

Aus dem Institut für Medizinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Optimierte Peptide und Peptidpools zur Stimulation  
antigenspezifischer T-Zellen bei Zytomegalievirus

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Felix Kiecker

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. F. Kern

2. Prof. Dr. med. H. W. Doerr

3. Prof. Dr. med. Th. Dörner

Datum der Promotion: 19.09.2008

## Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	5
1.1 Das Humane Zytomegalievirus (HCMV)	5
1.1.1 Die HCMV-Infektion	5
1.1.2 Epidemiologie	7
1.1.3 Klinik der HCMV-Infektion	7
1.1.4 Diagnostik	7
1.1.5 Therapie	8
1.2 Das Immunsystem	9
1.2.1 Antigenerkennung durch T-Zellen	10
1.2.2 Haupthistokompatibilitätskomplex und Erkennungsmechanismen	12
1.2.3 Immunantwort gegen HCMV und mögliche klinische Applikationen	15
2 Problemstellung	19
3 Material und Methoden	21
3.1 Materialien	21
3.1.1 Probandenmaterial	21
3.1.2 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.3 Chemikalien, Lösungen, Medien, Puffer	21
3.1.4 Monoklonale Antikörper, Tetramere	23
3.1.5 Einzelpeptide	23
3.1.6 Peptidpools	24
3.1.7 HCMV-Viruslysate	25
3.2 Verwendete Geräte	27
3.3 Verwendete Software	28
3.4 Methoden	28
3.4.1 Zellpräparation	28
3.4.2 Protokoll zur Stimulation antigenspezifischer T-Zellen und intrazellulären Zytokindetektion unter Verwendung von PBMC	29
3.4.3 Antikörperfärbung	31
3.4.4 Durchflusszytometrische Analyse	31
3.4.5 Datenanalyse	33
3.4.6 Peptidsynthese mittels multiplem Peptidsynthesizer (MPS)	34
3.4.6.1 Grundlagen	34

---

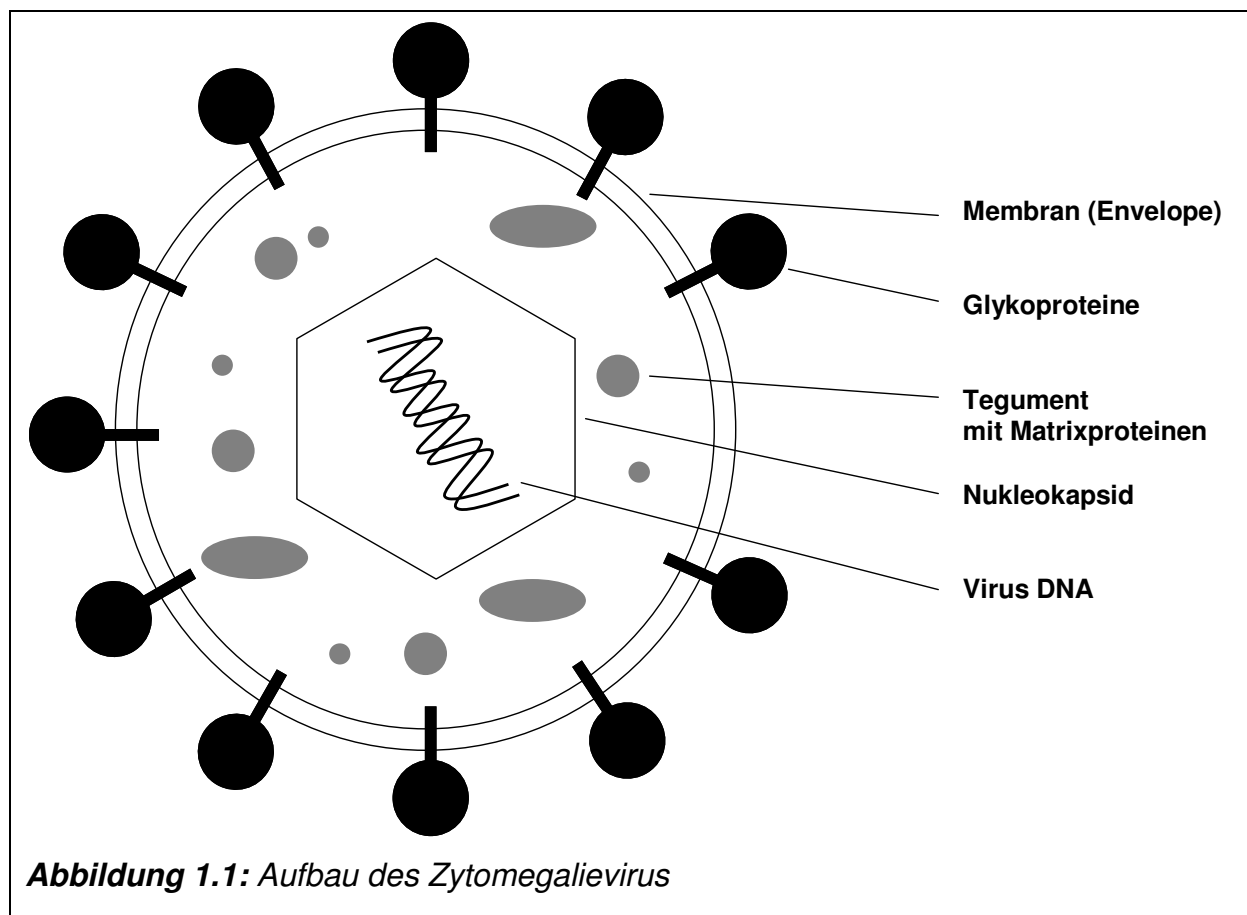
3.4.6.2 Peptidsynthese an Polystyrolharz mittels multiplem Peptidsynthesizer (MPS)	35
3.4.6.3 Abspaltung der Peptide	36
3.4.7 Analytische und präparative HPLC	37
3.4.8 Laserdesorptions-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF)	37
4 Ergebnisse	39
4.1 Vorversuche - Vereinheitlichung und Vereinfachung der Methode	39
4.1.1 Volumen der Probenansätze	39
4.1.2 Ablösen der Zellen von der Röhrchenwand	40
4.1.3 Vorinkubation der PBMC in verschiedenen Medien	42
4.1.4 Kostimulation	43
4.2 Welche Konfigurationen sollten Peptide und Peptidbibliotheken aufweisen, um bestimmten Anforderungen beim Einsatz als stimulierende Antigene gerecht zu werden ?	46
4.2.1 Analyse antigenspezifischer CD8-positiven T-Zellen durch Stimulation mit Peptiden einer Länge von neun bis zehn Aminosäuren	46
4.2.2 Länge der CD8-T-Zell-stimulierenden Peptide	47
4.2.3 Dosis-Wirkungs-Kurven Ergebnisse	49
4.2.4 Aminosäuren, die CD8-T-Zell-stimulierende Sequenzen flankieren, können erheblich die Stimulation stören und die Effektivität reduzieren	54
4.2.5 PP65-Gesamtmischung aus 9-AS-Peptiden	60
4.2.6 Stimulation von CD4-T-Zellen mittels Peptiden	62
5 Diskussion	66
5.1 Methodischer Teil	66
5.2 Welche Peptide sind für definierte Fragestellungen zu wählen ?	68
6 Zusammenfassung	74
7 Abkürzungsverzeichnis	76
8 Literaturverzeichnis	78
Danksagung	99
Veröffentlichungen, Vorträge, Präsentationen	100
Lebenslauf	101
Eidesstattliche Erklärung	102

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Humane Zytomegalievirus (HCMV)

#### 1.1.1 Die HCMV-Infektion

Das humane Zytomegalievirus (HCMV) ist das größte Herpesvirus. Es besteht aus einer Phospholipidmembran (Envelope) mit membranständigen Glykopeptiden, einer aus verschiedenen Proteinen aufgebauten Matrix (Tegument) und dem icosaedrischen Nukleokapsid (Core), welches eine lineare Doppelstrang-DNA umschließt (siehe Abbildung 1.1).



Das Virus weist mit etwa 230.000 Basenpaaren und über 200 offenen Leserahmen eines der größten Genome unter den Herpesviren auf [1].

Nach Infektion der Zelle wird die virale DNA zusammen mit Matrixproteinen in den Zellkern transportiert, wo es zur Replikation kommt. Der Replikationszyklus dauert etwa 24 Stunden [2, 3]. Zu Beginn wird die Transkription von immediate-early (IE) Genen durch das im Zellkern vorhandene pp65 aktiviert. Dabei werden die

Phosphoproteine IE-1 und IE-2 am stärksten exprimiert. Danach werden in der early (E) Phase Proteine hergestellt, die zur DNA- und Proteinsynthese benötigt werden (z. B. Virale DNA-Polymerase). In der late (L) Phase werden vor allem Strukturproteine wie z. B. pp65 synthetisiert. Nach der DNA-Synthese findet der Viruszusammenbau und die Freisetzung der Viruspartikel statt. Die Infektion kann dabei lytisch oder latent ablaufen. Es kommt zu typischen zytopathologischen Veränderungen wie Zellvergrößerung („Zytomegalie“) und von einem hellen Hof umgebene intranukleäre Einschlusskörpern („Eulenaugenzellen“). Im späteren Infektionsverlauf treten so genannte „dense bodies“ im Zytoplasma auf, die v. a. aus pp65 bestehen [4]. Das Protein pp65 ist den gesamten Replikationszyklus über präsent, was für die Immunogenität und für die Diagnostik eine wichtige Rolle spielt. Durch eine Reihe von Mechanismen ist das Virus in der Lage, dem Zugriff durch das Immunsystem zu entgehen und im Organismus zu persistieren [5, 6, 7]. Nach neueren Untersuchungen kommen jedoch viel häufiger klinisch unbemerkte Virus-Reaktivierungen vor als angenommen [8, 9, 10, 11].

Ein gesunder Mensch ist in der Lage die Infektion zu kontrollieren, so dass sie inapparent bleibt. Einen völlig anderen Verlauf nimmt die Infektion, wenn das Immunsystem nicht voll funktionstüchtig ist. Bei Immundefizienten kann es eine Reihe zum Teil schwerer Krankheitsbilder verursachen. Bei Herztransplantierten zum Beispiel ist die HCMV-Erkrankung immer noch eine der Haupttodesursachen [12, 13]. Immunsuppression durch Erkrankungen oder bei Organtransplantierten führt zu chronischer Antigenstimulation und Aktivierung des Immunsystems (z. B. durch chronische Infektionen oder nach Organtransplantation), was zu einer CMV-Reaktivierung führen kann [14, 15, 21]. Myelomonozytäre Vorläuferzellen im Knochenmark gelten dabei als wichtigstes Erregerreservoir, daneben persistiert das Virus in zirkulierenden Monozyten und Drüsenepithelien [16].

Die HCMV-Infektion ist darüber hinaus nach wie vor für schwere kongenitale Missbildungen verantwortlich [17].

Die Übertragung erfolgt altersabhängig intrauterin diaplazentar auf dem hämatogenen Weg, perinatal durch Zervixsekret oder postnatal in der Stillperiode über Muttermilch [22, 23], später über engen Kontakt (v. a. Sexualkontakte, Speichel) mit HCMV-Infizierten. Weiterhin von Bedeutung sind iatrogene Infektionen über Blut oder Blutprodukte bzw. Transplantationen [24, 25]. Einmal etabliert, bleibt die Infektion lebenslang bestehen. Das Virus kann durch Immunevasion der

vollständigen Eradikation durch das Immunsystem entgehen [26, 27, 28]. Dabei handelt es sich v. a. um Mechanismen, die mit dem Antigen-Präsentationsweg der Wirtszelle interferieren, so dass der Zugriff von T-Zellen verhindert wird. Eine andere Schutzfunktion stellt die Expression eines MHC-Klasse-I-Homologs dar, das vor NK-Zell-Zugriff schützt [18]. Weitere Mechanismen sind die Produktion von veränderten Interleukinen und Chemokinen, die Modulation der Komplementfaktoren, Signaltransduktion, Transkription und von anderen Zellfunktionen [19,20].

Dem normal ausgeprägten und nicht kompromittierten Immunsystem gelingt es trotzdem, das Virus zu kontrollieren.

### **1.1.2 Epidemiologie**

HCMV ist weltweit verbreitet und der Mensch ist der einzig bekannte Wirt. Die natürlichen Durchseuchungsgipfel liegen im Neugeborenen- bzw. Kleinkindalter sowie im jungen Erwachsenenalter.

Weltweit liegen die Durchseuchungsraten bei 40 bis 100% je nach geographischer Lage und nach soziohygienischem Status, in den Industrieländern bei ca. 60% [29].

### **1.1.3 Klinik der HCMV-Infektion**

Die Primärinfektion wie auch die Reaktivierung können eine ganze Reihe klinischer Manifestationen zeigen. Dabei unterscheidet man zwischen einem uncharakteristischen viralen Syndrom und den Endorgan-Erkrankungen (wie Pneumonitis, Hepatitis, Retinitis, Myokarditis u. a.) [31].

### **1.1.4 Diagnostik**

Zur Diagnostik einer CMV-Erkrankung stehen direkte Verfahren (Virusnachweis) und indirekte Verfahren (Nachweis virusspezifischer Immunreaktionen) zur Verfügung. Bei den direkten Nachweisverfahren stellt die CMV-Nukleinsäuretestung mit PCR bzw. real time PCR die Methode der Wahl bei Organsymptomatik dar [30, 32]. Als Material können Liquor, bronchoalveoläre Lavage, Biopsiematerial und Leukozyten bzw. Vollblut dienen [33]. Ältere nichtmolekulare Verfahren wie die Virusisolierung (Anzucht auf Zellkultur), die modifizierte Virusisolierung (Schnellverfahren) sowie der pp65-Antigenämietest haben aber ihre Bedeutung beibehalten. Sie sind meist preiswerter und in vielen Fällen gleichermaßen aussagekräftig. Die Bestimmung der

Viruslast hat sowohl diagnostische als auch prognostische Aussagekraft und dient dem Therapiemonitoring [34].

Bei den indirekten Methoden steht der Nachweis von CMV-spezifischen Antikörpern mittels ELISA als Screeningmethode vor Transplantationen und bei der Auswahl von Blutspendern für CMV-negative Immunsupprimierte zur Verfügung [35].

Eine Quantifizierung der CMV-spezifischen zellulären Immunität mittels In-vitro-Stimulation spezifischer T-Zellen und durchflusszytometrischer Messung ist bislang der Forschung vorbehalten, ermöglicht jedoch die Erschließung wirtsbezogener Aspekte als diagnostische und prognostische Parameter und könnte in absehbarer Zeit in die Routinediagnostik Einzug halten [36, 37, 38]. Dabei sind in der letzten Zeit erhebliche Fortschritte gerade bei der Analyse der T-Zell-Antwort auf Einzelzellebene gemacht worden, z. B. durch den Einsatz von MHC-Peptid-Tetrameren [38, 39, 40].

### **1.1.5 Therapie**

Bei Patienten, die wie Organtransplantierte oder auch AIDS-Patienten ein hohes Risiko für die Entwicklung einer CMV-Erkrankung haben, ist die prophylaktische Behandlung sinnvoll, wobei routinemäßig antivirale Medikamente zum Einsatz kommen [41]. In vielen Veröffentlichungen und auch Empfehlungen verschiedener Fachgesellschaften werden die Nukleosidanaloga Ganciclovir und zunehmend auch Valganciclovir (höhere orale Bioverfügbarkeit) bevorzugt [41, 42, 43].

Durch die prophylaktische Therapie wird das Risiko, eine CMV-Erkrankung nach einer Organtransplantation zu entwickeln, deutlich gesenkt. Ob so auch die Rate von Abstoßungsreaktionen vermindert werden kann, ist noch nicht abschließend geklärt [44, 45].

Eine sicher wirksame Impfung steht zur Zeit noch nicht zur Verfügung, obwohl schon seit längerer Zeit an der Entwicklung von Vakzinierungsstrategien gearbeitet wird [47, 48]. Es werden aktuell jedoch verschiedene Ansätze in präklinischen und klinischen Studien in Hinblick auf Wirksamkeit und Sicherheit untersucht, darunter Peptidvakzinen, DNA-Vakzinen, Vakzinierung mittels Vektoren wie z. B. attenuierte Pox- und Alphaviren [46].

Eine symptomatische HCMV-Erkrankung wird standardmäßig mit Ganciclovir intravenös für mindestens fünf Tage gefolgt von Ganciclovir bzw. Valganciclovir oral behandelt. Die deutlich toxischeren Substanzen Foscarnet und Cidofovir sind



Reservemedikamente [49, 50, 51] – neuerdings auch Leflunomid [52]. Bei klinisch schwerem Verlauf kommt auch der Einsatz von Hyperimmunglobulin in Frage.

Die antivirale Therapie kann die Replikation des HCMV allerdings nicht immer vollständig unterdrücken, so dass Resistenzen gegenüber den Virostatika auftreten können [53, 54, 55]. Li et al. fanden in ihrem Patientenkollektiv, dass 1,5% der Herztransplantierten eine Ganciclovir-Resistenz entwickeln. Das waren 12,5% der Patienten, bei denen eine CMV-Erkrankung zum Ausbruch kam [56].

## **1.2 Das Immunsystem**

Als Immunsystem wird das Abwehrsystem höherer Lebewesen bezeichnet, das in den Körper eingedrungene Mikroorganismen und fremde Substanzen entfernt und außerdem in der Lage ist, körpereigene maligne entartete Zellen zu zerstören. Auch einfache Organismen besitzen eine angeborene (unspezifische) Immunabwehr, die phylogenetisch sehr früh entstand und seitdem weitgehend unverändert blieb [57].

Die Wirbeltiere entwickelten zusätzlich eine adaptive Immunabwehr, die sie noch effektiver vor Krankheitserregern schützt.

Zur angeborenen Abwehr zählen anatomische und physiologische Barrieren wie Epithelien, zellvermittelte Reaktionen (z. B. Phagozytose), allgemein entzündliche Reaktionen und das Komplementsystem.

Mikroorganismen, die diese Barrieren überwinden, werden von Molekülen, sowie von speziellen Zellen (Makrophagen, natürlichen Killerzellen und neutrophilen Granulozyten) attackiert, die sie durch genetisch kodierte Rezeptoren erkennen.

Somit können Pathogene bekämpft werden, ohne dass der Organismus zuvor mit dem Erreger Kontakt gehabt haben muss. Zu diesen speziellen Rezeptoren gehören die so genannten Toll-like Rezeptoren (TLR) [58] und das zytosolisch lokalisierte retinoic acid inducible gene I (RIG-I). Das Immunsystem nutzt dabei unveränderliche Merkmale der Krankheitserreger - so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) [59, 60].

Makrophagen und neutrophile Granulozyten enthalten das Inflammasom, das durch Bakterienbestandteile stimuliert wird, was in der Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  mündet [61, 62].

Die adaptive Immunabwehr zeichnet sich durch die Anpassungsfähigkeit gegenüber neuen oder veränderten Pathogenen aus. Ihre Zellen sind in der Lage, spezifische Strukturen (Antigene) zu erkennen und gezielt zelluläre Abwehrmechanismen

einzusetzen und Antikörper zu bilden. Neben Antigenpräsentierenden Zellen (APC) stellen zwei Gruppen von Zellen die wesentlichen Elemente der adaptiven Immunität dar. Die T-Lymphozyten, welche die zellvermittelte Immunantwort gewährleisten und die B-Lymphozyten unterstützen, sowie die B-Lymphozyten selbst, die für die humorale Immunität verantwortlich sind.

Nach einer abgelaufenen Immunantwort bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, um bei erneutem Kontakt mit dem Krankheitserreger binnen kurzer Zeit wieder eine angemessene Abwehrreaktion aufzubauen.

Das adaptive Immunsystem ersetzt aber nicht das angeborene, sondern ergänzt es. Die verschiedenen Bestandteile bedingen sich gegenseitig - erst durch ein gut koordiniertes Zusammenspiel der angeborenen und adaptiven Immunabwehr wird die komplexe Immunreaktion des Körpers ermöglicht [63].

### **1.2.1 Antigenerkennung durch T-Zellen**

T-Zellen können mit Hilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) Peptide erkennen, die von anderen Zellen mit Hilfe der Haupthistokompatibilitäts-Moleküle (MHC-Moleküle) präsentiert werden (s. u.). Der TCR ist aus zwei Ketten aufgebaut, die zur Immunglobulin-Superfamilie gehören. Die variablen Regionen der Ketten haben jeweils drei hypervariable Regionen, die entscheidend für die Antigenbindung und MHC-Erkennung sind. Der TCR ist mit anderen Molekülen wie CD3 assoziiert. Diese akzessorischen Moleküle sind für die Weiterleitung des TCR-Signals ins Zellinnere verantwortlich [69].

Das Glykoprotein CD4 wird auf der Zelloberfläche von T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert. Auf T-Zellen ist CD4 ein Korezeptor des TCR, dessen Signal es verstärkt. Es gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und weist vier extrazelluläre Domänen (D1-4) auf. D1 interagiert mit der beta-2-Domäne von MHC-II-Molekülen [69].

CD8 ist ein Glykoprotein, das ebenfalls als Korezeptor für den TCR fungiert. Es wird v. a. auf zytotoxischen T-Zellen exprimiert, zudem wird es auf NK-Zellen gefunden. CD8 bindet spezifisch an MHC-I-Moleküle. Erst nach Dimerisierung ist es funktionell. Am häufigsten ist die Formation CD8-alpha und CD8-beta-Kette, beide gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Die extrazelluläre Domäne von CD8 interagiert mit der alpha 3-Domäne von MHC-Klasse-I-Molekülen [69].

Die Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen erfolgt durch Interaktion zwischen dem TCR und dem an das MHC-Molekül gebundene Peptid. Außerdem ist ein zweites, kostimulatorisches Signal notwendig, da das eine Signal alleine zum Tod der T-Zelle führen würde. Das kostimulatorische Signal kann z. B. über eine Interaktion zwischen CD28 und CD80 (B7-1) oder CD86 (B7-2) erfolgen [64].

Zytotoxische T-Zellen verfügen über ein Repertoire an direkten und indirekten Mechanismen, um als fremd erkannte Zielzellen zu zerstören [68,65].

Als direkte Mechanismen bezeichnet man die Sekretion von Granzymen und Perforinen oder die Wechselwirkungen des Moleküls Fas (CD95) mit seinem Liganden (CD95L).

CD8 T-Zellen können nach Aktivierung Perforin aus ihren Granula freisetzen. Es baut sich in die Zellmembran der Zielzelle ein, formiert eine Pore und ebnet so Granzyme B den Weg in die Zelle, um Apoptose auslösen zu können. Dies geschieht durch Aktivierung von Caspasen, die schließlich zur Aktivierung von DNase führt. Das Enzym DNase degradiert DNA, woraufhin die Apoptose eingeleitet wird. Zudem aktiviert Granzyme B das Protein Bid, welches die Proteine Bax und Bak rekrutiert, und so die Membranpermeabilität der Mitochondrien ändert. Es kommt zur Cytochrom-C-Freisetzung (benötigt, um die Initiator-Caspase 9 zu aktivieren, die wiederum die Caspasen 3 und 7 aktiviert, die die Zelle schließlich zerstören), sowie zur Freisetzung u. a. von Smac/Diablo und Omni/HtrA2 (Suppressoren der Apoptoseinhibitoren) [66].

Fas Ligand (FasL) ist ein Typ II Transmembranprotein, das zur TNF-Familie gehört.

FasL ist ein Homotrimer, das nach Bindung von auf der Zielzelle exprimiertem Fas zu dessen Trimerisation führt. Daraufhin wird der Rezeptor-Komplex (Death inducing Signalling Complex, DISC) über das endosomale System internalisiert. Das Adaptor-molekül FADD (Fas-associated death domain) bindet an die Todesdomäne von Fas. Es kommt zur Bindung von Caspase 8, die sich daraufhin selbst proteolytisch aktiviert und vom DISC ins Zytosol dissoziiert, wo andere Effektorcaspasen aktiviert werden. Dies wiederum führt zur DNA-Degradation und konsekutiv zur Apoptose [67].

Indirekte CD8 T-Zell-vermittelte Mechanismen haben einen nur geringen unmittelbaren zytotoxischen Effekt auf die Zielzelle. Sie beeinflussen andere Zellen und vermitteln so indirekt Zytotoxizität, können aber auch direkt auf die Zelle wirken und z. B. die Virusreplikation beeinflussen [68]. Dazu zählt die Sekretion von

Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ). Dabei handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin mit einer Vielzahl von immunmodulatorischen Effekten, so kann es z. B. die Expression von MHC-Molekülen steigern, Endothelzellen, Granulozyten, Makrophagen, T- und NK-Zellen aktivieren und die Differenzierung von T- sowie B-Zellen einleiten [69].

Der Antigenkontakt führt aber nicht nur zur Aktivierung von CD8-positiven T-Zellen, sondern auch zu deren Proliferation und Differenzierung zu Effektorzellen, deren Aufgabe die Antigenelimination ist. Bleibt ein weiterer Antigenkontakt aus, sterben die meisten Zellen durch Apoptose wieder ab. Ein kleiner Teil der Zellen wird zu ruhenden Gedächtniszellen, die bei erneuter Antigenexposition innerhalb kurzer Zeit eine starke Immunantwort mit erneuter klonaler Zellexpansion aufzubauen können.

Für die Antigenerkennung durch CD4 T-Zellen ist die Peptidpräsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle notwendig. CD4 T-Zellen können diese MHC-gebundenen Antigene mit Hilfe ihres TCR binden. Ist dies der Fall so werden sie aktiviert, was u. a. die Sekretion einer Reihe von Zytokinen wie IFN $\gamma$  zur Folge hat.

Die sezernierten Zytokine wirken nun auf andere Zellen des Immunsystems und aktivieren diese. B-Zellen beispielsweise differenzieren zu Plasmazellen und bilden Antikörper, Makrophagen werden zur Phagozytose angeregt [70].

### **1.2.2 Haupthistokompatibilitätskomplex und Erkennungsmechanismen**

Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC) umfasst eine Gruppe von Genen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6, die wichtige Proteine für die Immunerkennung, die Gewebeverträglichkeit bei Transplantationen [71] und die immunologische Individualität codieren [72].

Diese Genprodukte (MHC-Moleküle) sind Antigene auf der Oberfläche jeder Körperzelle, die Zellen als zum Körper gehörig kennzeichnen. Beim Menschen heißen sie humane Leukozytenantigene (HLA) [73].

Damit Antigene von T-Lymphozyten erkannt werden können, müssen sie zuvor aufbereitet und auf spezifischen Rezeptoren, den vom MHC-Komplex kodierten Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen, auf der Zelloberfläche präsentiert werden (MHC-Restriktion).

Bei der Klasse I werden HLA-A, -B und -C unterschieden, bei der Klasse II HLA-DR, -DP und -DQ. Zu den Klasse-III-Molekülen gehören die Komplementfaktoren C2, C4 sowie Bf-Plasmaproteine, die an der unspezifischen Immunabwehr beteiligt sind und funktionell nicht zum MHC-System gehören.

Im Gegensatz zu Antikörpern, die in extrazellulären Räumen vorhandene Antigene (Ag) binden, können T-Zellen nur an MHC-Moleküle gebundene Ag erkennen. Sie erkennen mit ihrem Rezeptor einen Komplex aus antigenem Peptid und präsentierendem MHC-Molekül auf den Ag-präsentierenden Zellen.

MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen beim Menschen aus einer transmembranären alpha-Kette, die aus drei Domänen (alpha 1 bis 3) besteht, und dem beta-2-Mikroglobulin.

Die beiden extrazellulären Domänen alpha 1 und 2 bilden eine Bindungsspalte, in der Peptide einer Länge von 7-13 AS – in aller Regel 9 – Platz finden [74].

Diese Peptide sind Fragmente, die beim Abbau von zelleigenen Proteinen im Proteasom entstehen und an der Zelloberfläche immunkompetenten Zellen präsentiert werden. Die präsentierten Peptide stellen einen Querschnitt der in den Zellen synthetisierten Proteine dar. HLA-Klasse-I-Moleküle finden sich auf allen kernhaltigen Körperzellen, die damit Peptide präsentieren, die einen Querschnitt der im Zytoplasma enthaltenen von der Zelle selbst synthetisierten Proteine repräsentieren. Sie werden dem Immunsystem über den so genannten endogenen Präsentationsweg dargeboten. Auch Peptide, die aus viralen Proteinen in virusinfizierten Zellen stammen und solche aus mutierten Proteinen in Tumorzellen, werden so präsentiert.

Variationen in der Aminosäuresequenz im Bereich der Bindungsspalte führen zu den unterschiedlichen HLA-Allelen mit verschiedener Antigenspezifität.

Durch den Vergleich von Peptiden, die von bestimmten HLA-Molekülen gebunden wurden, konnte gezeigt werden, dass diese Peptide häufig gleiche oder gleichartige Aminosäurereste an bestimmten Positionen aufweisen (Bindungsanker).

Als Bindungsmotiv bezeichnet man eine Aminosäuresequenz, die vom entsprechenden HLA-Molekül erkannt und gebunden wird. Diese Sequenz ist von der Struktur des MHC-Allomorphs in der Peptidbindungsspalte abhängig. Durch Röntgenstrukturanalysen wurde gezeigt, dass sich MHC-I- und MHC-II-Moleküle im Bereich der Bindungsspalte strukturell sehr ähnlich sind, selbst bei unterschiedlichen Spezies wie Maus und Mensch [75, 76, 77].

Die meisten durch HLA-Klasse-I-Moleküle gebundenen Peptide weisen zwei Bindungsankerpositionen auf, die in einem engen Kontakt mit dem MHC-Molekül stehen. Der eine ist meistens der AS-Rest an Position 2, der andere der C-terminale AS-Rest.

Bei HLA-A\*0201 entsprechen die Aminosäuren an den Positionen 2 und 9 solchen Ankerpositionen. Frühere Daten aus Peptid-Poolsequenzierungen, die an MHC-I gebunden waren, zeigten, dass für diese Ankerpositionen bestimmte Aminosäuren bevorzugt sind. Im Falle von HLA-A\*0201 sind Leucin und Valin die bevorzugten Ankeramino-säuren an diesen Positionen. Es gibt auch subdominante Anker, die nicht so eng wie die Hauptankerpositionen mit dem MHC in Kontakt stehen, wie z. B. die Aminosäure an Position 6 für HLA-A\*0201. Abbildung 1.2 verdeutlicht dies am Beispiel einiger HLA-A\*0201 präsentierter Peptide.

<b>G</b> I L G F V F T L	Influenza-Matrixprotein (59-68)
W <b>L</b> S L L V P F <b>V</b>	Hepatitis B sAg (335-343)
D L M G Y I P L <b>V</b>	Hepatitis C Matrixprotein (17-25)
Y <b>M</b> D G T M S Q <b>V</b>	Tyrosinase (369-377)
I L K E P V H G <b>V</b>	Reverse Transkriptase von HIV (476-484)
N L V P M V A T <b>V</b>	HCMV Matrixprotein pp65 (489-507)

**Abbildung 1.2:** Die Bindungsanker (fett dargestellt) von T-Zell-Epitopen, die von HLA-A\*0201 präsentiert werden, ähneln sich trotz ihrer sehr unterschiedlichen Herkunft stark. Bei diesem Beispiel ist der Bindungsanker an Position 2 am häufigsten Leucin (L), daneben finden sich auch andere aliphatische AS wie Valin (V), Methionin (M), Isoleucin (I), Alanin (A) und Treonin (T) [74].

Die Kenntnisse der Bindungsmotive für eine Reihe von HLA-Allelen erlaubt eine Vorhersage, welche Peptide von welchen HLA-Allelen präsentiert werden können [78]. Im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I-Molekülen ist die Bindungsspalte der Klasse-II-Moleküle zu beiden Seiten offen. Die N- und C-Termini der Peptide sind nicht in den Spalten der Peptidbindungsregion verankert, wodurch die Peptide länger als bei den MHC-I-Molekülen sein können. Die Röntgenstrukturanalysen von HLA-DR1, an dem ein Hämagglutinin-Peptid von Influenzavirus gebunden war, zeigten nur 9 AS innerhalb der Peptidbindungsspalte [79]. Im Gegensatz zu MHC-I-Molekülen erlauben die MHC-II-Moleküle eine relativ degenerierte Peptidbindung [80].

Typischerweise haben Klasse-II-präsentierte Peptide eine Länge von 15 bis 18 AS [74], es kommen aber auch viel kürzere (<9) und längere (>24) Liganden vor.

MHC-Klasse-II-Moleküle finden sich nur auf der Oberfläche von professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APC) wie Makrophagen, Langerhanszellen und dendritischen Zellen sowie auf B-Zellen.

Die APC nehmen Antigene aus ihrer Umgebung durch Endozytose auf und präsentieren sie – MHC-Klasse-II-gebunden – den CD4-positiven T-Helferzellen (exogener Präsentationsweg). T-Helferzellen sind zentrale Organisatoren der Immunantwort. Sie haben ein breites Repertoire an Zytokinen, das sie ausschütten können. Je nach der Zusammensetzung beeinflussen sie die Art der resultierenden Immunantwort. Sie werden aber auch durch die APC mittels kostimulatorischer Signale und Zytokine beeinflusst. Auf diese Weise kommt APC eine entscheidende Rolle bei der Antigenpräsentation und Induktion einer Immunantwort zu [81].

### **1.2.3 Immunantwort gegen HCMV und mögliche klinische Applikationen**

Eine HCMV-Infektion ruft sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervor. Die Interaktion von HCMV mit dem Immunsystem ist überaus komplex. HCMV selbst wirkt immunsuppressiv und versucht über verschiedene Mechanismen, der Elimination durch das Immunsystem zu entgehen [5, 82]. So wird vor allem die Expression des MHC-I-Komplexes aber auch in geringerem Maße die des MHC-II-Komplexes herunterreguliert und dadurch die Antigenpräsentation und -erkennung eingeschränkt [83]. Schon Ende der 70er Jahre gab es Hinweise darauf, dass die HCMV-Infektion durch HCMV-spezifische Zellen kontrolliert wird. Beim Vergleich von Patienten mit klinisch manifester mononukleoseähnlicher HCMV-Erkrankung mit Gesunden fanden Levin et al. 1979 eine deutlich schwächere Proliferationsantwort der Patienten [84]. Es wurde zunächst vermutet, dass die akute CMV-Infektion eine proliferative Antwort durch mononukleäre Zellen unterdrückt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine deutliche Korrelation zwischen der Gegenwart einer zytotoxischen HCMV-spezifischen T-Zell-Antwort und dem Verlauf der HCMV-Erkrankung besteht [85, 86, 87], so dass der Schluss gezogen wurde, dass HCMV-spezifische zytotoxische T-Zellen entscheidend für die Kontrolle der Erkrankung sind [88, 89].

Zunächst wurde am Maus-Modell gezeigt, dass ein adoptiver Transfer von CD8 T-Zellen vor der Entwicklung klinischer Manifestationen bei HCMV-Infektion schützt [90, 91]. Später wurde dies auch am Menschen gezeigt:

Ridell et al. 1992 beobachteten, dass mit dem adoptiven Transfer von CD8 T-Zelllinien bei drei Transplantationspatienten eine signifikant protektive Wirkung von HCMV-spezifischen CD8 T-Zellen in Bezug auf die Inzidenz schwerer HCMV-Infektionen erreicht werden konnte [92].

Eine 1995 veröffentlichte Studie von Walter et al. bestätigte diese protektive Wirkung [93]. Bei Knochenmarktransplantierten Patienten, denen HCMV-spezifische CD4 T-Zellen fehlten, nahm die HCMV-spezifische CTL-Aktivität jedoch bald wieder ab.

Bei der Generierung von HCMV-spezifischen T-Zellen wurden bisher verschiedene Strategien verfolgt. Zum einen wurden CTLs ex vivo mittels CMV-infizierten Fibroblasten als Stimulatorzellen induziert [93]. Diese Methode ist für den klinischen Einsatz allerdings ungeeignet, da hierbei ein erhebliches Infektionsrisiko vorliegt.

Eine andere Möglichkeit stellt die ex vivo Induktion HCMV-spezifischer CTLs mit dendritischen Zellen dar, die entweder mit Peptiden [94, 95] oder mit CMV-Antigen gepulst wurden [96, 108]. Beide Verfahren sind sehr arbeits- und zeitaufwendig.

Auch neuere Untersuchungen konnten die Wichtigkeit der CD8 T-Zell-Antwort unterstreichen, so konnten Bunde et al. zeigen, dass IE1-spezifische CD8-positive T-Zellen bei Transplantierten mit dem Schutz vor einer CMV-Erkrankung assoziiert ist [129].

Bei der Analyse der Rolle der HCMV-spezifischen CD4 T-Zellen fanden von Boland et al. (1993) bei Organtransplantierten [97] und Ljungman et al. (1993) bei Knochenmarktransplantierten [49] eine Korrelation zwischen der HCMV-spezifischen proliferativen Antwort und der Bewältigung bzw. Kontrolle der HCMV-Infektion, wobei die CD4 T-Zell-Antwort die überwiegende proliferative Antwort darstellte.

Bei Knochenmarktransplantierten konnte in den meisten Fällen eine frühere Rekonstitution der CD4 T-Zell-Antwort im Vergleich zur CD8 T-Zell-Antwort gefunden werden [99], wobei die CD4 T-Zell-Rekonstitution die Voraussetzung für die HCMV-spezifische CTL-Antwort zu sein schien.

Ljungman et al. zeigten in einer Studie (1993), dass eine fehlende proliferative CD4 T-Zell-Antwort mit einem erhöhten Risiko für eine interstitielle Pneumonie im Rahmen einer klinisch manifesten HCMV-Erkrankung einhergeht [98], und Einsele (1993)



erkannte, dass eine persistierende CD4 Lymphopenie generell die Entwicklung einer manifesten HCMV-Erkrankung begünstigt [100].

Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass für einen Langzeitschutz vor CMV-Erkrankung zusätzlich zu den spezifischen CD8 T-Zellen spezifische CD4 T-Zellen notwendig sind [93].

In letzter Zeit verdichteten sich die Hinweise darauf, dass die T-Helfer-Zellen eine wichtigere Rolle als bisher angenommen spielen – vor allem bei der Langzeitrekonstitution der Immunantwort gegen HCMV [101, 102, 103, 104, 105, 106]. Es konnten CMV-spezifische zytolytische CD4-positiv T-Zellen bei Patienten, deren Viruslast nach primärer Infektion abgefallen war, beobachtet werden [130]. Die Wichtigkeit der CMV-spezifischen CD4-positiven Zellen wird dadurch noch unterstrichen, dass eine verzögerte CD4 T-Zell-Antwort mit dem Auftreten von Krankheitssymptomen einer CMV-Erkrankung bei Nierentransplantierten korreliert werden konnte [131]. Dies führte zu Versuchen, beide T-Zell-Subpopulationen im Rahmen eines adoptiven Transfers therapeutisch einzusetzen, um eine möglichst langanhaltende effektive Immunantwort gegen CMV hervorzurufen [107, 108].

Als Hauptantigen der HCMV-spezifischen T-Zellen galt zunächst das immediate early 1 Protein (IE-1, UL123) [109, 110, 111]. Es wird in der frühen Phase der Infektion am stärksten exprimiert [112], und es konnten hohe Frequenzen IE-1-spezifischer CD-4- und CD8-positiver T-Zellen im peripheren Blut gesunder HCMV-seropositiver Probanden nachgewiesen werden [109, 110, 113].

Später wurde das Matrixprotein pp65 als immundominantes Protein für die HCMV-spezifische CTL-Antwort beschrieben. Es bildet den Hauptteil des Teguments von HCMV, und es konnte gezeigt werden, dass Peptide aus pp65 auch ohne Virusreplikation T-Zellen präsentiert werden [114, 116].

Es wurden Frequenzen pp65-spezifischer T-Zellen bei gesunden HCMV-seropositiven Probanden beobachtet, die zum Teil höher waren als für IE-1. Die für pp65 spezifischen CD8-positiven T-Zellen machten 70 bis 90% der CMV-spezifischen CD8-positiven T-Zellen aus. Wills et al. konnten zeigen, dass in einzelnen Fällen die T-Zell-Antwort dabei auf nur eine oder einige wenige antigene Determinanten beschränkt war [117]. Diese T-Zell-Populationen – gegen einzelne Epitope gerichtet – bestanden außerdem aus nur wenigen Klonen. Wills zeigte, dass diese Klone in vivo stark expandiert waren [118, 119, 120]. Ähnliches konnte auch für pp65-spezifische CD4 T-Zellen gezeigt werden [121].

Mit pp65 wurde ein Hauptantigen sowohl für CD8 als auch CD4 HCMV-spezifischen T-Zellen gefunden [114, 115, 122].

Mit der Zeit konnten eine Reihe von Epitopen aus den beiden Proteinen pp65 und IE-1 und anderen darüber hinaus identifiziert werden [123, 124, 125]. Bis heute sind mehr als 150 immunogene offene Leseraster bekannt [126].

Weiterhin bleibt unklar, warum es bei Patienten mit einem vergleichbaren Ausmaß an Immunsuppression zum Teil zu einer klinisch manifesten HCMV-Erkrankung kommt, wohingegen ein anderer Teil lediglich eine asymptomatische Virusreplikation zeigt und ein weiterer Teil überhaupt keine Replikation aufweist. Eine zuverlässliche Vorhersage darüber, welche Patienten ein besonders hohes Risiko haben, eine HCMV-Erkrankung zu entwickeln, ist zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht möglich.

Es ist also notwendig noch mehr über die komplexen Wechselwirkungen zwischen körpereigenen Abwehrmechanismen und dem HCMV in Erfahrung zu bringen.

Die T-Zell-Epitopkartierungen mittels Durchflusszytometrie kann hier bei einer ganzen Reihe von Aufgabengebieten hilfreich sein wie z. B. der Identifikation von Targetproteinen.

Ganz im Vordergrund steht die Erforschung der komplexen T-Zell-Antwort gegenüber HCMV. Von einem besseren Verständnis der immunologischen Vorgänge verspricht man sich eine Verbesserung der Diagnostik. Vor allem das Monitoring von Risikopatienten mit dem Ziel, eine HCMV-Erkrankung früh zu erkennen, um sie besser behandeln zu können, steht dabei im Vordergrund. Zudem könnte eine Therapie besser in ihrer Wirksamkeit abgeschätzt werden („Drug-Monitoring“).

Es gibt bereits Versuche des Immunmonitorings auf Epitopebene bei KMT-Patienten mittels „Tetrameren“ (über Streptavidin gekoppelte, mit PE markierte und mit Peptiden beladene tetramere MHC-Moleküle, die peptidspezifische T-Zellen binden) [127, 128].

Um die T-Zell-Antwort gegenüber HCMV zu untersuchen, müssen zunächst die Epitope, die durch die T-Zellen spezifisch erkannt werden, identifiziert werden.

Ein weiteres wichtiges Feld ist die Entwicklung von neuen Strategien in der Therapie, wie dem adoptiven Transfer HCMV-spezifischer T-Zellen und der Zusammenstellung effektiver Peptid-Vakzinen. Die Identifikation von immunogenen Proteinen und T-Zell-Epitopen steht dabei am Anfang der Entwicklung, ist aber auch hilfreich, um zum Beispiel die Effektivität einer Vakzine in Hinblick auf T-Zell-Aktivierung und –expansion zu untersuchen und im zeitlichen Verlauf zu kontrollieren.

## 2 Problemstellung

Schon seit langem ist die zentrale Rolle der T-Zellen bei der Kontrolle der HCMV-Infektion bekannt. Neben den CD8-positiven T-Zellen [91] kommt den CD4-Zellen eine wichtige Funktion zu. Therapieansätze wie die Vakzinierung werden bisher nur in klinischen Studien eingesetzt. Generell gilt bei einer Vakzine, dass diese umso besser wirken kann, umso mehr antigene Determinanten in ihr enthalten sind [46].

Der kombinierte adoptive Transfer von CD4- wie auch CD8-positiven T-Zellen ist sehr effektiv bei der Behandlung von Stammzelltransplantierten, die auf eine antivirale Therapie nicht ansprechen [108]. Allerdings ist diese Methode sehr zeitintensiv und es werden Fibroblasten benötigt, die mit lebendigem Virus infiziert sind. Es besteht also das Risiko einer Virus-Übertragung. Zudem muss die antivirale Potenz des adoptiven Zelltransfers im Vergleich mit der Therapie mit (Val-) Ganciclovir in klinischen Studien erst noch untersucht werden [132].

Auch existieren Lücken in der Diagnostik, die geschlossen werden müssen, um Reaktivierungen früher erkennen und besser therapieren zu können bzw. ein Übertherapieren von Gesunden zu vermeiden. Aus diesen Gründen ist es notwendig, die Immunantwort gegenüber HCMV auf zellulärer Ebene genauer zu verstehen.

In dieser Arbeit wurden daher folgende Ziele verfolgt:

- (1) Zunächst sollten die bei uns im Labor gebräuchlichen Protokolle zur Kurzzeitstimulation von antigenspezifischen T-Zellen standardisiert werden. Eine Vereinfachung der Arbeitsabläufe sollte dazu führen, Versuchsansätze mit einer großen Zahl von Einzelproben bewältigen zu können, ohne dass der Aufwand an Material und Arbeit den Rahmen des Machbaren sprengt. Gleichzeitig musste der Qualitätsstandard gewahrt bleiben.
- (2) Die optimierten Protokolle sollten dann eingesetzt werden, um zunächst zu untersuchen, wie die Peptide und Peptidbibliotheken konfiguriert sein sollten, um möglichst optimal spezifische T-Zell-Antworten erfassen zu können. Stellvertretend wurden dazu Peptide der Proteine pp65 und IE1 aus HCMV gewählt.
- (3) Ein großer Vorteil beim Einsatz von Peptiden in der Diagnostik von spezifischen T-Zell-Antworten ist die Möglichkeit beide Subpopulationen – CD-4 wie auch CD8 T-Zellen – parallel analysieren zu können. Es sollte geklärt

werden, ob die dafür eingesetzten Peptide besonderen Anforderungen genügen müssen.

- (4) Es sollte untersucht werden, inwieweit das Epitop flankierende Aminosäuren die Fähigkeit des Peptids T-Zellen spezifisch zu stimulieren beeinflussen können. Falls dies der Fall war, sollte untersucht werden, welche Konsequenzen sich daraus auf die Konzeption von Peptidpools ergeben.
- (5) Es sollte geklärt werden, ob eine pp65-Gesamtmischung aus mit dem Verfahren der Spotsynthese hergestellten 9-AS-Peptiden realisierbar ist, die in ihrer Fähigkeit CD8 T-Zellen spezifisch zu stimulieren mit einer Mischung aus 15-AS-Peptiden vergleichbar ist.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Probandenmaterial

Gesunden Spendern wurde nach vorheriger Aufklärung und Einverständniserklärung Blut entnommen. Die Blutspender waren mittels ELISA als HCMV-IgG-seropositiv bestimmt worden, Kontroll-Probanden als seronegativ. Sie waren zwischen 20 und 60 Jahre alt. Es wurde jeweils 10 bis 60 ml Blut mittels peripherer Venenpunktion gewonnen. Als Antikoagulans wurde Natriumcitrat verwendet.

Die seropositiven Probanden waren HLA-typisiert worden.

Hier nicht gezeigte Vorversuche ermöglichten, die seropositiven Probanden nach zuvor ermittelten Reaktivitäten gegenüber bestimmten Peptiden auszuwählen [123, 124, 125, 152].

#### 3.1.2 Verbrauchsmaterialien

10ml Citrat-Monovetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
0,5, 1,5 und 2,0 ml Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
2052 Falcon-Röhrchen (5 ml, Polypropylen)	BD, Franklin Lakes, N. J., USA
14 ml „Cellstar“-Polypropylen-Röhrchen	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
14 ml Polyethylen-Röhrchen mit Deckel	Greiner, Frickenhausen, Deutschland
2070-Falcon-Röhrchen (50 ml, Polypropylen)	BD, Franklin Lakes, N. J., USA
Pipettenspitzen à 10, 100 und 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Transferpipetten (3,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sterile Pipettenspitzen (5 und 10 ml)	BD, Franklin Lakes, N. J., USA

#### 3.1.3 Chemikalien, Lösungen, Medien, Puffer

Polystyrolharz	LC Sciences, Houston, Texas, USA
Fmoc-gekoppelte Aminosäuren	LC Sciences, Houston, Texas, USA
Piperidin 20%ig	Sigma, München, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphat (PyBOP)	Sigma, München, Deutschland
Dichlormethan (DCM)	Sigma, München, Deutschland

N-Methyl-Morpholin (NMM)	Sigma, München, Deutschland
Trifluoressigsäure (TFA)	Sigma, München, Deutschland
Phenol	Sigma, München, Deutschland
Methylphenylsulfid	Sigma, München, Deutschland
Ethandithiol	Sigma, München, Deutschland
Tert-Butylmethylether	Sigma, München, Deutschland
Diethylether	Sigma, München, Deutschland
Acetonitril	Serva, Heidelberg, Deutschland
Alpha-Cyano-4-hydroxycimtsäure	Sigma, München, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Brefeldin A (BFA)	Sigma, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Pierce, Rockford, Illinois, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Natriumazid ( $\text{NaN}_3$ )	Serva, Heidelberg, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	Sigma, Steinheim, Deutschland
Aqua destillata	Braun, Deutschland
FACS-Lyse-Reagenz	BD, San Jose, USA
Ficoll-Paque	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
1640-RPMI-Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Staphylokokken Enterotoxin B (SEB)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Sterile phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)	Dulbeccos, Gibco, UK

### **Zellkulturmedium**

1640-RPMI-Medium unter Zusatz von 10% (v/v) FCS, 2 mM L-Glutamin und 100 I.E. Penicillin/Streptomycin

### **Permeabilisierungslösung**

400 ml Aqua dest., 100 ml FACS-Lyse-Reagenz und 250  $\mu\text{l}$  Tween 20

### **EDTA-Lösung**

PBS und 2mM EDTA

**Wasch-Puffer**

PBS mit 0,5 % (w/v) BSA und 0,1 %  $\text{NaN}_3$

**PFA-Fixierungs-Lösung**

PBS und 1 % (w/v) PFA

**3.1.4 Monoklonale Antikörper, Tetramere**

anti-CD28	BD, San Jose, USA
anti-CD3-PerCP	BD, San Jose, USA
anti-CD8-APC	BD, San Jose, USA
anti-IFN- $\gamma$ -FITC	BD, San Jose, USA
anti-CD69-PE	BD, San Jose, USA
anti-Immunglobulin-2a-FITC, Maus	BD, San Jose, USA
anti-CD4-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich

Das FITC-markierte NLVPMVATV/HLA-A\*0201-Tetramer wurde von Proimmune (Oxford, GB) bezogen.

**3.1.5 Einzelpeptide**

Peptide der Proteine IE-1 (SwissProt P13202, siehe Tab. 3.2) und pp65 (SwissProt P06725, siehe Tab 3.1) des humanen CMV mit einer Länge von 9, 10 und 15 Aminosäuren wurden zum Teil in der Peptidchemie der Charité hergestellt. Die übrigen wurden von Jerini bezogen.

Die selbst durchgeführte Peptidsynthese (AS-Sequenzen sind in Tab. 3.3 aufgeführt) erfolgte mittels eines auf Standard Fluorenyl-methoxy-carbonyl(FMOC)-Festphasen-Chemie-basierenden Protokolls mit einem AMS 422 Peptid-Synthesizer [133].

Anschließend wurde mittels Massenspektroskopie die Molekülmasse bestätigt und die Reinheit mittels analytischer High-pressure liquid chromatography (HPLC) bestimmt. Gegebenenfalls wurden die Peptide in einem zusätzlichen Schritt mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

Alle Peptide wurden unter Stickstoff-Atmosphäre in DMSO gelöst. Auf diese Weise sollte eine Oxidation von Thiol-Gruppen von Cystein- und Methionin-haltigen Peptiden verhindert werden. Die Peptide wurden in einer Konzentration von 80 mg/ml als Stammlösungen bei minus 80 Grad Celsius gelagert.

Arbeitslösungen wurden mittels Verdünnung mit DMSO/PBS aus den Stammlösungen hergestellt. Die Peptidpools wurden aus den Einzelpeptid-Lösungen zusammen gemischt.

Aus praktischen Erwägungen sind die Peptidkonzentrationen in mg/ml, µg/ml oder ng/ml angegeben und nicht in molaren Konzentrationen. Es ist wichtig zu erwähnen, dass dasselbe Volumen eines 15-AS-Peptides nur etwa 60% der molaren Konzentration eines 9-AS-Peptides enthält. Bestehen bleiben aber die qualitativen Unterschiede zwischen 15-AS- und 9-AS-Peptiden, die bei den Dosis-Wirkungskurven beobachtet wurden.

Falls nicht anders angegeben, wurden die Peptide in > 95 % Reinheit verwendet. Die hier angegebenen Aminosäuresepositionen einiger Peptide beziehen sich auf die Originalsequenz von pp65 (SwissProt Nummer P06725).

### 3.1.6 Peptidpools

Die pp65-Peptidmischung, die von uns verwendet wurde, um alle Epitope aus pp65 in einem Versuchsansatz zu testen, bestand aus 138 Peptiden mit jeweils 15 Aminosäuren Länge. Dabei überlappten sich zwei aufeinanderfolgende Peptide um jeweils elf Aminosäuren, so dass die komplette Sequenz des Proteins pp65 abgedeckt wurde (siehe Tab. 3.1). Bei diesem Design werden alle möglichen Epitope repräsentiert, die nicht länger als 12 Aminosäuren sind. Da bis auf wenige Ausnahmen T-Zellepitope nicht länger als 9 bis 10 Aminosäuren sind, konnten auch das Epitop flankierende AS mitberücksichtigt werden. Auch bei CD4-T-Zellen haben Bindungsmotive eine Länge von 9 bis 10 Aminosäuren, optimale Peptide sind jedoch länger.

Eine Variante der Festphasen-Peptid-Synthese stellt die parallele Synthese an Zellulosemembranen dar, die als Spot-Synthese bezeichnet wird. Durch Pipettieren einzelner Reagenzientropfen werden kleine Bereiche der Membran benetzt (Spots). Die Synthese kann unter Verwendung eines Pipettierroboters zur ortsgenauen Reagenzienverteilung durchgeführt werden. Das Potential der Spot-Synthese liegt in der schnellen, parallelen Synthese einer großen Zahl von Peptiden. Dabei ist die Anordnung und Größe der Spots auf der Membran frei wählbar [134, 135].

In der durch Spot-Synthese hergestellten pp65-Peptidmischung – aus 9-AS-Peptiden bestehend – fanden sich insgesamt 552 Einzelpeptide. Auf diese Weise deckten sie entsprechend der 15-AS-Peptid-Mischung die gesamte AS-Sequenz von pp65 ab.



Die Synthese der Spot-Peptide erfolgte durch Li Ying Dong aus der Arbeitsgruppe Molekulare Bibliotheken unseres Institutes. Das Ablösen der Peptide von der Membran sowie das Lösen in DMSO und das Mischen der Einzelpeptide wurde von mir durchgeführt.

### 3.1.7 HCMV-Viruslysats

Als positive Kontrolle wurde in einigen Versuchen HCMV-Viruslysats (ein Extrakt CMV-infizierter Fibroblasten, welches zahlreiche CMV-Proteine beinhaltet - so auch pp65). Die exakte Zusammensetzung des Viruslysats ist nicht bekannt. Das HCMV-Viruslysats wurde mit PBS verdünnt und bei minus 80 Grad Celsius gelagert.

**Tabelle 3.1:** pp65 Peptidsequenzen

1	MESRGRRCPEMISVL	2	GRRCPMISVLGPIS	3	PEMISVLGPISGHVL
4	SVLGPISGHVLKAVF	5	PISGHVLKAVFSRGD	6	HVLKAVFSRGDTPVL
7	AVFSRGDTPVLPHE	8	RGDTPVLPHE	9	PVLPHE
10	HETRLQLQTIHVRVS	11	LLQTIHVRVVSQPSL	12	GIHVRVVSQPSLILVS
13	RVSQPSLILVSQYT	14	PSLILVSQYTPDSTP	15	LVSQYTPDSTPCHRG
16	YTPDSTPCHRGDNQL	17	STPCHRGDNQLQVQH	18	HRGDNLQVQHTYFT
19	NQLQVQHTYFTGSEV	20	VQHTYFTGSEVENVS	21	YFTGSEVENVS
22	SEVENVS	23	NVSVNVHNPTGRSIC	24	NVHNPTGRSICPSQE
25	PTGRSICPSQEPMSI	26	SICPSQEPMSIYVYA	27	SQEPMSIYVYALPLK
28	MSIYVYALPLKMLNI	29	VYALPLKMLNIPSIN	30	PLKMLNIPSINVHHY
31	LNIPSINVHHYPSAA	32	SINVHHYPSAAERKH	33	HHYPSAAERKHRLP
34	SAAERKHRLPVADA	35	RKHLRPVADAVIHA	36	HLPVADAVIHASGKQ
37	ADAVIHASGKQMWQA	38	IHASGKQMWQARLTV	39	GKQMWQARLTVSGLA
40	WQARLTVSGLAWTRQ	41	LTVSGLAWTRQQNQW	42	GLAWTRQQNQWKEPD
43	TRQQNQWKEPDVYYT	44	NQWKEPDVYYTSAFV	45	EPDVYYTSAFVFTK
46	YYTSAFVFTKDV	47	AFVFTKDVLRHV	48	PTKDVLRHVCAHE
49	VALRHVCAHELVCS	50	HVCAHELVCSMENT	51	AHELVCSMENTRATK
52	VCSMENTRATKMQVI	53	ENTRATKMQVIGDQY	54	ATKMQVIGDQYVKVY
55	QVIGDQYVKVYLESF	56	DQYVKVYLESFCEDV	57	KVYLESFCEDVPSGK
58	ESFCEDVPSGKLFMH	59	EDVPSGKLFMHVTLG	60	SGKLFMHVTLGSDVE
61	FMHVTLGSDVEEDLT	62	TLGSDVEEDLTMTRN	63	DVEEDLTMTRNPQPF
64	DLTMTRNPQPFMRPH	65	TRNPQPFMRPHERNG	66	QPFMRPHERNGFTVL
67	RPHERNGFTVLC	68	RNGFTVLC	69	TVLC
70	PKNMIIKPGKISHIM	71	IIPKPGKISHIMLVA	72	GKISHIMLVAFTSH
73	HIMLVAFTSHEHFG	74	DVAFTSHEHFGLLCP	75	TSHEHFGLLCPKSIP
76	HFGLLCPKSIPGLSI	77	LCPKSIPGLSISGNL	78	SIPGLSISGNLLMNG
79	LSISGNLLMNGQIF	80	GNLLMNGQIFLEVQ	81	MNGQIFLEVQAI
82	QIFLEVQAI	83	EVQAI	84	IRETVELRQYDPVAA
85	VELRQYDPVAA	86	QYDPVAA	87	VAA
88	FFFIDLLLQRGPQY	89	IDLLLQRGPQYSEHP	90	LQRGPQYSEHPTFTS
91	PQYSEHPTFTSQYRI	92	EHPTFTSQYRIQGKL	93	FTSQYRIQGKLEYR
94	YRIQGKLEYRHTWDR	95	GKLEYRHTWDRHDEG	96	YRHTWDRHDEGAAQG
97	WDRHDEGAAQGD	98	DEGAAQGD	99	AQGD
100	DDVWTSGSDSDEELV	101	TSGSDSDEELV	102	DSDEELV
103	ELV	104	TERKT	105	TPRVT
106	TGGGAMAGASTSAGR	107	AMAGASTSAGRKRKS	108	ASTSAGRKRKSASSA
109	AGRKRKSASSATACT	110	RKSASSATACTSGVM	111	SSATACTSGVMTRGR

112	ACTSGVMTRGRLKAE	113	GVMTRGRLKAESTVA	114	RGRLKAESTVAPEED
115	KAESTVAPEEDTDED	116	TVAPEEDTDESDNE	117	EEDTDESDNEIHNP
118	DESDNEIHNPVFT	119	DNEIHNPVFTWPPW	120	HNPVFTWPPWQAGI
121	VFTWPPWQAGILARN	122	PPWQAGILARNLVPM	123	AGILARNLVPMVATV
124	ARNLVPMVATVQGQN	125	VPMVATVQGQNLKYQ	126	ATVQGQNLKYQEFFW
127	GQNLKYQEFFWDAND	128	KYQEFFWDANDIYRI	129	FFWDANDIYRIFAEI
130	ANDIYRIFAELEGVW	131	YRIFAELEGVWQPAA	132	AELEGVWQPAAQPKR
133	GVWQPAAQPKRRRHR	134	PAAQPKRRRHRQDAL	135	PKRRRHRQDALPGPC
136	RHRQDALPGPCIAST	137	DALPGPCIASTPKKH	138	GPCIASTPKKHRG

**Tabelle 3.2:** IE-1 Peptidsequenzen

1	MESSAKRKMDPDNDP	2	AKRKMDPDNPDEGPS	3	MDPDNPDEGPSSKVP
4	NPDEGPSSKVP RPET	5	GPSSKVP RPETPVTK	6	KVPRPETPVTKATTF
7	PETPVTKATTF LQTM	8	VTKATTF LQTMLRKE	9	TTFLQTMLRKEVNSQ
10	QTMLRKEVNSQLSLG	11	RKEVNSQLSLG DPLF	12	NSQLSLG DPLFPELA
13	SLG DPLFPELAEESL	14	PLFPELAEESL KTFE	15	ELAEESL KTFEQVTE
16	ESL KTFEQVTE DCNE	17	TFEQVTE DCNENPEK	18	VTEDCNENPEK DVLA
19	CNENPEK DVLAE LVK	20	PEK DVLAE LVKQIKV	21	VLAELVKQIKV RVDM
22	LVKQIKV RVDMVRHR	23	IKV RVDMVRHRIKEH	24	VDMVRHRIKEHMLKK
25	RHRIKEHMLKKYTQT	26	KEHMLKKYTQTEEFK	27	LKKYTQTEEFKTFGAF
28	TQTEEFKTFGAFNMMG	29	EKFTGAFNMMGGCLQ	30	GAFNMMGGCLQNALD
31	MMGGCLQNALDILDK	32	CLQNALDILDKVHEP	33	ALDILDKVHEPF EEM
34	LDKVHEPF EEMK CIG	35	HEPF EEMK CIGLTMQ	36	EEMK CIGLTMQSMYE
37	CIGLTMQSMYENYIV	38	TMQSMYENYIVPEDK	39	MYENYIVPEDKREMW
40	YIVPEDKREMW MACI	41	EDKREMW MACIKELH	42	EMW MACIKELHDVSK
43	ACIKELHDVSKGAAN	44	ELHDVSKGAANKLGG	45	VSKGAANKLGGALQA
46	AANKLGGALQAKARA	47	LGGALQAKARAKKDE	48	LQAKARAKKDELRRK
49	ARAKKDELRRKMMYM	50	KDELRRKMMYMCYRN	51	RRKMMYMCYRNIEFF
52	MYMCYRNIEFFTKNS	53	YRNIEFFTKNSAFPK	54	EFFTKNSAFPKTTNG
55	KNSAFPKTTNGCSQA	56	FPKTTNGCSQAMAAL	57	TNGCSQAMAALQNL P
58	SQAMAALQNL PQ CSP	59	AALQNL PQ CSPDEIM	60	NLPQ CSPDEIMAYA Q
61	CSPDEIMAYA QKIFK	62	EIMAYA QKIFKILDE	63	YAQKIFKILDEERDK
64	IFKILDEERDKVLTH	65	LDEERDKVLTHIDHI	66	RDKVLTHIDHIFMDI
67	LTHIDHIFMDILTTC	68	DHIFMDILTTCVETM	69	MDILTTCVETMCNEY
70	TTCVETMCNEYKVTS	71	ETMCNEYKVTS DACM	72	NEYKVTS DACM M TMY
73	VTSDACM M TMYGGIS	74	ACM M TMYGGISLLSE	75	TMYGGISLLSEFCRV
76	GISLLSEFCRV LCCY	77	LSEFCRV LCCYVLEE	78	CRV LCCYVLEETSVM
79	CCYVLEETSVM LAKR	80	LEETSVM LAKRPLIT	81	SVMLAKRPLITKPEV
82	AKRPLITKPEVISVM	83	LITKPEVISVMKRRI	84	PEVISVMKRRIEIEIC
85	SVMKRRIEIEICMKVF	86	RRIEIEICMKVFAQYI	87	EICMKVFAQYILGAD
88	KVFAQYILGADPLRV	89	QYILGADPLRV C SPS	90	GADPLRV C SPSVDDL
91	LRV C SPSVDDLRAIA	92	SPSVDDLRAIAEESD	93	DDLRAIAEESDEEEA
94	AIAEESDEEEAIVAY	95	ESDEEEAIVAYTLAT	96	EEAIVAYTLATAGVS
97	VAYTLATAGVSSSDS	98	LATAGVSSSDSLVSP	99	GVSSSDSLVSPPEP
100	SDSLVSPPEPVPAT	101	VSPPEPVPATIPLS	102	ESPVPATIPLSSVIV
103	PATIPLSSVIVAENS	104	PLSSVIVAENS DQEE	105	VIVAENS DQEESEQS
106	ENSDQEESEQSDEEE	107	QEESEQSDEEE EGA	108	EQSDEEE EGAQEER
109	EEEEEGAQEEREDTV	110	EGAQEEREDTVSVKS	111	EEREDTVSVKSEPV
112	DTVSVKSEPVSEIEE	113	VKSEPVSEIEEVAPE	114	PVSEIEEVAPEEED
115	IEEVAPEEEDGAE	116	APEEEDGAE EPTAS	117	EEDGAE EPTASGGKS
118	AEEPTASGGKSTHPM	119	TASGGKSTHPMVTRS	120	GKSTHPMVTRSKADQ

**Tabelle 3.3:** Dargestellt sind die Sequenzen der selbstsynthetisierten Peptide, die durch Verlängerung der Peptidsequenz TPRVTGGGAM mit jeweils einer der 20 natürlichen Aminosäuren am C- und am N-Terminus entstehen.

TPRVTGGGAM- <b>A</b>	<b>A</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>R</b>	<b>R</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>N</b>	<b>N</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>D</b>	<b>D</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>C</b>	<b>C</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>Q</b>	<b>Q</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>E</b>	<b>E</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>G</b>	<b>G</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>H</b>	<b>H</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>I</b>	<b>I</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>L</b>	<b>L</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>K</b>	<b>K</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>M</b>	<b>M</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>F</b>	<b>F</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>P</b>	<b>P</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>S</b>	<b>S</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>T</b>	<b>T</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>W</b>	<b>W</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>Y</b>	<b>Y</b> -TPRVTGGGAM
TPRVTGGGAM- <b>V</b>	<b>V</b> -TPRVTGGGAM

### 3.2 Verwendete Geräte

Absaugpumpe Laboport	Neuberger, Freiburg, Deutschland
Brutschrank EG 110 R	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich
Laminar-Flow-Box	Kendro, Hanau, Deutschland
Lichtmikroskop	Olympus, Tokio, Japan
FACScalibur-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, USA
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipettierhilfe Pipettus Standard	Hirschmann, Eberstadt Deutschland
Beheizbares Wasserbad	Grant, Camebridge, Grossbritannien
Zentrifuge Centrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Kühlzentrifuge CR422	Jouan, Saint Nazaire, Frankreich
MPS AMS 422	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Reversed-Phase HPLC	
Laserdesorptions-Massenspektrometer	
LaserTec BenchTop II System	Perspective Biosystems, Vestec

### 3.3 Verwendete Software

Cell Quest Version 3.1	Becton Dickinson, USA
Paint-A-Gate	Becton Dickinson, USA
Microsoft Office Word 2003	Microsoft
Microsoft Office Excel 2003	Microsoft
Microsoft Office Power Point 2003	Microsoft
Grams386	Galaxy

### 3.4 Methoden

#### 3.4.1 Zellpräparation

Die Verwendung von Vollblut zur T-Zell-Stimulation wird von einigen Autoren bevorzugt, da es den natürlichen Bedingungen in vivo näher kommen soll als eine PBMC-Suspension. Im Vollblut vorhandene Substanzen wie z. B. Proteasen könnten sich störend auf die Stimulation auswirken. In Bezug auf T-Zell-Stimulation wurde in unserer Arbeitsgruppe beobachtet, dass man häufig deutlich höhere Konzentrationen der eingesetzten Antigene verwenden muss, um im Vollblut-Assay Ergebnisse zu erzielen, die vergleichbar sind mit denen beim Einsatz von PBMC [136].

Dabei ist es nicht von Bedeutung, ob man Peptide oder virales Lysat einsetzt.

Aus diesen Gründen verwendeten wir für die Stimulationsversuche PBMC-Suspensionen. PBMC wurden mittels Standard-Ficoll-Paque-Gradienten-Zentrifugation (Dichte 1,078 g/ml bei 20 Grad Celsius) aus Citrat-Vollblut präpariert. Dazu wurden 14 ml Polyethylen-Röhrchen mit 3 ml Ficoll befüllt, das anschließend mit 8 ml von 1:2 mit sterilem PBS verdünntem Vollblut überschichtet wurde. Nach der Zentrifugation bei 1000g für 20min wurde die zwischen Plasma und Ficoll entstandene Zellschicht mittels Pasteur-Pipette vorsichtig abgehoben. Die so gewonnenen Zellen (PBMC) wurden zweimal mit sterilem PBS gewaschen (210g für 10min). Ein dritter langsamer Waschschrift (164g für 12min) sollte möglicherweise

kontaminierende Thrombozyten beseitigen, die als potentielle Quelle für inhibierend wirkenden Transforming-Growth-Factor (TGF) gelten.

Danach wurden die so erhaltenen PBMC in Zellkulturmedium resuspendiert und auf eine Konzentration von  $5,0 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt und über Nacht in einem Brutschrank bei 37 Grad Celsius und 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre vorinkubiert.

### **3.4.2 Protokoll zur Stimulation antigenspezifischer T-Zellen und intrazellulären Zytokindetektion unter Verwendung von PBMC**

Alle Versuchsansätzen wurden in Doppelansätzen durchgeführt.

- Zunächst wurden die Peptidlösungen in die Röhrrchen gefüllt, bevor die Zellsuspension hinzugefügt wird, um zu gewährleisten, dass alle Proben gleich lange inkubieren. Dazu wurden 100 µl Kompletmedium zusammen mit der zu testenden Peptidlösung (Peptid in DMSO gelöst) – zum Beispiel 4 µl Peptidlösung + 96 µl Kompletmedium - in ein steriles Falcon-2054-Röhrrchen gefüllt. Als unstimulierte Kontrolle diente ein Röhrrchen mit 96 µl Kompletmedium und 4 µl reinem DMSO.
- Der Gebrauch von Falcon-2054-Röhrrchen ermöglichte es, den gesamten Versuchsablauf in einem Röhrrchen stattfinden zu lassen, was den Zellverlust während des Versuches verminderte.
- Die Endkonzentration der Peptide betrug somit 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml, 1µg/ml, 10µg/ml und 40µg/ml. Die DMSO-Konzentration in allen Versuchsansätzen – inklusive der unstimulierten Kontrolle – lag unter 0,1% (vol/vol).
- Für die Kombination aus Färbung mit Tetrameren und Peptidstimulation wurden die Zellen 30 min mit dem Tetramer in optimierter Konzentration in einem Standard-Brutschrank inkubiert (37 Grad Celsius, feuchte 5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre), bevor die Peptide zugegeben wurden.
- Bei den Versuchen mit Kostimulation mittels anti-CD28 wurden 1 bzw. 10 µl des monoklonalen Antikörper in die entsprechenden Röhrrchen zur Peptidstimulation hinzugefügt.
- Als nächstes wurden 400 µl der Zellsuspension mit  $0,5$  bis  $1,0 \times 10^6$  Zellen jedem Röhrrchen hinzugefügt. Die Endkonzentration aller Peptide betrug 1 µg/ml. Die DMSO-Konzentration sollte 1 % (v/v) zu keinem Zeitpunkt überschreiten.

- Die Röhrrchen wurden in einem Standard-Brutschrank (37 Grad Celsius, feuchte CO<sub>2</sub>-Atmosphäre) mit 5 Grad Neigung – also in fast horizontaler Lage - inkubiert.
- Nach 2 Stunden erfolgte die Zugabe von 500µl Komplettmediummedium mit 10µg BFA zu jedem Röhrrchen. Die BFA-Lösung wurde immer frisch hergestellt (mit Konzentration von 5mg/ml DMSO, 2 µl dieser Stocklösung wurden mit 498µl Komplettmediummedium gemischt, was 10µg BFA entspricht).
- Erneut erfolgte eine Inkubation im Brutschrank (s. o.), wobei die Röhrrchen genau in derselben Position liegen sollten wie zuvor, da sich sonst an der Röhrrchenwand adhärenente Zellen unter Umständen im Trockenen befinden könnten.
- Nach weiteren 4 Stunden wurden pro Röhrrchen 3ml eiskaltes PBS hinzugefügt.
- Zentrifugation (430g, 8min, 4 Grad Celsius) und Dekantieren beziehungsweise Aspiration des Überstandes.
- Resuspendieren des Zell-Pellets in der im Röhrrchen verbleibenden Flüssigkeit.
- Zugabe von mindestens 3ml PBS mit 2mM EDTA. Dabei ist es wichtig, dass der Teil der Röhrrchenwand, an dem adhärenente Zellen vermutet werden, bedeckt ist.
- Inkubation für 10min bei 37 Grad Celsius im Wasserbad.
- Vortexen für 30s bei niedriger Intensität.
- Zentrifugation (430g, 8min, 4 Grad Celsius) und Dekantieren beziehungsweise Aspirieren des Überstandes.
- Resuspendieren des Zell-Pellets in der verbleibenden Flüssigkeit.
- Zugabe von 1 ml Waschpuffer (PBS mit 0,5% (w/v) BSA und 0,1% (w/v) Natriumazid).
- Zentrifugation (430g, 8min, 4 Grad Celsius) und Dekantieren beziehungsweise Aspirieren des Überstandes.
- Resuspendieren des Zell-Pellets in der verbleibenden Flüssigkeit. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte mittels 1 ml Permeabilisierungslösung (doppelte Konzentration FACSLyse-Lösung (BD), 0,05% (vol/vol) Tween 20 (Sigma)) pro Röhrrchen. Die Röhrrchen wurden 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

- Zugabe von mindestens 3 ml Waschpuffer. Zentrifugation (430g, 8min, 4 Grad Celsius) und Dekantieren bzw. Aspirieren des Überstandes.
- Die Röhrchen wurden auf Papierhandtüchern trocken getupft, um das im Röhrchen verbliebene Volumen möglichst gering zu halten.
- Resuspendieren des Zell-Pellets in der verbleibenden Flüssigkeit. Oberflächen- und Intrazellulärfärbung mittels AK für 30 min auf Eis im Dunkeln.
- Die Kombination von Oberflächen- und intrazellulärer Färbung ist möglich, solange Antigene nicht bei der Fixierung zerstört werden. Der Hintergrund ist dabei oft etwas erhöht, was in der Regel aber kein Problem darstellt. Dieses Vorgehen ermöglicht eine erhebliche Zeiteinsparung.
- Waschen mit 2-3 ml Waschpuffer und Dekantieren.
- Refixieren der nach Permeabilisierung zugegebenen Antikörper mit 1 % PFA in PBS, wenn die Proben nicht unmittelbar im Anschluß gemessen wurden.

### **3.4.3 Antikörperfärbung**

Wir führten die Färbung mit fluorochrommarkierten monoklonalen Antikörpern in einem Volumen von 100 µl durch. Um diesen Arbeitsschritt zu vereinfachen, kamen zuvor bereits gemischte Antikörper-Mischungen zum Einsatz, wie zum Beispiel anti-Interferon- $\gamma$ -FITC, anti-CD69-PE, anti-CD4-PerCP, und anti-CD4- oder anti-CD8-APC. Durch deren Verwendung konnte im Vergleich zur Hinzugabe jedes Antikörpers einzeln erheblich Zeit und Arbeit eingespart werden.

### **3.4.4 Durchflusszytometrische Analyse**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Analyse von Antigenen innerhalb und auf der Oberfläche einer Zelle mit Hilfe von Antikörpern, an die Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind. Die Zellen einer Zellsuspension werden dazu in einem Flüssigkeitsstrahl als einzelne Teilchen zentral in laminare Strömung gebracht, so dass sie nacheinander einzeln in den Messbereich eintreten – man spricht dabei von hydrodynamischer Fokussierung. Dort trifft monochromatisches Laserlicht auf die einzelne Zelle. Wenn an die Zelle fluoreszenzmarkierte Antikörper gebunden sind, emittieren diese – durch das Laserlicht angeregt – Licht eines bestimmten Wellenlängenspektrums.

Dies wiederum wird von Detektoren (Photomultiplier) im Messbereich in einen elektrischen Impuls umgewandelt, gegebenenfalls verstärkt und dann computer-gestützt analysiert.

Jedes der so von den Detektoren registrierte Ereignis entspricht einer Zelle und kann in einem Dot-Plot (Punktwolkendarstellung) zweidimensional dargestellt werden. Im Dot-Plot können nun polygonale Regionen definiert werden, um bestimmte Zellpopulationen auszuwählen. Beim „Gaten“ können dann durch logische Verknüpfung definierter Regionen bestimmte Zellpopulationen ausgewählt werden, die durch anschließende Farbkodierung z. B. wieder in Dot-Plots dargestellt werden können.

Gleichzeitig wird das Laserlicht beim Auftreffen auf die Zelle gestreut. Dies erfolgt je nach Aufbau der Zelle in einer charakteristischen Art und Weise. Aus der Interpretation von Vorwärtsstreulicht (FSC = forward scatter) und Seitwärtsstreulicht (SSC = sideward scatter) sind Rückschlüsse auf Größe und Granularität der Zelle möglich.

Die Messung der Proben erfolgte mit einem BD FACSCalibur Durchflusszytometer, einem Apple-Macintosh-Computer G3 und der CellQuest Software.

Bei einem Vier-Farben-Durchflusszytometer wie dem FACSCalibur können durch die Verwendung von vier Fluoreszenzfarbstoffen mit ähnlichen Absorptions-, aber unterschiedlichen Emissionsmaxima bis zu sechs Parameter gleichzeitig untersucht werden. Als Farbstoffe verwendeten wir in dieser Arbeit Fluoreszein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Perdinin Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC).

Mindestens 500 000 Lymphozyten wurden für jede Probe aufgenommen.

Zur Datenanalyse wurden die  $IFN\gamma^+/CD69^+/CD3^+/CD4^+$  oder  $IFN\gamma^+/CD69^+/CD3^+/CD8^+$  Ereignisse bestimmt und in Prozent der gesamten CD4 oder CD8 T-Zellen ausgedrückt.

Davon wurden die Prozentsätze von  $IFN\gamma$  positiven Zellen in korrespondierenden Gates bei unstimulierten Proben abgezogen. Für jedes Röhrchen wurde eine Isotypkontrolle durchgeführt, die mit anti-IgG2a-FITC (Maus) an Stelle von anti- $IFN\gamma$  gefärbt wurde.

Der Einsatz eines 4-Farben-Geräts ermöglichte die Verwendung von zwei T-Zell-Markern (CD3 und CD4 oder CD8) zusammen mit zwei Aktivierungsmarkern



(Interferon $\gamma$  und CD69). Die Färbung des frühen Aktivierungsparameters CD69 ermöglichte hierbei eine genauere Analyse der T-Zell-Antworten [151].

Für die Instrumenteneinstellung wurden pro Fluorochrom Einfachfärbungen benötigt. Dies vereinfacht deutlich, die Photomultiplier einzustellen und die Kompensation der spektralen Überlappung durchzuführen.

### 3.4.5 Datenanalyse

Diese Experimente zielten auf die Identifikation und Quantifizierung von positiven und negativen Ereignissen in Prozent einer entsprechenden Referenzpopulation ab. Dazu mussten die Zellpopulationen exakt definiert werden. Die Quantifizierung von intrazellulären Zytokinen mittels „quantification beads“ war nicht effektiv möglich, da sie zu stark von der exakten Reproduktion der Membranpermeabilisierung abhängt. Die Datenauswertung wurde für jede einzelne Probe nach der „Visual-Cluster“-Methode durchgeführt.

1. Nach der Datenerfassung wird eine Region um die Lymphozyten in einem Diagramm festgelegt, in dem das Seitwärtsstreulicht (SSC, entspricht der Granularität der Zellen) gegen das Vorwärtsstreulicht (FSC, entspricht der Zellgröße) dargestellt wird.
2. Dann werden die Lymphozyten in einem CD3 gegen CD4 bzw. CD8 Punktdiagramm analysiert und eine Region wird um die CD3-positiven und CD4- bzw. CD8-positiven Lymphozyten definiert. Zu beachten ist, dass aktivierte T-Zellen in variabler Weise den T-Zell-Rezeptor (TCR) und auch CD4/CD8 herunterregulieren können. Dies ist beim Definieren der CD4-/CD8-Population zu berücksichtigen.
3. CD4- oder CD8-positive T-Zellen können in einem CD69 gegen IFN $\gamma$  Punktdiagramm dargestellt werden. Bei der Setzung der Grenze zwischen IFN $\gamma$ -positiven und -negativen Ereignissen ist die CD69-negative Population behilflich, die vollständig IFN $\gamma$ -negativ sein sollte. In den meisten Fällen können einzelne Populationen klar abgegrenzt werden. Eine CD69-negative/IFN $\gamma$ -positive Population beruht in der Regel auf unspezifischer Färbung und weniger auf IFN $\gamma$ -produzierenden CD69-negativen T-Zellen. Die CD69-positiven/IFN $\gamma$ -positiven Ereignisse werden registriert und als Prozent der CD4-/CD8-positiven Gesamt-T-Zell-Population angegeben.

4. Entsprechend wird mit den Negativ- und Isotypkontrollen verfahren. Bei den Isotypkontrollen handelt es sich um Probenansätze, die genau identisch behandelt und stimuliert wurden, deren Färbung jedoch mit einem Isotyp-Ak (hier FITC-markiertem Maus-IgG2a) erfolgt, um das Ausmaß der unspezifischen Bindung zu bestimmen.
5. Bei den stimulierten Proben werden die Prozentsätze der Isotypkontroll-positiven Ereignisse von den IFN $\gamma$ -positiven subtrahiert. Die Differenz entspricht den positiven Ereignissen mit Hintergrund.

In den unstimulierten Proben werden die Prozentsätze der Isotypkontroll-positiven Ereignisse von den IFN $\gamma$ -positiven subtrahiert. Auf diese Weise läßt sich der Hintergrund definieren, der anschließend von den positiven Ereignissen abgezogen wird. Die Differenz ist die echte Frequenz von T-Zellen die auf die antigenspezifische Stimulation mit IFN $\gamma$ -Produktion reagiert haben.

Als kleinste positive Antwort wurde 0,03 % der entsprechenden T-Zell-Population definiert. Kleinere Antworten wurden als negativ gewertet, da sie nicht vom Hintergrund unterschieden werden konnten. T-Zellen von CMV-negativen Probanden ließen sich in diesem Assay nicht stimulieren.

Die Auswertung und Interpretation vergleichbarer Daten ist ausführlich in [167] dargestellt.

### **3.4.6 Peptidynthese mittels multiplem Peptidsynthesizer (MPS)**

#### **3.4.6.1 Grundlagen**

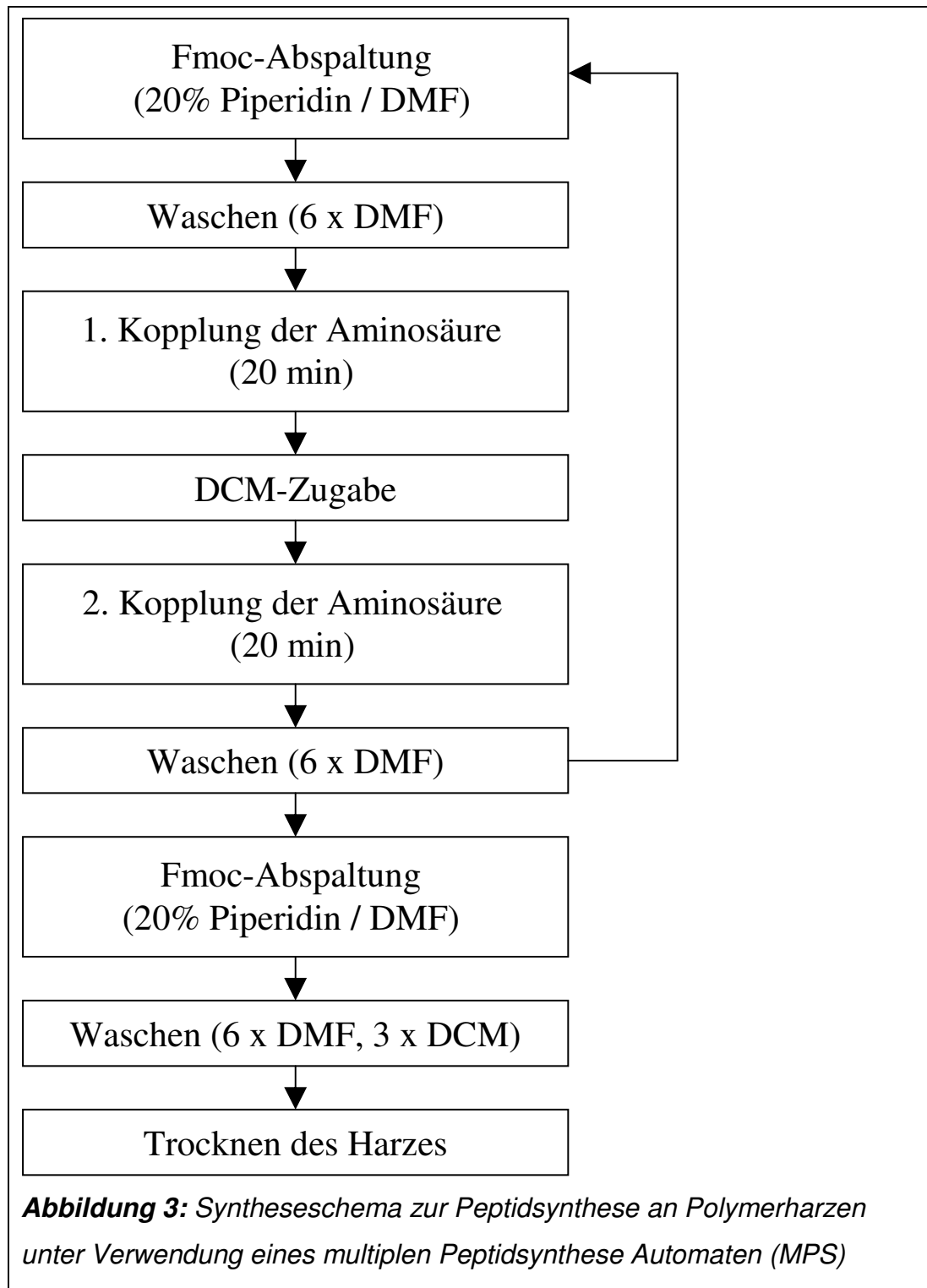
Peptide sind Polyamide, deren Grundbausteine – die alpha-Aminosäuren – durch Säureamidbindung zwischen Carboxylgruppe und Aminogruppe miteinander verbunden sind. Dazu muss eine relativ starke Positivierung (Aktivierung) des Carboxyl-Kohlenstoffs durch Reste mit negativen I- und M-Effekt erfolgen.

Bei der Festphasen-Peptid-Synthese nach Merrifield wird die C-terminale AS mit einem Polymer-Träger verestert. Nach Abspaltung der Aminoschutzgruppe kann die nächste N-terminal geschützte, aktivierte Aminosäure gekoppelt werden. Nach Ablauf der Reaktion werden Reaktionslösung und Nebenprodukte durch Filtration ausgewaschen. Durch Wiederholung dieser Reaktionsschritte wird das gewünschte Peptid Schritt für Schritt synthetisiert. Am Schluß der Synthese erfolgt die Trennung

des Peptids vom Polymer-Träger und die Abspaltung der Seitenschutzgruppen der Aminosäuren.

#### **3.4.6.2 Peptidsynthese an Polystyrolharz mittels multipltem Peptidsynthesizer (MPS)**

Die Synthese der Peptide erfolgte an Polystyrolharz als festem Träger mit einer Ansatzgröße von 50µmol. Das Verhältnis Harz/Aminosäure/Aktivator/Base betrug 1:4:4:8. Die Aminosäuren wurden in einer Konzentration von 0,7M eingesetzt, gelöst in DMF (Dimethylformamid). Es wurde stets eine Doppelkopplung durchgeführt. Der Synthesekyklus des Automaten bestand aus der Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen mit 20%igem Piperidin (zweimal 5min) und anschließend 6maligem Waschen mit DMF, bevor die Aminosäure gekoppelt wurde (zweimal 20min). Vor der nächsten Fmoc-Abspaltung wurde wieder 6mal mit DMF und 3mal mit Dichlormethan (DCM) gewaschen. Die Aktivierung der Aminosäuren erfolgte durch Zugabe von 200µmol PyBOP in 220µl DMF und 400µmol NMM in 100µl DMF zu 200µmol Aminosäure in 300µl DMF. Nach der Koppelung der ersten sechs Aminosäuren wurden die Zeiten für die Fmoc-Abspaltung und die Koppelungszeiten der Aminosäuren automatisch erhöht.



### 3.4.6.3 Abspaltung der Peptide

Zur Abspaltung der Peptide vom Harz und zur Abspaltung der Seitenschutzgruppen wurden 2ml Abspatlösung (80% TFA, 7,5% Phenol, 5% Methylphenylsulfid, 5% Wasser und 2,5% Ethandithiol) zum Harz gegeben. Die Abspaltzeit betrug 3 Stunden. Danach wurde die Abspatlösung vom Harz getrennt (Filtration) und das Peptid mit etwa 30ml eiskaltem tert-Butylmethylether aus der Lösung ausgefällt. Der

Niederschlag wurde abzentrifugiert und das erhaltene Pellet mit etwa 25ml Diethylether resuspendiert und gewaschen. Das Zentrifugieren und Waschen wurde viermal wiederholt. Nach dem Trocknen der Peptide wurden sie in Wasser gelöst und gefriergetrocknet. Die Peptide lagen nach der Abspaltung C-terminal als Amide vor.

### 3.4.7 Analytische und präparative HPLC

Alle Peptide wurden mittels Reversed-Phase HPLC analytisch auf ihren Reinheitsgrad untersucht. Es wurde ein linearer Gradient von 5% bis 60% Acetonitril/0,05% TFA gegen Wasser/0,05% TFA in 20min verwendet. Das Injektionsvolumen betrug ca. 20 $\mu$ l, in Abhängigkeit der Konzentration der Peptidlösung, die zwischen 0,5mg/ml und 1mg/ml lag. Die Flussrate betrug 1,2ml/min. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 214nm.

Im Anschluß daran wurden die Peptide mittels präparativer HPLC gereinigt. Dazu wurden die Peptide in Wasser gelöst, filtriert und auf eine präparative Säule gepumpt. Der Gradient und die Laufzeit wurden aufgrund der unterschiedlichen Reinheit der Rohpeptide variiert. Als Laufmittel dienten Acetonitril/0,05% TFA gegen Wasser/0,05% TFA. Die Flussrate betrug 12ml/min. Die Detektion erfolgte photometrisch bei 214nm. Der Hauptpeak wurde mittels Fraktionssammler aufgefangen, wobei die Fraktionszeit 10s betrug. Alle erhaltenen Fraktionen eines Peptides wurden anschließend mittels analytischer HPLC auf ihre Reinheit kontrolliert. Sämtliche reinen Fraktionen wurden vereinigt und gefriergetrocknet. Die Reinheit der Peptide lag danach bei 90% bis 95%.

### 3.4.8 Laserdesorptions-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF)

Die Konzentration der Peptidlösungen für die Massenspektrometrie betrug 1 $\mu$ mol/ml. Als Matrix wurde alpha-Cyano-4-hydroxizimtsäure verwendet, von der eine gesättigte Lösung in Acetonitril/Wasser (Verhältnis 2:1) hergestellt wurde. Jeweils 1 $\mu$ l der Proben- und der Matrixlösung wurden auf dem Probenhalter gemischt und an der Luft getrocknet.

Die Laserdesorptions-Massenspektrometrie führten wir mit einem LaserTec BenchTop II System (Perspective Biosystems, Vestec) unter Verwendung eines Stickstofflasers bei 337nm, 3ns gepulst, durch. Die desorbierten Ionen wurden bei 26,2kV beschleunigt und nach einer Flugstrecke von 1,2m von einem Sekundärelektronenvervielfacher detektiert. Die Signale von vielen Laserimpulsen

wurden addiert. Die Verarbeitung der Primärdaten wurde anschließend mit dem Auswertungsprogramm Grams386 auf einem PC durchgeführt.

Die Integrale der Signalfächen geben nicht die Konzentrationsverhältnisse der Proben wieder. Sie variieren je nach Desorptions- und Ionisationsfähigkeit der Moleküle und in Abhängigkeit von der Laserenergie. Diese Methode liefert ausschließlich Aussagen über die qualitative Zusammensetzung einer Probe.

## 4 Ergebnisse

Für den durchflusszytometrischen Nachweis antigenspezifischer T-Zellen nach Kurzzeit-Stimulation mit Peptiden, Peptidbibliotheken oder anderen Antigenen wie z. B. CMV-Viruslysate und anschließender simultaner Detektion von Oberflächenmarkern und intrazellulärer Zytokinexpression unter Verwendung von PBMC [148, 151] lagen im Institut unterschiedliche Protokolle vor.

Der erste Teil der methodischen Arbeiten diente daher der Etablierung eines effektiven Protokolls für alle weiteren Versuche mit intrazellulärer Zytokinfärbung.

Zunächst musste also eine Optimierung hinsichtlich Aufwand an Material, Arbeit und Zeit sowie eine Vereinheitlichung der Methodik zur besseren Vergleichbarkeit erfolgen. Dazu wurden systematisch das Stimulationsvolumen, das Stimulationsmedium und das Verfahren zur Ablösung der Zellen von der Röhrchenwand im Laufe der Versuchsdurchführung untersucht (Abschnitt 4.1).

In einem zweiten Teil methodischer Experimente wurde untersucht, welche Konfigurationen Peptide und Peptidbibliotheken aufweisen müssen, um bestimmten Anforderungen beim Einsatz als stimulierende Antigene gerecht zu werden (Abschnitt 4.2).

### 4.1 Vorversuche - Vereinheitlichung und Vereinfachung der Methode

#### 4.1.1 Volumen der Probenansätze

Die bisherigen Versuche waren in einem Volumen von 2ml pro Ansatz durchgeführt worden. Als Vorteil eines kleineren Volumens wurde eine geringere Menge an nötigem Probandenmaterial (Blut bzw. PBMC) sowie an Stimulationsantigenen angesehen. Es wurde eine Ersparnis von Kosten erwartet. Zudem könnten mit der gleichen Menge an Probandenmaterial mehr Stimulationen angesetzt werden, was vor allem beim Einsatz der Methode bei Patienten im Rahmen von klinischen Studien wichtig wäre, da man in diesem Fall mit weniger Material auskommen könnte.

Von Bedeutung war, dass bei der Verkleinerung des Stimulationsvolumens die T-Zell-Antworten in gleichem Umfang erzielt werden sollten.

Drei Probanden, die bekanntermaßen eine T-Zell-Antwort gegenüber pp65-Peptiden aufwiesen, wurde Blut abgenommen. Ihre PBMC wurden mit der pp65-Gesamt-

mischung stimuliert, wobei jeweils ein Stimulationsvolumen von 1ml mit dem von 2ml verglichen wurde. Für alle Versuchsansätze wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zudem wurden unstimulierte Kontrollen mitgeführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

**Tabelle 4.1:** Ergebnisse der Versuche zum Vergleich der Stimulation in verschiedenen Stimulationsvolumina bei drei gesunden Spendern.

		Proband 1	Proband 2	Proband 3
1ml Volumen	Ansatz 1	0,22	0,65	0,16
	Ansatz 2	0,23	0,57	0,12
	Mittelwert	0,23	0,61	0,14
2ml Volumen	Ansatz 1	0,21	0,71	0,11
	Ansatz 2	0,19	0,70	0,13
	Mittelwert	0,20	0,71	0,12
Differenz		+13 %	-16 %	+14 %

Bei den 3 Probanden lagen die Antworten (CD8 Lymphozyten, die IFN $\gamma$  produzieren) der 1ml-Ansätze in etwa vergleichbaren Größenordnungen wie in denen der 2ml-Ansätze. Aus unserer Sicht ließ sich also das Stimulationsvolumen auf 1ml verringern. So konnten die Materialkosten deutlich gesenkt werden und mit geringeren Zellzahlen pro Ansatz gearbeitet werden (und damit geringeren Blutvolumina, die den Probanden entnommen werden mussten).

#### 4.1.2 Ablösen der Zellen von der Röhrenwand

Nachfolgend untersuchten wir, ob das Ablösen der Zellen von der Wand der Stimulationsröhren, das im von Picker et al. vorgestellten Originalprotokoll [148] durch 15maliges Spülen mit einer Pipette erfolgte, auch durch Vortexen in ausreichender Weise erfolgen kann.



Zugrunde lag die Überlegung, dass ein 15maliges Spülen vor allem bei großen Versuchsansätzen einen mühsamen und zeitintensiven Arbeitsschritt darstellte und zu Ungenauigkeiten und damit auch zu mangelnder Reproduzierbarkeit führen könnte.

Ein Vortexen für 15s pro Röhrchen hingegen würde ein relativ einfaches und leicht auch bei großen Versuchsansätzen durchführbares Verfahren darstellen.

Dazu wurden PBMC von 3 Probanden, die bekannterweise eine CD8 T-Zell-Reaktion auf die Stimulation mit Peptiden aus pp65 zeigten, mit der pp65-Gesamtmischung stimuliert.

Jeweils in Dreifachansätzen wurden dann beide Verfahren der Zellablösung von der Röhrchenwand (einmaliges Vortexen für 5 Sekunden und 15faches Spülen mit der Pipette) durchgeführt und die Ergebnisse miteinander verglichen (siehe Tabelle 4.2).

**Tabelle 4.2:** Ergebnisse der Versuche zum Vergleich der verschiedenen Verfahren zum Ablösen der Zellen von der Röhrchenwand.

		Proband 1	Proband 2	Proband 3
Spülen	Ansatz 1	1,07	0,05	0,35
	Ansatz 2	0,84	0,06	0,36
	Ansatz 3	0,97	0,04	0,37
	Mittelwert	0,96	0,05	0,36
Vortexen	Ansatz 1	0,88	0,04	0,26
	Ansatz 2	0,89	0,05	0,33
	Ansatz 3	1,19	0,06	0,33
	Mittelwert	0,99	0,05	0,31
Differenz		-3 %	+/-0 %	+14 %

Bei allen drei Probanden konnten mit dem Vortexen sehr ähnliche Ergebnisse erzielt werden wie mit dem 15maligen Spülen bezüglich der Höhe der CD8-Antwort (CD8 und IFN $\gamma$ -produzierende T-Lymphozyten).

Zudem konnten beim Vergleich der Gesamtzellzahl in den verschiedenen Versuchsansätzen keine deutlichen Unterschiede festgestellt werden. Das bedeutet, dass der Zellverlust bei beiden Verfahren in einer vergleichbaren Größenordnung liegt.

Da das Vortexen eine erhebliche Arbeitsvereinfachung gegenüber dem Spülen gerade beim Bewältigen großer Ansätze von 50 und mehr Probenröhrchen bedeutet, und es zudem auch weniger fehleranfällig ist, ersetzten wir im Versuchsablauf das Spülen durch Vortexen für 5 Sekunden. Alle Röhrchen konnten so zügig ohne Zeitverzug und in gleicher Weise und nicht sequentiell wie beim Spülen behandelt werden. So konnte eine bessere Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Versuchsansätzen wie auch zu einer besseren Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Personen, die den Versuch durchführen, erreicht werden.

#### **4.1.3 Vorinkubation der PBMC in verschiedenen Medien**

Zur weiteren Vereinfachung und Vereinheitlichung prüften wir, ob die nächtliche Vorinkubation der PBMC im Brutschrank auch in RPMI-Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) möglich ist, anstatt sie wie bisher in RPMI-Medium mit 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA) durchzuführen. Auf diese Weise wurde kein Mediumwechsel nach der nächtlichen Vorinkubation notwendig. Diese sollte in FCS-haltigem Medium durchgeführt werden, da wir bei Proliferationsversuchen im BSA-haltigen Medium mehr unspezifische Stimulationen beobachtet hatten.

Wir verglichen die Vorinkubation in den zwei verschiedenen Medien und führten den weiteren Versuchsablauf identisch durch. Dazu stimulierten wir PBMC von drei Probanden mit der pp65-Gesamt Mischung, die bereits zuvor eine CD8 T-Zell-Antwort auf Peptide aus pp65 gezeigt hatten. Die Versuche wurden jeweils in Doppelansätzen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.3 dargestellt.

**Tabelle 4.3:** Ergebnisse der Versuche zum Vergleich des Einsatzes verschiedener Zellkulturmedien zur Vorinkubation der PBMC.

		Proband 1	Proband 2	Proband 3
BSA-Medium	Ansatz 1	0,14	0,18	0,06
	Ansatz 2	0,13	0,16	0,05
	Mittelwert	0,14	0,17	0,06
FCS-Medium	Ansatz 1	0,14	0,16	0,05
	Ansatz 2	0,15	0,18	0,04
	Mittelwert	0,15	0,17	0,05
Differenz		+7 %	+/-0 %	-17 %

Bei den drei Probanden, deren Zellen mit der Peptidmischung stimuliert wurden, konnten sowohl bei der Vorinkubation in BSA-haltigem Medium als auch in FCS-haltigem Medium ähnlich hohe Antworten (CD8 Lymphozyten, die IFN $\gamma$  produzieren) gemessen werden.

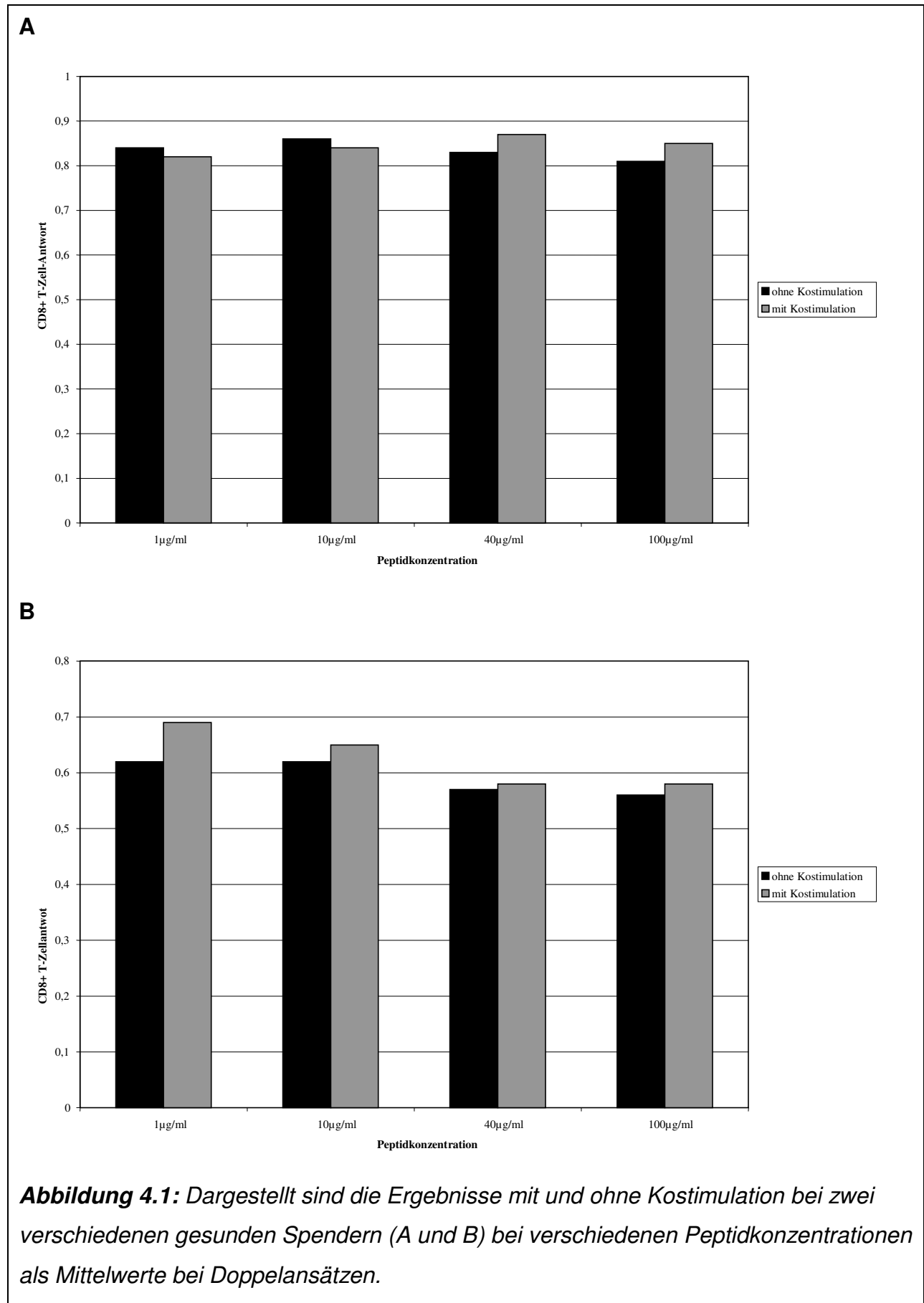
Da die Vorinkubation in FCS-Medium zumindest gleich hohe Antworten erzeugt wie die in BSA-Medium, haben wir das Versuchsprotokoll entsprechend geändert. Auf diese Weise benutzen wir für den gesamten Versuch nur noch eine Art von Zellkulturmedium : RPMI-Medium mit 10% FCS, L-Glutamin und Antibiotikazusatz (Penicillin/Streptomycin).

#### 4.1.4 Kostimulation

Viele Autoren propagieren den Einsatz von kostimulatorischen Antikörpern, um die Stimulationsantwort zu verstärken. Um den Stellenwert einer zusätzlichen Kostimulation zu evaluieren, verglichen wir die Stimulation von PBMC mit und ohne Zugabe von Antikörpern gegen CD28 bei zwei Probanden, die bekanntermaßen eine CD8 T-Zell-Antwort gegenüber dem Peptid NLVPMVATV aus pp65 aufwiesen. Die Färbung erfolgte mit Tetrameren, die PE-markiert waren und das Peptid NLVPMVATV gebunden hatten. Auf diese Weise konnte ausgeschlossen werden, dass durch die Kostimulation andere

T-Zellen aktiviert wurden, als dies durch die Peptidstimulation alleine der Fall war. Analysiert wurden also nur Zellen, die Tetramer- und IFN $\gamma$ -positiv waren.

Bei beiden Probanden konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Proben, denen kostimulatorische Antikörper zugefügt wurden und denen ohne Kostimulation, festgestellt werden (Abbildung 4.1).



## **4.2 Welche Konfigurationen sollten Peptide und Peptidbibliotheken aufweisen, um bestimmten Anforderungen beim Einsatz als stimulierende Antigene gerecht zu werden ?**

Grundsätzlich sollen die Peptide eine effektive Stimulation der gewünschten Zielzellpopulation bewirken. Idealerweise sollen sie einfach und preiswert zu produzieren sein und praktisch in ihrer Handhabbarkeit sein.

Die speziellen Anforderungen, die an die Peptide gestellt werden, werden durch ihre beabsichtigte Verwendung definiert.

### **4.2.1 Analyse antigenspezifischer CD8-positiven T-Zellen durch Stimulation mit Peptiden einer Länge von neun bis zehn Aminosäuren**

Wenn ein CD8-T-Zell-Epitop in seiner AS-Sequenz bekannt ist, kann man es einsetzen, um die Frequenz, den Phänotyp und die Funktionalität von T-Zellen, die dieses Epitop erkennen, zu analysieren.

Um zu bestimmen, wie akkurat solche Frequenzen unter Einsatz verschiedener Peptidkonzentrationen zu messen sind, wählten wir das gut bekannte HLA-A\*0201 präsentierte Peptid NLVPMVATV aus HCMV pp65 [117].

Es wurde ein Spender gewählt, der bekanntermaßen eine T-Zell-Reaktion gegenüber diesem aufwies. T-Zellen dieses Spenders wurden mit dem entsprechenden HLA-A\*2010/NLVPMVATV-Tetramer gefärbt, um die Frequenz der T-Zellen festzustellen, die dieses Epitop erkennen würden. Simultan dazu wurde die Stimulation mit dem Peptid alleine durchgeführt. Das Protokoll zur Tetramerfärbung wie im Methodenteil beschrieben stellt eine Modifikation des Originalprotokolls dar, das uns von Sharon Waldrop zur Verfügung gestellt worden war. In Vorversuchen konnten wir zeigen, dass die Zugabe des Tetramers 30 min vor der Peptidstimulation erfolgen sollte, um optimale Färbeergebnisse zu erzielen.

Etwa 80 % der tetramerpositiven Zellen produzierten IFN $\gamma$  nach Stimulation mit NLVPMVATV. Peptidkonzentrationen über 1  $\mu$ g/ml (bis zu 40  $\mu$ g/ml wurde getestet) konnten den Prozentsatz nicht erhöhen. Wir haben in gleicher Weise bei sechs gesunden Spendern – die bekanntermaßen eine T-Zell-Antwort gegenüber dem Peptid aufwiesen - den Teil der tetramerpositiven CD8 T-Zellen gemessen, der in der Lage war, IFN $\gamma$  zu produzieren. Der Anteil der Interferon-produzierenden CD8-T-Zellen lag im Durchschnitt bei 66,9 +/- 14,3% (mean +/- SD, SD geschätzt für n=6 Beobachtungen). Dabei war wichtig, dass keine der Tetramer-negativen Zellen auf die Stimulation mit

dem Peptid hin IFN $\gamma$  produzierten. Dies zeigte, dass solche peptidinduzierten Antworten hochspezifisch sind.

#### 4.2.2 Länge der CD8-T-Zell-stimulierenden Peptide

Peptide mit einer Länge von 15 Aminosäuren werden häufig in so genannten Peptidbibliotheken zur Stimulation von CD8-T-Zellen eingesetzt. Dabei handelt es sich um Mischungen von Peptiden, die eine interessierende Aminosäuresequenz komplett abdecken. Aufeinander folgende Peptide weisen dabei eine definierte Zahl von Aminosäuren auf, die sich überlappen. Wenn zum Beispiel die Länge der Einzelpeptide 15 Aminosäuren beträgt und die Überlappung 8 Aminosäuren ist, so wird eine Aminosäuresequenz einer Länge von 120 durch nur 16 Einzelpeptide dargestellt (1-15, 8-22, 15-29, 22-36, 29-43, 36-50, 43-57, 50-4, 57-71, 64-78, 71-85, 78-92, 85-99, 92-106, 99-113, 106-120).

Im Gegensatz dazu werden 112 Einzelpeptide benötigt, wenn die Peptidlänge 9 Aminosäuren beträgt und die Einzelpeptide mit jeweils 8 Aminosäuren überlappen sollen. Dies führt zu mehr Arbeitsaufwand, höheren Kosten und zu größeren Mengen Probandenmaterial (Blut), das für die Testung benötigt wird.

Daher schien es wichtig, die Effektivität von 15-AS-Peptiden und kürzeren Peptiden in Hinblick auf ihre Fähigkeit CD8-T-Zellen zu stimulieren, zu vergleichen. Diese kürzeren Peptide mit einer Länge von 9 bis 10 AS sind eigentlich optimal, um an den Bindungsstellen der MHC-Klasse-I-Moleküle zu binden, und CD8-positive T-Zellen zu stimulieren [74].

Anfangs verglichen wir das gut bekannte – aus CMV pp65 stammende – Peptid 495-NLVPMVATV-503 und das längere Peptid 493-ARNLVPMVATVQQQN-507, das in seiner Sequenz das kürzere Peptid enthält. Dabei stehen die Zahlen für die Nummern der ersten und letzten Aminosäuren in der Aminosäuresequenz des Gesamtproteins.

Beim Einsatz des Peptides in der gängigen Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  beobachteten wir, dass die Stimulation mit dem 9 Aminosäure langen Peptid effektiver war.

Wir sahen einen etwa 20 % niedrigeren Anteil an IFN $\gamma$  produzierenden CD8-T-Zellen bei Stimulation mit dem 15-AS-Peptid – in derselben Konzentration eingesetzt.

Alle Peptide, die in diesen Experimenten verwendet wurden, waren Peptide mit einer minimalen Reinheit von 60 % durch HPLC bestimmt. Um dieses Phänomen systematischer zu untersuchen, verglichen wir die Antworten von 9-AS-Peptiden bzw. 10-AS-Peptiden und korrespondierenden 15-AS-Peptiden, indem wir eine Reihe von

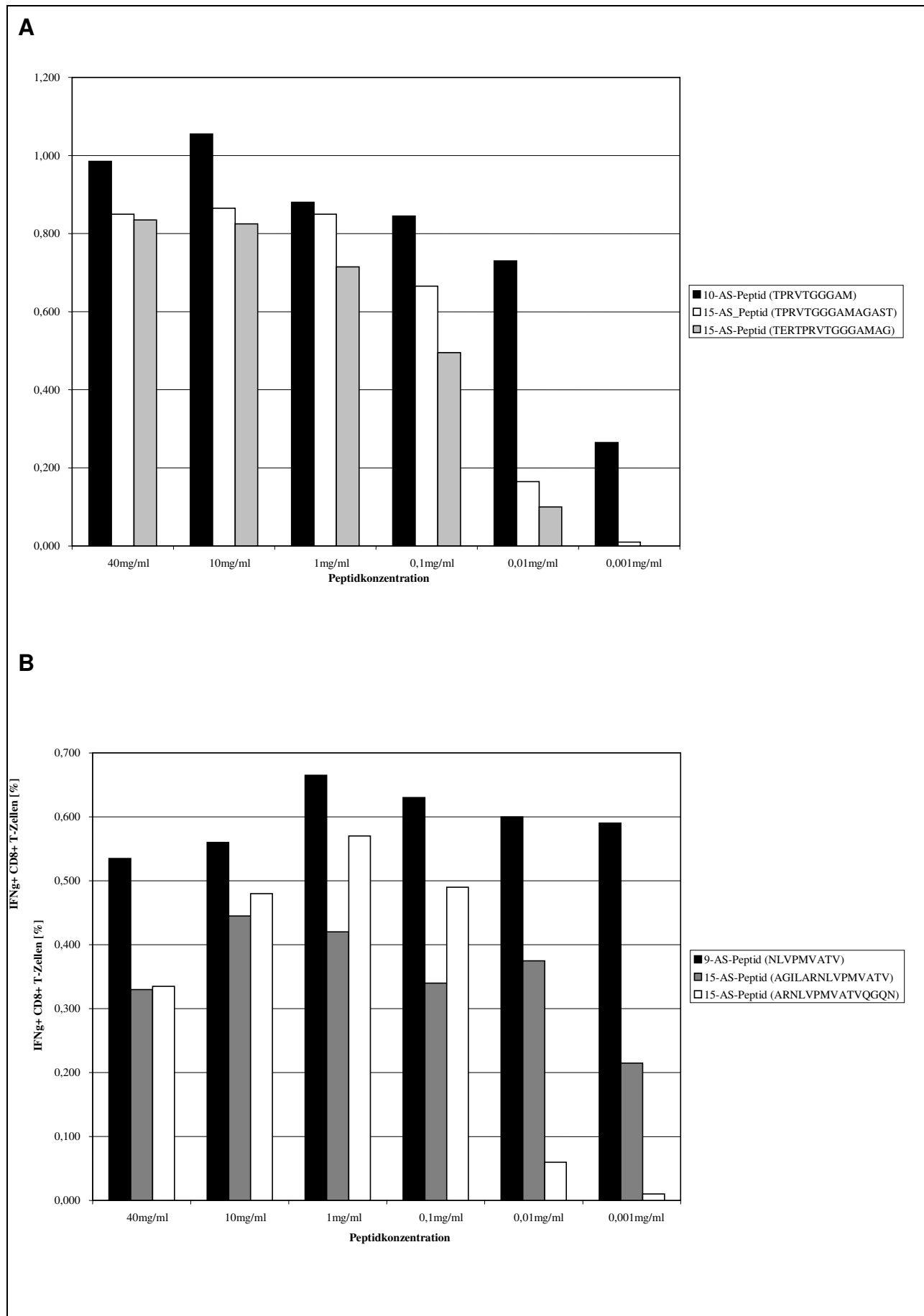
Dosis-Wirkungskurven mit gereinigten Peptiden erstellt. Es wurden jeweils zwei aufeinanderfolgende 15-AS-Peptide aus pp65 bzw. IE-1 gewählt, die beide das kürzere Peptid in ihrer AS-Sequenz aufwiesen. Alle eingesetzten Peptide wurden mittels präparativer HPLC auf eine Reinheit > 95% gebracht. Alle Versuche wurden mit Doppelansätzen durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse stellen die entsprechenden Mittelwerte dar. Eine Übersicht über die durchgeführten Experimente ist in Tabelle 4.4 dargestellt.

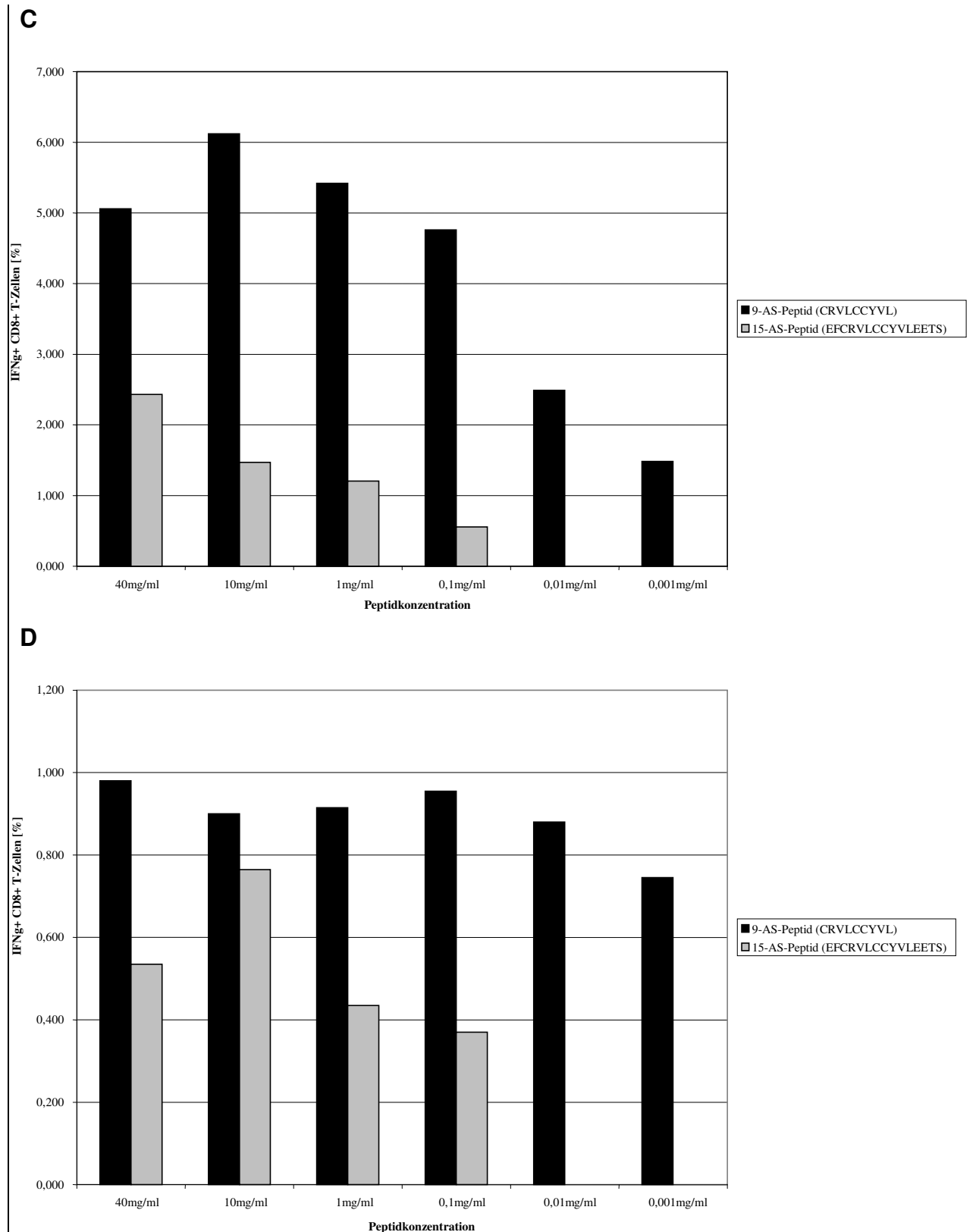
**Tabelle 4.4:** Übersicht über die durchgeführten Dosis-Wirkungs-Kurven Experimente mit Peptiden aus pp65 und IE-1.

Nr.	Peptide	Konzentrationen [mg/ml]	Spender
1	NLVPMVATV ARNLVPMVATVQQQN AGILARNLVPMVATV	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 1
2	NLVPMVATV ARNLVPMVATVQQQN AGILARNLVPMVATV	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 2
3	NLVPMVATV ARNLVPMVATVQQQN AGILARNLVPMVATV	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 3
4	NLVPMVATV ARNLVPMVATVQQQN AGILARNLVPMVATV	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 4
5	NLVPMVATV ARNLVPMVATVQQQN AGILARNLVPMVATV	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 5
6	TPRVTGGGAM TPRVTGGGAMAGAST TERTPRVTGGGAMAG	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 6
7	TPRVTGGGAM TPRVTGGGAMAGAST TERTPRVTGGGAMAG	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 7
8	TPRVTGGGAM TPRVTGGGAMAGAST TERTPRVTGGGAMAG	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 8
9	TPRVTGGGAMAGAST TERTPRVTGGGAMAG	100; 200	Proband 8
10	CRVLCCYVL EFCRVLCCYVLEETS	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 5
11	CRVLCCYVL EFCRVLCCYVLEETS	0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 40	Proband 9



## 4.2.3 Dosis-Wirkungs-Kurven Ergebnisse



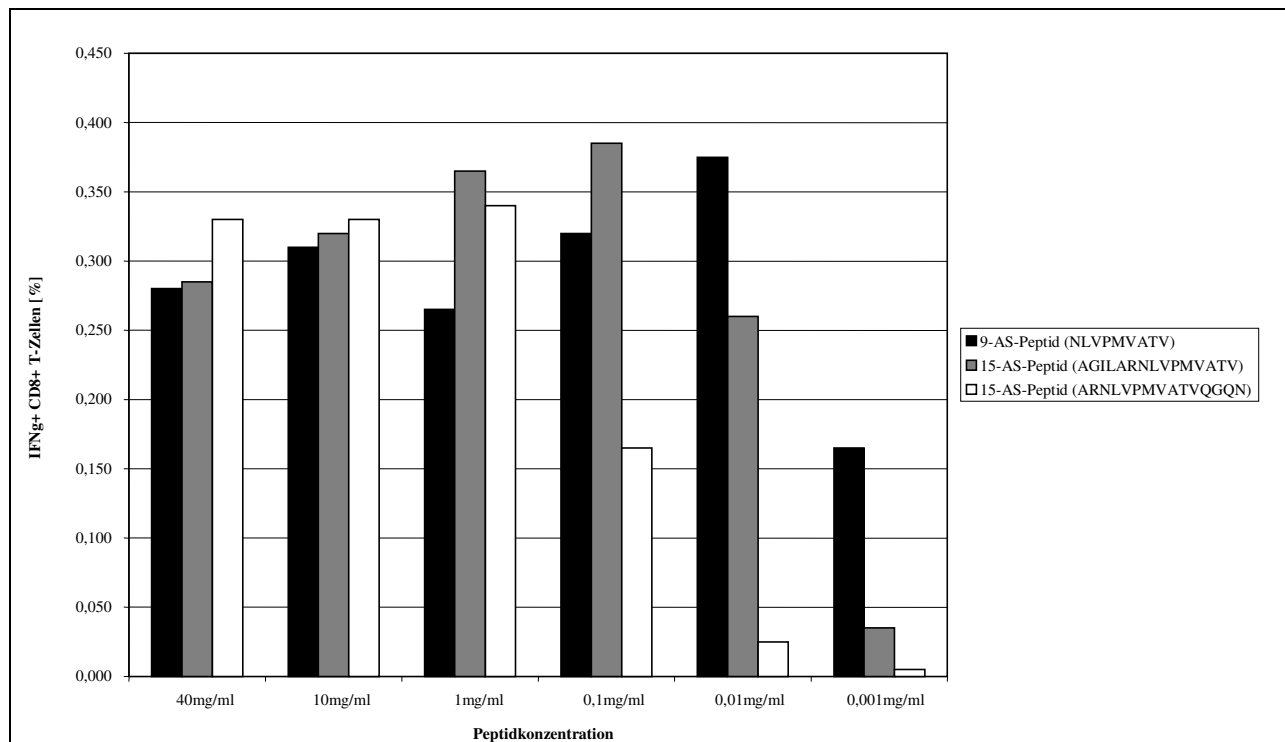


**Abbildung 4.2:** Hier dargestellt sind die Ergebnisse von insgesamt vier Spendern (A, B, C und D), deren PBMC mit verschiedenen Konzentrationen von 9- bzw. 10-AS-Peptiden und den korrespondierenden längeren 15-AS-Peptiden aus pp65 und IE1 stimuliert

wurden. Gezeigt ist der Anteil der CD8-positiven T-Zellen, die auf die Stimulation hin  $IFN\gamma$  produzieren. Gut sichtbar ist der höhere Anteil an  $IFN\gamma$ - und CD8-positiven T-Zellen nach Stimulation mit den kurzen Peptiden im Verhältnis zur Stimulation mit den längeren Peptiden im gesamten Konzentrationsbereich der eingesetzten Peptide.

In allen von uns untersuchten Fällen, konnte klar gezeigt werden, dass die 9- bzw. 10-AS-Peptide effektiver CD8-positive T-Zellen zur  $IFN\gamma$ -Produktion stimulieren können als die entsprechenden längeren 15-AS-Peptide. Die jeweils maximal erreichbaren Antworten waren höher.

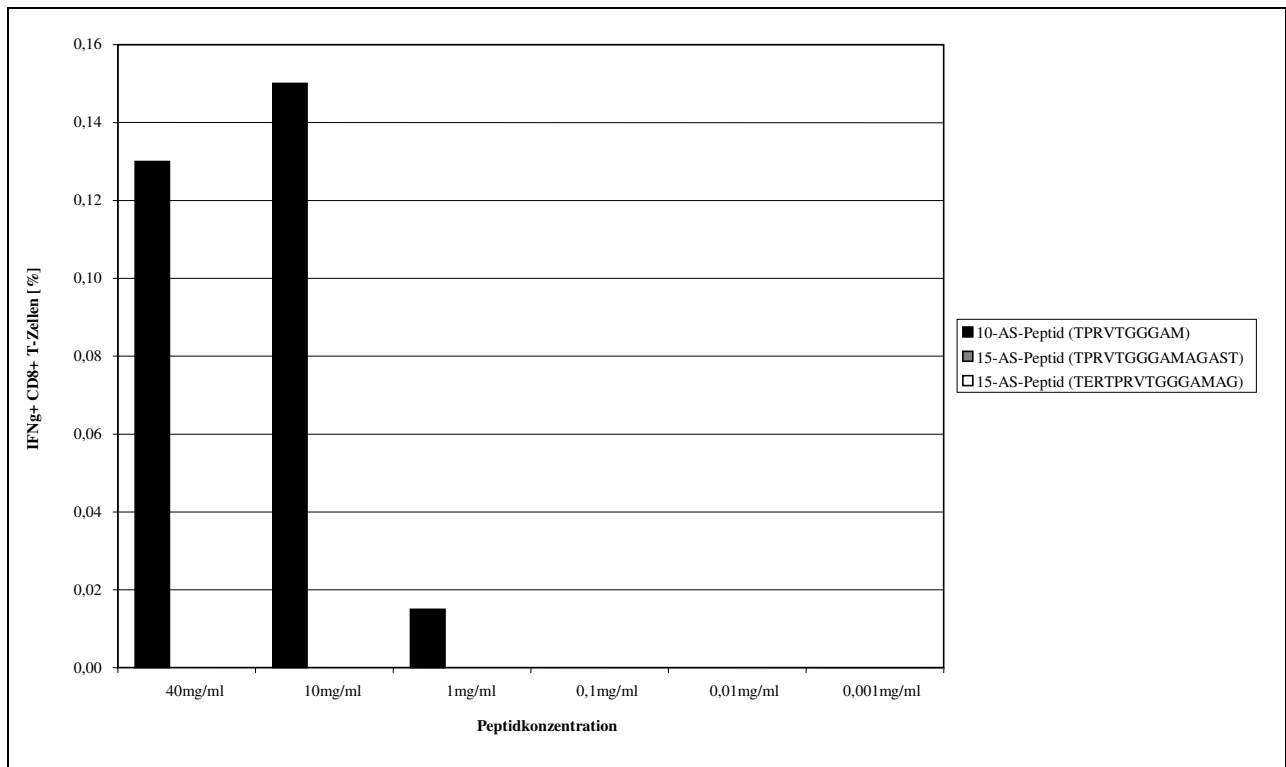
In einem Fall zeigte das optimale 9-AS-Peptid sein Maximum bei einer Konzentration von etwa 10  $\mu\text{g/ml}$ , mit höheren Dosen nahm seine Stimulationspotential eher ab, während die 15-AS-Peptide maximale Antworten bei etwa 100  $\mu\text{g/ml}$  und 1  $\text{mg/ml}$  induzierten. Bei 1  $\text{mg/ml}$  waren diese Antworten etwas höher als die, die mit dem 9-AS-Peptid erreicht wurden, sie lagen aber unter dem maximalen Wert, der mit dem 9-AS-Peptid erzielt werden konnte (Abbildung 4.3). Die Unterschiede waren aber sehr gering. Auch dieses Experiment bestätigt die Tendenz, dass kürzere Peptide den langen bei der Stimulation von spezifischen CD8-positiven T-Zellen schon bei geringeren Konzentrationen sicher detektierbare Antworten hervorrufen können.



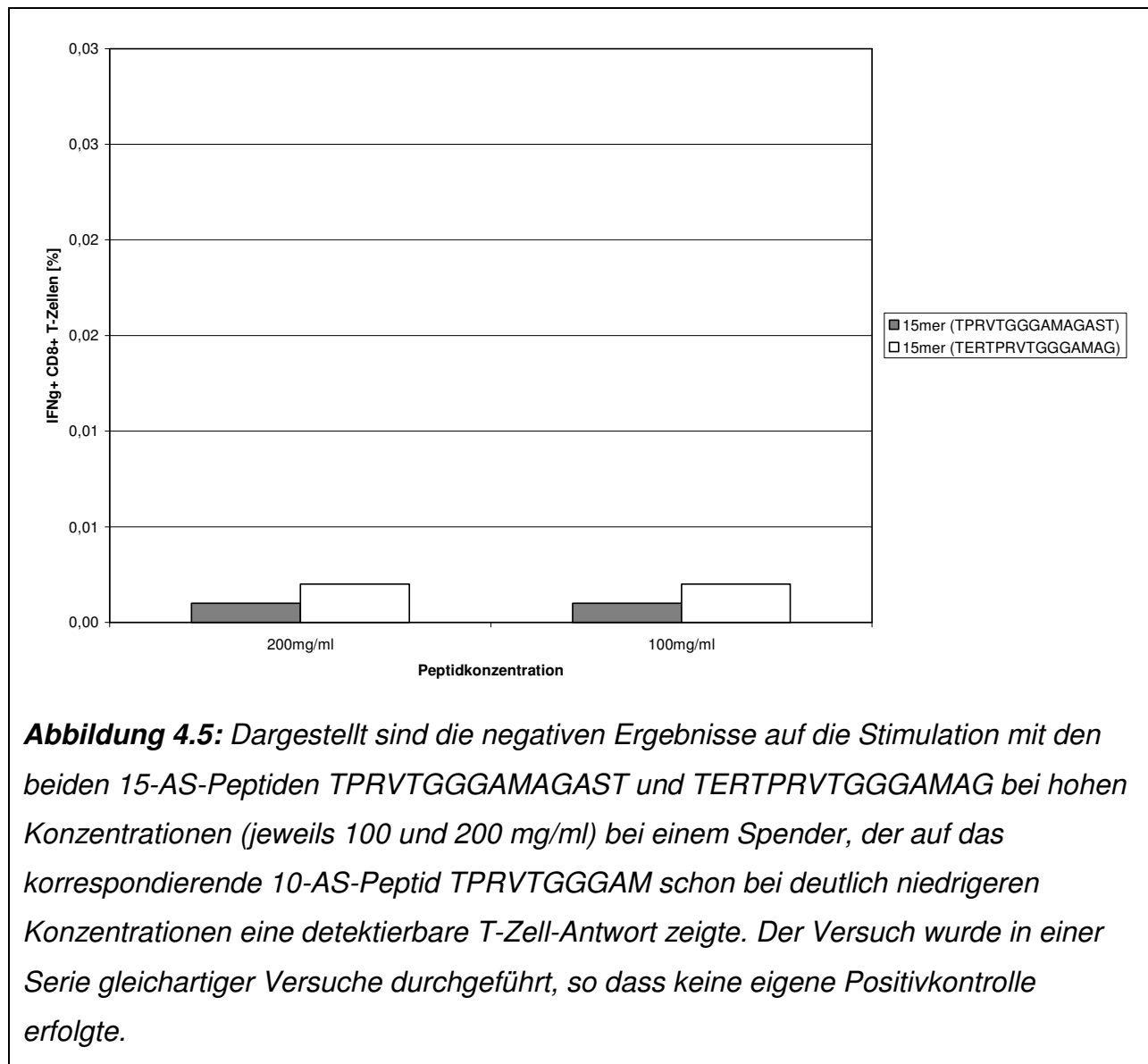
**Abbildung 4.3:** Dargestellt sind die Stimulationsergebnisse eines Spenders, bei dem im niedrigen Konzentrationsbereich das kurze 9-AS-Peptid den korrespondierenden längeren 15-AS-Peptiden überlegen ist. Ab einer Peptidkonzentration von 0,1 mg/dl gleichen sich die Ergebnisse der drei Peptide an (Sättigungsbereich).

In den meisten anderen Fällen waren die Antworten gegenüber dem jeweiligen 9-AS-Peptid höher als die gegenüber den 15-AS-Peptiden im gesamten getesteten Konzentrationsbereich der Peptide.

In einem Fall war die Antwort gegenüber dem 9-AS-Peptid bei 1 µg/ml kaum detektierbar, während gar keine messbare Antwort durch die 15-AS-Peptide ausgelöst wurde (Abbildung 4.4). Auch bei deutlich höheren Konzentrationen änderte sich diese Beobachtung nicht (Abbildung 4.5). Dieses komplette Fehlen einer Antwort gegenüber den 15-AS-Peptiden bei gleichzeitig vorhandener Antwort gegenüber dem kürzeren Peptid wurde bei nur einem von 50 Spendern beobachtet, der in den letzten Jahren in der Arbeitsgruppe analysiert wurde. Aufgrund dieser Besonderheit wurde der Spender insbesondere für die Dosis-Wirkungs-Kurven ausgewählt. Man kann spekulieren, dass dieser Spender nicht die Ausstattung mit den nötigen Proteasen/Peptidasen aufwies, um die längeren Peptide auf eine Länge zu kürzen, so dass sie in die entsprechende MHC-I-Bindungsspalte passten.



**Abbildung 4.4:** Ein Spender zeigte eine T-Zell-Reaktion auf Stimulation mit dem 10-AS-Peptid (TPRVTGGGAM) ab einer Peptidkonzentration von 1 mg/ml, auf Stimulation mit beiden korrespondierenden 15-AS-Peptiden konnte keine T-Zell-Antwort nachgewiesen werden.



**Abbildung 4.5:** Dargestellt sind die negativen Ergebnisse auf die Stimulation mit den beiden 15-AS-Peptiden TPRVTGGGAMAGAST und TERTPRVTGGGAMAG bei hohen Konzentrationen (jeweils 100 und 200 mg/ml) bei einem Spender, der auf das korrespondierende 10-AS-Peptid TPRVTGGGAM schon bei deutlich niedrigeren Konzentrationen eine detektierbare T-Zell-Antwort zeigte. Der Versuch wurde in einer Serie gleichartiger Versuche durchgeführt, so dass keine eigene Positivkontrolle erfolgte.

#### 4.2.4 Aminosäuren, die CD8-T-Zell-stimulierende Sequenzen flankieren, können erheblich die Stimulation stören und die Effektivität reduzieren

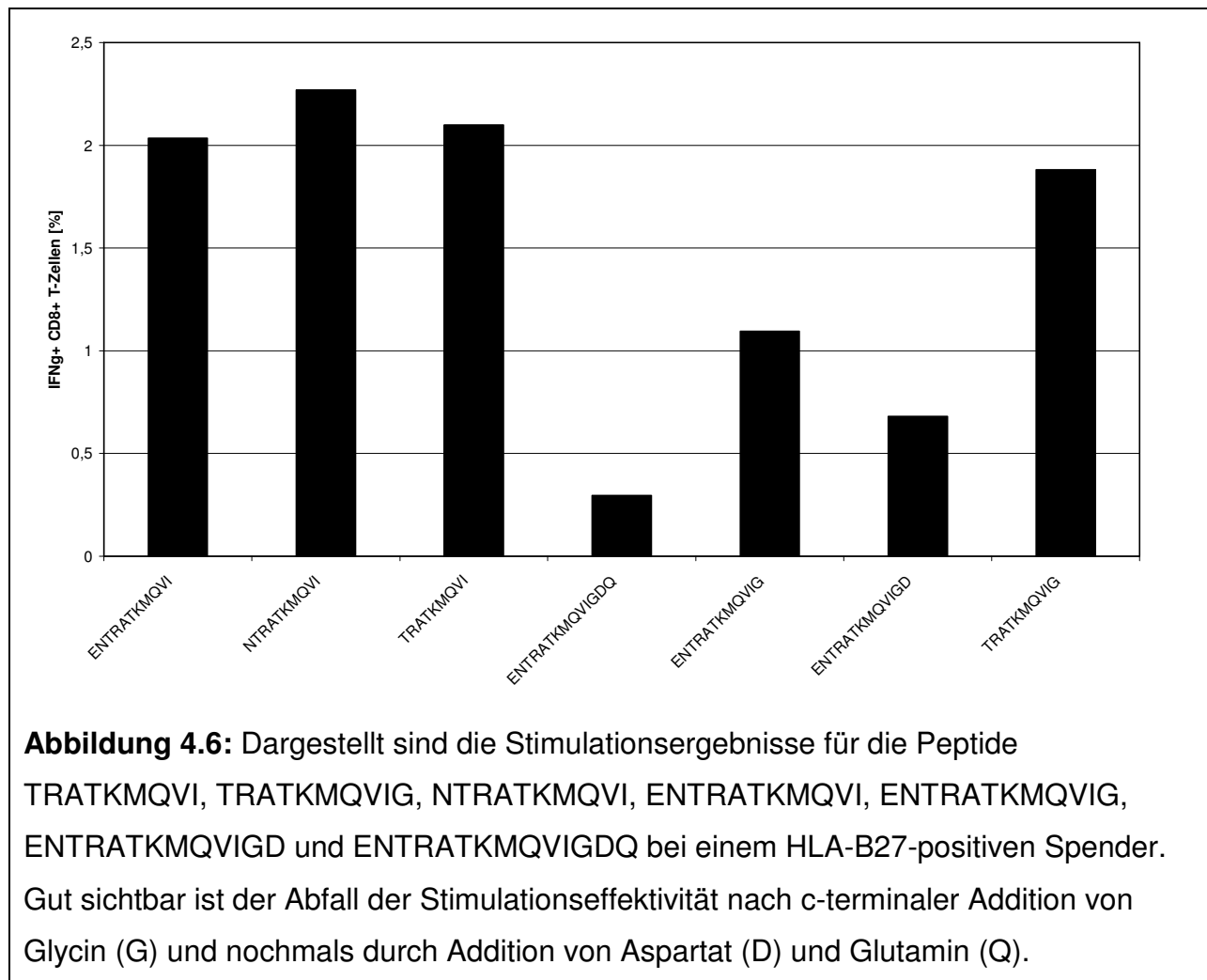
Ergebnisse von einem Spender, der auf die aus pp65 stammenden 15-AS-Peptiden 413-TERKTPRVTGGGAMA-427 und 417-TPRVTGGGAMAGAST-431 nicht reagierte, aber gegenüber dem 9-AS-Peptid 417-TPRVTGGGAM-426 eine CD8-T-Zell-Antwort aufwies, ließen vermuten, dass es Aminosäuren geben könnte, die mit dem Peptid-Clipping oder -Trimming stärker interferieren als andere.

Unter Peptid- bzw. Proteinclipping und -trimming versteht man post-proteasomale Veränderungen an Proteinen bzw. Peptiden. Diese werden in aller Regel durch proteolytische Enzyme durchgeführt [137, 138, 139].

Zum Beispiel wurde das aus pp65 stammende 9-AS-Peptid 211-TRATKMQVI-219 bei drei Spendern als eine stimulierende Sequenz identifiziert. Alle von ihnen reagierten auch auf das 15-AS-Peptid 205-VCSMENTRATKMQVI-219, jedoch gegenüber dem folgenden 15-AS-Peptid 209-ENTRATKMQVIGDQY-223 konnten keine Antworten gemessen werden. Dies unterschied sich klar vom vorangehenden Beispiel, bei dem nur ein Spender gegenüber beiden 15-AS-Peptiden nicht reaktiv war, die jedoch in der Lage waren, T-Zellen anderer Spender zu stimulieren.

Die Ergebnisse legten nahe, dass die vier C-terminalen Aminosäuren Glycin (G), Aspartat (D), Glutamin (Q) und Tyrosin (Y) alleine oder in Kombination miteinander bei allen drei Spendern mit einer effektiven Peptidpräsentation interferierten.

Um dies besser zu verstehen, synthetisierten und testeten wir die Einzelpeptide mit folgenden Sequenzen : TRATKMQVI, TRATKMQVIG, NTRATKMQVI, ENTRATKMQVI, ENTRATKMQVIG, ENTRATKMQVIGD und ENTRATKMQVIGDQ (FMOC-basierende Peptidsynthese). Alle Peptide wurden gereinigt (> 95%) und alle Versuche wurden in Doppelansätzen bei einem HLA-B27-positiven Spender, der bekanntermaßen eine CD8-T-Zell-Antwort gegenüber dem 9-AS-Peptid 211-TRATKMQVI-219 sowie dem 15-AS-Peptid 209-ENTRATKMQVIGDQY-223 aufwies, durchgeführt (Abbildung 4.6).



Die ersten vier Peptide stimulierten etwa gleich gut, die optimale Sequenz befand sich also innerhalb der Sequenz 209-ENTRATKMQVI-219. Das zugefügte C-terminale Glycin verringerte die Stimulationseffektivität deutlich, wenn es an 209-ENTRATKMQVI-219 angehängt wurde, jedoch weniger, wenn es zu dem kürzeren Peptid 211-TRATKMQVI-219 zugefügt wurde.

Es kann also sein, dass nach Anhängen von Glycin alleine das Peptid noch besser in die Bindungsspalte passte als nach N-terminalem Anhängen von Glutamat (E) und Arginin (N). Durch Anhängen von Aspartat (D) und Glutamin (Q) an den C-Terminus wurde die Stimulationseffizienz nochmals reduziert, bis mit dem 14-AS-Peptid nur noch etwa 10% der Effektivität erreicht wurde, die das 9-AS-Peptid erzielen konnte.

Aus diesem Experiment konnte zwar keine generelle Schlussfolgerung für das Anhängen von Aminosäuren an stimulierende Peptide gezogen werden, da es sich hier um ein Experiment mit einer einzelnen Aminosäuresequenz handelte. Jedoch konnte



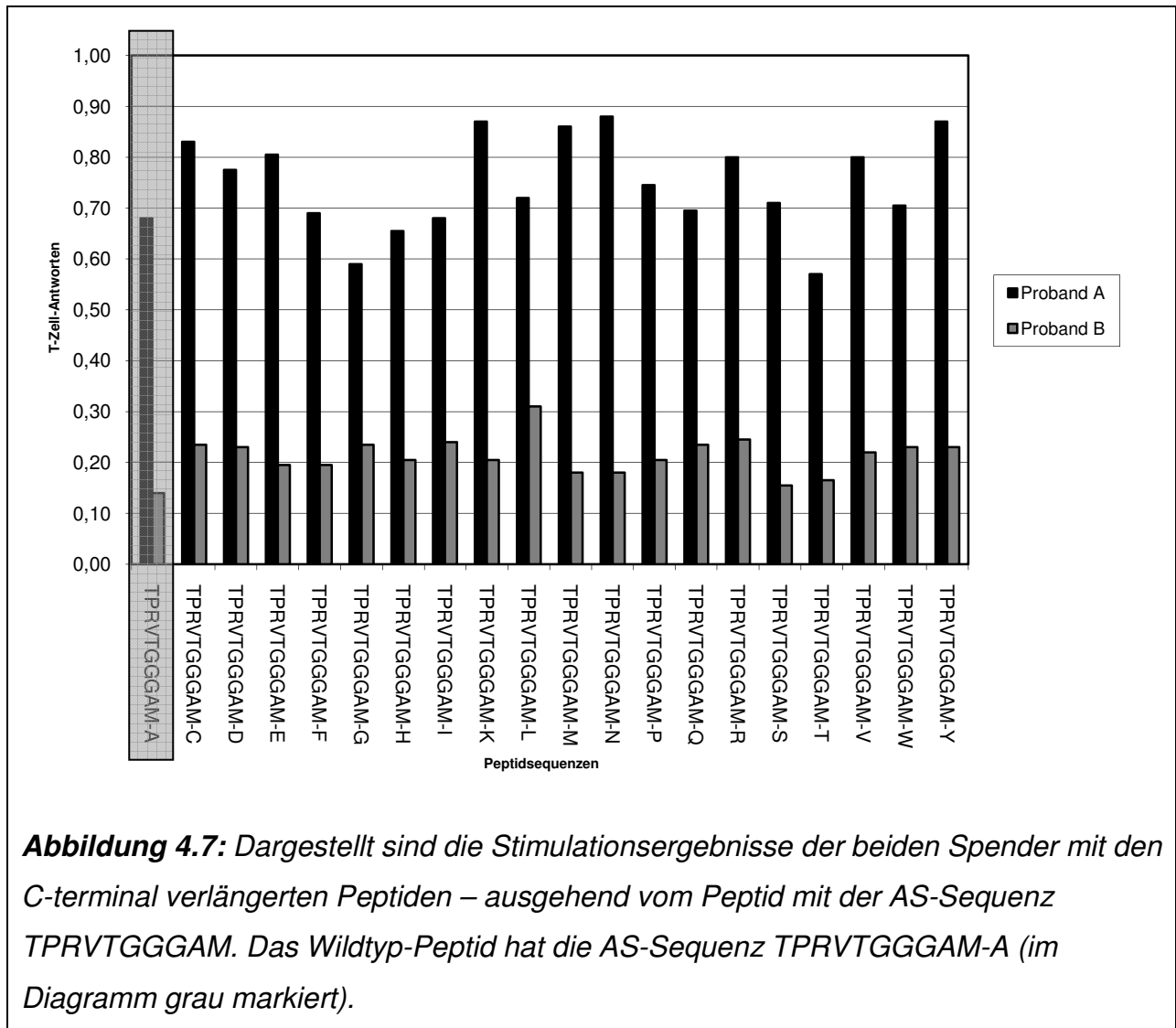
gezeigt werden, dass solche Aminosäureadditionen grundsätzlich die Fähigkeit von Peptiden T-Zellen zu stimulieren erheblich beeinträchtigen können.

Der Vergleich mit den vorher diskutierten Peptiden 417-TPRVTGGGAM-426 und dem korrespondierenden 417-TPRVTGGGAMAGAST-431 beispielsweise wies darauf hin, dass dies nicht einfach eine Frage der Anzahl der C-terminal angehängten Aminosäuren ist. 417-TPRVTGGGAMAGAST-431 war immer noch in der Lage, sehr effizient zu stimulieren, obwohl fünf Aminosäuren an die Sequenz 417-TPRVTGGGAM-426 angehängt wurden.

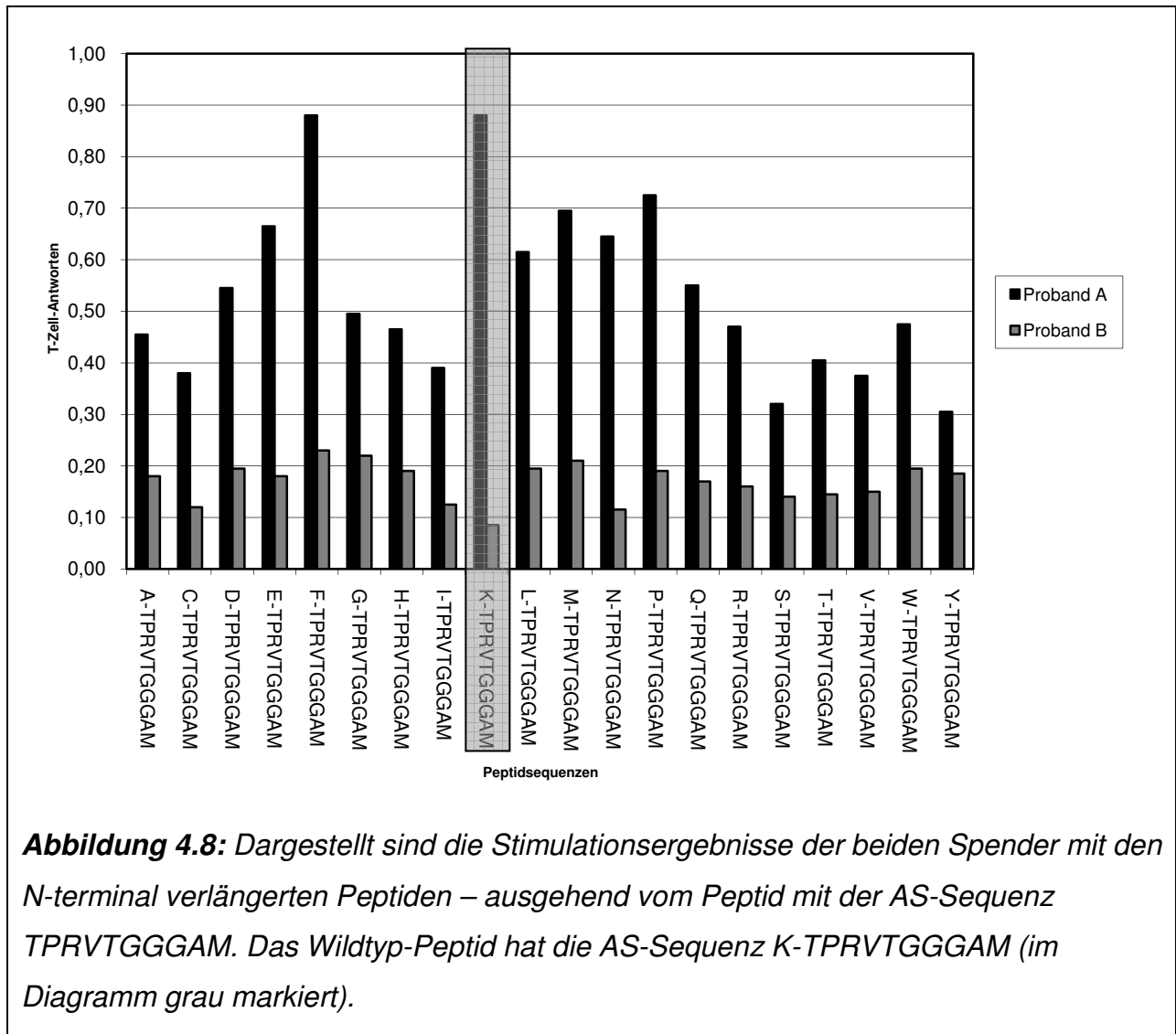
Um den Einfluss von flankierenden Aminosäuren auf die Effektivität der Präsentation des Epitops und der nachfolgenden Stimulation der spezifischen T-Zellen systematisch zu untersuchen, wählten wir das Peptid 417-TPRVTGGGAM-426 aus.

Wir verlängerten es jeweils um eine Aminosäure am C- oder N-Terminus unter Verwendung aller 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren. Auf diese Weise synthetisierten wir 40 Peptide mittels MPS, die alle > 95% mittels HPLC aufgereinigt wurden.

Anschließend wurden mit ihnen PBMC von zwei Blutspendern, die eine Antwort gegenüber dem ursprünglichen Peptid gezeigt hatten, mit Doppelansätzen getestet (Abb. 4.7 und 4.8). Die zugesetzte Peptidmenge betrug ca. 1 µg pro Ansatz.



**Abbildung 4.7:** Dargestellt sind die Stimulationsergebnisse der beiden Spender mit den C-terminal verlängerten Peptiden – ausgehend vom Peptid mit der AS-Sequenz TPRVTGGGAM. Das Wildtyp-Peptid hat die AS-Sequenz TPRVTGGGAM-A (im Diagramm grau markiert).



**Abbildung 4.8:** Dargestellt sind die Stimulationsergebnisse der beiden Spender mit den N-terminal verlängerten Peptiden – ausgehend vom Peptid mit der AS-Sequenz TPRVTGGGAM. Das Wildtyp-Peptid hat die AS-Sequenz K-TPRVTGGGAM (im Diagramm grau markiert).

Nach Addition von Aminosäuren an den C-Terminus wurden durch das am wenigsten effektive Peptid je nach Spender 45 % beziehungsweise 65 % der T-Zellen stimuliert, die durch das effektivste Peptid stimuliert werden konnten.

Nach N-terminaler Aminosäure-Addition stimulierten die am wenigsten effizienten Peptide je nach Spender 35 % beziehungsweise 36 % der T-Zellen, die durch das effektivste Peptid zur Zytokinproduktion angeregt wurden.

Hierbei wurde die Stimulationseffizienz durch C-terminales Anhängen von Glycin, Aspartat und Glutamin nicht so stark beeinträchtigt wie bei dem zuvor beschriebenen Beispiel mit 200-NTRATKMQVI-219.

Diese Beispiele zeigten, dass das Hinzufügen von Aminosäuren eine leicht unterschiedliche Beeinflussung der Stimulation bewirkten, je nachdem welche AS angehängt wurde. Dies war auch abhängig davon, ob sie C- oder T-terminal bei CD8-T-

Zell-stimulierenden Peptiden erfolgte. Auffällig ist auch, dass die Effekte, die durch das Anhängen der AS erzielt wurden, bei den beiden Spendern nicht gleichartig waren. Man kann spekulieren, dass diese Effekte abhängig waren von der angehängten Aminosäure, der Peptidsequenz selbst, der individuellen Protease-Ausstattung und anderen noch nicht bekannten Faktoren.

#### **4.2.5 PP65-Gesamtmischung aus 9-AS-Peptiden**

Bei Stimulation mit Peptiden, die länger waren als die optimale Länge, um in die entsprechende MHC-Bindungsspalte zu passen, konnte es zu einer Verschlechterung der Stimulationseffektivität kommen. Daher war aus unserer Sicht die Konzeption einer Gesamtmischung sinnvoll, die nur aus „optimal“ langen Peptiden – also 9-AS-Peptiden - bestand. Die einzelnen Peptide überlappten sich jeweils mit acht Aminosäuren, so dass die gesamte AS-Sequenz des pp65-Proteins mittels 552 Einzelpeptiden abgebildet werden konnte. Im Vergleich dazu lag die Zahl der Einzelpeptide bei der „konventionellen“ pp65-Gesamtmischung aus 15-AS-Peptiden bei 138.

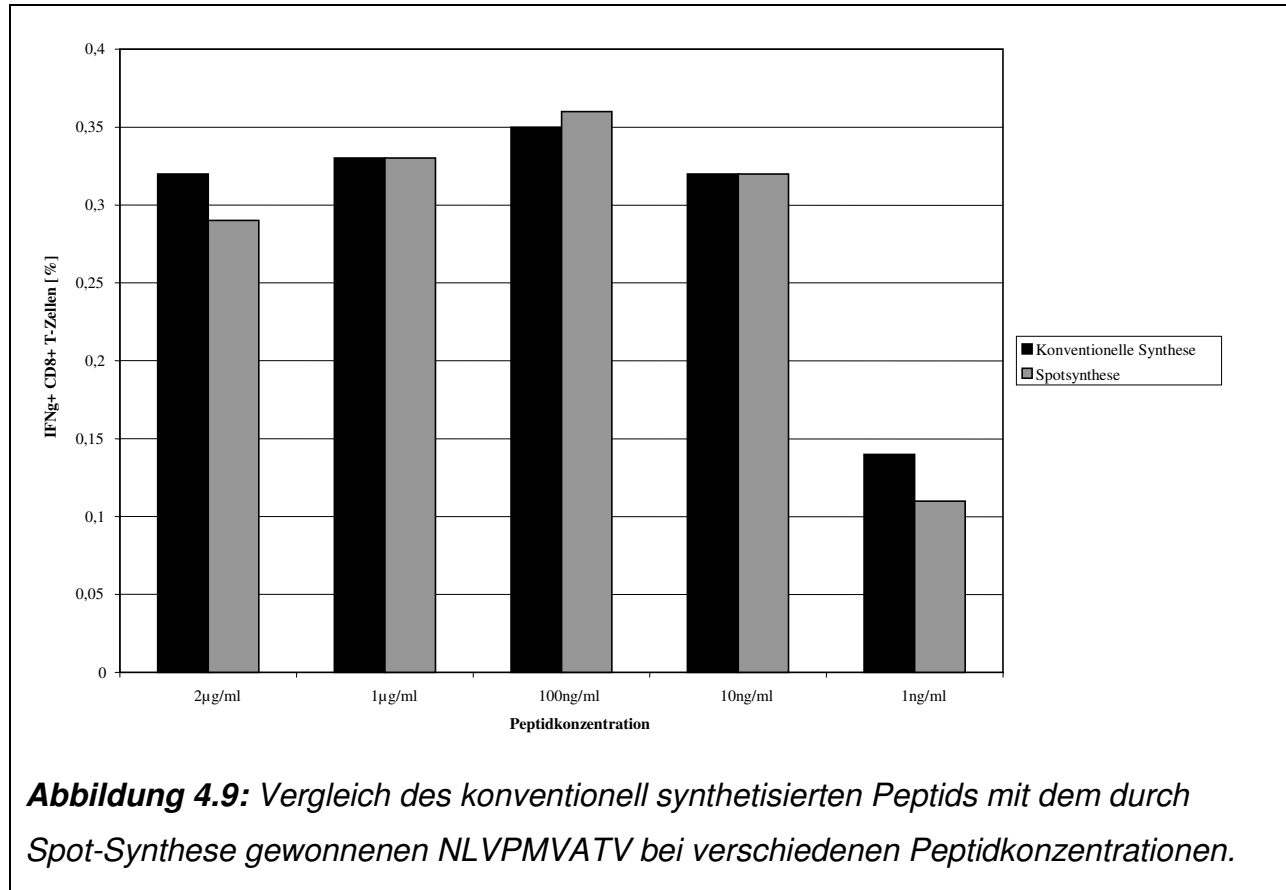
Die erhebliche Erhöhung der Zahl der Einzelpeptide machte den Einsatz neuer Techniken erforderlich, um den Arbeits- und Zeitaufwand zu reduzieren.

Die Peptide wurden mittels Spot-Synthese auf einer Zellulose-Membran synthetisiert.

Bei diesem Verfahren passten alle 552 Peptide auf eine Membran, die ein Format von DINA4 hat. Der Vorteil dieser Technik beruht in der enormen Zahl an Peptiden, die mit Hilfe eines Roboters auf einer relativ kleinen Membran synthetisiert werden können. Nachteilig ist die relativ kleine Ausbeute (etwa 10 ng Peptid pro Spot) sowie eventuell notwendige C-terminale Veränderungen bei der Peptidsynthese. Peptide werden vom C- zum N-Terminus synthetisiert und dazu am C-Terminus angeheftet, der dazu oft verändert ist. Unglücklicherweise dient der C-Terminus fast immer als Ankerposition und diese C-terminale Veränderungen interferieren vermutlich mit Peptid-Ankern in der MHC-Bindungsspalte.

Zunächst wurden PBMC eines gesunden Probanden, der bekanntermaßen gegenüber dem 9-AS-Peptid NLVPMVATV aus pp65 eine CD8 T-Zell-Antwort aufwies sowohl mit dem konventionell synthetisierten Peptid mit einer Reinheit > 95 % als auch mit dem Peptid, das mittels Spot-Synthese gewonnen worden war, stimuliert. Die Stimulationsergebnisse bei verschiedenen Peptidkonzentrationen sind als Dosis-Wirkungskurve in Abbildung 4.9 dargestellt. Dieser Vorversuch diente als

Qualitätskontrolle der Funktionalität der Peptide, die mittels Spot-Synthese hergestellt worden waren. Dabei wurde das Peptid NLVPMVATV stellvertretend für die anderen oben genannten gewählt.



Nachdem also gezeigt wurde, dass prinzipiell die spotsynthetisierten Peptide in ihrer Stimulationseffizienz mit den konventionell hergestellten vergleichbar waren, stimulierten wir PBMC zweier Blutspender, die bekanntermaßen auf Peptide der pp65-Gesamtmischung reagierten, mit der pp65-9-AS-Peptid-Mischung und parallel dazu mit der konventionellen pp65-Gesamtmischung aus 15-AS-Peptiden bestehend.

Beide Gesamtmischungen lieferten vergleichbare Antworten an CD8 T-Zellen, die mit einer IFN $\gamma$ -Produktion reagierten.

Die Erstellung von Peptid-Bibliotheken mit einer großen Anzahl an Einzelpeptiden wie oben beschrieben ist in den letzten Jahren immer wichtiger geworden – z. B. zum Epitopmapping mit dem Ziel einer Vakzinenentwicklung [168, 169].



Um diese Beobachtung systematisch zu untersuchen, wurden alle drei Peptide gereinigt (>95%) und als Einzelpeptide in Dosis-Wirkungskurven bei 3 Spendern getestet, bei denen zuvor eine CD4 T-Zell-Antwort gegenüber den Peptiden beobachtet worden war, alle drei waren HLA-DR11 positiv.

Beim Einsatz von 1 oder 10 µg/ml Peptid war der Unterschied zwischen den Peptiden 91 (361-PQYSEHPTFTSQYRI-375), 92 (365-EHPTFTSQYRIQGKL-379) und 93 (369-FTSQYRIQGKLEYRH-383) sichtbar aber nicht sonderlich stark ausgeprägt. Wenn aber das jeweilige Peptid in einer Konzentration von nur 1 ng/ml eingesetzt wurde, war der Unterschied erheblich. Bei allen drei Spendern wurden durch Peptid 92 deutlich mehr CD4-T-Zellen stimuliert als durch die beiden anderen.

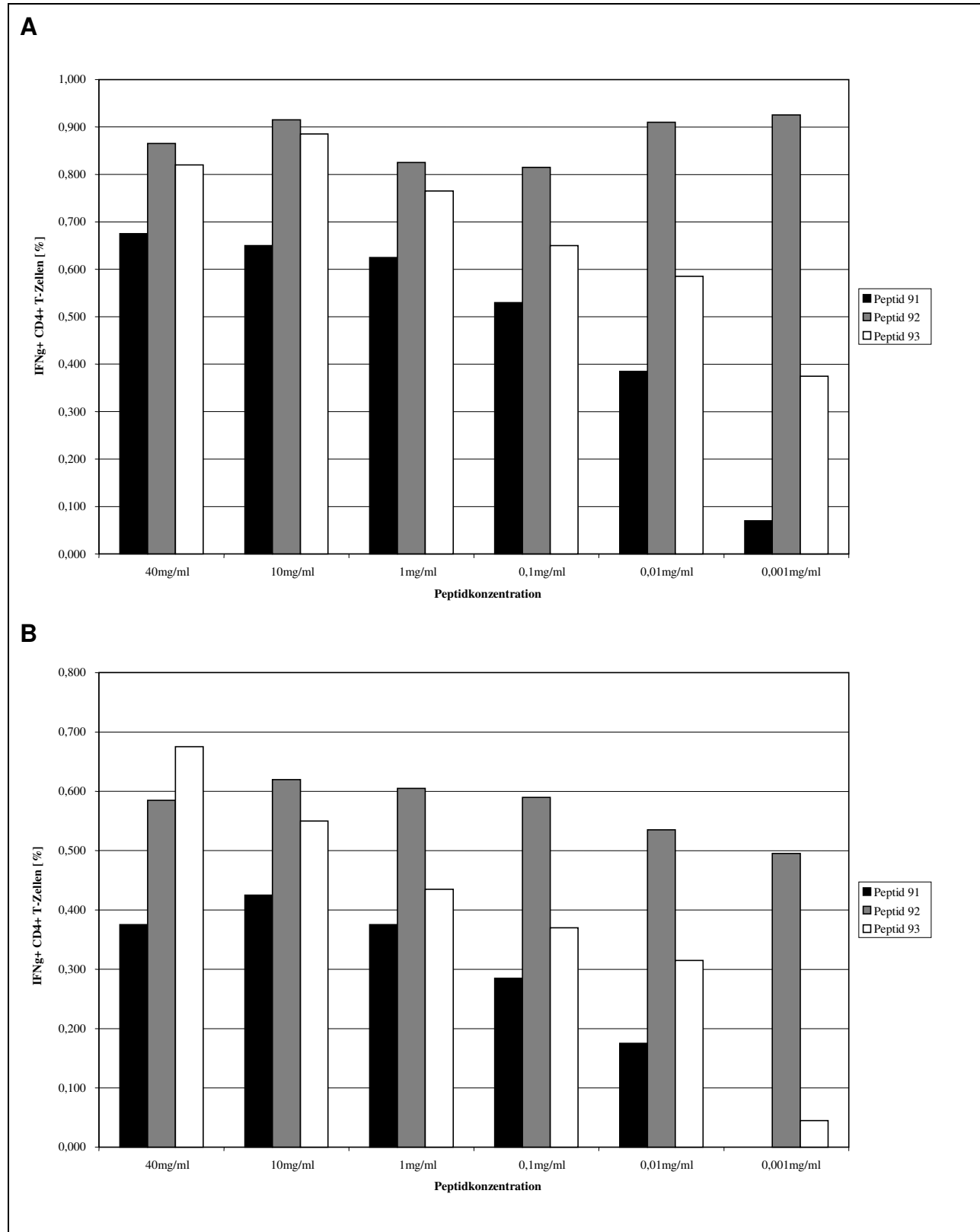
Daher vermuteten wir, dass das Epitop, das durch den TCR erkannt wurde, im Peptid 92 komplett, in den beiden anderen jedoch nicht vollständig, enthalten war.

Dies schien uns wahrscheinlicher als Probleme beim Clipping anzunehmen, da der Theorie nach ein Kürzen der Peptide für eine MHC-Klasse-II-Präsentation nicht notwendig ist.

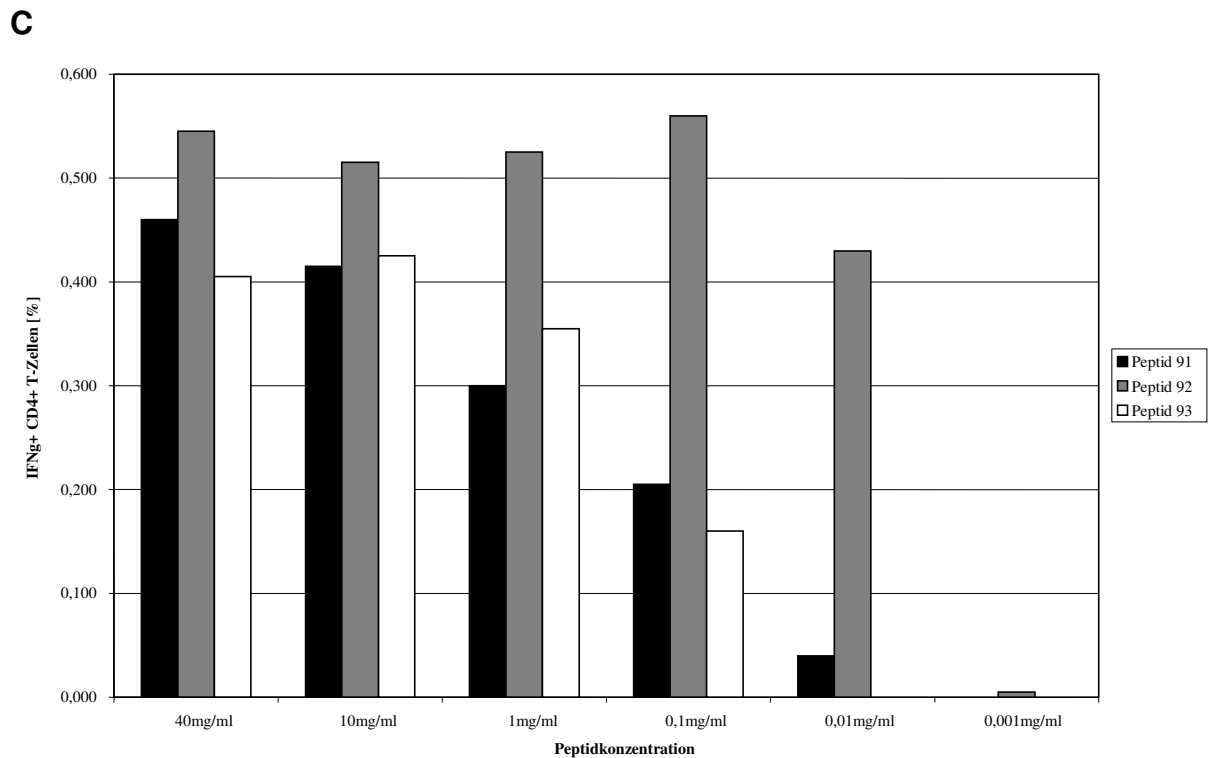
Durch das Testen aller möglichen die Region abdeckenden 9-AS-Peptide bei einem positiven Spender konnten wir die zwei am effektivsten stimulierenden 9-AS-Peptide identifizieren. Dabei handelte es sich um 367-TFTSQYRIQ-375 und 368-FTSQYRIQG-376, wobei letzteres etwas besser stimulierte. Die Peptide 366-PTFTSQYRI-374 und 369-TSQYRIQGK-377 induzierten vergleichsweise nur sehr kleine Antworten.

Interessanterweise war bei einem dieser Spender Peptid 92 immer noch effizienter als die stimulierenden kurzen Peptide, was bestätigt, dass, obwohl neun Aminosäuren die Länge des Bindungsmotivs für HLA-DR11 sind, die optimale Peptidlänge zur Stimulation von spezifischen CD4 T-Zellen länger ist. Die maximale Länge von Peptiden, die zur CD4-T-Zell-Stimulation sinnvoll ist, wurde nicht untersucht. Viele Autoren setzten aber Peptide ein, die viel länger sind als 15 Aminosäuren. Die Beobachtung, dass kurze Peptide einer Länge von nur 9 Aminosäuren CD4-T-Zellen effektiv stimulieren können, ist beachtenswert. Sie bestätigt außerdem, dass T-Zell-Antworten auf 9-AS-Peptide nicht notwendigerweise CD8 T-Zell-Antworten sein müssen. Dies ist zum Beispiel relevant, wenn man andere Methoden wie z. B. ELISPOT einsetzt, bei denen der Phänotyp der antwortenden Zellen ohne vorheriges Sortieren nicht bekannt ist.

Zudem haben unsere Dosis-Wirkungskurven mit CD4 T-Zell-stimulierenden Peptiden bestätigt, dass geringere Peptidkonzentrationen zur optimalen Stimulation benötigt werden, als dies bei CD8-T-Zellen der Fall ist [172].







**Abbildung 4.11:** Vergleich der Stimulationseffizienz von den drei aufeinander folgenden Peptiden 91, 92 und 93 aus der pp65-Gesamtmischung bei PBMC dreier Spender (A, B und C), die bekanntermaßen eine nachweisbare CD4 T-Zell-Antwort aufwiesen. Dargestellt ist der Anteil der CD4 T-Zellen, der auf die Stimulation mit verschiedenen Peptidkonzentrationen mit einer  $IFN\gamma$ -Produktion reagiert.

## 5 Diskussion

Zahlreiche Untersuchungen haben die Wichtigkeit der zellulären Immunantwort bei CMV-Infektionen verdeutlicht. Patienten, deren zellvermittelte Immunität defizient ist, weisen ein erhöhtes Risiko auf, eine CMV-Erkrankung bzw. -Reaktivierung zu entwickeln [140, 141, 142]. Zudem lassen sich Patienten, deren zelluläres Immunsystem defizient ist mittels adoptivem Transfer CMV-spezifischer T-Zellen therapieren [143, 144, 132].

Aus diesen Gründen ist das genauere Verständnis der T-Zell-Antwort gegenüber CMV sowohl von diagnostischem wie auch therapeutischen Interesse. Bei der T-Zell-Analyse können die Frequenzen spezifischen Zellen wie auch deren verschiedene Effektorfunktionen verfolgt werden [145, 146, 147].

Zur effektiven Analyse der CD4 und CD8 T-Zell-Antworten gegen HCMV ist der Einsatz von Peptiden und auch Peptidbibliotheken sinnvoll und hilfreich, weil mit Hilfe der Peptide beide T-Zell-Populationen gleichzeitig analysiert werden können.

Zudem können mit der Peptidstimulation nach relativ kurzer Zeit Ergebnisse erzielt werden.

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Arbeiten diskutiert, die zur Vereinheitlichung und Vereinfachung der Methode durchgeführt wurden.

Anschließend werden Aspekte des Einsatzes verschieden konfigurierter Peptide beleuchtet, je nachdem für welchen Einsatz sie geplant sind.

### 5.1 Methodischer Teil

Das ursprüngliche Protokoll für die intrazelluläre Zytokinfärbung wurde 1995 von Picker und Mitarbeitern vorgestellt. Es ermöglichte, Antigen-spezifische T-Zellen nach Kurzzeitstimulation ex vivo (6 bis 8 h) durch die gleichzeitige Färbung von Oberflächenmarkern und intrazellulär verbliebener Zytokine durchflusszytometrisch zu charakterisieren und zu quantifizieren [148].

IFN $\gamma$  schien besonders geeignet, da es als wichtiges Effektor-Zytokin relativ rasch nach einer Zellaktivierung induziert wird.

Wenig später wurde ein Vollblut-Protokoll eingeführt, das eine Vereinfachung dieser Methode darstellen sollte [149], da die Präparation von PBMC entfiel. Zudem ging man davon aus, dass die Stimulation von Vollblutproben eher dem physiologischen Milieu entsprach als die Stimulation von isolierten PBMC [149].

Dieses Protokoll wurde von Nomura und Mitarbeitern optimiert [150].

Die Präparation von PBMC stellt einen Arbeitsaufwand dar, der durch die Verwendung von Vollblut entfällt. Allerdings erscheint die Argumentation etwas oberflächlich. Aus unserer Sicht stellt Vollblut nicht wirklich das physiologischere Milieu dar. Der Vorgang der Antigenpräsentation und deren Erkennung durch T-Zellen erfolgt nicht im Blut sondern im peripheren Gewebe bzw. in sekundären lymphatischen Organen.

Unterschiede zwischen Vollblut und PBMC sind vermutlich Faktoren wie z. B. Proteasen, die im Vollblut vorhanden sein könnten, jedoch nicht in PBMC-Suspensionen oder im peripheren Gewebe. Sie könnten mit der Antigenpräsentation und –erkennung interferieren. Dies scheint uns ein größeres Risiko als der Nutzen des Einsatzes der Vollblut-Methode.

Zudem ist es außerordentlich schwierig, die Versuchsbedingungen bei der Vollblutmethode konstant zu halten. So ist es z. B. nicht möglich, anders als durch Verdünnung Zellkonzentrationen einzustellen.

Ein weiterer Vorteil der PBMC-Methode sind die viel kleineren Antigenkonzentrationen, die benötigt werden um T-Zell-Frequenzen durchflusszytometrisch zu detektieren [136].

Die Verwendung kostimulatorischer monoklonaler Antikörper z. B. gegen CD28 wird von einigen Autoren befürwortet [149,150, 151], die die Meinung vertreten, dass durch Kostimulation die Effektivität von Peptidstimulationen gesteigert werden kann. Unsere Versuche haben jedoch gezeigt, dass der Effekt auf eine Kurzzeitstimulation mit Peptiden nur gering ist, insbesondere, wenn eine Vorinkubation der Zellen über Nacht stattfindet [152].

Die Verwendung solcher Antikörper bedeutet einen zusätzlichen Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand. In einzelnen Fällen wurde eine schwächere T-Zell-Antwort bei der Verwendung von Kostimulation beobachtet, so dass wir uns gegen den Einsatz von kostimulatorischen Antikörpern entschieden haben.

Die Färbung des frühen Aktivierungsmarkers CD69 erleichtert die Analyse der Zellen und damit die Auswertung der Versuche nur geringfügig [151]. Inzwischen verzichten die meisten Autoren auf diesen Marker zugunsten weiterer T-Zell-Marker oder anderer Oberflächenmarker.

Auf die Durchführung von unspezifischen Positivkontrollen mit Stimulantien wie PMA/Ionomycin oder auch SEB wurde verzichtet. Alle Versuche waren in

Versuchsserien eingebettet, bei denen ein Nebeneinander von positiven und negativen Peptidantworten auftraten. Aus unserer Sicht war das als Positivkontrollen ausreichend, um prinzipiell zu zeigen, dass die entsprechende Versuchsserie korrekt durchgeführt worden war.

## **5.2 Welche Peptide sind für definierte Fragestellungen zu wählen ?**

Bevor Peptide für eine Untersuchung ausgewählt werden, ist die Frage zu klären, wozu diese benutzt werden sollen. In Hinsicht auf neuere Forschungsergebnisse können Peptide in verschiedenen Situationen zur T-Zell-Stimulation eingesetzt werden: Identifikation von antigenen Proteinen oder Peptiden, Monitoring von T-Zell-Antworten im zeitlichen Verlauf und Untersuchung von T-Zellen einer einzelnen Spezifität.

In Bezug auf CD8-T-Zellen bestätigen unsere Ergebnisse die Beobachtung, dass die effektivsten Peptide zur Stimulation der antigenspezifischen Zellen neun bis zehn Aminosäuren lang sind. Diese Peptide sind auch die beste Wahl, wenn die Peptidstimulation mit einer Tetramerfärbung kombiniert werden soll. Beim Einsatz desselben Peptids, das auch im Tetramer-Peptid-Komplex enthalten ist, kann die funktionelle Kapazität antigen-spezifischer T-Zellen in einzigartiger Art und Weise studiert werden.

Dieses Vorgehen wurde erfolgreich von mehreren Autoren demonstriert [153, 154].

Mit Hilfe dieser Technik konnten zum Beispiel Bronke et al. bei Patienten mit einer HIV-Infektion die CMV-spezifischen CD8-positiven T-Zellen und deren Zytokinprofil im zeitlichen Verlauf untersuchen [155]. Vor der Entwicklung einer CMV-Erkrankung nahm die Zahl von CMV-spezifischen CD4-positiven T-Zellen und IFN $\gamma$ -produzierenden CMV-spezifischen CD8-positiven T-Zellen deutlich ab, wohingegen die Zahl der Perforin- und Granzym B-exprimierenden Zellen zunahm.

Unsere Ergebnisse zeigen mit wenigen Ausnahmen, dass auch 15-AS-Peptide in der Lage sind, CD8 T-Zell Antworten zu induzieren.

Bei einem Spender wurde beobachtet, dass, obwohl das 9-AS-Peptid eine T-Zell-Antwort induzieren konnte, keine solche für die entsprechenden 15-AS-Peptide nachweisbar war. Diese Ausnahme könnte darauf beruhen, dass die individuelle Ausstattung des Spenders mit Proteasen die Prozessierung der extern zugefügten 15-AS-Peptide nicht erlaubte.

Obwohl die extrazelluläre Prozessierung von Peptiden ein zunehmend akzeptiertes Konzept ist, sind die genauen Abläufe wie auch notwendige Peptidasen, die im extrazellulären Clipping und Trimming involviert sind, nur teilweise bekannt [156, 157, 158, 159].

Das Risiko, kürzere stimulierende Peptidsequenzen in 15-AS-Peptiden zu übersehen, ist geringer, wenn die Überlappungen von aufeinanderfolgenden Peptiden bei einem Peptid-Scan so groß sind, dass jedes potentiell stimulierende kurze Peptid in zwei einzelnen längeren Peptiden enthalten ist.

Beim Einsatz von 15-AS-Peptiden mit 11 Überlappungen sind sechs der möglichen sieben 9-AS-Peptid-Sequenzen in zwei Peptiden enthalten. Nur eine Teilsequenz mit der Länge von neun AS ist genau in der Mitte eines jeden 15-AS-Peptides lokalisiert, und damit nur in genau diesem einen repräsentiert.

Aber auch nicht optimal stimulierende Peptide sind in aller Regel immer noch in der Lage, CD8-T-Zell-Antworten hervorzurufen. Aus diesem Grund erscheint uns das Risiko gering, mit dem Einsatz einer so konzipierten Peptidbibliothek Epitope zu übersehen.

Würden die Überlappungen auf 12 erhöht, so wären alle denkbaren 9-AS-Peptide in mindestens zwei Peptiden einer Länge von 15 Aminosäuren enthalten. Dies würde zwar wiederum die Sicherheit erhöhen, die notwendige Zahl an Peptiden würde aber um 25 Prozent ansteigen, da der Schritt zwischen zwei Peptiden (= Länge der Einzelpeptide minus Überlappung) von vier auf drei Aminosäuren reduziert werden würde. Die Zahl der notwendigen Peptide für eine komplette Peptidbibliothek kann durch Division der Zahl der Aminosäuren des gesamten Proteins mit der Schrittgröße zwischen zwei aufeinanderfolgenden Peptiden abgeschätzt werden.

Wenn CD8-T-Zellen von Interesse sind, empfehlen wir 15-AS-Peptide zum Screenen und zur Verlaufskontrolle. In solchen Fällen ist nicht entscheidend, 100 % der CD8-T-Zell-Antwort zu erfassen. Der Einsatz von 15-AS-Peptiden erlaubt es bei guter Praktikabilität mit einer übersichtlichen Zahl an Einzelpeptiden eine Übersicht darüber zu erlangen, ob z. B. bei einem Patienten überhaupt eine CD8 T-Zell-Antwort vorliegt bzw. wie sich diese im zeitlichen oder auch therapeutischen Verlauf entwickelt.

Wenn jedoch eine exakte Quantifikation der CD8 T-Zell-Antwort gefordert wird, empfehlen wir den Einsatz von 9- oder 10-AS-Peptiden. In unseren Versuchen haben diese Peptide am effektivsten CD8 T-Zellen spezifisch stimuliert und wir

haben einen Spender gesehen, der eine CD8 T-Zell-Antwort gegenüber einem 9-AS-Peptid aufwies bei fehlender Antwort auf Stimulation mit den beiden korrespondierenden 15-AS-Peptiden. In einem solchen Fall wäre also die CD8 T-Zell-Antwort gegenüber diesem einen Epitop ausschließlich mit 9-AS-Peptiden registriert worden.

Bei Screening- oder Verlaufsuntersuchungen spielt die CD8 T-Zell-Antwort gegenüber einem einzelnen Epitop keine entscheidende Bedeutung, da ein Spender spezifische CD8 T-Zellen gegenüber mehreren Epitopen aus z. B. pp65 aufweist. Soll eine genaue Quantifizierung der CD8 T-Zell-Antwort erfolgen, so ist die Erfassung aller stimulierenden AS-Sequenzen von Bedeutung.

Die zwei Serien von Experimenten mit N- und C-terminalen AS-Verlängerungen führen zu verschiedenen interessanten Ideen. Theoretisch könnte die Verlängerung eines stimulierenden Peptides zu einem neuen Epitop führen, so dass andere T-Zellen oder T-Zell-Klone stimuliert werden als jene, die ursprünglich vom kürzeren Peptid angesprochen wurden.

In unserem Beispiel findet die Aminosäure-Addition außerhalb der Region statt, die als MHC-Bindungsregion bekannt ist. Es ist daher nicht wahrscheinlich, dass jedes Mal, wenn eine Aminosäure hinzugefügt wird, ein komplett neues Epitop entsteht, welches zur Stimulation einer völlig anderen Gruppe von T-Zell-Klonen mit ungefähr derselben Frequenz führt.

Interessant ist, dass verschiedene Aminosäuren dabei verschiedene Effekte haben. Zum Beispiel zeigt Spender 1, dass ein C-terminales Leucin einfacher zu verarbeiten ist als ein C-terminales Alanin, wodurch die Stimulationseffizienz gegenüber dem Leucin um circa 50 % vermindert ist. Spender 2 zeigt diesen Unterschied nicht so deutlich. Interessanterweise dient Leucin an Position 11 als C-terminaler Anker in der HLA-B7-Peptid-Bindungsspalte, und so wurden Peptide mit Leucin an Position 11 als Liganden für HLA-B7 beschrieben. Wegen der Komplexität dieses Themas möchten wir hier nur eine sehr vorsichtige Schlußfolgerung ziehen.

Die Aminosäuren, die an Epitope angehängt werden, können deren Bindung bzw. Präsentation und evt. T-Zell-Induktion verschiedenartig beeinflussen – abhängig von der angehängten AS und dem Individuum mit seiner eigenen Ausstattung an HLA-Molekülen, Proteasen und Peptidasen sowie anderen noch nicht bekannten Faktoren. Zusätzlich könnten auch verschiedene T-Zell-Klone involviert sein. Da VCSMENTRATKMQVI CD8-positive T-Zellen bei insgesamt drei Spendern

stimulieren konnte, ENTRATQMQVIGDY hingegen bei keinem (beide enthalten identische stimulierende kürzere Peptid-Sequenzen), ist zu vermuten, dass es gewisse Regelmäßigkeiten gibt, die noch genauer zu untersuchen sind.

Wie von uns erwartet worden war, können C-terminale Veränderungen die Stimulationseffizienz von definierten 9-AS-Peptiden dramatisch verändern. Sie interferieren vermutlich mit Peptid-Ankern in der MHC-Bindungsmulde. Trotzdem werden Peptide vom C- zum N-Terminus synthetisiert und dazu am C-Terminus angeheftet, der für diese Aufgabe oft verändert ist. Allerdings dient der C-Terminus fast immer als Ankerposition.

Obwohl wir die Frage der C-terminalen Modifikation bei längeren Peptiden nicht systematisch untersucht haben, führen die Ergebnisse der 9-AS-Peptid-Versuche zur Empfehlung, Peptide mit funktionellem C-Terminus zu verwenden, wenn CD8-T-Zellen von Interesse sind.

Peptid-Pools, die alle denkbaren Epitope eines Proteins abdecken sollen, sind ein hilfreiches Werkzeug um CD4 und CD8 T-Zell-Antworten gegenüber Proteinen zu analysieren.

Hinsichtlich CD4 T-Zell-Antworten sind solche Pools mindestens so effizient wie die entsprechenden rekombinanten Proteine [162]. Bei CD8-T-Zell-Antworten sind sie sogar deutlich effizienter [163]. Falls kürzere Peptide verwendet werden, könnten einige CD4-Antworten verloren gehen. Es wurde zwar gezeigt, dass auch 9-AS-Peptide CD4 T-Zellen stimulieren können [164], andererseits wurde gesehen, dass AS, die das MHC-Bindungsmotiv flankieren, eine wichtige Rolle bei der CD4-T-Zell-Stimulation spielen können, da der TCR Aminosäuren auch außerhalb der MHC-Bindungssequenz erkennen kann [165, 166].

Daher scheint es wichtig zu sein, die Peptide und auch die Überlappungen nicht zu klein zu wählen. Die minimale Länge der Peptide sollte deshalb 12 AS sein. Dieses Design lässt Raum für insgesamt drei flankierende AS – 1 bis 2 auf jeder Seite – zusätzlich zur typischen Länge eines Bindungsmotivs von neun AS. Die Überlappung zweier aufeinander folgender Einzelpeptide von 11 AS zum Beispiel sichert, dass keine 12-AS-Sequenz verloren gehen kann.

Wenn CD4- und CD8-T-Zell-Antworten gleichzeitig gescreent oder im zeitlichen Verlauf verfolgt werden sollen, zeigen unsere Ergebnisse, dass 15-AS-Peptide mit 11 AS Überlappungen zwischen den Peptiden ein gutes Design darstellt. Auf diese

Weise liegen Peptide vor, die den Anforderungen beider T-Zell-Subfamilien relativ gut gerecht werden.

In einer Veröffentlichung haben Draenert et al. Peptid-Sets mit variablen Peptidlängen (15, 18 oder 20 AS) und variablen Überlappungen (10 oder 11 AS) verglichen [160].

In Übereinstimmung mit unseren Daten wurden generell höhere CD8-Antworten mit den kürzeren Peptiden gesehen. 2 von 17 Probanden, die als reaktiv auf die Stimulation gewertet wurden, zeigten höhere CD8-Antworten auf Stimulation mit Mischungen aus 18 oder 20 AS langen Peptiden. Bei CD4-T-Zellen schien die Tendenz in die entgegengesetzte Richtung zu zeigen, mit höheren Antworten bei längeren Peptiden. Keiner dieser Unterschiede erreichte statistische Signifikanz. Von den Autoren wurde geschlossen, dass Peptide zwischen 15 und 20 AS Länge ähnliche Ergebnisse liefern. Wir haben CD8-T-Zell-Antworten von 18- oder 20 AS langen Peptiden nicht systematisch untersucht. Unsere Ergebnisse aus den Experimenten mit den Zufallsverlängerungen mit jeweils nur einer AS sowie die Experimente mit der systematischen Verlängerung eines definierten Peptids um mehrere AS haben aber klar gezeigt, dass die Effizienz antigenspezifische CD8 T-Zellen durch AS-Addition erheblich reduziert werden kann.

In einzelnen Fällen lassen sich längere Peptide konstruieren, die eine bessere Stimulationseffizienz haben als das entsprechende, kürzere 15-AS-Peptid. Es ist z. B. denkbar, dass das aus einer N-terminalen Verlängerung des in Abb. 4.6 dargestellten 11-AS-Peptids ENTRATKMQVI um 7 AS resultierende 18-AS-Peptid eine höhere Stimulationseffizienz aufweist als das ebenfalls in Abb. 4.6 gezeigte 14-AS-Peptid ENTRATKMQVIGDQ. Wir denken aber, dass solche Konstruktionen die Ausnahme sind und sicher keine generelle Gültigkeit haben.

Unsere Vergleiche der einzelnen 15-AS-Peptide mit den entsprechenden kürzeren optimalen Peptiden einer Länge von neun oder zehn AS zeigte die überlegene Effizienz der kürzeren Peptide. Draenert et al. konnten keine 18- oder 20-AS-Peptide zeigen, die gegenüber diesen optimal kurzen Peptiden eine Überlegenheit aufwiesen. Generell denken wir, je mehr AS angehängt sind, umso mehr müssen wieder entfernt werden – etwa durch extrazelluläre Prozessierung. Unglücklicherweise haben Draenert et al. nicht die 18- bzw. 20 AS langen Peptide identifiziert, die effektiver als die korrespondierenden 15-AS-Peptide waren [160].



Falls nur CD8-T-Zell-Antworten untersucht werden sollen, sind 9-AS-Peptide mit acht Überlappungen eine interessante und realistische Option, obgleich dazu eine größere Zahl von Einzelpeptiden nötig ist.

Wir konnten eine solche Peptidmischung in einem ersten Versuch mittels Spot-Synthese für das Protein pp65 erzeugen [161]. Bei einzelnen Probanden konnten wir mit dieser 9-AS-Mischung vergleichbare Antworten wie mit der konventionellen pp65-Gesamtmischung, die aus 15-AS-Peptiden aufgebaut war, erzielen.

Unsere Dosis-Wirkungskurven zeigen, dass neun AS lange Peptide in zehnfach niedrigeren Konzentrationen gleiche CD8-Antworten hervorrufen können wie 15-AS-Peptide.

Daher wird nicht nur eine kleinere Menge pro Peptid benötigt, sondern auch mehr Peptide können in einem Pool kombiniert werden. Moderne Spot-Synthesetechnologie kann hunderte oder sogar tausende von Einzelpeptiden in geringen Mengen zu relativ geringen Kosten produzieren. Der Einsatz moderner Synthesetechniken ermöglicht es inzwischen, die Peptide mit freiem C-Terminus zu produzieren. Wenn man unser derzeitiges Test-Format nimmt, so kann jeweils 1 µg von jedem der 250 bis 500 Peptide in einem 10 µl-Aliquot untergebracht werden – in 100 % DMSO gelöst.

Dabei ist wichtig zu berücksichtigen, dass die Endkonzentration des DMSO während des gesamten Versuchsablaufs 1 % (vol/vol) nicht übersteigt, da in höheren Konzentrationsbereichen DMSO zytotoxische Wirkungen entfalten kann.

Wenn nur 100 ng/ml pro Peptid benötigt werden, können zehnmal mehr Peptide in diesem Ansatz untergebracht werden. Dies könnte von Interesse sein für das Screenen des kompletten Proteoms eines Organismus wie HCMV auf CD8-T-Zell-Epitope.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass keine generelle Empfehlung für die Konfiguration der Peptide, die eingesetzt werden sollen, ausgesprochen werden kann. Diese ist abhängig von der Anwendung. Allerdings sollten C-terminale Modifikationen vermieden werden, wenn CD8 T-Zell-Antworten interessieren.

Der Umfang der geplanten Untersuchung, die Fragestellung und das verfügbare Budget legen somit fest, welche Art von Peptiden verwendet werden können und sollten. Zum Screening könnte eine Kombination aus kurzen und langen Peptiden eingesetzt werden, da auf diese Weise sichergestellt wird, dass effektive Peptide für die Stimulation sowohl von CD4 als auch für CD8 T-Zellen vorhanden sind.

## 6 Zusammenfassung

Noch immer stellt die Primärinfektion bzw. die Reaktivierung des humanen Cytomegalievirus (HCMV) bei Immunkompromitierten ein großes klinisches Problem dar. Die T-Zell-vermittelte Immunität spielt eine zentrale Rolle bei der Kontrolle der Infektion. Deren Untersuchung ist daher von größter Wichtigkeit. Peptide zur Stimulation von T-Zellen können hierbei hilfreich sein. Es kann eine große Zahl an Peptiden gleichzeitig zum Einsatz kommen, so dass mit entsprechenden Peptidpools schnell ganze Virusproteine abgedeckt sind. Zudem ist ein großer Vorteil, dass mit der Hilfe von Peptiden und Peptidpools beide T-Zell-Populationen CD4 und CD8 gleichzeitig analysiert werden können. Wie Peptide und Peptidpools in Abhängigkeit von ihrem Einsatzziel optimal konfiguriert sein sollten, steht bisher nicht abschließend fest. In dieser Arbeit sollten daher folgende Fragen geklärt werden:

- (1) Zunächst sollten die bei uns im Labor gebräuchlichen Protokolle zur Kurzzeitstimulation von antigenspezifischen T-Zellen mit Peptiden und Peptidpools standardisiert werden.
- (2) Die optimierten Protokolle sollten dann eingesetzt werden, um zu untersuchen, wie die Peptide und Peptidbibliotheken konfiguriert sein müssen, um möglichst optimal spezifische T-Zell-Antworten zu erfassen. Stellvertretend wurden dazu Peptide der Proteine pp65 und IE1 aus HCMV gewählt.
- (3) Es sollte geklärt werden, ob unterschiedliche Anforderungen an die eingesetzten Peptide gestellt werden, wenn CD4 und CD8 T-Zellen simultan durchgeführt werden.
- (4) Es sollte festgestellt werden, ob das Epitop flankierende Aminosäuren die Fähigkeit des Peptids T-Zellen spezifisch zu stimulieren beeinflussen können.
- (5) Es sollte geklärt werden, ob eine pp65-Gesamtmischung aus mit dem Verfahren der Spotsynthese hergestellten 9-AS-Peptiden realisierbar ist, die in ihrer Fähigkeit CD8 T-Zellen zu stimulieren mit einer Mischung aus 15-AS-Peptiden vergleichbar ist.

15-AS-Peptide werden häufig in Peptidpools zur Stimulation von CD8 T-Zellen eingesetzt, deren Einzelpeptide sich überlappen und so eine AS-Sequenz abdecken. Werden kürzere Peptide eingesetzt, so ist eine deutlich höhere Zahl von Einzelpeptiden nötig. Wir beobachteten, dass kurze Peptide effektiver CD8 T-Zellen stimulieren als korrespondierende längere 15-AS-Peptide.

Eine pp65-Gesamtmischung, die aus kurzen 9-AS-Peptiden bestand, wurde mittels Spot-Synthese hergestellt. Ihre Einzelpeptide überlappten sich jeweils mit acht AS. Die gesamte AS-Sequenz des pp65-Proteins wurde so mittels 552 Einzelpeptiden abgebildet. Die „konventionelle“ pp65-Gesamtmischung aus 15-AS-Peptiden hatte 138 Einzelpeptide. Mit beiden Mischungen erzielten wir vergleichbare CD8 T-Zell-Antworten.

Ein Spender wies auf ein aus pp65 stammendes 9-AS-Peptid eine CD8 T-Zell-Antwort auf, nicht jedoch auf Stimulation mit den beiden korrespondierenden 15-AS-Peptiden. Dies ließ vermuten, dass es AS gibt, die mit dem Clipping oder Trimming stärker interferieren als andere. Wir verlängerten definierte kurze Peptide um einzelne AS sowohl C- als auch N-terminal. Dabei zeigte sich, dass die AS-Addition die Stimulationseffektivität unterschiedlich stark einschränkte. Dies war abhängig von der angehängten AS, ob diese C- oder N-terminal angehängt wurde und individuellen Faktoren des untersuchten Individuums.

Die Länge der von CD4 T-Zellen erkannten Peptide ist deutlich variabler als die von CD8 T-Zellen, wobei die Länge der sich in der Bindungsspalte befindlichen AS-Sequenz ebenfalls in aller Regel 9 AS beträgt. Es wurde gezeigt, dass auch 9-AS-Peptide CD4 T-Zellen stimulieren können. Epitop-flankierende AS können aber eine wichtige Rolle bei der CD4 T-Zell-Stimulation spielen, da der TCR auch AS außerhalb der MHC-Bindungssequenz erkennen kann. Zum Screenen von CD4 T-Zell-Antworten sind Pools mit 15-AS-Peptide und 12 Überlappungen mindestens so effizient wie entsprechende rekombinante Proteine. Falls kürzere Peptide verwendet werden, könnten CD4 T-Zell-Antworten verloren gehen.

C-terminale Modifikationen können die Stimulationseffizienz von Peptiden dramatisch verändern, so dass wir generell empfehlen, Peptide mit funktionellem C-Terminus zu verwenden, wenn CD8 T-Zell-Antworten untersucht werden sollen.

Ansonsten legen der Umfang der geplanten Untersuchung, die Fragestellung und das verfügbare Budget fest, welche Art von Peptiden verwendet werden sollten.

Bei der Untersuchung von CD8 T-Zell-Antworten empfehlen wir zum Screenen oder als Verlaufskontrolle 15-AS-Peptid-Pools. Zur Quantifizierung halten wir kurze Peptide für überlegen. Sollen CD4 als auch CD8 T-Zell-Antworten untersucht werden, können 15-AS-Peptid-Pools verwendet werden. Eine interessante Alternative dazu stellt die Kombination aus kurzen und langen Peptiden dar.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abkürzung</b>	<b>Vollständiger Begriff</b>
Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure bzw. Aminosäuren
BFA	Brefeldin A
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium
CD	Cluster of differentiation
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamin tetra-Essigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung bzw. -analyse
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Einheit der relativen Zentrifugalkraft
h	Stunde(n)
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPLC	High pressure liquid chromatography
IE-1	Immediate early 1 protein (UL123)
IFN $\gamma$	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
KMT	Knochenmarkstransplantation
min	Minuten
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ g	Mikrogramm
MHC-I/II	Haupthistokompatibilitätskomplexe
MPS	Multiple Peptide Synthesizer
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NK-Zelle	Natürliche-Killer-Zelle

PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perinidin-Chlorophyll-A-Protein
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-12-Myristat-12-Acetat
pp65	Phosphoprotein 65 (UL83)
S.	Seite
SSC	Seitwärtsstreulicht
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
z. B.	zum Beispiel

#### **Tabelle des Einzel-Buchstaben-Codes für Aminosäuren (AS)**

<b>Code</b>	<b>Aminosäure</b>	<b>Gruppe</b>
G	Glycin	aliphatische AS
A	Alanin	aliphatische AS
S	Serin	aliphatische AS
T	Threonin	aliphatische AS
V	Valin	aliphatische AS
L	Leucin	aliphatische AS
I	Isoleucin	aliphatische AS
P	Prolin	heterozyklische AS
W	Tryptophan	heterozyklische AS
H	Histidin	heterozyklische AS
D	Aspartat	saure AS
N	Asparagin	saure AS
E	Glutamat	saure AS
Q	Glutamin	saure AS
C	Cystein	schwefelhaltige AS
M	Methionin	schwefelhaltige AS
F	Phenylalanin	aromatische AS
Y	Tyrosin	aromatische AS
R	Arginin	basische AS
K	Lysin	basische AS

## 8 Literaturverzeichnis

- 1 Mocarski ES Jr, Kemble GW. Recombinant cytomegaloviruses for study of replication and pathogenesis. *Intervirology*. 1996;39(5-6):320-30.
- 2 Emery VC. Viral dynamics during active cytomegalovirus infection and pathology. *Intervirology*. 1999;42(5-6):405-11.
- 3 Emery VC, Cope AV, Bowen EF, Gor D, Griffiths PD. The dynamics of human cytomegalovirus replication in vivo. *J Exp Med*. 1999 Jul 19;190(2):177-82.
- 4 Irmiere A, Gibson W. Isolation and characterization of a noninfectious virion-like particle released from cells infected with human strains of cytomegalovirus. *Virology*. 1983 Oct 15;130(1):118-33.
- 5 Loenen WA, Bruggeman CA, Wiertz EJ. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Semin Immunol*. 2001 Feb;13(1):41-9.
- 6 Hassan J, Connell J. Translational mini-review series on infectious disease: congenital cytomegalovirus infection: 50 years on. *Clin Exp Immunol*. 2007 Aug;149(2):205-10.
- 7 Scalzo AA, Corbett AJ, Rawlinson WD, Scott GM, Degli-Esposti MA. The interplay between host and viral factors in shaping the outcome of cytomegalovirus infection. *Immunol Cell Biol*. 2007 Jan;85(1):46-54. Epub 2006 Dec 5.
- 8 Reddehase MJ. The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr Opin Immunol*. 2000 Dec;12(6):738.
- 9 Prösch S, Wendt CE, Reinke P et al. A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology*. 2000 Jul 5;272(2):357-65.

- 10 Mehta SK, Stowe RP, Feiveson AH, Tying SK, Pierson DL. Reactivation and shedding of cytomegalovirus in astronauts during spaceflight. *J Infect Dis.* 2000 Dec;182(6):1761-4. Epub 2000 Nov 8.
- 11 Sissons JG, Bain M, Wills MR. Latency and reactivation of human cytomegalovirus. *J Infect.* 2002 Feb;44(2):73-7.
- 12 Rubin RH. Prevention of cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Transpl Infect Dis.* 2000 Sep;2(3):99-100.
- 13 Radovancevic B, Konuralp C, Vrtovec B et al. Factors predicting 10-year survival after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2005 Feb;24(2):156-9.
- 14 Döcke WD, Prösch S, Fietze E et al. Cytomegalovirus reactivation and tumour necrosis factor. *Lancet.* 1994 Jan 29;343(8892):268-9.
- 15 Fietze E, Prösch S, Reinke P et al. Cytomegalovirus infection in transplant recipients. The role of tumor necrosis factor. *Transplantation.* 1994 Sep 27;58(6):675-80.
- 16 Slobedman B, Stern JL, Cunningham AL, Abendroth A, Abate DA, Mocarski ES. Impact of human cytomegalovirus latent infection on myeloid progenitor cell gene expression. *J Virol.* 2004 Apr;78(8):4054-62.
- 17 Arav-Boger R, Battaglia CA, Lazzarotto T et al. Cytomegalovirus (CMV)-encoded UL144 (truncated tumor necrosis factor receptor) and outcome of congenital CMV infection. *J Infect Dis.* 2006 Aug 15;194(4):464-73. Epub 2006 Jul 7.
- 18 Rickards CR, Stanton RJ, Borysiewicz LK, López-Botet M, Wilkinson GW, Tomasec P. The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells. *Prod'homme V, Griffin C, Aicheler RJ, Wang EC, McSharry BP. J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4473-81

- 19 Loenen WA, Bruggeman CA, Wiertz EJ. Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Semin Immunol.* 2001 Feb;13(1):41-9. Review.
- 20 Gilbert MJ, Riddell SR, Plachter B, Greenberg PD. Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature.* 1996 Oct 24;383(6602):720-2.
- 21 Rubin RH. Prevention and treatment of cytomegalovirus disease in heart transplant patients. *J Heart Lung Transplant.* 2000 Aug;19(8):731-5. Review.
- 22 Hamprecht K, Maschmann J, Vochem M, Dietz K, Speer CP, Jahn G. Epidemiology of transmission of cytomegalovirus from mother to preterm infant by breastfeeding. *Lancet.* 2001 Feb 17;357(9255):513-8.
- 23 Lawrence RM, Lawrence RA. Breast milk and infection. *Clin Perinatol.* 2004 Sep;31(3):501-28.
- 24 Reesink HW, Engelfriet CP, Tegtmeyer GE et al. Prevention of post-transfusion cytomegalovirus: leucoreduction or screening? *Vox Sang.* 2002 Jul;83(1):72-87.
- 25 Roback JD, Su L, Zimring JC, Hillyer CD. Transfusion-transmitted cytomegalovirus: lessons from a murine model. *Transfus Med Rev.* 2007 Jan;21(1):26-36.
- 26 Reddehase MJ, Simon CO, Podlech J, Holtappels R. Stalemating a clever opportunist: lessons from murine cytomegalovirus. *Hum Immunol.* 2004 May;65(5):446-55.
- 27 Mocarski ES Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol.* 2004 Aug;6(8):707-17.



- 28 Reddehase MJ. Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol.* 2002 Nov;2(11):831-44.
- 29 De Ory Manchón F, Sanz Moreno JC, Castañeda López R, Ramírez Fernández R, León Rega P, Pachón del Amo I. Cytomegalovirus seroepidemiology in the community of Madrid. *Rev Esp Salud Publica.* 2001 Jan-Feb;75(1):55-62.
- 30 Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis.* 2002 Apr 15;34(8):1094-7. Epub 2002 Mar 11.
- 31 Heise W. Die CMV-Erkrankung - Klinisches Krankheitsspektrum, Diagnose und Therapie. Media Bibliothek, Pharmacia & Upjohn. 1998.
- 32 Drew WL. Laboratory diagnosis of cytomegalovirus infection and disease in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2007 Aug;20(4):408-11.
- 33 Weber B, Nestler U, Ernst W et al. Low correlation of human cytomegalovirus DNA amplification by polymerase chain reaction with cytomegalovirus disease in organ transplant recipients. *J Med Virol.* 1994 Jun;43(2):187-93.
- 34 Berger A, Preiser W. Viral genome quantification as a tool for improving patient management: the example of HIV, HBV, HCV and CMV. *J Antimicrob Chemother.* 2002 May;49(5):713-21.
- 35 Reesink HW, Engelfriet CP, Tegtmeyer GE et al. Prevention of post-transfusion cytomegalovirus: leucoreduction or screening? *Vox Sang.* 2002 Jul;83(1):72-87.

- 36 Kern F, Faulhaber N, Khatamzas E et al. Measurement of anti-human cytomegalovirus T cell reactivity in transplant recipients and its potential clinical use: a mini-review. *Intervirolology*. 1999;42(5-6):322-4.
- 37 Preiser W, Fleckenstein C, Doerr HW. New methods for the diagnosis of cytomegalovirus. *Dtsch Med Wochenschr*. 2004 Jul 2;129(27):1509-12.
- 38 Gratama JW, Kern F. Flow cytometric enumeration of antigen-specific T lymphocytes. *Cytometry A*. 2004 Mar;58(1):79-86.
- 39 Kern F, LiPira G, Gratama JW, Manca F, Roederer M. Measuring Ag-specific immune responses: understanding immunopathogenesis and improving diagnostics in infectious disease, autoimmunity and cancer. *Trends Immunol*. 2005 Sep;26(9):477-84.
- 40 Li Pira G, Kern F, Gratama J, Roederer M, Manca F. Measurement of antigen specific immune responses: 2006 update. *Cytometry B Clin Cytom*. 2007 Mar;72(2):77-85.
- 41 Paya C, Humar A, Dominguez E et al. Efficacy and safety of valganciclovir vs. oral ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Am J Transplant*. 2004 Apr;4(4):611-20.
- 42 Zamora MR, Davis RD, Leonard C; CMV Advisory Board Expert Committee. Management of cytomegalovirus infection in lung transplant recipients: evidence-based recommendations. *Transplantation*. 2005 Jul 27;80(2):157-63.
- 43 Martin DF, Sierra-Madero J, Walmsley S et al. A controlled trial of valganciclovir as induction therapy for cytomegalovirus retinitis. *N Engl J Med*. 2002 Apr 11;346(15):1119-26.
- 44 Strippoli GF, Hodson EM, Jones CJ, Craig JC. Pre-emptive treatment for cytomegalovirus viraemia to prevent cytomegalovirus disease in solid organ transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 Jan 25;(1):CD005133.

- 45 Pescovitz MD. Benefits of cytomegalovirus prophylaxis in solid organ transplantation. *Transplantation*. 2006 Jul 27;82(2 Suppl):S4-8.
- 46 Schleiss MR, Heineman TC. Progress toward an elusive goal: current status of cytomegalovirus vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2005 Jun;4(3):381-406.
- 47 Plotkin SA, Farquhar J, Horberger E. Clinical trials of immunization with the Towne 125 strain of human cytomegalovirus. *J Infect Dis*. 1976 Nov;134(5):470-5.
- 48 Diamond DJ, York J, Sun JY, Wright CL, Forman SJ. Development of a candidate HLA A\*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood*. 1997 Sep 1;90(5):1751-67.
- 49 Grossi P, Baldanti F. Treatment of ganciclovir-resistant human cytomegalovirus infection. *J Nephrol*. 1997 May-Jun;10(3):146-51.
- 50 Aschan J, Ringdén O, Ljungman P, Lönnqvist B, Ohlman S. Foscarnet for treatment of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients. *Scand J Infect Dis*. 1992;24(2):143-50.
- 51 Bowden RA. Cytomegalovirus infections in transplant patients: methods of prevention of primary cytomegalovirus. *Transplant Proc*. 1991 Jun;23(3 Suppl 3):136-8, discussion 138.
- 52 John GT, Manivannan J, Chandy S, Peter S, Jacob CK. Leflunomide therapy for cytomegalovirus disease in renal allograft recipients. *Transplantation*. 2004 May 15;77(9):1460-1.
- 53 Erice A, Gil-Roda C, Pérez JL et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis*. 1997 May;175(5):1087-92.

- 54 Alain S, Honderlick P, Grenet D et al. Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation*. 1997 May 27;63(10):1533-6.
- 55 Bowen EF, Emery VC, Wilson P et al. Cytomegalovirus polymerase chain reaction viraemia in patients receiving ganciclovir maintenance therapy for retinitis. *AIDS*. 1998 Apr 16;12(6):605-11.
- 56 Li F, Kenyon KW, Kirby KA, Fishbein DP, Boeckh M, Limaye AP. Incidence and clinical features of ganciclovir-resistant cytomegalovirus disease in heart transplant recipients. *Clin Infect Dis*. 2007 Aug 15;45(4):439-47. Epub 2007 Jul 10.
- 57 Martinelli C, Reichhart JM. Evolution and integration of innate immune systems from fruit flies to man: lessons and questions. *J Endotoxin Res*. 2005;11(4):243-8.
- 58 Armant MA, Fenton MJ. Toll-like receptors: a family of pattern-recognition receptors in mammals. *Genome Biol*. 2002 Jul 29;3(8):REVIEWS3011. Epub 2002 Jul 29.
- 59 Kato H, Takeuchi O, Sato S et al. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*. 2006 May 4;441(7089):101-5. Epub 2006 Apr 9.
- 60 Saito T, Gale M Jr. Principles of intracellular viral recognition. *Curr Opin Immunol*. 2007 Feb;19(1):17-23. Epub 2006 Nov 21.
- 61 Drenth JP, van der Meer JW. The inflammasome--a linebacker of innate defense. *N Engl J Med*. 2006 Aug 17;355(7):730-2.
- 62 Mariathasan S, Monack DM. Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2007 Jan;7(1):31-40.

- 63 Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ. How specific should immunological memory be? *J Immunol.* 1999 Jul 15;163(2):569-75.
- 64 Ward RC, Kaufman HL. Targeting costimulatory pathways for tumor immunotherapy. *Int Rev Immunol.* 2007 May-Aug;26(3-4):161-96.
- 65 Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:275-308.
- 66 Barry M, Bleackley RC. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol.* 2002 Jun;2(6):401-9.
- 67 Andersen MH, Schrama D, Thor Straten P, Becker JC. Cytotoxic T cells. *J Invest Dermatol.* 2006 Jan;126(1):32-41.
- 68 Tannenbaum CS, Hamilton TA. Immune-inflammatory mechanisms in IFN $\gamma$ -mediated anti-tumor activity. *Semin Cancer Biol.* 2000 Apr;10(2):113-23.
- 69 Janeway CA, Travers P. *Immunobiology.* Elsevier Health Sciences, 2004.
- 70 Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. *Microbes Infect.* 2001 Nov;3(13):1167-71.
- 71 Zinkernagel RM, Doherty PC. The discovery of MHC restriction. *Immunol Today.* 1997 Jan;18(1):14-7. Review.
- 72 Eckstein R. *Immunhämatologie und Transfusionsmedizin.* Urban&Fischer/Elsevier, München 2004.
- 73 Waßmuth R. *Einführung in das HLA-System.* Ecomed-Verlag, Landberg/Lech 2005.

- 74 Rammensee HG, Bachmann J, Stevanovic S. MHC Ligands and Peptide Motifs. *Landes Bioscience*. 1997 (vol. 1), No. 6, 905-11.
- 75 Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*. 1987 Oct 8-14;329(6139):506-12.
- 76 Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC et al. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature*. 1993 Jul 1;364(6432):33-9.
- 77 Fremont DH, Matsumura M, Stura EA, Peterson PA, Wilson IA. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb. *Science*. 1992 Aug 14;257(5072):919-27.
- 78 Rammensee HG, Bachmann J, Emmerich NPN, Bacher OA, Stevanovic S. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics*. 1999 Nov;50(3-4):213-9.
- 79 Stern LJ, Wiley DC. Antigenic peptide binding by class I and class II histocompatibility proteins. *Behring Inst Mitt*. 1994 Jul;(94):1-10.
- 80 Falk K, Rötzschke O, Stevanović S, Jung G, Rammensee HG. Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics*. 1994;39(4):230-42.
- 81 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998 Mar 19;392(6673):245-52.
- 82 Mocarski ES Jr. Immune escape and exploitation strategies of cytomegaloviruses: impact on and imitation of the major histocompatibility system. *Cell Microbiol*. 2004 Aug;6(8):707-17.

83 Moutaftsi M, Mehl AM, Borysiewicz LK, Tabi Z. Human cytomegalovirus inhibits maturation and impairs function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2002 Apr 15;99(8):2913-21.

84 Levin MJ, Rinaldo CR Jr, Leary PL, Zaia JA, Hirsch MS. Immune response to herpesvirus antigens in adults with acute cytomegaloviral mononucleosis. *J Infect Dis*. 1979 Dec;140(6):851-7.

85 Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Cytomegalovirus infection and specific cell-mediated immunity after marrow transplant. *J Infect Dis*. 1980 Dec;142(6):816-24.

86 Quinnan GV Jr, Kirmani N, Rook AH et al. Cytotoxic t cells in cytomegalovirus infection: HLA-restricted T-lymphocyte and non-T-lymphocyte cytotoxic responses correlate with recovery from cytomegalovirus infection in bone-marrow-transplant recipients. *N Engl J Med*. 1982 Jul 1;307(1):7-13.

87 Rook AH, Smith WJ, Burdick JF et al. Virus-specific cytotoxic lymphocyte responses are predictive of the outcome of cytomegalovirus infection of renal transplant recipients. *Transplant Proc*. 1984 Dec;16(6):1466-9.

88 Quinnan GV, Manischewitz JE, Ennis PA. Role of cytotoxic T lymphocytes in murine cytomegalovirus infection. *J Gen Virol*. 1980 Apr;47(2):503-8.

89 Quinnan GV Jr, Burns WH, Kirmani N et al. HLA-restricted cytotoxic T lymphocytes are an early immune response and important defense mechanism in cytomegalovirus infections. *Rev Infect Dis*. 1984 Mar-Apr;6(2):156-63.

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

- 91 Reddehase MJ, Mutter W, Münch K, Bühring HJ, Koszinowski UH. CD8-positive T lymphocytes specific for murine cytomegalovirus immediate-early antigens mediate protective immunity. *J Virol.* 1987 Oct;61(10):3102-8.
- 92 Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM, Li CR, Agha ME, Greenberg PD. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science.* 1992 Jul 10;257(5067):238-41.
- 93 Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med.* 1995 Oct 19;333(16):1038-44.
- 94 Szmania S, Galloway A, Bruorton M et al. Isolation and expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes to clinical scale from a single blood draw using dendritic cells and HLA-tetramers. *Blood.* 2001 Aug 1;98(3):505-12.
- 95 Kleihauer A, Grigoleit U, Hebart H et al. Ex vivo generation of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells by peptide-pulsed dendritic cells. *Br J Haematol.* 2001 Apr;113(1):231-9.
- 96 Peggs K, Verfuert S, Mackinnon S. Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood.* 2001 Feb 15;97(4):994-1000.
- 97 Boland GJ, Hene RJ, Ververs C, de Haan MA, de Gast GC. Factors influencing the occurrence of active cytomegalovirus (CMV) infections after organ transplantation. *Clin Exp Immunol.* 1993 Nov;94(2):306-12.
- 98 Ljungman P, De Bock R, Cordonnier C et al. Practices for cytomegalovirus diagnosis, prophylaxis and treatment in allogeneic bone marrow transplant recipients: a report from the Working Party for Infectious Diseases of the EBMT. *Bone Marrow Transplant.* 1993 Oct;12(4):399-403.



- 99 Li CR, Greenberg PD, Gilbert MJ, Goodrich JM, Riddell SR. Recovery of HLA-restricted cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses after allogeneic bone marrow transplant: correlation with CMV disease and effect of ganciclovir prophylaxis. *Blood*. 1994 Apr 1;83(7):1971-9.
- 100 Einsele H, Ehninger G, Steidle M et al. Lymphocytopenia as an unfavorable prognostic factor in patients with cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation. *Blood*. 1993 Sep 1;82(5):1672-8.
- 101 Zajac AJ, Murali-Krishna K, Blattman JN, Ahmed R. Therapeutic vaccination against chronic viral infection: the importance of cooperation between CD4+ and CD8+ T cells. *Curr Opin Immunol*. 1998 Aug;10(4):444-9.
- 102 Zhao GG, Li JY, Atlas E, Cleary JP. Cytomegalovirus pneumonitis as an initial presentation in an HIV-infected patient. *Conn Med*. 1999 Oct;63(10):585-8.
- 103 Komanduri KV, Viswanathan MN, Wieder ED et al. Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med*. 1998 Aug;4(8):953-6.
- 104 Komanduri KV, Donahoe SM, Moretto WJ et al. Direct measurement of CD4+ and CD8+ T-cell responses to CMV in HIV-1-infected subjects. *Virology*. 2001 Jan 20;279(2):459-70.
- 105 Sester M, Sester U, Gartner B et al. Levels of virus-specific CD4 T cells correlate with cytomegalovirus control and predict virus-induced disease after renal transplantation. *Transplantation*. 2001 May 15;71(9):1287-94.
- 106 Foster AE, Gottlieb DJ, Sartor M, Hertzberg MS, Bradstock KF. Cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T-cells follow a similar reconstitution pattern after allogeneic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2002;8(9):501-11.

- 107 Zaia JA. Prevention and management of CMV-related problems after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2002 Apr;29(8):633-8.
- 108 Einsele H, Roosnek E, Rufer N et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood.* 2002 Jun 1;99(11):3916-22.
- 109 Borysiewicz LK, Hickling JK, Graham S et al. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells. Relative frequency of stage-specific CTL recognizing the 72-kD immediate early protein and glycoprotein B expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Exp Med.* 1988 Sep 1;168(3):919-31.
- 110 Borysiewicz LK, Graham S, Hickling JK, Mason PD, Sissons JG. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells: their precursor frequency and stage specificity. *Eur J Immunol.* 1988 Feb;18(2):269-75.
- 111 Alp NJ, Allport TD, Van Zanten J, Rodgers B, Sissons JG, Borysiewicz LK. Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early 1 protein. *J Virol.* 1991 Sep;65(9):4812-20.
- 112 Thomsen DR, Stenberg RM, Goins WF, Stinski MF. Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1984 Feb;81(3):659-63.
- 113 Borysiewicz LK, Morris S, Page JD, Sissons JG. Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes: requirements for in vitro generation and specificity. *Eur J Immunol.* 1983 Oct;13(10):804-9.
- 114 McLaughlin-Taylor E, Pande H, Forman SJ et al. Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8+ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol.* 1994 May;43(1):103-10.

115 Grefte JM, van der Gun BT, Schmolke S et al. The lower matrix protein pp65 is the principal viral antigen present in peripheral blood leukocytes during an active cytomegalovirus infection. *J Gen Virol.* 1992 Nov;73 ( Pt 11):2923-32.

116 Riddell SR, Rabin M, Geballe AP, Britt WJ, Greenberg PD. Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol.* 1991 Apr 15;146(8):2795-804.

117 Wills MR, Carmichael AJ, Mynard K et al. The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol.* 1996 Nov;70(11):7569-79.

118 Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Carmichael AJ, Sissons JG. The memory cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to human cytomegalovirus infection contains individual peptide-specific CTL clones that have undergone extensive expansion in vivo. *J Virol.* 1999 Mar;73(3):2099-108.

119 Weekes MP, Carmichael AJ, Wills MR, Mynard K, Sissons JG. Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J Immunol.* 1999 Jun 15;162(12):7569-77.

120 Weekes MP, Wills MR, Mynard K, Hicks R, Sissons JG, Carmichael AJ. Large clonal expansions of human virus-specific memory cytotoxic T lymphocytes within the CD57+ CD28- CD8+ T-cell population. *Immunology.* 1999 Nov;98(3):443-9.

121 Bitmansour AD, Waldrop SL, Pitcher CJ et al. Clonotypic structure of the human CD4+ memory T cell response to cytomegalovirus. *J Immunol.* 2001 Aug 1;167(3):1151-63.

122 Beninga J, Kropff B, Mach M. Comparative analysis of fourteen individual human cytomegalovirus proteins for helper T cell response. *J Gen Virol.* 1995 Jan;76 ( Pt 1):153-60.

123 Kern F, Surel IP, Brock C et al. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med.* 1998 Aug;4(8):975-8.

124 Kern F, Bunde T, Faulhaber N et al. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1709-16. Epub 2002 May 31.

125 Kern F, Surel IP, Faulhaber N et al. Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol.* 1999 Oct;73(10):8179-84.

126 Sylwester AW, Mitchell BL, Edgar JB et al. Broadly targeted human cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T cells dominate the memory compartments of exposed subjects. *J Exp Med.* 2005 Sep 5;202(5):673-85.

127 Gratama JW, van Esser JW, Lamers CH et al. Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood.* 2001 Sep 1;98(5):1358-64.

128 Hebart H, Deginik S, Stevanovic S et al. Sensitive detection of human cytomegalovirus peptide-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by interferon-gamma-enzyme-linked immunospot assay and flow cytometry in healthy individuals and in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3830-7.

129 Bunde T, Kirchner A, Hoffmeister B et al. Protection from cytomegalovirus after transplantation is correlated with immediate early 1-specific CD8 T cells. *J Exp Med.* 2005 Apr 4;201(7):1031-6. Epub 2005 Mar 28.

130 van Leeuwen EM, Remmerswaal EB, Vossen MT et al. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J Immunol.* 2004 Aug 1;173(3):1834-41.

131 Gamadia LE, Rentenaar RJ, van Lier RA, ten Berge IJ. Properties of CD4(+) T cells in human cytomegalovirus infection. *Hum Immunol.* 2004 May;65(5):486-92.

132 Einsele H, Hebart H. CMV-specific immunotherapy. *Hum Immunol.* 2004 May;65(5):558-64.

133 Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int J Pept Protein Res.* 1990 Mar;35(3):161-214.

134 Hilpert K, Winkler DF, Hancock RE. Peptide arrays on cellulose support: SPOT synthesis, a time and cost efficient method for synthesis of large numbers of peptides in a parallel and addressable fashion. *Nat Protoc.* 2007;2(6):1333-49

135 Frank R. The SPOT-synthesis technique. Synthetic peptide arrays on membrane supports--principles and applications. *J Immunol Methods.* 2002 Sep 1;267(1):13-26.

136 Hoffmeister B, Bunde T, Rudawsky IM, Volk HD, Kern F. Detection of antigen-specific T cells by cytokine flow cytometry: the use of whole blood may underestimate frequencies. *Eur J Immunol.* 2003 Dec;33(12):3484-92.

137 Saveanu L, Carroll O, Hassainya Y, van Endert P. Complexity, contradictions, and conundrums: studying post-proteasomal proteolysis in HLA class I antigen presentation. *Immunol Rev.* 2005 Oct;207:42-59.

- 138 Yewdell JW, Bennink JR. Cut and trim: generating MHC class I peptide ligands. *Curr Opin Immunol.* 2001 Feb;13(1):13-8.
- 139 Goldberg AL, Cascio P, Saric T, Rock KL. The importance of the proteasome and subsequent proteolytic steps in the generation of antigenic peptides. *Mol Immunol.* 2002 Oct;39(3-4):147-64
- 140 von Muller L, Klemm A, Durmus N et al. Cellular immunity and active human cytomegalovirus infection in patients with septic shock. *J Infect Dis.* 2007 Nov 1;196(9):1288-95. Epub 2007 Oct 1.
- 141 Ozdemir E, Saliba RM, Champlin RE et al. Risk factors associated with late cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation for hematological malignancies. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Jul;40(2):125-36. Epub 2007 May 28.
- 142 Avetisyan G, Larsson K, Aschan J, Nilsson C, Hassan M, Ljungman P. Impact on the cytomegalovirus (CMV) viral load by CMV-specific T-cell immunity in recipients of allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006 Nov;38(10):687-92. Epub 2006 Sep 25.
- 143 O'reilly RJ, Doubrovina E, Trivedi D, Hasan A, Kollen W, Koehne G. Adoptive transfer of antigen-specific T-cells of donor type for immunotherapy of viral infections following allogeneic hematopoietic cell transplants. *Immunol Res.* 2007 Jul;38(1-3):237-250.
- 144 Micklethwaite K, Hansen A, Foster A et al. Ex vivo expansion and prophylactic infusion of CMV-pp65 peptide-specific cytotoxic T-lymphocytes following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2007 Jun;13(6):707-14. Epub 2007 Apr 6.
- 145 Gillespie GM, Wills MR, Appay V et al. Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol.* 2000 Sep;74(17):8140-50.

146 Sandberg JK, Fast NM, Nixon DF. Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. *J Immunol.* 2001 Jul 1;167(1):181-7.

147 Kern F, Khatamzas E, Surel I et al. Distribution of human CMV-specific memory T cells among the CD8pos. subsets defined by CD57, CD27, and CD45 isoforms. *Eur J Immunol.* 1999 Sep;29(9):2908-15.

148 Picker LJ, Singh MK, Zdraveski Z et al. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. *Blood.* 1995 Aug 15;86(4):1408-19.

149 Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods.* 1998 Mar 1;212(1):89-98.

150 Nomura LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry.* 2000 May 1;40(1):60-8.

151 Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, Maino VC, Picker LJ. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency. *J Clin Invest.* 1997 Apr 1;99(7):1739-50.

152 Hoffmeister B, Kiecker F, Tesfa L, Volk HD, Picker LJ, Kern F. Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods.* 2003 Mar;29(3):270-81.

153 Morita-Hoshi Y, Heike Y, Kawakami M et al. Functional analysis of cytomegalovirus-specific T lymphocytes compared to tetramer assay in patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Nov 19 [Epub ahead of print].

- 154 Gratama JW, Cornelissen JJ. Diagnostic potential of tetramer-based monitoring of cytomegalovirus-specific CD8+ T lymphocytes in allogeneic stem cell transplantation. *Clin Immunol.* 2003 Jan;106(1):29-35.
- 155 Bronke C, Palmer NM, Jansen CA et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells in HIV-1-infected individuals progressing to AIDS with CMV end-organ disease. *J Infect Dis.* 2005 Mar 15;191(6):873-80. Epub 2005 Jan 31.
- 156 Sherman LA, Burke TA, Biggs JA. Extracellular processing of peptide antigens that bind class I major histocompatibility molecules. *J Exp Med.* 1992 May 1;175(5):1221-6.
- 157 Accapezzato D, Nisini R, Paroli M et al. Generation of an MHC class II-restricted T cell epitope by extracellular processing of hepatitis delta antigen. *J Immunol.* 1998 Jun 1;160(11):5262-6.
- 158 Nakagawa Y, Takeshita T, Berzofsky JA, Takahashi H. Analysis of the mechanism for extracellular processing in the presentation of human immunodeficiency virus-1 envelope protein-derived peptide to epitope-specific cytotoxic T lymphocytes. *Immunology.* 2000 Sep;101(1):76-82.
- 159 Boomker JM, de Leij LF, The TH, Harmsen MC. Viral chemokine-modulatory proteins: tools and targets. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Feb;16(1):91-103. Epub 2005 Jan 28.
- 160 Draenert R, Altfeld M, Brander C et al. Comparison of overlapping peptide sets for detection of antiviral CD8 and CD4 T cell responses. *J Immunol Methods.* 2003 Apr 1;275(1-2):19-29.
- 161 Kramer A, Reineke U, Dong L et al. Spot synthesis: observations and optimizations. *J Pept Res.* 1999 Oct;54(4):319-27.



162 Maecker HT, Dunn HS, Suni MA et al. Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods*. 2001 Sep 1;255(1-2):27-40.

163 Maecker HT, Ghanekar SA, Suni MA, He XS, Picker LJ, Maino VC. Factors affecting the efficiency of CD8+ T cell cross-priming with exogenous antigens. *J Immunol*. 2001 Jun 15;166(12):7268-75.

164 Elkington R, Walker S, Crough T et al. Ex vivo profiling of CD8+-T-cell responses to human cytomegalovirus reveals broad and multispecific reactivities in healthy virus carriers. *J Virol*. 2003 May;77(9):5226-40.

165 Fournier P, Ammerlaan W, Ziegler D et al. Differential activation of T cells by antibody-modulated processing of the flanking sequences of class II-restricted peptides. *Int Immunol*. 1996 Sep;8(9):1441-51.

166 Muller CP, Ammerlaan W, Fleckenstein B et al. Activation of T cells by the ragged tail of MHC class II-presented peptides of the measles virus fusion protein. *Int Immunol*. 1996 Apr;8(4):445-56.

167 Hoffmeister B, Kiecker F, Surel I et al. Evaluation of the frequency of virus-specific CD8+ T cells by cytokine flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 2003;215:59-69.

168 De Groot AS. Immunomics: discovering new targets for vaccines and therapeutics. *Drug Discov Today*. 2006 Mar;11(5-6):203-9.

169 Paston SJ, Dodi IA, Madrigal JA. Progress made towards the development of a CMV peptide vaccine. *Hum Immunol*. 2004 May;65(5):544-9.

170 Kiecker F, Streitz M, Ay B et al. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides--what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol*. 2004 May;65(5):523-36.

171 Ay B, Volkmer R, Boisguerin P. Synthesis of cleavable peptides with authentic C-termini: an application for fully automated SPOT synthesis. *Tetrahedron Letters* 2007;48(3):361-4.

172 Bitmansour AD, Douek DC, Maino VC, Picker LJ. Direct ex vivo analysis of human CD4(+) memory T cell activation requirements at the single clonotype level. *J Immunol.* 2002 Aug 1;169(3):1207-18.

## Danksagung

Für die Hilfe und Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit möchte ich allen Beteiligten meinen Dank aussprechen.

Dem Direktor des Instituts für Medizinische Immunologie, Hans-Dieter Volk, möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut danken, in dem zu arbeiten eine außersprochen angenehme Erfahrung für mich war.

Florian Kern – meinem Betreuer – möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen. Hervorzuheben sind das ausgesprochen gute Verhältnis zu ihm als auch zu allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe sowie die vielen Ideen und Hilfen, die die Realisation dieser Arbeit ermöglicht haben und nicht zuletzt seine Geduld.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern aus dem Institut, deren Unterstützung unschätzbar war für den Fortgang dieser Arbeit. Zudem waren sie immer wieder bereit, Blut für die Durchführung der Experimente zu spenden, v. a. Gana Bold, Torsten Bunde, Ingrid Jäckel, Christa Liebental, Christian Meisel, Bianka Petzold, Denis Werner und Ivana Büttnerova.

Auch außerhalb des Instituts konnte ich Kommilitonen zur Blutspende gewinnen, hierbei gilt mein Dank Christine Olbrich und Henning Tautz.

Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Molekulare Bibliotheken des Institutes möchte ich mich für die Einarbeitung und Hilfestellung bei der selbständig durchgeführten Synthese der Peptide und deren weiterer Verarbeitung bedanken. Insbesondere Rudolf Volkmer-Engert und Ines Kretschmar waren mir hierbei eine große Hilfe. Li Ying Dong hat die 552 9-AS-Peptide mit Hilfe der Spot-Synthesetechnik hergestellt.

Den Mit-Doktoranden danke ich für die interessante Zeit voller guter Erfahrungen. Insbesondere Nicole Faulhaber möchte ich hier nennen, deren kompetente Anleitung den Anfang im Laboralltag sehr vereinfacht hat.

Torsten Bunde und Bodo Hoffmeister möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken, aus der sich eine freundschaftliche Beziehung entwickelt hat.

Schließlich möchte ich mich für die Korrektur meiner Arbeit bei Wendelin Damm, Maja Hofmann, Thomas Mutzke und Olaf Reupke bedanken.

## Veröffentlichungen, Vorträge, Präsentationen

Aus dieser Arbeit sind bislang folgende Veröffentlichungen, Vorträge und Präsentationen hervorgegangen:

- Kiecker F, Streitz M, Ay B, Cherepnev G, Volk HD, Volkmer-Engert R, Kern F. Analysis of antigen-specific T-cell responses with synthetic peptides-what kind of peptide for which purpose? *Hum Immunol.* 2004 May;65(5):523-36.
- Hoffmeister B, Kiecker F, Tesfa L, Volk HD, Picker LJ, Kern F. Mapping T cell epitopes by flow cytometry. *Methods.* 2003 Mar;29(3):270-81.
- Hoffmeister B, Kiecker F, Surel I, Khatamzas E, Schuster V, Volk HD, Kern F. Evaluation of the frequency of virus-specific CD8+ T cells by cytokine flow cytometry. *Methods Mol Biol.* 2003;215:59-69.
- Kern F, Bunde T, Faulhaber N, Kiecker F, Khatamzas E, Rudawski IM, Pruss A, Gratama JW, Volkmer-Engert R, Ewert R, Reinke P, Volk HD, Picker LJ. Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis.* 2002 Jun 15;185(12):1709-16. Epub 2002 May 31.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich, Felix Kiecker, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Optimierte Peptide und Peptidpools zur Stimulation antigenspezifischer T-Zellen bei Zytomegalievirus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 31.01.2008

Felix Kiecker