

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

DISSERTATION

Charakterisierung antigenspezifischer T-Zellen in der Transplantation am
Beispiel CMV-reaktiver T-Zellen: Etablierung von Testsystemen für die
adoptive T-Zelltherapie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Schmück

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H.-D. Volk
2. Prof. Dr. med. D. Kabelitz
3. Prof. Dr. D. Abendroth

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
3. Methodik	4
3.1 Publikation 1: <i>Adoptiver T-Zelltransfer</i>	4
3.2 Publikation 2: <i>Isolation, Expansion und Analyse CMV-spezifischer regulatorischer T-Zellen</i>	4
3.3 Publikation 3: <i>in vitro Expansion von zentralen Gedächtnis T-Zellen</i>	4
4. Ergebnisse	5
4.1 Publikation 1: <i>Adoptive T-Zelltherapie eines Lungentransplantierten Patienten mit Virostatika-resistenter CMV-Pneumonie</i>	5
4.2 Publikation 2: <i>CMV-spezifische regulatorische und Effektor T-Zellen teilen die dominant expandierten T-Zellrezeptor-Klone</i>	6
4.3 Publikation 3: <i>Expansion von humanen virus-spezifischen multifunktionalen zentralen Gedächtnis T-Zellen durch partielle IL-2-Rezeptor Signalwegsinhibierung – die Schlüsselrolle der CD4+ T-Zellen</i>	7
5. Diskussion	10
6. Literaturverzeichnis.....	12
7. Anteilserklärung.....	15
8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen	16
Publikation 1.....	16
Publikation 2.....	22
Publikation 3.....	35
9. Lebenslauf.....	45
10. Publikationsliste	46
11. Selbständigkeitserklärung	48
12. Danksagung.....	48

1. Zusammenfassung

Infektionen mit dem humanen Zytomegalievirus (CMV) können insbesondere bei Patienten nach einer Transplantation schwere Komplikationen verursachen. Es ist entscheidend vorab das dadurch vermittelte Abstoßungsrisiko abschätzen zu können und Therapien anzupassen. Eine neue Behandlungsmöglichkeit stellt die virus-spezifische adoptive T-Zelltherapie dar. Die *in vitro* Generierung und Applikation virus-spezifischer T-Zelllinien bei Patienten nach Transplantation solider Organe ist jedoch durch die permanente Immunsuppression und die limitierte Verfügbarkeit und Fitness der spezifischen Zellen diffizil. Unsere Arbeitsgruppe entwickelte ein Protokoll mit dem virus-spezifische T Zellen erfolgreich auch von immunsupprimierten Patienten *in vitro* generiert und appliziert werden können. In der vorliegenden Arbeit werden anhand des Falles eines transplantierten Patienten mit Virostatika-resistenter CMV-Pneumonie die kritischen Parameter der adoptiven T-Zell Therapie aufgezeigt. Hierbei werden im Folgenden die drei vorangestellten Publikationen zusammengefasst.

Die Infusion der CMV-spezifischen T-Zellen führte zur drastischen Reduktion der Viruslast und aller klinischen Symptome. Leider war dieser Effekt nur transient. Zur Untersuchung des Rezidivs, wurde der Einfluss CMV-spezifischer regulatorischer T Zellen (Tregs) und die Langlebigkeit der transferierten Effektor T-Zellen (Teff) und deren Eigenschaften dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass CMV-induzierte Tregs (iTregs) im Zusammenhang mit einer rezidivierenden CMV-Infektion stehen. Zudem zeigen die CMV-spezifischen iTregs und Teff identische Klonalität mit jedoch unterschiedlicher Funktionalität. Weiterhin ist die Langlebigkeit der adoptiv-transferierten Zellen eine große Herausforderung für den Langzeiterfolg der Therapie. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch eine partielle Inhibierung des Interleukin-2 (IL-2)-Rezeptor-Signalweges humane CD4+ und CD8+ zentrale Gedächtnis T-Zellen (T_{CM}) mit verbesserter Funktionalität *in vitro* generiert werden können. Hierfür essentiell ist die Zytokin induzierte Signalübertragung via der IL-2beta Kette, IL-7alpha Kette und der gemeinsamen Gamma Kette. Die expandierten CD8+ T-Zellen besaßen unter dem Einfluss der inhibitorischen Moleküle ausschließlich in Gegenwart von CD4+ T-Zellen den Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp. Diese neue Methode zur Anreicherung humaner virus-spezifische T_{CM} *in vitro* erreicht klinisch relevante Zellzahlen und ist unter GMP (Gute-Herstellungs-Praxis)-konformen Konditionen durchführbar. Die Erkenntnisse des Einflusses regulatorischer T-Zellen und die Generierung langlebiger Gedächtnis T-Zellen für die adoptive T-Zelltherapie bieten wichtige Implikationen zur Verbesserung des Adoptionsverhaltens von Teff und ermöglichen eine distinkte Abschätzung des Transplantatabstoßungsrisikos.

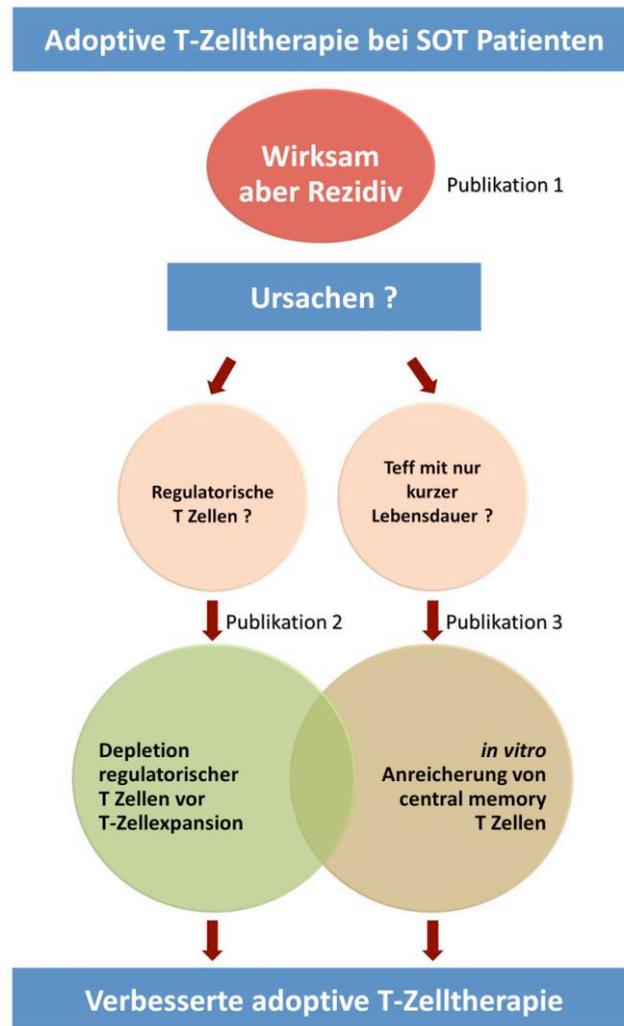


Abb. 1: Überblick über die drei vorangestellten Publikationen:

Publikation 1: Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmück M, Römhild A, Hammer MH, Kurtz A, Uharek L, Knosalla C, Lehmkuhl H, Volk HD, Reinke P. *Adoptive T-Cell Therapy of a Lung Transplanted Patient with Severe CMV Disease and Resistance to Antiviral Therapy*. Am J Transplant. 2009; 9(7): 1679-84

Publikation 2: Schwele S, Fischer AM, Brestrich G, Wlodarski MW, Wagner L, Schmueck M, Roemhild A, Thomas S, Hammer MH, Babel N, Kurtz A, Maciejewski JP, Reinke P, Volk HD. *Cytomegalovirus-Specific Regulatory and Effector T Cells Share TCR Clonality-Possible Relation to Repetitive CMV Infections*. Am J Transplant. 2012; 12(3): 669-681

Publikation 3: Schmueck M, Fischer AM, Hammoud B, Brestrich G, Fuehrer H, Luu SH, Mueller K, Babel N, Volk HD and Reinke P. *Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central-memory T cells by partial targeting the IL-2 receptor signaling pathway – the key role of CD4+ T cells*. J Immunol. 2012; 188;5189-5198

2. Einleitung

Das humane Zytomegalievirus (CMV) entwickelt lebenslange Persistenz und reaktiviert häufig nach Primärinfektion, steht jedoch unter der Immunkontrolle in (immun)kompetenten Individuen (1). Bei immunsupprimiert- transplantierten Patienten können jedoch CMV-assoziierte Komplikationen auftreten. Eine wiederholte Reaktivierung des Virus führt zu einer verlangsamten Kontrolle selbiger, welche in der verminderten T-Zellreaktivität begründet liegt. Dies führt zu der Verschlechterung der Transplantatfunktion und Transplantatadaption (2). Trotz des signifikanten Fortschrittes in Diagnose und Behandlung haben CMV-Infektionen stets bedeutenden Einfluss auf die Morbidität und Mortalität von transplantierten Patienten (3). Hierbei sind die CMV-Erkrankung und die asymptomatische CMV-Virämie unabhängig voneinander wirkende Mechanismen der akuten und chronischen Transplantatabstoßung oder führen zu Organfehlfunktionen (2). Obwohl antivirale Medikamente sehr effizient die Virusreplikation unterdrücken können sind für die komplette und dauerhafte Kontrolle der CMV-Reaktivierung / Infektion effektive und spezifische T-Zellfunktionen entscheidend (3). Des Weiteren entziehen sich Mutationen im Virusgenom der Virostatika-kontrolle. T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulierung von Infektionen und Tumoren. Die im Rahmen einer Organtransplantation notwendigen immunsupprimierenden Medikamente unterdrücken unter anderem unspezifisch die T-Zellreaktivität. Neben erwünschter allospezifischer T-Zellreaktivität wird jedoch auch die virusspezifische Reaktivität vermindert (4).

Ein neuer therapeutischer Ansatz zur Wiederherstellung der T-Zell Reaktivität stellt die adoptive T-Zelltherapie dar (5). T-Zelltherapien werden bereits erfolgreich nach einer hämatopoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) angewendet (6). Unsere Arbeitsgruppe entwickelte ein Protokoll mit dem virus-spezifische T Zellen erfolgreich auch von immunsupprimierten Patienten mit Transplantation solider Organe *in vitro* generiert werden können. Hierfür werden die spezifischen Zellen nach Stimulation über die Sekretion und magnetische Markierung des Effektormoleküls Interferon- γ (IFN- γ) selektiert, anschließend expandiert und dem Patienten injiziert. Erste Studien ergaben aussichtsvolle Ergebnisse zur Reduktion der Epstein-Barr-Virus(EBV)-vermittelten Posttransplantations-Lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) in permanent immunsupprimierten Individuen (7-10). Im Folgenden werden die drei vorangestellten Publikationen zusammengefasst. In der vorliegenden Arbeit werden im Rahmen eines therapeutischen Ansatzes (Proof-of-Concept Therapie) eines transplantierten Patienten mit Virostatika-resistenter CMV-Pneumonie die positiven aber auch kritischen Parameter der adoptiven T-Zell Therapie aufgezeigt. Die Infusion der CMV-spezifischen T-Zellen führte zur einer drastischen Reduktion der Viruslast und aller klinischen Symptome. Der Patient konnte innerhalb weniger Tage von der Intensivstation entlassen werden. Leider war dieser Effekt nur transient. Zur Untersuchung des Rezidivs werden im Folgenden der Einfluss CMV-spezifischer regulatorischer T-Zellen (Treg) und die Langlebigkeit der transferierten Effektor T-Zellen (Teff) und deren Eigenschaften dargestellt.

3. Methodik

Die ausführliche Beschreibung der angewandten Methoden ist in den beiliegenden Publikationen 1-3 dargestellt. Die Methoden sind im Folgenden zusammenfassend dargestellt.

3.1 Publikation 1: *Adoptiver T-Zelltransfer*

Unsere Arbeitsgruppe entwickelte ein Peptid-basiertes Protokoll zur Generierung und Expansion CMV-spezifischer CD4⁺ und CD8⁺ T-Zelllinien von gesunden Spendern (9, 11). Die CMV-spezifischen T-Zellen des Patienten wurden nach Stimulation mittels IFN- γ CliniMACS Sekretions-Assay (Miltenyi Biotech) durch magnetische Isolation positiv selektiert, expandiert und injiziert. Pro adoptiven T-Zelltransfer wurden $1 \times 10^7/m^2$ Körperoberfläche generierte CMV-spezifische T Zellen injiziert. Die T-Zellen wurden vor adoptiven Transfer durchflusszytometrisch auf Spezifität untersucht und die Zytotoxizität wurde mittels Calcein-Freigabe-Assay bestimmt. Zudem wurde eine CMV-Epitopkartierung durchgeführt. Zur Bestimmung der CMV-spezifischen T-Zellfrequenzen im Verlauf wurde die ELISpot-Technik verwendet. Die Patientenanamnese kann der Publikation entnommen werden.

3.2 Publikation 2: *Isolation, Expansion und Analyse CMV-spezifischer regulatorischer T-Zellen*

Zur Analyse des Einflusses regulatorischer T Zellen wurden die CD8⁺ T Zellen aus den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) gesunder Probanden depletiert. Die Generierung erfolgte mittels CMV peptid-basierter Isolationstechnologie. Nach 14-tägiger Expansion der CD4⁺ CMV-spezifischen T Zellen wurden die CMV-spezifischen Tregs über die erhöhte Expression des zellspezifischen Oberflächenmarkers CD25^(hoch) durchflusszytometrisch (FACSsort) selektiert. Die Tregs wurden zu verschiedenen Zeitpunkten phänotypisch mittels FACS analysiert. Die T-Zellrezeptor (TZR)-Klone wurden mittels hoch-sensitiver Analyse der β -Ketten untersucht und die Hypermutationsregion der TZR-affinitätsbestimmenden CDR3 (Complementarity determining region 3) sequenziert (12). Des Weiteren wurden Proliferations-Analysen mittels FACS und Demethylierungsanalysen (der Treg-spezifischen FOXP3 DNA) mittels Bisulfitsequenzierung durchgeführt.

3.3 Publikation 3: *in vitro Expansion von zentralen Gedächtnis T-Zellen*

CMV-spezifische T-Zellen wurden mit den Reagenzien Rapamycin oder Basiliximab unter dem Einfluss der Zytokine Interleukin-2 und Interleukin-7 *in vitro* expandiert. Funktionalität nach antigen-spezifischer Re-Stimulation und Differenzierungsstatus der expandierten CMV-spezifischen T-Zellen wurden mittels FACS analysiert. Zytotoxizität der generierten T-Zellen wurde im durchflusszytometrischen „Killing-Assay“ nachgewiesen (13). Für *in vitro* Infektionsexperimente wurden Monozyten isoliert, maturiert und anschließend mit einem CMV-Laborstamm (NEWT) infiziert.

4. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der drei vorangestellten Publikationen zusammengefasst.

4.1 Publikation 1: *Adoptive T-Zelltherapie eines Lungentransplantierten Patienten mit Virostatika-resistenter CMV-Pneumonie*

Wir entwickelten zur Generierung CMV-spezifischer T-Zelllinien ein Peptid-pool basiertes Protokoll, welches die Peptide der immunogenen CMV-Proteine pp65 (*Phosphoprotein 65*) und IE-1 (*Immediate-early-1*) beinhaltet (9). Hierbei werden fast alle CD4+ und CD8+ Epitope unabhängig vom humanen Leukozyten-antigen (HLA)-Typ umfasst. Die PBMCs werden hierfür mit Peptid-poolen stimuliert und die spezifischen T-Zellen mittels spezifischer Antikörper gegen sezerniertes IFN- γ selektiert. Autologe CMV-spezifische CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden im Rahmen eines therapeutischen Ansatzes generiert und einem Patienten mit Virostatikaresistenz und rezidivierender CMV-Erkrankung injiziert [Publikation 1 (6)]. Die transferierten Zellen beseitigten vollständig die virale Infektion und der Patient konnte innerhalb weniger Tage von der künstlichen Beatmung getrennt werden. Nach Rekonstitution der klinischen Beschwerdefreiheit konnte der Patient innerhalb von drei Wochen aus der Klinik entlassen werden. Die Viruslast blieb auch nach einer zweiten T-Zell-Infusion auf einem konstant niedrigen Niveau. Allerdings kam es wenige Wochen später zu einer akuten CMV-Infektion. Sechs Wochen später entwickelte der Patient eine zelluläre Abstoßung und erhielt daraufhin eine Steroidtherapie. Dies führte zu einem drastischen Abfall der allo-spezifischen T-Zellen, jedoch auch zur Abnahme der CMV-spezifischen T-Zell Antwort und zu einem Anstieg des Virustiters im Blut. Der Patient verstarb zwei Wochen später durch Transplantatfehlfunktion, verursacht durch eine alloreaktive zelluläre Abstoßung. Die aussichtsreichen Daten des adoptiven Transfers CMV-spezifischer T-Zellen dieses Lungentransplantierten Patienten mit Virostatika-resistenter CMV-Pneumonie zeigen einen limitierenden Faktor – die Langlebigkeit und Effektivität der injizierten Zellen ist ungenügend.

Bei der Behandlung von EBV-bedingten Komplikationen nach Transplantationen zeigt sich, dass unter lymphopenen Bedingungen ein adoptiver T-Zelltransfer effizienter ist und die transferierten Zellen eine erhöhte Proliferation zeigen (14). Zwei Mechanismen scheinen hierfür verantwortlich zu sein: die transferierten Zellen können Nischen einnehmen, welche im nicht-lymphopenen Zustand von anderen Immunzellen blockiert würden. Der zweite Mechanismus könnte eine einhergehende Depletion regulatorischer T-Zellen sein, welche einen negativen Einfluss auf die antigen-spezifische Effektor Funktionalität aufweisen können. Zur Untersuchung des Rezidivs, wird im Folgenden der Einfluss CMV-spezifischer Tregs anhand der Publikation 2 und die Langlebigkeit der transferierten Effektor T-Zellen Teff und deren Eigenschaften anhand der Publikation 3 dargestellt.

4.2 Publikation 2: *CMV-spezifische regulatorische und Effektor T-Zellen teilen die dominant expandierten T-Zellrezeptor-Klone*

Die Genexpressionsanalyse des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FOXP3 ergab einen 2,5-fach erhöhten Anteil an Tregs in Patienten nach Nierentransplantation verglichen mit gesunden Probanden (11). Tregs bewahren nicht nur vor Autoimmunerkrankungen, sie können auch die Immunantwort gegen Infektionen vermindern (15). Daher stellten wir die Hypothese auf, dass eine rezidivierende und andauernde CMV-Infektion möglicherweise mit CMV-induzierten regulatorischen T-Zellen zusammenhängt, die die Immunkontrolle CMV-spezifischer Teff supprimiert.

Die häufige T-Zellaktivierung durch CMV führt möglicherweise zur Induktion von Tregs (iTregs) bei Patienten mit Transplantation solider Organe. Durch standardisiertes CMV-Monitoring der Viruslast der Patienten ist es möglich den *in vivo* Verlauf CMV-spezifischer iTregs zu erforschen [Publikation 2 (16)]. Patienten, die unter rezidivierenden CMV-Ausbruch litten, zeigten eine signifikant erhöhte Frequenz an FOXP3+CD25^{hoch} T-Zellen, verglichen mit Patienten mit nicht-wiederkehrender CMV-Infektion. Die Depletion von CD25^{hoch} T-Zellen *in vitro* führte bei dieser Patientenkohorte zu einer erhöhten Effektor T-Zellfunktion nach CMV-spezifischer Stimulation (16). Die CD4+ CMV-spezifische T-Zellreaktivität wurde mittels Peptid-pool basierter Methodik erfasst und durch Matrixanalyse wurden die individuellen immundominanten Epitope bestimmt (17, 18). Die Epitop-spezifischen CD4+ T-Zellen wurden selektiert, expandiert und funktional bezüglich der Treg-spezifisch erhöhten Expression des Interleukin 2 (IL-2) Rezeptors (CD25) charakterisiert (verglichen mit Teff) (19). Zum Nachweis CMV-spezifischer regulatorischer T-Zellen innerhalb der CD4+CD25^{hoch} wurden CMV-Epitop-spezifische CD4+ T-Zellen isoliert und für 14 Tage expandiert. Die Restimulation der expandierten Zellen induzierte eine starke IFN- γ Sekretion. Die expandierten Zellen zeigten bezüglich des CD25-Expressionslevels drei distinkte T-Zellpopulationen: CD25^{gering}, CD25^{intermediär} und CD25^{hoch} exprimierend. Durch die durchflusszytometrische Zellsortierung der einzelnen Populationen konnte mit Hilfe eines Suppressionsassays die proliferationshemmenden Eigenschaften der CD25^{hoch} exprimierenden T-Zellen auf die CD25^{gering} exprimierenden T-Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten zeigen, dass die CMV-spezifisch expandierten CD25^{hoch} exprimierenden T-Zellen zur Treg Population zugehörig sind. Des Weiteren wurde der Phänotyp der CMV-spezifischen CD25^{hoch} iTregs von Patienten und gesunden Probanden charakterisiert. Sehr auffallend war der Unterschied in der Expression des Treg-spezifischen Transkriptionsfaktors FOXP3. Die FOXP3 Expression korrelierte mit einem verstärkten regulatorischen Einfluss der CD4+CD25^{hoch} exprimierenden Tregs auf die T-Zell Effektorfunktion bei CMV-rezidivierenden Patienten verglichen mit Patienten mit nicht-wiederkehrender CMV-Infektion. Da die CD4+CD25^{hoch} exprimierenden Tregs die Teff Epitop-spezifisch supprimieren, wurden die T-Zellrezeptor (TZR)-Klone mittels hoch-sensitiver PCR-Analyse der V β -Ketten untersucht, um die Hypermutationsregion der TZR-affinitätsbestimmenden CDR3 zu sequenzieren (12). Beide Populationen teilten die dominant expandierten TZR-Klone. Teff und iTregs differenzieren somit von einem Klon mit gleichen viralen

Epitopspezifitäten. Dies verdeutlicht den Einfluss CMV-spezifischer iTregs auf die Funktionalität der CMV-spezifischen T-Zellantwort und die einhergehende Kontrolle der viralen Infektion. Eine gezielte Depletion der CMV-spezifischen iTregs vermeidet möglicherweise schwere CMV-Erkrankungen und verlängert die protektiven Effekte der Teff *in vivo*.

Anhand der Publikation 3 wird im Folgenden die Langlebigkeit der transferierten Teff und deren Eigenschaften dargestellt. Das Rezidiv der CMV-Infektion des Patienten ist nicht durch die verabreichte Immunsuppression zu begründen, da bei Patienten mit Transplantation solider Organe mit ähnlicher Immunsuppression und EBV-assoziiierter PTLD mit dem gleichen zelltherapeutischen Ansatz eine schnelle Abnahme der Viruslast nach Infusion beobachtet werden kann. Des Weiteren war die EBV-Immunkontrolle dauerhaft (7). Viele präklinische Studien beweisen die bessere und dauerhafte Adoption von Teff mit zentralen Gedächtniszell- (central/memory: T_{CM}) Ursprung. Die Persistenz der transferierten Zellen korreliert mit der therapeutischen Wirksamkeit im Tiermodell (20). Die Balance zwischen Adoption und einer starken antigen-spezifischen Effektorfunktion führt möglicherweise zum besten therapeutischen Ergebnis.

4.3 Publikation 3: *Expansion von humanen virus-spezifischen multifunktionalen zentralen Gedächtnis T-Zellen durch partielle IL-2-Rezeptor Signalwegsinhibierung – die Schlüsselrolle der CD4+ T-Zellen*

Die Analyse der im Rahmen der Dissertation generierten CMV-spezifischen Zelllinien nach Expansion / Generierung und vor Infusion ergab einen minimalen Anteil von T_{CM}, während das EBV-spezifische Zellprodukt einen erhöhten Anteil an T_{CM} enthielt (6, 21). Auch die retrospektive Analyse der transferierten T-Zelllinie des Patienten ergab nach CMV-spezifischer Stimulation ausschließlich die Produktion des Effektorzytokins IFN- γ , jedoch keine IL-2 oder Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α Sezernierung. Diese funktionale Charakteristik ist assoziiert mit einem spät-differenzierten Effektor/Gedächtnis (effector/memory: T_{EM}) T-Zellphänotyp und der daher unzureichenden Langlebigkeit *in vivo* (22). Spät-differenzierte T_{EM} und terminal-differenzierte T-Zellen (T_{EMRA}) besitzen ausgeprägte Effektorfunktionen, weisen jedoch nach wiederholtem Antigenkontakt ein nur schwaches proliferatives Potential auf und sind nicht befähigt ein andauerndes protektives Gedächtnis zu bilden (23).

Das Immunsuppressivum Rapamycin bindet das intrazelluläre Enzym mTOR (Abk. für engl. mammalian Target of Rapamycin, zu Deutsch Ziel des Rapamycins im Säugetier). Es wurde als ein bedeutendes Enzym zur Regulation der T-Zell-Gedächtnis Differenzierung beschrieben (24, 25). Studien in Tieren zeigen die Effekte der mTOR-Inhibierung durch Rapamycin während der Expansions -und Kontraktionsphase nach primärer viraler Immunisierung auf die Quantität und Qualität der Gedächtnis-T-Zell Entwicklung (24-27). Rapamycin scheint das Überleben der (viral)-antigen-spezifischen T-Zellen zu verlängern (28, 29). Trotz immunsuppressiver Effekte erhöht es die antigen-spezifische T-Zellreaktivität und beschleunigt die T-Zell-Gedächtnis Differenzierung *in vivo*

(25). Es ist jedoch unklar, ob die mTOR-Inhibierung auch die Komposition des Zellproduktes bezüglich eines Erhöhten Anteils an T_{CM} verbessert. Dies ist insbesondere von Interesse, da die Patienten-spezifischen Gedächtnis-T-Zellen bereits *in vivo* gereift sind.

Im Folgenden sollen nun die Effekte der partiellen *in vitro* Inhibierung des IL-2 Signalweges auf das T-Zellprodukt aufgezeigt werden [Publikation 3 (30)]. Hierfür wurden die CMV-spezifischen T-Zellen mit den Reagenzien Rapamycin und / oder Basiliximab (IL-2-Rezeptor Antagonist) *in vitro* expandiert. Da es sich bei diesen Reagenzien um Immunsuppressivum handelt, wurden zunächst Dosisbestimmungen durchgeführt. Die optimale Dosis der Reagenzien wurde anhand des Proliferationsverhaltens bestimmt. Konzentrationen von über 20nM Rapamycin und von über 20µg/mL Basiliximab inhibieren die Proliferation der CMV-spezifischen T-Zellen signifikant. Somit wurden maximal diese Konzentrationen während der Expansion verwendet. Humane T_{CM} sind über die Expression der Oberflächenmarker CCR7 und CD62L charakterisiert (23). Diese Moleküle spielen eine entscheidende Rolle bei der Migration von Gedächtnis T-Zellen zu sekundären lymphatischen Organen (23). T_{EM} besitzen einen spät-differenzierten Phänotyp, da sie diese Oberflächenmoleküle nur bedingt exprimieren. Die transferierte T-Zelllinie des Patienten zeigte keine Expression dieser Marker (6). Die *in vitro* Expansion der CMV-spezifischen T-Zellen mit den Reagenzien Rapamycin oder Basiliximab führte, verglichen mit den üblich verwendeten Protokoll, zu einer signifikant erhöhten Expression von CCR7 und CD62L nach 18-tägiger Expansion. Da die Proliferation durch den Einsatz der Reagenzien in den verwendeten Konzentrationen nicht inhibiert wurde und der Anteil an T_{CM} erhöht war, führt dies zu einer absolut erhöhten Anzahl von T_{CM} . T_{CM} zeigen starke proliferative Fähigkeiten, sezernieren jedoch weniger Effektorzytokine als T_{EM} . Erstaunlicherweise waren die mit den inhibitorischen Reagenzien generierten T-Zellen nicht in ihrer Effektorfunktion vermindert. Eine spezifische Eigenschaft von T_{CM} ist die Fähigkeit nach Antigenkontakt IL-2 zu sezernieren (23). Es ist mehrfach gezeigt worden, dass die Qualität einer tiefen antiviralen Immunität von CD4+ und CD8+ T-Zellen mit der multiplen Produktion der Zytokine IFN- γ , TNF- α und IL-2 korreliert (31). Die mit den inhibitorischen Reagenzien generierten T-Zellen zeigten eine signifikant erhöhte Produktion dieser Zytokine nach spezifischer Stimulation. Die generierten T-Zellen waren trotz eines erhöhten Anteils an T_{CM} auch nicht in ihrer Zytotoxizität eingeschränkt, wie qualitativ im „Killing-Assay“ nachgewiesen werden konnte.

Beide Prinzipien der partiellen Inhibierung des IL-2 Signalweges ergaben einen erhöhten Anteil und damit eine erhöhte Expansion der CD4+ T-Zellen. Da die T-Zellen trotz eines erhöhten Anteils an T_{CM} nicht in ihrer Funktion eingeschränkt waren, wurde der Einfluss der CD4+ T-Zellhilfe untersucht. Hierzu wurden CD4+ und CD8+ T-Zellen einzeln und zusammen mit und ohne die inhibitorischen Moleküle kultiviert. Hierbei zeigte sich, dass die CD8+ T-Zellen in Ko-Kultur mit CD4+ T-Zellen verstärkt expandierten. Die CD8+ T-Zellen besaßen dabei unter dem Einfluss der inhibitorischen Moleküle ausschließlich in Gegenwart von CD4+ T-Zellen (während der Expansionsphase) den

Gedächtnis-T-Zell-Phänotyp (CCR7+, CD62L+). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die CD8+ T-Zell-Effektorfunktion mit dem CD4+ T-Zellanteil korreliert.

In weiterführenden Experimenten, die den Einfluss der Zytokine im Medium bestimmten, konnte gezeigt werden, dass IL-2 und IL-7 in Kombination zur Expansion benötigt werden und die genannten Effekte stark von diesen Zytokinen abhängig sind. Basiliximab inhibiert spezifisch die IL-2-Rezeptor-alpha Untereinheit. IL-2 und IL-7 besitzen die gleichen intrazellulären Gamma Ketten ihrer Rezeptoren. Demnach ist die partielle Inhibierung des IL-2 Signalweges via der IL-2beta Kette, IL-7alpha Kette und die gemeinsame Gamma Kette zur Generierung von vollfunktionalen T_{CM} essentiell. Erwähnenswert für translative Aspekte der adoptiven CMV-spezifischen T-Zelltherapie ist, dass diese neue Methode zur Anreicherung humaner virus-spezifische T_{CM} im T-Zellprodukt klinisch relevante Zellzahlen erreicht und unter GMP-konformen Konditionen durchführbar ist.

5. Diskussion

Es konnte zum ersten Mal im Rahmen eines therapeutischen Ansatzes ein adoptiver T-Zelltransfer CMV-spezifischer T-Zellen bei einem Patienten nach einer Lungentransplantation gezeigt werden (Publikation 1; (6)). Die Daten zeigen die Stärke und gleichzeitig die Limitierungen des Ansatzes. Trotz des beeindruckenden klinischen Verlaufes, welcher durch die effektive antivirale Funktion der injizierten T-Zellen erzielt werden konnte, kam es erneut zu einer CMV-Infektion, worauf eine zweite T-Zellinjektion erfolgte. Der Patient entwickelte eine zelluläre Abstoßung. Die Daten schließen einen direkten Zusammenhang zwischen der zweiten Infusion der T-Zellen und der Abstoßung nicht aus. Es erscheint jedoch unwahrscheinlich, da die erste T-Zell-Infusion das klinische Bild deutlich verbesserte und die Abstoßung erst zwei Wochen nach zweitem adoptiven T-Zell-Transfer auftrat. Auch die finale Biopsie der Lunge wurde CMV negativ getestet. Durch Rekonstitution der klinischen Beschwerdefreiheit kann angenommen werden, dass der adoptive Transfer erfolgreich war, obwohl die Viruslast im Blut nicht vollständig abnahm. Obwohl die Inzidenz eines Virostatika-resistenten CMV-Pneumonie Patienten eher selten im Bereich der Lungentransplantationsmedizin auftritt, haben die Daten überdies Relevanz. Sie veranschaulichen das enorme Potential der adoptiven T-Zelltherapie als eine neue Behandlungsmöglichkeit für Risikopatienten, für die keine adäquaten antiviralen Behandlungsmöglichkeiten mehr existieren.

Wir konnten zeigen, dass, verglichen mit Patienten ohne häufige CMV-Reaktivierung / Infektion, Nierentransplantierte Patienten mit rezidivierender CMV-Infektion eine erhöhte Frequenz an regulatorischen T-Zellen mit erhöhtem suppressivem Einfluss auf die CMV-spezifische Teff Reaktivität aufweisen (Publikation 2; (16)). Repetitiver Antigenkontakt *in vivo* ist mit der *in vivo* Expansion von iTregs assoziiert (32), was, durch antigen-spezifische Suppression der Teff, eine verminderte virale Kontrolle der CMV-Reaktivierung impliziert. Des Weiteren war es uns möglich, CMV-spezifische iTregs zu isolieren, zu charakterisieren und zu expandieren, was den Antigen-gesteuerten Prozess der Teff-Regulation unterstreicht. Die expandierten antigenspezifischen Tregs supprimieren zudem *in vitro* Teff nach Epitop-spezifischer Reaktivierung.

Die humanen CMV-spezifischen CD25^{hoch} und CD25^{gering} T-Zellen zeigen trotz unterschiedlicher Funktionalität eine identische Klonalität der TZR. Dies verdeutlicht, dass Teff und iTregs mit der gleichen viralen Epitopspezifität von einem „Mutterklon“ differenzieren können. Diese Daten verdeutlichen den Einfluss CMV-spezifischer iTregs auf die CMV-spezifische T-Zellreaktivität. Die gezielte Depletion CMV-spezifischer iTregs *in vivo* könnte die Wirksamkeit CMV-spezifischer Teff-Zellprodukte beim adoptiven T-Zelltransfer verbessern, um schwere CMV-Erkrankungen zu vermeiden und die protektiven Effekte *in vivo* nach Transfer verlängern.

Die Langlebigkeit der adoptiv-transferierten Zellen ist eine große Herausforderung für den Langzeiterfolg der Therapie. Konventionelle Expansionsstrategien humaner antigen-spezifischer T-Zellen bringen zumeist T_{EM} / T_{EMRA} Zellen mit guter Effektorfunktion, jedoch limitierter *in vivo* Adoption hervor (7, 8). Wir konnten durch die partielle Inhibierung des IL-2-Rezeptor Signalweges während der Expansion in einem GMP-konformen Prozess Antigen-spezifische T-Zellen mit verbesserter Funktion generieren, welche überdies einen Phänotyp von langlebigen Gedächtnis T-Zellen besitzen (Publikation 3; (30)). Es konnten T-Zellen mit einem erhöhten T_{CM} Anteil generiert werden, welche dessen ungeachtet sehr gute Effektorfunktion und zudem verbesserte Polyfunktionalität aufweisen. Die Daten korrelieren mit den Arbeiten von Araki et al., welche den Effekt von Rapamycin auf die Anzahl und Qualität der Gedächtnis T-Zellen Differenzierung in Mäusen beschreiben (24, 25). Rapamycin steigert das Ausmaß, die Dauer und die Qualität der Antigen-spezifischen T-Zellantwort. Diese Daten zeigen jedoch stets den Einfluss Rapamycins nach primärem Antigenkontakt *in vivo* (33). Die hier gezeigten Daten unterscheiden sich von diesen Studien, da durch Rapamycin eine bereits existierende Gedächtnis T-Zellantwort verbessert wird. Des Weiteren zeigen unsere generierten T_{CM} eine antigenspezifische Polyfunktionalität und keine verminderte Zytokinseznierung, was den genannten Studien widerspricht. Interessanterweise war die $CD8^+$ T_{CM} -Formierung von dem Anteil der $CD4^+$ T-Zellen in Kultur abhängig. Die CCR7 und CD62L Expression war nur verlängert wenn $CD4^+$ T-Zellen in der Expansionskultur vorhanden waren. Dies unterstreicht die Bedeutung der $CD4^+$ T-Zellhilfe für die $CD8^+$ T-Zell Gedächtnis Etablierung nach einem wiederholten Antigenkontakt. Der Anteil der T_{CM} im Zellprodukt zeigte in vielen präklinischen Studien eine verbesserte und dauerhafte Adoption von Teff. T_{CM} zeigten eine erhöhte und verlängerte Expression der mit diesem Zelltyp assoziierten Oberflächenmolekülen CCR7 und CD62L (20, 23). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass $CD4^+$ T-Zellen, abgesehen von einer Helferfunktion, direkte antivirale lytische T-Zellantworten auslösen. Zytolytische $CD4^+$ T-Zellen sind in vielen chronischen Erkrankungen, wie EBV, HIV und CMV von Bedeutung (34). Diese Erkenntnisse dieser Arbeit bieten wichtige Implikationen für die T_{CM} Generierung zur Verbesserung des Adoptionsverhaltens von Teff. Zudem bieten die hier gezeigten Ansätze eine universell translative Umsetzung durch GMP-konforme Protokolle.

Die Beachtung der beschriebenen Faktoren, wie die Depletion regulatorischer T-Zellen, sowie die Verbesserung des Adoptionsverhalten und der T-Zellfunktionalität, ermöglichen eine verbesserte Abschätzung des Transplantatabstoßungsrisikos und könnten zur Rekonstitution der klinischen Beschwerdefreiheit nach Transplantation solider Organe beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Einsele, H., Kapp, M., and Grigoleit, G.U. 2008. CMV-specific T cell therapy. *Blood Cells Mol Dis* 40:71-75.
2. Razonable, R.R., Rivero, A., Rodriguez, A., Wilson, J., Daniels, J., Jenkins, G., Larson, T., Hellinger, W.C., Spivey, J.R., and Paya, C.V. 2001. Allograft rejection predicts the occurrence of late-onset cytomegalovirus (CMV) disease among CMV-mismatched solid organ transplant patients receiving prophylaxis with oral ganciclovir. *J Infect Dis* 184:1461-1464.
3. Reinke, P., Prosch, S., Kern, F., and Volk, H.D. 1999. Mechanisms of human cytomegalovirus (CMV) (re)activation and its impact on organ transplant patients. *Transpl Infect Dis* 1:157-164.
4. Riddell, S.R., Watanabe, K.S., Goodrich, J.M., Li, C.R., Agha, M.E., and Greenberg, P.D. 1992. Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257:238-241.
5. Fujita, Y., Rooney, C.M., and Heslop, H.E. 2008. Adoptive cellular immunotherapy for viral diseases. *Bone Marrow Transplant* 41:193-198.
6. Brestrich, G., Zwinger, S., Fischer, A., Schmuck, M., Rohmild, A., Hammer, M.H., Kurtz, A., Uharek, L., Knosalla, C., Lehmkuhl, H., et al. 2009. Adoptive T-cell therapy of a lung transplanted patient with severe CMV disease and resistance to antiviral therapy. *Am J Transplant* 9:1679-1684.
7. Savoldo, B., Goss, J.A., Hammer, M.M., Zhang, L., Lopez, T., Gee, A.P., Lin, Y.F., Quiros-Tejeira, R.E., Reinke, P., Schubert, S., et al. 2006. Treatment of solid organ transplant recipients with autologous Epstein Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes (CTLs). *Blood* 108:2942-2949.
8. Shaffer, D.R., Rooney, C.M., and Gottschalk, S. 2010. Immunotherapeutic options for Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disease following transplantation. *Immunotherapy* 2:663-671.
9. Hammer, M.H., Meyer, S., Brestrich, G., Moosmann, A., Kern, F., Tesfa, L., Babel, N., Mittenzweig, A., Rooney, C.M., Hammerschmidt, W., et al. 2005. HLA type-independent generation of antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *Eur J Immunol* 35:2250-2258.
10. Haque, T., Wilkie, G.M., Jones, M.M., Higgins, C.D., Urquhart, G., Wingate, P., Burns, D., McAulay, K., Turner, M., Bellamy, C., et al. 2007. Allogeneic cytotoxic T-cell therapy for EBV-positive posttransplantation lymphoproliferative disease: results of a phase 2 multicenter clinical trial. *Blood* 110:1123-1131.
11. Brestrich, G., Zwinger, S., Roemhild, A., Noutsias, M., Rohde, M., Keeren, K., Sawitzki, B., Volk, H.D., Reinke, P., and Hammer, M.H. 2009. Generation of CMV-specific T-cell lines from seropositive solid-organ-transplant recipients for adoptive T-cell therapy. *J Immunother* 32:932-940.
12. Wlodarski, M.W., Gondek, L.P., Nearman, Z.P., Plasilova, M., Kalaycio, M., Hsi, E.D., and Maciejewski, J.P. 2006. Molecular strategies for detection and quantitation of clonal cytotoxic T-cell responses in aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 108:2632-2641.
13. Hermans, I.F., Silk, J.D., Yang, J., Palmowski, M.J., Gileadi, U., McCarthy, C., Salio, M., Ronchese, F., and Cerundolo, V. 2004. The VITAL assay: a versatile fluorometric technique for assessing CTL- and NKT-mediated cytotoxicity against multiple targets in vitro and in vivo. *J Immunol Methods* 285:25-40.
14. Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S.K., Sixbey, J.W., Gan, Y., Srivastava, D.K., Bowman, L.C., Krance, R.A., Brenner, M.K., et al. 1998. Infusion of cytotoxic

- T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92:1549-1555.
15. Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-400.
 16. Schwele, S., Fischer, A.M., Brestrich, G., Wlodarski, M.W., Wagner, L., Schmueck, M., Roemhild, A., Thomas, S., Hammer, M.H., Babel, N., et al. 2012. Cytomegalovirus-Specific Regulatory and Effector T Cells Share TCR Clonality-Possible Relation to Repetitive CMV Infections. *Am J Transplant* 12:669-681.
 17. Kern, F., Surel, I.P., Brock, C., Freistedt, B., Radtke, H., Scheffold, A., Blasczyk, R., Reinke, P., Schneider-Mergener, J., Radbruch, A., et al. 1998. T-cell epitope mapping by flow cytometry. *Nat Med* 4:975-978.
 18. Kern, F., Faulhaber, N., Frommel, C., Khatamzas, E., Prosch, S., Schonemann, C., Kretzschmar, I., Volkmer-Engert, R., Volk, H.D., and Reinke, P. 2000. Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 30:1676-1682.
 19. Sakaguchi, S., and Powrie, F. 2007. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* 317:627-629.
 20. Wang, X., Berger, C., Wong, C.W., Forman, S.J., Riddell, S.R., and Jensen, M.C. 2011. Engraftment of human central memory-derived effector CD8+ T cells in immunodeficient mice. *Blood* 117:1888-1898.
 21. Tussey, L., Speller, S., Gallimore, A., and Vessey, R. 2000. Functionally distinct CD8+ memory T cell subsets in persistent EBV infection are differentiated by migratory receptor expression. *Eur J Immunol* 30:1823-1829.
 22. Berger, C., Jensen, M.C., Lansdorp, P.M., Gough, M., Elliott, C., and Riddell, S.R. 2008. Adoptive transfer of effector CD8+ T cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates. *J Clin Invest* 118:294-305.
 23. Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401:708-712.
 24. Araki, K., Turner, A.P., Shaffer, V.O., Gangappa, S., Keller, S.A., Bachmann, M.F., Larsen, C.P., and Ahmed, R. 2009. mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* 460:108-112.
 25. Araki, K., Youngblood, B., and Ahmed, R. 2010. The role of mTOR in memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev* 235:234-243.
 26. Turner, A.P., Shaffer, V.O., Araki, K., Martens, C., Turner, P.L., Gangappa, S., Ford, M.L., Ahmed, R., Kirk, A.D., and Larsen, C.P. 2011. Sirolimus enhances the magnitude and quality of viral-specific CD8+ T-cell responses to vaccinia virus vaccination in rhesus macaques. *Am J Transplant* 11:613-618.
 27. Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124:471-484.
 28. Mariotti, J., Foley, J., Jung, U., Borenstein, T., Kantardzic, N., Han, S., Hanson, J.T., Wong, E., Buxhoeveden, N., Trepel, J.B., et al. 2008. Ex vivo rapamycin generates apoptosis-resistant donor Th2 cells that persist in vivo and prevent hemopoietic stem cell graft rejection. *J Immunol* 180:89-105.
 29. Rao, R.R., Li, Q., Odunsi, K., and Shrikant, P.A. 2010. The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. *Immunity* 32:67-78.

30. Schmueck, M., Fischer, A.M., Hammoud, B., Brestrich, G., Fuehrer, H., Luu, S.H., Mueller, K., Babel, N., Volk, H.D., and Reinke, P. 2012. Preferential Expansion of Human Virus-Specific Multifunctional Central Memory T Cells by Partial Targeting of the IL-2 Receptor Signaling Pathway: The Key Role of CD4+ T Cells. *J Immunol* 188:5189-5198.
31. Precopio, M.L., Betts, M.R., Parrino, J., Price, D.A., Gostick, E., Ambrozak, D.R., Asher, T.E., Douek, D.C., Harari, A., Pantaleo, G., et al. 2007. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med* 204:1405-1416.
32. Zhou, Y. 2008. Regulatory T cells and viral infections. *Front Biosci* 13:1152-1170.
33. Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. 2005. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol* 17:326-332.
34. Brown, D.M., Kamperschroer, C., Dilzer, A.M., Roberts, D.M., and Swain, S.L. 2009. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cell Immunol* 257:69-79.

7. Anteilserklärung

Publikation 1: Impact factor 2009: 6.433

Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmueck M, Römhild A, Hammer MH, Kurtz A, Uharek L, Knosalla C, Lehmkuhl H, Volk HD, Reinke P. *Adoptive T-Cell Therapy of a Lung Transplanted Patient with Severe CMV Disease and Resistance to Antiviral Therapy*. Am J Transplant. 2009; 9(7): 1679-84

5 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Assistenz bei der Analyse der durchflusszytometrischen Daten, Assistenz beim Anfertigen des Manuskriptes

Publikation 2: Impact factor 2011: 6.051

Schwele S, Fischer AM, Brestrich G, Wlodarski MW, Wagner L, Schmueck M, Roemhild A, Thomas S, Hammer MH, Babel N, Kurtz A, Maciejewski JP, Reinke P, Volk HD. *Cytomegalovirus-Specific Regulatory and Effector T Cells Share TCR Clonality-Possible Relation to Repetitive CMV Infections*. Am J Transplant. 2012; 12(3): 669-681

15 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Hilfe bei Auswertung und Analyse der Daten, Durchführung einiger Experimente, Assistenz beim Anfertigen des Manuskriptes

Publikation 3: Impact factor 2011: 5.745

Schmueck M, Fischer AM, Hammoud B, Brestrich G, Fuehrer H, Luu SH, Mueller K, Babel N, Volk HD and Reinke P. *Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central-memory T cells by partial targeting the IL-2 receptor signaling pathway – the key role of CD4+ T cells*. J Immunol. 2012; 188;5189-5198

75 Prozent

Beitrag im Einzelnen: Experimentelles Design, Durchführung der meisten Experimente, Auswertung und Analyse der Daten, Anfertigung des Manuskriptes

Michael Schmück

8. Druckexemplare der ausgewählten Publikationen

Publikation 1:

Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmueck M, Römhild A, Hammer MH, Kurtz A, Uharek L, Knosalla C, Lehmkuhl H, Volk HD, Reinke P. *Adoptive T-Cell Therapy of a Lung Transplanted Patient with Severe CMV Disease and Resistance to Antiviral Therapy*. Am J Transplant. 2009; 9(7): 1679-84

Publikation 2:

Schwele S, Fischer AM, Brestrich G, Wlodarski MW, Wagner L, Schmueck M, Roemhild A, Thomas S, Hammer MH, Babel N, Kurtz A, Maciejewski JP, Reinke P, Volk HD. *Cytomegalovirus-Specific Regulatory and Effector T Cells Share TCR Clonality-Possible Relation to Repetitive CMV Infections*. Am J Transplant. 2012; 12(3): 669-681

Publikation 3:

Schmueck M, Fischer AM, Hammoud B, Brestrich G, Fuehrer H, Luu SH, Mueller K, Babel N, Volk HD and Reinke P. *Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central-memory T cells by partial targeting the IL-2 receptor signaling pathway – the key role of CD4+ T cells*. J Immunol. 2012; 188;5189-5198

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

10. Publikationsliste

Publikationen:

Brestrich G, Zwinger S, Fischer A, Schmück M, Römhild A, Hammer MH, Kurtz A, Uharek L, Knosalla C, Lehmkuhl H, Volk HD, Reinke P. *Adoptive T-Cell Therapy of a Lung Transplanted Patient with Severe CMV Disease and Resistance to Antiviral Therapy*. Am J Transplant. 2009; 9(7): 1679-84

Schwele S, Fischer AM, Brestrich G, Wlodarski MW, Wagner L, Schmueck M, Roemhild A, Thomas S, Hammer MH, Babel N, Kurtz A, Maciejewski JP, Reinke P, Volk HD. *Cytomegalovirus-Specific Regulatory and Effector T Cells Share TCR Clonality-Possible Relation to Repetitive CMV Infections*. Am J Transplant. 2012; 12(3): 669-681

Schmueck M, Fischer AM, Hammoud B, Brestrich G, Fuehrer H, Luu SH, Mueller K, Babel N, Volk HD and Reinke P. *Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central-memory T cells by partial targeting the IL-2 receptor signaling pathway – the key role of CD4+ T cells*. J Immunol. 2012; 188;5189-5198

Patent-Applikation:

EP 11177524.3: *Antigen-specific CD4+ and CD8+ central-memory T cell preparations for adoptive T cell therapy*; 12.08.11; IP filed 2011

Vorträge:

SFB TR36 Retreat, Wildbad Kreuth, Deutschland, Dez. 2011

Talk: “*Preferential expansion of virus-specific multifunctional central-memory T cells*”

2nd BSRT PhD Symposium, Berlin, Deutschland, Dez. 2011

Talk: “*Impaired IL-2 signaling promotes CD4-mediated antiviral CD8+ T cell response*”

3rd STThera Meeting, Berlin, Deutschland, März, 2011

Talk: “*The eligible role of virus-specific cytotoxic CD4+ T-cells within effector T-cell products for adoptive T-cell therapy*”

1st PhD Retreat of the Grad School SFB TR36, Spitzingsee, Deutschland, Nov. 2010

Talk: “*Ex vivo generation of HCMV-peptide specific T-cell lines from naïve donors*”

2nd STThera Meeting, Berlin, Deutschland, März, 2010

Talk: “*Ex vivo generation of HCMV-peptide specific T-cell lines from naïve donors*”

1st, STThera Meeting, Berlin, Deutschland, Feb. 2009

Talk: “*Ex vivo generation of HCMV-peptide specific T-cell lines from naïve donors*”

Poster Präsentationen:

2nd Symposium on Adoptive T Cell Therapy, Berlin, Deutschland, Mai 2012

“*Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central-memory T cells by partial targeting the IL-2 receptor signaling pathway – the key role of CD4+ T cells*”

1st School of Translational Immunology, Potsdam, Deutschland, März 2012

“*Preferential expansion of human virus-specific multifunctional central-memory T cells by partial targeting the IL-2 receptor signaling pathway – the key role of CD4+ T cells*”

Joint Annual Meeting SII CA/DGfI, Riccione, Italien, Okt. 2011
“Impaired IL-2 signaling promotes CD4-mediated antiviral CD8+ T cell response”

XII TTS Basic Science Symposium / II ESOT Basic Science Meeting, Boston, USA, Jun. 2011
“Impaired IL-2 signaling promotes CD4-mediated antiviral CD8+ T cell response”

14th International Congress of Immunology, Kobe, Japan, Aug. 2010
“Ex vivo generation of HCMV-peptide specific T-cell lines from naïve donors”

2nd European Congress of Immunology & Satellite Symposium “Tolerance and Immunoregulation – From basic mechanisms to therapeutic applications”, Berlin, Deutschland, Sep. 2009
“Ex vivo generation of HCMV-peptide specific T-cell lines from naïve donors”

American Transplant Congress, Boston, USA, Jun. 2009
“Ex vivo generation of HCMV-peptide specific T-cell lines from naïve donors”

11. Selbständigkeitserklärung

„Ich, Schmück, Michael, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung antigenspezifischer T-Zellen in der Transplantation am Beispiel CMV-reaktiver T-Zellen: Etablierung von Testsystemen für die adoptive T-Zelltherapie“ 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.“

26.06.2012

Datum

Unterschrift

12. Danksagung

Für meine Doktorarbeit schulde ich sehr vielen Menschen einen herzlichen Dank. Besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Hans-Dieter Volk für die Möglichkeit, in Ihrem Arbeitsreis meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen, bedanken. Sie waren stets eine Quelle der Inspiration und sorgten mit viel Geduld für das Gelingen der Arbeit. Ein sehr großer Dank gilt meiner Betreuerin Prof. Dr. Petra Reinke für Ihre konstruktive Kritik und Ihre vielen Ideen, die immer wieder den nötigen Schwung gegeben haben. Ein großer Dank gilt Dr. Gordon Brestrich, der mich zu Beginn der Arbeit fürsorglich in die Thematiken eingeführt hat. Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder, sowie meiner Freundin Marie bedanken, die mich stets bestärkt und unterstützt haben. Ein großer Dank geht aber auch an meine Kollegen, denn die Zusammenarbeit mit Euch war ein Meilenstein bei der Erstellung meiner Doktorarbeit. Auch möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die mich nicht nur tatkräftig unterstützt haben, sondern mich stets aufbauten und für die erforderliche Abwechslung sorgten. Für die finanzielle Unterstützung danke ich dem SFB TR36, der Charité sowie dem BMBF.