

Aus der Klinik für Allgemeine Pädiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Generierung CMV-spezifischer Lymphozyten aus Stammzellapheresat

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Heine

aus Dresden

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Gaedicke
 2. Prof. Dr. K. Welte
 3. Prof. Dr. med. R. Handgretinger

Datum der Promotion: 16.05.2010

Für meine Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	6
1.1	Das Immunsystem	6
1.1.1	Allgemeines	6
1.1.2	CD-Nomenklatur	7
1.1.3	MHC-System.....	8
1.1.4	MHC-Moleküle und T-Zellantwort	8
1.1.5	Autologe und Allogene Stammzelltransplantation	9
1.1.6	GvHD/GvL.....	10
1.1.7	Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation.....	11
1.2	Das humane Cytomegalievirus (HCMV).....	12
1.2.1	Allgemeines.....	12
1.2.2	Virale Struktur des HCMV.....	12
1.2.3	Epidemiologie und Pathogenese des HCMV	13
1.2.4	HCMV-assoziierte-Erkrankungen	14
1.2.5	HCMV-Infektionen bei transplantierten Patienten.....	14
1.2.6	HCMV-Erkrankung bei Patienten nach Stammzelltransplantation	15
1.2.7	HCMV-Diagnostik.....	16
1.2.8	Therapie der HCMV-Infektion.....	16
1.2.9	Immunantwort gegen HCMV	18
1.2.10	Adoptive Immuntherapie der HCMV-Infektion.....	19
2	Zielsetzung der Arbeit	21
3	Materialien	23
3.1	Geräte.....	23
3.2	Plastik- und Glaswaren	23
3.3	Reagenzien und Chemikalien.....	24
3.4	Seren	25
3.5	Kulturmedien.....	25
3.6	Zytokine	25
3.7	FACS-Antikörper	26
3.8	Produkte für die Zellseparation	26
3.9	Produkte für ELISpot.....	27
3.10	Produkte für MLR	27
3.11	Produkte für Zytotoxizitätsassay	27
3.12	Peptide.....	27
3.13	Virus-Lysat.....	27
3.14	Positivkontrolle.....	28
3.15	Kostimulation	28
3.16	T2-Zelllinie	28
4	Methoden	29
4.1	Blut-/Stammzellapheresatprobengewinnung	29
4.2	Vorbehandlung der Proben und Einfrieren	29
4.3	Zellzahlbestimmung	30
4.4	Auftauen der Proben.....	30
4.5	Vorbereitung zum Zytokinnachweis (Ficoll und Thrombozytenwasch)	31
4.6	Zytokinnachweis.....	31
4.7	IFN- γ Sekretionsassay	33
4.8	MACS-Separation	35

4.9 Kultivierung CMV-spezifischer T-Zellen.....	36
4.10 Testung der Funktionalität der T-Zellen nach 21-tägiger Kultur	37
4.10.1 CFDA-Färbung der Stimulatorzellen.....	37
4.10.2 Vorbereitung der Zellen	37
4.10.3 Zytokinnachweis nach 21-tägiger Kultur	38
4.10.4 Stimulatorzellen für die MLR.....	38
4.10.5 Mixed Lymphocytes Reaction (MLR)	39
4.10.6 Stimulatorzellen für den ELISpot.....	40
4.10.7 ELISpot	40
4.10.8 Vorbereitung der T2 Zellen für den Zytotoxizitätsassay	42
4.10.9 PKH 26-Färbung.....	42
4.10.10 Zytotoxizitätsassay.....	43
4.11 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab.....	45
4.11.1 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab mit CMV pp65 inkubierten Zellen	46
4.11.2 Kontrollen für IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab.....	47
4.12 Testung der Funktionalität der T-Zellen nach 5-tägiger Kurzkultur	48
4.12.1 PKH 26-Färbung der Stimulatorzellen.....	48
4.12.2 CFDA-Färbung der kultivierten, selektierten Zellen	49
4.12.3 Proliferationsassay	49
5 Ergebnisse	51
5.1 Cytokin Detection von 14 gesunden Spendern	51
5.2 Vergleich Zytokinnachweis CMV positiver Zellen in peripherem Blut, Stammzellapheresat und peripherem Blut zusammen mit Stammzellapheresat.....	54
5.3 IFN- γ Sekretionsassay	57
5.4 Zellvermehrungsrate nach 3 Wochen Kultivierung	60
5.5 Zytokinnachweis nach 3-wöchiger Kultivierung	61
5.6 MLR.....	63
5.7 Elispot	64
5.8 Zytotoxizitätsassay	64
5.9 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab.....	66
6 Diskussion.....	70
6.1 Warum adoptive Immuntherapie bei CMV-Erkrankung nach Stammzelltransplantation?	70
6.2 Diskussion der Ergebnisse	71
6.2.1 Zytokinnachweis.....	71
6.2.2 IFN- γ Sekretionsassay.....	73
6.2.3 Zellvermehrungsrate nach 21 Tagen Kultur.....	74
6.2.4 Benötigte Zellzahl für den klinischen Einsatz.....	74
6.2.5 MLR	75
6.2.6 ELISpot	76
6.2.7 Spezifitätsverlust nach unspezifischer Expansion?	76
6.2.8 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab.....	77
6.2.9 Kurzkultivierung der Zellen nach IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab.....	78
6.2.10 Proliferationsassay	79
6.2.11 Übertragung der Ergebnisse auf die Klinik.....	79
6.3 Transfer nicht nur CMV pp65 spezifischer T-Zellen, sondern auch anderer Proteine.....	80
7 Zusammenfassung	81
8 Literaturverzeichnis	83
9 Abkürzungsverzeichnis	91
10 Danksagung.....	93
11 Lebenslauf.....	94

12 Erklärung 95

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Allgemeines

Das Immunsystem hat die Aufgabe, uns vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen. Es lässt sich in ein unspezifisches und spezifisches Immunsystem unterteilen. Zu ersterem zählen u. a. der Säuremantel der Haut, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Aus dem zellulären Bereich sind Granulozyten, das Monozyten-Makrophagensystem sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zu nennen, wobei letztere eine Zwischenstellung zwischen dem spezifischen und unspezifischen Immunsystem einnehmen. Das spezifische System, welches sich aus T- und B-Lymphozyten zusammensetzt, kann hochspezifisch auf das jeweilige Antigen reagieren und klonal expandieren, so dass eine sehr effektive Antwort sowie Gedächtnisreaktion möglich ist. Die Feinabstimmung erfolgt über Zytokine sowie regulatorische T-Lymphozyten, wodurch eine adäquate Reaktion und eine Abschaltung nach erfolgter Immunantwort gewährleistet wird (Pezzutto et al. 2007).

Die Zellen des Immunsystems entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Die dabei entstehenden Lymphozyten-Vorläuferzellen differenzieren sich später zu B- und T-Lymphozyten und NK-Zellen. Nur die B-Lymphozyten reifen im Knochenmark, die Vorläufer-T-Lymphozyten wandern in den Thymus und reifen dort aus. Wenn beide Lymphozytenklassen ihre Reifung abgeschlossen haben, gelangen sie über das Blutssystem zu den peripheren Lymphorganen (Lymphknoten, Milz, lymphatisches Gewebe usw.). B-Lymphozyten differenzieren, wenn sie aktiviert werden, zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren. Es gibt zwei große Klassen von T-Lymphozyten. Eine Klasse differenziert nach Aktivierung zu zytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs), welche hauptsächlich virusinfizierte Zellen abtöten, während die zweite Klasse von T-Lymphozyten zu Zellen differenziert, die andere Zellen wie z. B. B-Zellen und Makrophagen, aktivieren. Lymphozyten besitzen die Möglichkeit, eine spezifische Immunantwort gegen praktisch jedes fremde Antigen zu entwickeln. Dies ist möglich, da jeder einzelne, ausreifende Lymphozyt eine einzigartige Variante eines Prototyps von Antigen-Rezeptor trägt, so dass die Population von T- und B-Lymphozyten zusammen ein riesiges Repertoire von Rezeptoren tragen, die hoch spezifisch in ihrer Antigen-Bindungs-Stelle sind. Der B-Zell-Antigen-Rezeptor ist eine membrangebundene Form des Antikörpers, den die

B-Zelle nach ihrer Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle sezerniert. Antikörper-Moleküle bezeichnet man allgemein als Immunglobuline. Deshalb bezeichnet man den Antigen-Rezeptor der B-Lymphozyten auch als membrangebundenes Immunglobulin. Die T-Zell-Antigen-Rezeptoren, oft einfach T-Zell-Rezeptoren genannt, sind zwar mit Immunglobulinen verwandt, zeigen aber deutliche Unterschiede, beispielsweise durch ihre spezifische Fähigkeit, Antigene von fremden Proteinen oder Pathogenen zu erkennen, die in Wirtszellen eingedrungen sind.

Die dritte Linie der lymphatischen Zellen, die NK-Zellen, besitzen keine antigenspezifischen Rezeptoren und sind Teil des angeborenen, unspezifischen Immunsystems. Diese Zellen zirkulieren im Blut als große Lymphozyten mit charakteristischen Granulas. Sie besitzen die Fähigkeit, abnorme Zellen wie zum Beispiel Tumorzellen und virusinfizierte Zellen wieder zu erkennen und zu töten (Janeway et al. 2005).

1.1.2 CD-Nomenklatur

Lymphozyten lassen sich morphologisch nicht unterscheiden. Sie exprimieren aber abhängig von ihrem Differenzierungs- oder Aktivierungszustand ein charakteristisches Profil von Oberflächenmolekülen, worüber ihre diagnostische Differenzierung ermöglicht wird. Mit Hilfe spezifischer monoklonaler Antikörper, die an einen bestimmten Differenzierungsmarker (Oberflächenmolekül) binden, ist es möglich diese Oberflächenmoleküle mit verschiedenen Methoden sichtbar zu machen und somit Lymphozyten zu unterscheiden. Es wurde festgestellt, dass mehrere monoklonale Antikörper die gleichen Moleküle auf der Oberfläche von Immunzellen binden. Diese Antikörper wurden jeweils zu einem Cluster zusammengefasst und diese Cluster bekamen laufende Nummern. Das Molekül, welches von den Antikörpern eines cluster of differentiation gebunden wird, heißt cluster determinant, CD (Schütt et al. 2006). So ist zum Beispiel die Unterscheidung von T-Helferzellen und CTLs dadurch möglich, dass T-Helferzellen CD4 exprimieren, während CTLs CD8 positiv sind. CD34, ein Mucin, ist ein Marker für hämatopoetische Vorläuferzellen und kapilläre Endothelzellen. Für die Stammzellapherese ist dieser Differenzierungsmarker von großer Bedeutung, da durch selektive Erhöhung der Anzahl der CD34+-Zellen im peripheren Blut die für die Transplantation wichtigen Zellen in ausreichender Anzahl zur Verfügung gestellt werden können.

1.1.3 MHC-System

Bei den Haupthistokompatibilitätskomplexen (MHC) handelt es sich um eine Gruppe von Genen auf Chromosom 6 des Menschen bzw. Chromosom 17 bei Mäusen. Diese Gene codieren eine Gruppe von Membranglykoproteinen, die man als MHC-Moleküle oder auch Haupthistokompatibilitätsantigene (HLA) bezeichnet. Die MHC-Klasse-I-Moleküle (beim Menschen HLA-A, -B, -C, werden auf fast allen Körperzellen exprimiert) präsentieren den CD8-T-Zellen Peptide, die im Zytosol aus Antigenen abgespalten wurden. Die MHC-Klasse-II-Moleküle (beim Menschen HLA-DP, -DQ, -DR, auf B-Lymphozyten, dendritischen Zellen und stimulierten Makrophagen exprimiert) präsentieren den CD4-T-Zellen Peptide, die in zellulären Vesikeln durch Proteinabbau erzeugt wurden. Die MHC-Gene codieren auch Proteine, die an der Aufspaltung der Antigene und an anderen Teilen der Immunreaktion beteiligt sind. Der MHC enthält an verschiedenen Loci zahlreiche Allele und ist damit der am stärksten polymorphe Gencluster im menschlichen Genom (Janeway et al. 2005).

1.1.4 MHC-Moleküle und T-Zellantwort

Bis zur Erkennung eines Peptid-MHC-Komplexes zirkulieren antigenspezifische CTLs ständig im Körper und passieren dabei die lymphatischen Gewebe wie z.B. Lymphknoten oder Milz, in denen eine hohe Dichte an antigenpräsentierenden Zellen (APCs) herrscht. Auf den APCs erkennen die CD8 positiven CTLs MHC-Klasse-I präsentierte Peptide. Dieser Erkennungsprozess zusammen mit einem kostimulierenden Signal, das von den APCs vermittelt wird, führt zur Aktivierung der CTLs und damit zu sekretorischen und rezeptorvermittelten zytotoxischen Mechanismen gegen krankhaft veränderte Zielzellen in der Peripherie (Berke 1994). CTLs produzieren aber auch noch Zytokine wie z.B. $\text{IFN-}\gamma$, die u. a. Entzündungsreaktionen induzieren, das Immunproteasom aktivieren, die antigenpräsentierenden Eigenschaften von APCs verbessern und virale Replikationsvorgänge inhibieren.

Die MHC-Klasse-II präsentierte Peptide auf APCs werden im Gegensatz dazu von CD4+ T-Zellen erkannt. Auch bei diesen Zellen führt der Erkennungsprozess zur Sekretion von Zytokinen. Anhand der ausgeschütteten Zytokine und ihrer Funktion lassen sich zwei Untergruppen der CD4 positiven T-Zellen unterscheiden. Zum einen die Th1- oder inflammatorische T-Zellen, deren Leitzytokin $\text{IFN-}\gamma$ ist. Diese Zellen aktivieren Makrophagen, um intravesikuläre Bakterien abzutöten. Zum anderem die Th2- oder T-Helferzellen, deren Leitzytokin Interleukin 4 ist, die im Gegensatz dazu die Antikörperproduktion durch B-

Lymphozyten aktivieren und damit für die humorale Immunantwort von entscheidender Bedeutung sind.

1.1.5 Autologe und Allogene Stammzelltransplantation

Die intravenöse Infusion hämatopoetischer Stammzellen aus Knochenmark, peripherem Blut oder postpartalem Nabelschnurblut ist heute eine weltweit anerkannte Behandlungsmethode für viele angeborene und erworbene Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, solider Tumoren und schwerer Autoimmunerkrankungen (Bortin et al. 1989; Goldman et al. 1988; Krivit et al. 1992; Ramsay et al. 1991).

Unterschieden wird die autologe (Empfänger und Spender identisch) und allogene (genetisch differente Individuen, die jedoch derselben Spezies angehören) Stammzelltransplantation. Die HLA-Gewebetypisierung wird vorgenommen, um auch bei der allogenen Transplantation eine möglichst hohe Übereinstimmung zwischen Spender und Empfänger zu erzielen.

Die Anzahl der CD34+-Zellen (hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen) im peripheren Blut ist normalerweise gering (ca. 0,05 %). Bei der allogenen Stammzelltransplantation (siehe Abb. 1) wird beim gesunden Spender durch Verabreichung von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder GM-CSF die Konzentration von CD34+-Zellen am Tag 4-5 bis auf das Hundertfache gesteigert, bevor es (trotz fortgesetzter Stimulierung) wieder zu einem raschen Abfall der zirkulierenden CD34+-Zellen kommt (Kröger et al. 2004). Ist eine ausreichende Anzahl CD34+-Zellen erreicht, wird die Leukapherese durchgeführt. Das daraus gewonnene Stammzellapheresat kann beliebig lang kryokonserviert werden. Die darauf folgende Konditionierungsbehandlung des erkrankten Patienten kann unterschiedlich aussehen, oft handelt es sich um eine hochdosierte Chemo-Radiotherapie, d.h. die Kombination aus Ganzkörperbestrahlung und Chemotherapie. Durch diese Konditionierungsbehandlung kommt es zu einer Aplasie (Abfall der Erythrozyten, Granulozyten und der Thrombozyten im peripheren Blut), die ohne Stammzellrückgabe in der Mehrzahl der Fälle irreversibel ist. Die Reinfusion der kryokonservierten Stammzellen direkt im Anschluss an die Chemotherapie führt dazu, dass die Aplasiephase nur 10 bis 15 Tage dauert. Anschließend kommt es meistens zur vollständigen Rekonstitution der Blutbildung (Pezutto et al. 2007). Bei allogener Stammzelltransplantation wird somit ein kompletter Austausch des Immunsystems durchgeführt.

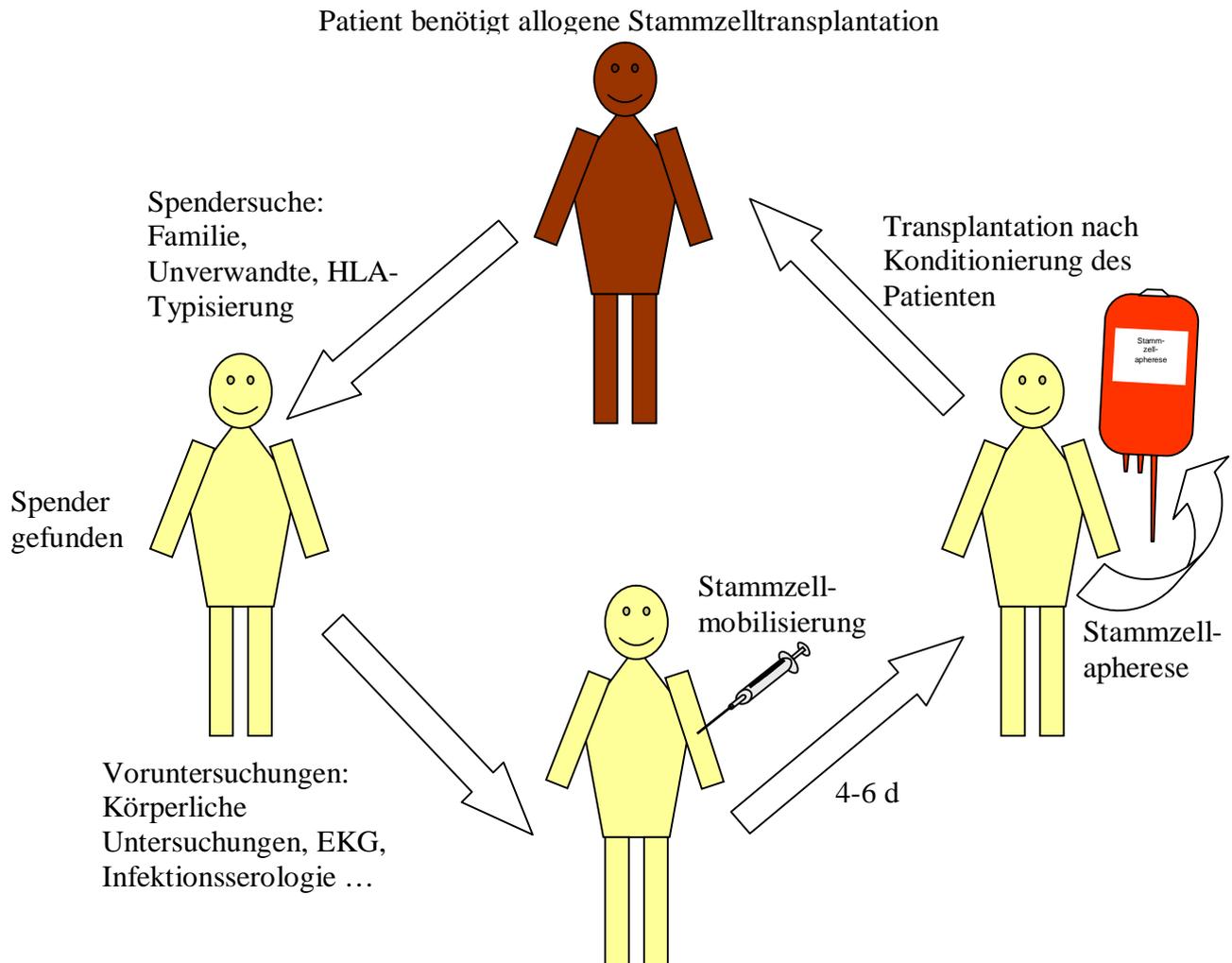


Abb. 1: **Allogene Stammzelltransplantation** Wird bei einem Patienten die Indikation zur Stammzelltransplantation gestellt, erfolgt zunächst die Spendersuche im Familienumkreis. Bei erfolgloser Suche wird ein Spender über Spenderregister gesucht, der aufgrund seiner HLA-Typisierung in Frage kommt. Nach eingehenden Vorsorgeuntersuchungen erhält der Spender hämatopoetische Wachstumsfaktoren wie G-CSF oder GM-CSF und nach 4-5 Tagen ist die Anzahl CD34+-Zellen ausreichend für eine Stammzellapherese. Die dadurch gewonnenen Zellen können dann dem Patienten nach Konditionierung (hochdosierte Chemotherapie bzw. die Kombination aus Ganzkörperbestrahlung und Chemotherapie) zugeführt werden.

1.1.6 GvHD/GvL

Eine Hauptursache von Morbidität und Mortalität nach allogener Transplantation ist die „graft versus host disease“ (GvHD), die durch Spender T-Lymphozyten verursacht wird. Bei HLA-kompatibler Transplantation ist die GvHD-Antwort gegen Nebenhistokompatibilitätsantigene (minor histocompatibility antigens) gerichtet. Vermutlich präsentieren APC des Empfängers die fremden Gewebeanigene den Spender-T-Lymphozyten, insbesondere, da die Aktivität der APC durch Chemo- und Radiotherapie induzierte Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF- α erhöht ist. Die GvHD betrifft vor allem die Haut (kleinfleckiges Exanthem), Leber (cholestatische Hepatitis)

und Darm (Diarrhö). Ferner kommt es zur Austrocknung von Schleimhäuten und Bindehaut (Sicca-Syndrom) und zur Myositis. Zur Prophylaxe einer GvHD führt man eine Immunsuppression mit z. B. Cyclosporin durch, eventuell auch in Kombination mit Methotrexat. Das Risiko einer GvHD sinkt durch Depletion von T-Lymphozyten. Da die Spender-T-Lymphozyten aber auch den günstigen GvL-Effekt (Spender-T-Lymphozyten können im Körper verteilte Leukämiezellen aufspüren und somit entscheidend zur Heilung oder Verlängerung der Remission beitragen (Schütt & Bröker 2006)) vermitteln, steigt dadurch wiederum das Risiko eines Tumorrezidivs. Um den gewünschten GvL-Effekt bei gleichzeitiger Reduzierung des GvHD-Risikos beizubehalten, kann man die T-Zellen nur partiell depletieren und die Spender-T-Lymphozyten zu späteren Zeitpunkten nach einem abgestuften Schema reinfundieren (Pezzutto et al. 2007).

1.1.7 Infektionen nach allogener Stammzelltransplantation

Patienten nach allogener Stammzelltransplantation sind extrem anfällig für die Akquisition und Reaktivierung bestimmter Infektionskrankheiten. Verschiedenste bakterielle, virale und parasitäre Erreger sowie Pilze können in den verschiedenen Phasen der Post-Transplantationsperiode schwere, potentiell letale Infektionen hervorrufen. Die Empfänglichkeit für bestimmte Infektionskrankheiten wird bestimmt durch die Grunderkrankung und die Art der Vortherapie, durch das gewählte Transplantations- sowie Konditionierungsverfahren und durch den Grad der Übereinstimmung zwischen Patienten und Stammzellspender. Eine häufig nach allogener Stammzelltransplantation auftretende Infektion ist die CMV-Infektion, auf die im Weiteren genauer eingegangen wird.

1.2 Das humane Cytomegalievirus (HCMV)

1.2.1 Allgemeines

1945 wurde CMV erstmals in Mäusen isoliert (Smith 1954). Kurze Zeit später isolierten unabhängig voneinander drei Forschungsgruppen, geführt von Smith, Weller, Rowe und Kollegen das menschliche CMV (Craig et al. 1957; Rowe et al. 1956; Smith 1956). Das humane CMV (siehe Abb. 2) wurde von den menschlichen Speicheldrüsen gewonnen und der Ausdruck CMV wurde verwendet, um die Bezeichnung Speicheldrüsen-Virus oder cytomegalic inclusion disease virus zu ersetzen (Weller et al. 1960). Die erste Beschreibung einer erkannten CMV-Erkrankung in einem gesunden Menschen wurde 1965 dokumentiert (Klemola et al. 1965).

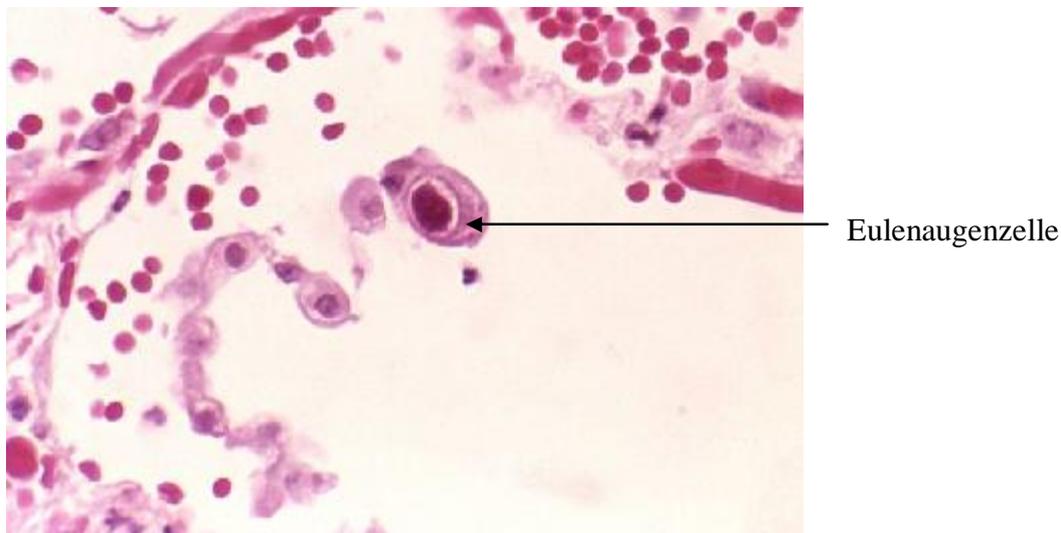


Abb. 2: CMV-Infektion in der Lunge. HE-Färbung (Ewing E., CDC Public Health Image Library, 1982) Dargestellt sind Pneumozyten, wobei die zentrale Zelle die für CMV typische, enorme Vergrößerung der Zelle wiedergibt. Aufgrund der intranukleären Einschlüsse bei HCMV-infizierten Zellen, den so genannten Eulenaugenzellen, wurde die Erkrankung früher als cytomegalic inclusion disease bezeichnet.

1.2.2 Virale Struktur des HCMV

Das CMV ist ein β -Herpes-Virus und das größte Virus, mit dem sich ein Mensch infizieren kann (siehe Abb. 3). Sein Genom kann 230 Proteine kodieren, viele von diesen spielen eine wichtige Rolle in der Verringerung der Immunantwort. Im infektiösen Virion wird die CMV Doppelstrang-DNA von einem Nucleoproteinkern umhüllt, der wiederum von Matrixproteinen und CMV pp65 Antigen umgeben wird. Dieses pp65 Antigen ist wichtig für die CMV-Diagnostik, da es mit Hilfe von Immunfluoreszenz, Immunoperoxidase und anderen Erkennungsmethoden leicht in den infizierten Zellen der Patienten erkannt wird (Shuster et al. 1985).

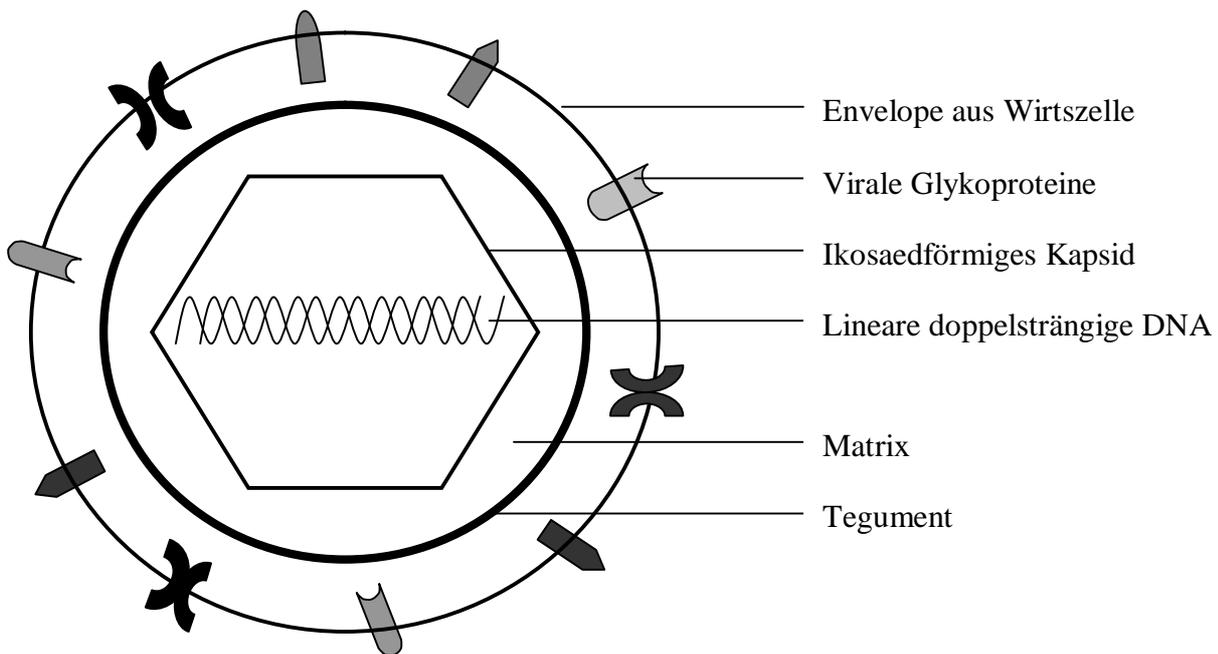


Abb. 3: Schematischer Aufbau CMV. Das Genom (lineare doppelsträngige DNA) wird von einem Kapsid (Ikosaeder) umschlossen, der wiederum von einer Matrix und Tegument umgeben wird. Die äußerste Schicht bildet eine Hülle (Envelope), die aus der Lipiddoppelschicht der Wirtszellmembran entstanden ist und auf der sich bis zu 60 verschiedene virale Glykoproteine befinden.

1.2.3 Epidemiologie und Pathogenese des HCMV

Die Übertragung des ubiquitär auftretenden CMV (Colimon et al. 1990) erfolgt durch Schmierinfektion oder direkten Kontakt mit infizierten Personen. Als Erregerreservoir dienen im wesentlichen Blut, Urin, Fäkalien, Speichel, zervikale und vaginale Sekrete, Sperma, Muttermilch und Tränen. Durchseuchungsgipfel treten im Kleinkindsalter durch Schmierinfektion und in der Adoleszenzphase durch beginnende Sexualaktivität auf.

60-70 % der U.S. Bevölkerung (Zhang et al. 1995) und fast 100 % in einigen Teilen Afrikas sind mit HCMV infiziert. Die Erkrankung variiert von inapparent, über das kongenitale HCMV-Syndrom bei Neugeborenen, was fatal verlaufen kann, bis hin zum infektiösen Mononukleose-Syndrom bei Erwachsenen. Bei immunsupprimierten Patienten, wie Lunge-, Leber-, Nieren- und Herztransplantatempfängern, führt CMV zu meist ausgeprägten und schweren Erkrankungssyndromen. CMV-Pneumonie ist eine lebensgefährliche Komplikation bei knochenmarktransplantierten Patienten nach Transplantation (Meyers et al. 1986). Bei Patienten mit AIDS ist CMV der häufigste virale Erreger und CMV-Retinitis die häufigste Nebenerkrankung, trotz der zur Verfügung stehenden antiviralen Therapie. (Masur et al. 1996).

Wie alle Herpesviren besitzt auch CMV die Fähigkeit, nach Erholung von einer akuten Infektion eine latente Infektion hervorzurufen. Der genaue Mechanismus, der die Latenz steuert, ist unklar, aber polymorphnukleare Zellen, T-Lymphozyten, endothelial vaskuläres Gewebe, renale Epithelzellen und Speicheldrüsen beherbergen wahrscheinlich das Virus in einer nichtreplizierenden oder langsam replizierenden Form. Zur Aktivierung aus dem latenten Zustand kann es nach Immunsuppression, anderen Erkrankungen oder Chemotherapeutikaeinnahme kommen (Ho 1995).

Man kann eine primäre von einer sekundären CMV-Infektion unterscheiden. Unter einer primären Infektion versteht man die Infektion seronegativer Patienten, die sich niemals zuvor mit CMV infiziert hatten. Die sekundäre Infektion ist die Aktivierung einer latenten Infektion oder Reinfektion bei einer seropositiven Person. Eine klinische CMV-Erkrankung kann aus einer primären und einer sekundären Infektion resultieren, wobei sich häufig bei einer primären Infektion das Virus mehr repliziert und die Krankheit schwerer ist. Kongenitale Infektionen des Neugeborenen in der mütterlichen Gebärmutter sind fast immer das Resultat einer Erstinfektion der Mutter während der Schwangerschaft (Griffiths et al. 1982).

Die Erstinfektion junger Erwachsener mit CMV kann zu einem infektiösen Mononukleose-Syndrom mit Fieber, Lymphadenopathie und relativer Lymphozytose führen. Es wird geschätzt, dass 79 % der infektiösen Mononukleose durch EBV verursacht wird und die restlichen 21 % durch akute CMV-Infektion (Klemola et al. 1970).

1.2.4 HCMV-assozierte-Erkrankungen

Eine Vielzahl von assoziierten Erkrankungen kann bei CMV-Infektion vorkommen. Zu diesen assoziierten Erkrankungen gehören interstitielle Pneumonie, Hepatitis, Guillain-Barré-Syndrom, Meningoenzephalitis, Myokarditis, Thrombozytopenie und hämolytische Anämie (die regelmäßig bei Kindern mit kongenitaler CMV-Erkrankung vorkommt und gelegentlich als Komplikation der CMV-Mononukleose bei gesunden Erwachsenen), sowie Hautausschlag (makulopapillär und rubelliform).

1.2.5 HCMV-Infektionen bei transplantierten Patienten

Nach Knochenmarktransplantationen und Organtransplantationen macht die starke immunsuppressive Therapie, die zur Prävention der Transplantatabstoßung verwendet wird, den Patienten empfänglich für schwerwiegende CMV-Erkrankungen. Bei den verschiedenen Transplantationsformen äußert sich die CMV-Erkrankung auf unterschiedliche Art und Weise.

Die Heftigkeit der End-Organ-Erkrankung, verursacht durch CMV, ist verbunden mit dem Grad der Immunsuppression. Desto stärker die Immunsuppression ist, wie sie zum Beispiel nach Knochenmarktransplantation benötigt wird, desto häufiger ist das Auftreten von Erkrankungen. Deshalb ist CMV-Pneumonie während der ersten 120 Tage nach Knochenmarktransplantationen um einiges schwerer und lebensbedrohlicher als bei Patienten nach Nierentransplantationen. Alle großen Transplantationen (Niere, Leber, Herz, Herz-Lunge und Knochenmark) sind assoziiert mit einem erhöhten Risiko an CMV-Erkrankung. In einer Zusammenfassung von 16 Studien mit 1276 Patienten wurde herausgefunden, dass die Infektionsrate nach Nierentransplantationen, gemessen mit Hilfe des serologischen Anstiegs von Antikörper gegen CMV oder Isolation des Virus in Blut, Urin oder im Hals, zwischen 59 % und 70 % lag, wobei die mittlere Rate 70 % betrug. Die Infektionsrate war signifikant höher unter den Empfängern, die vor der Organtransplantation seropositiv waren (84 %) und niedriger bei seronegativen Empfängern (52 %) (Ho 1991).

1.2.6 HCMV-Erkrankung bei Patienten nach Stammzelltransplantation

Patienten die vor Transplantation CMV negativ sind haben bei individuell angepasster Therapie ein geringeres Risiko an CMV zu erkranken (Bowden et al. 1995; Bowden et al. 1991b; Ljungman et al. 2002c). Dies bedeutet, dass möglichst ein seronegativer Spender gefunden werden sollte und alle Produkte, die der Patient vor Transplantation bekommt, sollten entweder ohne Leukozyten oder von CMV negativen Blutspendern stammen (Ljungman et al. 2004).

Eine zum Teil lebensgefährliche Infektionskomplikation nach allogener Knochenmarktransplantation ist die interstitielle Pneumonie infolge von CMV, welche oft innerhalb der ersten 120 Tage nach Transplantation auftritt. Diese Pneumonie zeigt oft ein eher interstitielles Muster als eine alveolare Erkrankung. Die CMV-Pneumonie fängt rasch an mit respiratorischen Beschwerden, die weniger als 2 Wochen dauern. Fieber, unproduktiver Husten und Dyspnoe, die zu Hypoxie führt, können in schweren Verläufen vorkommen. Diese Hypoxie erfordert manchmal eine assistierte Beatmung. Bei knochenmarktransplantierten Patienten hat die CMV-Erkrankung eine sehr hohe Mortalität zur Folge (in großen Gruppen bis 84 %) (Meyers et al. 1986). Es gibt Hinweise darauf, dass die Schwere der CMV-Pneumonien, die bei knochenmarktransplantierten Patienten beobachtet wurden, zum Teil eine Folge von Graft-versus-Host Reaktionen in der Lunge sein können. Berichtet wurde auch, dass Graft-versus-Host Erkrankungen häufiger bei CMV-Pneumonien (82 %) als ohne CMV-Pneumonien (27 %) vorkommen (Meyers et al. 1986).

1.2.7 HCMV-Diagnostik

Eine CMV-Infektion bzw. eine CMV-assoziierte Erkrankung lässt sich nach Isolierung des Virus aus der Kultur mit Hilfe serologischer und molekularbiologischer Methoden nachweisen. Der Kulturnachweis des Virus erfolgt mittels monoklonaler Antikörper (Gleaves et al. 1985). Mit dem ELISA ist ein serologisches Verfahren für den Nachweis einer CMV-Infektion vorhanden, indem IgM (bei akuter Infektion vorhanden) und IgG (welches nach Infektion zeitlebens nachweisbar ist) bestimmt werden.

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

Einige Studien haben gezeigt, dass das Screening mittels Bronchoalveolarlavage (BAL) eindeutige Hinweise auf die Entwicklung einer CMV-Pneumonie gibt (Schmidt et al. 1991). Aber seitdem die Blutuntersuchung einfacher geworden ist und eine Quantifizierung der Viruslast erlaubt, ist die Verwendung der BAL in den Hintergrund getreten (Ljungman et al. 2004).

1.2.8 Therapie der HCMV-Infektion

Für die passive Immunprophylaxe gibt es Immunglobuline mit CMV-spezifischen Antikörpern. Dadurch konnte bei der Organtransplantation die Schwere der Krankheit reduziert werden, die Erkrankung selbst aber nicht verhindert werden. Ausschlaggebend für die antivirale Wirkung ist ein ausreichend hoher Titer, der oftmals jedoch nicht erreicht wird (Bachmann et al. 1997). Aus diesem Grund wird heute die Gabe von Immunglobulinen zur Prävention von CMV-Infektion oder –Erkrankung nicht mehr empfohlen (Ljungman et al. 2004). Die kombinierte Gabe von Hyperimmunglobulinen und Ganciclovir führte zu einer Verminderung der Sterblichkeit bei der interstitiellen Pneumonie zum frühen Zeitpunkt, ohne dabei die insgesamt Überlebensrate wesentlich anheben zu können (Emanuel et al. 1988; Ljungman et al. 1992; Reed et al. 1988).

Bei dokumentiertem CMV-Nachweis bei Patienten nach allogener Stammzelltransplantation erfolgt die antivirale Therapie routinemäßig mit Ganciclovir oder Foscarnet. Ganciclovir ist ein CMV- bzw. Herpesvirusspezifischer Guanosin-Antimetabolit (Tyms et al., 1984), der nach Phosphorylierung durch virale Kinasen als Ganciclovir-Triphosphat in die virale DNA eingebaut wird und zum Abbruch oder einer deutlichen Beschränkung der viralen DNA-Elongation führt. Die dosislimitierende Toxizität von Ganciclovir besteht in der Induktion einer Myelosuppression. Diese kommt häufiger bei Knochenmarktransplantierten Patienten oder bei Patienten mit AIDS vor, als bei Organtransplantatempfängern (Bowden et al. 1987; Goodrich et al. 1991).

Seit Oktober 2001 ist Valganciclovir, ein Prodrug des Ganciclovirs, erhältlich. Im Organismus wird es rasch zu Ganciclovir hydrolysiert und im Unterschied zu Ganciclovir ist die orale Gabe möglich, da es maximale Konzentrationen zwischen 59-67 % der parenteral verabreichten Ganciclovirkonzentration erreichen kann.

Foscarnet ist ein weiteres antivirales Medikament, das im Unterschied zu Ganciclovir keine intrazelluläre Aktivierung durch virale Enzyme benötigt. Indikationen sind Unwirksamkeit oder Resistenz gegen Ganciclovir, Leuko- und/oder Thrombopenie und eine schwere CMV-Retinitis (Aschan et al. 1992; Bowden et al. 1991a). Die virusstatische Wirkung von Foscarnet beruht auf einer direkten allosterischen Hemmung viraler Enzyme wie der DNA-Polymerase und der Reversen Transkriptase. Foscarnet hat ein anderes Nebenwirkungsspektrum als Ganciclovir. Der Einsatz wird vor allem durch die Nephrotoxizität limitiert (Bregante et al. 2000).

Die antiviralen Therapeutika führen nicht immer zu einer vollständigen Eliminierung des Virus, so dass zunehmend Resistenzen gegen diese Virustatika auftreten (Alain et al. 1997; Bowen et al. 1998; Erice et al. 1997). Einige Studien konnten belegen, dass eine Kombinationstherapie aus Ganciclovir und Foscarnet Resistenzentwicklungen verhindern kann, ohne die Häufigkeit systemisch toxischer Reaktionen zu erhöhen (Bacigalupo et al. 1996; Jacobson et al. 1994; Manfredi et al. 1996).

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

Die Notwendigkeit, Strategien zur Prävention der CMV-Erkrankung zu finden, resultiert in einem neuen Syndrom, das late-onset CMV-Erkrankung genannt wird und in vielen Fällen Infektionen mit Ganciclovir-resistenten mutierten Viren beinhaltet (Krause et al. 1997; Winston et al. 2003). Ganciclovir-Therapie, GvHD und ihre Behandlung kann die Wiederherstellung der CMV-spezifischen T-Zell-Immunität nach Knochenmarkstransplantation verzögern. Dieses CMV-spezifische Immundefizit kann nach der Beendigung der Ganciclovir-Therapie persistieren. Die kontinuierliche Detektion von CMV pp65-Antigen, CMV-DNA im Plasma oder peripheren Blutzellen und einer Lymphopenie, die 3 Monate nach der Ganciclovir-Präventionstherapie beobachtet werden, sind starke Vorzeichen einer späten CMV-Erkrankung und eines fulminanten Verlaufes (Winston et al. 2003). Die späte CMV-Erkrankung entwickelte sich im Mittel 146 Tage nach Knochenmarkstransplantation in 18 % von 146 Patienten mit einer Mortalität von 46 %. Präventive Messungen zur Verhinderung später CMV-Erkrankung sollte bei Patienten erfolgen, bei denen CMV innerhalb der ersten 3 Monate nach Transplantation reaktiviert wurde, genauso wie bei Patienten mit niedrigem CMV-spezifischer Immunität und niedriger CD4-Zellzahl.

In randomisierten Studien konnte gezeigt werden, dass sowohl Acyclovir als auch Valganciclovir als antivirale Chemoprophylaxe das Risiko einer CMV-Infektion reduzieren, aber nicht das einer -Erkrankung (Ljungman et al. 2002a; Prentice et al. 1994).

1.2.9 Immunantwort gegen HCMV

CTLs stellen die wichtigste Komponente der Immunantwort gegen HCMV dar. Bei Transplantationspatienten korreliert ihr Vorkommen direkt mit einem positiven klinischen Verlauf (Ljungman et al. 1985; Reusser et al. 1991). Nach Transplantation reduziert ein adoptiver Immuntransfer mit CMV-spezifischen-CTLs signifikant die Inzidenz schwerer CMV-Infektionen (Riddell et al. 1992; Walter et al. 1995). Als Hauptziel der HCMV-spezifischen CTL-Antwort konnte das Phosphoprotein pp65 identifiziert werden (Longmate et al. 2001; McLaughlin-Taylor et al. 1994; Wills et al. 1996). Die meisten HCMV-Peptid-Epitope, die mittels Klonierungs-Technik (Diamond et al. 1997; Longmate et al. 2001; Wills et al. 1996) oder mittels MHC-Klasse-I Epitop-Vorhersage (Solache et al. 1999) definiert wurden, stammen aus pp65. Zum zellulären Teil der CMV-Immunantwort gehören des Weiteren die NK-Zellen. Diese bieten den ersten Schutz bei der Virusinfektion, indem sie infizierte Zellen lysieren und das antivirale Zytokin IFN- γ sezernieren (Kos et al. 1996).

CMV ist in der Lage, die Expression der MHC-Klasse-I Moleküle der infizierten Zellen zu vermindern. Dies erkennen die NK-Zellen und zerstören diese Zelle daraufhin.

1.2.10 Adoptive Immuntherapie der HCMV-Infektion

Trotz Einführung neuer antiviraler Therapiestrategien stellt die CMV-Infektion bzw. -Erkrankung noch immer eine der Haupttodesursachen für Patienten nach allogener Stammzelltransplantation dar (Einsele et al. 1995; Einsele et al. 2000; Ljungman et al. 1992). Aufgrund der sich häufenden Berichte über Virustatika-resistenten CMV-Isolate nach Stammzelltransplantation und da die Virustatikatherapie zusätzlich mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist, wird intensiv nach Alternativen zur Behandlung und Prävention der CMV-Erkrankung gesucht. Die adoptive Immuntherapie stellt eine solche Alternative dar, indem CMV-spezifische Zellen des Spenders auf den Empfänger übertragen werden. Es wurde beobachtet, dass eine fehlende Rekonstitution der CMV-spezifischen Immunantwort nach allogener Stammzelltransplantation entscheidend für die Entwicklung einer CMV-Erkrankung ist (Krause et al. 1997; Ljungman et al. 1985; Reusser et al. 1991; Walter et al. 1995). Transplantatempfängern konnte eine schützende CMV-spezifische T-Zell-Immunität übertragen werden, wenn den Patienten ex vivo generierte, CMV-spezifische T-Zellen des Spenders infundiert wurden (Einsele et al. 2002; Riddell et al. 1992; Walter et al. 1995).

Verschiedene Strategien zur Generierung CMV-spezifischer T-Zellen sind beschrieben worden, wobei die ex vivo Induktion CMV-spezifischer CTLs mittels CMV-infizierter autologer Fibroblasten als Stimulatorzellen (Walter et al. 1995) oder EBV-infizierter LCLs als Feederzellen (Szmania et al. 2001) erfolgreich war. Für den klinischen Einsatz sind diese Methoden jedoch ungeeignet, da die Anwesenheit von CMV- oder EBV-Viren ein nicht zu unterschätzendes Infektionsrisiko darstellt. Die Induktion CMV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe dendritischer Zellen ex vivo, die entweder mit CMV-Peptiden (Kleihauer et al. 2001; Szmania et al. 2001; Vannucchi et al. 2001) oder mit CMV-Antigen (Einsele et al. 2002; Peggs et al. 2001) gepulst werden, ist ebenfalls erfolgsversprechend. Der Nachteil hierbei liegt jedoch in der arbeitsintensiven und sehr zeitaufwendigen in vitro Expansion über mehrere Wochen.

Für eine lang andauernde Persistenz transferierter CD8⁺ T-Zellen scheint die zusätzliche Anwesenheit von CD4⁺ T-Helferzellen wichtig zu sein. Denn diese senden Wachstumsfaktoren aus, wie z.B. Interleukin 2 oder vermitteln kostimulierende Signale, z.B. über CD40/CD40L, was wiederum die Antigenpräsentation und die kostimulatorische Kapazität von APCs deutlich erhöht (Sarawar et al. 2001; Schoenberger et al. 1998). Es konnte gezeigt werden, dass eine

Abnahme der CMV-Antwort der infundierten zytotoxischen T-Zellen vor allem bei den Patienten auftrat, die keine CMV-spezifische CD4⁺ T-Helfer Antwort hatten (Walter et al. 1995). Darüber hinaus konnte demonstriert werden, dass das Auftreten einer T-Helfer Antwort nach Infusion einher ging mit einer anhaltenden oder zunehmenden CMV-Antwort der zytotoxischen T-Zellen (Heslop et al. 1996; Walter et al. 1995). Der Transfer von ausschließlich CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen konnte zwar eine Expansion CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen induzieren, aber nur bei den Patienten, bei denen Vorläuferzellen vorhanden waren (Einsele et al. 2002).

2 Zielsetzung der Arbeit

CMV-Erkrankung bei Knochenmarktransplantierten Patienten hat eine Mortalität mit bis zu 84 % zur Folge. Die häufigste lebensgefährliche Infektionskomplikation bei allogener Knochenmarktransplantation ist die interstitielle Pneumonie verursacht durch CMV (Meyers et al. 1986). Zurzeit gibt es mehrere Therapieoptionen, die aber alle mit Nachteilen und Einschränkungen verbunden sind. So konnte die Gabe von Immunglobuline mit CMV-spezifischen Antikörpern zur passiven Immunprophylaxe zwar die Schwere der Krankheit reduzieren, aber die Erkrankung nicht verhindern (Bachmann et al. 1997). Bei kombinierter Gabe von Hyperimmunglobulin und Ganciclovir ist auf lange Sicht die Überlebensrate gering (Emanuel et al. 1988; Ljungman et al. 1992; Reed et al. 1988) und bei antiviraler Therapie mit Ganciclovir, Valganciclovir, Foscarnet und Cidofovir limitieren Nebenwirkungen und zunehmende Resistenzen den Einsatz (Alain et al. 1997; Aschan et al. 1992; Bregante et al. 2000; Erice et al. 1997; Goodrich et al. 1991; Ljungman et al. 2001).

Aus diesem Grund scheint die adoptive Immuntherapie mit Übertragung CMV-spezifischer Spender-T-Zellen auf den Empfänger eine gute Alternative für die Therapie von CMV-Erkrankungen nach Knochenmarkstransplantationen zu sein. Bisher gelang die Generierung CMV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe von ex vivo Induktion CMV-spezifischer CTLs mittels CMV-infizierter autologer Fibroblasten als Stimulator-Zellen (Walter et al. 1995) oder EBV-infizierter LCLs als Feeder-Zellen (Szmania et al. 2001). Auch die ex-vivo Induktion CMV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe dendritischer Zellen, die entweder mit CMV-Peptiden (Kleihauer et al. 2001; Szmania et al. 2001; Vannucchi et al. 2001), oder mit CMV-Antigen (Einsele et al. 2002; Peggs et al. 2001) gepulst werden, ist erfolgsversprechend. Da dabei aber entweder infektiöses Material (z.B. Virus) benötigt wurde oder eine arbeitsintensive und sehr zeitaufwendige ex vivo Expansion über mehrere Wochen nötig war, galt es neue und bessere Methoden zur Generierung CMV-spezifischen T-Lymphozyten zu finden.

In Vorexperimenten wurde bereits versucht, CMV-spezifische T-Zellen aus Vollblut zu extrahieren, zu kultivieren und anschließend auf ihre Funktionalität zu prüfen (Griesche 2005). Dabei stellte sich heraus, dass bei Simulieren der klinischen Realität das Maximum an Zellen, das man von einem Fremdspender bekommen kann, nicht ausreicht. Daraus folgt, dass man den Spendern zusätzlich Blut oder eben Stammzellapheresat entnehmen muss.

Im klinischen Alltag ist es schwer, im Nachhinein von einem nicht verwandten Spender eine ausreichende Menge Blut zu erhalten, denn der Spender hat schon einmal gespendet. Es bedeutet

einen großen logistischen Aufwand, den Spender ein zweites Mal zu aktivieren und außerdem vergeht einige Zeit, ehe die erneute Blutspende beim Patienten ankommt. Aber von fast allen Stammzellprodukten, besonders bei Kindern, sind überschüssige Stammzellen vorhanden, die eingefroren werden und bei Bedarf unmittelbar zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund wäre es günstig, wenn man die zur Verfügung stehende Stammzellapherese verwenden könnte.

Es wurde aber mehrfach berichtet, dass es bei Stammzellapherese die Antigenpräsentation abnimmt und es zum so genannten Th1/Th2 shift kommt. So beschreibt Rondelli et al., dass es zu einer signifikanten Reduktion von CD14+-Monozyten in G-CSF mobilisierten Stammzellapherese im Vergleich zu unbehandelten Zellen kommt und Sloand et al. fand heraus, dass mit G-CSF stimulierte CD4+-Zellen einen signifikanten Unterschied in der Zytokindetektion zeigen. Durch die Gabe von G-CSF wurde eine abnehmende IL-4 und eine erhöhte IFN- γ Expression beobachtet, was wiederum in einem abnehmen Th1/Th2 Verhältnis resultiert (Rondelli et al. 1998; Sloand et al. 2000).

Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob es überhaupt möglich ist, aus kryokonservierten Stammzellapheresaten CMV-spezifische T-Lymphozyten in ausreichender Menge und Qualität zu gewinnen. Dabei sollten die generierten CMV-spezifischen T-Zellen sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Lymphozyten enthalten, die Generierung sollte kein infektiöses Material (z.B. Virus) erfordern und GMP-Kriterien (gute Herstellungspraxis) sollten erfüllt werden können.

Für die Überprüfung der Funktionalität der Zellen sollen verschiedene Versuchsanordnungen angewendet werden. Mit Hilfe des Zytokinnachweis und des Elispot soll gezeigt werden, dass CMV-spezifische T-Zellen vorhanden sind. Der Zytotoxizitätsassay soll zur Bestätigung dienen, dass die CMV-spezifischen, selektierten und kultivierten Zellen in der Lage sind, CMV-infizierte Zelllinien zu lysieren. Durch die MLR soll nachgewiesen werden, dass die Aktivität CMV-spezifischer T-Zellen nach 21-tägiger Kultur gegen körperfremde, nicht CMV-spezifische Zellen verringert ist.

3 Materialien

3.1 Geräte

Bestrahlungsmaschine	Gammacell 3000 ELAN	MDS Nordion, Ottawa, ON, Canada
Zentrifuge	Rotanta 460 R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen
FACS-Calibur		BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Freezing Container "Mr Frosty"		Nalge, Sigma-Aldrich, Stockholm, Schweden
MACS Mix		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Milli-Q Plus 185		Millipore, Billerica, MA, USA
Neubauer-Zählkammer		VWR
Steri-Cycle CO ₂ Inkubator		Thermo Fisher Scientific, Inc., Marietta, OH, USA
Mikroskop	Olympus CK2	LRI Instrument AB, Lund, Schweden
Laminar Flow	danLAF®-o-matic VFRS 1206	danLAF, Claus Damm, Humlebæk, Dänemark
Kühlschrank und Gefrierschrank	Husqvarna Topas	Husqvarna, Stockholm, Schweden
Eppendorf- Multipipette		Eppendorf AG, Hamburg
Pipettboy		Eppendorf AG, Hamburg

3.2 Plastik- und Glaswaren

24-Wellplate	Falcon Multiwell 24 Well	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
96-Wellplate	Falcon Microtest U-Boden	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
150 ml Bottle Top Vacuum Filter		Corning Incorporated, Corning, NY, USA
96-well Microplate	Schwarz, transparenter, flacher Boden	Nunc, Roskilde, Dänemark
Combitips plus	5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkulturflaschen	50, 250 ml Flasche	BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA
FACS tube	5 ml Rundboden, PS	BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, MA, USA

Glasflasche	250, 500, 1000 ml	DURAN Group GmbH, Mainz
Kryovials	1,5 ml	Nalge, Sigma-Aldrich, Stockholm, Schweden
Pipettenspitzen	20, 100 µl und 1 ml	Sarstedt, Nürnberg
Serologische Pipetten	5, 10, 25 ml	Sarstedt, Nürnberg
Steriles Spritzenfilter	0,2 µm	Pall Life Science, New York, NY, USA
Einweg-Pasteurpipette	3,5 ml	Sarstedt, Nürnberg
Zentrifugenröhrchen	15, 50 ml PP	Sarstedt, Nürnberg

3.3 Reagenzien und Chemikalien

Antibiotic antimycotic solution (100x) stabilised	10.000 units penicillin/ml 10 mg streptomycin/ml 25 µg amphotericin/ml	Sigma-Aldrich, Steinheim
Beriglobin	160 mg/ml	Aventis Behring GmbH, Marburg
Brefeldin A		Sigma-Aldrich, Steinheim
CFSE	CFDA Stammlösung 5mmol	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Clini MACS PBS/EDTA Buffer		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
DMSO	Hybri-Max	Sigma-Aldrich, Steinheim
Deoxyribonuclease I	Rinderpankreas	Calbiochem, Merck KgaA, Darmstadt
EDTA Dinatriumsalz	Titriplex	Merck KgaA, Darmstadt
Ethanol		Apotheket Lunds Universität Sjukhuset, Lund, Schweden
FACS Lyse-Lösung		BD Bioscience, San Jose, CA, USA
FACS Permeabilisierungslösung		BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Heparin	Heparin Sodium Injection B.P.	Leo Pharm Inc., Thornhill, ON, Kanada
Kiovig	human IgG, 100 mg/ml	Baxter AG, Wien, Österreich
Lymphoprep		Fresenius Kabe Norge AS for Axis-Shield POCAs, Oslo, Norwegen
Lymphocyte		PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

Magnesiumchlorid		Merck KgaA, Darmstadt
Mikroskopische Türks Lösung		Merck KgaA, Darmstadt
Natriumazid	Stammlösung: 20% (w/v) in PBS	Sigma-Aldrich, Stockholm, Schweden
BD Pharm Lyse	Ammonium Chloride Lysing Reagent	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA
PI-Stammlösung	Stammlösung: 1 mg/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Steinheim
PBS (Dulbecco´s Phosphat Buffered Saline)	Ohne Mg & Ca	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Steriles Wasser		Fresenius Kabe Norge AS, Halden, Norwegen
Trypanblau	0,4%	Invitrogen Corporation, Karlsruhe

3.4 Seren

BSA		Sigma-Aldrich, Stockholm, Schweden
Human Albumin Behring	200 mg/ml steril	Aventis Behring, Marburg
Humanserum AB (off the clot)	Anti-HIV 1&2 neg., HBs Ag neg., Endotoxinfrei, steril filtriert	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Humanplasma AB		Blutbank, Universitäts-krankenhaus Lund, Schweden

3.5 Kulturmedien

RPMI 1640		Invitrogen (Gibco), Paisley, Großbritannien
X-vivo 15		BioWhittaker, Walkersville, MD, USA

3.6 Zytokine

Proleukin	Interleukin 2, 18x10 ⁶ IE/IU	Chiron, Amsterdam, Niederlande
Rh IL-7	Interleukin 7, rekombinant human, von <i>E. coli</i>	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
Rh IL-15	Interleukin 15, rekombinant human, von <i>E. coli</i>	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA

3.7 FACS-Antikörper

Anti-human IFN- γ	APC	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA
Anti-human IFN- γ	PE	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA
Anti-human CD4	APC	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Anti-human CD4	PerCP-Cy 5.5	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Anti-human CD8	APC	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Anti-human CD8	PE	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Anti-human CD8	PerCP-Cy 5.5	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Anti-human CD14	PerCP	BD Bioscience, San Jose, CA, USA
Anti-human CD69	FITC	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA
Anti-human CD69	PE	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA
ChromPure Mouse IgG	Gesamtes Molekül	Jackson ImmunoResearch, Hamburg

3.8 Produkte für die Zellseparation

IFN- γ Secretion Assay Cell Enrichment and Detection Kit (PE)	IFN- γ Catch Reagent IFN- γ Detection Antibody (PE) Anti-PE Micro Beads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Large Scale IFN- γ Secretion Assay Enrichment Kit (human)	IFN- γ Catchmatrix Reagent IFN- γ Enrichment Reagent IFN- γ Detection Antibody	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Seperator		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
MACS Column MS		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

3.9 Produkte für ELISpot

Human IFN- γ -KIT	Human IFN- γ Microplate Detection Antibody Concentrate Streptavidin-AP Concentrate A Dilution Buffer 1 Dilution Buffer 2 Wash Buffer Concentrate BCIP/NBT Chromogen	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
--------------------------	--	--

3.10 Produkte für MLR

Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence)-Kit	BrdU labelling reagent FixDenat Anti-BrdU-POD Antibody dilution solution Washing buffer Substrate component A Substrate component B	Roche, Penzberg
---	--	-----------------

3.11 Produkte für Zytotoxizitätsassay

7-AAD	10 μ g/ml in PBS	Sigma-Aldrich, Stockholm, Schweden
PKH26 labeling kit	Diluent "C" PKH26	Sigma, Saint-Louis, MO, USA
AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I	AnnexinV-FITC Binding Buffer	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA

3.12 Peptide

CMV pp65	Recombinant Protein human Cytomegalovirus	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
Human CMV pp65		Bachem, Bubendorf, Schweiz
PepTivator-CMV pp65		Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

3.13 Virus-Lysat

Cytomegalovirus Ag (AD 169) Lysat		Biodesign International, Saco, Maine, USA
--------------------------------------	--	--

3.14 Positivkontrolle

Staphylococcal Enterotoxin B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
------------------------------	---

3.15 Kostimulation

Anti-human CD28	BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA
-----------------	---

3.16 T2-Zelllinie

Die T2 Zelllinie ist eine Variante der T1 Zelllinie, die durch Selektion des SFR1-MI.3 monoklonalen Antikörpers (gegen eine monomorphe Determinante von HLA DR) geschaffen wurde. Die Zellen exprimieren kein HLA DR und sind MHC-Klasse-II-Antigen negativ. Sie synthetisieren HLA B5, exprimieren es aber nicht. Dadurch ist die Zelllinie zum Studieren von Antigenverarbeitung und T-Zellerkennung von MHC-Klasse-I-Antigenen verwendbar (Salter RD, et al., 1985). Da sie aber nur HLA A2 exprimiert, konnten für diesen Versuch auch nur die Spender verwendet werden, die HLA A2 positiv waren.

Die T2-Zelllinie wurde von John Campbell, Miltenyi Biotec, UK, zur Verfügung gestellt.

4 Methoden

4.1 Blut-/Stammzellapheresatprobengewinnung

Zum Etablieren des Zytokinnachweises (Cytokin Detection) wurden in Vorexperimenten 14 gesunde Personen auf ihren CMV-Status untersucht. Zu diesem Zweck wurde von allen Personen 6 ml Vollblut entnommen, ein Zytokinnachweis (siehe unten) durchgeführt, wobei als Testreagenz CMV pp65 verwendet wurde, und die Proben anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

Die Gewinnung der weiteren Blut- und Stammzellapheresatproben erfolgte nach vorheriger Einverständniserklärung der Spender im Rahmen einer Blut- bzw. Stammzellapheresespende für die allogene Stammzelltransplantation. Bei den Spendern handelt es sich um nächste Angehörige eines Leukämiepatienten.

4.2 Vorbehandlung der Proben und Einfrieren

12-36 ml Blut der Spender im EDTA-Röhrchen wurde im Labor ficollisiert und die MNC gewaschen. Dazu wurde das Blut im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt, dann in einem 50 ml Tube vorsichtig auf 15 ml Lymphoprep geschichtet und durch 35-minütige Zentrifugation bei $400\times g$ und Raumtemperatur (RT) erfolgte die Trennung der Blutbestandteile in verschiedene Schichten. Je nach ihrer Dichte wandern die Zellen bis zu der Stelle, an der ihre Dichte der Dichte des Gradienten entspricht. An diesen Stellen bilden sich Schichten aus, da die Zellen dort verbleiben. Es bilden sich vier Schichten aus. Zuerst befindet sich das Plasma, danach folgt ein dünner Ring, die so genannte Interphase, die Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten enthält. In der Ficollschicht darunter sammeln sich die Granulozyten und die unterste Schicht bilden die Erythrozyten. Es wurde vorsichtig die Interphase abgenommen und die in dieser Phase enthaltenen Zellen wurden noch zweimal für 10 Minuten bei $300\times g$ und RT gewaschen, um die Reste der Ficoll-Lösung zu entfernen. Mit einem weiteren Zentrifugationsschritt bei $200\times g$ für 10 Minuten wurden die Thrombozyten entfernt. Die Zellsuspension wurde in PBS resuspendiert und nach der Zellzählung mit Einfrierlösung, die DMSO (15 %), HSA (8 %), Heparin (20 I.U./ml) und PBS enthielt, 1:1 verdünnt und je 1 ml pro Kryovial im Freezing Container in einen -80°C Kühlschrank gestellt und später in den Stickstofftank überführt. Von dem Stammzellapheresat wurden ebenfalls kurz nach der Spende etwa 5 ml für die Forschung abgenommen. Im Labor wurde im Gegensatz zur Blutprobe nur die Zellzahl ermittelt und dann

direkt das Stammzellapheresat ohne weitere Separationsschritte eingefroren (ohne Zugabe von Heparin zur Einfrierlösung, da das Stammzellapheresat bereits heparinisiert ist).

4.3 Zellzahlbestimmung

Um die Anzahl der kernhaltigen Zellen zu bestimmen, wurden 10 µl der Zellsuspension abpipettiert und mit 90 µl Türks-Lösung versetzt. Dies bewirkte eine Lyse der verbliebenen Erythrozyten. Außerdem wurden, um den Anteil der toten Zellen zu ermitteln, 10 µl der Zellsuspension mit 90 µl Trypan Blau verdünnt, da Trypan Blau die toten Zellen im Gegensatz zu den lebenden Zellen blau anfärbt. Anschließend erfolgte die Zählung in einer Neubauer-Kammer.

4.4 Auftauen der Proben

Die Kryovials mit den Blut- und Stammzellapheresatproben wurden nach der Entnahme aus dem Stickstofftank unter der Laminarbank geöffnet und durch Zugabe der Auftaulösung, die aus PBS, 2 % igem HSA, MgCl₂ (2,5 mMol/l), und DNase (100 Kunitz Units/ml) bestand, möglichst schnell in ein 50 ml Tube überführt und anschließend bei 300×g, 10 Minuten, RT und geringer Beschleunigung und Bremse zentrifugiert. Der Schritt wurde wiederholt, die Zellsuspension in RPMI 1640 + 10 % AB Serum und DNase (50 Kunitz Units/ml) gelöst und anschließend erfolgte eine Zellzählung. Die Zugabe von DNase hat sich als hilfreich erwiesen, da in mehreren Versuchen nachgewiesen werden konnte, dass sich im Vergleich zum Versuch ohne Zugabe von DNase eine sauberere Zellsuspension ergab. Dies ergibt sich dadurch, dass DNase bei Zugabe von MgCl₂ durch die Anwesenheit der Magnesiumionen jeden DNA-Strang unabhängig bearbeitet und die spaltenden Seiten zufällig wählt (Weir 1993). Somit kann die DNA von toten oder beschädigten Zellen abgebaut werden.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit RPMI 1640 + 10 % AB Serum und DNase (50 Kunitz Units/ml) auf ein Verhältnis von höchstens 1×10^7 Zellen/ml verdünnt und je nach Zellzahl in 50 ml oder 250 ml Falconflaschen gefüllt und über Nacht in einen Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ gestellt.

4.5 Vorbereitung zum Zytokinnachweis (Ficoll und Thrombozytenwasch)

Am nächsten Morgen wurde das Stammzellapheresat aus dem Inkubator geholt, PBS/EDTA (20 mM) dazugegeben, so dass eine Endkonzentration von 2 mM/ml entstand, und 10 Minuten inkubiert, damit sich die adhärenen Zellen ablösen. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und die Flasche mehrmals mit PBS gespült, so dass am Ende die Zellsuspension in etwa 30 ml PBS vorlag. Diese Zelllösung wurde auf 15 ml Lymphoprep vorsichtig geschichtet und wie bei den Blutproben ein Ficoll mit anschließendem Waschen sowie Entfernung der Thrombozyten begonnen. Die mononukleären Zellen, die nach dieser Prozedur noch übrig sind, wurden mit RPMI 1640 + 10 % AB Serum aufgefüllt und zu gleichen Teilen auf 8 FACS-Tubes verteilt.

Die bereits ficollisierten Blutproben wurden nach der Entnahme aus dem Inkubator ebenfalls mit PBS/EDTA (20 mM) inkubiert und anschließend die Flaschen mit PBS gespült. Die somit in PBS gelöste Zellsuspension wurde runterzentrifugiert und in RPMI 1640 + 10 % AB Serum resuspendiert. Daraufhin wurde zu je vier FACS-Tubes, die mit ficollisiertem Stammzellapheresat des entsprechenden Spenders gefüllt waren, dieses ficollisierte periphere Blut dazugegeben und mit dem Zytokinnachweis gestartet.

4.6 Zytokinnachweis

Bei diesem Versuch wurde, modifiziert nach dem Protokoll von BD Biosciences (BD Biosciences 2002a), zu vier FACS-Tubes mit Zellsuspension je 5 µl αCD28 (0,2 mg/ml) zur Kostimulation zugegeben.

- Ein Tube wurde als Negativkontrolle verwendet, dem nichts weiter hinzugefügt wurde
- Ein weiteres als Positivkontrolle, zu dem 10 µl SEB (0,1 mg/ml) gegeben wurden
- Zum dritten Tube als Testreagenz wurden 10 µl CMV pp65 (5 mg/ml) dazu gegeben
- Und zum vierten Tube 25 µl CMV Lysat (0,2 mg/ml).

Die Proben wurden mit leicht gelöstem Deckel für 2 Stunden bei 37°C, 5 % CO₂ im 45°Winkel im Brutschrank inkubiert. Nach 2 Stunden wurden die Proben aus dem Inkubator geholt, je Tube 2 µl Brefeldin A (5 µg/µl in DMSO) dazugegeben und für 4 Stunden weiter inkubiert. Brefeldin A diente als Inhibitor, der die Sekretion der Proteine, in diesem Fall IFN-γ, vom Golgi-Apparat in die Umgebung blockiert. Dieser Schritt erhöht die Konzentration von IFN-γ in der Zelle und macht sie dadurch detektierbar. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden in jedes Tube PBS/EDTA (20 mM) gegeben, 10 Minuten bei RT inkubiert und darauf folgend 3 ml

Lysispuffer-Gebrauchslösung zu jeder Probe gegeben. Nach erneuter Inkubation wurde 10 Minuten bei 500×g und RT zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben dekantiert, in jeweils 400 µl Permeabilisierungspuffer PERM2 resuspendiert und nach 10-minütiger Inkubation bei RT wurden 4 ml FACS-Puffer, bestehend aus 0,1 % BSA-Stammlösung und 0,1 % Natriumazid-Stammlösung in PBS, in jedes Tube gegeben. Es folgte ein nochmaliges Zentrifugieren, Dekantieren und anschließendes Resuspendieren in 1ml FACS-Puffer, um die Proben über Nacht im Kühlschrank bei 4°C lagern zu können.

Am darauf folgenden Tag wurden die Proben bei 500×g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Nach der Dekantierung wurde zu jedem Tube entsprechend der Anzahl der unterschiedlichen FACS-Färbungen je 60 µl Beriglobin Waschpuffer Gebrauchslösung dazugegeben. Anschließend wurden zu den Kompensationsröhrchen je 10 µl (1:5 mit FACS-Puffer verdünnt) Isotyp dazugegeben und ansonsten je 5 µl Antikörper entsprechend des FACS-Protokolls (siehe Tab. 1). Die Inkubation erfolgte, da es sich um eine intrazelluläre Färbung handelte, für 30 Minuten bei 4°C im Kühlschrank. Nach dieser Inkubationszeit wurde zu jedem Tube 2 ml FACS-Puffer dazugegeben und erneut zentrifugiert, anschließend 300 µl FACS-Puffer in jedes FACS-Tube gegeben und mit der durchflusszytometrischen Messung am FACS-Gerät begonnen (siehe Abb. 4).

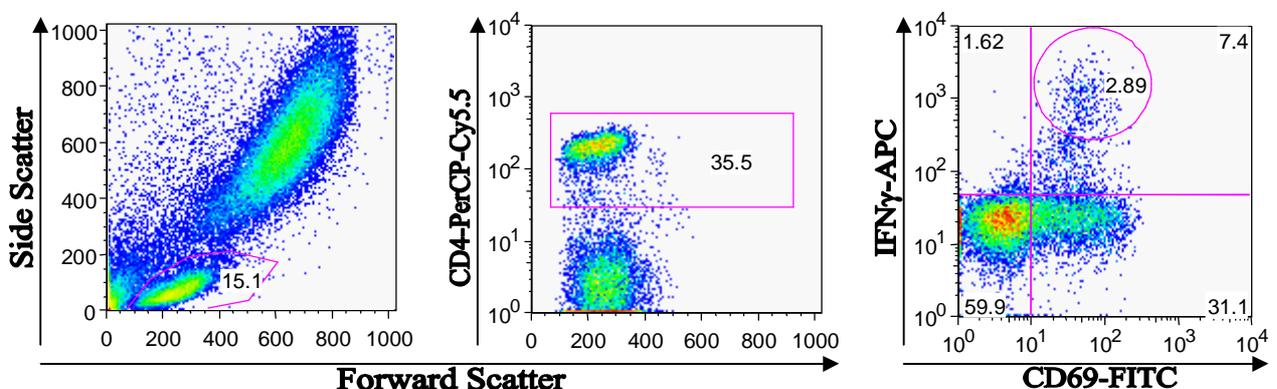


Abb. 4: Bilder der Durchflusszytometrischen Messung beim Zytokinnachweis Zu sehen sind von links nach rechts das Eingrenzen der Lymphozytenpopulation, der CD4⁺-Lymphozyten und von diesen wiederum die IFN-γ/CD69 doppelt positiven Zellen.

Tab. 1: FACS-Protokoll-Antikörper Aufgeführt sind die einzelnen Antikörper, mit denen bei den Versuchen gearbeitet wurde. Von allen Antikörpern wurden 5 µl zugegeben (bis auf IFN-γ-PE beim IFN-γ Sekretionsassay im Großmaßstab, wo 10 µl Antikörper eingesetzt wurden) und von den entsprechenden Isotypen jeweils 10 µl zu den Proben gegeben.

Versuch	FITC	PE	3. Farbe	4. Farbe
Zytokinnachweis vor der Kultur	CD69	CD8	PerCP-Cy5.5 CD4	APC-IFN-γ
Zytokinnachweis nach Kultur	CFDA	CD69	PerCP-Cy5.5 CD4 bzw. CD8	APC-IFN-γ
IFN-γ Sekretionsassay	CD69	IFN-γ	PerCP CD14 + PI	APC-CD4 bzw. CD8
Zytotoxizitätsassay	AnnexinV	PKH 26	7AAD	
Proliferationsassay	CFDA	PKH 26	PerCP-Cy5.5 CD4	APC-CD8

4.7 IFN-γ Sekretionsassay

Ficollisiertes Stammzellapheresat wurde nach dem abgewandelten Protokoll von Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec) so in RPMI 1640 + 10 % AB Serum aufgenommen, dass sich eine Konzentration von ca. 1×10^7 Zellen/ml ergab. Von dieser Zellsuspension wurde je 1 ml in ein Well einer 24 Well-Platte pipettiert. Zu allen Wells wurden je 5 µl αCD28 zur Kostimulation dazugegeben.

- Ein Well wurde als Negativkontrolle verwendet, diesem wurde nichts weiter hinzugefügt
- Ein weiteres als Positivkontrolle, zu dem 10 µl SEB gegeben wurden
- Zu den restlichen mit Zellsuspension gefüllten Wells wurde als Testreagenz 10 µl CMV pp65 hinzugegeben.

Die 24 Well-Platte wurde zur Stimulation für 16 Stunden über Nacht in einen Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ gestellt. Nach dieser Stimulationsphase wurde zu jedem Well 100 µl PBS/EDTA (20 mM) dazugegeben und 10 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde jedes Well in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und die Wells mit 4°C kaltem Puffer (0,5 % BSA und 2mM EDTA in PBS entgast mit Bottle Top Filter in einer Glasflasche) gespült. Nach der weiteren Zugabe von kaltem Puffer, so dass sich 10 ml kalter Puffer/ 1×10^7 Zellen je 50 ml Falcon-Tube befanden, erfolgte eine Zentrifugation bei 400×g, 10 Minuten und 4°C. Resuspendiert wurde in 80 µl

kaltem Medium (RPMI 1640 + 10 % AB Serum), 2 μ l Beriglobin und 10 μ l IgG Mouse. Die Zugabe von IgG Mouse hat sich als sinnvoll herausgestellt, weil dadurch die unspezifische Bindung vor der FACS Analyse geblockt wird. Damit diese Reagenzien wirken konnten, wurden erst nach einer 3-minütigen Inkubationszeit 20 μ l Catch Reagent (Fang Reagenz, wird so genannt, weil es eine Fangmatrix auf der Zelloberfläche bildet, die dann während der Sekretionsphase die von den Zellen sezernierten IFN- γ -Moleküle „einfängt“) zu jedem Tube gegeben und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die so genannte Sekretionsphase gestartet, indem 40 ml 37°C warmes RPMI 1640 + 5 % AB Serum zu jedem Tube zugegeben wurde und die Tubes, im MACS Mix auf mittlerer Stufe rotierend, im Inkubator 45 Minuten bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert wurden. Diese Sekretionsphase wurde durch Zugabe von kaltem Puffer im Verhältnis von mindestens 1:3 gestoppt und mit den Proben auf Eis weiter gearbeitet, um eine Sekretion während der folgenden Schritte zu verhindern. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 400 \times g, 10 Minuten und 4°C wurden die Zellen in 80 μ l kaltem Puffer, 20 μ l IFN- γ -Detection Antibody, sowie 2 μ l Beriglobin aufgenommen und im Dunkeln 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von kaltem Puffer und erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 80 μ l kaltem Puffer, 20 μ l PE MicroBeads und 2 μ l Beriglobin resuspendiert. Daraufhin erfolgte eine 15-minütige Inkubation im Kühlschrank bei 4°C. Anschließend wurden die Tubes mit kaltem Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Nach diesem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 500 μ l kaltem Puffer aufgenommen, die Zellzahl ermittelt und von dem Tube, welches das Testreagenz enthielt, also mit CMV pp65 inkubiert worden war, ein Alliquot für die Durchflusszytometrie abgenommen. Die Positivkontrolle (nur mit α CD28 inkubiert) und die Negativkontrolle (mit α CD28 und SEB inkubiert) wurden nicht über die MACS-Säule separiert, sondern die gesamte Zellsuspension für die durchflusszytometrische Messung verwendet.

4.8 MACS-Separation

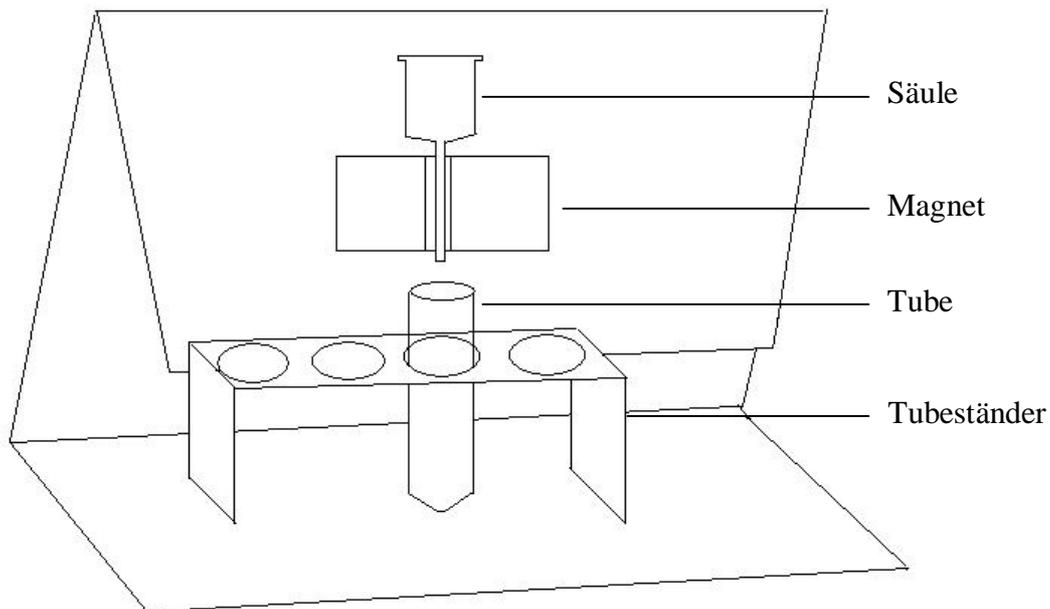


Abb. 5: MACS-Aufbau Auf das metallene Gestell wird ein Magnet angebracht, in den wiederum die Säule gesteckt wird. Beim Separationsschritt wird die Zellsuspension auf die Säule gegeben, durchläuft diese, die gelabelten Zellen bleiben im Magneten hängen und die restliche Zellsuspension kann unter der Säule mit einem Tube aufgefangen werden.

Die MACS-Separation wurde wie in Abb. 5 dargestellt durchgeführt. Von der auf die Säule gegebenen Zellsuspension wurden die vorher gelabelten Zellen, in diesem Fall die IFN- γ positiven Zellen, im Magnetfeld festgehalten. Nur die IFN- γ negativen Zellen liefen durch die Säule durch und wurden mit Hilfe eines 15 ml Tubes aufgefangen. Dies war die so genannte Negativfraktion. Die erste Säule wurde aus dem Magneten entnommen, auf die zweite gesteckt und der Stempel gedrückt, so dass das magnetische Feld der ersten Säule aufgehoben wurde und die Zellen, die magnetisch festgehalten wurden, auf die zweite Säule übertragen werden konnten. Diese zweite Säule wurde mit kaltem Puffer nachgespült und die Zellsuspension, die durch die Säule durchgelaufen war, wurde wieder als Negativfraktion in dem 15 ml Tube aufgefangen. Anschließend wurde auch die zweite Säule aus dem magnetischen Feld entfernt, auf ein 15 ml Tube gesteckt und nach Zugabe von 500 μ l Kulturmedium (RPMI 1640 + 10 % AB Serum) mit Hilfe kräftigen Drückens des Stempels in das Tube übertragen. Damit wurde die so genannte Positivfraktion gewonnen, die hauptsächlich die IFN- γ positiven Zellen enthält. Durch die Säulenseparation kommt es auch zu einer Anzahl von toten und in Apoptose befindlichen Zellen. Deshalb war es besonders wichtig, bei der sich anschließenden Zellzählung nur die wirklich lebenden Zellen zu zählen.

Sowohl von der Negativ- als auch der Positivfraktion wurde nach der Zellzählung ein Teil zur FACS Analyse entnommen, wobei die Zellzahl der Positivfraktion möglichst 1×10^5 Zellen betragen sollte. Die vor der MACS-Separation für die FACS Analyse abgenommenen Proben, sowie die Positiv- und Negativfraktion wurden zentrifugiert, um sie dann in 80 μ l Beriglobin Wasch-Puffer zu resuspendieren und die entsprechenden Antikörper dazugegeben. Anschließend wurde für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Bei diesem Versuch erfolgte nur eine 10-minütige Inkubationszeit, da das intrazelluläre IFN- γ bereits durch den IFN- γ -Detection Antibody gefärbt ist und die restlich zu färbenden Marker nur extrazellulär sind. Nach der Zugabe von FACS-Puffer wurden alle FACS-Tubes zentrifugiert und in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung am FACS-Gerät wurde PI zur Identifizierung der toten Zellen dazugegeben und anschließend mit der Messung begonnen.

4.9 Kultivierung CMV-spezifischer T-Zellen

Die Negativfraktion wurde als Feederzellen für die IFN- γ -positiven Zellen verwendet. Aus diesem Grund wurde von der Negativfraktion die 5-fache Zellzahl der Positivfraktion abgenommen und diese Zellsuspension bei 30 Gray bestrahlt. Bei dieser Bestrahlungsdosis sind die Zellen nicht mehr in der Lage, sich zu vermehren. Die restliche Negativfraktion wurde für den Tag 14 zur erneuten Feederzellzugabe unbestrahlt eingefroren.

Die Positivfraktion und die bestrahlte Negativfraktion wurden runterzentrifugiert und so in Kulturmedium (RPMI 1640 + 10 % AB Serum) aufgenommen, dass 1×10^4 Zellen/50 μ l in der Positivfraktion waren und 5×10^4 Zellen/50 μ l in der Negativfraktion. Danach wurden jeweils 50 μ l der Positivfraktion und 50 μ l der Negativfraktion in ein Well einer 96 Well-Platte mit Rundboden pipettiert. Durch den Rundboden lagen die Zellen näher beieinander und konnten somit besser miteinander kommunizieren und sich gegenseitig stimulieren. Zur Unterstützung der Zellproliferation und -entwicklung wurden zu den Zellen ein Interleukin-Mix, bestehend aus 10 μ l Interleukin 2 (100 Units/ml), 10 μ l Interleukin 7 (100 ng/ml) und 10 μ l Interleukin 15 (100 ng/ml) gegeben. Dazu wurde 1 % Antibiotika/Antimykotika (10.000 Units Penicillin, 10 mg Streptomycin und 25 μ g Amphotericin B pro ml) gegeben. Die 96 Well-Platte wurde in einen Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ gestellt und dreimal in der Woche Interleukin-Mix + 1 % Antibiotika/Antimykotika dazugegeben. Sieben Tage vor der Testung der Funktionalität (bei 21-tägiger Kultur am Tag 14) erhielten die Zellen das letzte Mal den Interleukin-Mix + 1% Antibiotika/Antimykotika. Zusätzlich wurden Feederzellen, die Negativfraktion von Tag 0, dazugegeben. Dazu wurde die Negativfraktion aufgetaut, in Kulturmedium + 1 %

Antibiotika/Antimykotika resuspendiert und mit 30 Gray bestrahlt. Da nach 14-tägiger Kultur angenommen wurde, dass sich die Zellzahl ungefähr verzehnfacht hat, wurden zu jedem Well, im Vergleich zur anfänglichen Positivfraktion, die 50 fache Feederzellzahl dazugegeben und die Inkubation fortgesetzt. Die Zellen wurden 1:1 geteilt, wenn das Gesichtsfeld fast vollständig ausgefüllt war und die Zellen mehrschichtig lagen. Durch den Rundboden der Platte war es oft schwer zu erkennen, wie viel Zellen sich in jedem Well befanden. Ebenso war auch der Zustand der einzelnen Zellen schwer zu ermitteln.

4.10 Testung der Funktionalität der T-Zellen nach 21-tägiger Kultur

4.10.1 CFDA-Färbung der Stimulatorzellen

Es wurde Stammzellapheresat des entsprechenden Spenders aufgetaut und in PBS gelöst, so dass eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml entstand. Mit dieser Zellsuspension wurde die CFDA Gebrauchslösung (die vorher 1:100 mit PBS verdünnt wurde) 1:100 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten im Dunkeln wurde das Tube mit PBS/BSA (0,5 %ig) auf 20 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei $300 \times g$ und RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurde der Schritt wiederholt und das Pellet in Kulturmedium (RPMI 1640 + 10 % AB Serum) in der Konzentration 1×10^6 Zellen/500 μ l aufgelöst. Von dieser Zellsuspension wurden je 500 μ l in ein FACS-Tube gefüllt und über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

4.10.2 Vorbereitung der Zellen

Die 96-Well-Platte mit den CMV-spezifischen IFN- γ -positiven T-Zellen nach Separation wurde aus dem Inkubator geholt, zu jedem Well PBS/EDTA (20 mM) gegeben und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in ein 50 ml Tube überführt, die Wells dreimal mit PBS gespült und die Zellzahl ermittelt. Es wurde die entsprechende Zellzahl für MLR, Zytotoxizitätsassay oder Elispot abgenommen und der Rest für den Zytokinnachweis nach 21-tägiger Kultur verwendet.

4.10.3 Zytokinnachweis nach 21-tägiger Kultur

Das Tube mit den spezifischen T-Zellen wurde mit PBS aufgefüllt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in Kulturmedium (RPMI 1640 + 10 % AB Serum) resuspendiert, so dass eine Zelldichte von $2,5 \times 10^5$ spezifischen T-Zellen/500 μ l erreicht wurde. Zu dieser Zellsuspension wurde mindestens die dreifache Anzahl an CFDA-gefärbten Stimulatorzellen dazugegeben, danach die Suspension gleichmäßig auf vier FACS-Tubes verteilt und zu jedem Tube 5 μ l α CD28 (0,2 mg/ml) zur Kostimulation dazugegeben.

- Ein Tube wurde als Negativkontrolle verwendet, dem nichts weiter hinzugefügt wurde
- Ein zweites Tube, zu dem 10 μ l SEB gegeben wurde
- Ein drittes Tube, dem 10 μ l CMV pp65-Bachem dazu gegeben wurde
- Zum vierten Tube 25 μ l CMV Lysat.

Anschließend wurde mit dem Zytokinnachweis, wie oben beschrieben, fortgefahren.

4.10.4 Stimulatorzellen für die MLR

Zehn gesunden Personen aus dem Labor wurde jeweils ca. 14 ml peripheres Blut entnommen, dieses Blut wurde ficollisiert, die Thrombozyten entfernt und die so gewonnenen MNC aller Spender vereint. Anschließend wurden die gepoolten Proben 1:1 mit der Einfrierlösung, die DMSO (15 %), HSA (8 %), Heparin (20 I.U./ml) und PBS enthielt, verdünnt, in Kryovials gefüllt, im Stickstofftank gelagert.

Für die MLR wurde jeweils ein Kryovial aus dem Stickstofftank entnommen und mit einer Auftaulösung, die aus PBS und 2 % igem HSA bestand, aufgetaut. Nach vollständigem Entfernen der Einfrierlösung durch zweimaliges Zentrifugieren wurden die Stimulatorzellen in RPMI 1640 + 10 % AB Serum resuspendiert. Damit bei der MLR die Stimulatorzellen nur stimulieren und nicht selbst reagieren, wurden sie bei 20 Gray bestrahlt.

4.10.5 Mixed Lymphocytes Reaction (MLR)

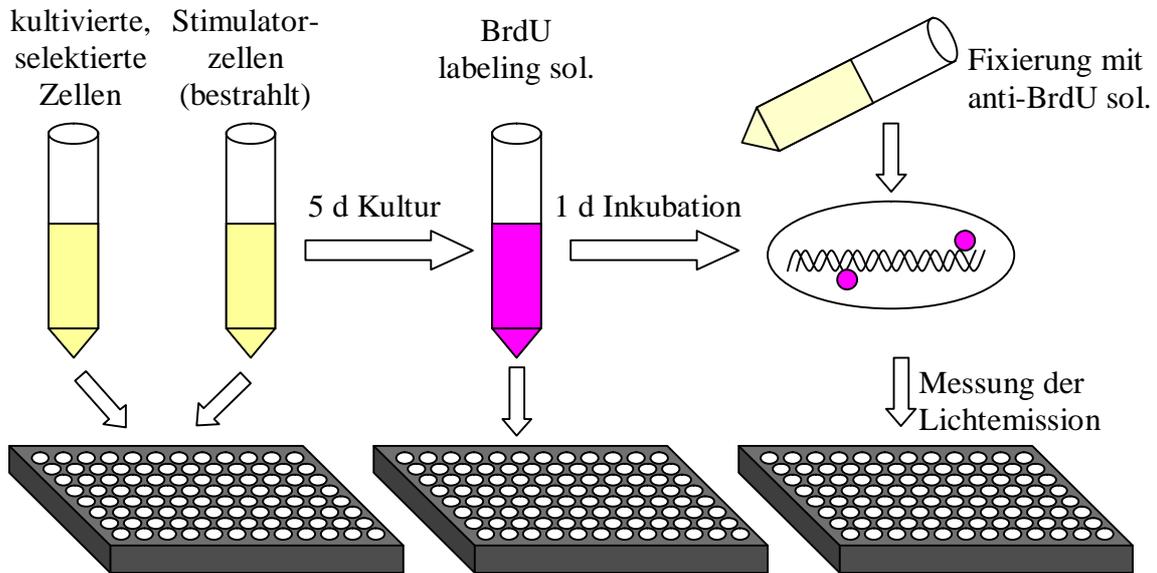


Abb. 6: MLR-Schema Abgebildet sind das Zusammenpipettieren der Positivfraktion nach Kultur und der bestrahlten Stimulatorzellen, die Zugabe der MLR-Materialien und die anschließende Messung der Lichtemission mit Hilfe des Elispot-Reader.

Eine Übersicht der Versuchsanordnung der MLR ist in Abb. 6 wiedergegeben.

In eine schwarze 96-Wellplatte wurde nach dem angepassten Protokoll von Roche (Roche Diagnostics GmbH 2003) im dreifachen Ansatz je 100 μ l der jeweiligen Zellsuspension pipettiert. Es wurde eingesetzt

- Responderzellen mit bestrahlten Stimulatorzellen
- zur Hintergrundidentifizierung Responderzellen allein in Medium
- bestrahlte Stimulatorzellen allein in Medium
- Medium allein.

Diese Platte wurde für 5 Tage in einen Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit gestellt. Dann wurden zu allen Wells, die mit Zellsuspension gefüllt waren, bis auf einen der beiden Hauptansätze, der als Kontrolle funktionierte, 10 μ l BrdU labeling solution (führt zum Einbau des Thymidin-Basenanalogs statt Thymin) pipettiert und die Inkubation im Inkubator für 24 Stunden fortgesetzt. Nach der Inkubationszeit wurde die MP (Mikropipettierplatte) bei 300 \times g, 10 Minuten zentrifugiert und nach Entfernung des Mediums die MP mit Hilfe eines Föns vollständig getrocknet. Im darauf folgenden Schritt wurden 200 μ l Fix Denat zu jedem Well gegeben und für 40 Minuten bei RT inkubiert. Nach dem Entfernen des Fix Denat wurden zu jedem Well 150 μ l Anti-BrdU-POD-Gebrauchslösung gegeben und für 120 Minuten bei RT

inkubiert. Diese Lösung wurde durch dreimaliges Waschen mit Waschlösung vollständig entfernt. Nach dem letzten Mal Waschen wurde auf dem Boden der MP schwarze Klebefolie befestigt und zu jedem Well 100 µl Substratlösung gegeben. Daraufhin wurde die Platte möglichst zügig in den Elispot-Reader gelegt und von diesem nach 3-minütigem Schütteln im Abstand von 3 Minuten drei Messungen der Lichtemission der MP vorgenommen. Die relative Lichteinheit/Sekunde (rlu/s) korreliert mit der Anzahl der DNA-Synthese und somit mit der Anzahl der proliferierenden Zellen in der zu untersuchenden Mikrokultur.

4.10.6 Stimulatorzellen für den ELISpot

Als Stimulatorzellen wurde Stammzellapheresat des gleichen Spenders, für den der ELISpot erfolgte, aufgetaut und zwei Tage im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ in RPMI 1640 + 10 % AB Serum inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension in Wells einer 24 Well-Platte überführt, so dass eine Konzentration von ca. 1×10^7 Zellen/ml entstand. Zu jedem der beiden Wells wurden 10 µl CMV pp65 gegeben und die Inkubation für 24 Stunden fortgesetzt. Nach dieser Inkubationszeit wurde die Zellzahl ermittelt und die Stimulatorzellen durch Zugabe von 4 % igem Paraformaldehyd, welches nach 15-minütiger Inkubationszeit durch zweimaliges Waschen entfernt wurde, in ihrer Aktivität gehemmt. Die Stimulatorzellen wurden am Ende in RPMI 1640 + 10 % AB Serum resuspendiert.

4.10.7 ELISpot

Um den Hintergrund so gering wie möglich zu halten, wurde den ganzen Versuch über die ELISpotplatte aus dem ELISpotkit in sterile Aluminiumfolie gehüllt. Bei der ELISpotplatte ist der Boden mit monoklonalem Antikörper, der spezifisch für humanes IFN-γ ist, beschichtet. Somit bindet das, durch Inkubation mit den CMV pp65 inkubierten Stimulatorzellen, von den Zellen produzierte IFN-γ an die immobilisierten Antikörper und bleibt auch nach den Waschschritten daran hängen. An dieses IFN-γ bindet ein biotinylierter polyklonaler Antikörper, der spezifisch für IFN-γ ist. Nachdem durch erneutes Waschen alle ungebundenen biotinylierten Antikörper entfernt sind, wird mit alkalischer Phosphatase konjugiertes Streptavidin dazugegeben und die ungebundenen Teile werden wieder durch Waschen entfernt. Durch Zugabe einer Substrat-Lösung (BCIP/NBT) bildet sich ein blau-schwarz farbener Niederschlag (siehe Abb. 8). Dieser erscheint als Spot an der Stelle der Zytokinlokalisierung, wobei jeder

einzelne Punkt ein IFN- γ sezernierende Zelle repräsentiert. Der Versuchsaufbau ist in Abb. 7 abgebildet.

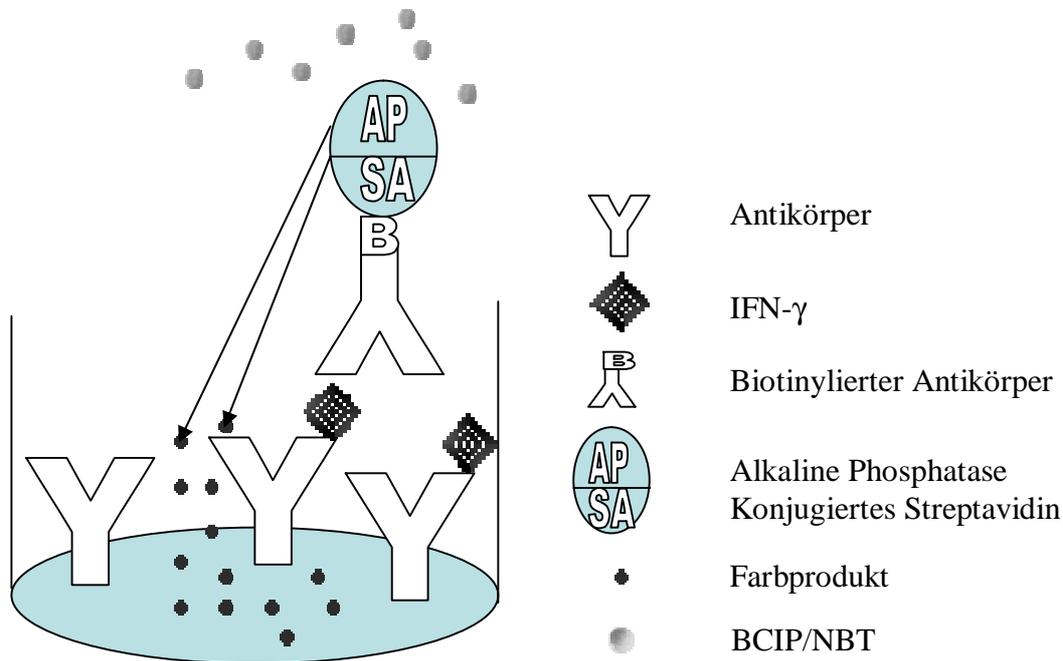


Abb. 7: ELISpot-Schema Auf den mit monoklonalen Antikörpern (spezifisch für IFN- γ) beschichtetem Boden werden das, von den CMV-spezifischen T-Zellen ausgeschüttete IFN- γ gebunden. Der anschließend zugegebene biotinylierte Antikörper bindet an das IFN- γ und daran bindet wiederum die später dazugegebene Alkaline Phosphatase/konjugiertes Streptavidin. Durch Zugabe von BCIP/NBT wird Alkaline Phosphatase/konjugiertes Streptavidin zur Ausschüttung eines Farbproduktes angeregt, welches sich in Form von sichtbaren Punkten auf dem Boden der ELISpot-Platte zeigt.

In jedes Well der ELISpotplatte, welches später mit Zellsuspension gefüllt werden sollte, wurden modifiziert nach dem Protokoll von R&D (R&D Systems 2004) 200 μ l RPMI 1640 + 10 % AB Serum gefüllt und 20 Minuten bei RT inkubiert. Danach wurden entsprechend dem Pipettierschema je 75 μ l Zellsuspension unterschiedlicher Kulturzeit und Konzentration, jeweils im Doppelansatz, in die Wells pipettiert und im Inkubator inkubiert. Nach einem Tag wurde zu jedem Well die entsprechende Konzentration an Stimulatorzellen dazugegeben. Zur Hintergrundbestimmung wurden zwei leere Wells mit der höchsten Konzentration an Stimulatorzellen gefüllt und die Platte erneut in den Inkubator gestellt. Nach 24 Stunden wurden die Wells viermal mit ELISpot-Wasch-Puffer gespült, zu jedem Well 100 μ l ELISpot-Detection-Antibody dazugegeben und anschließend über Nacht im Kühlschrank bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle Wells viermal mit ELISpot-Wasch-Puffer gespült, nach dem letzten Waschschrift 100 μ l ELISpot-Streptavidin-AP in jedes Well gegeben und für zwei Stunden bei RT inkubiert. Anschließend wurde noch viermal mit ELISpot-Wasch-Puffer gewaschen und zu

jedem Well 100 µl ELISpot BCIP/NBT Chromogen dazugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT im Dunkeln wurde die Chromogen-Lösung entfernt und die Platte einmal mit deionisiertem Wasser gespült. Die Plastikunterlage wurde entfernt, die Platte ca. 3 Stunden bei RT getrocknet und anschließend von jedem Well ein Foto gemacht. Im Anschluss erfolgte die Zählung der Punkte anhand der gemachten Fotos.

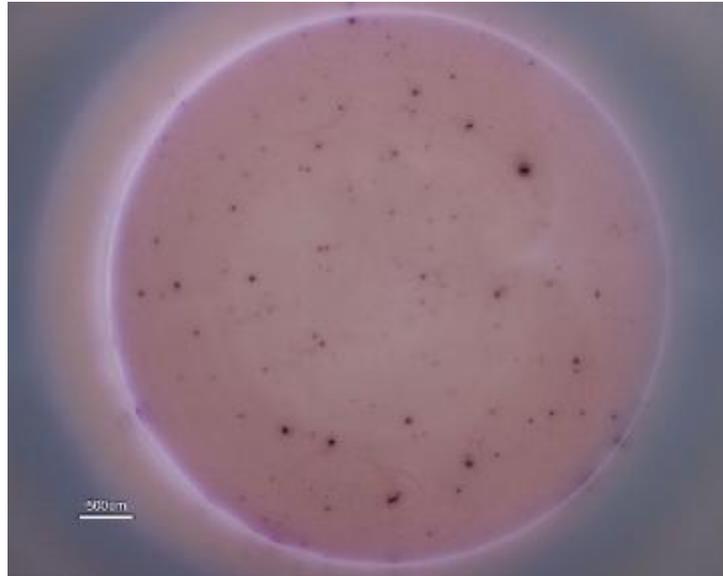


Abb. 8: Elispot-Foto Auf dem Bild sind einzelne braune Punkte, so genannte Spots zu erkennen. Sie markieren die Stelle, an der ein CMV-spezifischer T-Lymphozyt IFN- γ ausgeschüttet hat und dieses an die immobilisierten Antikörper, mit denen der Boden der Elispot-Platte beschichtet ist, gebunden hat. Somit repräsentiert jeder Punkt eine IFN- γ sezernierende Zelle.

4.10.8 Vorbereitung der T2 Zellen für den Zytotoxizitätsassay

Die T2 Zellen wurden in X-Vivo 15 Medium + 1 % Antibiotika/Antimykotika in einer Konzentration zwischen 3×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml in einer Falcon-Flasche im Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchte aufbewahrt und jeden 2. bis 3. Tag das Medium erneuert. Dabei wurden die Zellen in 50 ml Tubes überführt und 10 Minuten bei 400×g und RT zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen in frischem X-Vivo 15 Medium + 1 % Antibiotika/Antimykotika resuspendiert und in der Konzentration zwischen 3×10^5 und 1×10^6 Zellen/ml pro Falcon-Flasche im Inkubator weiter inkubiert.

4.10.9 PKH 26-Färbung

Am Morgen des Zytotoxizitätsassays wurden modifiziert nach dem Protokoll von John Campbell (Campbell 2005) und wie in Abb. 9 dargestellt die T2 Zellen wie oben beschrieben ficollisiert

und gewaschen und in einer neuen Falcon-Flasche in der Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml X-Vivo 15 Medium + 1 % Antibiotika/Antimykotika über den Tag in den Inkubator gestellt. Am Abend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Tube überführt und das Kultur-Gefäß dreimal mit 1 ml X-Vivo 15 Medium gewaschen. Das Tube wurde auf 5 ml mit X-Vivo 15 Medium aufgefüllt und zweimal 10 Minuten bei $300 \times g$ und RT zentrifugiert. Nach diesem Waschschrift wurde in 1 ml PBS resuspendiert und nach der Zellzählung ein Aliquot für die ungefärbte T2 Zell-Kontrolle abgenommen. Zum Tube mit den T2 Zellen, die PKH 26 gefärbt werden sollten, wurden 4 ml PBS dazugegeben und zusammen mit der ungefärbten Kontrolle 10 Minuten bei $300 \times g$ und RT zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen für die ungefärbte Kontrolle in X-Vivo 15 Medium resuspendiert, in eine Falcon-Flasche überführt und in den Inkubator gestellt. Die Zellen für die Färbung wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in Diluent „C“ resuspendiert. Es wurde eine neue PKH 26 Stammlösung hergestellt, indem 10 μ l Farbstoff in 1 ml Diluent „C“ gelöst wurden. Diese Färbelösung wurde 1:1 mit der Zellsuspension verdünnt. Anschließend wurde die Lösung 4 Minuten bei RT auf mittlerer Stufe des MACS Mix kontinuierlich rotiert, um Zellverklumpung zu verhindern. Durch Zugabe der gleichen Volumenmenge an Serum wurde die Reaktion gestoppt und danach bei RT für 2 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit X-Vivo 15 Medium durch Zentrifugation für 10 Minuten bei $200 \times g$ und RT wurden die Zellen gezählt und in X-Vivo15 Medium + 5 % AB Serum resuspendiert.

4.10.10 Zytotoxizitätsassay

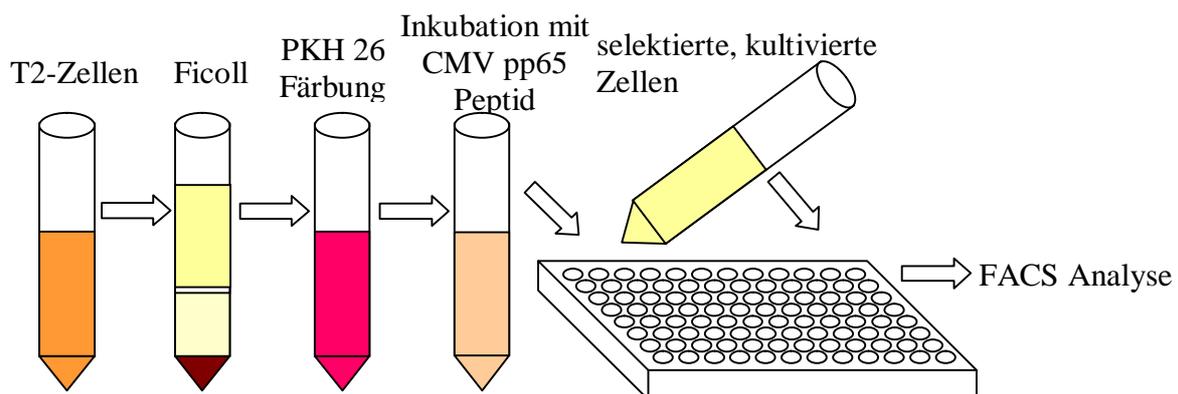


Abb. 9: Zytotoxizitätsassay-Schema Dargestellt ist die Vorbereitung der Stimulatorzellen (Ficollisierung, PKH 26 Färbung und Inkubation mit CMV pp65 der T2-Zellen), Zusammenpipettieren der T2-Zellen und der Positivfraktion nach Kultur und anschließende FACS Analyse.

Zu den PKH 26 gefärbten T2-Zellen wurden 10 µl Human CMV pp65 (Bachem)/ml gegeben und in einer Falcon-Flasche über Nacht im Inkubator inkubiert. Am nächsten Morgen wurden noch einmal 10 µl Human CMV pp65 (Bachem)/ml hinzugefügt und die Inkubation für eine weitere Stunde fortgesetzt. Anschließend wurde die Zellzahl ermittelt und eine definierte Anzahl von T2 Zellen (als Zielzelle) in eine 96 Well-Platte pipettiert. Zu diesen Zellen wurde eine bestimmte Anzahl an IFN- γ positiver T-Zellen nach 21-tägiger Kultur (als Effektorzellen) dazugegeben, so dass sich insgesamt 100 µl pro Well befanden. Nach einer erneuten Inkubation von vier Stunden im Inkubator wurden 10 µl PBS/EDTA zu jedem Well gegeben und bei RT 10 Minuten inkubiert. Die Zellen wurden in ein FACS-Tube überführt und die Wells dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Darauf folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten bei 500 \times g und RT. Resuspendiert wurden die Zellen in 1 \times Binding Puffer, der zuvor 1:10 mit destilliertem H₂O verdünnt worden war, so dass eine Konzentration von 1 \times 10⁶ Zellen/ml entstand. Danach wurden 100 µl von dieser Zellsuspension entnommen und entsprechend dem Färbeprotokoll und Protokoll von BD Biosciences (BD Biosciences 2002b) 5 µl AnnexinV-FITC und 10 µl 7-AAD zu den FACS Tubes gegeben und im Dunkeln 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde eiskalter 1 \times Binding Puffer zu jedem Tube gegeben. Innerhalb einer Stunde erfolgte die durchflusszytometrische Messung am FACS-Gerät (siehe Abb. 10).

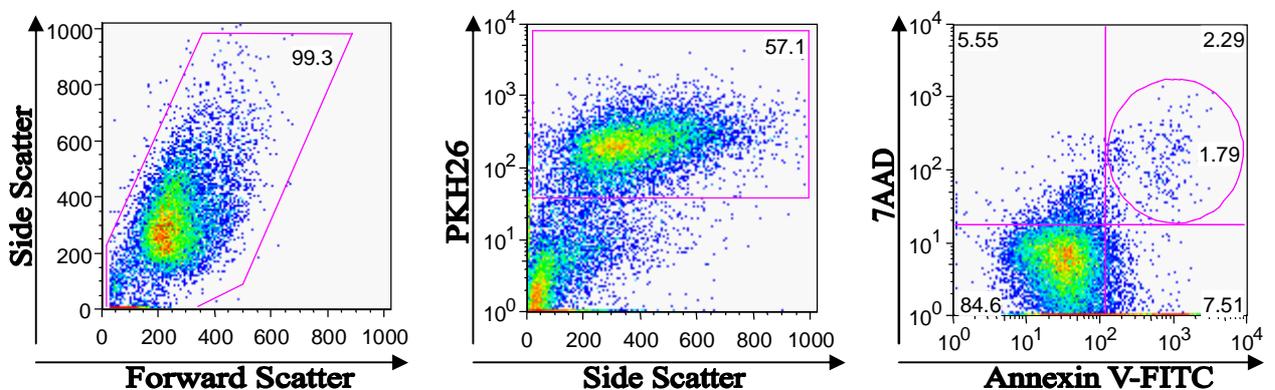


Abb. 10: Bilder der Durchflusszytometrischen Messung beim Zytotoxizitätsassay Von links nach rechts ist das Eingrenzen der T2-Zellen zu erkennen, das darauf folgende gate der PKH26 positiven T2-Zellen und anschließend das Gate um die toten T2-Zellen.

4.11 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab

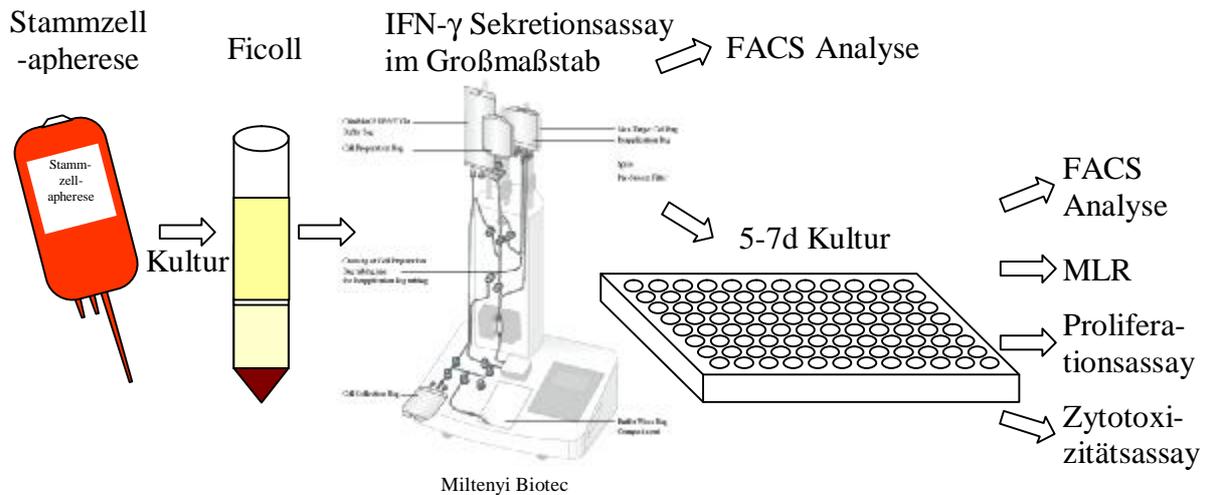


Abb. 11: Schema des IFN- γ Sekretionsassays im Großmaßstab Dargestellt ist der grobe Ablauf des Assays im Großmaßstab und geplante Funktionstests nach Selektion und Kultur. Die Abbildung des CliniMACS[®] Plus Instrument wurde der Miltenyi Biotec-Homepage (http://www.miltenyibiotec.com/download/clinimacs_newsletter/545/cn_291104.pdf) entnommen.

Die Experimente des IFN- γ Sekretionsassays im Großmaßstab, also die Vorbereitung der Zellen, Kultivierung und anschließende Funktionalitätstests (siehe auch Abb. 11) gleichen den Experimenten des IFN- γ Sekretionsassays, mit gewissen Modifikationen. So wurde als Ausgang eine größere Menge Stammzellapherese aufgetaut, nach dem selben Prinzip wie oben beschrieben, mit der Änderung, dass die Zellsuspension in Beuteln aufgetaut und über Nacht inkubiert wurde. Aufgrund von besseren Zellzahlergebnissen wurde das Ficollprotokoll insoweit angepasst, dass der erste Zentrifugationsschritt gleich bleibt und die darauf folgenden ersetzt werden durch einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt bei $400\times g$ und RT sowie einen anschließenden Thrombozyten-Waschschritt für 15 Minuten bei $250\times g$ und RT.

Nach der Ficollisierung wurde die Zellsuspension so aufgeteilt, dass

- zu 5×10^8 Zellen in 100 ml Medium in einem Beutel $250 \mu\text{l}$ CD28 (0,2 mg/ml) und 1 ml CMV pp65 (5 mg/ml) dazugegeben wurden
- zu 1×10^7 Zellen in einer 24 Well-Platte nur $5 \mu\text{l}$ CD28 (0,2 mg/ml), diese Zellsuspension galt als Negativkontrolle
- zu 1×10^7 Zellen in einer 24 Well-Platte $5 \mu\text{l}$ CD28 (0,2 mg/ml) und $10 \mu\text{l}$ SEB (0,1 mg/ml) diese Zellsuspension galt als Positivkontrolle.

Anschließend wurde wie beim IFN- γ Sekretionsassay für 16 Stunden im Inkubator inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde nach dem angepassten Miltenyi Biotec-Protokoll (Miltenyi Biotec 2008) fortgefahren. Dabei wurden der mit CMV pp65 inkubierte Zellbeutel parallel zu

den Kontrollproben bearbeitet, aber aufgrund der Unterschiede werden diese beiden Abläufe nacheinander dargestellt.

4.11.1 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab mit CMV pp65 inkubierten Zellen

Die Zellsuspension wurde in einem Transferbeutel mit einem Volumen von 600 ml überführt, dieser Beutel mit 500 ml kaltem Kulturmedium (RPMI 1640) + 2 % AB Plasma gefüllt und anschließend 10 Minuten bei 300 \times g, 4°C, ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, bis auf ein Volumen von 10 ml. Mit einer Injektionsnadel wurde Kiovig (1,5 mg/ml) in den Beutel injiziert und 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurden in den Beutel 3,675 ml IFN-gamma Catchmatrix Reagent gespritzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Drei neue Beutel wurden mit 275 ml warmen (37°C) RPMI 1640 + 10 % AB Plasma gefüllt. Die Zellsuspension wurde mit warmen RPMI 1640 + 10 % AB Plasma auf 500 ml aufgefüllt und je 125 ml zu den drei neuen Beuteln und 125 ml RPMI 1640 + 10 % AB Plasma zu dem ersten Beutel, so dass in jedem Beutel die Zellsuspension in 400 ml warmen Medium war. Die Beutel wurden gemeinsam bei 37°C für 45 Minuten unter kontinuierlichen Rotationen im Inkubator inkubiert. Nach dieser Sekretionsphase wurde 200 ml kalter CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA zu jedem der 4 Beutel gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 300 \times g, 4°C und ohne Bremse folgte daraufhin und nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen in kaltem CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA resuspendiert und die gesamte Zellsuspension in einen Beutel vereint. Nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation bei 300 \times g, 4°C und ohne Bremse wurde der Überstand bis auf ein Volumen von 10 ml entfernt, 3,675 ml Enrichment Reagent und Kiovig (1,5 mg/ml) mit Hilfe einer Spritze in den Beutel injiziert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden 500 ml kalter CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA zu dem Beutel dazugegeben, wieder wie zuvor zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes in 100 ml kaltem CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA resuspendiert. Es wurde eine Zellzählung durchgeführt und 4×10^5 Zellen für die FACS Analyse abgenommen. Die restliche Zellsuspension wurde mit Hilfe des CliniMACS[®] Plus Instrument in die so genannte Positiv- und Negativfraktion selektiert. Von diesen beiden Fraktionen wurde anschließend ein Alliquot zur FACS Analyse entnommen und die restliche Zellsuspension in Kultur gegeben. Wobei diesmal nach dem modifizierten Protokoll von Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec) die Kultur nur 5 Tage betrug, zur Positivfraktion die 100 fache Anzahl an bestrahlter Negativfraktion

dazugegeben wurde und an Interleukinen nur 200U IL2 / ml an Tag 1 und Tag 3 dazugegeben wurden.

4.11.2 Kontrollen für IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab

Die Negativ- und Positivkontrolle wurde nach der Inkubationsphase in jeweils ein 50 ml Tube überführt, mit kaltem RPMI 1640 + 2 % AB Plasma auf 15 ml aufgefüllt und anschließend 10 Minuten bei 400 \times g, 4°C, ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt, die Zellsuspension in 100 μ l kaltem RPMI 1640 + 2 % AB Plasma + 2 μ l Beriglobin resuspendiert und 3 Minuten inkubiert. Anschließend wurden je Tube 75 μ l IFN-gamma Catchmatrix Reagent dazugegeben und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Jedes Tube wurde mit warmen RPMI 1640 + 10 % AB Plasma auf 40 ml aufgefüllt und bei 37°C für 45 Minuten unter kontinuierlichen Rotationen im Inkubator inkubiert. Nach dieser Sekretionsphase wurden die Tubes geteilt, indem jeweils 20 ml Zellsuspension in ein neues Tube überführt wurde. Zu jedem Tube wurde 30 ml kalter CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA gegeben und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Ein 10-minütiger Zentrifugationsschritt bei 300 \times g, 4°C und ohne Bremse folgte daraufhin und nach Entfernen des Überstandes wurde die Zellen in kaltem CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA resuspendiert und die Tubes mit der gleichen Zellsuspension (Negativ- bzw. Positivkontrolle) vereint. Nach einer erneuten 10-minütigen Zentrifugation bei 300 \times g, 4°C wurde der Überstand entfernt und in 100 μ l kaltem CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA + 2 μ l Beriglobin + 75 μ l Enrichment Reagent resuspendiert und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Im Anschluss an diese Inkubationszeit wurden die Tubes mit kaltem CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA bis auf 10 ml gefüllt, wieder wie zuvor zentrifugiert und nach Entfernen des Überstandes in 0,5 ml kaltem CliniMACS PBS/EDTA Puffer + 0,5 % HSA resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann anschließend komplett für die FACS Analyse verwendet. Für die FACS Analyse wurden alle Proben zentrifugiert, um sie dann in 80 μ l Beriglobin Wasch-Puffer zu resuspendieren und die entsprechenden Antikörper dazuzugeben. Anschließend wurde für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach der Zugabe von FACS-Puffer wurden alle FACS-Tubes zentrifugiert und in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung am FACS-Gerät wurde PI zur Identifizierung der toten Zellen dazugegeben und anschließend mit der Messung begonnen.

4.12 Testung der Funktionalität der T-Zellen nach 5-tägiger Kurzkultur

Nach der Kurzkultur sollten drei Funktionstests durchgeführt werden:

die bereits beschriebenen Verfahren MLR und Zytotoxizitätsassay sowie als neues Experiment den Proliferationsassay, der im Weiteren erläutert wird (siehe Abb. 12). Bei diesem Versuch wird die Fähigkeit der generierten CMV spezifischen T-Zellen, nach CMV Lysat Stimulation zu proliferieren, untersucht.

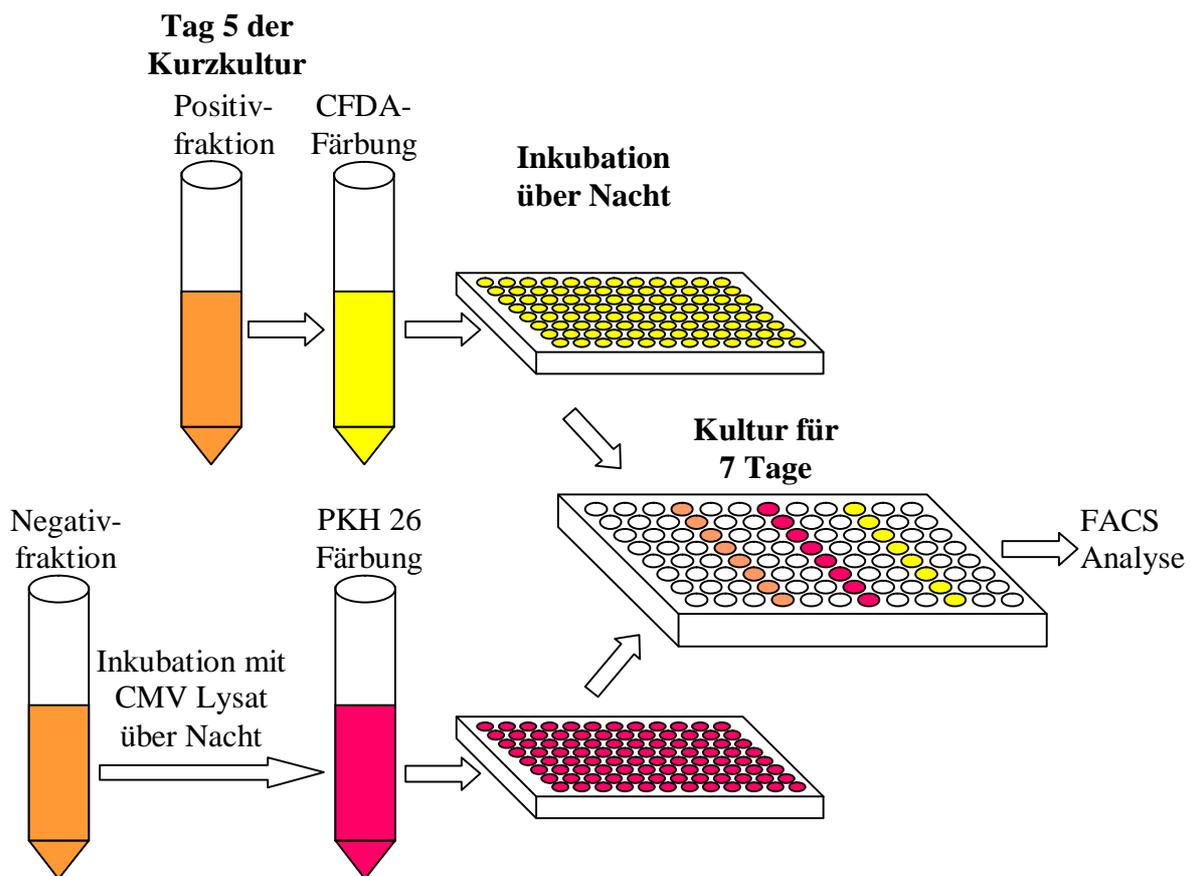


Abb. 12: Proliferationsassay-Schema Dargestellt ist die Färbung der Positiv- und Negativfraktion (die vorher mit CMV Lysat inkubiert wurde), Kultivierung und anschließende FACS Analyse.

4.12.1 PKH 26-Färbung der Stimulatorzellen

Am Tag 4 der Kurzkultur wurde zur unbestrahlten Negativfraktion, die für diesen Versuch als Stimulatorzellen verwendet wurden, CMV Lysat dazugegeben, so dass sich eine Konzentration von 10 µg/ml ergab und über Nacht im Inkubator weiter inkubiert. Die mit CMV Lysat inkubierte Negativfraktion wurde am Tag 5 der Kurzkultur aufgeteilt in PKH 26 ungefärbte und PKH26 gefärbte Zellen. Die ungefärbten wurden weiter in Kultur gegeben und die Zellen für die

Färbung wurden in einer Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml in Diluent „C“ resuspendiert. Es wurde eine neue PKH 26 Stammlösung hergestellt, indem 5 μ l Farbstoff in 495 μ l Diluent „C“ gelöst wurden. Von dieser Färbelösung wurde 1:5 mit Diluent „C“ verdünnt und die daraus resultierende Farblösung wiederum 1:1 mit der Zellsuspension verdünnt. Anschließend wurde die Lösung 4 Minuten bei RT auf mittlerer Stufe des MACS Mix kontinuierlich rotiert, um Zellverklumpung zu verhindern. Durch Zugabe der gleichen Volumenmenge an AB Plasma wurde die Reaktion gestoppt und danach bei RT für 2 Minuten inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit RPMI 1640 durch Zentrifugation für 10 Minuten bei $400 \times g$ und RT wurden die Zellen in RPMI 1640 + 10 % AB Plasma + 1% Antibiotika/Antimykotika resuspendiert und wie die ungefärbten Zellen über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

4.12.2 CFDA-Färbung der kultivierten, selektierten Zellen

Es wurde die Positivfraktion nach 5 Tagen Kurzkultur aus dem Inkubator geholt und so in PBS gelöst, dass eine Konzentration von 1×10^7 Zellen/ml entstand. Mit dieser Zellsuspension wurde die CFDA Gebrauchslösung (die vorher 1:100 mit PBS verdünnt wurde) 1:100 verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von 4 Minuten im Dunkeln wurde das Tube mit PBS/BSA (0,5%ig) auf 20 ml aufgefüllt und 10 Minuten bei $400 \times g$ und RT zentrifugiert. Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurde der Schritt wiederholt und das Pellet in Kulturmedium (RPMI 1640 + 10 % AB Plasma) in der Konzentration 1×10^5 Zellen/100 μ l gelöst. Von dieser Zellsuspension wurden je 100 μ l in ein Well einer 96 Well-Platte gefüllt und über Nacht im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert.

4.12.3 Proliferationsassay

Die PKH 26 gefärbten und ungefärbten Stimulatorzellen und die CFDA gefärbten Zellen wurden, nach dem abgewandelten Protokoll von Rauser (Rauser 2003; Rauser et al. 2004), nach der Inkubation über Nacht nach einem bestimmten Schema in eine 96 Well-Platte pipettiert und im Inkubator bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Am Tag 1 der Kultur wurde IL 2 dazugegeben, so dass sich eine Konzentration von 50 U/ml ergab. Die 96-Well-Platte wurde am Tag 7 aus dem Inkubator geholt, zu jedem Well PBS/EDTA (20mM) gegeben und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in FACS-Tubes überführt und zentrifugiert, um sie dann in 80 μ l Beriglobin Wasch-Puffer zu resuspendieren und die entsprechenden Antikörper dazuzugeben. Anschließend wurde für 10 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Nach der Zugabe von FACS-

Puffer wurden alle FACS-Tubes zentrifugiert, in 300 μ l FACS-Puffer resuspendiert und anschließend mit der Messung begonnen.

5 Ergebnisse

5.1 Cytokin Detection von 14 gesunden Spendern

Um herauszufinden, welche Person von 14 gesunden Spendern CMV positiv bzw. negativ ist, wurde bei der sich an den Zytokinnachweis anschließenden Auswertung mit FlowJo (siehe Abb. 13) erst die gesamte Lymphozytenpopulation durch Ausgrenzen aller anderen Populationen ermittelt und von dieser der prozentuale Anteil der Zellen, die IFN- γ sezernieren (somit IFN- γ positiv sind) und gleichzeitig CD69 positiv sind. CD69 ist ein Marker für aktivierte T- und B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen und somit konnte durch Eingrenzen der doppelt IFN- γ /CD69 positiven Zellen der Anteil aktivierter Lymphozyten, die als Zeichen ihrer Stimulierbarkeit durch CMV pp65 IFN- γ ausschütten, ermittelt werden.

Da außerdem noch von Interesse war, ob sowohl T-Helferzellen als auch CTL durch CMV pp65 stimuliert wurden, wurde die Lymphozytenpopulation auf den Anteil von CD4 und CD8 positiver Zellen und wiederum deren jeweiliger Anteil an IFN- γ +/CD69+ Zellen untersucht (siehe Abb. 14 und 15).

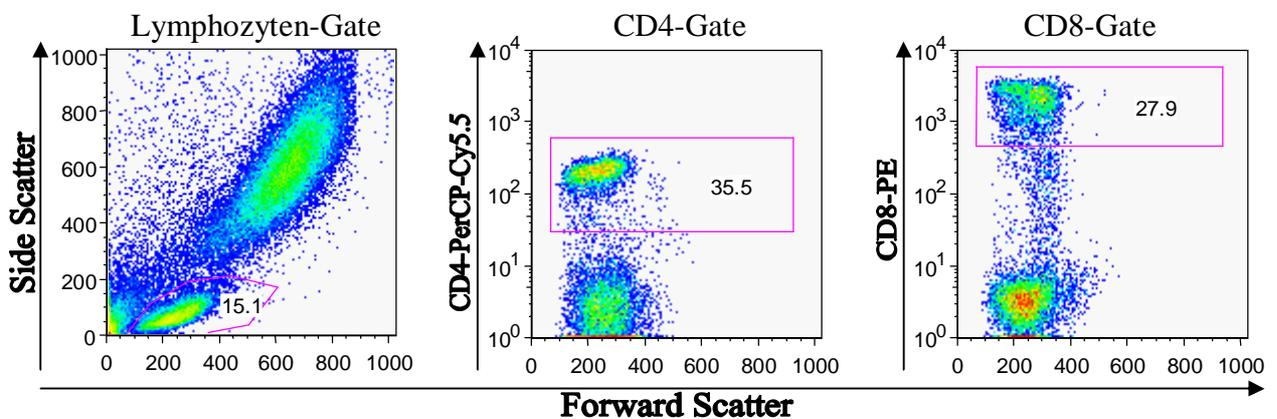


Abb. 13: Gatingstrategien zum Nachweis intrazellulärer Zytokine Bei der sich an die FACS-Messung anschließenden Auswertung wurde durch Auftragung des Forward Scatter (FSC) gegen den Sideward Scatter (SSC) die Lymphozytenpopulation ermittelt und eingegrenzt, wie am Beispiel von Testperson 1 gezeigt. Diese Lymphozytenpopulation, wurde dann wiederum auf die CD4 positiven Zellen bzw. CD8 positiven Zellen gegated.

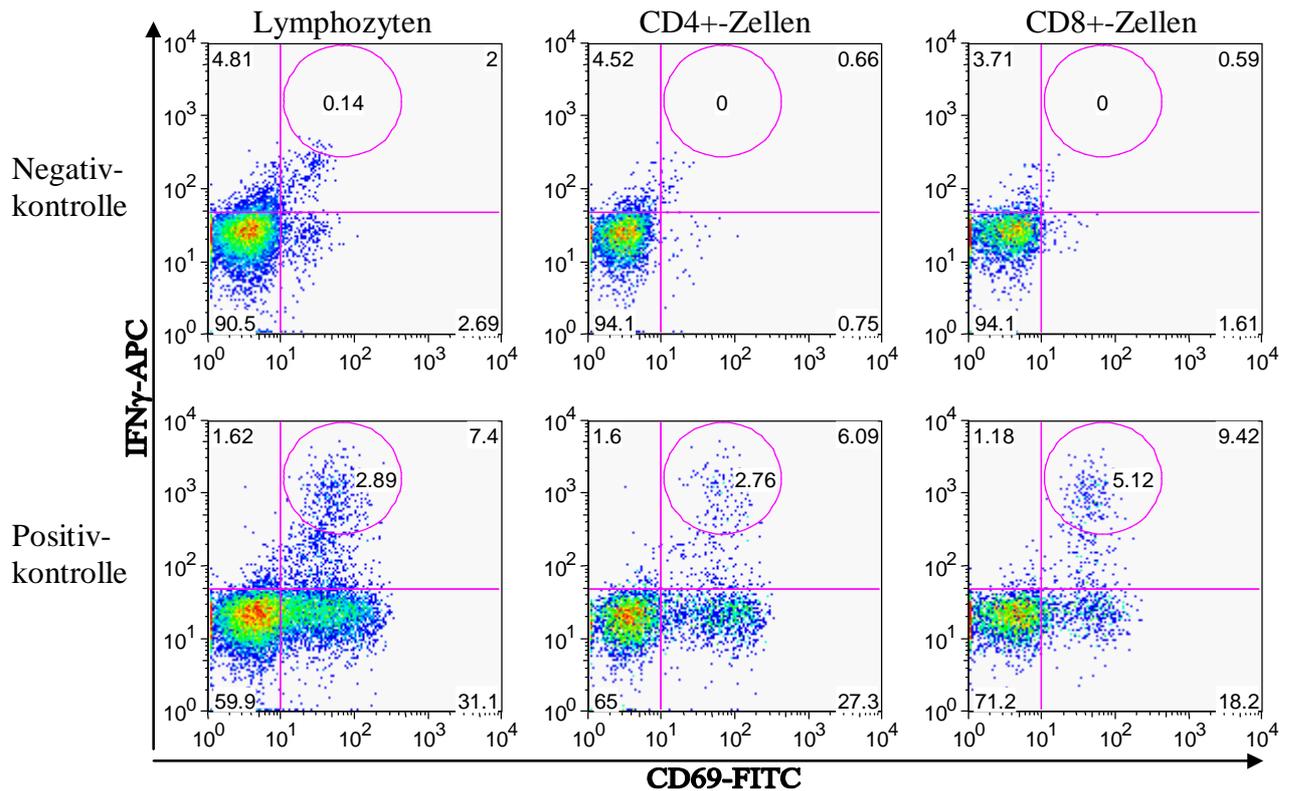


Abb. 14: Negativ- und Positivkontrolle Rechts sind von der Negativ- und Positivkontrolle die doppelt IFN- γ und CD69 positiven Lymphozyten dargestellt. In der Mitte sind von den CD4 positiven Zellen die sowohl IFN- γ als auch CD69 positiven Zellen abgebildet und links das gleiche von den CD8 positiven Zellen.

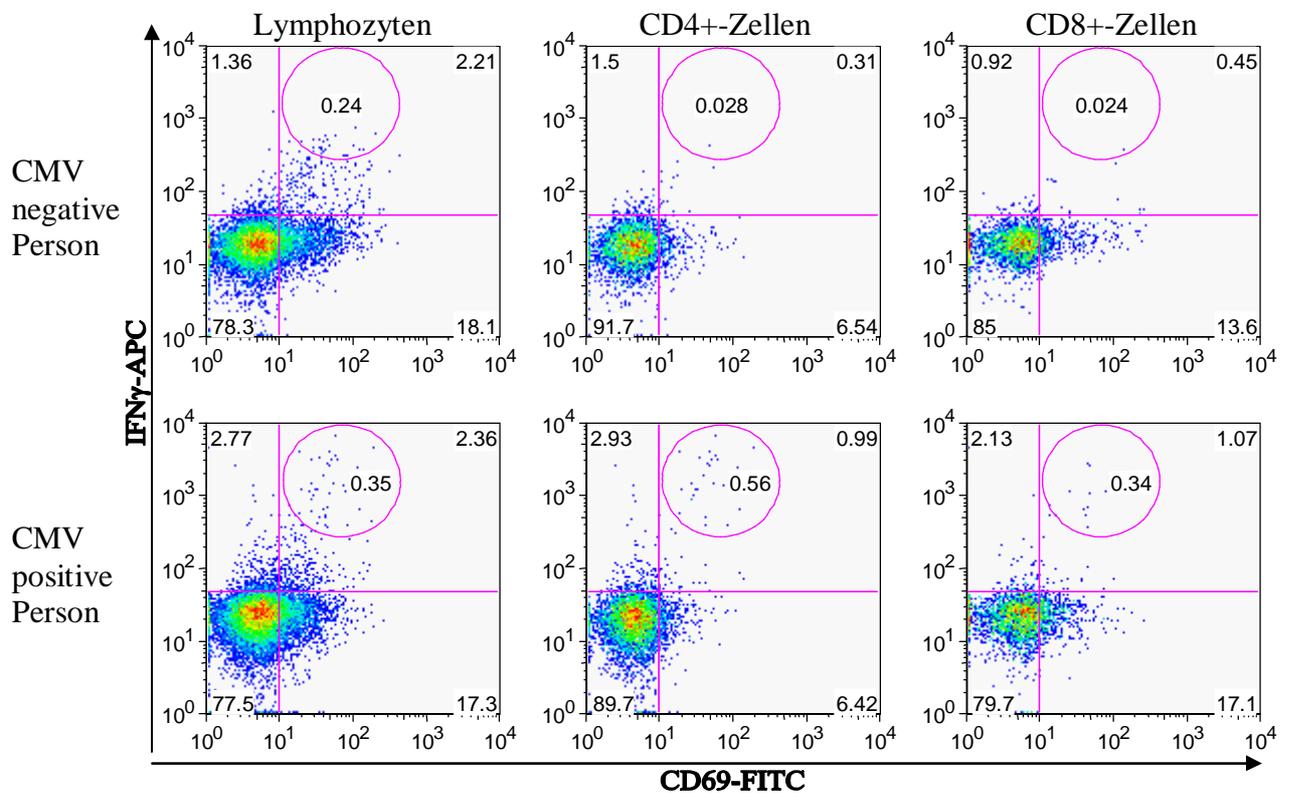


Abb. 15: CMV positive und negative Person In der rechten Spalte sind die IFN- γ /CD69+-Lymphozyten wiedergegeben. In der Mitte sind von den CD4+-Zellen die sowohl IFN- γ als auch CD69 positiven Zellen dargestellt und in der linken Spalte das gleiche für die CD8+-Zellen.

Im Durchschnitt (n=14) waren $16,73 \% \pm 3,33 \%$ der beim Zytokinnachweis untersuchten Zellen Lymphozyten und von diesen Lymphozyten waren im Mittel $39,46 \% \pm 5,89 \%$ CD4 positiv bzw. $21,60 \% \pm 4,76 \%$ CD8 positive Zellen. Von der gesamten Lymphozytenpopulation waren, nach Abzug der Negativkontrolle, im Mittel $0,16 \% \pm 0,17 \%$ IFN- γ und CD69 positiv. Bei den CD4 positiven Zellen wurde für die sowohl IFN- γ als auch CD69 positiven Zellen ein Durchschnittswert von $0,19 \% \pm 0,16 \%$ ermittelt und für die CD8 positiven Zellen von $0,64 \% \pm 0,79 \%$, jeweils nach Abzug der Negativkontrolle.

Zur Einschätzung, ob eine Person bereits eine Cytomegalievirusinfektion durchgemacht hat bzw. durchmacht und somit positiv ist, wurde für die CD4 und CD8 positiven Zellen mindestens ein Wert von $0,10 \%$ IFN- γ und CD69 positiven Zellen erwartet. 10 von 14 untersuchten Personen wurden anhand dieses Auswahlkriteriums als CMV positiv eingestuft. Der höchste Wert an CD4 positiven, doppelt IFN- γ und CD69 positiven Zellen lag bei $0,48 \%$ (Person 7) und für CD8 positive Zellen lag er bei $2,65 \%$ (Person 14).

Tab. 2: Übersicht über CMV positive und negative Personen im Labor Es wurde von 14 Personen im Labor Blut entnommen und auf den CMV-Status untersucht. Dabei galt eine Person als CMV positiv, wenn der Prozentwert der IFN- γ /CD69/CD4 positiven Zellen und der Prozentwert der IFN- γ /CD69/CD8 positiven Zellen über $0,10 \%$ lag. Dadurch konnten 10 CMV positive Personen und 4 CMV negative Personen im Labor ermittelt werden.

Spender Nr.	Lymphozyten [%]			IFN- γ +/CD69+ [%]			CMV pos./neg.
	gesamt	CD4+	CD8+	gesamt	CD4+	CD8+	
1	15,50	34,10	26,40	0,03	0,00	0,01	neg.
2	20,60	34,70	26,00	0,13	0,35	0,34	pos.
3	22,30	40,50	20,70	0,15	0,33	0,08	pos.
4	14,40	46,90	15,10	0,01	0,39	0,46	pos.
5	16,80	43,10	26,40	0,05	0,07	0,09	neg.
6	18,70	40,30	21,10	0,09	0,05	0,58	pos.
7	21,10	27,10	30,80	0,01	0,00	0,00	neg.
8	13,10	49,60	15,80	0,13	0,10	0,61	pos.
9	19,10	39,00	21,60	0,30	0,48	0,33	pos.
10	15,40	45,00	21,30	0,37	0,15	1,87	pos.
11	14,50	39,50	19,80	0,46	0,19	1,41	pos.
12	11,80	40,20	15,90	0,00	0,00	0,00	neg.
13	18,20	39,40	16,90	0,07	0,36	0,60	pos.
14	12,70	33,00	24,60	0,48	0,22	2,65	pos.

5.2 Vergleich Zytokinnachweis CMV positiver Zellen in peripherem Blut, Stammzellapheresat und peripherem Blut zusammen mit Stammzellapheresat

Bei diesem Versuch wurde von vier Stammzellapheresespendern ein Zytokinnachweis in peripherem Blut (PB), Stammzellapheresat (PBPC) und der Kombination von beiden durchgeführt. Damit sollte ein Vergleich der Stimulierbarkeit und Detektion CMV positiver Zellen von peripherem Blut, Stammzellapheresat und beiden zusammen möglich werden, um somit zu entscheiden, ob in den nachfolgenden Versuchen Stammzellapheresat alleine oder in Kostimulation mit peripherem Blut verwendet werden sollte. Außerdem wurde getestet, ob es einen Unterschied in der Anzahl von IFN- γ und CD69 positiven Zellen nach Inkubation mit CMV pp65 oder CMV Lysat gibt. CMV pp65 und CMV Lysat wurden miteinander verglichen, da bisher zur Generierung CMV-spezifischer, CD4 positiver T-Zellen meist CMV Lysat eingesetzt wurde. CMV Lysat besteht allerdings nur zu ca. 10 % aus viralen Proteinen und ist in der Zusammensetzung sehr variabel und schlecht charakterisiert. Der Gebrauch eines solchen Produktes für den klinischen Einsatz wäre somit bedenklich, weshalb nach einer Alternative zur Generierung von CMV-spezifischen CD4+ T-Zellen gesucht wurde. Eine Möglichkeit stellt die Aktivierung der CD4 positiven T-Zellen mit rekombinanten Protein (z. B. CMV pp65) dar. Deshalb wurde in den Versuchen CMV pp65 und CMV Lysat miteinander verglichen, um eventuell bei gleicher oder besserer Stimulierbarkeit von CMV pp65 gegenüber CMV Lysat in den weiteren Versuchen CMV pp65 zu verwenden.

Tab. 3: Übersicht zum Vergleich PB (peripheres Blut) versus PBPC (Stammzellapheresat)
Es wurde die Detektierbarkeit von CMV positiven Zellen in Blut und Stammzellapheresat bei Inkubation der Zellen mit CMV pp65 oder CMV Lysat verglichen.

		Lymphozyten [%]			IFN- γ + / CD69+ [%]		
		gesamt	CD4+	CD8+	gesamt	CD4+	CD8+
CMV pp65	PB	49,45	25,65	34,58	0,00	0,01	0,00
	PBPC	48,93	33,00	27,23	0,86	0,36	1,63
	PB+PBPC	44,77	30,77	28,63	0,79	0,33	1,62
CMV Lysat	PB	51,43	26,83	30,10	0,06	0,20	0,01
	PBPC	47,87	34,07	24,70	0,60	0,92	1,03
	PB+PBPC	44,63	32,30	26,57	0,54	0,87	0,88

Bei der Auswertung der durchflusszytometrischen Messungen mit FlowJo (siehe Abb. 16-19) betrug die Lymphozytenanzahl nach Ficoll und Zytokinnachweis in allen Versuchsanordnungen

im Mittel $48,11 \% \pm 14,75 \%$ und die Anzahl CD4 positiver Zellen $30,02 \% \pm 7,20 \%$, sowie CD8 positiver Zellen $29,01 \% \pm 6,30 \%$. Bei der Untersuchung doppelt IFN- γ und CD69 positiver Lymphozyten zeigten sich erste Unterschiede nach Abzug der Negativkontrolle. Denn während bei der Inkubation von CMV pp65 mit peripherem Blut dies im Mittel auf $0 \% \pm 0,01 \%$ der Zellen zutrif, waren es bei Inkubation mit dem Stammzellapheresat allein $0,86 \% \pm 0,90 \%$ und bei Inkubation von peripherem Blut zusammen mit Stammzellapheresat $0,79 \% \pm 0,94 \%$. Für die Inkubation mit CMV Lysat ergaben sich für das periphere Blut Durchschnittswerte von $0,06 \% \pm 0,06 \%$, für Stammzellapheresat $0,60 \% \pm 0,70 \%$ und die Kombination aus beiden $0,54 \% \pm 0,66 \%$. Von den CD4 positiven Zellen mit CMV pp65 Inkubation waren im Mittel $0,01 \% \pm 0,02 \%$ IFN- γ und CD69 positiv im peripheren Blut, $0,36 \% \pm 0,06 \%$ in dem Stammzellapheresat und $0,33 \% \pm 0,06 \%$ im peripheren Blut gemeinsam mit Stammzellapheresat. Wurden die Zellen mit CMV Lysat statt CMV pp65 inkubiert, so ergab sich für die CD4 positiven Zellen im Durchschnitt ein Anteil doppelt IFN- γ und CD69 positiver Zellen im peripheren Blut von $0,20 \% \pm 0,15 \%$, in dem Stammzellapheresat von $0,92 \% \pm 0,77 \%$ und die Kombination aus peripherem Blut und Stammzellapheresat von $0,87 \% \pm 0,80 \%$. Im Vergleich dazu sind bei den CD8 positiven Zellen bei Inkubation mit CMV pp65 im peripheren Blut keine Zellen IFN- γ und CD69 positiv gewesen. Im Stammzellapheresat waren im Gegensatz dazu $1,63 \% \pm 2,20 \%$ IFN- γ und CD69 positiven Zellen im Mittel bei den CD8 positiven Zellen zu finden und $1,62 \% \pm 2,31 \%$ bei peripherem Blut gemeinsam mit Stammzellapheresat. Die Inkubation mit CMV Lysat ergab bei den CD8 positiven Zellen $0,01 \% \pm 0,02 \%$ IFN- γ und CD69 positive Zellen im peripheren Blut, $1,03 \% \pm 1,46 \%$ im Stammzellapheresat und $0,88 \% \pm 1,32 \%$ in der Kombination aus peripherem Blut und Stammzellapheresat.

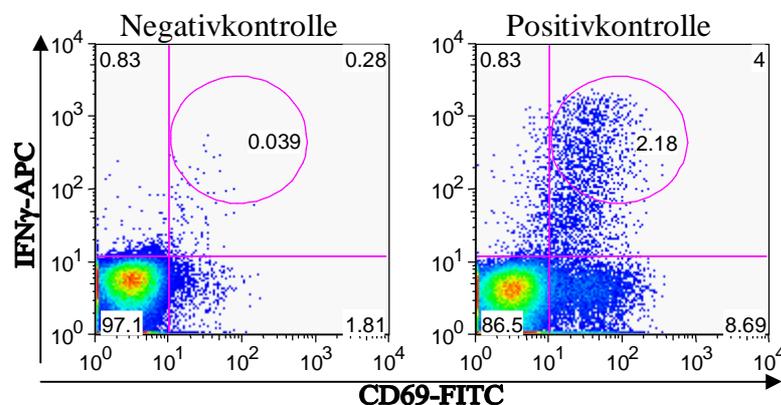


Abb. 16: Positiv- und Negativkontrolle Abgebildet sind von links nach rechts die CD69/IFN- γ positiven Lymphozyten der Negativ- und Positivkontrolle.

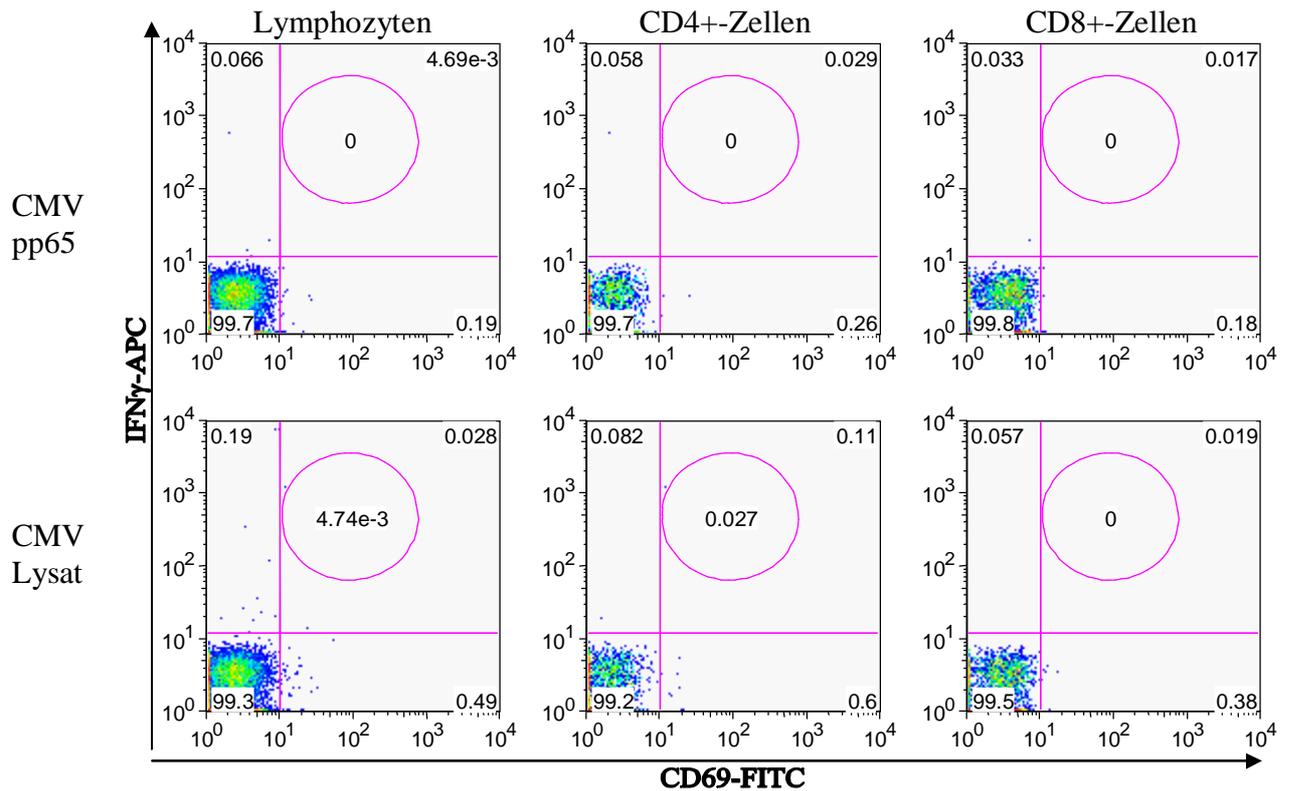


Abb. 17: PB inkubiert mit CMV pp65 bzw. CMV Lysat Von links nach rechts ist für die mit CMV pp65 bzw. CMV Lysat inkubierten Zellen aus PB der Anteil CD69/IFN- γ positiven Zellen in der Lymphozytenpopulation und in den CD4+- bzw. CD8+-Zellen abgebildet.

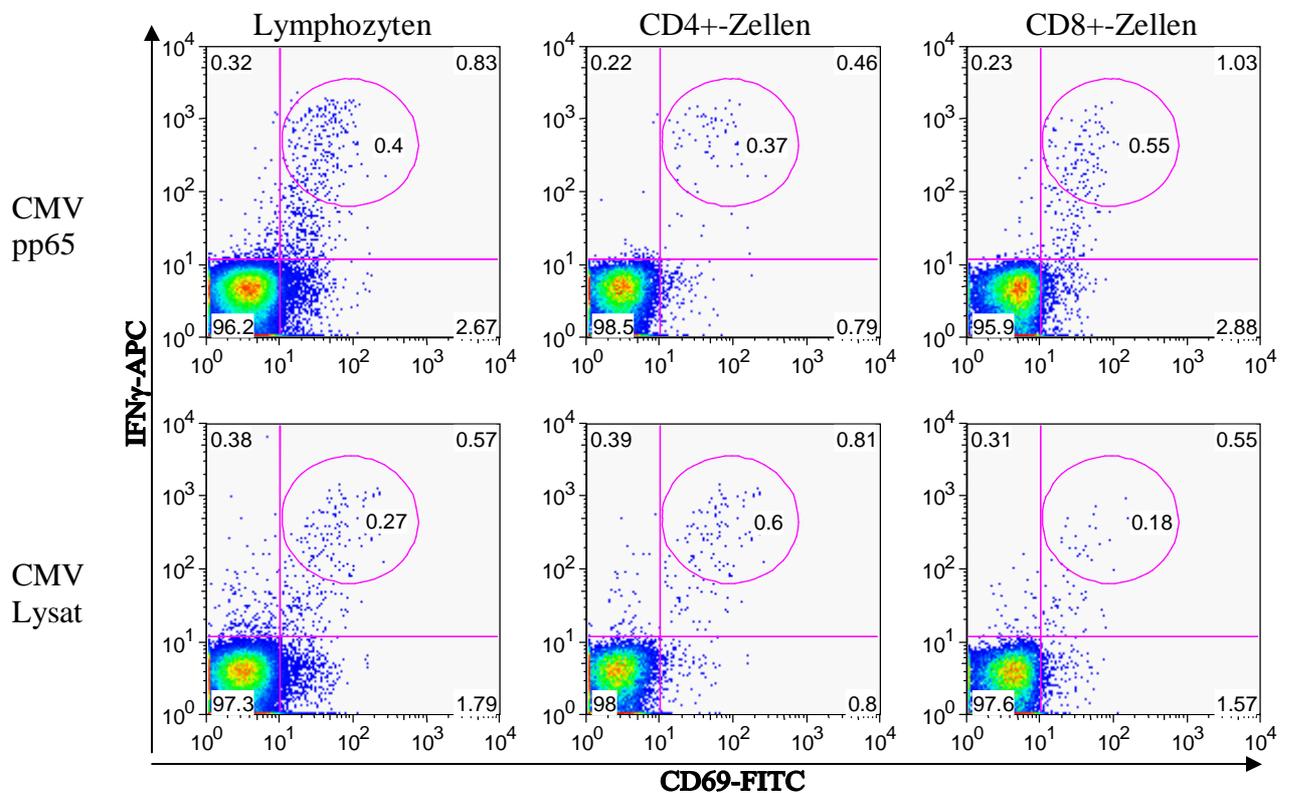


Abb. 18: PBPC inkubiert mit CMV pp65 bzw. CMV Lysat Von links nach rechts ist für die mit CMV pp65 bzw. CMV Lysat inkubierten Zellen aus PB der Anteil CD69/IFN- γ positiven Zellen in der Lymphozytenpopulation und in den CD4+- bzw. CD8+-Zellen abgebildet.

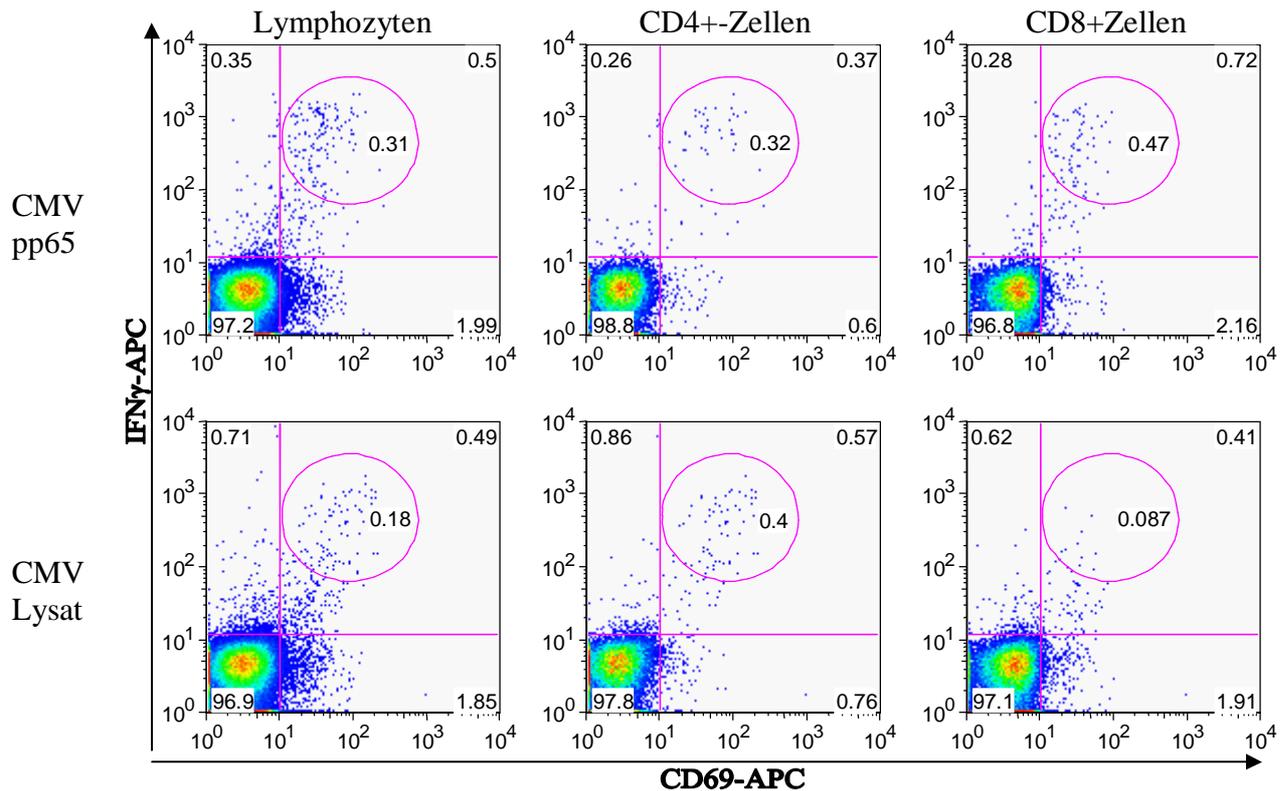


Abb. 19: PB und PBPC inkubiert mit CMV pp65 bzw. CMV Lysat Von links nach rechts ist für die mit CMV pp65 bzw. CMV Lysat inkubierten Zellen der Anteil CD69/IFN- γ pos. Zellen in der Lymphozytenpopulation und in den CD4+- bzw. CD8+-Zellen abgebildet.

Es zeigte sich, dass das Stammzellapheresat allein sich im Vergleich zum peripheren Blut besser stimulieren lässt und eine Kombination von Stammzellapheresat mit peripherem Blut zu keiner Verbesserung der Detektion CMV positiver Zellen führt. Außerdem konnte durch die gleichzeitige Testung auf CMV pp65 und CMV Lysat gezeigt werden, dass es nur geringfügige Unterschiede in der Detektion CMV positiver Zellen nach Zugabe der beiden Reagenzien gab.

Aufgrund der nicht verbesserten Detektierbarkeit von CMV positiven Zellen durch Zugabe von peripherem Blut zum Stammzellapheresat wurde im weiteren Verlauf auf diese verzichtet und nur mit Stammzellapheresat gearbeitet.

5.3 IFN- γ Sekretionsassay

Bei der magnetischen Separation konnte eine große Reinheit an CMV positiven Zellen in der Positivfraktion gewonnen werden, wie dies am Beispiel des Spenders 3 (siehe Abb. 20-21) verdeutlicht wird.

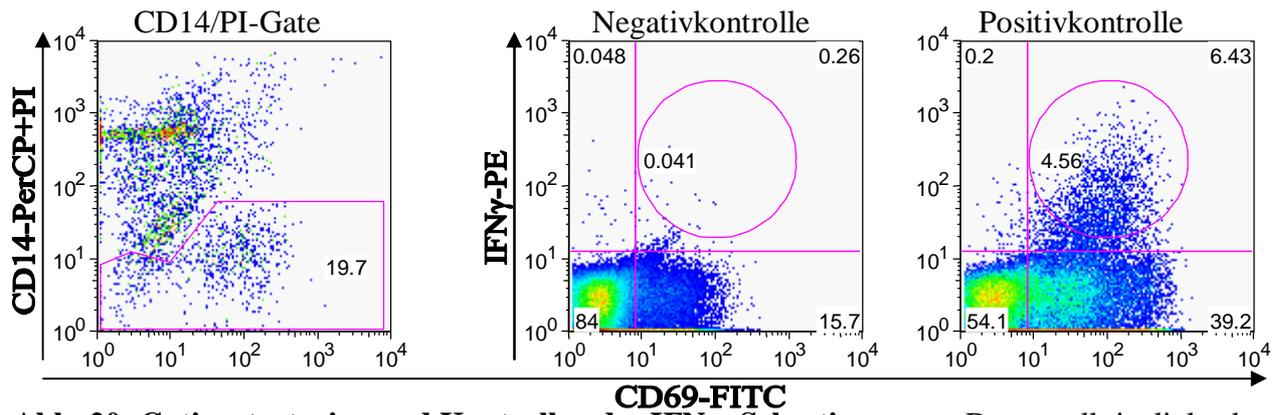


Abb. 20: Gatingstrategien und Kontrollen des IFN γ Sekretionsassay Dargestellt ist links das Ausgaten der Monozyten und toten Zellen und die CD69/IFN γ positiven Lymphozyten der Negativ-(in der Mitte) und Positivkontrolle (rechts).

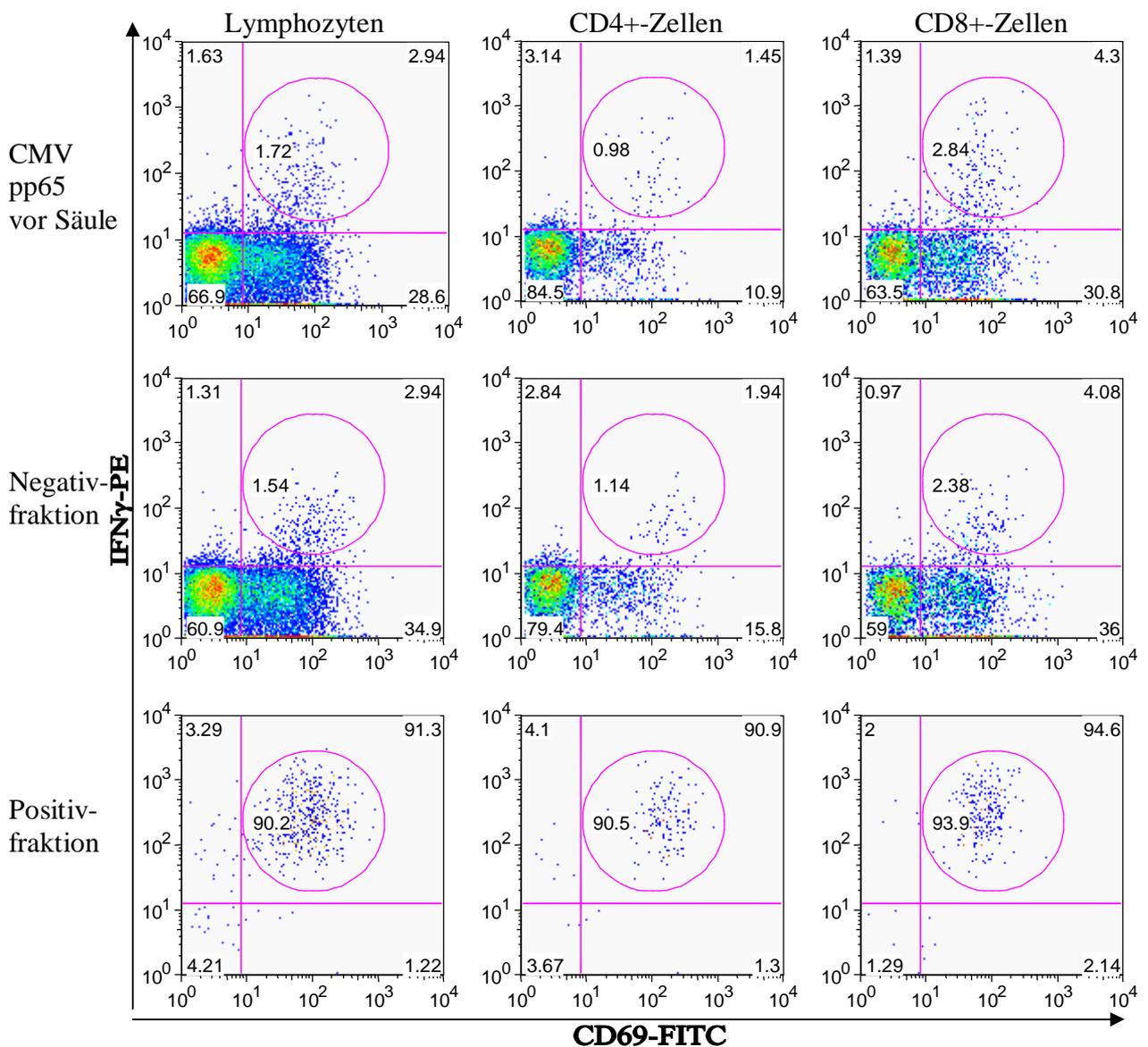


Abb. 21: IFN γ Sekretionsassay Abgebildet sind, jeweils für die mit CMV pp65 inkubierten Zellen vor (oberste Zeile) und nach magnetischer Separation (mittlere und untere Zeile) von der Negativ- und Positivfraktion, der Anteil CD69/IFN γ pos. Zellen in der Lymphozytenpopulation (links) und in den CD4+- (Mitte) bzw. CD8+-Zellen (rechts).

Nachdem die CD14 und PI positiven Zellen ausgegrenzt wurden, wurde aus der eingegrenzten Population die Lymphozytenpopulation ermittelt und von dieser der prozentuale Anteil der IFN- γ und CD69 positiven Zellen bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 wiedergegeben. Außerdem wurde die Anzahl der CD4 und CD8 positiven Zellen, sowie der jeweilige prozentuale Anteil an IFN- γ und CD69 positiven Zellen von diesen ermittelt (siehe Tab. 4).

Tab. 4: IFN- γ Secretion Assay Dargestellt sind für alle 4 Spender die Werte der lebenden Lymphozyten und der davon prozentuale Anteil an IFN- γ und CD69 positiven Zellen. Außerdem wurde von den lebenden Lymphozyten der prozentuale Anteil CD4 und CD8 positiver Zellen ermittelt und von diesen der jeweilige Prozentsatz an IFN- γ und CD69 positiven Zellen. Mit Stammzellapherese des Spenders 3 wurde insgesamt sechs mal die gleiche Versuchsanordnung durchgeführt, deshalb ist in dieser Tabelle für den Spender 3 der Mittelwert aus allen sechs Versuchen genommen wurden.

		Spender Nr.	CD14-/PI- Lymphozyten [%]			IFN- γ +/CD69+ [%]			
			CD4+	CD8+	gesamt	CD4+	CD8+		
vor Säule	CMV pp65	1	55,60	27,10	30,90	00,85	00,72	01,44	
		2	37,30	23,30	33,80	00,24	01,03	00,11	
		3	52,63	26,65	29,67	02,41	01,43	04,29	
		4	53,50	23,50	33,50	01,19	00,64	00,99	
	Mittelwert			51,35	25,98	30,69	01,86	01,22	03,14
	Standard- abweichung			07,88	01,71	02,70	01,17	00,51	02,48
nach Säule	Positiv- fraktion	1	07,18	37,80	36,00	69,70	86,90	89,00	
		2	04,69	40,20	04,52	40,90	92,30	71,40	
		3	16,84	25,10	59,52	79,50	77,86	92,04	
		4	08,44	11,10	55,60	62,20	69,40	82,00	
	Mittelwert			13,06	26,83	49,22	71,29	79,74	87,83
	Standard- abweichung			10,24	09,12	20,06	16,82	13,64	08,09
	Negativ- fraktion	1	63,40	26,00	33,10	00,78	01,10	00,89	
		2	38,50	23,20	35,70	00,25	01,86	00,17	
		3	55,92	26,90	29,53	02,17	00,83	03,42	
		4	60,25	23,00	36,60	01,04	00,45	00,75	
Mittelwert			55,29	25,96	31,40	01,68	00,93	02,48	
Standard- abweichung			09,08	01,86	04,04	01,14	00,50	02,39	

Die höchste Anzahl doppelt IFN- γ und CD69 positiver Zellen in der Positivfraktion nach Separation konnte in einem Versuch mit Spender 3 mit 90,10 % in der gesamten Lymphozytenpopulation und 92,20 % bei den CD4 positiven Zellen, sowie 95,60 % bei den CD8 positiven Zellen, nachgewiesen werden. Bei zwei Spendern (Spender 1 und 2) war der prozentuale Anteil CD4 positiver Lymphozyten in der Positivfraktion geringer als der Anteil CD8 positiver Lymphozyten und bei zwei Spendern (Spender 3 und 4) zeigte sich dieses Verhältnis genau umgekehrt. Von den CD4 bzw. CD8 positiven Zellen in der Positivfraktion war der Anteil von IFN- γ und CD69 positiven Zellen in der CD8 positiven Population bei drei Spendern (Spender 1, 3 und 4) höher als bei der CD4 positiven Population und nur bei einem Spender (Spender 2) überwog der prozentuale Anteil der CD4 positiven IFN- γ und CD69 doppelpositiven Zellen die CD8 positiven IFN- γ und CD69 positiven Zellen.

Im Durchschnitt befanden sich $9,75 \times 10^6 \pm 5,50 \times 10^7$ Zellen vor der magnetischen Separation in der Probe, die mit CMV pp65 inkubiert wurde, und nach der Separation waren davon $9,83 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^5$ Zellen in der Positivfraktion und $8,47 \times 10^6 \pm 4,30 \times 10^6$ Zellen in der Negativfraktion.

5.4 Zellvermehrungsrate nach 3 Wochen Kultivierung

Nach 3 Wochen Kultur erfolgte als erstes die Ermittlung der Zellvermehrungsrate. Die graphische Darstellung der Vermehrungsrate gibt Abb. 22 wieder. Die mittlere Vermehrungsrate betrug $10,90 \pm 2,52$.

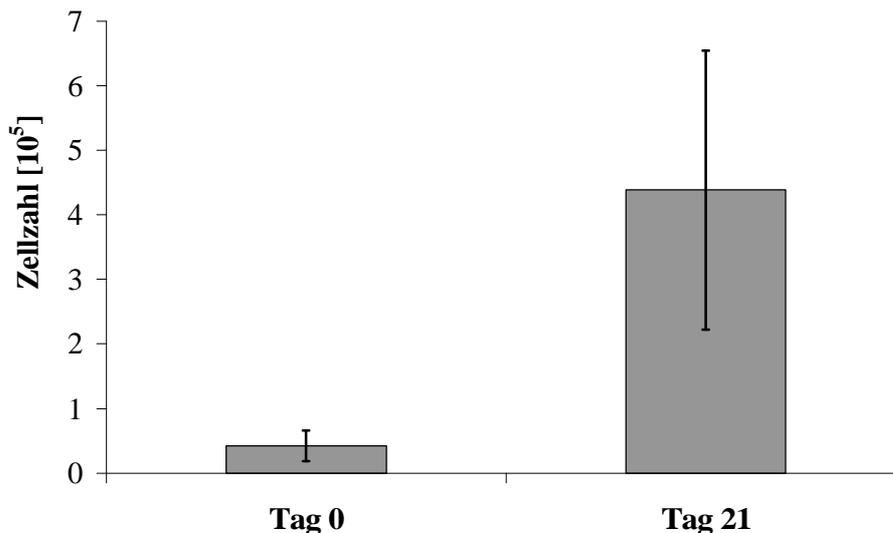


Abb. 22: Zellvermehrungsrate nach 21 Tagen Kultivierung CMV spezifischer T-Zellen Es sind die Mittelwerte der Zellzahlen an Tag 0, also zu Beginn der Kultur, mit Standardabweichung und die Mittelwerte der Versuchsanordnung an Tag 21, also zum Ende der Kultur, mit Standardabweichung für alle 4 Spender aufgetragen.

5.5 Zytokinnachweis nach 3-wöchiger Kultivierung

Nach der Kultivierung wurden mehrere Versuche mit den Zellen durchgeführt. Deshalb stand für den Zytokinnachweis leider nur eine geringe Zellzahl zur Verfügung, was sich auch in den Ergebnissen niederschlägt. Mit einer höheren Zellzahl wären sicherlich eindeutiger Ergebnisse möglich gewesen. So konnte in dem Zytokinnachweis nach 21 Tagen Kultur zwar nachgewiesen werden, dass von den Lymphozyten ein Teil doppelt IFN- γ und CD69 positiv war (siehe Tab. 5). Es war aber nur in einem Versuch möglich auch die CD4 und CD8 positiven Zellen auf ihren Anteil an IFN- γ und CD69 positiven Zellen zu untersuchen.

Tab. 5: Zellvermehrungsrate und Zytokinnachweis nach 21 Tagen Zellkultur Für insgesamt fünf Versuche mit vier Spendern ist die Rate der Zellvermehrung von Tag 0 bis zum Tag 21 der Kultur wiedergegeben. Außerdem ist der prozentuale Anteil der IFN- γ /CD69 positiven Lymphozyten angegeben, der beim Zytokinnachweis nach 21 Tagen Kultur nochmals mit CMV pp65 bzw. mit CMV Lysat inkubiert wurde. Der Mittelwert dieser beiden Werte wurde nach Abzug der Negativkontrolle berechnet.

	Zellvermehrungsrate nach 21 Tagen	IFN- γ +/ CD69+ CMV pp65	Lymphozyten am Tag 21 [%] CMV Lysat	Mittelwert
Spender 1	11,93	0,14	1,09	0,62
Spender 2	07,77	0,18	0,00	0,09
Spender 3/1	12,95	0,09	0,10	0,10
Spender 3/2	08,66	0,16	0,04	0,10
Spender 4	13,20	0,02	0,13	0,08

Im Mittel waren $0,12\% \pm 0,06\%$ der mit CMV pp65 inkubierten Lymphozyten nach 3-wöchiger Kultivierung IFN- γ und CD69 positiv und $0,27\% \pm 0,46\%$ der mit CMV Lysat inkubierten Lymphozyten. Somit sind im Mittel $0,19\% \pm 0,32\%$ der Lymphozyten nach 21-tägiger Kultur als IFN- γ und CD69 positiv detektierbar.

In einem Versuch (siehe Abb. 23-24) konnten $47,20\%$ der mit CMV pp65 inkubierten Lymphozyten als CD4 positiv erkannt werden und $44,50\%$ der mit CMV Lysat inkubierten. Außerdem konnten $7,42\%$ der mit CMV pp65 inkubierten Lymphozyten als CD8 positiv und $4,70\%$ der mit CMV Lysat inkubierten als CD8 positiv ermittelt werden. Von diesen CD4 positiven Zellen, die mit CMV pp65 inkubiert wurden, waren $0,10\%$ IFN- γ und CD69 positiv und für die mit CMV Lysat inkubierten Zellen lag der Wert bei $0,29\%$. Bei den mit CMV pp65 inkubierten CD8 positiven Zellen lag der Wert der doppelt IFN- γ und CD69 positiven CD8 positiven Zellen bei $1,61\%$ und für die mit CMV Lysat inkubierten Zellen bei $0,93\%$.

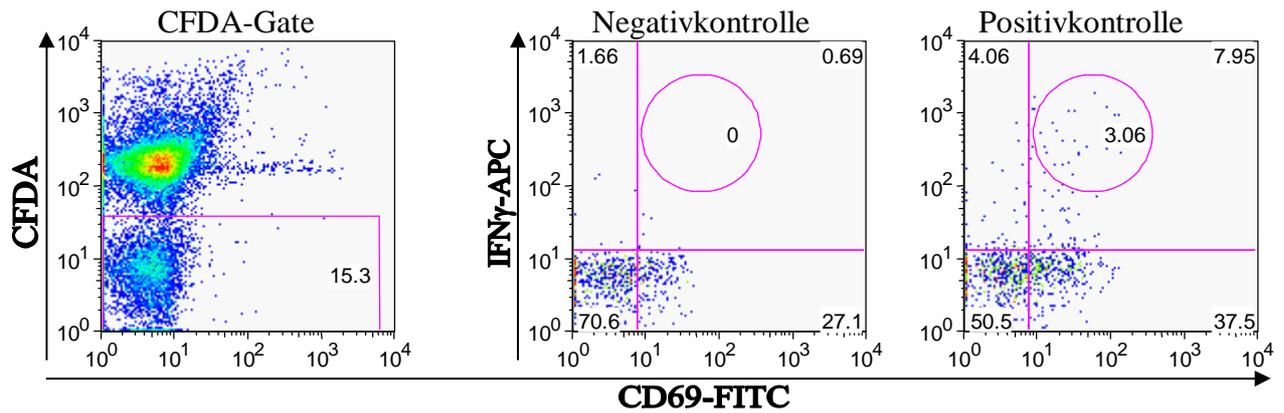


Abb. 23: Gatingstrategien und Kontrollen des Zytokinnachweises nach 3-wöchiger Kultur
 Dargestellt ist rechts das Ausgaten der CFDA gefärbten Stimulatorzellen und daneben die CD69/IFN- γ positiven Lymphozyten der Negativ- und Positivkontrolle.

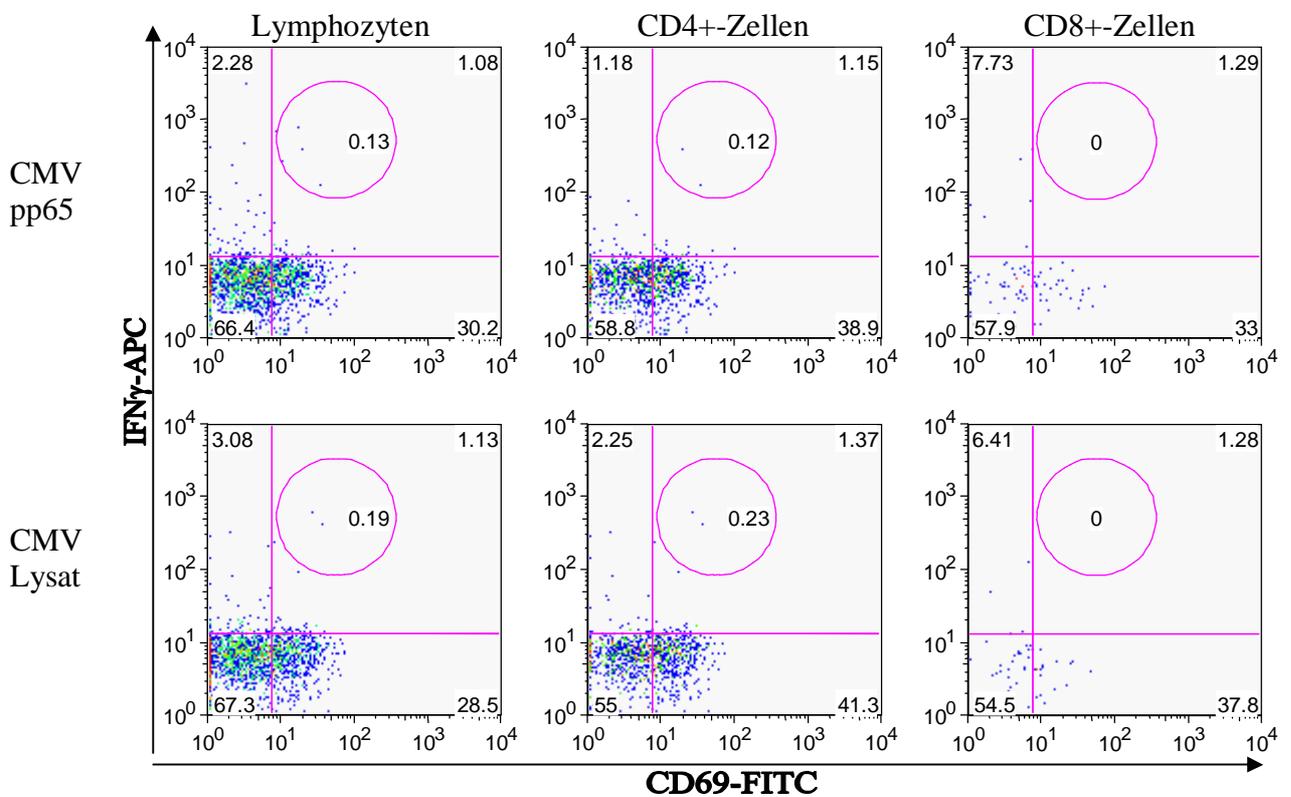


Abb. 24: Zytokinnachweis nach 21 Tagen Kultur Von links nach rechts sind, jeweils für die mit CMV pp65 bzw. CMV Lysat inkubierten Zellen, der Anteil CD69/IFN- γ pos. Zellen in der Lymphozytenpopulation und in den CD4+- bzw. CD8+-Zellen abgebildet.

5.6 MLR

Dieser Versuch wurde mit drei verschiedenen Spendern nach 21-tägiger Kultur durchgeführt. Es wurden alle Ansätze in diesem Versuch dreifach angesetzt. Da nach 21 Tagen Kultur nur eine begrenzte Anzahl von Zellen, nach Abnahme eines Teils der Zellen für den Zytokinnachweis, vorhanden war, wurde die höchst mögliche Anzahl je Versuch eingesetzt. Normalerweise wird für diesen Versuch eine Zellzahl von 1×10^5 Zellen/Well empfohlen. Aufgrund der nicht ausreichenden Zellgesamtzahl, die für die MLR nach 21 Tagen Kultur zu Verfügung stand, wurde diese Zellzahl verringert und es konnte gezeigt werden, dass auch bei einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen/Well eindeutige Ergebnisse erzielt werden. Lag die Zellzahl darunter, so zeigten die Ergebnisse die gleiche Tendenz, aber nach Abzug des Hintergrundes (bestrahlte Stimulatorzellen allein) waren die Werte von Tag 21 unter der Nachweisgrenze (siehe Abb. 25). Die Werte wurden ermittelt, indem von jedem dreifachen Ansatz der Mittelwert berechnet wurde.

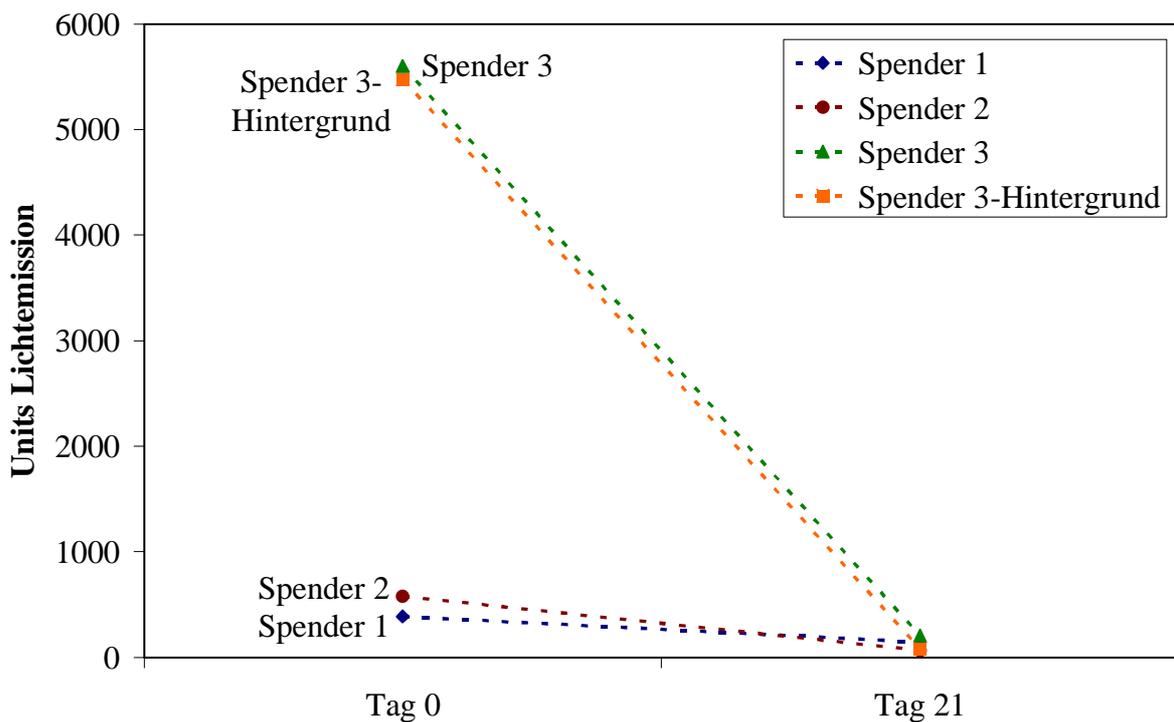


Abb. 25: MLR nach 21 Tagen Kultur Es wurde das Stammzellapheresat von drei Spendern am Tag 0 der Kultur auf ihre Abstoßungsreaktion körperfremder Zellen, die in Units Lichtemission bei der MLR wiedergegeben wurde, untersucht und mit derselben Versuchsanordnung die Reaktion der Spenderzellen nach 21tägiger Kultur verglichen. Aufgrund geringer Zellzahl bei den Versuchen mit Spender 1 und 2 konnte bei diesen Versuchen kein Hintergrund abgezogen werden. Bei dem Versuch mit Spender 3 war dies möglich.

5.7 Elispot

Mit diesem Versuch konnte nachgewiesen werden, dass nach 7 und 21 Tagen Kultur IFN- γ ausgeschüttet wird. Die Ausschüttung wurde nicht nur nach verschiedenen Kultivierungszeiten getestet, sondern auch für verschiedene Interleukinzugaben zur Kultur. Es wurden in einem Ansatz die Hälfte der Zellen mit einem IL-Mix aus IL 2, IL 7 und IL 15 gefüttert und die andere Hälfte nur mit IL 2. Es konnte gezeigt werden, dass es zwischen den verschiedenen Interleukinzugaben keinen großen Unterschied in der Ausschüttung von IFN- γ gab (siehe Abb. 26).

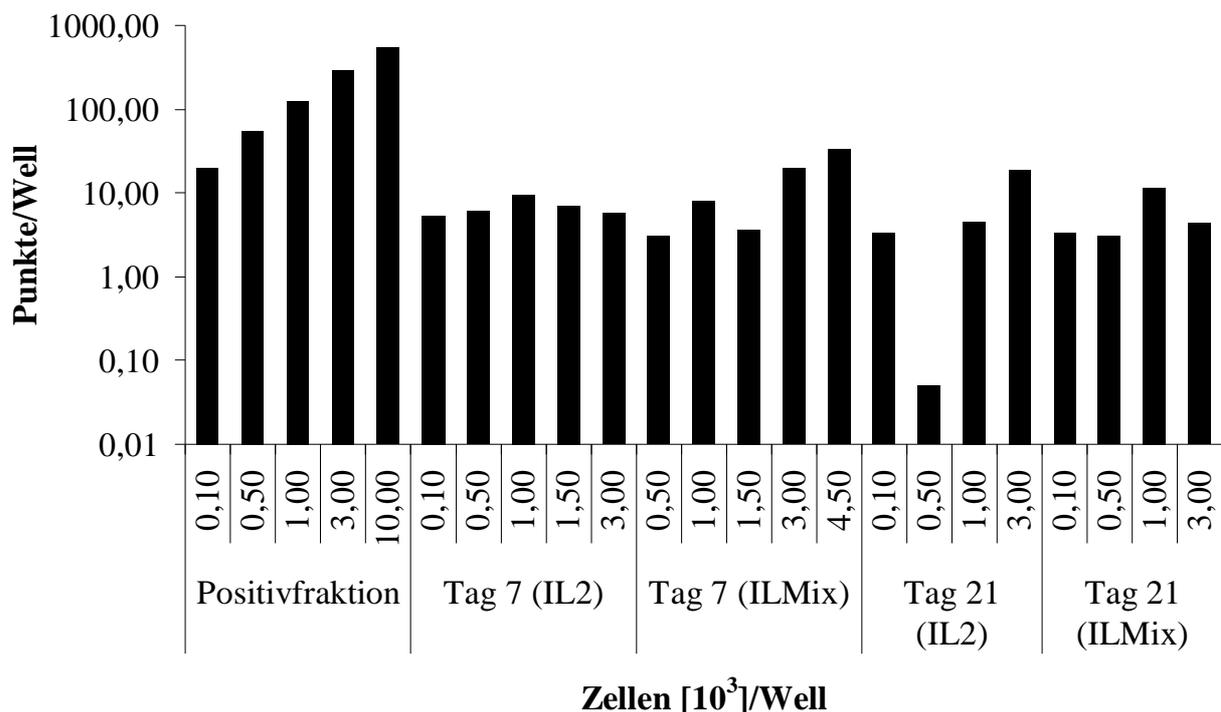


Abb. 26: Elispot nach 21 Tagen Kultur Von dem Stammzellapheresat eines Spenders wurde die Positivfraktion nach Separation, die CMV spezifischen Zellen nach 7 und 21 Tagen Zellkultur mit den oben genannten Zytokinen auf das Vorhandensein einer Sekretion von IFN- γ untersucht. Diese IFN- γ Sekretion zeigte sich in braunen Punkten auf dem Boden der mit spezifisch für IFN- γ Antikörper beschichteten Elispot-Platte. Wobei jeder Punkt auf der Platte ein IFN- γ ausschüttende Zelle repräsentiert.

5.8 Zytotoxizitätsassay

Dieser Versuch sollte dazu dienen, CMV-spezifische T-Zellen unterschiedlicher Versuchsphasen (nach 21 Tagen Kultur, Positivfraktion nach magnetischer Separation und aufgetautes Stammzellapheresat) auf ihr Auslösen einer Apoptose in T2-Zellen, die mit CMV inkubiert wurden, zu untersuchen (siehe Abb. 27-28).

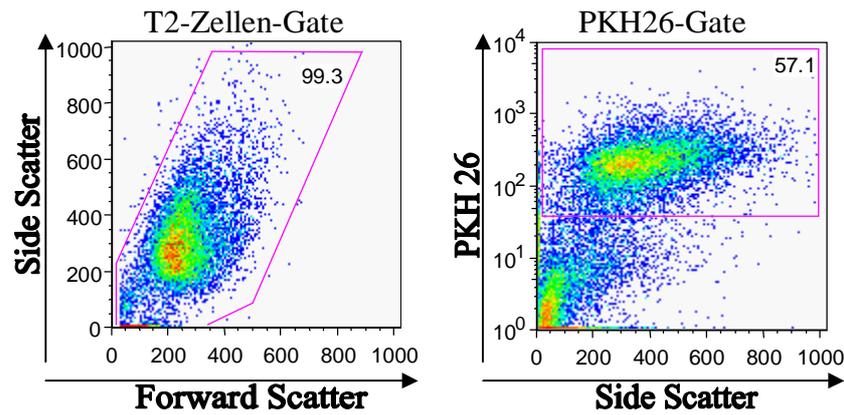


Abb. 27: Gatingstrategien Zytotoxizitätsassay Dargestellt ist rechts das Eingaten der T2-Zellen und links das danach erfolgende Gaten auf die PKH 26 positiven Zellen (die gefärbten Zielzellen).

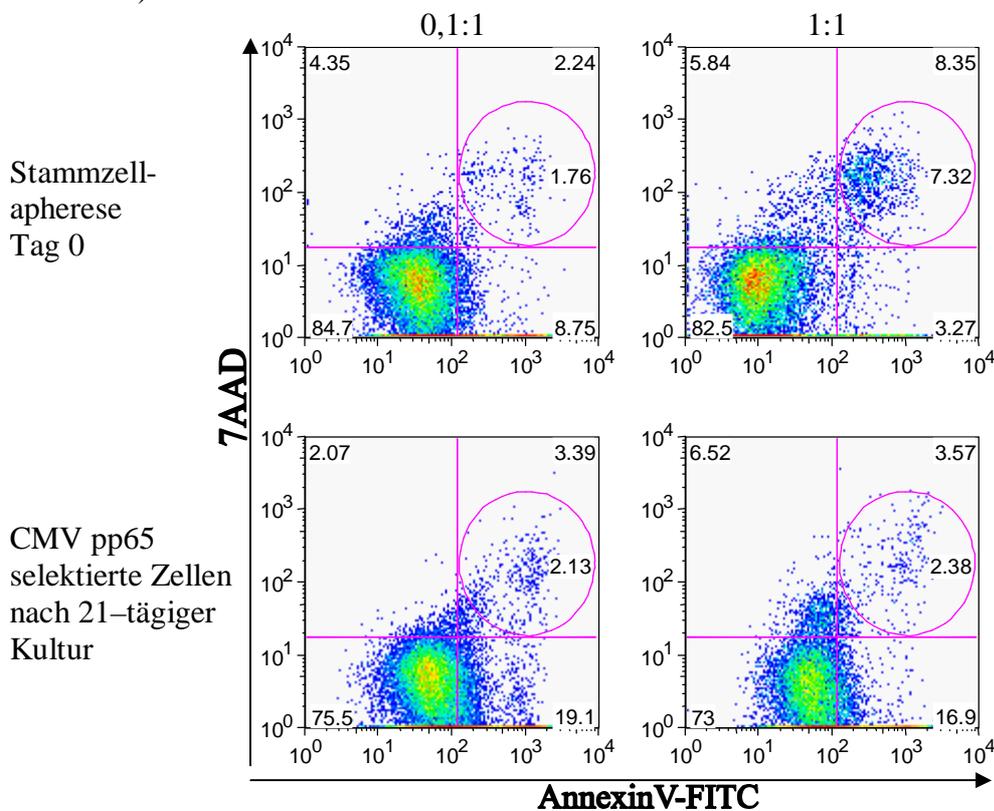


Abb. 28: Zytotoxizitätsassay Abgebildet ist vergleichend von der Stammzellapherese von Tag 0 (oberste Zeile) und den kultivierten Zellen (untere Zeile) der Anteil sowohl 7AAD als auch AnnexinV positiver Zellen bei zwei verschiedenen Verhältnissen von Effektorzellen:Zielzellen.

Durch die Färbung mit AnnexinV konnten die Zellen, die auf dem Weg des Zelltodes sind, angefärbt werden. Mit 7AAD wurden die bereits toten Zellen markiert und später detektiert.

Als Effektorzellen wurden CMV-spezifische T-Zellen nach 21 Tagen, CMV-spezifische Zellen der Positivfraktion und unselektierte Stammzellapheresatzellen verwendet. Es zeigte sich, dass insgesamt mit Zunahme der Effektorzellen die Anzahl der toten Zellen, nach Abzug der Negativkontrolle, zunimmt. So konnte für den Spender 3 bei der Zugabe der CMV-spezifischen T-Zellen nach 21 Tagen zu den T2-Zellen bei Zunahme des Verhältnisses Effektor- zu Zielzellen

(T2-Zellen) von 0, 1: 1 auf 1: 1 eine Zunahme um 3,69 % ermittelt werden. Wurden stattdessen als Effektorzellen die Positivfraktion eingesetzt, betrug die Zunahme 6,49 % und als die Stammzellapheresatzzellen als Effektorzellen eingesetzt wurden, betrug die Zunahme 6,91 %. Bei einem Verhältnis von Effektor- zu Zielzellen 1: 1 ergab sich eine mittlere Anzahl toter Zellen von 4,73 %.

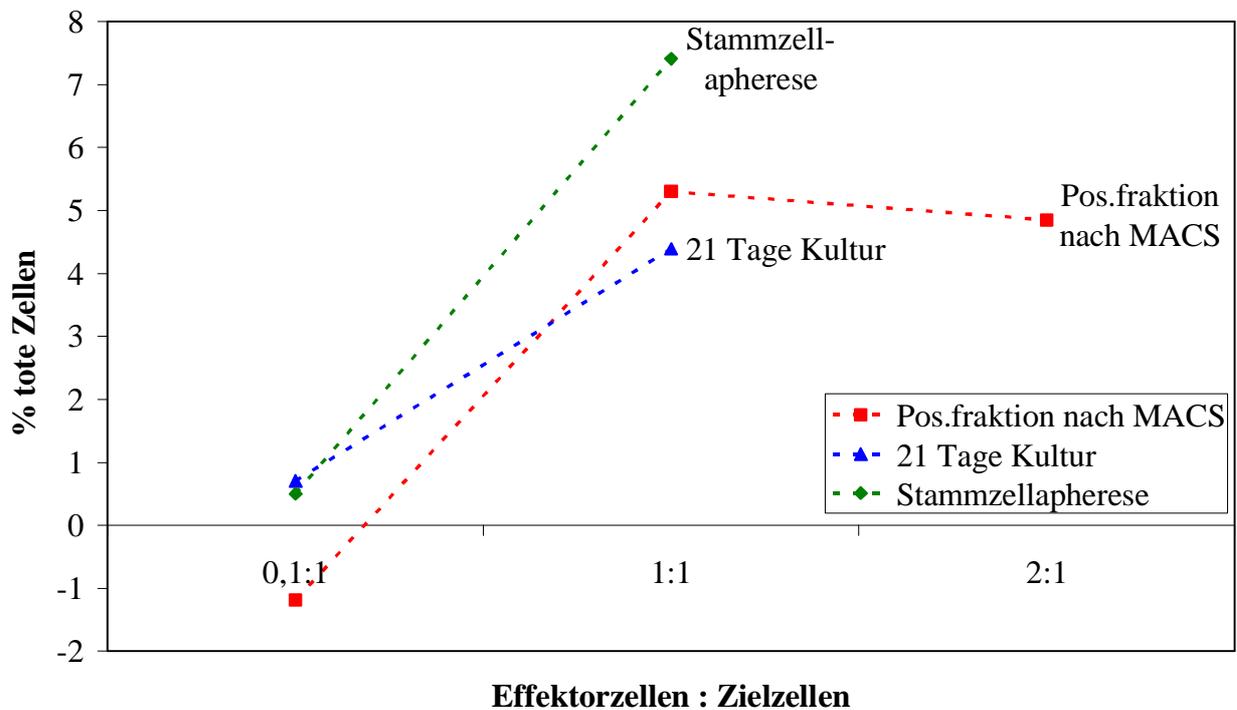


Abb. 29: Zytotoxizitätsassay-Diagramm Wiedergegeben ist die Zunahme des prozentualen Anteils toter Zellen bei Zunahme des Verhältnisses Effektorzellen zu Zielzellen. Dabei wurde das Stammzellapheresat, die Positivfraktion und Zellen nach 21 Tagen Zellkultur vom gleichen Spender vergleichend als Effektorzellen eingesetzt. Als Zielzelle wurde die mit CMV infizierte T2-Zelllinie verwendet.

Aufgrund der geringen Zellzahl nach 21-tägiger Kultur, war es nur in einzelnen Versuchen möglich, das Verhältnis 2: 1 bzw. 5: 1 einzusetzen. Auch bei diesen Versuchen konnte insgesamt eine Zunahme der toten Zellen nachgewiesen werden.

5.9 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab

Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob die Separation CMV pp65 spezifischer Zellen im klinischen Maßstab durchgeführt werden kann. Die Analyse des IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab erfolgte durch FACS-Messung (siehe Abb. 30). Dabei wurde wie bei dem IFN- γ Sekretionsassay, nachdem die CD14 und PI positiven Zellen ausgegrenzt wurden, aus der eingegrenzten Population die Lymphozytenpopulation ermittelt und von dieser

der prozentuale Anteil der IFN- γ und CD69 positiven Zellen ermittelt (siehe Tab. 6). Die Werte der IFN- γ und CD69 Lymphozyten des IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab lagen dabei unter den Mittelwerten des IFN- γ Sekretionsassay, die bei CMV pp65 Testreagenz vor Separation $1,86 \% \pm 1,17 \%$ und nach der magnetischen Separation für die Positivfraktion $71,29 \% \pm 16,82 \%$ und für die Negativfraktion $1,68 \% \pm 1,14 \%$ betragen.

Tab. 6: Werte des IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab Dargestellt ist der Anteil der lebenden Lymphozyten und der davon prozentuale Anteil an IFN- γ und CD69 positiven Zellen. Außerdem wurde von den lebenden Lymphozyten der prozentuale Anteil CD4 und CD8 positiver Zellen ermittelt und von diesen der jeweilige Prozentsatz an IFN- γ und CD69 positiven Zellen.

		CD14-/PI- [%]	Lymphozyten [%]		IFN- γ +/CD69+ [%]		
			CD4+	CD8+	gesamt	CD4+	CD8+
vor magnetischer Separation	CMV pp65	78,75	41,30	30,60	00,23	00,16	00,41
nach magnetischer Separation	Positivfraktion	20,20	36,30	18,30	32,60	31,50	75,80
	Negativfraktion	87,70	43,20	30,10	00,14	00,70	00,23

Außerdem wurde die Anzahl der CD4 und CD8 positiven Zellen, sowie der jeweilige prozentuale Anteil an IFN- γ und CD69 positiven Zellen in dieser Gruppe ermittelt. Der Anteil CD4+-Zellen in der Lymphozytenpopulation des IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab lag über dem Durchschnitt der Werte des IFN- γ Sekretionsassay ($25,98 \% \pm 1,71 \%$ vor Separation, $26,83 \% \pm 9,12 \%$ in der Positivfraktion, $30,69 \% \pm 2,70 \%$ in der Negativfraktion). Der Anteil doppelt positiver IFN- γ und CD69-Zellen lag wiederum unter den Werten des IFN- γ Sekretionsassay ($1,22 \% \pm 0,51 \%$ vor Separation, $79,74 \% \pm 13,64 \%$ in der Positivfraktion, $0,93 \% \pm 0,50 \%$ in der Negativfraktion).

Der Anteil CD8 positiver Zellen (der mit CMV inkubierten Zellen) an der Lymphozytenpopulation (vor allem in der Positivfraktion) lag im IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab unter den Werten des IFN- γ Sekretionsassay ($30,69 \% \pm 2,70 \%$ vor Separation, $49,22 \% \pm 20,06 \%$ in der Positivfraktion, $31,40 \% \pm 4,04 \%$ in der Negativfraktion). Auch der Wert für die doppelt IFN- γ und CD69 positiven Zellen der CD8+-Zellen lag unter den Werten, die im IFN- γ Sekretionsassay erreicht wurden ($3,14 \% \pm 2,48 \%$ vor Separation, $87,83 \% \pm 8,09 \%$ in der Positivfraktion und $2,48 \% \pm 2,39 \%$ in der Negativfraktion).

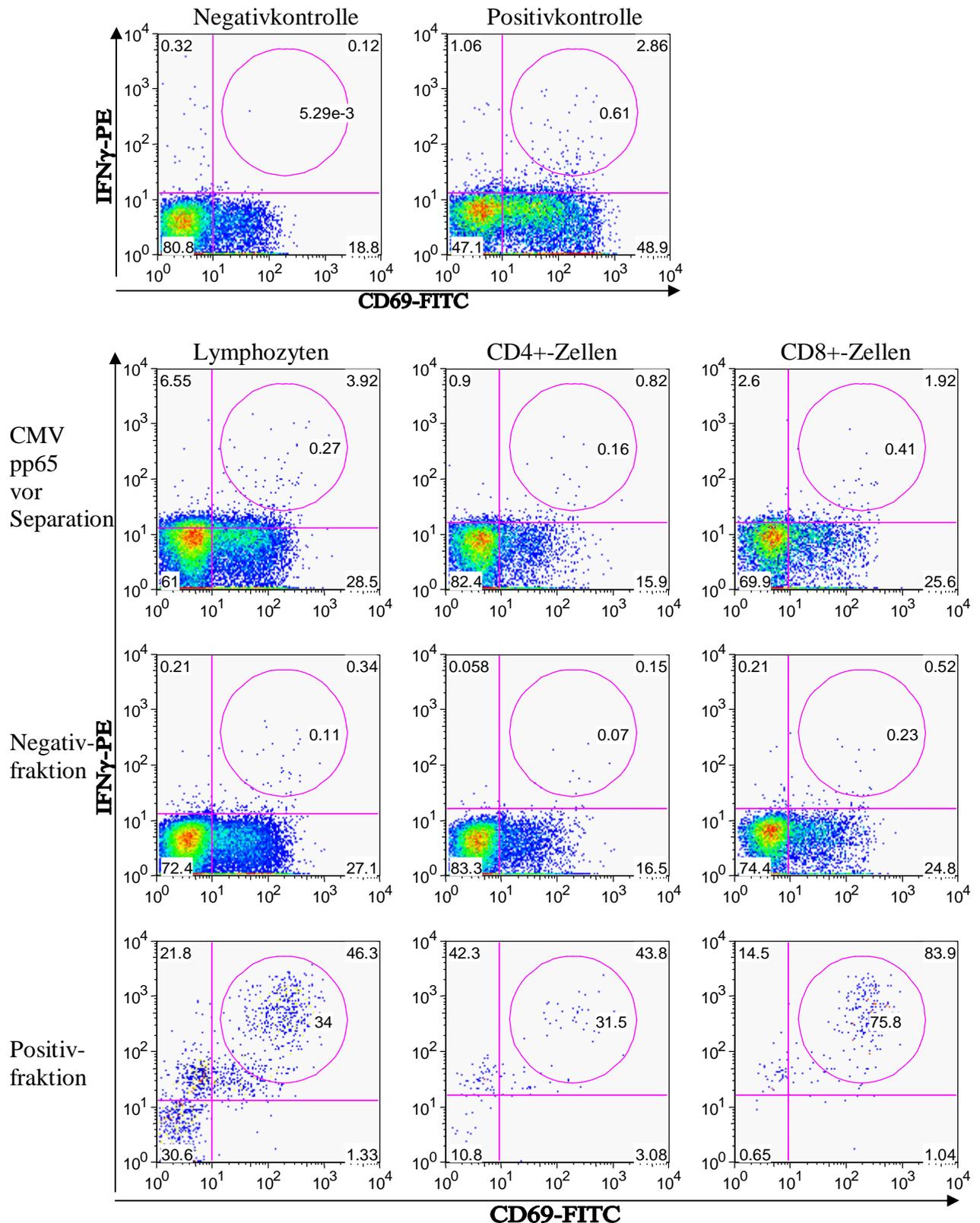


Abb. 30: IFN-g Sekretionsassay im Großmaßstab In der obersten Reihe sind die CD69/IFN- γ positiven Lymphozyten der Negativ- und Positivkontrolle dargestellt. Darunter jeweils für die mit CMV pp65 inkubierten Zellen vor Separation (zweite Reihe), und nach Separation von der Negativ- (dritte Reihe) und Positivfraktion (vierte Reihe), der Anteil CD69/IFN- γ pos. Zellen in der Lymphozytenpopulation (links) und in den CD4+- (Mitte) bzw. CD8+-Zellen (rechts) abgebildet.

Im Bezug auf die Zellzahl befanden sich $1,60 \times 10^8$ Zellen in dem mit CMV pp65 inkubierten Beutel vor der Trennung durch das CliniMACS[®] Plus Instrument und nach erfolgreicher Separation $1,83 \times 10^5$ Zellen in der Positiv- und $1,37 \times 10^8$ Zellen in der Negativfraktion. Im Vergleich zum IFN- γ Sekretionsassay ($9,75 \times 10^6 \pm 5,50 \times 10^7$ Zellen vor Separation, $9,83 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^5$ Zellen in der Positivfraktion und $8,47 \times 10^6 \pm 4,30 \times 10^6$ Zellen in der Negativfraktion) befanden sich demzufolge eine 10-fach verringerte Anzahl Zellen in der Positivfraktion, nämlich 0,11 % der Zellen vor Separation statt 1,01 %. Bei der Negativfraktion war die Zellzahl mit 85,63 % der Zellen vor Separation im Vergleich zu 86,87 % annähernd gleich.

Neben der Stimulation mit CMV pp65 erfolgte in Vorversuchen auch eine Stimulation mit PepTivator-CMV pp65. Im Vergleich zeigte sich jedoch, dass in den mit CMV pp65 inkubierten Zellsuspensionen mehr CMV-spezifische Zellen detektierbar waren und deshalb wurde im IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab weiterhin mit CMV pp65 gearbeitet.

6 Diskussion

6.1 Warum adoptive Immuntherapie bei CMV-Erkrankung nach Stammzelltransplantation?

Nach allogener Stammzelltransplantation können in der Post-Transplantationsperiode verschiedenste bakterielle, virale und parasitäre Erreger sowie Pilze schwere, potentiell letale Infektionen hervorrufen. Deshalb wird ständig nach wirksamen Methoden zur Bekämpfung und Beseitigung dieser Infektionen gesucht. Exemplarisch für bedeutende Virusinfektionen nach Stammzelltransplantation wurden in dieser Arbeit CMV-spezifische Zellen in den Experimenten untersucht.

Die CMV-Erkrankung ist eine ernsthafte Komplikation nach Stammzelltransplantation und die Gegenwart CMV-spezifischer T-Zellen im Transplantat ist für die spätere Wiederherstellung einer schützenden T-Zellantwort unerlässlich. Das Wiedererlangen der peptidspezifischen T-Zellimmunität, Infektions- und Erkrankungsrate werden durch verschiedene Faktoren beeinflusst wie Alter des Empfängers, Herkunft der Spende, Transplantatart, Behandlungsplan, immunsuppressive Therapie, Viruslast, GvHD, Zeit bis zum Anwachsen des Transplantats (Boeckh et al. 2003a; Boeckh et al. 2003b; Hebart et al. 2004; Junghanss et al. 2002; Ljungman et al. 2003; Ljungman et al. 2002b; Ljungman et al. 2006; Reusser et al. 1991).

Eine zeitige und sensitive Detektion einer aktiven CMV-Infektion kann durch verschiedene quantitative Assays erreicht werden, die dadurch die Möglichkeit eröffnen, das Vorkommen und die Prognose der CMV-Erkrankung vorherzusagen (von Muller et al. 2007). Es konnte beobachtet werden, dass Transplantatpatienten mit hoher und sehr dynamisch zunehmender Viruslast prädisponiert für CMV-Erkrankung zu sein scheinen. Wohingegen die meisten Patienten mit niedrigem Level an CMV-Replikation nach Stammzelltransplantation auch ohne antivirale Therapie keine CMV-Erkrankung entwickeln (Emery et al. 2000; Verkruyse et al. 2006).

Da es zunehmend zu Virustatika-resistenten CMV-Isolaten nach Stammzelltransplantation kommt und die Virustatikatherapie darüber hinaus mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist, stellt die adoptive Immuntherapie eine Erfolg versprechende Alternative dar, indem CMV-spezifische Zellen des Spenders auf den Empfänger übertragen werden. So konnte beobachtet werden, dass eine fehlende Rekonstitution der CMV-spezifischen Immunantwort nach allogener Stammzelltransplantation entscheidend für die Entwicklung einer CMV-Erkrankung ist (Krause

et al. 1997; Ljungman et al. 1985; Reusser et al. 1991; Walter et al. 1995) und mit ex vivo generierten, CMV-spezifischen T-Zellen des Spenders, dem Transplantatempfängern eine schützende CMV-spezifische T-Zell-Immunität übertragen werden konnte (Einsele et al. 2002; Riddell et al. 1992; Walter et al. 1995).

6.2 Diskussion der Ergebnisse

Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Beitrag zur Entwicklung der adoptiven Immuntherapie bei CMV-Erkrankung nach Stammzelltransplantation zu leisten.

Es konnte gezeigt werden, dass in eingefrorenem Stammzellapheresat CMV-spezifische T-Zellen besser zu detektieren sind als in kryokonserviertem Blut. Die Selektion CMV-spezifischer T-Zellen mit Hilfe des IFN- γ Sekretionsassay gelang ebenso wie deren Kultivierung. Nach der 21-tägigen Kultivierung stellte sich bei der Untersuchung der Zellen mit Hilfe des Zytokinnachweises und des Elispots heraus, dass CMV-spezifische T-Zellen vorhanden sind. Außerdem konnte mit dem Zytotoxizitätsassay gezeigt werden, dass diese Zellen in der Lage sind CMV-infizierte Zelllinien zu lysieren. Durch die MLR konnte nachgewiesen werden, dass das Abwehrvermögen CMV-spezifischer T-Zellen nach 21-tägiger Kultur gegen körperfremde, nicht CMV-spezifische Zellen, verringert ist, was im Hinblick auf GvHD ein weiterer positiver Aspekt ist. Mit dem IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab wurden die bereits gewonnenen Erkenntnisse und Ergebnisse erfolgreich im klinischen Maßstab umgesetzt. Des Weiteren wurde versucht, mit dem Proliferationsassay einen weiteren Funktionalitätsassay zu etablieren.

6.2.1 Zytokinnachweis

Mit dem Zytokinnachweis konnten CMV-spezifische CD4⁺- und CD8⁺-Zellen in Stammzellapheresat und Blut nachgewiesen werden. Beim Vergleich von aufgetautem Stammzellapheresat und aufgetautem Blut des gleichen Spenders konnte bei allen Spendern beobachtet werden, dass die Prozentzahl der als CMV positiv detektierbaren Zellen bei Blut (0,03 % \pm 0,05 %) unter dem Wert des Stammzellapheresat (0,73 % \pm 0,74 %) lag.

Zu beobachten war dabei zusätzlich, dass bei den aufgetauten Blutproben der CMV positiven Spender die Anzahl der CMV positiv detektierbaren Zellen immer unter den Werten der nicht vorher kryokonservierten Blutproben der CMV positiven Personen im Labor (0,22 % \pm 0,18 %) lag. Deshalb liegt die Vermutung nahe, dass die Detektierbarkeit CMV spezifischer Lymphozyten durch das Einfrieren der Blutproben abnimmt. In weiteren Experimenten könnte dies genauer untersucht werden, indem z.B. eine Blutprobe zur Hälfte kryokonserviert und die

andere Hälfte nicht und anschließend beide Proben in Hinsicht auf die Anzahl detektierbarer CMV positiver Zellen verglichen werden. Bei Stammzellapheresat war dieser Unterschied durch die Kryokonservation nicht zu beobachten. Der Vergleich Stammzellapheresat und Blut erfolgte, um zu untersuchen, ob es einen Unterschied in der Anzahl CMV positiv detektierbarer Zellen zwischen Blut und Stammzellapheresat gibt und ob es durch eine Zugabe von peripherem Blut zum Stammzellapheresat aufgrund von Kostimulation zu einer Steigerung der detektierbaren CD4 und CD8 positiven Zellen kommt. Hinsichtlich der Beobachtungen anderer Forschungsgruppen, die eine abnehmende Antigenpräsentation und eine Veränderung des Th1/Th2-Verhältnisses in G-CSF mobilisierter Stammzellapherese im Vergleich zu nicht mobilisierter bzw. Blut beobachteten, waren diese Ergebnisse unerwartet. Angesichts der von Rondelli et al. (Rondelli et al. 1998) beschriebenen, signifikanten Reduktion von CD14+-Monozyten in G-CSF mobilisierten Stammzellapherese im Vergleich zu unbehandelten Zellen, würde man aufgrund der dadurch verringerten Antigenpräsentation eine Abnahme der Detektierbarkeit CMV-spezifischer Zellen in G-CSF mobilisiertem Stammzellapheresat erwarten.

Sloand et al. (Sloand et al. 2000) beschreibt die Verschiebung des Th1/Th2 Verhältnisses durch G-CSF zu Gunsten von Th2. Durch die daraus resultierende, verringerte Anzahl von Th1-Zellen sollte auch die Anzahl an CD8+-Zellen vermindert sein, da die Th1-Zellen die Generierung dieser fördern.

Da es aber in dieser Arbeit zu keiner Verschlechterung der Generierung CMV-spezifischer Zellen bei Verwendung von G-CSF mobilisierten Stammzellapheresat im Vergleich zu nicht mobilisierten Blut kam, eher im Gegenteil, eröffnet sich die Möglichkeit, in Zukunft G-CSF mobilisierte Stammzellapheresat einzusetzen, anscheinend ohne den vermuteten Antigenpräsentationsverlust und Abnahme des prozentualen Anteils der Th1-Zellen.

In der Literatur wird auch beschrieben, dass die CMV-Detektion in Plasma meist weniger sensitiv als in Blutzellen (Von Muller et al. 2002) ist. Aber Tests in Plasma scheinen weniger zeitaufwändig, leichter durchführbar und besser standardisierbar zu sein. So wurden vor kurzem sensitivere CMV PCR-Tests für Plasma etabliert (Boeckh et al. 2004; Kalpoe et al. 2004). Von Müller et. al (von Muller et al. 2007) hat vergleichsweise die CMV-Detektion in Blutzellen und Plasma untersucht und dabei herausgefunden, dass es grundlegende Unterschiede in der CMV-Detektion gibt und dadurch vielleicht die CMV-Detektion in Blutzelle und Plasma alleine eher limitiert ist. Deshalb vermutet er, dass CMV-Monitoring in Vollblut besser sein könnte als nur in Blutzellen bzw. Plasma, was aber noch in weiteren Studien untersucht werden muss.

Für zukünftige Experimente wäre aus diesem Grund noch einmal zu überlegen, ob die CMV-Detektion aus Stammzellapheresat allein ausreichend ist oder doch lieber mit Vollblut erfolgen sollte.

6.2.2 IFN- γ Sekretionsassay

Es konnte mit Hilfe der magnetischen Separation eine große Reinheit an doppelt IFN- γ und CD69 positiven Zellen bei den Lymphozyten erreicht werden (71,29 % \pm 16,82 %). Mit Abnahme der CD14/PI negativen Zellen von 51,35 % \pm 7,88 % vor MACS auf 13,06 % \pm 10,24 % in der Positivfraktion zeigt sich eine prozentuale Zunahme des Anteils von toten Zellen und Monozyten nach magnetischer Separation in der Positivfraktion. Diese Zunahme dürfte vor allem auf die bei der magnetischen Separation auftretende Zurückhaltung der toten Zellen in der Säule und infolge des Trennprozesses zunehmende Anzahl geschädigter Zellen zurückzuführen sein. Durch anschließende Kultivierung der Positivfraktion befinden sich somit sehr viele dieser Zellen in der Kultur. Um trotzdem das richtige Verhältnis von Positivfraktion zu Feederzellen pro Well zu haben, war es wichtig, bei der Zellzählung nach der magnetischen Separation nur die wirklich lebenden Zellen zu zählen. Stimmt dieses Verhältnis nicht und befinden sich zum Beispiel zu wenig lebende, positiv selektierte Zellen in Kultur, kann dies dazu führen, dass durch die verringerte Zelldichte die Kommunikation und gegenseitige Stimulation der Zellen eingeschränkt ist und somit die Zellen in ihrem Wachstum gehemmt sind. Dies wirkt sich wiederum auf die Ausbeute der Zellen nach der Kulturzeit aus.

Aufgrund der sich an die Separation anschließenden durchflußzytometrischen Messung und anschließenden Auswertung mit FlowJo lässt sich zumindest die theoretisch zu erwartende Anzahl CMV positiver T-Zellen nach magnetischer Separation, also in der Positivfraktion, ermitteln. Dabei wird der Anteil IFN- γ /CD 69 positiver Zellen in der Lymphozytenfraktion vor magnetischer Zellseparation als CMV spezifische Zellen gewertet und aus der Gesamtzellzahl die Zellzahl dieses Anteils ausgerechnet. Im Durchschnitt war die Zellzahl vor magnetischer Separation $9,75 \times 10^6 \pm 5,50 \times 10^6$, von denen im Mittel 1,86 % \pm 1,17 % der Lymphozyten IFN- γ und CD69 positiv waren, was eine zu erwartende Zellzahl von ca. $1,82 \times 10^5$ Zellen in der Positivfraktion ergibt. Tatsächlich waren im Durchschnitt $9,83 \times 10^4 \pm 1,41 \times 10^5$ Zellen in der Positivfraktion. Damit wurde in etwa die zu erwartende Zellzahl erreicht, wenn man bedenkt, dass durch die magnetische Separation und Zentrifugationsschritte ein Verlust an CMV positiven Zellen zu erwarten ist.

6.2.3 Zellvermehrungsrate nach 21 Tagen Kultur

Veranlasst durch Literaturangaben wurde eine Vermehrungsrate von 100 nach 3-wöchiger Kulturzeit erwartet. Doch leider konnten in den Versuchen nur eine mittlere Vermehrungsrate von 10,90 erreicht werden. Die Ursache dafür kann unter anderem, wie oben beschrieben, darin liegen, dass bei der Zellzählung nach Selektion von einer zu hohen Anzahl lebender Zellen in der Positivfraktion ausgegangen wurde und das Verhältnis CMV-spezifische Zellen zu Feederzellen nicht korrekt war und damit keine optimalen Bedingungen für die Kultur geschaffen wurden.

Aufgrund des Rundbodens war es bei der mikroskopischen Beobachtung der Zellen vor der Zugabe der Interleukinmischung schwer, eine genaue Aussage darüber zu machen, wie viele Zellen sich in jedem Well befinden und wie der Zustand der einzelnen Zellen ist. Da das Medium kein Phenolrot enthielt, konnte dieser Farbindikator nicht zur Bestimmung der Kulturbedingungen herangezogen werden. Ein mehrmals durchgeführter pH Test des Kulturmediums nach der Kultur zeigte aber keine Verschiebung des pH Bereiches. Es konnte somit nicht genau ermittelt werden, ob optimale Bedingungen für die Zellen vorliegen und demzufolge könnten nicht optimale Kulturbedingungen zu der geringen Zellzahlzunahme geführt haben.

6.2.4 Benötigte Zellzahl für den klinischen Einsatz

Für den adoptiven Transfer CMV-spezifischer T-Zellen ist es wichtig zu wissen, wie hoch die Zelldosis und das Verhältnis von CD4⁺ T-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen zur Infusion sein sollte, um den erwünschten Erfolg zu erreichen. Zum Ermitteln dieser Zelldosis wird die Körperoberfläche des Patienten abgeschätzt. Sie hängt aber auch von anderen Faktoren wie der Fähigkeit der infundierten Zellen zur Persistenz bzw. Expansion in vivo, der Migration zu entscheidenden Lokalisationen, der antigenwirksamen Funktion und der Antigenlast des Patienten ab (Ho et al. 2002). Bisher ist noch nicht klar, wie hoch die Zelldosis im Einzelfall sein sollte. So infundierte Einsele (Einsele et al. 2002) 1×10^7 in vitro expandierte T-Zellen pro m² Körperoberfläche zur Therapie von HCMV-Infektionen und mit dieser Zelldosis profitierten 5 von 7 Knochenmarktransplantierten Patienten von einer länger andauernden Wirkung. Walter (Walter et al. 1995) erreichte mit 1×10^9 T-Zellen/m² zur HCMV-Prophylaxe eine gute Wirkung ohne signifikante Nebenwirkungen bei 14 Knochenmarktransplantierten Patienten. Bei der CMV-Immuntherapie mittels CD8⁺ T-Zellen durch adoptiven Transfer von bis zu 5×10^9 /m² T-Zellklonen durch Riddell (Riddell et al. 1992) wurde eine länger anhaltende Immunität nur bei Patienten mit endogener Rekonstitution CMV-spezifischer CD4⁺ T-Zellen erzielt. Andererseits

war der adoptive Transfer von $1 \times 10^6 - 5 \times 10^6$ CMV-spezifischen CD4+ T-Zellen ausreichend, eine CMV-Virämie zu beseitigen, allerdings nur bei Patienten, bei denen eine endogene CD8+ T-Zellantwort auftrat (Einsele et al. 2002).

Für Patienten nach Transplantation solider Organe kann der T-Zellbedarf aufgrund einer in der Regel vergleichsweise stärker supprimierten T-Zellimmunität und deshalb geringeren Expansion der infundierten Zellen in vivo um einiges höher sein.

Da die Frage nach der Anzahl CMV-spezifischer T-Zellen und dem Verhältnis von CD4+ T-Zellen zu CD8+ T-Zellen zur Prävention und/oder Therapie einer CMV-Virämie bisher nicht eindeutig geklärt ist, es sich aber eher um ein klinisches Problem handelt, wurde dieser Punkt in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Für weitere Experimente ist dies aber durchaus interessant zu wissen, da so die Experimente darauf ausgerichtet werden können, dass eine ausreichende Zellzahl und Verhältnis von CD4+ T-Zellen zu CD8+ T-Zellen erreicht werden.

6.2.5 MLR

Es wurde berichtet, dass, obwohl sich in peripheren Blutstammzellen von G-CSF-mobilisierten Spendern die 10-fache Anzahl an T-Zellen im Vergleich zu Knochenmark befindet, die Inzidenz und der Schweregrad von GvHD in Empfängern von G-CSF mobilisierten, peripheren Blutstammzellen nicht höher ist als nach allogener Transplantation von unbehandeltem Knochenmark. Es werden verschiedene Ursachen dafür diskutiert. So ist Arpinati et al. (Arpinati et al. 2000) der Meinung, dass durch die G-CSF-Gabe es zu einer Verschiebung des Verhältnisses innerhalb der dendritischen Zellen kommt, was wiederum einen Einfluss auf die CD4+-Zellen hat und letztendlich sich auf die Alloreaktivität auswirkt. So stellte er fest, dass sich nach einer 5-tägigen G-CSF-Behandlung die Anzahl der lymphoiden dendritischen Zellen (DC2) erhöht, während die Anzahl der myeloiden dendritischen Zellen (DC1) sich nicht veränderte. Da die DC1 die Fähigkeit haben, naive T-Zellen in Th1 Effektorzellen und DC2 in Th2 Effektorzellen zu differenzieren, verändert die zunehmende Anzahl der DC2 auch das Verhältnis innerhalb der CD4+-Zellen mit Zunahme der Th2-Zellen. Th1-Zellen produzieren IFN- γ und fördern die Generierung von CD8-T-Zellen und mononukleären Phagozyten, die wiederum gegen Viren und andere intrazellulären Mikroben schützen. Im Gegensatz dazu produzieren Th2-Zellen IL-4 und IL-10 und sind an der allergischen Reaktion beteiligt. Daher vermutet Arpinati, dass die Erhöhung des Anteils der Th2-Zellen sich positiv auf die GvHD auswirkt, trotz der 10-fachen Anzahl von T-Zellen in G-CSF mobilisierten, peripheren Blutstammzellen. Auch Sloand et al. (Sloand et al. 2000) beschreibt den Zusammenhang

zwischen Th1/Th2-Verhältnis und GvHD. Wobei er aber der Meinung ist, dass G-CSF direkt zur Zunahme von Th2 und somit zur Abnahme der GvHD führt.

Aufgrund dieser Ergebnisse ist eine vergleichbare Reaktion von G-CSF mobilisierter Stammzellapherese und nicht mit G-CSF behandeltem Blut in der MLR wahrscheinlich. In dieser Arbeit wurde in der MLR aber vor allem die Alloreaktivität im Bezug auf die Kulturdauer betrachtet und es konnte gezeigt werden, dass durch diese die Alloreaktivität noch weiter abnimmt und somit GvHD vermindert wird. Außerdem musste aufgrund der geringen Zellzahl, die nach Kultur zur Verfügung stand, die Zellzahl pro Well verringert werden und es konnte gezeigt werden, dass ab einer Zellzahl von 5×10^4 Zellen/Well eindeutige Ergebnisse erzielt werden können.

6.2.6 ELISpot

Hobeika et al (Hobeika et al. 2005) verglich die Einschätzung der antigenspezifischen T-Zellreaktion durch Peptid-MHC-Tetramere und IFN- γ -Elispot-Assays und fand heraus, dass beide Methoden vergleichbare Spezifität und Sensitivität haben. Trotz Anwendung zweier verschiedener Methoden für die Routine CMV-Erkennung (PCR und Antigenämie-Assay) wurden keine widersprüchlichen Ergebnisse beobachtet. Wie bereits publiziert, sind beide Methoden für die Frühdiagnostik einer aktiven CMV-Infektion geeignet (Bonon et al. 2005) und zeigen eine statistisch signifikante Beziehung zwischen Viruslast, gemessen mit PCR und pp65 positiven Leukozyten (Garrigue et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde der IFN- γ -Elispot-Assay zum Nachweis CMV-spezifischer Zellen (die IFN- γ ausschütten) nach MACS (vor Kultivierung) und nach 7 bzw. 21 Tagen Kultur verwendet. Bei dem verwendeten Elispot wurden die Zellen ohne Automat von Hand gezählt. Da es keine genauen Angaben gibt, ab welcher Größe und Aussehen ein Punkt in der Elispotplatte auch wirklich als ein Punkt gewertet werden soll, ergibt sich natürlich eine Fehlerquelle. Aber es konnte mit diesem Versuch gezeigt werden, dass zu jeder Zeit bei jeder Konzentration CMV-spezifische Zellen, die IFN- γ ausschütten, vorhanden sind. Für weitere Tests mit dieser Methode wäre eine automatische Zählung der Punkte wünschenswert.

6.2.7 Spezifitätsverlust nach unspezifischer Expansion?

Es gibt Arbeitsgruppen, die einen Spezifitätsverlust nach unspezifischer Expansion bei ihren Versuchen beschreiben. So berichtet Sili (Sili et al. 2003), der T-Zellen nach einmaliger Stimulation mit pp65-exprimierenden transgenen dendritischen Zellen unspezifisch expandierte,

von einem Verlust der anfangs nachgewiesenen Antigen-spezifität nach zweimaliger Stimulation. Die Arbeitsgruppe um Szmania (Szmania et al. 2001) führte eine Zellexpansion nach Selektion durch pp65-Tetramere mit Hilfe von allogenen Feederzellen, allogenen, Tetramer-gepulsten lymphoblastoiden Zelllinien sowie verschiedenen Zytokinen durch und beschrieb nach einer anfänglich sehr schnellen Expansion einen leichten Spezifitätsverlust von 94,50 % – 99,00 % Tetramer-spezifischen Zellen zu 75,40 % - 86,00 %. Im Zytotoxizitätsassay kam es aber trotzdem zu einer HCMV-spezifischen Lyse.

Im Gegensatz dazu beschreibt Bissinger (Bissinger et al. 2002), der T-Zelllinien nach Einzelpeptid-Stimulation und magnetischer Separation, durch autologe und allogene Feederzellen unspezifisch expandierte, auch nach 2-4-wöchiger Kultur keinen Verlust der Spezifität.

Wir konnten bei unseren Versuchen ebenfalls einen Spezifitätsverlust feststellen. So war im Elispot schon nach 7 Tagen im Vergleich zu Tag 0 (Positivfraktion nach magnetischer Separation) eine Verringerung der Anzahl IFN- γ sezernierender Zellen zu beobachten und auch bei dem vergleichenden Zytokinnachweis der Positivfraktion von Tag 0 mit den Zellen nach 21 Tagen Kultur zeigt sich dieser Spezifitätsverlust. So sind anfänglich im Mittel 71,29 % \pm 16,82 % der Lymphozyten IFN- γ und CD69 positiv und nach 21 Tagen Kultur nur noch 0,19 % \pm 0,32 %.

Dies kann daran liegen, dass die für den Zytokinnachweis nach 21 Tagen Kultur zur Verfügung stehende Zellzahl zu gering war und in der Zellsuspension nach 21 Tagen Kultur nicht nur CMV-spezifische T-Zellen, sondern auch Feederzellen, tote Zellen, Zelltrümmer usw. enthalten waren, die zu einer Verfälschung der Werte geführt haben könnten. Dennoch ist es uns gelungen, anhand von Elispot und Zytotoxizitätsassay zu zeigen, dass die Zellen nach 21 Tagen Kultur noch in der Lage sind, IFN- γ zu produzieren und CMV-infizierte Zellen zu lysieren.

6.2.8 IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab

Aufgrund der Erkenntnisse und Ergebnisse, die mit dieser Arbeit bisher gewonnen werden konnten, war die Durchführung eines IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab mit anschließender Untersuchung der Funktionalität der Zellen durch FACS Analyse, MLR, Zytotoxizitäts- und Proliferationsassay vorgesehen. Im Unterschied zum IFN- γ Sekretionsassay wurde für den Assay im Großmaßstab eine größere Zellzahl (5×10^8 Zellen statt $2,05 \times 10^7 \pm 6,08 \times 10^6$) als Ausgangsmenge genommen und die Zellen nicht über MS-Säulen, sondern durch das

CliniMACS[®] Plus Instrument selektiert. Geplant war die dreimalige Durchführung des IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab. Bei dem ersten Versuch wurde das kryokonservierte Stammzellapheresat eines Spenders verwendet, das bereits im IFN- γ Sekretionsassay verwendet wurde. Obwohl bei mehreren IFN- γ Sekretionsassay eine gute Selektion CMV-spezifischer Zellen bei diesem Spender gelang, war es nicht möglich, eine Selektion im Großmaßstab durchzuführen. Es befanden sich zwar Zellen in der Positiv- und Negativfraktion, doch diese waren nicht CMV-spezifisch. Später stellte sich dann aufgrund von Farbunterschieden der Reagenzien heraus, dass die Firma, von der das Kit für den IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab bezogen wurde, bei der Beschriftung der Gefäße einen Fehler gemacht hatte und so das Catchmatrix Reagent und Enrichment Reagent vertauscht worden waren. Auch der dritte Versuch konnte nicht korrekt durchgeführt werden, da die für das CliniMACS[®] Plus Instrument benötigten Materialien von der Firma nicht ausgeliefert wurden. Aus diesem Grund wurde der IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab nur bis zu dem Schritt, bevor die Beutel in das CliniMACS[®] Plus Instrument zur Separation gegeben werden, durchgeführt. Somit ist der zweite Assay der einzig komplett und korrekt durchgeführte IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab.

Bei der FACS Analyse der erfolgreichen Selektion der CMV-spezifischen Zellen durch den zweiten IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab war die Reinheit an CMV-spezifischen Zellen in der Lymphozytenpopulation und den CD4⁺- bzw. CD8⁺-Zellen unter den Werten des IFN- γ Sekretionsassay. Auch der prozentuale Anteil der Zellen in der Positivfraktion im Bezug auf die Gesamtzellzahl vor der Separation lag unter einem Zehntel im Vergleich zum IFN- γ Sekretionsassay. Da allerdings dieser Versuch nur einmal durchgeführt werden konnte, sollte dies nicht überbewertet und durch weitere Experimente genauer untersucht werden. Es konnte auf jeden Fall gezeigt werden, dass die Selektion CMV-spezifischer Zellen auch mit Hilfe des IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab funktioniert und bei Wiederholung der Experimentanordnung und den damit gewonnenen Daten können eindeutigere Aussagen gemacht werden.

6.2.9 Kurzkultivierung der Zellen nach IFN-g Sekretionsassay im Großmaßstab

Aufgrund der relativ schlechten Zellvermehrungsrate nach dem IFN- γ Sekretionsassay wurde die Kultivierung der CMV-spezifischen Zellen nach dem Protokoll von Miltenyi Biotec (Miltenyi Biotec 2008) überarbeitet und in eine 5-tägige Kurzkultur mit alleiniger Interleukin 2-Gabe umgewandelt. Da aber nach 5 Tagen nur eine Zellvermehrungsrate von 2,03 statt 10,90 im

Vergleich zum IFN- γ Sekretionsassay nach 21 Tagen erreicht wurde, sollte das Kultivierungsprotokoll für weitere Versuchsplanungen noch einmal überdacht werden. Infolge der langen Kulturzeiten, die im klinischen Alltag problematisch sind, verzichtet man heutzutage sowieso meist auf die Kultivierung und setzt die virus-spezifischen Zellen direkt ein. Angesichts dieser geringen Zellzahl nach der Kurzkultur konnte bei dem zweiten IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab lediglich ein Funktionstest durchgeführt werden, der Proliferationsassay.

6.2.10 Proliferationsassay

Dieser Assay wurde zur Untersuchung der Fähigkeit der CMV-spezifischen T-Zellen, nach CMV Lysat Stimulation zu proliferieren, nur nach dem IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab durchgeführt. Da nur bei den ersten beiden Assays im Großmaßstab Zellen für die Kultur gewonnen werden konnten, konnte dieser Versuch lediglich zweimal durchgeführt werden, wobei es sich bei den Zellen, die durch den ersten IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab gewonnen wurden, nicht um CMV-spezifische Zellen handelte und somit die Proliferation nach Stimulation mit CMV Lysat nicht so deutlich war, wie erwartet. Bei dem zweiten Versuch im Großmaßstab konnten bei der FACS Analyse keine CFDA-gefärbten Zellen dargestellt werden. Dies könnte zum Beispiel daran liegen, dass das CFDA aufgrund längerer Lagerungszeit an Farbtintensität verloren hatte. Durch parallele Wiederholung der Experimente mit dem verwendeten CFDA und neuem CFDA könnte diese Hypothese bestätigt werden. Die Ergebnisse des Proliferationsassays lassen keine Aussage zu, ob CMV-spezifische T-Zellen nach Stimulation mit CMV Lysat Stimulation proliferieren. Um diese Aussage zu machen, müsste die Methode erst noch etabliert werden und die Experimente in ausreichender Anzahl durchgeführt werden.

6.2.11 Übertragung der Ergebnisse auf die Klinik

Damit eine spätere Übertragung der gewonnenen Erkenntnisse und Nutzung für die Klinik möglich wird, wurde in dieser Arbeit versucht, möglichst schon in vitro nur Substanzen zu verwenden, die man auch für in vivo Versuche verwenden kann. So wurde ausschließlich mit Medium ohne Phenolrot gearbeitet. Statt fetalem Kälberserum (FCS) wurde humanes Serum (AB Serum) bzw. humanes Plasma (AB Plasma) aus der Blutbank verwendet und nachdem in Experimenten gezeigt werden konnte, dass sich die Stimulation durch CMV pp65 und CMV Lysat kaum unterscheidet, wurde auf CMV Lysat verzichtet. Denn CMV Lysat ist für den

klinischen Einsatz hinsichtlich seiner sehr variablen Zusammensetzung und seiner schlechten Charakterisierung nicht besonders geeignet und besteht zudem nur aus 10 % viralen Proteinen.

6.3 Transfer nicht nur CMV pp65 spezifischer T-Zellen, sondern auch anderer Proteine

Als Hauptziel der CMV-spezifischen CTL-Antwort konnte zwar das Phosphoprotein pp65 identifiziert werden (Longmate et al. 2001; McLaughlin-Taylor et al. 1994; Wills et al. 1996) und die meisten CMV Peptid Epitope, die definiert wurden, stammen aus pp65, aber in letzter Zeit wurden bei einigen Spendern auch die Proteine IE1, pp150 und gB als dominante Ziele einer CMV-spezifischen CTL-Antwort beschrieben (Gyulai et al. 2000; Kern et al. 1999; Khan et al. 2002; Retiere et al. 2000; Tabi et al. 2001). Um das Spektrum der CMV-spezifischen MHC Klasse I-Immunantwort zu erweitern, wäre es deshalb sinnvoll, spezifische CD8+ T-Zellen auch gegen diese generieren zu können. So gelang es Rauser 2003, CMV/IE-spezifische Zellen zu generieren. Er kam zu der Auffassung, dass zur Kontrolle der CMV-Reaktivierung CMV/IE-spezifische T-Zellen wesentlich beitragen und dass der Transfer solcher CMV/IE-spezifischer T-Zellen kombiniert mit CMV/pp65-spezifischer T-Zellen in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation ohne CMV-Virämie vorteilhaft sein könnte und möglicherweise die CMV-Reaktivierung effektiver verhindern könnte, als der alleinige Transfer von CMV pp65 spezifischen Zellen (Rauser 2003).

In Vortests zum IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab wurde auch PepTivator-CMV pp65 mit CMV pp65 verglichen. PepTivator-CMV pp65 ist ein Peptidpool, der aus 15-mer Peptiden mit 11 Aminosäureüberschneidungen besteht und die komplette Sequenz vom pp65 Protein des CMV abdeckt. Es zeigte sich jedoch im Vergleich, dass bei Inkubation mit CMV pp65 mehr CMV-spezifische Zellen detektierbar sind und deshalb wurde im IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab weiterhin mit CMV pp65 gearbeitet.

7 Zusammenfassung

Die Einführung hoch effektiver, präventiver, antiviraler Therapiestrategien verbesserte signifikant die klinischen Ergebnisse bei CMV-Infektion und veränderte den Ablauf der Erkrankung komplett. Durch den präventiven Gebrauch antiviraler Medikamente verschoben sich die CMV-bedingten Komplikationen von dem, zeitlich gesehen, frühen zum späteren Beginn nach Stammzelltransplantation, die so genannte late-onset CMV-Erkrankung, häufig ab 100 Tage nach Knochenmarkstransplantation. Dennoch verursacht CMV immer noch Morbidität und Mortalität bei diesen Patienten, vor allem, wenn das Transplantat von einem CMV-seronegativen Spender stammt.

Antigen-spezifische T-Zellen sind unentbehrlich für die Kontrolle der CMV-Infektion. Immuntherapie offeriert den Patienten nach Stammzelltransplantation einen eleganten Weg zur Verbesserung der Immunrestitution entsprechend der viralen Replikation und ohne ersichtlichen Nebeneffekt. Dies könnte den Gebrauch antiviraler Chemotherapie und damit auch die nachteiligen Effekte dieser Therapie wie Myelo- oder Nephrotoxizität reduzieren und darüber hinaus den Entwicklungsdruck bei der Ausbildung von Medikamentenresistenz vermindern.

Doch bis die in dieser Arbeit beschriebenen Techniken in einen klinischen Standardablauf umgewandelt werden können, müssen noch einige Hindernisse überwunden werden.

Obwohl sich in den letzten Jahren die Auswahl und Erhältlichkeit von Reagenzien für die Selektion der Antigen-spezifischen T-Zellen, die klinischen Ansprüchen genügen, verbessert hat, ist immer noch nicht genug über die ideale Zusammensetzung der zellulären Produkte für den adoptiven Transfer bekannt. So ist die optimale Zielstruktur der CMV-spezifischen T-Zell-Antwort nicht exakt definiert und es wird immer noch kontrovers über den Nutzen der Übertragung verschiedener T-Zellen-Untergruppen für die Immuntherapie diskutiert. Dementsprechend ist noch nicht geklärt, ob man nur CD4⁺ T-Zellen oder CD8⁺ T-Zellen oder eine Kombination von Beiden übertragen sollte.

Darüber hinaus kommt es durch die verschiedenen Methoden der Zellgenerierung zu verschiedenen Altersstufen von T-Zellen. Frisch isolierte und spezifisch selektierte T-Zellen haben ein größeres Expansionspotential in vivo verglichen mit wiederholt in vitro stimulierten T-Zellen. Aber die spezifische Stimulation ex vivo reduziert anscheinend das Risiko für Alloreaktivität.

In Anbetracht der zahlreichen verschiedenen Methoden zur Generierung von T-Zellen, sollten sich weitere Studien mit der Frage befassen, welches die beste T-Zell-Untergruppe für die antivirale T-Zelltherapie ist, welche Differenzierungs- bzw. Aktivierungsstufe oder -stufen

vorzugsweise zum Einsatz kommen sollten und was die optimale Zelldosis abhängig von der Viruslast und Immunsuppression des Patienten ist.

Für diese Arbeit gilt, dass die gewonnenen Erkenntnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen zu übertragen sind, denn bisher wurde nicht untersucht, ob die CMV-spezifischen T-Zellen die ermittelten Eigenschaften auch im menschlichen Körper besitzen. Außerdem ist zu beachten, dass die Versuche, die sich an den IFN- γ Sekretionsassay anschlossen, zwar mehrmals, aber nur mit dem Stammzellapheresat von 4 verschiedenen Spendern und der IFN- γ Sekretionsassay im Großmaßstab lediglich einmal komplett und korrekt durchgeführt werden konnten. Darüber hinaus stand nur eine geringe Zellzahl an CMV-spezifischen Zellen nach Separation zur Verfügung. Deshalb sollten in Folgeexperimenten die Anzahl der Spender erhöht und das Kultivierungsprotokoll überarbeitet werden, um somit bei weiteren Versuchen statistisch signifikante Werte erhalten zu können.

Für die zukünftige Forschung besteht die Möglichkeit, die in dieser Arbeit erreichten Erkenntnisse und Ergebnisse in weiteren Untersuchungen auf ihre Anwendbarkeit auf andere Viren zu prüfen.

8 Literaturverzeichnis

Alain S, Honderlick P, Grenet D et al. Failure of ganciclovir treatment associated with selection of a ganciclovir-resistant cytomegalovirus strain in a lung transplant recipient. *Transplantation* 1997; 63 (10):1533-6.

Arpinati M, Green CL, Heimfeld S et al. Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000; 95 (8):2484-90.

Aschan J, Ringden O, Ljungman P et al. Foscarnet for treatment of cytomegalovirus infections in bone marrow transplant recipients. *Scand J Infect Dis* 1992; 24 (2):143-50.

Bachmann MF, Kalinke U, Althage A et al. The role of antibody concentration and avidity in antiviral protection. *Science* 1997; 276 (5321):2024-7.

Bacigalupo A, Bregante S, Tedone E et al. Combined foscarnet-ganciclovir treatment for cytomegalovirus infections after allogeneic hemopoietic stem cell transplantation. *Transplantation* 1996; 62 (3):376-80.

BD Biosciences. Application Note: Cytokine Detection in Antigen-Activated CD8+ and CD4+ T Cells 2002a.

BD Biosciences. Technical Data Sheet: AnnexinV-FITC Apoptosis Detection Kit I 2002b.

Berke G. The binding and lysis of target cells by cytotoxic lymphocytes: molecular and cellular aspects. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:735-73.

Bissinger AL, Rauser G, Hebart H et al. Isolation and expansion of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes using interferon-gamma secretion assay. *Exp Hematol* 2002; 30 (10):1178-84.

Boeckh M, Bowden RA, Goodrich JM et al. Cytomegalovirus antigen detection in peripheral blood leukocytes after allogeneic marrow transplantation. *Blood* 1992; 80 (5):1358-64.

Boeckh M, Huang M, Ferrenberg J et al. Optimization of quantitative detection of cytomegalovirus DNA in plasma by real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (3):1142-8.

Boeckh M, Leisenring W, Riddell SR et al. Late cytomegalovirus disease and mortality in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplants: importance of viral load and T-cell immunity. *Blood* 2003a; 101 (2):407-14.

Boeckh M, Nichols WG, Papanicolaou G et al. Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003b; 9 (9):543-58.

Bonon SH, Menoni SM, Rossi CL et al. Surveillance of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation patients. *J Infect* 2005; 50 (2):130-7.

Bortin MM, Rimm AA. Increasing utilization of bone marrow transplantation. II. Results of the 1985-1987 survey. *Transplantation* 1989; 48 (3):453-8.

Bowden RA, Digel J, Reed EC et al. Immunosuppressive effects of ganciclovir on in vitro lymphocyte responses. *J Infect Dis* 1987; 156 (6):899-903.

Bowden RA, Fisher LD, Rogers K et al. Cytomegalovirus (CMV)-specific intravenous immunoglobulin for the prevention of primary CMV infection and disease after marrow transplant. *J Infect Dis* 1991a; 164 (3):483-7.

Bowden RA, Slichter SJ, Sayers M et al. A comparison of filtered leukocyte-reduced and cytomegalovirus (CMV) seronegative blood products for the prevention of transfusion-associated CMV infection after marrow transplant. *Blood* 1995; 86 (9):3598-603.

Bowden RA, Slichter SJ, Sayers MH et al. Use of leukocyte-depleted platelets and cytomegalovirus-seronegative red blood cells for prevention of primary cytomegalovirus infection after marrow transplant. *Blood* 1991b; 78 (1):246-50.

Bowen EF, Emery VC, Wilson P et al. Cytomegalovirus polymerase chain reaction viraemia in patients receiving ganciclovir maintenance therapy for retinitis. *Aids* 1998; 12 (6):605-11.

Bregante S, Bertilson S, Tedone E et al. Foscarnet prophylaxis of cytomegalovirus infections in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation (BMT): a dose-finding study. *Bone Marrow Transplant* 2000; 26 (1):23-9.

Campbell J. FACS-based CTL assay 2005.

Colimon R, Michelson S. Human cytomegalovirus: pathology, diagnosis, treatment. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1990; 19:333-56.

Craig JM, Macauley JC, Weller TH et al. Isolation of intranuclear inclusion producing agents from infants with illnesses resembling cytomegalic inclusion disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1957; 94 (1):4-12.

Diamond DJ, York J, Sun JY et al. Development of a candidate HLA A*0201 restricted peptide-based vaccine against human cytomegalovirus infection. *Blood* 1997; 90 (5):1751-67.

Einsele H, Ehninger G, Hebart H et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood* 1995; 86 (7):2815-20.

Einsele H, Hebart H, Kauffmann-Schneider C et al. Risk factors for treatment failures in patients receiving PCR-based preemptive therapy for CMV infection. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25 (7):757-63.

Einsele H, Roosnek E, Rufer N et al. Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 2002; 99 (11):3916-22.

Einsele H, Steidle M, Vallbracht A et al. Early occurrence of human cytomegalovirus infection after bone marrow transplantation as demonstrated by the polymerase chain reaction technique. *Blood* 1991; 77 (5):1104-10.

Emanuel D, Cunningham I, Jules-Elysee K et al. Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. *Ann Intern Med* 1988; 109 (10):777-82.

Emery VC, Sabin CA, Cope AV et al. Application of viral-load kinetics to identify patients who develop cytomegalovirus disease after transplantation. *Lancet* 2000; 355 (9220):2032-6.

Erice A, Gil-Roda C, Perez JL et al. Antiviral susceptibilities and analysis of UL97 and DNA polymerase sequences of clinical cytomegalovirus isolates from immunocompromised patients. *J Infect Dis* 1997; 175 (5):1087-92.

Garrigue I, Boucher S, Couzi L et al. Whole blood real-time quantitative PCR for cytomegalovirus infection follow-up in transplant recipients. *J Clin Virol* 2006; 36 (1):72-5.

Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA et al. Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 1985; 21 (2):217-21.

Goldman JM, Gale RP, Horowitz MM et al. Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann Intern Med* 1988; 108 (6):806-14.

Goodrich JM, Mori M, Gleaves CA et al. Early treatment with ganciclovir to prevent cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1991; 325 (23):1601-7.

Griesche N. Ex-vivo Expansion CMV-spezifischer T-Zellen. Berlin: Technische Universität Berlin; 2005.

Griffiths PD, Stagno S, Pass RF et al. Infection with cytomegalovirus during pregnancy: specific IgM antibodies as a marker of recent primary infection. *J Infect Dis* 1982; 145 (5):647-53.

Gyulai Z, Endresz V, Burian K et al. Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* 2000; 181 (5):1537-46.

Hebart H, Einsele H. Clinical aspects of CMV infection after stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2004; 65 (5):432-6.

Heslop HE, Ng CY, Li C et al. Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 1996; 2 (5):551-5.

Ho M. Cytomegalovirus. G Mandell; J Bennett; R Dolin et al., editors. New York: Churchill Livingstone; 1995. (G Mandell; J Bennett; R Dolin et al. editors. *Principles and Practice of Infectious Diseases*).

Ho M. Cytomegalovirus: Biology and Infection. 2nd ed. In: Plenum. Series Cytomegalovirus: Biology and Infection. 2nd ed. New York; 1991.

Ho WY, Yee C, Greenberg PD. Adoptive therapy with CD8(+) T cells: it may get by with a little help from its friends. *J Clin Invest* 2002; 110 (10):1415-7.

Hobeika AC, Morse MA, Osada T et al. Enumerating antigen-specific T-cell responses in peripheral blood: a comparison of peptide MHC Tetramer, ELISpot, and intracellular cytokine analysis. *J Immunother* 2005; 28 (1):63-72.

Jacobson MA, Kramer F, Bassiakos Y et al. Randomized phase I trial of two different combination foscarnet and ganciclovir chronic maintenance therapy regimens for AIDS patients with cytomegalovirus retinitis: AIDS clinical Trials Group Protocol 151. *J Infect Dis* 1994; 170 (1):189-93.

Janeway C, Travers P, Walport M et al. *Immunobiology-the immune system in health and disease*. Oxford; 2005.

Junghanss C, Boeckh M, Carter RA et al. Incidence and outcome of cytomegalovirus infections following nonmyeloablative compared with myeloablative allogeneic stem cell transplantation, a matched control study. *Blood* 2002; 99 (6):1978-85.

Kalpoe JS, Kroes AC, de Jong MD et al. Validation of clinical application of cytomegalovirus plasma DNA load measurement and definition of treatment criteria by analysis of correlation to antigen detection. *J Clin Microbiol* 2004; 42 (4):1498-504.

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; 73 (10):8179-84.

Khan N, Cobbold M, Keenan R et al. Comparative analysis of CD8+ T cell responses against human cytomegalovirus proteins pp65 and immediate early 1 shows similarities in precursor frequency, oligoclonality, and phenotype. *J Infect Dis* 2002; 185 (8):1025-34.

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; 113 (1):231-9.

Klemola E, Kaariainen L. Cytomegalovirus as a possible cause of a disease resembling infectious mononucleosis. *Br Med J* 1965; 2 (5470):1099-102.

Klemola E, Von Essen R, Henle G et al. Infectious-mononucleosis-like disease with negative heterophil agglutination test. Clinical features in relation to Epstein-Barr virus and cytomegalovirus antibodies. *J Infect Dis* 1970; 121 (6):608-14.

Kos FJ, Engleman EG. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol Today* 1996; 17 (4):174-6.

Krause H, Hebart H, Jahn G et al. Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant* 1997; 19 (11):1111-6.

Krivot W, Shapiro E, Hoogerbrugge PM et al. State of the art review. Bone marrow transplantation treatment for storage diseases. *Keystone*. January 23, 1992. *Bone Marrow Transplant* 1992; 10 Suppl 1:87-96.

Kröger N, Zander R. *Allogene Stammzelltherapie-Grundlagen, Indikationen und Perspektiven*. Bremen; 2004.

Ljungman P, Brand R, Einsele H et al. Donor CMV serologic status and outcome of CMV-seropositive recipients after unrelated donor stem cell transplantation: an EBMT megafile analysis. *Blood* 2003; 102 (13):4255-60.

Ljungman P, de La Camara R, Milpied N et al. Randomized study of valacyclovir as prophylaxis against cytomegalovirus reactivation in recipients of allogeneic bone marrow transplants. *Blood* 2002a; 99 (8):3050-6.

Ljungman P, Deliliers GL, Platzbecker U et al. Cidofovir for cytomegalovirus infection and disease in allogeneic stem cell transplant recipients. The Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Blood* 2001; 97 (2):388-92.

Ljungman P, Engelhard D, Link H et al. Treatment of interstitial pneumonitis due to cytomegalovirus with ganciclovir and intravenous immune globulin: experience of European Bone Marrow Transplant Group. *Clin Infect Dis* 1992; 14 (4):831-5.

Ljungman P, Griffiths P, Paya C. Definitions of cytomegalovirus infection and disease in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002b; 34 (8):1094-7.

Ljungman P, Larsson K, Kumlien G et al. Leukocyte depleted, unscreened blood products give a low risk for CMV infection and disease in CMV seronegative allogeneic stem cell transplant recipients with seronegative stem cell donors. *Scand J Infect Dis* 2002c; 34 (5):347-50.

Ljungman P, Lonnqvist B, Wahren B et al. Lymphocyte responses after cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients--a one-year follow-up. *Transplantation* 1985; 40 (5):515-20.

Ljungman P, Perez-Bercoff L, Jonsson J et al. Risk factors for the development of cytomegalovirus disease after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2006; 91 (1):78-83.

Ljungman P, Reusser P, de la Camara R et al. Management of CMV infections: recommendations from the infectious diseases working party of the EBMT. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33 (11):1075-81.

Longmate J, York J, La Rosa C et al. Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics* 2001; 52 (3-4):165-73.

Manfredi R, Mastroianni A, Coronado OV et al. The treatment of AIDS-related cytomegalovirus disease with ganciclovir and foscarnet association. Three case reports. *Recenti Prog Med* 1996; 87 (11):545-8.

Masur H, Whitcup SM, Cartwright C et al. Advances in the management of AIDS-related cytomegalovirus retinitis. *Ann Intern Med* 1996; 125 (2):126-36.

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; 43 (1):103-10.

Meyers JD, Flournoy N, Thomas ED. Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 1986; 153 (3):478-88.

Miltenyi Biotec. Cytokine Secretion Assays: IFN- γ Secretion Assay.

Miltenyi Biotec. Expansion of antigen-specific cytokine-secreting T cells.

Miltenyi Biotec. Large Scale IFN- γ Secretion Assay Enrichment Kit 2008.

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; 97 (4):994-1000.

Pezzutto A, Ulrichs T, Burmester G. Taschenatlas der Immunologie. Stuttgart; 2007.

Prentice HG, Gluckman E, Powles RL et al. Impact of long-term acyclovir on cytomegalovirus infection and survival after allogeneic bone marrow transplantation. European Acyclovir for CMV Prophylaxis Study Group. *Lancet* 1994; 343 (8900):749-53.

R&D Systems. ELISpot: Human IFN- γ 2004.

Ramsay NK, Davies S. Bone marrow transplant for acute leukaemia. *Baillieres Clin Haematol* 1991; 4 (2):483-510.

Rasmussen L, Zipeto D, Wolitz RA et al. Risk for retinitis in patients with AIDS can be assessed by quantitation of threshold levels of cytomegalovirus DNA burden in blood. *J Infect Dis* 1997; 176 (5):1146-55.

Rausser G. Generierung von virus-spezifischen T-Zellen für den adoptiven Transfer [Dissertation]. Tübingen: Eberhard-Karls-Universität; 2003.

Rausser G, Einsele H, Sinzger C et al. Rapid generation of combined CMV-specific CD4+ and CD8+ T-cell lines for adoptive transfer into recipients of allogeneic stem cell transplants. *Blood* 2004; 103 (9):3565-72.

Reed EC, Bowden RA, Dandliker PS et al. Treatment of cytomegalovirus pneumonia with ganciclovir and intravenous cytomegalovirus immunoglobulin in patients with bone marrow transplants. *Ann Intern Med* 1988; 109 (10):783-8.

Retiere C, Prod'homme V, Imbert-Marcille BM et al. Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol* 2000; 74 (9):3948-52.

Reusser P, Riddell SR, Meyers JD et al. Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 1991; 78 (5):1373-80.

Riddell SR, Watanabe KS, Goodrich JM et al. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 1992; 257 (5067):238-41.

Roche Diagnostics GmbH. Cell Proliferation ELISA, BrdU (chemiluminescence): Instruction manual 2003.

Rondelli D, Raspadori D, Anasetti C et al. Alloantigen presenting capacity, T cell alloreactivity and NK function of G-CSF-mobilized peripheral blood cells. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22 (7):631-7.

Rowe WP, Hartley JW, Waterman S et al. Cytopathogenic agent resembling human salivary gland virus recovered from tissue cultures of human adenoids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92 (2):418-24.

Sarawar SR, Lee BJ, Reiter SK et al. Stimulation via CD40 can substitute for CD4 T cell function in preventing reactivation of a latent herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98 (11):6325-9.

Schmidt GM, Horak DA, Niland JC et al. A randomized, controlled trial of prophylactic ganciclovir for cytomegalovirus pulmonary infection in recipients of allogeneic bone marrow transplants; The City of Hope-Stanford-Syntex CMV Study Group. *N Engl J Med* 1991; 324 (15):1005-11.

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI et al. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* 1998; 393 (6684):480-3.

Schütt C, Bröker B. *Grundwissen Immunologie*. München; 2006.

Shuster EA, Beneke JS, Tegtmeier GE et al. Monoclonal antibody for rapid laboratory detection of cytomegalovirus infections: characterization and diagnostic application. *Mayo Clin Proc* 1985; 60 (9):577-85.

Sili U, Huls MH, Davis AR et al. Large-scale expansion of dendritic cell-primed polyclonal human cytotoxic T-lymphocyte lines using lymphoblastoid cell lines for adoptive immunotherapy. *J Immunother (1997)* 2003; 26 (3):241-56.

Sloand EM, Kim S, Maciejewski JP et al. Pharmacologic doses of granulocyte colony-stimulating factor affect cytokine production by lymphocytes in vitro and in vivo. *Blood* 2000; 95 (7):2269-74.

Smith MG. Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 92 (2):424-30.

Smith MG. Propagation of salivary gland virus of the mouse in tissue cultures. *Proc Soc Exp Biol Med* 1954; 86 (3):435-40.

Solache A, Morgan CL, Dodi AI et al. Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus. *J Immunol* 1999; 163 (10):5512-8.

Spector SA, Wong R, Hsia K et al. Plasma cytomegalovirus (CMV) DNA load predicts CMV disease and survival in AIDS patients. *J Clin Invest* 1998; 101 (2):497-502.

Szmania S, Galloway A, Bruorton M et al. Isolation and expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes to clinical scale from a single blood draw using dendritic cells and HLA-tetramers. *Blood* 2001; 98 (3):505-12.

Tabi Z, Moutaftsi M, Borysiewicz LK. Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J Immunol* 2001; 166 (9):5695-703.

Vannucchi AM, Glinz S, Bosi A et al. Selective ex vivo expansion of cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes using dendritic cells pulsed with a human leucocyte antigen A*0201-restricted peptide. *Br J Haematol* 2001; 113 (2):479-82.

Verkruyse LA, Storch GA, Devine SM et al. Once daily ganciclovir as initial pre-emptive therapy delayed until threshold CMV load \geq 10000 copies/ml: a safe and effective strategy for allogeneic stem cell transplant patients. *Bone Marrow Transplant* 2006; 37 (1):51-6.

Von Muller L, Hampl W, Hinz J et al. High variability between results of different in-house tests for cytomegalovirus (CMV) monitoring and a standardized quantitative plasma CMV PCR assay. *J Clin Microbiol* 2002; 40 (6):2285-7.

von Muller L, Hinz J, Bommer M et al. CMV monitoring using blood cells and plasma: a comparison of apples with oranges? *Bone Marrow Transplant* 2007; 39 (6):353-7.

Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ et al. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 1995; 333 (16):1038-44.

Weir AF. *Enzymes of Molecular Biology*. MMe Burrel, editor; 1993. (MMe Burrel editor. *Methods in Molecular Biology*).

Weller TH, Hanshaw JB, Scott DE. Serologic differentiation of viruses responsible for cytomegalic inclusion disease. *Virology* 1960; 12:130-2.

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; 70 (11):7569-79.

Winston DJ, Yeager AM, Chandrasekar PH et al. Randomized comparison of oral valacyclovir and intravenous ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis* 2003; 36 (6):749-58.

Zhang LJ, Hanff P, Rutherford C et al. Detection of human cytomegalovirus DNA, RNA, and antibody in normal donor blood. *J Infect Dis* 1995; 171 (4):1002-6.

9 Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7 Amino-Actinomycin D
AB Serum	Humanes Serum Typ AB ohne Gerinnungsfaktoren (off the clot)
AIDS	erworbenes Immundefektsyndrom (acquired immunodeficiency syndrome)
APC	Antigen präsentierende Zelle (antigen presenting cell)
BAL	Bronchoalveolarlavage
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-Indoxylphosphat
BrdU	5-Bromdesoxyuridin
BSA	Albumin aus Rinderserum (bovine serum albumin)
CD	Differenzierungsantigene (cluster of differentiation bzw. cluster determinant)
DC	dendritische Zellen (dendritic cells)
CFDA	Carboxyfluorescein-Diazetat
CMV	Cytomegalievirus
CTL	Zytotoxischer T-Lymphozyt (cytotoxic T-lymphocyte)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (enzyme-linked immunosorbent assay)
ELISpot	Enzymgekoppelte Immunpunkttechnik (enzyme-linked immunospot technique)
FACS	Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorter)
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor (granulocyte colony stimulating factor)
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)
GMP	Gute Herstellungspraxis (good manufacturing practice)

GvHD	Transplantat-gegen-Empfänger-Reaktion (graft versus host disease)
GvL	Transplantat-gegen-Leukämie (graft versus leukemia)
HCMV	Humanes Cytomegalievirus (human cytomegalovirus)
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus (human immunodeficiency virus)
HLA	Histokompatibilitätsantigen (human leukocyte antigen)
HSA	Albumin aus Humanserum (human serum albumin)
IFN- γ	Interferon gamma
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
LCL	Lymphoblastoide Zelllinie (lymphoblastoid cell line)
MACS	Magnetische Zellseparation (magnetic activated cell sorting)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion (mixed lymphocytes reaction)
MNC	Mononukleäre Zellen
MP	Mikropipettierplatte
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (nitro blue tetrazolim chloride)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen (natural killer cells)
PB	Peripheres Blut (peripheral blood)
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PBPC	Blutvorläuferzellen im peripheren Blut (peripheral blood progenitor cell)
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
pp65	65 kiloDalton kleines Matrixphosphoprotein (lower matrix phosphoprotein)
SEB	Staphylokokken Enterotoxin B
Streptavidin-AP	Streptavidin, konjugiert mit alkalischer Phosphatase
RT	Raumtemperatur
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor (tumour necrosis factor)

10 Danksagung

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Gaedicke recht herzlich für die Betreuung der Doktorarbeit in Berlin und bei Herrn Dr. S. Scheduling für die Überlassung des Themas und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit in seiner Arbeitsgruppe in Lund bedanken. Vielen Dank auch für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung aller Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Stem Cell Centers in Lund, insbesondere Josefina, Jan, Daniela, Ariane, Nancy, Teia und Hong. Weiterhin möchte ich Dr. J. Campbell von der Firma Miltenyi Biotec für die Bereitstellung der T2-Tellen danken. Ganz besonderen Dank den Korrekturlesern allen voran Anna, Stefan und Herrn Dr. N. Pargac.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei meinen Eltern und meiner Schwester für Ihre Unterstützung während meines Studiums bedanken und bei Veronique und meinen Großeltern dafür, dass sie einfach immer für mich da sind.

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Erklärung

„Ich, Anne Heine, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Generierung CMV-spezifischer Lymphozyten aus Stammzellapheresat“ 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.“

Datum

Unterschrift