o. ä.), dabei werden CD8⁺-T-Zellen gewonnen. Auch diese können bei der Behandlung von CMV hilfreich sein [95], allerdings fehlen die für einen dauerhaften Schutz notwendigen CD4⁺-T-Zellen. Die Entwicklung von MHC-II-Peptid-Komplexen wird derzeit untersucht, es sind wenige in Frage kommende Epitope bekannt. Die verschiedenen Methoden zur Gewinnung von CMV-spezifischen T-Zellen zum klinischen Einsatz wurden von Einsele *et al.* zusammengefasst [96], dabei wird auch ein Überblick über die Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden gegeben.

Hier wurde angestrebt, Bedingungen für eine Aufreinigung von CMV-T-Zellen zum adoptiven Transfer zu schaffen, ohne weitere Expansionschritte durchzuführen.

4.3.2 Heilversuch mit CMV-spezifischen T-Zellen und Nachweis der transfundierten Zellen in vivo

UPN1238 hatte bereits mehrfach CMV reaktiviert (dreimal) und sprach auf die medikamentöse Therapie mit GCV nicht an. Zudem trat eine gefürchtete Nebenwirkung des GCV auf – es zeichnete sich eine beginnende Myelosuppression ab. Daher wurde ein Heilversuch mit angereicherten, CMV-spezifischen Spender-T-Zellen versucht. Die Zellen wurden nach Stimulation mit rekombinantem pp65 nach dem Tübinger Protokoll [52]

am CliniMACS aufgereinigt. Obwohl nur eine geringe Zahl CMV-spezifischer T-Zellen transfundiert wurde, zeigte sich ein deutlicher Effekt. Nach Absetzen des Ganciclovirs kam es zunächst noch zu einem Anstieg der pp65-positiven Leukozyten, als jedoch die CMV-T-Zellen proliferierten, sank die Zahl der pp65-positiven Leukozyten. Die Senkung der Immunsuppression verbesserte die Immunantwort durch die CMV-T-Zellen weiter. Die CMV-Reaktivierung wurde schließlich durch die transfundierten Zellen beherrscht. Gleichzeitig hatten die wenigen Zellen auch einen positiven Einfluss auf die Immunrestitution im Allgemeinen. Während vorher nur wenige CD3⁺CD8⁺-T-Zellen und praktisch keine CD3⁺CD4⁺-T-Zellen im Blut der Patientin messbar waren, proliferierten nach der Gabe der CMV-T-Zellen zunächst die virusspezifischen CD3⁺CD8⁺- und CD3⁺CD4⁺-T-Zellen. Dabei bildete sich auch wieder eine Population an nicht virus-spezifischen CD3⁺CD4⁺-T-Zellen aus.

Der hier vorgestellte Heilversuch zeigt eindrucksvoll das Potential des adoptiven Immuntransfers zur Behandlung von CMV. Während die medikamentöse Therapie keinen Erfolg zeigte und sogar das Transplantat gefährdete, wurde durch den Transfer der CMV-T-Zellen die Infektion erfolgreich zurückgedrängt, ohne dass sich negative Begleiteffekte zeigten. Augmentative Mittel für die Funktion der transfundierten Zellen wie die Gabe von IL-2 waren nicht notwendig, die Bedingungen *in vivo* führten allein zu einer Expansion der CMV-spezifischen T-Zellen, die auch nachgewiesen wurde.

4.4 Generierung von dendritischen Zellen

4.4.1 Anwendungen von DC

4.4.1.1 DC für funktionelle Tests

Im Rahmen der Arbeit wurde, um APC für funktionelle Test zur Verfügung zu haben, die Generierung von DCs aus der adhärennten Fraktion von PBMNCs etabliert. Die DCs wurden exogen mit pp65 beladen und zur Restimulation von unspezifisch expandierten CMV-T-Zellen verwendet, um deren Funktionalität und Spezifität zu überprüfen. Zur Abschätzung der Alloreaktivität wurden allogene, nicht HLA-idente DCs generiert.

4.4.1.2 Immunisierung CMV-negativer Spender

Die Generierung von DCs kann aber nicht nur bei funktionellen Test hilfreich sein, sie ist auch der Schlüssel zur Generierung von antigenspezifischen T-Zellen aus dem Blut CMV-seronegativer Spender. Desweiteren sind DCs bei der Stimulation als antigenpräsentierende Zellen überlegen, sie wurden nicht nur für *in vitro* Stimulation genutzt, sondern auch zur Vakzinierung und Auslösung einer Immunantwort *in vivo* [97]. Es sei bemerkt, dass dies für (exogene) Proteinantigene und in den DCs erzeugte Antigenfragmente gilt, nicht für exogene Peptide. Hier sind T2, Monozyten, T-Zellen und B-Zellen im Bezug auf die Bindung der Peptide überlegen [98]. Dennoch können auch Peptid-gepulste DC eine Immunantwort z. B. gegen EBV auslösen [99].

Nachdem die Generierung von DC im Rahmen dieser Arbeit bereits etabliert wurde, und die beladenen DC *in vitro* auch eine Immunantwort auslösten, könnten nach dem vorgestellten Protokoll generierte DC auch für eine spezifische Expansion von CMV-T-Zellen oder zur Generierung antigenspezifischer T-Zellen aus dem Blut seronegativer Spender verwendet werden.

4.4.2 Verschiedene Methoden der DC-Generierung

Neben dem hier verwendeten Protokoll zur Ausreifung mit MCM, das mit CD14⁺-Zellen als Ausgangsmaterial auch schon für klinische Versuche genutzt wurde [46], gibt es zahlreiche andere Methoden zur Generierung und Ausreifung von DCs, z. B. stellten Alldawi *et al.* ein Protokoll zur schnellen Erzeugung von DC vor [47], bei dem zur Ausreifung IFN- γ und Lipopolysaccharid (LPS) zugegeben werden. Nersting *et al.* beobachteten, dass LPS die ausreifende Wirkung von MCM verstärken kann [49]. Da jedes MCM unterschiedlich gut funktioniert, werden teilweise Zytokingemische mit TNF- α , IL-6, Prostaglandin E2, IL-1 β , sowie den hier auch verwendeten IL-4 und GM-CSF zur Ausreifung von DC bevorzugt, um einheitliche Bedingungen bei der Ausreifung zu schaffen [48]. Neben all den genannten Variationen spielt auch das verwendete Medium eine wichtige Rolle [100].

Bei der DC-Generierung und -Ausreifung mit MCM konnten gute Ergebnisse erzielt werden. Die erzielten Zellen zeigten unter dem Mikroskop deutlich die morphologischen Eigenschaften reifer DC, also eine astartige Struktur und Semiadhärenz. Die im Durchflusszytometer analysierten Zellen waren zu über 90% positiv für CD83, CD86 und HLA-DR – typische Oberflächenmarker von reifen DCs – und trugen kaum CD14 auf ihrer Oberfläche.

4.5 Etablierung von funktionellen Tests zur Beurteilung angereicherter antigenspezifischer Zellen

4.5.1 Proliferationstest

4.5.1.1 Testlauf mit expandierten CMV-T-Zellen

Beim Testlauf mit unspezifisch expandierten CMV-T-Zellen konnte eine spezifische Proliferation nachgewiesen werden, allerdings gab es auch eine starke Hintergrundproliferation. Vergleicht man die Ansätze mit pp65-beladenen und unbeladenen autologen DCs, so unterscheiden sich die Anteile der proliferierenden Zellen nur um 10%. Da die Zellen zuvor mit IL-2 expandiert wurden, war die weiter anhaltende Teilungsaktivität eventuell noch IL-2 induziert.

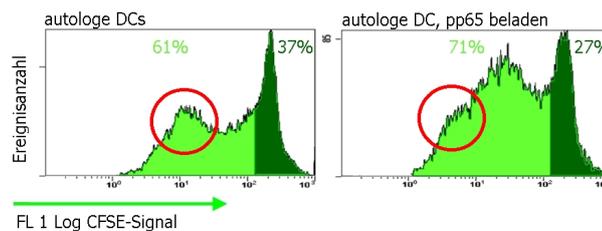


Abbildung 4.1: Störsignale beim Proliferationstest: X-Achse: Fluoreszenzintensität, CFSE-Signal; Y-Achse: Ereignisanzahl; bei der Kokultur mit unbeladenen (links) und pp65-beladenen (rechts) autologen DCs mit unspezifisch expandierten CMV-T-Zellen entwickelte sich ein Signal (roter Kreis) am linken Rand der proliferierenden Population (hellgrün)

Desweiteren zeigte sich in beiden Ansätzen ein breites Signal am linken Rand der CFSE-positiven Population, während sich beim Ansatz mit pp65-beladenen DCs zusätzliche (Tochter-)Populationen ausbildeten (vgl. Abb. 4.1). Möglicherweise wurde das Signal am linken Rand der proliferierenden Zellen durch absterbende T-Zellen verursacht, diese verlieren auch an Fluoreszenzintensität. Die zugegebenen DCs wurden nicht bestrahlt, haben also auch Nährstoffe verbraucht, eventuell führte dies zu einer Mangelsituation und zum langsamen Absterben der T-Zellen. Da der Blutspender, aus dem sowohl T-Zellen als auch die Ausgangspopulation für die DC gewonnen wurden, CMV-positiv war, ist auch eine Stimulationswirkung dieser DC ohne zusätzlich Beladung mit CMV-Antigen nicht auszuschließen. Eventuell schufen die DC auch ein Milieu, das die ohnehin vorhandene

Proliferation (in der Negativkontrolle proliferierten 37%) noch förderte. Beim Vergleich von CD3⁺-T-Zellen und unspezifisch expandierten CMV-T-Zellen schnitten die CMV-T-Zellen bezüglich der Antigen-spezifischen Expansion nicht wie erwartet besser ab. Dies bedeutet zum einen, dass die in den CD3⁺-T-Zellen enthaltenen CMV-T-Zellen proliferierten, zum anderen, dass die angereicherten CMV-T-Zellen durch die unspezifische Expansion an Spezifität und Reaktivität verloren haben könnten. Eine Expansion sollte also besser spezifisch z. B. durch Zugabe Antigen-beladener, bestrahlter DC erfolgen, dies liefert gute Ergebnisse [92].

Sollen Fütterzellen verwendet werden, muss entweder so lange expandiert werden, bis die Fütterzellen sich aufgelöst haben, oder es muss eine homogene Zellpopulation als Fütterzellen benutzt werden, die sich durch Färbung mit Antikörpern ausfiltern lässt. Die Ansätze mit Fütterzellen waren hier nicht auswertbar, da die nach 7 Tagen Expansion noch vorhandenen Fütterzellen bei der CFSE-Färbung der CMV-T-Zellen mitgefärbt wurden und Störsignale verursachten.

4.5.1.2 Nachweis der Proliferation mittels CFSE-Färbung

Der Proliferationstest mit CFSE ist radioaktiven Methoden in der Genauigkeit gleichwertig [55], [101] und bietet zusätzlich die Möglichkeit, die proliferierenden Zellen genauer zu charakterisieren [102], [53]. Der Test wurde bereits von anderen Gruppen zur Bewertung von CMV-T-Zellen verwendet [52].

Zwar konnten Färbung und Testaufbau etabliert werden, das eigentliche Ziel - der Nachweis der CMV-spezifischen Proliferation der mittels Sekretionstest angereicherten CMV-T-Zellen - konnte jedoch nicht erreicht werden. Auch der Versuch mit einer Zelllinie gegen das NLVPMVAT-Peptid schlug fehl. Dies lag allerdings nicht an dem Test, sondern an dem verwendeten Zellmaterial. Die unspezifische Expansion führte bei den angereicherten Zellen, die von vornherein keine gute Reinheit hatten (für den klinischen Einsatz werden über 90% angestrebt), zu einem Verlust der Spezifität und Reaktivität. Bezieht man mit ein, dass es sich bei der T-Zelllinie ebenfalls um vielfach expandierte CMV-T-Zellen handelte und diese auch keine spezifische Proliferation mehr zeigten, ist von einer unspezifischen Expansion der Zellen abzusehen. Wenn überhaupt, sollte spezifisch expandiert werden, allerdings würde dies die Aussage verfälschen, da nicht mehr die aufgereinigten Zellen, sondern spezifisch expandierte Zellen untersucht würden. Die spezifische Expansion führt jedoch zu einer Verringerung von unspezifischen und / oder allo-reaktiven Zellen

und einer Anreicherung antigenspezifischer Zellen [91]. Es sollte aber gerade der Anteil eben dieser Zellen direkt nach Durchführung der Sekretionstest bestimmt werden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wäre eine Aufreinigung von CMV-T-Zellen im klinischen Maßstab nötig, neben einer höheren Ausbeute bedeutet eine Aufreinigung am *CliniMACS* auch gleichzeitig eine homogenere Aufarbeitung der Zellen (Waschschritte, Aufarbeitungszeit). Im Labormaßstab konnten hier ohne Expansionsschritt nicht ausreichend Zellen für eine Etablierung der Tests gewonnen werden. Allerdings müssten für eine eventuelle Validierung der Aufreinigung im klinischen Maßstab ohnehin Testläufe am *CliniMACS* stattfinden, die in solchen Probeläufen angereicherten Zellen könnten zur Etablierung der grundsätzlich funktionsfähigen Tests verwendet werden.

4.5.2 Degranulationstest

4.5.2.1 Probleme beim Degranulationstest

Beim Degranulationstest ergab sich das gleiche Problem wie beim Proliferationstest. Der Versuch mit der Zelllinie war nicht erfolgreich, CMV-T-Zellen standen für einen Test nicht in ausreichender Menge zur Verfügung. Grundsätzlich ist die Messung der CD107a-Präsentation auf der Zelloberfläche ein guter Nachweis für CMV-spezifische Zytotoxizität [38], nicht nur im humanen System [103], und kann leicht mit anderer Tests wie z. B. hier der Tetramerfärbung kombiniert werden [37].

4.5.2.2 Andere Verwendungsmöglichkeiten für die T2-Zellen

Die T2 Zellen könnten, nachdem ihre Eignung als APZ kontrolliert wurde, als Zielzellen für funktionelle Tests mit CMV-T-Zellen von HLA-A*0201-positiven Spendern dienen. Auch zur spezifischen Expansion könnten sie eingesetzt werden, allerdings nur für Forschungszwecke, nicht für die Herstellung von Zellen für den klinischen Einsatz. T2 Zellen sind weniger gute APC als DCs, desweiteren können sie nur mit Peptiden beladen werden. Sie sind jedoch leicht in großer Menge kultivierbar. Ihre Stimulationwirkung als APC könnte durch Zugabe von Kostimulatoren wie α CD28 oder α CD49 verbessert werden. CD28 und CD49d sind wichtige Zielstrukturen für die T-Zellaktivierung. CD28, das B7/BB1 (CD80) oder B70/B7-2 bindet, vermittelt die Adhäsion zwischen T-Zellen mit B-Zellen oder DC und ist einer der Hauptkostimulatoren für die T-Zellaktivierung. CD49d ist eine

Integrin $\alpha 4$ Kette, es ist in Zelladhäsion an Fibronectin und VCAM-1 beteiligt sowie an Leukozyteninteraktionen.

4.5.2.3 Ersatz des Degranulationstest

Anstatt des Degranulationstests, der Zellmaterial verbraucht, könnte bei der Kontrolle der angereicherten CMV-T-Zellen für den klinischen Einsatz ein Test verwendet werden, der kein oder nur wenig Zellmaterial verbraucht: Anstatt die Zellen nach (Re-)Stimulation mit CMV-Antigen zu analysieren, könnte auch nur der Kulturüberstand untersucht werden. Die Zellen bleiben dabei unverändert und können für andere Tests verwendet werden. So könnte z. B. die Zytotoxizität anhand der Ausschüttung von Granzym B mittels ELISA (engl. *enzyme linked immuno sorbent assay*) nachgewiesen werden [104], [105].

4.6 Austestung verschiedener GMP-Medien

4.6.1 Analyse im Durchflusszytometer

Die durchflusszytometrische Analyse lieferte Daten zur Beurteilung des Sekretionstests und der verwendeten Medien. Durch die Analyse konnte sowohl der Erfolg der Aufreinigung (Stimulationsrate, Reinheit der angereicherten Population) als auch Effekte der verschiedenen Medien (Vitalität der Zellen) beobachtet werden. Allerdings wurden einige Proben unspezifisch angereichert. Die bei den unspezifischen Anreicherungen gemessenen Werte können jedoch als Anhaltspunkte bei der Beurteilung einer Aufreinigung CMV-spezifischer T-Zellen mittels Sekretionstest dienen: Sind vor der Anreicherung bereits mehr als 10% IFN- γ -positive Zellen und nach der Anreicherung weniger als 25% tote Zellen enthalten, wurde unspezifisch angereichert. Bei CMV-seropositiven Spendern liegt der Anteil der CMV-spezifischen Zellen normalerweise nicht über 5%, es sind aber schon Werte bis 10% aufgetreten. Dementsprechend sollten auch nicht mehr IFN- γ -positive Zellen vor Anreicherung detektiert werden. Der Anteil der toten Zellen im Eluat kann auch zur Beurteilung der Aufreinigung herangezogen werden: Desto weniger IFN- γ -positive Zellen vor Aufreinigung vorhanden sind, desto mehr tote Zellen sind im Eluat. Die toten Zellen werden unspezifisch an die Säule gebunden, je weniger die Säule mit IFN- γ -positiven Zellen besetzt ist, desto mehr unspezifische Bindungskapazität ist frei.

4.6.2 Vergleich von intrazellulärer Färbung und Sekretionstest

Während der Sekretionstest bei anschließender Verwendung von immunomagnetischen *beads*, die das IFN- γ oder den Nachweisantikörper gegen das IFN- γ binden, auch die Anreicherung der detektierten Zellen sowie den Ausschluss von toten Zellen erlaubt, kann die intrazelluläre Färbung auch aus cryokonserviertem Material angesetzt werden und ist weniger störungsanfällig. Die gemessenen Werte für die jeweiligen Proben stimmen bei Sekretionstest und intrazellulärer Färbung nicht überein, allerdings werden auch unterschiedliche Populationen betrachtet. Eine parallele Färbung mit lebend-tot-Farbstoff ist bei der intrazellulären Färbung nicht möglich, da durch die Permeabilisierung alle Zellen angefärbt werden und im Durchflusszytometer als tot erscheinen. Beim Sekretionstest waren im Schritt vor der Säule durchschnittlich 10% tote Zellen enthalten (vgl. Abb. 3.23). Da tote und apoptotische Zellen eine Eigenfluoreszenz haben und außerdem auch unter den apoptotischen Zellen IFN- γ -positive sein können, waren bei der intrazellulären Färbung bei gleicher Stimulationsdauer leicht erhöhte Werte an IFN- γ -positiven Zellen zu erwarten, dies war bei MV1 bei allen Medien und bei MV3 beim Ansatz mit RPMI1640 auch der Fall. Die Abweichungen zwischen intrazellulärer Färbung und Sekretionstest aus frischen Zellen, bei denen die Werte aus dem Sekretionstest höher lagen, waren entweder durch unspezifische Anfärbungen im Sekretionstest oder durch eine bessere Aktivierung der Zellen im Sekretionstest bedingt, hier wurde die Kommunikation der Zellen während der Inkubation nicht nach 2 h unterbrochen. Allerdings hätten in letzterem Fall die Werte der selben Probe für die einzelnen Medien näher beieinander liegen müssen, diese weichen jedoch um bis zu 3,3% (MV3, CellGro vs. RPMI1640) ab. Da die intrazelluläre Färbung wenig Material verbraucht (1×10^6 Zellen pro Ansatz) und auch aus gefrorenen Proben angesetzt werden kann, bietet sie sich für nachträgliche Bestimmungen der IFN- γ -positiven Zellen an. Außerdem kann sie als Vergleichstest zum Sekretionsassay dienen, um die dort gemessenen Werte zu verifizieren und unspezifische Färbungen auszuschließen.

4.6.3 Expansion in den verschiedenen Medien

Die besten Expansionsraten wurden mit CellGro erzielt. Allerdings soll bei der klinischen Umsetzung des Sekretionstests von einer Expansion abgesehen werden, weil Kosten und (Zeit-)Aufwand zu groß sind. Auch das Risiko einer Kontamination der Zellen ist höher, je länger sie *in vitro* kultiviert werden. Zudem ist eine unspezifische Expansion auch ungünstig, weil möglicherweise solche T-Zellen, die *in vitro* gut wachsen, gegenüber den

eigentlich gewollten CMV-T-Zellen bevorzugt vermehrt werden. Neben T-Zellen werden auch NK-Zellen expandiert, dies hätte allerdings beim klinischen Einsatz keine Nachteile und könnte desweiteren über die IL-2 Konzentration gesteuert werden.

4.6.4 Zusammenfassende Beurteilung der getesteten Medien

Die beiden getesteten GMP-Medien sind beide für eine GMP-konforme Herstellung von CMV-T-Zellen im klinischen Maßstab geeignet. Dabei schnitt CellGro subjektiv etwas besser ab als X-Vivo 15, die Zellen sahen besser aus, während der Aufreinigung gab es weniger Verklumpungen, bei der Expansion, die jedoch beim klinischen Protokoll keine Rolle spielen wird, war CellGro überlegen. Bezüglich der Reinheit der Zellen und ihrer Vitalität gab es keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Medien.

4.7 Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion nach IFN- γ Sekretionstest

4.7.1 Reinheit der IFN- γ -positiven Zellen

4.7.1.1 Unspezifische Anreicherungen

Während bei den Vorversuchen teilweise sehr gute Reinheiten erreicht wurden, konnten hier im Mittel nur Reinheiten mit knapp über 50% IFN- γ -positiven Zellen erreicht werden. Desweiteren wurden 4 Proben unspezifisch angereichert. Bereits bei den Vorversuchen hatte sich das Problem einer unspezifischen Anreicherung gezeigt. Allerdings führte auch die damals gewählte Abwandlung des Herstellerprotokolls, die Zellen in der Sekretionsphase stärker zu verdünnen, nicht zu einer Verbesserung bei der Aufreinigung von größeren Zellzahlen, hier konnte die in den Vorversuchen gewählte Verdünnung mit 1 : 100 (1×10^5 Zellen pro 1 ml in Sekretionsphase; stimulierte Zellmenge: 1×10^7 PBMNCs) nicht umgesetzt werden und musste auf 1 : 20 gesenkt werden. Laut Herstellerangaben wäre bis zu einem Anteil von 5% IFN- γ -positiven Zellen eine Verdünnung von 1 : 10 ausreichend. Da aber bei Probe 5 nach Stimulation mit CMV-Lysat und bei 6, 8 und 9 nach Stimulation mit pp65 dennoch eine unspezifische Färbung stattfand, war die Ursache für die unspezifischen Anreicherungen hier und in den vorherigen Versuchen möglicherweise nicht

die unzureichende Verdünnung. Wäre dies der Fall, so müssten insbesondere Proben mit hohen Anteilen an IFN- γ -sezernierenden Zellen unspezifische Färbungen aufweisen, dies war aber laut Abgleich mit der intrazellulären Färbung nicht der Fall. Eine zu langsame Abkühlung der Proben nach der Sekretionsphase vor der Zentrifugation könnte auch zu unspezifischen Färbungen führen, allerdings hätten dann beide Ansätze einer Probe unspezifisch gefärbt sein müssen, da sie immer parallel aufgearbeitet, also auch gleichzeitig und für die gleiche Dauer gekühlt und zentrifugiert wurden. Eventuell genügte die Erhöhung der Verdünnung auf 1:20 anstatt 1:10 auch nicht – bei den Vorversuchen wurde 1:100 verdünnt. Dies ist jedoch bei höheren Zellzahlen kaum umsetzbar. Bei einer Aufreinigung am CliniMACS mit 1×10^9 Zellen würden für eine Verdünnung auf 1×10^5 Zellen pro 1 ml 10 L Medium verbraucht werden.

4.7.1.2 Bestimmung der Fehlerquelle

Da auch bei höheren Verdünnungen das Problem der unspezifischen Anreicherung weiter auftrat, sollten auch andere Ursachen in Betracht gezogen werden, z. B. die Dauer der Inkubation mit Antigen oder die Anzahl der Waschschriffe vor Färbung mit dem spezifischen Antikörper. Um die Frage zu klären, ob die Ursache der unspezifischen Färbung bereits vor der Sekretionsphase oder in der Verdünnung während der Sekretionsphase liegt, gibt es folgende Möglichkeiten:

Zunächst könnten die gleichen PBMCs in mehrere Sekretionstests eingesetzt und die Stimulationsdauer sowie die Verdünnung in der Sekretionsphase variiert werden. Zusätzlich könnten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stimulation die Zytokinsekretion mit BFA gestoppt, die Zellen dann weiter inkubiert und eine intrazelluläre Färbung durchgeführt werden. Nimmt bei späterer Zugabe des BFA der Anteil an IFN- γ -positiven Zellen immer weiter zu, so werden nicht-CMV-reaktive Zellen unspezifisch mit IFN- γ markiert – z. B. binden Monozyten IFN- γ . Allerdings wurden in den unspezifisch angereicherten Proben in der IFN- γ -positiven Population nicht mehr Monozyten oder B-Zellen gefunden, als bei den spezifisch angereicherten, sondern weniger.

Ebenso wäre es möglich, nach der ü. N. Stimulation (als Vergleichswert) und nach verschiedenen Verdünnungen in der Sekretionsphase die Zellen nicht nur auf IFN- γ , sondern zusätzlich mit Tetrameren zu färben. Sinkt bei geringerer Verdünnung der Anteil der Tetramer-positiven Zellen in der IFN- γ -positiven Population, so zeigt dies eine unspezifische Färbung an.

Weitere mögliche Ursachen sind eine zu geringe Durchmischung (Schüttelfrequenz, Rotation etc.) während oder eine zu langsame Abkühlung nach der Sekretionsphase.

4.7.2 T-Zellen

Wie bereits mehrfach erwähnt, sind für einen effektiven Schutz vor CMV sowohl CD8-positive als auch CD4-positive T-Zellen notwendig. Darum wurde auf den Gehalt an T-Zellen besonders viel Wert gelegt und die Effekte der beiden verglichenen Antigene, CMV-Lysat und pp65, auf die T-Zell-Subpopulationen im Eluat betrachtet. Dabei zeigte sich das, anders als nach den Vorversuchen angenommen, sowohl CMV-Lysat als auch pp65 gute CD4- und CD8-Antworten erzeugten, die Verteilung der T-Zell-Subpopulationen war bei beiden Antigenen im Mittel ähnlich. Bei den Vorversuchen wurden teilweise sehr hohe CD4⁺-Anteile nach Stimulation mit CMV-Lysat gefunden, umgekehrt deutlich mehr CD8⁺-Anteile nach Stimulation mit pp65. Allerdings wurden bei den beiden Versuchen auch unterschiedliche Chargen von CMV-Lysat und pp65 verwendet. Da die Zusammensetzung des Lysates schwanken kann, könnte z. B. ein höherer Gehalt an pp65 im CMV-Lysat für die gute CD8⁺-Antwort bei der Charakterisierung des Eluates verantwortlich sein: Normalerweise werden exogene Antigene über das MHC-II präsentiert und lösen eine CD4⁺-Antwort aus. Es gibt allerdings den Mechanismus der *cross presentation* (vgl. 1.1.4, S. 8), der zu einer Präsentation auf beiden MHC-Molekülen führt. Hinzu kommt, dass pp65 auch als exogenes Antigen besonders gute CD8-Antworten auslöst (dazu später mehr, siehe 4.8.1.2, S. 219). Ein anderer Grund für die unterschiedlichen CD4⁺-CD8⁺-Verteilungen bei den Vorversuchen im Vergleich zur Charakterisierung des Eluates kann sein, dass bei der Charakterisierung des Eluates die CD4⁺-CD8⁺-Verteilung auf die CD3⁺-T-Zellen bezogen wurde, während sich die Werte bei den Vorversuchen auf alle Lymphozyten bezogen.

In allen spezifisch angereicherten Proben wurden unabhängig vom zur Stimulation verwendeten Antigen (pp65 oder Lysat) nach Aufreinigung über 50% CD4-positive T-Zellen gemessen, diese sind für den Erhalt der CMV-Immunität *in vivo* besonders wichtig. Auch CD8-positive T-Zellen waren mit 14,9% bis 19% in ausreichender Menge enthalten. Diese Ergebnisse bestätigen, dass sich die Aufreinigung CMV-spezifischer T-Zellen über Zytokinsekretion gut für die Gewinnung solcher Zellen für einen klinischen Einsatz eignet, wie auch Rauser *et al.* zeigten [52], da sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen gewonnen werden.

4.7.3 NK-Zellen

NK-Zellen sind auch ein wichtiger Teil der Abwehr gegen CMV. Sie beeinflussen *in vitro* und *in vivo* andere inflammatorische Zellen bei der Reaktion auf CMV [106]. Daher ist ein NK-Anteil in den aufgereinigten IFN- γ -positiven Zellen von Vorteil. Bei der Überprüfung der Eluatzusammensetzung zeigte sich hier, dass je nach verwendetem Antigen unterschiedliche Mengen an NK-Zellen und NK-T-Zellen mit angereichert werden. Besonders bei der Stimulation mit pp65 wurden spezifisch NK-Zellen mitangereichert.

In Mäusen wurde bereits gezeigt, dass der Transfer von NK-Zellen die Myelosuppression durch CMV stoppen und Schutz vor dem Virus vermitteln kann [107]. Es gibt auch NK-vermittelte Inhibition der Virusreplikation ohne Zellyse [108]. Das CMV reguliert, wie andere Viren, die Präsentation von MHC-I auf der Zelloberfläche herunter, und entgeht damit zytotoxischen T-Zellen. An diesem Punkt greifen die NK an, die durch Fehlen des MHC-I-Moleküls nicht mehr inhibiert werden. Allerdings wurde für CMV gezeigt, dass es auch der Immunantwort durch NK-Zellen entgehen kann: Es exprimiert ein MHC-I homolog (UL18), das die Erkennung durch NK-Zellen blockiert [109]. Dennoch ist der Co-Transfer von virusspezifischen T-Zellen und NK-Zellen positiv zu bewerten, da so gleich mehrere Teile der normalen Immunabwehr regeneriert werden.

Der Anteil an NK-T-Zellen in der IFN- γ -positiven Population lag bei dem mit Lysat stimulierten Ansatz um 2%, beim pp65 stimulierten um 3%. Diese seltenen Zellen sind Teil der angeborenen Immunität [110] und regulieren wie die CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen angeborene und adaptive Immunität, außerdem beeinflussen sich die beiden Gruppen gegenseitig [111]. Es wurde auch gezeigt, dass bestimmte Medikamente die Antigen-spezifische Expansion von NK-T-Zellen fördern können [112], außerdem spielen NK-T-Zellen bei der Immunantwort gegen Tumoren eine Rolle [113].

4.7.4 B-Zellen

Neben IFN- γ -positiven T- und NK-Zellen wurden auch B-Zellen angereichert, nach Stimulation mit pp65 machten sie im Mittel 8,1% der IFN- γ -positiven Zellen aus. B-Zellen sezernieren IFN- γ , wenn sie durch IL-18 und IL-12 dazu angeregt werden, gleichzeitig wird dabei die Produktion von IgE unterdrückt [114], [115]. B-Zellen produzieren neutralisierende Antikörper und können so die Verbreitung von Viren im Körper eindämmen, außerdem begünstigt die Opsonisierung eine Aufnahme durch Phagozyten und damit auch die

Präsentation von CMV-Antigenen. Im Mausmodell wurde durch den Transfer von CMV-spezifischen B-Zellen (ohne T-Zellen) eine bestehende CMV-Infektion bekämpft und eine dauerhafter Schutz aufgebaut [116]. Der Transfer von CMV-spezifischen B-Zellen könnte auch im humanen System einen positiven Effekt haben.

4.7.5 CD14-positive und CD25-positive Zellen

4.7.5.1 Monozyten

Zur Bestimmung der Monozyten wurde ein Antikörper gegen CD14 verwendet. CD14 ist der Rezeptor für den Komplex aus LPS und dem LPS-bindenden Protein, es findet sich auf monozytären Zellen wie Monozyten (peripheres Blut) und Makrophagen (Gewebe). Normalerweise sezernieren Monozyten kein IFN- γ , dennoch wurden sie hier mit angereichert. Sie tragen aber, genau wie B-Zellen, das Oberflächenmolekül CD119, den IFN- γ -Rezeptor. Die Anreicherung der CD14⁺-Zellen könnte mit der Bindung von durch T-Zellen sezerniertem IFN- γ an CD119 und anschließende Färbung dieses gebundenen IFN- γ durch den spezifischen Antikörper erklärt werden. Auch ein Teil der aufgereinigten B-Zellen könnte so mit dem Antikörper α IFN- γ markiert und deshalb angereichert worden sein. Es handelt sich hierbei um eine unspezifische Anreicherung aktivierter Monozyten, allerdings können diese Zellen *in vivo* die Immunantwort unterstützen.

4.7.5.2 CD25-positive Zellen

CD25 ist ein Aktivierungsmarker, passend zu dem hohen Anteil an IFN- γ -positiven T- und B-Zellen und durch IFN- γ aktivierten Monozyten wurde ein hoher Anteil an CD25⁺-Zellen nach Anreicherung gemessen. Addiert man den Gehalt an T-Zellen und B-Zellen in der IFN- γ -positiven Population, so ergibt dies ungefähr den Wert der CD25⁺-Zellen.

4.7.6 Vorteile des IFN- γ -Sekretionstests

Die hier gezeigten Ergebnisse zur Zusammensetzung des Eluates nach Aufreinigung CMV-spezifischer Zellen mit Zytokinsekretionstest zeigen, dass der Sekretionstest klare Vorteile gegenüber T-Zelllinien oder mit HLA-Peptid-Komplexen angereicherten Zellen bietet:

Neben T-Zellen werden andere CMV-spezifische Immunzellen, nämlich B-Zellen und NK-Zellen, mit angereichert. Die Transfusion eines solchen Zellgemischs baut eventuell nicht nur die T-Zell-Antwort gegen CMV wieder auf, sie legt den Grundstein für alle vorhandenen Abwehrmechanismen gegen CMV, da alle beteiligten Immunzellen enthalten sein können, von APC abgesehen. Ein ähnlicher Effekt könnte nur durch kombinierte Gabe einer CMV-T-Zelllinie und angereicherten B-Zellen (z. B. über CD19-Selektion) oder NK-Zellen (z. B. über CD56-Selektion) erreicht werden, der Zytokinsekretionstest liefert dies in einem Schritt.

Die grundlegenden Bedingungen für eine Aufreinigung im klinischen Maßstab wurden im Rahmen dieser Arbeit geschaffen: Es wurden GMP-konforme Medien getestet und als geeignet eingestuft, Anhaltspunkte für Qualitätsstandards (Anteile an T-Zellen, toten Zellen und anderen Immunzellen in der aufgereinigten Population) wurden gefunden. Desweiteren wurden mehrere Tests etabliert, die zur Bewertung der CMV-T-Zellen (Tetramermessung, Proliferationstest, CD107a-Messung) geeignet sind. Die endgültige Bewertung der CMV-T-Zellen mit diesen Tests scheiterte nur an den geringen Zellausbeuten und / oder teilweise schlechten Reinheiten der CMV-T-Zellen bei der Durchführung des Sekretionstest im vergrößerten Labormaßstab. Diese Probleme sind – wenn man die Ergebnisse von Rauser *et al.* [52] bei den Aufreinigungen am CliniMACS betrachtet – bei Anreicherungen von CMV-T-Zellen im klinischen Maßstab nicht zu erwarten. Neben Aspekten bei der Aufreinigung und Bewertung von CMV-T-Zellen konnten hier auch erfolgreich mit dem Sekretionstest angereicherte CMV-T-Zellen zur Heilung von rekurrenten CMV-Infektionen eingesetzt werden, die Zellen konnten *in vivo* nachgewiesen werden. Zusätzlich wurden Anhaltspunkte gefunden, dass bei der Anreicherung IFN- γ -positiver Zellen mit dieser Methode andere wichtige Immunzellen (NK-Zellen, B-Zellen) mit angereichert werden, die einen positiven Effekt für den Empfänger der Zellen haben könnten.

4.8 Klonierung und Expression viraler Proteine des CMV in einem Baculovirussystem

4.8.1 CMV-Antigene

4.8.1.1 Protein versus Peptid

Für die Stimulation von antigenspezifischen T-Zellen können sowohl Proteine als auch Peptide verwendet werden. Beide Varianten haben Vor- und Nachteile. In dieser Arbeit wurde sich auf Proteinantigene konzentriert, da das Konzept der Stimulation und Aufreinigung möglichst breit anwendbar sein sollte. Will man Peptidantigene verwenden, so muss das jeweilige Epitop bekannt sein, genau wie der HLA-Typ des (Blut-)Spenders. Die HLA-Abhängigkeit ist ein eindeutiger Nachteil von Peptiden, desweiteren werden damit fast ausschließlich CD8-positive T-Zellen stimuliert, denn die bekannten Epitope binden meist HLA-I. Durch Verwendung von überlappenden Peptidgemischen (engl. *peptide pools*), die ein ganzes oder mehrere Proteine abdecken, kann das Problem der vorherigen Identifizierung von Epitopen umgangen werden. Allerdings fällt dann ein Vorteil der Peptidantigene weg: verwendet man nur ausgewählte Epitope, kennt man die Spezifität der gebundenen T-Zellen genau, sie sind nach Aufreinigung leicht z. B. mit Tetrameren zu überprüfen. Überlappende Peptidpools verursachen hauptsächlich CD4⁺-Antworten, aber auch CD8⁺-Antworten sind möglich (z. B. beim pp65).

Die Stimulation mit Proteinen braucht etwas mehr Zeit als bei Peptiden, da das Antigen erst von den APC prozessiert werden muss. Dafür kann ein immunogenes Protein für alle HLA-Typen verwendet werden, allerdings liegt die Stärke des Ansprechens hier auch daran, ob das Hauptepitop für den jeweiligen HLA-Typ darin enthalten ist. Man braucht aber das Epitop nicht zu kennen. Durch Expression immunogener Proteine in humanen Zellen kann eine Infektion simuliert und so sehr genau die Immunreaktion *in vivo* nachempfunden werden.

Für eine GMP-Produktion sind Peptide, Peptidpools, (rekombinante) Proteine und Proteingemische geeignet, solange die Zusammensetzung genau definiert ist und keine schädlichen Begleitstoffe (z. B. bakterielle Toxine bei Proteinexpression in Prokaryonten) enthalten sind. Allerdings lassen sich Peptide einfacher unter GMP-Bedingungen synthetisieren als Proteine.

4.8.1.2 Immunantwort gegen pp65

Bei der Stimulation von T-Zellen mit exogenen Antigenen sollten hauptsächlich CD4-T-Zellen aktiviert werden. Bei den meisten Antigenen ist dies auch der Fall. pp65 löst aber deutliche CD8⁺-T-Zell-Antworten aus, wie hier auch bei mehreren Versuchen gezeigt wurde. Zunächst ging man davon aus, dass die Präsentation von pp65 auf dem MHC-I durch DCs vor allem auf Phagozytose von apoptotischen oder zerstörten, infizierten Zellen durch die DCs beruht [117]. Für pp65 wurde gezeigt, dass es von DCs exogen aufgenommen, und über MHC-I und MHC-II präsentiert wird, ohne dass dabei eine ganze Zelle phagozytiert wird: Tabi *et al.* [118] zeigten, dass bei Kokultur von DC mit nicht HLA-identen CMV-infizierten Fibroblasten die DCs eine klare CD8⁺-T-Zellantwort gegen pp65 und IE-1 auslösten. Dies war nicht der Fall, wenn die DCs vorher mit BFA behandelt wurden, was auf einen Transport des Antigens vom Phagosom / Endosom zum Cytosol hindeutet. Eine Apoptose der Fibroblasten war für die Induktion der *cross-presentation* nicht notwendig. Wichtig für eine effektive *cross-presentation* ist bei aktiven Viren allerdings, dass die DCs möglichst früh mit den infizierten Zellen in Kontakt kommen, da infizierte Zellen in späteren Phasen die DC-Reifung hemmen [72], [119]. pp65 ist ein gutes Zielprotein, es ist als Teil des Teguments bereits in den infizierten Zellen vorhanden, bevor die Virusreplikation begonnen hat. Ähnlich verhält es sich mit den sehr frühen Genprodukten wie IE-1 und IE-2.

4.8.1.3 Immunantwort gegen andere CMV-Proteine

Neben *ul83* (pp65) gibt es weitere ORF (bzw. deren Produkte), die bei vielen CMV-seropositiven Personen zu einer messbaren Immunantwort führen. Sylwester *et al.* [41] untersuchten mit überlappenden Peptidpools, die jeweils eines von 213 ORF des CMV repräsentierten, die Immunantwort gegen CMV in 33 CMV-seropositiven Personen, für 151 ORF konnte eine Immunantwort gemessen werden. Dabei zeigte sich, dass 5 ORF (UL55, UL83, UL86, UL99 und UL122) bei mehr als der Hälfte der Personen von CD4⁺-T-Zellen erkannt wurden, 3 ORF (UL48, UL83 und UL123) wurden von CD8⁺-T-Zellen bei mehr als der Hälfte der Probanden erkannt. Die hier zur Expression in Insektenzellen ausgewählten Proteine – UL55, UL83, UL86, UL94, UL122 und UL123 – wurden danach ausgewählt, ob sie erstens eine gute CD4- und / oder CD8-Antwort auslösten, und zweitens ob sie eine Immunantwort in Probanden auslösten, die nicht oder schlecht auf die am Häufigsten erkannten ORF reagierten. Im Folgenden werden kurz die Stimulationswirkungen der

ausgewählten Proteine erläutert (vgl. [41], Seite 675, *figure 1 C*): UL55 löste in der von Sylwester *et al.* untersuchten Kohorte am Häufigsten von allen ORF CD4⁺-Antworten aus und steht an Platz 10 bei der Auslösung von CD8⁺-Antworten. UL83 steht sowohl bei den CD4⁺- als auch bei den CD8⁺-Antworten an Platz 2. UL86 wurde eher von CD4⁺-Zellen erkannt (Platz 3), als von CD8⁺-Zellen (Platz 18). UL94 hingegen stimulierte eher CD8⁺-Zellen (Platz 11). UL122 und UL123 führten vor allem zur Stimulation von CD8⁺-Zellen (Platz 3 und 4), waren aber auch bei der Auslösung von CD4⁺-Antworten auf den vorderen Plätzen zu finden (UL122 Platz 5, UL123 Platz 11). Die Eigenschaften der in den jeweiligen ORF kodierten Proteine wurde bereits erläutert (siehe 3.7.1, S. 182). Die getroffene Auswahl enthält Proteine, die in verschiedenen Stadien der Virusreplikation exprimiert werden, und die sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-Antworten bei einer großen Anzahl verschiedener HLA-Typen auslösen.

4.8.2 Herstellung von CMV-Proteinen

4.8.2.1 Expressionssystem

Hier wurden Insektenzellen als Expressionssystem ausgewählt, weil erstens bakterielle Systeme eher zu Kontaminationen des rekombinanten Proteins mit mikrobiellen Substanzen, wie z. B. Toxinen, führen können und zweitens Prokaryonten keine Glykosylierung durchführen. Da bei den exprimierten Proteinen zum Teil eine schlechte Löslichkeit erwartet wurde, hätte die fehlende Glykosylierung das Problem noch verschlimmert.

Das pp65 ist als rekombinantes Protein bereits von mehreren Anbietern erhältlich, es handelt sich dabei immer um bakteriell exprimiertes Protein. Die Puffer enthalten hohe Konzentrationen an Harnstoff (z. B. 4 M bei dem pp65 von Miltenyi Biotec), was sich in der Zellkultur eventuell negativ auswirkt. Daher wurde versucht, die Proteine unter milden Bedingungen in Lösung zu halten, das Anfügen eines Gluthathion-S-Transferase-Tags ermöglicht nicht nur die Aufreinigung der Proteine, es erhöht auch deren Löslichkeit. Ein weiterer Grund, ein eukaryotisches Expressionssystem zu nutzen, war die Größe der ausgewählten Proteine. In Insektenzellen können eher große Proteine (um 200 kDa) exprimiert werden, als in Bakterien.

4.8.2.2 Proteinauswahl

Die ausgewählten Proteine (siehe 3.7.1, S. 182) sollen möglichst breit anwendbar sein. Die Proteinauswahl schließt nicht nur Strukturproteine wie pp65 mit ein, auch funktionelle Proteine wie IE-1 und IE-2, die als Transaktivatoren früh im Replikationszyklus wirken, oder UL48, das beim Transport der Partikel in der Zelle beteiligt ist, wurden ausgesucht. Damit würden die mit dem Proteingemisch stimulierten T-Zellen in mehreren Schritten des Replikationszyklus Zielstrukturen finden und angreifen können. Solche T-Zellen könnten möglicherweise noch schneller und effektiver gegen eine CMV-Reaktivierung helfen und weitere Reaktivierungen verhindern, eine Immunantwort gegen mehrere Epitope erschwert eventuell auch das Entkommen des Virus vor der Immunantwort.

4.8.2.3 Expression und Aufreinigung der Proteine

4.8.2.3.1 Planung der Konstrukte

Die Auswahl des Expressionssystem und das Design der cDNAs war auf Gewinnung von Proteinmengen über 1 mg und gute Reinheit ausgelegt. Nach Aufreinigung über das GST-Tag hätte die große und potentiell immunogene GST über die eingefügte TEV-Schnittstelle entfernt werden sollen. Die TEV-Protease wiederum hatte ein His-Tag und wäre darüber wieder entfernt worden. Sollte bei weiteren Aufreinigungsversuchen ein Wechsel des Tag nötig werden, kann auch jedes andere Tag über die TEV-Schnittstelle entfernt werden, dies gewährleistet später eine unverfälschte Immunantwort gegen Epitope des CMV, die Verunreinigung der CMV-Proteine mit einem größeren Tag könnte unspezifische Aktivierungen bewirken.

4.8.2.3.2 Klonierung in *pENTR1a*

Die Klonierung in den Vektor *pENTR1a* erfolgte über Restriktionsenzyme. Zuvor wurden die ausgewählten CMV-DNAs dahingehend analysiert, ob sie durch die potentiell für die Klonierung geeigneten RE geschnitten werden. Zwar konnte für die meisten Konstrukte ein RE-Paar gefunden werden, dass die CMV-DNA nicht schneidet, allerdings konnte für das sehr große UL48 nur eine Restriktionsschnittstelle verwendet werden, da alle übrigen in Frage kommenden Restriktionsenzyme auch innerhalb von UL48 geschnitten hätten. Soll bei weiteren Klonierungsversuchen von UL48 an dem gewählten System festgehalten

werden, muss die Integrationsrichtung des Inserts überprüft werden. Dies funktioniert am Besten mittels PCR oder Restriktionsspaltung des Plasmids.

Der Vektor *pENTR1a* macht bei Sequenzierungen allerdings Probleme, die MCS wird von Sequenzbereichen flankiert, die Sekundärstrukturen ausbilden. Über diese Bereiche kann nicht sequenziert werden, daran scheiterte auch die Sequenzierung der erfolgreich klonierten DNAs zu UL55, UL83, UL86, UL94, UL122 und UL123. Zur Kontrolle des korrekten Einbaus (im Leseraster; bei UL48 außerdem Orientierung) müsste von innen nach außen sequenziert werden, dazu wäre für jedes Konstrukt ein sequenzspezifischer Primer nötig. Dies ist ein klarer Nachteil der *pENTR*-Vektoren. Da allerdings die Identität der CMV-DNAs schon durch die Sequenzierung der *pCRblunt*-Ausgangsklone verifiziert wurde, sollte gerade für die zusammengesetzten cDNAs (UL36 und UL123) noch eine Erstellung von sequenzspezifischen Primern und die Sequenzierung der *pENTR1a*-Konstrukte (vom Insert aus nach außen) erfolgen.

4.8.2.3.3 Expression und Aufreinigung

Für UL55, UL83, UL86, UL94, UL122 und UL123 konnten erfolgreich cDNAs isoliert werden. Für alle außer UL86 wurden auch Baculoviren erzeugt, die die CMV-cDNA tragen. Nur bei UL83 und UL122 konnte auch eine Proteinexpression nachgewiesen werden. Eine Aufreinigung dieser Proteine unter physiologischen Bedingungen scheiterte daran, dass sie nicht im löslichen Überstand nach dem Zellaufschluss vorlagen.

Für eine erfolgreiche Expression und Aufreinigung müssen verschiedene Aufschlusspuffer getestet werden, was viel Zeit in Anspruch nehmen kann. Die Identität der exprimierten Proteine soll, falls ein passender Antikörper vorhanden ist, durch Western Blot überprüft werden. Zumindest gegen pp65 und IE-1 sind Antikörper erhältlich. Da in allen Ansätzen anscheinend das GST-Tag exprimiert wurde, sind eventuell auch die anderen Proteine vorhanden, auch wenn sich keine Expressionsbanden in der PAGE zeigten. Dies könnte mittels einer RT-PCR auf infizierte Zellen genauer überprüft werden.

Bei der Verwendung anderer Aufschlusspuffer muss zunächst getestet werden, ob die Bindung der GST beeinflusst wird. Bei Verwendung des rekombinanten pp65 der Firma Miltenyi Biotec, das in einem Puffer mit 50 mM Natriumdihydrogencarbonat, 300 mM NaCl und 4 M Urea gelöst ist, zeigten sich zum Teil Verklumpungen der Zellen. Ein physiologischer Puffer wäre also zu bevorzugen.

Bei der PAGE-Analyse des Aufreinigungsversuches mit PBS waren die Proteine mit den Zelltrümmern assoziiert. Dies könnte bedeuten, dass die Proteine unter den gewählten Bedingungen (PBS: physiologischer Puffer, wenig Salze) nicht mehr löslich sind oder dass sie als sogenannte *inclusion bodies* vorlagen. Sowohl pp65 als auch IE-2 wurden schon in prokaryotischen und in Insekten-Zellen exprimiert, dabei wurden Aufschlusspuffer mit 6 M Guanidinhydrochlorid, einem stark chaotropen Salz, verwendet, die Proteine wurden über His-Tag aufgereinigt [120], [121], [122]. Als Elutionspuffer wurde ein Puffer mit 8 M Urea, 20 mM Tris-HLC und 100 mM Imidazol verwendet. Vergleicht man die verwendeten Bedingungen mit denen bei der Aufreinigung von pp65 in anderen Publikationen, waren die viralen Proteine hier wahrscheinlich nicht mehr in Lösung und wurden deshalb auch nicht an die GST-Agarose gebunden. Um eine ausreichende Menge an sauberen Proteinen für die Stimulationsversuche zu erhalten, muss das Aufreinigungsverfahren noch weiter optimiert werden.

Insgesamt konnten hier grundlegende Voraussetzungen für die Herstellung eines Proteingemischs zur Stimulation CMV-spezifischer T-Zellen aus dem Blut CMV-seropositiver Spender geschaffen werden: Die breite Auswahl an Proteinen würde die Spenderauswahl unabhängiger vom HLA-Typ machen. Die Identität der klonierten cDNAs wurde bereits durch Sequenzierung überprüft, die korrekten Konstrukte, die in dem gewählten Expressionssystem nicht exprimiert werden können, lassen sich leicht umklonieren.

4.8.2.3.4 Expressionssystem

Das Gateway™-System bietet die Möglichkeit, einfach von einem Vektor in einen anderen zu rekombinieren. Da dies problemlos möglich ist, sollte parallel oder ersatzweise auch eine Expression der Proteine in Bakterien versucht werden. Die Expression in den Insektenzellen hat die Löslichkeit z. B. beim pp65 nicht signifikant verbessert, genausowenig, wie das GST-Tag. Für den Einsatz der Proteine zur Stimulation virusspezifischer T-Zellen spielt die native Struktur jedoch keine Rolle. Daher ist der Wechsel in ein bakterielles System und ein gleichzeitiger Austausch des Tag sinnvoll. Die bereits vorhandenen Konstrukte können weiter benutzt werden, wichtige Vorarbeiten (Sequenzanalyse, Primerdesign, Gewinnung der DNA, Kontrolle der Konstrukte) sind bereits abgeschlossen. Durch Wechsel von Expressionssystem und Tag sowie Modifikation der Aufreinigungsbedingungen – d. h. Anpassung der Puffer für *inclusion bodies* oder schwer lösliche Proteine – können so in naher Zukunft rekombinante Proteine des CMV gewonnen werden.

4.9 Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit sollten die folgenden Ziele erreicht werden:

- (1) Etablierung eines Testverfahrens zur Patientenauswahl und -überwachung**
- (2) Austestung und Optimierung des Zytokinsekretionstests (im Labormaßstab)**
- (3) Definition von Qualitätsmerkmalen und Etablierung geeigneter Tests für Umsetzung der Aufreinigung in klinischem Maßstab**
- (4) Gewinnung neuer Antigene zur Verbesserung der *in vitro* Stimulation von CMV-spezifischen T-Zellen**

Mit der Etablierung des Tetramertests konnte Ziel 1 erreicht werden. Die Messung wird routinemäßig durchgeführt, bis jetzt wurden mehr als 80 Patienten getestet und interessante Einblicke in die CMV-spezifische Immunrekonstitution nach HSCT gewonnen. Vor allem in Kombination mit funktionellen Tests wie der intrazellulären Färbung eignet sich der Test zur Auswahl von Patienten, die von rekurrenten Infektionen bedroht werden, genauso, wie zur Auswahl von potentiellen Spendern. Um die Aussagekraft der Messungen noch zu verbessern, sollten an Tag +50, +100 und +150 nach HSCT routinemäßig ebenfalls funktionelle Tests – z. B. eine intrazelluläre Färbung – durchgeführt werden. Chimärismusanalysen der CMV-bindenden Zellen könnten deren Herkunft – Spender oder Empfänger – klären.

Der Zytokinsekretionstest wurde mit unterschiedlichen Modifikationen und für pp65 und CMV-Lysat im Vergleich durchgeführt. Dabei zeigten sich Probleme mit unspezifischen Anreicherungen. Durch durchflusszytometrische Tests wurde die angereicherte Population genauer charakterisiert. Ein Proliferationstest mit CFSE wurde aufgebaut und die mitogen-induzierte Proliferation von PBMNCs damit nachgewiesen. Die Ziele 2 und 3 konnten somit teilweise umgesetzt werden. Für weitergehende Tests und Festlegung von Qualitätsstandards für Aufreinigungen im klinischen Maßstab müssen Aufreinigungen am CliniMACS durchgeführt werden, das ist allerdings sehr kostenintensiv. Eventuell kann nach einigen Probeläufen der Bedarf an Zellen für die Tests zur Bewertung der angereicherten Zellen gesenkt werden, oder auch auf die Durchführung bestimmter Test bei jedem Lauf verzichtet werden – z. B. könnte durch Tetramerfärbung ein hoher Anteil an CMV-bindenden Zellen nachgewiesen und im Umkehrschluss von wenig Verunreinigungen ausgegangen werden. Es wurde hier auch gezeigt, dass beim Sekretionstest neben

T-Zellen auch NK-Zellen, B-Zellen und Monozyten mit angereichert werden. Eventuell sollte auch ihr Anteil und nicht nur der der T-Zellen standardmäßig nach Aufreinigungen am CliniMACS bestimmt werden.

Die Versuche zum Zytokinsekretionstest bestätigten, dass pp65 alleine nicht für eine effektive Stimulation von CMV-T-Zellen bei allen Spendern geeignet ist. Daher wurden weitere immunogene Proteine des CMV aus der Literatur ausgewählt. Diese konnten bis auf eines erfolgreich kloniert werden, für 5 wurde ein rekombinantes Baculovirus hergestellt, für 2 bereits eine Expression in Insektenzellen gezeigt. Damit wurde der Grundstein für das Erreichen von Ziel 4 gelegt.

Zukünftig sollen die hier etablierten Methoden genutzt werden, um die Überwachung der Immunrekonstitution noch zu verbessern. Mit Hilfe von DCs soll die Stimulation von CMV-spezifischen T-Zellen bei seropositiven Spendern untersucht werden. Dabei sind sowohl die bereits durchgeführte Etablierung der DC-Generierung von Nutzen, als auch die vorhandenen CMV-cDNAs für immunogene Proteine. Diese könnten auch in DC exprimiert werden.

Literaturverzeichnis

- [1] HOFFBRAND, V., P. MOSS und J. PETTIT: *Essential Haematology (Essentials)*. WileyBlackwell, 2006.
- [2] GRAF, T.: *Immunology: blood lines redrawn*. Nature, 452(7188):702–703, 2008.
- [3] JANEWAY, C. A. JR., P. TRAVERS, S. HUNT und M. WALPORT: *Immunologie*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., 1997.
- [4] JANEWAY, C. A., K. MURPHY und P. TRAVERS: *Janeway's Immunobiology*. Taylor & Francis, 2008.
- [5] AKI, M., N. SHIMBARA, M. TAKASHINA, K. AKIYAMA, S. KAGAWA, T. TAMURA, N. TANAHASHI, T. YOSHIMURA, K. TANAKA und A. ICHIHARA: *Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes*. J Biochem, 115(2):257–269, 1994.
- [6] AKIYAMA, K., S. KAGAWA, T. TAMURA, N. SHIMBARA, M. TAKASHINA, P. KRISTENSEN, K. B. HENDIL, K. TANAKA und A. ICHIHARA: *Replacement of proteasome subunits X and Y by LMP7 and LMP2 induced by interferon-gamma for acquirement of the functional diversity responsible for antigen processing*. FEBS Lett, 343(1):85–88, 1994.
- [7] HWANG, L. Y., P. T. LIEU, P. A. PETERSON und Y. YANG: *Functional regulation of immunoproteasomes and transporter associated with antigen processing*. Immunol Res, 24(3):245–272, 2001.
- [8] BOSE, S., F. L. L. STRATFORD, K. I. BROADFOOT, G. G. F. MASON und A. J. RIVETT: *Phosphorylation of 20S proteasome alpha subunit C8 (alpha7) stabilizes the 26S proteasome and plays a role in the regulation of proteasome complexes by gamma-interferon*. Biochem J, 378(Pt 1):177–184, 2004.
- [9] DAHLMANN, B.: *Proteasomes*. Essays Biochem, 41:31–48, 2005.

- [10] FONTENEAU, J. F., D. G. KAVANAGH, M. LIRVALL, C. SANDERS, T. L. COVER, N. BHARDWAJ und M. LARSSON: *Characterization of the MHC class I cross-presentation pathway for cell-associated antigens by human dendritic cells*. *Blood*, 102(13):4448–4455, 2003.
- [11] GUERMONPREZ, P., L. SAVEANU, M. KLEIJMEER, J. DAVOUST, P. VAN ENDERT und S. AMIGORENA: *ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells*. *Nature*, 425(6956):397–402, 2003.
- [12] STRYER, L.: *Biochemie*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., 1999.
- [13] *Die blauen Ratgeber: Leukämie bei Erwachsenen*. Deutsche Krebshilfe e. V., 1/2007.
- [14] CICERI, F., C. BONINI, C. GALLO-STAMPINO und C. BORDIGNON: *Modulation of GvHD by suicide-gene transduced donor T lymphocytes: clinical applications in mismatched transplantation*. *Cytotherapy*, 7(2):144–149, 2005.
- [15] TRAVERSARI, C., S. MARKTEL, Z. MAGNANI, P. MANGIA, V. RUSSO, F. CICERI, C. BONINI und C. BORDIGNON: *The potential immunogenicity of the TK suicide gene does not prevent full clinical benefit associated with the use of TK-transduced donor lymphocytes in HSCT for hematologic malignancies*. *Blood*, 109(11):4708–4715, 2007.
- [16] FERRARA, J. L. M. und G. YANIK: *Acute graft versus host disease: pathophysiology, risk factors, and prevention strategies*. *Clin Adv Hematol Oncol*, 3(5):415–9, 428, 2005.
- [17] FERRARA, J. L. M. und P. REDDY: *Pathophysiology of graft-versus-host disease*. *Semin Hematol*, 43(1):3–10, 2006.
- [18] FERRARA, J. L. M.: *Novel strategies for the treatment and diagnosis of graft-versus-host-disease*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 20(1):91–97, 2007.
- [19] ALMYROUDIS, N. G., A. JAKUBOWSKI, D. JAFFE, K. SEPKOWITZ, E. PAMER, R. J. O'REILLY und G. A. PAPANICOLAOU: *Predictors for persistent cytomegalovirus reactivation after T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. *Transpl Infect Dis*, 9(4):286–294, 2007.
- [20] BATTIWALLA, M., Y. WU, R. P. S. BAJWA, M. RADOVIC, N. G. ALMYROUDIS, B. H. SEGAL, P. K. WALLACE, R. NAKAMURA, S. PADMANABHAN, T. HAHN und P. L. MCCARTHY: *Ganciclovir inhibits lymphocyte proliferation by impairing DNA synthesis*. *Biol Blood Marrow Transplant*, 13(7):765–770, 2007.

- [21] HESLOP, H. E. und C. M. ROONEY: *Adoptive cellular immunotherapy for EBV lymphoproliferative disease*. Immunol Rev, 157:217–222, 1997.
- [22] EINSELE, H., G. RAUSER, U. GRIGOLEIT, H. HEBART, C. SINZGER, S. RIEGLER und G. JAHN: *Induction of CMV-specific T-cell lines using Ag-presenting cells pulsed with CMV protein or peptide*. Cytotherapy, 4(1):49–54, 2002.
- [23] OZDEMIR, E., L. S. STJOHN, G. GILLESPIE, S. ROWLAND-JONES, R. E. CHAMPLIN, J. J. MOLLDREM und K. V. KOMANDURI: *Cytomegalovirus reactivation following allogeneic stem cell transplantation is associated with the presence of dysfunctional antigen-specific CD8+ T cells*. Blood, 100(10):3690–3697, 2002.
- [24] MODROW, S., D. FALKE und U. TRUYEN: *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- [25] BRITT, W. J. und S. BOPANA: *Human cytomegalovirus virion proteins*. Hum Immunol, 65(5):395–402, 2004.
- [26] YU, D., M. C. SILVA und T. SHENK: *Functional map of human cytomegalovirus AD169 defined by global mutational analysis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(21):12396–12401, 2003.
- [27] HOLTAPPELS, R., J. PODLECH, M.-F. PAHL-SEIBERT, M. JÜLCH, D. THOMAS, C. O. SIMON, M. WAGNER und M. J. REDDEHASE: *Cytomegalovirus misleads its host by priming of CD8 T cells specific for an epitope not presented in infected tissues*. J Exp Med, 199(1):131–136, 2004.
- [28] BIRON, K. K.: *Antiviral drugs for cytomegalovirus diseases*. Antiviral Res, 71(2-3):154–163, 2006.
- [29] GONCZOL, E. und S. PLOTKIN: *Development of a cytomegalovirus vaccine: lessons from recent clinical trials*. Expert Opin Biol Ther, 1(3):401–412, 2001.
- [30] RIDDELL, S. R., M. RABIN, A. P. GEBALLE, W. J. BRITT und P. D. GREENBERG: *Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression*. J Immunol, 146(8):2795–2804, 1991.
- [31] RIDDELL, S. R., B. A. WALTER, M. J. GILBERT und P. D. GREENBERG: *Selective reconstitution of CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in immunodeficient bone marrow transplant recipients by the adoptive transfer of T cell clones*. Bone Marrow Transplant, 14 Suppl 4:S78–S84, 1994.

- [32] VANNUCCHI, A. M., S. GLINZ, A. BOSI, R. CAPORALE und P. ROSSI-FERRINI: *Selective ex vivo expansion of cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes using dendritic cells pulsed with a human leucocyte antigen A*0201-restricted peptide*. Br J Haematol, 113(2):479–482, 2001.
- [33] FOSTER, A. E., D. J. GOTTLIEB, M. MARANGOLO, A. BARTLETT, Y.-C. LI, G. W. BARTON, J. A. ROMAGNOLI und K. F. BRADSTOCK: *Rapid, large-scale generation of highly pure cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy*. J Hematother Stem Cell Res, 12(1):93–105, 2003.
- [34] SZMANIA, S., A. GALLOWAY, M. BRUORTON, P. MUSK, G. AUBERT, A. ARTHUR, H. PYLE, N. HENSEL, N. TA, L. LAMB, T. DODI, A. MADRIGAL, J. BARRETT, J. HENSLEE-DOWNEY und F. VAN RHEE: *Isolation and expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes to clinical scale from a single blood draw using dendritic cells and HLA-tetramers*. Blood, 98(3):505–512, 2001.
- [35] LACEY, S. F., D. J. DIAMOND und J. A. ZAIA: *Assessment of cellular immunity to human cytomegalovirus in recipients of allogeneic stem cell transplants*. Biol Blood Marrow Transplant, 10(7):433–447, 2004.
- [36] BROSTERHUS, H., S. BRINGS, H. LEYENDECKERS, R. A. MANZ, S. MILTENYI, A. RADBRUCH, M. ASSENMACHER und J. SCHMITZ: *Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion*. Eur J Immunol, 29(12):4053–4059, 1999.
- [37] BETTS, M. R., J. M. BRENCHLEY, D. A. PRICE, S. C. DE ROSA, D. C. DOUEK, M. ROEDERER und R. A. KOUP: *Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation*. J Immunol Methods, 281(1-2):65–78, 2003.
- [38] MITTENDORF, E. A., C. E. STORRER, C. D. SHRIVER, S. PONNIAH und G. E. PEOPLES: *Evaluation of the CD107 cytotoxicity assay for the detection of cytolytic CD8+ cells recognizing HER2/neu vaccine peptides*. Breast Cancer Res Treat, 92(1):85–93, 2005.
- [39] CHUA, D., J. HUANG, B. ZHENG, S. Y. LAU, W. LUK, D. L. KWONG, J. S. SHAM, D. MOSS, K. Y. YUEN, S. W. IM und M. H. NG: *Adoptive transfer of autologous Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells for nasopharyngeal carcinoma*. Int J Cancer, 94(1):73–80, 2001.
- [40] FEUCHTINGER, T., P. LANG, K. HAMPRECHT, M. SCHUMM, J. GREIL, G. JAHN, D. NIETHAMMER und H. EINSELE: *Isolation and expansion of human adenovirus-*

- specific CD4+ and CD8+ T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy.* Exp Hematol, 32(3):282–289, 2004.
- [41] SYLWESTER, A. W., B. L. MITCHELL, J. B. EDGAR, C. TAORMINA, C. PELTE, F. RUCHTI, P. R. SLEATH, K. H. GRABSTEIN, N. A. HOSKEN, F. KERN, J. A. NELSON und L. J. PICKER: *Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects.* J Exp Med, 202(5):673–685, 2005.
- [42] ROZEN, S. und H. J. SKALETSKY: *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. I.* Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, Seiten pp 365–386, 2000.
- [43] BOYUM, A.: *Separation of white blood cells.* Nature, 204:793–794, 1964.
- [44] MAZUR, P.: *Freezing of living cells: mechanisms and implications.* Am J Physiol, 247(3 Pt 1):C125–C142, 1984.
- [45] SATO, M., T. TAKAYAMA, H. TANAKA, J. KONISHI, T. SUZUKI, T. KAIGA und H. TAHARA: *Generation of mature dendritic cells fully capable of T helper type 1 polarization using OK-432 combined with prostaglandin E(2).* Cancer Sci, 94(12):1091–1098, 2003.
- [46] THURNER, B., C. RÖDER, D. DIECKMANN, M. HEUER, M. KRUSE, A. GLASER, P. KEIKAVOUSSI, E. KÄMPGEN, A. BENDER und G. SCHULER: *Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application.* J Immunol Methods, 223(1):1–15, 1999.
- [47] ALLDAWI, L., M. TAKAHASHI, M. NARITA, F. AYRES, N. TSUKADA, Y. OSMAN, T. FURUKAWA und Y. AIZAWA: *Effect of prostaglandin E2, lipopolysaccharide, IFN-gamma and cytokines on the generation and function of fast-DC.* Cytotherapy, 7(2):195–202, 2005.
- [48] CHOI, G. S., J. M. KANG und M. G. LEE: *Analysis of methods for the generation of dendritic cells from human peripheral blood monocytes.* Yonsei Med J, 41(5):642–650, 2000.
- [49] NERSTING, J., M. SVENSON, V. ANDERSEN und K. BENDTZEN: *Maturation of human dendritic cells by monocyte-conditioned medium is dependent upon trace amounts of lipopolysaccharide inducing tumour necrosis factor alpha.* Immunol Lett, 89(1):59–65, 2003.

- [50] O'DOHERTY, U., R. IGNATIUS, N. BHARDWAJ und M. POPE: *Generation of monocyte-derived dendritic cells from precursors in rhesus macaque blood*. J Immunol Methods, 207(2):185–194, 1997.
- [51] CHALOUNI, C. M. und I. MELLMAN: *An eye for science*. Medicine@Yale (Online), July/August 2006 Volume 2 Issue 4:www.medicineat Yale.org, 2006.
- [52] RAUSER, G., H. EINSELE, C. SINZGER, D. WERNET, G. KUNTZ, M. ASSENMACHER, J. D. M. CAMPBELL und M. S. TOPP: *Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants*. Blood, 103(9):3565–3572, 2004.
- [53] HILCHEY, S. P. und S. H. BERNSTEIN: *Use of CFSE to monitor ex vivo regulatory T-cell suppression of CD4+ and CD8+ T-cell proliferation within unseparated mononuclear cells from malignant and non-malignant human lymph node biopsies*. Immunol Invest, 36(5-6):629–648, 2007.
- [54] QUAH, B. J. C., H. S. WARREN und C. R. PARISH: *Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*. Nat Protoc, 2(9):2049–2056, 2007.
- [55] MILOVANOVA, T. N.: *Comparative analysis between CFSE flow cytometric and tritiated thymidine incorporation tests for beryllium sensitivity*. Cytometry B Clin Cytom, 72(4):265–275, 2007.
- [56] SALTER, R. D., D. N. HOWELL und P. CRESSWELL: *Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids*. Immunogenetics, 21(3):235–246, 1985.
- [57] SALTER, R. D. und P. CRESSWELL: *Impaired assembly and transport of HLA-A and -B antigens in a mutant TxB cell hybrid*. EMBO J, 5(5):943–949, 1986.
- [58] MADIGAN, M. T., J. M. MARTIN und J. PARKER: *Brock Mikrobiologie*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., 2001.
- [59] MÜLHARDT, C.: *Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., 2002.
- [60] F. LOTTSPEICH, H. ZORBAS (HRSG.): *Bioanalytik*. Spektrum Akad. Vlg., Hdg., 1998.
- [61] VAUGHN, J. L., R. H. GOODWIN, G. J. TOMPKINS und P. MCCAWLEY: *The establishment of two cell lines from the insect Spodoptera frugiperda (Lepidoptera; Noctuidae)*. In Vitro, 13(4):213–217, 1977.

- [62] RANDOLPH, S. S. B., T. A. GOOLEY, E. H. WARREN, F. R. APPELBAUM und S. R. RIDDELL: *Female donors contribute to a selective graft-versus-leukemia effect in male recipients of HLA-matched, related hematopoietic stem cell transplants*. Blood, 103(1):347–352, 2004.
- [63] CHALANDON, Y., J.-M. TIERCY, U. SCHANZ, T. GUNGOR, R. SEGER, J. HALTER, C. HELG, B. CHAPUIS, A. GRATWOHL, A. TICHELLI, G. NICOLOSO DE FAVERRI, E. ROOSNEK, J. R. PASSWEG, SWISS TRANSPLANT WORKING GROUP FOR BLOOD, MARROW TRANSPLANTATION (STABMT) und SWISS NATIONAL DONOR REGISTRY: *Impact of high-resolution matching in allogeneic unrelated donor stem cell transplantation in Switzerland*. Bone Marrow Transplant, 37(10):909–916, 2006.
- [64] OTTINGER, H. D., S. FERENCIK, D. W. BEELEN, M. LINDEMANN, R. PECE-
NY, A. H. ELMAAGACLI und H. GROSSE-WILDE: *Impact of HLA-A,B,C allele mismatches on outcome after unrelated blood stem cell transplantation in whites*. Transplantation, 78(7):1077–1080, 2004.
- [65] BOECKH, M. und W. G. NICHOLS: *The impact of cytomegalovirus serostatus of donor and recipient before hematopoietic stem cell transplantation in the era of antiviral prophylaxis and preemptive therapy*. Blood, 103(6):2003–2008, 2004.
- [66] KANDA, Y., S. CHIBA, H. HIRAI, H. SAKAMAKI, T. ISEKI, Y. KODERA, T. KARASUNO, S. OKAMOTO, N. HIRABAYASHI, K. IWATO, A. MARUTA, Y. FUJIMORI, T. FURUKAWA, S. MINEISHI, K. MATSUO, N. HAMAJIMA und M. IMAMURA: *Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation from family members other than HLA-identical siblings over the last decade (1991-2000)*. Blood, 102(4):1541–1547, 2003.
- [67] SCHMID, C., M. SCHLEUNING, R. SCHWERDTFEGER, B. HERTENSTEIN, E. M. MISCHAK-WEISSINGER, D. BUNJES, S. V. HARS DORF, C. SCHEID, U. HOLTICK, H. GREINIX, F. KEIL, B. SCHNEIDER, M. SANDHERR, G. BUG, J. TISCHER, G. LEDDEROSE, M. HALLEK, W. HIDDEMANN und H.-J. KOLB: *Long-term survival in refractory acute myeloid leukemia after sequential treatment with chemotherapy and reduced-intensity conditioning for allogeneic stem cell transplantation*. Blood, 108(3):1092–1099, 2006.
- [68] SMITH, J. A. und G. S. PARI: *Expression of human cytomegalovirus UL36 and UL37 genes is required for viral DNA replication*. J Virol, 69(3):1925–1931, 1995.

- [69] OGAWA-GOTO, K., S. IRIE, A. OMORI, Y. MIURA, H. KATANO, H. HASEGAWA, T. KURATA, T. SATA und Y. ARAO: *An endoplasmic reticulum protein, p180, is highly expressed in human cytomegalovirus-permissive cells and interacts with the tegument protein encoded by UL48*. J Virol, 76(5):2350–2362, 2002.
- [70] TACKABERRY, E. S., A. K. DUDANI, F. PRIOR, M. TOCCHI, R. SARDANA, I. ALTOSAAR und P. R. GANZ: *Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B (UL55) in seeds of transgenic tobacco*. Vaccine, 17(23-24):3020–3029, 1999.
- [71] JARVIS, M. A., T. R. JONES, D. D. DRUMMOND, P. P. SMITH, W. J. BRITT, J. A. NELSON und C. J. BALDICK: *Phosphorylation of human cytomegalovirus glycoprotein B (gB) at the acidic cluster casein kinase 2 site (Ser900) is required for localization of gB to the trans-Golgi network and efficient virus replication*. J Virol, 78(1):285–293, 2004.
- [72] ARRODE, G., C. BOCCACCIO, J.-P. ABASTADO und C. DAVRINCHE: *Cross-presentation of human cytomegalovirus pp65 (UL83) to CD8+ T cells is regulated by virus-induced, soluble-mediator-dependent maturation of dendritic cells*. J Virol, 76(1):142–150, 2002.
- [73] FUHRMANN, S., M. STREITZ, P. REINKE, H.-D. VOLK und F. KERN: *T Cell Response to the Cytomegalovirus Major Capsid Protein (UL86) Is Dominated by Helper Cells with a Large Polyfunctional Component and Diverse Epitope Recognition*. J Infect Dis, 197(10):1455–1458, 2008.
- [74] WING, B. A., G. C. LEE und E. S. HUANG: *The human cytomegalovirus UL94 open reading frame encodes a conserved herpesvirus capsid/tegument-associated virion protein that is expressed with true late kinetics*. J Virol, 70(6):3339–3345, 1996.
- [75] NAMBOODIRI, A. M., K. M. ROCCA und J. P. PANDEY: *IgG antibodies to human cytomegalovirus late protein UL94 in patients with systemic sclerosis*. Autoimmunity, 37(3):241–244, 2004.
- [76] KHAN, N., M. COBBOLD, R. KEENAN und P. A. H. MOSS: *Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype*. J Infect Dis, 185(8):1025–1034, 2002.
- [77] SADANARI, H., R. YAMADA, T. YAMAGOSHI, K. OHNISHI, K. MATSUBARA, S. FUKUDA und J. TANAKA: *The major immediate-early genes of human cytomega-*

- lovirus induce two novel proteins with molecular weights of 91 and 102 kilodaltons.* Arch Virol, 145(6):1257–1266, 2000.
- [78] BORST, E. M., G. HAHN, U. H. KOSZINOWSKI und M. MESSERLE: *Cloning of the human cytomegalovirus (HCMV) genome as an infectious bacterial artificial chromosome in Escherichia coli: a new approach for construction of HCMV mutants.* J Virol, 73(10):8320–8329, 1999.
- [79] BORST, E. M., C. BENKARTEK und M. MESSERLE: *Use of bacterial artificial chromosomes in generating targeted mutations in human and mouse cytomegaloviruses.* Curr Protoc Immunol, Chapter 10:Unit 10.32, 2007.
- [80] CHALANDON, Y., S. DEGERMANN, J. VILLARD, L. ARLETTAZ, L. KAISER, S. VISCHER, S. WALTER, M. H. M. HEEMSKERK, R. A. W. VAN LIER, C. HELG, B. CHAPUIS und E. ROOSNEK: *Pretransplantation CMV-specific T cells protect recipients of T-cell-depleted grafts against CMV-related complications.* Blood, 107(1):389–396, 2006.
- [81] HEIJNEN, I. A. F. M., D. BARNETT, M. J. ARROZ, S. M. BARRY, M. BONNEVILLE, B. BRANDO, J.-L. D’HAUTCOURT, F. KERN, T. H. TÖTTERMAN, E. W. A. MARIJT, D. BOSSY, F. W. M. B. PREIJERS, G. ROTHE, J. W. GRATAMA und EUROPEAN WORKING GROUP ON CLINICAL CELL ANALYSIS: *Enumeration of antigen-specific CD8+ T lymphocytes by single-platform, HLA tetramer-based flow cytometry: a European multicenter evaluation.* Cytometry B Clin Cytom, 62(1):1–13, 2004.
- [82] GRATAMA, J. W. und J. J. CORNELISSEN: *Clinical utility of tetramer-based immune monitoring in allogeneic stem cell transplantation.* BioDrugs, 17(5):325–338, 2003.
- [83] HOBEIKA, A. C., M. A. MORSE, T. OSADA, M. GHANAYEM, D. NIEDZWIECKI, R. BARRIER, H. K. LYERLY und T. M. CLAY: *Enumerating antigen-specific T-cell responses in peripheral blood: a comparison of peptide MHC Tetramer, ELISpot, and intracellular cytokine analysis.* J Immunother, 28(1):63–72, 2005.
- [84] MORITA, Y., M. HOSOKAWA, M. EBISAWA, T. SUGITA, O. MIURA, Y. TAKAUE und Y. HEIKE: *Evaluation of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-lymphocytes in patients with the HLA-A*02 or HLA-A*24 phenotype undergoing hematopoietic stem cell transplantation.* Bone Marrow Transplant, 36(9):803–811, 2005.
- [85] KALPOE, J. S., P. L J VAN DER HEIDEN, N. VAESSEN, E. C J CLAAS, R. M. BARGE und A. C M KROES: *Comparable incidence and severity of cytomegalo-*

- virus infections following T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation preceded by reduced intensity or myeloablative conditioning.* Bone Marrow Transplant, 40(2):137–143, 2007.
- [86] RIDDELL, S. R. und P. D. GREENBERG: *The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells.* J Immunol Methods, 128(2):189–201, 1990.
- [87] RIDDELL, S. R., P. REUSSER und P. D. GREENBERG: *Cytotoxic T cells specific for cytomegalovirus: a potential therapy for immunocompromised patients.* Rev Infect Dis, 13 Suppl 11:S966–S973, 1991.
- [88] RIDDELL, S. R. und P. D. GREENBERG: *Principles for adoptive T cell therapy of human viral diseases.* Annu Rev Immunol, 13:545–586, 1995.
- [89] RIDDELL, S. R. und P. D. GREENBERG: *T cell therapy of human CMV and EBV infection in immunocompromised hosts.* Rev Med Virol, 7(3):181–192, 1997.
- [90] CASAZZA, J. P., M. R. BETTS, D. A. PRICE, M. L. PRECOPIO, L. E. RUFF, J. M. BRENCHLEY, B. J. HILL, M. ROEDERER, D. C. DOUEK und R. A. KOUP: *Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation.* J Exp Med, 203(13):2865–2877, 2006.
- [91] EINSELE, H., E. ROOSNEK, N. RUFER, C. SINZGER, S. RIEGLER, J. LÖFFLER, U. GRIGOLEIT, A. MORIS, H.-G. RAMMENSEE, L. KANZ, A. KLEIHAEUER, F. FRANK, G. JAHN und H. HEBART: *Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy.* Blood, 99(11):3916–3922, 2002.
- [92] PEGGS, K., S. VERFUERTH und S. MACKINNON: *Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions.* Blood, 97(4):994–1000, 2001.
- [93] KEEVER-TAYLOR, C. A., D. MARGOLIS, S. KONINGS, G. R. SANDFORD, C. A. NICOLETTE, C. LAWENDOWSKI und W. H. BURNS: *Cytomegalovirus-specific cytolytic T-cell lines and clones generated against adenovirus-pp65-infected dendritic cells.* Biol Blood Marrow Transplant, 7(5):247–256, 2001.
- [94] PAPANICOLAOU, G. A., J.-B. LATOUCHE, C. TAN, J. DUPONT, J. STILES, E. G. PAMER und M. SADELAIN: *Rapid expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes by artificial antigen-presenting cells expressing a single HLA allele.* Blood, 102(7):2498–2505, 2003.

- [95] COBBOLD, M., N. KHAN, B. POURGHEYSARI, S. TAURO, D. McDONALD, H. OSMAN, M. ASSENMACHER, L. BILLINGHAM, C. STEWARD, C. CRAWLEY, E. OLAVARRIA, J. GOLDMAN, R. CHAKRAVERTY, P. MAHENDRA, C. CRADDOCK und P. A. H. MOSS: *Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers*. J Exp Med, 202(3):379–386, 2005.
- [96] EINSELE, H., M. KAPP und G. U. GRIGOLEIT: *CMV-specific T cell therapy*. Blood Cells Mol Dis, 40(1):71–75, 2008.
- [97] GRIGOLEIT, G. U., M. KAPP, H. HEBART, K. FICK, R. BECK, G. JAHN und H. EINSELE: *Dendritic cell vaccination in allogeneic stem cell recipients: induction of human cytomegalovirus (HCMV)-specific cytotoxic T lymphocyte responses even in patients receiving a transplant from an HCMV-seronegative donor*. J Infect Dis, 196(5):699–704, 2007.
- [98] ZEHN, D., C. J. COHEN, Y. REITER und P. WALDEN: *Efficiency of peptide presentation by dendritic cells compared with other cell types: implications for cross-priming*. Int Immunol, 18(12):1647–1654, 2006.
- [99] LIN, C.-L., W.-F. LO, T.-H. LEE, Y. REN, S.-L. HWANG, Y.-F. CHENG, C.-L. CHEN, Y.-S. CHANG, S. P. LEE, A. B. RICKINSON und P. K. H. TAM: *Immunization with Epstein-Barr Virus (EBV) peptide-pulsed dendritic cells induces functional CD8+ T-cell immunity and may lead to tumor regression in patients with EBV-positive nasopharyngeal carcinoma*. Cancer Res, 62(23):6952–6958, 2002.
- [100] ROYER, P.-J., S. TANGUY-ROYER, F. EBSTEIN, C. SAPEDE, T. SIMON, I. BARBIEUX, R. OGER und M. GREGOIRE: *Culture medium and protein supplementation in the generation and maturation of dendritic cells*. Scand J Immunol, 63(6):401–409, 2006.
- [101] GUJAR, S. A. und T. I. MICHALAK: *Flow cytometric quantification of T cell proliferation and division kinetics in woodchuck model of hepatitis B*. Immunol Invest, 34(2):215–236, 2005.
- [102] PUTZ, T., R. RAMONER, H. GANDER, A. RAHM, G. BARTSCH, L. HÖLTL und M. THURNHER: *Monitoring of CD4+ and CD8+ T-cell responses after dendritic cell-based immunotherapy using CFSE dye dilution analysis*. J Clin Immunol, 24(6):653–663, 2004.

- [103] CHAN, K. S. und A. KAUR: *Flow cytometric detection of degranulation reveals phenotypic heterogeneity of degranulating CMV-specific CD8+ T lymphocytes in rhesus macaques*. J Immunol Methods, 325(1-2):20–34, 2007.
- [104] EWEN, C. L., J. RONG, A. I. KOKAJI, R. C. BLEACKLEY und K. P. KANE: *Evaluating antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses by a novel mouse granzyme B ELISPOT assay*. J Immunol Methods, 308(1-2):156–166, 2006.
- [105] NOWACKI, T. M., S. KUERTEN, W. ZHANG, C. L. SHIVE, C. R. KREHER, B. O. BOEHM, P. V. LEHMANN und M. TARY-LEHMANN: *Granzyme B production distinguishes recently activated CD8(+) memory cells from resting memory cells*. Cell Immunol, 247(1):36–48, 2007.
- [106] DORNER, B. G., H. R. C. SMITH, A. R. FRENCH, S. KIM, J. POURSINE-LAURENT, D. L. BECKMAN, J. T. PINGEL, R. A. KROCZEK und W. M. YOKOYAMA: *Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection*. J Immunol, 172(5):3119–3131, 2004.
- [107] BROXMEYER, H. E., A. DENT, S. COOPER, G. HANGOC, Z.-Y. WANG, W. DU, J. GERVAY-HAQUE, V. SRIRAM, G. J. RENUKARADHYA und R. R. BRUTKIEWICZ: *A role for natural killer T cells and CD1d molecules in counteracting suppression of hematopoiesis in mice induced by infection with murine cytomegalovirus*. Exp Hematol, 35(4 Suppl 1):87–93, 2007.
- [108] IVERSEN, A.-C., P. S. NORRIS, C. F. WARE und C. A. BENEDICT: *Human NK cells inhibit cytomegalovirus replication through a noncytolytic mechanism involving lymphotoxin-dependent induction of IFN-beta*. J Immunol, 175(11):7568–7574, 2005.
- [109] PROD'HOMME, V., C. GRIFFIN, R. J. AICHELER, E. C. Y. WANG, B. P. MCSHARRY, C. R. RICKARDS, R. J. STANTON, L. K. BORYSIEWICZ, M. LÓPEZ-BOTET, G. W. G. WILKINSON und P. TOMASEC: *The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells*. J Immunol, 178(7):4473–4481, 2007.
- [110] KAER, L. VAN und S. JOYCE: *Innate immunity: NKT cells in the spotlight*. Curr Biol, 15(11):R429–R431, 2005.
- [111] CAVA, A. LA, L. VAN KAER und FU-DONG-SHI: *CD4+CD25+ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators*. Trends Immunol, 27(7):322–327, 2006.
- [112] CHANG, D. H., N. LIU, V. KLIMEK, H. HASSOUN, A. MAZUMDER, S. D. NIMER, S. JAGANNATH und M. V. DHODAPKAR: *Enhancement of ligand-dependent*

- activation of human natural killer T cells by lenalidomide: therapeutic implications.* Blood, 108(2):618–621, 2006.
- [113] MORRIS, E. S., K. P. A. MACDONALD, V. ROWE, T. BANOVIC, R. D. KUNS, A. L. J. DON, H. M. BOFINGER, A. C. BURMAN, S. D. OLVER, N. KIENZLE, S. A. PORCELLI, D. G. PELLICCI, D. I. GODFREY, M. J. SMYTH und G. R. HILL: *NKT cell-dependent leukemia eradication following stem cell mobilization with potent G-CSF analogs.* J Clin Invest, 115(11):3093–3103, 2005.
- [114] YOSHIMOTO, T., H. OKAMURA, Y. I. TAGAWA, Y. IWAKURA und K. NAKANISHI: *Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon-gamma production from activated B cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 94(8):3948–3953, 1997.
- [115] YOSHIMOTO, T., K. TAKEDA, T. TANAKA, K. OHKUSU, S. KASHIWAMURA, H. OKAMURA, S. AKIRA und K. NAKANISHI: *IL-12 up-regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production.* J Immunol, 161(7):3400–3407, 1998.
- [116] KLENOVSEK, K., F. WEISEL, A. SCHNEIDER, UW. APPELT, S. JONJIC, M. MESSERLE, B. BRADEL-TRETHEWAY, T. H. WINKLER und M. MACH: *Protection from CMV infection in immunodeficient hosts by adoptive transfer of memory B cells.* Blood, 110(9):3472–3479, 2007.
- [117] ARRODE, G., C. BOCCACCIO, J. LULÉ, S. ALLART, N. MOINARD, J. P. ABASTADO, A. ALAM und C. DAVRINCHE: *Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells.* J Virol, 74(21):10018–10024, 2000.
- [118] TABI, Z., M. MOUTAFTSI und L. K. BORYSIEWICZ: *Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens.* J Immunol, 166(9):5695–5703, 2001.
- [119] MANDRON, M., H. MARTIN, B. BONJEAN, J. LULÉ, E. TARTOUR und C. DAVRINCHE: *Dendritic cell-induced apoptosis of human cytomegalovirus-infected fibroblasts promotes cross-presentation of pp65 to CD8+ T cells.* J Gen Virol, 89(Pt 1):78–86, 2008.
- [120] TIRAN, A., R. A. TIO, E. OOSTENVELD, M. C. HARMSSEN, B. TIRAN, P. DEN HEIJER, S. H. MONNINK, M. M. WILDERS-TRUSCHNIG und T. H. THE: *Humoral*

- immune response to human cytomegalovirus in patients undergoing percutaneous transluminal coronary angioplasty.* Clin Diagn Lab Immunol, 6(1):45–49, 1999.
- [121] ZANTEN, J. VAN, M. C. HARMSSEN, M. VAN DER GIESSEN, W. VAN DER BIJ, J. PROP, L. DE LEIJ und T. H. THE: *Humoral immune response against human cytomegalovirus (HCMV)-specific proteins after HCMV infection in lung transplantation as detected with recombinant and naturally occurring proteins.* Clin Diagn Lab Immunol, 2(2):214–218, 1995.
- [122] TANAKA, N., H. KIMURA, Y. HOSHINO, K. NISHIKAWA, S. KOJIMA, Y. NISHIYAMA und T. MORISHIMA: *Expression of tegument protein pp65 of human cytomegalovirus (CMV) and its application to the analysis of viral-specific cellular immunity in CMV-infected individuals.* Arch Virol, 147(12):2405–2417, 2002.

Abbildungsverzeichnis

1.1	Schema der Hämatopoese	2
1.2	Schema des Ablaufs der V-D-J-Rekombination [3].	4
1.3	Schema eines Antikörpermoleküls.	5
1.4	Schema des T-Zell-Rezeptors [4].	6
1.5	Aufbau des MHC-I-Moleküls [12].	10
1.6	Zeitlicher Verlauf einer HSCT und Auftreten von Komplikationen	17
1.7	Funktionelle Genomkarte des HCMV	21
1.8	Angriffspunkte verschiedener Nachweismethoden für Antigenerkennung durch T-Zellen	28
2.1	Schema zur Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation	42
2.2	Bild einer dendritischen Zelle	58
2.3	Schema zur Überlappung der Emmissionspektren von Fluoreszenzfarbstoffen	62
2.4	Ereignisfilterung bei der Tetramermessung	67
2.5	Schematische Darstellung der Weitergabe des Vitalfarbstoffes CFSE	73
2.6	Beladung der Platte für den Degranulationstest	81
2.7	Beschickung der 96-Loch-Platte für den Proliferationstest beim Medienvergleich	87
3.1	Rekonstitution der T-Zellen und der CMV-bindenden Zellen in UPN1482 .	137
3.2	Rekonstitution der T-Zellen und der CMV-bindenden Zellen in UPN1528 .	140
3.3	Nachweis CMV-bindender Zellen im Durchflusszytometer bei UPN1491 . .	142
3.4	Verteilung der CD4- (blau) und CD8-positiven (grau) Zellen in der IFN- γ -positiven Population	146
3.5	IFN- γ -sezernierende Zellen bei UPN1238	148
3.6	Rekonstitution von CD4-positiven und CD8-positiven CMV-T-Zellen bei UPN1238	149

3.7	Korrelation der Messwerte für IFN- γ -sezernierende Zellen aus der Zytometernalyse mit klinischen Daten bei UPN1238	150
3.8	Mitogen-induzierte Proliferation	152
3.9	Proliferationstest mit unspezifisch expandierten CMV-T-Zellen	153
3.10	Spezifische und unspezifische Färbung beim Sekretionstest	156
3.11	Bestimmung der IFN- γ -positiven Zellen und der CD4- und CD8-positiven Zellen beim Medienvergleich	159
3.12	Vergleich zwischen Sekretionstest aus frischem Material mit Sekretionstest und intrazellulärer Färbung von kryokonservierten Zellen	161
3.13	Unspezifische Expansion der CMV-T-Zellen beim Medienvergleich	163
3.14	HLA-Verteilung bei der Charakterisierung der aufgereinigten Zellfraktion .	165
3.15	Verteilung der CD3 ⁺ CD4 ⁺ -T-Zellen	174
3.16	Verteilung der CD3 ⁺ CD8 ⁺ -T-Zellen	175
3.17	Verteilung der NK-Zellen	176
3.18	Verteilung der B-Zellen	177
3.19	Verteilung der CD14 ⁺ -Zellen	178
3.20	Zellpopulationen im Eluat	180
3.21	Zellpopulationen in der IFN- γ -positiven Fraktion im Eluat	181
3.22	Kontrolle der PCR-Produkte	184
3.23	Kontrolle der Fragmente nach Gelelution	185
3.24	Kontrollgel <i>pCRblunt</i> -CMV-cDNA-Konstrukte	187
3.25	Deletion in UL36-1	188
3.26	Präparatives Gel nach RE-Spaltung	189
3.27	Kontrolle der <i>pENTR1a</i> -Konstrukte	190
3.28	Kontrolle der Bacmide mit PCR	191
3.29	Expressionstest	192
4.1	Störsignale beim Proliferationstest	207

A Lebenslauf, Publikationsliste, Erklärung zur Dissertation

Lebenslauf

Name: Sylvia Martina Claudia Borchers

geboren in: Hannover, Deutschland

geboren am: 26. Oktober 1978

Schulabschluss: Abitur am Gymnasium Lehrte, Jahrgang 1998

Studium: 1998 bis 2004 Studium der Biologie (Diplom) an der
Universität Hannover

Diplomarbeit: 2004 am Institut für Lebensmittelchemie; Titel "Das
Exoproteom von *Pleurotus sapidus* und *Marasmius
scorodonius*"

Doktorandenstelle: seit 2004 als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung
Hämatologie, Hämostaseologie, Onkologie und
Stammzelltransplantation, MHH

Publikationsliste, chronologisch

- (I) S. BORCHERS, S. LUTHER, B. GRABOW, A. GANSER, E.M. WEISSINGER *Monitoring of virus-specific immune reconstitution in patients after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation*. Haematologica, Volume 93, supplement no. 1, June 2008 (ahead of print); 0889 (Vortrag)
- (II) S. BORCHERS, S. LUTHER, J. KONTSENDORN, B. GRABOW, M. STADLER, H. DIEDRICH, S. BUCHHOLZ, M. EDER, A. GANSER, E. M. WEISSINGER *Monitoring patients for CMV-immunity after HSCT with MHC-I-peptide-tetramers - implications for follow up of CMV therapy*. Bone Marrow Transplantation Volume 41, Issue S1: S80-S343; P 876 (Poster)
- (III) E. M. WEISSINGER, S. BORCHERS, E. PROVASI, M. RADRIZZANI, C. BENNATI, C. GALLO STAMPINO, E. DAMMANN, E. SCHIFFER, J. KONTSENDORN, S. JÖRG, W. KUEHNAU, F. CICERI, N. VON NEUHOFF, H.-J. KOLB, M. STADLER, A. GANSER, B. HERTENSTEIN *Graft-versus-leukaemia with little graft-versus-host disease? A clinical phase I/II study using transfusion of transduced donor T-cells for donor leukocyte transfusion*. Bone Marrow Transplantation Volume 41, Issue S1: S80-S343; P 1019 (Poster)
- (IV) E. M. WEISSINGER, S. BORCHERS, A. SILVANI, E. PROVASI, M. RADRIZZANI, C. BENATI, C. G. STAMPINO, E. DAMMANN, J. SCHMIDTKE, W. KUEHNAU, F. CICERI, N. VON NEUHOFF, H.-J. KOLB, C. BONINI, A. GANSER AND B. HERTENSTEIN *Graft versus Leukemia with little Graft versus host disease? A clinical phase I/II study using transfusion of transduced donor T-cells for donor leukocyte transfusion*. submitted (Paper)
- (V) S. BORCHERS, B. GRABOW, S. LUTHER, J. KONTSENDORN, A. GANSER AND E. M. WEISSINGER *CMV specific tetramers - monitoring patients after stem cell transplantation*. Haematologica, Volume 92, supplement no. 1, June 2007; abstract no. 0210 (Poster)
- (VI) S. BORCHERS, A. SILVANI, E. PROVERSA, B. HERTENSTEIN, N. VON NEUHOFF, C. BONINI , F. CICERI, A. GANSER AND E. M. WEISSINGER *Using HSV-TK suicide gene transfer to improve the safety of DLI*. Haematologica, Volume 92, supplement no. 1, June 2007; abstract no. 0194 (Poster)

(VII) S. BORCHERS, M. HEUER, B. HERTENSTEIN, J. ALVES, A. GANSER, E. M. WEISSINGER *Adoptive transfer of CMV-specific T-cells selected for IFN- γ secretion by magnetic labeling: A closer look on the selected cells*. Haematologica, Volume 92, supplement no. 1, June 2007; abstract no. 1262 (Abstract)

(VIII) S. BORCHERS, B. GRABOW, S. LUTHER, M. HEUER, A. GANSER, E. M. WEISSINGER *Monitoring of virus-specific T-cells with virus-specific tetramers? implication for virus-specific T-cell therapy?* Bone Marrow Transplantation Volume 39, Issue S1: S56-S229; P 713 (Poster)

(IX) S. BORCHERS, A. SILVANI, E. PROVASI, M. RADRIZZANI, C. BENATI, C. G. STAMPINO, E. DAMMANN, J. SCHMIDTKE, W. KUEHNAU, F. CICERI, N. VON NEUHOF, H.-J. KOLB, C. BONINI, A. GANSER, B. HERTENSTEIN AND E. M. WEISSINGER *Graft versus Leukemia with little Graft versus host disease? A clinical phase I/II study using transfusion of transduced donor T-cells for donor leukocyte transfusion (Running title: Fate of HSV-Tk- T-cells after allo-HSCT)*. DG-GT Annual Meeting 2006 abstract book; abstract no. 2 (Vortrag)

(X) S. BORCHERS, M. TOPP, A. GANSER, H. EINSELE, E. M. WEISSINGER AND B. HERTENSTEIN *Isolation Of Cytomegalovirus (CMV) Specific T-Cells From Seropositive Donors: A Possible Tool For CMV-Prophylaxis*. ASH 47th annual meeting and exposition, abstract book "Abstracts2view"; abstract no. 3037 (Poster)

(XI) S. BORCHERS, M. TOPP, A. GANSER, H. EINSELE, E. M. WEISSINGER AND B. HERTENSTEIN *Isolation of Cytomegalovirus (CMV) specific T-cells from seropositive Donors: A possible tool for pre-emptive therapy?* Onkologie 2005; 28(suppl 3):1-275, abstract no. 201 (Poster)

Erklärung zur Dissertation

Hierdurch erkläre ich, dass die Dissertation “Gewinnung antigenspezifischer T-Zellen zum adoptiven Immuntransfer am Beispiel der Cytomegalievirusinfektion” selbstständig verfasst und alle benutzten Hilfsmittel sowie evtl. zur Hilfeleistung herangezogene Institutionen vollständig angegeben wurden.

Die Dissertation wurde nicht schon als Diplom- oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet.

Hannover, den

(Sylvia Borchers)