

3. Material und Methoden

3.1 Probanden und Materialien

Probanden

Das Vorhaben zur Generierung und Charakterisierung von CMV-spezifischen T-Zellen wurde durch die Ethikkommission der Charité Universitätsmedizin Berlin genehmigt.

In der Studie wurden 5 gesunde und 10 nierentransplantierte Spender untersucht, die schriftlich informiert wurden und sich freiwillig für die Teilnahme bereit erklärten. Es wurden nur Spender für die Studie zugelassen, die zu Beginn eine positive CMV-Serologie aufwiesen.

Tabelle 3: Probanden

Spender	Geschlecht	Alter	Art der Immunsuppression	Monate nach Transplantation
H-1	f	56	keine	---
H-2	m	27	keine	---
H-3	m	36	keine	---
H-4	f	48	keine	---
H-5	m	37	keine	---
Mittelwert		41		---
TX-1	m	56	Dreifachtherapie [#] , Rappamycin	11
TX-2	m	24	Dreifachtherapie [#]	24
TX-3	f	62	Dreifachtherapie [#]	35
TX-4	f	60	Dreifachtherapie [#]	41
TX-5	m	46	Steroide, CNI	7
TX-6	m	23	Dreifachtherapie [#]	12
TX-7	m	39	Dreifachtherapie [#]	16
TX-8	m	64	Dreifachtherapie [#]	85
TX-9	f	69	Steroide, CNI	35
TX-10	f	60	Dreifachtherapie [#]	79
Mittelwert		50		34.5

CNI, Calcineurininhibitor; MMF, Mycophenolatmofetil; m, männlich; f, weiblich

[#] Die Dreifachtherapie besteht aus Steroiden, MMF und CNI

Tabelle 4: Geräte

Art des Gerätes	Hersteller
Zentrifuge	Heraeus
Sterilbank	Heraeus
Inkubator	Heraeus
Mikroskop	Leica
Autoklav	Gössner
Kühlschrank	Liebherr
Wasserbad	GFL
Stickstofftank	Taylor-Wharton
-80°C Gefriertruhe	Heraeus
Feinwaage	Satorius
pH-Meter	Wiss.-techn. Werkstätte
Gamma-Cell 40 (Bestrahlung)	Atomic Energy
Pipetten 1ml/ 200µl/ 10µl	Greiner
Pipetierhilfe	Matrix Technologies
ELISA/ Fluoreszenzmessgerät	Tecan
CliniMACS Plus	Miltenyi Biotech
MiniMACS Separator	Miltenyi Biotech
Rotationseinrichtung	Miltenyi Biotech
Steril Tube Fuser	Applied Critical Fluids
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik
Thermocycler	Perkin Elmer
Cycler Gene Amp 9700	Applied Biosystems
Durchflusszytometer Calibur	Becton& Dickinson
Neubauer Zählkammer	Fein-Optik
Einfrierbox	Nalgene
Glaswaren	Schott

Tabelle 5: Einwegartikel

Artikel	Hersteller	Anwendung
Pipettenspitzen 1ml/ 200µl/ 10µl	Eppendorf	allgemein
Transferringpipetten 1,2,5,10,25 ml	Becton& Dickinson	allgemein
Eppendorftubes 0,5, 1,5 ml	Eppendorf	allgemein
Falcon-Röhrchen 15, 50ml	Becton& Dickinson	allgemein
Pasteurpipetten	Sarstedt	Zellkultur
96-Lochplatten Rundboden	Corning	Zellkultur
24, 96-Lochplatten Flachboden	Corning	Zellkultur
Zellkulturflaschen 25, 75 cm ²	Corning	Zellkultur
Zellsieb 40µm	Greiner	Zellkultur
Sterilfilter 0,2µm	Fisher Scientific	Zellkultur
Einwegspritzen 2, 5, 10, 25 50 ml	Braun	allgemein
14ml-Röhrchen	Greiner	Ficollgradient
Zitrat-/ Heparinröhrchen	Sarstedt	Blutentnahme
MiniMACS-Säule	Miltenyi Biotech	T-Zell Isolierung
Transferbeutel 600ml	Miltenyi Biotech	GMP T-Zell Isolierung
CliniMACS-Schlauch Set	Miltenyi Biotech	GMP T-Zell Isolierung
PreSystem Filter	Miltenyi Biotech	GMP T-Zell Isolierung
Luer/Spike Interconnector	Miltenyi Biotech	GMP T-Zell Isolierung
96-Lochplatten unbeschichtet	Nunc	ELISA
Kryoröhrchen 1,8, 5 ml	Nunc	Zelleinfrierung
Micronicröhrchen 0,5, 5 ml	Becton&Dickinson	Durchflusszytometrie

Tabelle 6: Reagenzien

Reagenz	Hersteller	Anwendung
PBS	Biochrom	allgemein
RPMI-Medium	Biochrom	Zellkultur
Fötales Kälberserum	Biochrom	Zellkultur
Penizillin/ Streptomycin	Biochrom	Zellkultur
Proleukin 2 (IL-2)	Chiron	T-Zellkultur
Aciclovir	Ratiopharm	LCL-Zellkultur
Cyclosporin A	Novatis	LCL-Zellkultur
B 95-8 Viruslysate	Quelle Rooney	LCL-Zellkultur
Ficoll Plaque	Amersham	PBMC-Isolierung
Tryphanblau	Sigma	Zellzählung
Dimethylsulfoxid	Sigma	Kryokonservierung

pp65-Peptidpool	JPT Peptide Technologies	T-Zellstimulation
IE-1-Peptidpool	JPT Peptide Technologies	T-Zellstimulation
IFN- γ -Secretion Assay	Miltenyi Biotech	T-Zellisolierung
EDTA	Sigma	MACS-Puffer
CliniMACS Cytokine Capture System	Miltenyi Biotech	T-Zellisolierung GMP
Humanes AB Serum	Sigma	T-Zellkultur GMP
Calcein AM	Mobitech	Zytotoxizitätstest
Triton X 100	Sigma	Zytotoxizitätstest
Human IFN- γ -ELISA Set	Becton& Dickinson	ELISA
ELISA Substrat	Becton& Dickinson	ELISA
Tween 20	Sigma	ELISA
Natriumhydrogencarbonat	Sigma	ELISA
Dinatriumcarbonat	Sigma	ELISA
Schwefelsäure	Sigma	ELISA
Natriumazid	Sigma	für FACS-Puffer
Paraformaldehyd	Sigma	Zellfixierung
Brefeldin A	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Perm 2 Lösung	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD3-FITC/ PE/ PerCp/ APC	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD8-FITC/ PE/ PerCp/ APC	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD4-FITC/ PE/ PerCp/ APC	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD16-FITC/ PE	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD19-PE	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-IFN- γ -FITC	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD27-PE	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD28-FITC	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CD62L-PerCp	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
Anti-CCR7-FITC	Becton& Dickinson	Durchflusszytometrie
β -Mercaptoethanol	Sigma	Für Lysispuffer
RNeasy Mini Kit	Qiagen	RNA Isolierung
First Strand Buffer	Gibco	cDNS-Synthese
Dithiothreitol	Gibco	cDNS Synthese
Reverse Transkriptase	Gibco	cDNS Synthese
RNAse Inhibitor	Promega	cDNS Synthese
Oligo dT Primer	Pharmacia	cDNS Synthese
Desoxynukleosidtriphosphate	Pharmacia	cDNS Synthese
DNase	Ambion	cDNS Synthese
TaqMan Universal Master Mix	Applied Biosystems	TRBV-Analyse
TRBV Primer und Sonden	Institut für Kardiologie	TRBV-Analyse
Mycoplasma Detection Kit	Roche	Reinheitsprüfung GMP

Medien und Puffer

Zellkulturmedium:

500ml RPMI-Medium
2mM L-Glutamin
50 ml fötales Kälberserum
5 ml Penizillin/ Streptomycin

T- Zellkulturmedium:

500ml RPMI-Medium
2mM L-Glutamin
50 ml fötales Kälberserum
5 ml Penizillin/ Streptomycin
50.000 U IL-2 (100 U/ml)

GMP-Zellkulturmedium

500ml RPMI-Medium
2mM L-Glutamin
50 ml humanes AB Serum

FACS-Puffer

500 ml PBS
5ml fötales Kälberserum
0,01% Natriumazid

Fixierungslösung

100 ml PBS
2g Paraformaldehyd

ELISA-Coatingpuffer

500 ml destilliertes H₂O
1,78g Dinatriumcarbonat
4,2g Natriumhydrogencarbonat

EILSA-Waschpuffer

500 ml PBS
250 µl Tween 20

Einfriermedium

45ml fötales Kälberserum
5ml Dimethylsulfoxid

MACS-Puffer	500 ml PBS
	25ml fötales Kälberserum
	2mM EDTA

3.2 Methoden

3.2.1 PBMC-Isolierung

PBMCs wurden mit Hilfe eines Dichtegradienten aus peripherem Blut der Probanden isoliert. Dazu wurde das Blut 1:1 mit PBS verdünnt. 14 ml Röhrchen wurden mit jeweils 3ml Ficoll Plaque bestückt und vorsichtig mit 7 ml Blut überschichtet. Die Röhrchen wurden bei Raumtemperatur (RT) für 40 Minuten bei 400xg mit ausgeschalteter Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde die Interphase, welche die PBMCs enthält, mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgezogen. Die Zellen wurden in 50 ml PBS überführt und 2-mal gewaschen.

3.2.2 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zellsuspensionen wurden mit Tryphanblau im Verhältnis 1:1 gemischt und auf eine Neubauer-Zählkammer aufgebracht. Es wurden die lebenden ungefärbten Zellen in allen 4 Quadranten ausgezählt und der Mittelwert pro Quadrat errechnet. Dieser wurde mit 2 multipliziert um die Verdünnung zu berücksichtigen. Der entstehende Wert ergab die Zellkonzentration $\times 10^4$ pro ml Zellsuspension.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

PBMCs, LCLs, oder T-Zelllinien wurden eingefroren, soweit sie für eine spätere Verwendung vorgesehen waren. Dazu wurden die Zellen gezählt und 2-mal in Zellkulturmedium bei 4°C gewaschen. Das Pellet wurde gebrochen und 20 min auf Eis gekühlt. Danach wurden die Zellen in 4°C kaltem Einfriermedium in einer Konzentration von 5 bis 10×10^6 /ml resuspendiert und zügig in beschriftete Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden mit Hilfe einer Einfrierbox auf -70°C abgekühlt und anschließend in flüssigen Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in einem 37°C warmen Wasserbad bis knapp über den Schmelzpunkt erwärmt. Die Suspension wurde anschließend zügig in 50 ml eiskaltes Zellkulturmedium überführt und 2-mal gewaschen.

3.2.4 LCL-Generierung und -Kultivierung

5×10^6 PBMCs wurden in 200 µl B95-8 Viruslysate resuspendiert und anschließend mit 1,8 ml Zellkulturmedium aufgefüllt, dem 1 µg/ml Cyclosporin A zur Inhibition der T-Zellfunktion zugesetzt war. 1 ml dieser Suspension wurde in 5 Vertiefungen einer 96-Lochplatte mit Flachboden gleichmäßig verteilt. Die restliche Suspension wurde im Verhältnis 1:1 mit Zellkulturmedium und Cyclosporin A verdünnt und in weitere 10 Vertiefungen der 96-Lochplatte aufgebracht. Die Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. 100 µl des Überstandes wurden jede Woche durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Nach 2-3 Wochen zeigten die LCLs starkes Wachstum und konnten schrittweise in eine 24-Lochplatte, eine 25 cm² Kulturflasche und letztendlich in eine 75 cm² Kulturflasche expandiert werden. Ab diesem Zeitpunkt galt die LCL-Linie als etabliert, und dem Medium wurde ab diesem Zeitpunkt 25 µg/ml Aciclovir zur Hemmung der EBV-Replikation zugesetzt. Bei etablierten LCL-Linien wurde 2-mal wöchentlich das Medium gewechselt, wobei die Hälfte der Suspension durch frisches Zellkulturmedium ersetzt wurde.

3.2.5 T-Zell-Generierung und -Kultivierung

Die Generierung der T-Zelllinien fand durch spezifische Stimulation, Isolierung der IFN-γ-sezernierenden Zellen und deren Expansion statt.

Zur Stimulation wurden die PBMCs der Spender in Zellkulturmedium mit einer Konzentration von 2×10^7 /ml resuspendiert. Jeweils 0,5 ml der Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte gegeben, mit 1 µg/ml pp65- oder IE-1-Peptidpool versetzt und für 6h im Inkubator kultiviert. Für die Isolation mittels IFN-γ-Secretion Assay wurden die Zellen unter Zugabe von 2ml kaltem PBS mit einer Pasteurpipette in ein 50ml Falcon Tube überführt. Die Zellen wurden bei 4°C mit 400xg für 10 Minuten zentrifugiert und das Pellet gebrochen. Danach wurden 100 µl kaltes Zellkulturmedium und 25 µl Catch Antikörper pro 2×10^7 PBMCs hinzugefügt und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit kaltem Zellkulturmedium 2-mal gewaschen. Für die IFN-γ-Sezernierung wurden die Zellen

mit warmem Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt und auf mehrere Falcon Röhren verteilt, sodass maximal 25ml in jedem Röhren waren. Die Röhren wurden anschließend für 50 Minuten in einer Rotationseinrichtung bei 37°C und 5% CO_2 mit langsamer Rotation belassen. Der Stopp der IFN- γ -Sekretion erfolgte durch die Zugabe von 25 ml kaltem Zellkulturmedium und der Inkubation für 10 Minuten auf Eis. Die Zellen wurden gewaschen und mit $100\mu\text{l}$ Medium und $25\mu\text{l}$ Detection Antikörper pro 2×10^7 Zellen für 10 Minuten auf Eis fluorometrisch gefärbt. Nach einem Waschschriff konnten einige Zellen für die Bestimmung der spezifischen Vorfrequenz entnommen werden. Dazu wurde deren Oberfläche mit anti-CD3/ -CD4 und -CD8 Antikörpern gefärbt. Der Großteil der Zellen wurde mit Hilfe der anti-PE-Microbeads magnetisch markiert. Dazu wurden Konzentrationen wie bei den anderen Markierungsschritten verwendet und die Zellen für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach dem Waschen wurden die IFN- γ -sezernierenden Zellen im MiniMACS-Separator unter Verwendung von 2 MiniMACS-Säulen isoliert. Die radioaktive Bestrahlung der Negativfraktion erfolgte mit 30 Gray (Gy). Diese wurde anschließend gewaschen und in 1ml T-Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Vertiefung einer 24-Lochplatte aufgebracht. Die isolierten IFN- γ -sezernierenden Zellen wurden ebenfalls in 1 ml T-Zellkulturmedium resuspendiert und den Feederzellen zugesetzt. Die Platte wurde im Inkubator für 20-28 Tage inkubiert, wobei bei Farbumschlag des Indikators die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt wurde. Zusätzlich wurde die Kultur täglich im Lichtmikroskop untersucht. Bei der Ausbildung einer konfluenten Zellschicht wurde der Inhalt jeder Vertiefung auf zwei neue Vertiefungen verteilt und mit T-Zellkulturmedium aufgefüllt.

3.2.6 T-Zell-Generierung und -Kultivierung unter GMP-Bedingungen

Alle Arbeiten fanden in einem Labor mit A- und B-Reinraumklasse unter Verwendung zugelassener Schutzkleidung statt. Um mögliche Kontaminationen auszuschließen, wurden bis auf die Expansion der T-Zellen alle Arbeiten in geschlossenen Systemen durchgeführt. Dazu wurden Beutel- und Schlauchsysteme verwendet, die sich mit Hilfe eines Plastikschweißgerätes (steril tube fuser) beliebig miteinander verbinden oder trennen ließen. Die Isolierung der IFN- γ -sezernierenden Zellen wurde automatisch mit Hilfe eines CliniMACS Plus durchgeführt (Abbildung 5). 1×10^9 PBMCs des haemopoetischen Stammzellspenders wurden dazu in einen Transferbeutel unter Verwendung einer 50 ml Einwegspritze vorgelegt. Anschließend erfolgten zwei Waschschriffe, bei denen jeweils

500ml kaltes GMP-Zellkulturmedium in den Beutel gefüllt und dieser für 10 Minuten bei 4°C und 400xg zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde in einen weiteren Transferbeutel überführt, nachdem dieser mittels Tubing Heat Sealer an die Schläuche des ersten angeschweißt wurde. Nach den Waschsritten wurden die Zellen in 100ml GMP-Zellkulturmedium aufgenommen und durch Verwendung einer 2ml Einwegspritze mit 1µg/ml pp65- und IE-1-Peptidpool versetzt. Die Stimulation der Zellen erfolgte für 6h in einem Inkubator. Anschließend wurden die Zellen mittels CliniMACS-Cytokin-Capture-System markiert. Dazu wurden die Zellen 1-mal gewaschen und in 10ml kaltem GMP-Zellkulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde mit 7,5ml Catchmatrix Reagenz durch eine 10ml Einwegspritze versetzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde zu den Zellen 500ml warmes GMP-Zellkulturmedium gegeben. Der Inhalt wurde gleichmäßig auf 4 Beutel verteilt, und diese wurden bis zu einem Volumen von 250ml mit warmem GMP-Zellkulturmedium befüllt. Zur IFN- γ -Sezernierung wurden die 4 Beutel für 45 Minuten im Inkubator unter langsamer Rotation kultiviert. Die Unterbrechung der Sezernierung erfolgte durch Zugabe von 250 ml kaltem GMP-Zellkulturmedium. Nach einer Inkubation von 10 Minuten auf Eis wurden die Beutel zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Zellen wurden in einem Beutel vereinigt und in 10ml kaltem Medium aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen mit 7,5ml IFN- γ -Enrichment Reagenz versetzt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden 1-mal gewaschen und in 100 ml resuspendiert. Der Transferbeutel wurde mit Hilfe des Luer/Spike Interconnectors mit den CliniMACS-Schlauchsystem und dem PreSystem Filter verbunden. Das System wurde in den CliniMACS Plus eingespannt (Abbildung 5). Dieser wurde mit dem Programm ENRICHMENT 3.1 gestartet und führte automatisch die Selektion der magnetisch markierten IFN- γ -sezernierenden Zellen durch.

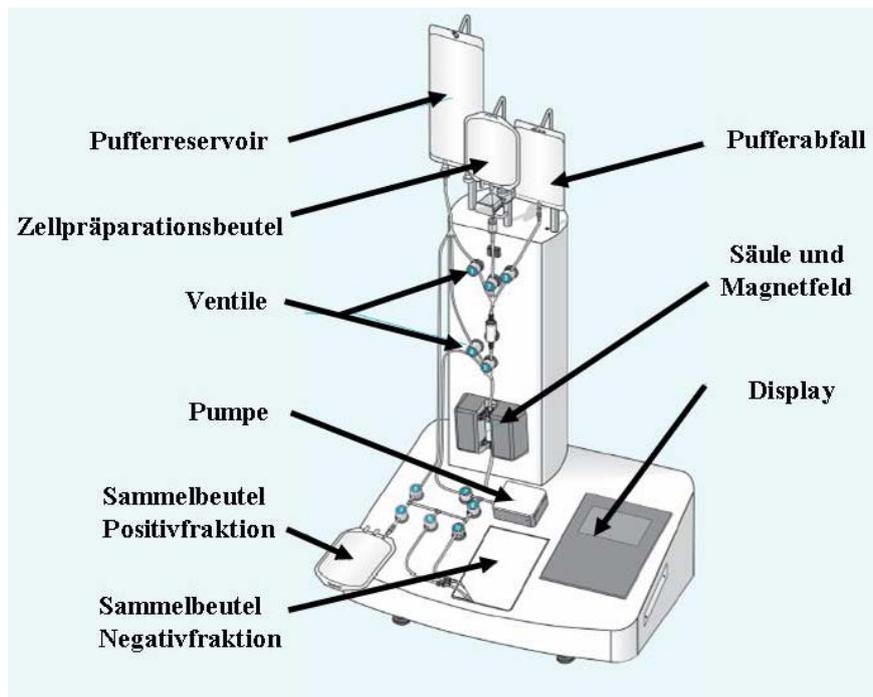


Abb. 5. Aufbau eines CliniMACS Plus

Die Abbildung stellt einen CliniMACS Plus mit eingespanntem Beutel-/ Schlauchsystem zur magnetischen Isolierung von Zellen dar. Die einzelnen Elemente sind durch Pfeile gekennzeichnet. Die Abbildung ist einem technischen Datenblatt der Firma Miltenyi Biotech GmbH entnommen.

Die Zellzahl der selektionierten Positivfraktion wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt und 5×10^5 der Zellen wurden pro Vertiefung in einer 24-Lochplatte ausgesät. Jeder Vertiefung wurden 2×10^7 mit 30 Gy bestrahlte Zellen der Negativfraktion als Feeder zugesetzt. Jede Vertiefung enthielt 2ml GMP-Zellkulturmedium, das anstelle von humanem AB-Serum autologes Serum des Stammzellspenders enthielt und mit 100 U/ml IL-2 versetzt war. Die Zellen wurden für 14 Tage kultiviert, wobei das Wachstum der Zellen jeden Tag unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wurde. Beim Umschlag des Farbindikators wurde 1ml des Mediums durch frisches ersetzt. Beim Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurde der Inhalt jeder Vertiefung auf zwei neue verteilt und mit GMP-Zellkulturmedium, dem 100 U/ml IL-2 zugesetzt war, aufgefüllt.

3.2.7 Durchflusszytometrie

Oberflächenfärbung

5×10^5 - 1×10^6 Zellen wurden in 0,5 ml Micronic Röhrchen überführt, mit FACS-Puffer aufgefüllt und 10 Minuten bei RT mit 400xg zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt,

das Pellet gebrochen und der Waschschrift wiederholt. Anschließend wurden die Zellen in 50µl FACS-Puffer resuspendiert und mit den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen der Antikörper für 10 min bei 4°C gefärbt. Nach dem Färben wurden die Zellen 2-mal gewaschen und für die Analyse in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen.

Intrazellulärfärbung

1×10^6 Zellen wurden in 0,5 ml Micronic Röhrchen überführt und 2-mal gewaschen. Das Pellet wurde in 100µl Fixierlösung aufgenommen und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden 2-mal gewaschen und anschließend permeabilisiert. Dazu wurde Perm2-Lösung 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und auf 4°C gekühlt. Anschließend wurden 100 µl dieser Verdünnung auf die pelletierten Zellen gegeben. Diese wurden 20 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend 2-mal gewaschen. Die Zellen wurden in 50µl FACS-Puffer aufgenommen und nach Herstellerangaben mit den jeweiligen Antikörpern für 30 Minuten bei 4°C gefärbt. Nach 2-maligen Waschen wurde das Pellet für die Analyse in 100µl FACS-Puffer aufgenommen.

Analyse und Auswertung

Die gefärbten Zellen wurden mit einem Durchflusszytometer der Marke Calibur mittels CellQuest-Software gemessen und anschließend unter Verwendung der Cytomation Summit Software ausgewertet.

3.2.8 Zytotoxizitätstestung

Zur Bestimmung des lytischen Potenzials wurde ein fluorometrischer Zytotoxizitätstest durchgeführt. Dazu wurden 1×10^6 Zielzellen mit 500µl einer 20mM Calceinlösung für 30 Minuten im Inkubator gefärbt. Die Färbung wurde anschließend durch die Zugabe von 10ml Zellkulturmedium abgestoppt. Die Zielzellen wurden 2-mal mit Zellkulturmedium gewaschen und bei einer Konzentration von 4×10^4 Zellen/ml resuspendiert. Es wurden jeweils 100µl dieser Suspension in 24 Vertiefungen einer 96-Lochplatte mit Flachboden pipettiert. Jeweils 4 dieser Vertiefungen sind anschließend mit 100µl Zellkulturmedium (Spontanlyse), einer 0,9% Triton-X100-Lösung (Maximallyse), $1,6 \times 10^5$ T-Zellen (40:1), 8×10^4 T-Zellen (20:1) 4×10^4 T-Zellen (10:1) und 2×10^4 T-Zellen (5:1) befüllt worden. Nach einer Inkubation von 4h bei

37°C und 5% CO₂ wurden 100 µl Überstand aus jeder Vertiefung in eine neue 96-Lochplatte überführt. Die Überstände wurden in einem Fluoreszenzmessgerät analysiert und die Menge des freigesetzten Calceins bestimmt. Für die Bestimmung der spezifischen Lyse wurden Mittelwerte aus den Vierfachwerten gebildet, wobei Ausreißer zuvor durch einen Test nach Nalimov identifiziert und ausgeschlossen wurden (139).

Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

Lyse in % = (mittlere Fluoreszenz der Probe – mittlere Spontanlyse) / (mittlere Maximallyse – mittlere Spontanlyse)

Die Ausreißer wurden nach Nalimov folgendermaßen identifiziert:

$$r^* = \frac{|x^* - \bar{x}|}{s} \cdot \sqrt{\frac{n}{n-1}}$$

mit r^* = Sensitivität, x^* = möglicher Ausreißer, \bar{x} = Mittelwert, s = Standardabweichung, und n = Anzahl der Experimente

Für die Sensitivität wurde der Wert 1,645 eingesetzt. Damit bestand bei einem Formelergebnis von $>1,645$ eine hohe Wahrscheinlichkeit (95%), dass x^* ein Ausreißer ist.

3.2.9 Epitopmapping und IFN- γ -ELISA

Zur Bestimmung der Epitopspezifitäten wurden die T-Zelllinien mit pp65- oder IE-1-Mappingpools stimuliert (Abbildung 13). Dazu wurden jeweils 1×10^6 autologe LCLs mit 1 µg/ml eines Mappingpools für 2h im Inkubator beladen. Die Zellen wurden 2-mal mit Zellkulturmedium gewaschen und bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml resuspendiert. 100 µl dieser Suspension wurde in die Vertiefungen einer 96-Lochplatte mit Rundboden gegeben. Anschließend wurden 100 µl T-Zellsuspension mit gleicher Konzentration dazugegeben. Die Platte wurde für 6h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. 100 µl Überstand wurde in eine neue Platte übertragen und bei -20°C eingefroren.

Die Überstände wurden am nächsten Tag unter Verwendung des humanen IFN- γ -ELISA-Sets auf ihren Gehalt an IFN- γ untersucht. Die Vertiefungen einer unbeschichteten 96-Lochplatte mit Flachboden wurden über Nacht mit 50 µl einer in Coating-Puffer 1:400 verdünnten Capture-Antikörperlösung bei 4°C beladen. Am nächsten Tag wurde jede Vertiefung durch wiederholtes Auffüllen und Entfernen mit 300 µl ELISA Waschpuffer 3-mal gewaschen. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit 200 µl FACS-Puffer für 1h bei RT blockiert. Nach 3-maligem Waschen wurde 50 µl Probenüberstand in die Vertiefung aufgebracht und für

2h bei RT inkubiert. Die Vertiefungen wurden 5-mal gewaschen und 50µl einer 1:400 verdünnten Mischung aus Detektionsantikörper und Enzymreagenz wurden aufgebracht und 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 7-mal gewaschen und jede Vertiefung wird mit 50µl Substratlösung für 5 Minuten behandelt. Die enzymatische Färbereaktion wurde durch das Hinzupipettieren von 50µl 1M Schwefelsäure gestoppt. Die Platte wurde anschließend in einem ELISA-Messgerät analysiert.

3.2.10 Analyse der T-Zellrezeptor Beta variablen Gene (TRBV)

RNA Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den T-Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben. Zuvor wurde das Zellpellet in einem RNase inaktivierenden guanidinium-isothiocyanathaltigen Puffer lysiert und mit β -Mercaptoethanol in einem Verhältnis 1:143 versetzt. Die Fällung wurde mit -20°C kaltem 70%igem Ethanol durchgeführt, das in einem Verhältnis 1:2 eingesetzt wurde. Die Bindung an die Silikamembran der Säule erfolgte, indem das Gemisch aufgetragen und für 15 Sekunden bei 1000xg zentrifugiert wurde. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule mit den zu dem Kit zugehörigen Puffern gewaschen. Vor der Elution wurde die Säule getrocknet. Zur vollständigen Elution der an der Silikamembran gebundenen Gesamt-RNA, wurden die Säulen zweimal für 5 Minuten bei 37°C mit jeweils 22 µl RNase freiem Wasser inkubiert und im Anschluss für 1 Minute bei 1000xg zentrifugiert.

cDNA-Synthese

Für das Umschreiben der RNA in cDNA wurde die Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, verwendet. Zur Synthese der cDNA wurden Oligo-Desoxythymidin- (OdT-) Primer eingesetzt, die sich an den 3'-Poly A-Schwanz der mRNA anlagern. Es wurden maximal 2 µg RNA in einem Volumen von 18 µl eingesetzt und mit 2 µl OdT-Primer (0,1 mg/ml) gemischt. Um die Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden, wurden die Ansätze für 10 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Folgender Mix wurde je Reaktionsansatz zugegeben:

8µl First Strand Puffer
4 µl Dithiothreitol
4µl Desoxynukleosidtriphosphat
2µl DNase
0,5µl RNase-Inhibitor

Durch die Zugabe der DNase und die anschließende 30-minütige Inkubation bei 37°C wurden DNA-Restkontaminationen eliminiert. Die DNase wurde bei 75°C inaktiviert. Nach dem Abkühlen auf Eis wurde 1 µl Reverse Transkriptase und 1 µl RNase-Inhibitor hinzugegeben. Die cDNA-Synthese erfolgte für 60 Minuten bei 42°C mit einem abschließenden Enzyminaktivierungsschritt bei 95°C für 5 Minuten. Die synthetisierte cDNA wurde bis zur Real Time PCR bei -20°C aufbewahrt.

Real Time PCR

Die Real Time PCR ist eine Methode zur Amplifikation von spezifischen DNA-Abschnitten, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und darüber hinaus eine quantitative Bestimmung geringster DNA-Mengen ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen am Ende eines PCR-Zyklus durchgeführt, da bei dieser Methode die Fluoreszenz proportional mit der Menge der gebildeten DNA zunimmt. Für die Quantifizierung muss ein Schwellenwert (Cycle of Threshold; C_t) überschritten werden, sodass die Fluoreszenz vom Hintergrund klar zu unterscheiden ist.

Die für die Taqman PCR verwendeten Primer und Fluoreszenzsonden wurden durch das Institut für Kardiologie and Pneumologie der Charité Universitätsmedizin zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden in Doppelansätzen analysiert. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

2µl cDNA
6,25µl TaqMan Universal Master Mix
0,25µl Sonde
2,5 µl Primer
1,5µl H₂O

Die Analyse erfolgte in einem Gene Amp 9700 Cycler. Das Standardprogramm für die Real Time PCR bestand aus vier Schritten. Zunächst wurden kontaminierende RNA-Fragmente bei 50°C für 2 Minuten zerkleinert. Anschließend erfolgte die Denaturierung der cDNA durch einen Heißstart bei 95°C für 10 Minuten. Danach wurden 40 Zyklen mit jeweils einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 Sekunden und einem Annealing- und Extensionsschritt bei 60°C für 60 Sekunden durchgeführt. Um die Reproduzierbarkeit der Methode zu gewährleisten, wurden alle Proben in einer Doppelbestimmung analysiert. Dabei wurde bei einer Abweichung des C_t-Wertes von mehr als 0,5 die Messung der Probe wiederholt. Für die Auswertung wurden die Proben auf das Gen hypoxanthine phosphoribosyl-transferase (HPRT) normalisiert, welches in allen Zelltypen gleichmäßig exprimiert wird. Dies erfolgte nach der Formel:

$$2^{-\Delta C_t} \text{ mit } \Delta C_t = C_t(\text{Zielgen}) - C_t(\text{HPRT})$$

3.2.11 Mykoplasmenantigennachweis

Der Zellkulturüberstand der unter GMP-Bedingungen hergestellten T-Zelllinien wurde mit Hilfe des Mycoplasma Detection Kit auf Mykoplasmenantigene untersucht. Mit Hilfe dieses Kits lassen sich Antigene der verbreitetsten Mykoplasmenarten (*M. arginini*; *M. hyorhini*; *M. orale*; *A. laidlawii*) durch ELISA nachweisen. Für jede Probe und jede Mykoplasmenart wurden 4-fach Bestimmungen genau nach Herstellerangaben und unter der exklusiven Verwendung der Kitmaterialien durchgeführt. Ein Positivstandard und eine Negativkontrolle wurden zusätzlich mitgeführt. Der Test wurde in einem ELISA-Messgerät ausgewertet. Der Test galt nur dann als aussagekräftig, wenn der Positivstandard ein eindeutiges Signal auslöste und keines bei der Negativkontrolle detektiert werden konnte.

3.2.12 Aerobe-/anaerobe Bakterienkultur und LPS-Testung

Zellsuspensionen der unter GMP-Bedingungen hergestellten T-Zelllinien wurden mittels ELISA auf LPS und mittels Aufbringung auf wachstumsfördernde Nährböden auf aerobe und anaerobe Bakterien untersucht. Diese Untersuchungen wurden im Routinelabor des Institutes für Mikrobiologie der Charité Universitätsmedizin durchgeführt.

3.2.13 HLA-Typisierung

Zur Bestimmung allogener Kreuzkontaminationen des unter GMP-Bedingungen hergestellten T-Zellproduktes wurde eine HLA-Typisierung durchgeführt. Dieser wurde hochauflösend auf genetischer Ebene im Institut für Rechtsmedizin der Charité Berlin durchgeführt.

3.2.14 CMV-PCR

Zum Zeitpunkt der Generierung der pp65- und IE-1-spezifischen T-Zelllinien wurde die Menge an CMV-DNA im peripheren Blut der Spender mittels PCR bestimmt. Diese Untersuchung wurde im Routinelabor des Institutes für Medizinische Immunologie der Charité Universitätsmedizin durchgeführt.

3.2.15 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mittels SPSS-Software durchgeführt. Es wurden pp65- und IE-1-spezifische T-Zelllinien eines Spenders paarweise miteinander verglichen. Dazu wurde der nichtparametrische Wilcoxon-Test angewendet. Ein Ergebnis wurde als signifikant betrachtet, wenn ein p-Wert kleiner 0,05 erreicht wurde.