

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

DISSERTATION

Charakterisierung eines Adenovirus-spezifischen T-Zell-Produkts  
nach Standardisierung des Herstellungsprozesses

Vorbereitung für den klinischen Einsatz bei pädiatrischen Patienten  
nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation  
mit Komplikationen durch Adenoviren oder präemptiv

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Andra Zimmermann

aus Rostock

Datum der Promotion: 30.05.2015

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |    |
|---|----|
| Kurzfassung . . . . .   | 4  |
| Abstract . . . . .  | 6  |
| Abkürzungen und Definitionen . . . . .  | 8  |
| <br>  |    |
| 1 EINLEITUNG . . . . .  | 10 |
| 1.1 Humane Adenoviren . . . . .   | 11 |
| 1.2 AdV-Infektionen bei Kindern nach allogener hämatopoetischer<br>Stammzelltransplantation (HSCT) . . . . .                      | 14 |
| 1.2.1 Immunrekonstitution nach allogener HSCT . . . . .   | 16 |
| 1.2.2 Humane AdV-Serotypen und klinische Manifestationen. . . . .   | 16 |
| 1.2.3 Adoptive zelluläre Immuntherapie . . . . .  | 17 |
| 1.2.3.1 Humane AdV-spezifische T-Zellen . . . . .   | 18 |
| 1.2.3.2 Generierung humaner AdV-spezifischer T-Zellen . . . . .   | 19 |
| <br>  |    |
| 2 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN . . . . .   | 21 |
| <br>  |    |
| 3 MATERIAL UND METHODEN . . . . .   | 23 |
| 3.1 Blutentnahme. . . . .   | 23 |
| 3.2 Geräte und Verbrauchsartikel . . . . .  | 23 |
| 3.3 Prinzip der Durchflusszytometrie . . . . .  | 25 |
| 3.4 Vollblutstimulationsassay . . . . .   | 26 |
| 3.5 IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay zur Generierung humaner AdV-spezifischer T-Zellen . . . . .                                    | 30 |
| 3.5.1 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes . . . . .   | 31 |
| 3.5.2 Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix . . . . .   | 32 |
| 3.5.3 Immunmagnetische Zellseparation mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay . . . . .  | 33 |
| 3.6 Statistische Analyse . . . . .  | 37 |
| <br>  |    |
| 4 ERGEBNISSE . . . . .  | 38 |
| 4.1 AdV-spezifische T-Zellen im Vollblut gesunder Probanden . . . . .   | 38 |
| 4.1.1 AdV-spezifische CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen. . . . . | 43 |
| 4.1.2 Koexpression von Aktivierungsantigenen auf AdV-spezifischen T-Zellen. . . . .   | 45 |
| 4.1.3 Statistischer Vergleich der Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix<br>versus AdV3-Hexonprotein. . . . .                          | 48 |
| 4.1.4 AdV-spezifische T-Zellantwort in Abhängigkeit vom Alter . . . . .   | 51 |

---

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2   | Standardisierung des Herstellungsprozesses zur Generierung<br>humaner AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate . . . . . | 53 |
| 4.2.1 | Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes . . . . .   | 53 |
| 4.2.2 | Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix . . . . .   | 54 |
| 4.2.3 | Immunmagnetische Zellseparation mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay . . . . .                                      | 56 |
| 4.3   | Evaluierung des optimierten humanen AdV-spezifischen T-Zell-Transplantats . . . . .                                   | 57 |
| 4.3.1 | Quantifizierung des unspezifischen Zellverlusts . . . . .   | 58 |
| 4.3.2 | Charakterisierung des T-Zell-Endprodukts. . . . .   | 59 |
| 4.3.3 | AdV-Spezifität der T-Zellen im Endprodukt<br>versus Ausgangspräparat . . . . .  | 60 |
| 5     | DISKUSSION . . . . .  | 62 |
| 5.1   | AdV-spezifische T-Zellen im Vollblut gesunder Probanden . . . . .   | 62 |
| 5.2   | Standardisierung des Herstellungsprozesses zur Generierung humaner<br>AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate . . . . . | 67 |
| 5.3   | Evaluierung des optimierten humanen AdV-spezifischen T-Zell-Transplantats . . . . .                                   | 70 |
| 5.4   | Ausblick . . . . .  | 73 |
|       | Literaturverzeichnis . . . . .  | 74 |
|       | Anhang . . . . .  | 85 |
|       | Eidesstattliche Versicherung . . . . .  | 85 |
|       | Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen . . . . .   | 86 |
|       | Lebenslauf . . . . .  | 87 |
|       | Danksagung . . . . .  | 89 |

---

## KURZFASSUNG

### EINFÜHRUNG

Virale Infektionen sind häufig kritische Komplikationen nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation. Adenoviren (AdV) und Herpesviren sind die häufigsten und schwerwiegendsten Ursachen opportunistischer Infektionen bei diesen immunsupprimierten Patienten.

Reaktivierungen durch humane AdV treten vor allem bei Kindern nach allogener HSCT auf und bei disseminierender AdV-Erkrankung ist eine hohe Morbidität und Mortalität die Folge.

Adoptive Immuntherapien, z. B. mit AdV-spezifischen T-Zellen, stellen eine Therapieoption dar.

### METHODEN

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst nach sechsstündiger Stimulation von je 1 ml Vollblut mit AdV-Antigenen (AdV3-Hexonprotein und AdV3-Hexon-Peptiden) und Anti-Human CD28 bei 23 gesunden Probanden AdV-spezifische T-Zellen mittels Durchflusszytometrie identifiziert und analysiert.

Durch Einsatz eines Interferon gamma (IFN $\gamma$ )-Sekretions-Assays wurden AdV3-Hexon-Peptid-spezifische, IFN $\gamma$  sezernierende T-Zellen nach einer sechsstündigen Stimulation mononukleärer Zellen mit AdV3-Hexon-Peptiden und anschließender immunmagnetischer Markierung mit dem CliniMACS<sup>®</sup> Separator isoliert. Diese Arbeit zeigt vorab eine Entwicklung und Optimierung technischer Standards in sieben Experimenten, gefolgt von einer Analyse der angereicherten AdV-spezifischen T-Zellen.

### RESULTATE

Nach Vollblutstimulation wurden im Median innerhalb der Lymphozytenpopulation 0,07 % AdV3-Hexon-Peptid- und 0,08 % AdV3-Hexonprotein-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen und 0,01 % AdV3-Hexon-Peptid-spezifische CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. In der Analyse von Antigen-induzierter CD154 Expression bei CD4<sup>+</sup> und CD69 bei CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten plus IFN $\gamma$  halbierten sich die medianen Frequenzen AdV-spezifischer T-Zellen (0,04 % AdV3-Hexon-Peptid- und 0,03 % AdV3-Hexonprotein-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und 0,01 % AdV3-Hexon-Peptid-reaktive CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen).

Zusammengefasst sind AdV3-Hexonprotein wie auch die AdV3-Hexon-Peptid-Mischung in gleicher Weise geeignet, spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen zu stimulieren. Dabei lassen sich bei gesunden Probanden im Mittel deutlich mehr AdV-spezifische CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachweisen. Weiterhin zeigte sich, dass AdV-spezifische T-Zellfrequenzen mit steigendem Alter fallen.

Ausgehend von 100 ml humanem Vollblut wurde eine mediane Zahl von  $90 \times 10^6$  mononukleären Zellen (Range:  $70\text{--}240 \times 10^6$ ) mit AdV3-Hexonpeptiden stimuliert. Nach dem IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay und der immunmagnetischen Anreicherung wurde eine mediane Zahl von  $88 \times 10^3$  (Range:  $2,2\text{--}640 \times 10^3$ ) AdV-spezifischen, IFN $\gamma$  sezernierenden Zellen isoliert. Die phänotypische Analyse des AdV-spezifischen T-Zell-Produkts mittels Durchflusszytometrie identifizierte im Median 45 % AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen und 7,8 % AdV-reaktive CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der CD3<sup>+</sup> T-Zell-Population.

Die Entwicklung und Optimierung technischer Standards ergab tendenziell konsistentere Werte der Recovery aller mononukleären Zellen bei Passagierung der Zellen in Röhrchen statt Beuteln und Weglassen der Vorfiltrierung.

## FAZIT

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass AdV-spezifische T-Zellen nach Vollblutstimulation mit AdV-Antigenen bei gesunden Probanden detektiert werden können.

AdV-spezifische T-Zellen können mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay und immunmagnetischer Separation angereichert werden. Da die absoluten Zellzahlen aus einem Ausgangsvolumen von 100 ml Vollblut aufgrund der niedrigen Frequenzen AdV-spezifischer T-Zellen gering sind, wird eine Expansion dieser angereicherten Zellen erforderlich sein, um suffiziente Zahlen für adoptive Immuntherapien zu erhalten.

---

## ABSTRACT

### INTRODUCTION

Viral infections are often critical complications after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. Adenoviruses and herpesviruses are the most frequent and severe causes of opportunistic infections in these immunosuppressed patients.

Reactivations by human AdV occur especially in children after allogeneic HSCT and a disseminating AdV disease contributes to a high morbidity and mortality

Adoptive immunotherapies, e.g. with AdV-specific T cells, are therapeutic options.

### METHODS

In the context of this work it was at first made an identification and analysis by flow cytometry of AdV-specific T cells in 23 healthy human donors after a 6-hour stimulation of 1 ml of whole blood with AdV antigens (AdV3-hexon protein and AdV3-hexon peptides) and anti human CD28.

Using an interferon gamma (IFN $\gamma$ ) secretion and capture assay AdV3-hexon-peptide-specific, IFN $\gamma$  secreting T cells were isolated with the CliniMACS<sup>®</sup> instrument after a 6-hour stimulation of mononuclear cells with AdV3-hexon peptides and following immunomagnetic labelling.

This work shows initially a development and an optimization of technical standards in 7 experiments followed by analysis of the enriched AdV-specific T cells.

### RESULTS

After stimulation of whole blood a median frequency of 0.07 % AdV3-hexon-peptide- and 0.08 % AdV3-hexon protein-specific CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells and 0.01 % AdV3-hexon-peptide-specific CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells within the lymphocyte population could be identified. Analyzing antigen induced CD154 expression in CD4<sup>+</sup> and CD69 in CD8<sup>+</sup> T lymphocytes plus IFN $\gamma$  the median frequencies of AdV-specific T cells halved (0.04 % AdV3-hexon-peptide- and 0.03 % AdV3-hexon protein-specific CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> and 0.01 % AdV3-hexon-peptide-reactive CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells).

In summary AdV3-hexon protein and AdV3-hexon-peptide are similarly suitable to stimulate specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. On average there are more AdV-specific CD4<sup>+</sup> than CD8<sup>+</sup> T cells in healthy donors. Furthermore it is shown that the AdV-specific T cell frequencies decrease with increasing age.

Starting with 100 ml human peripheral blood a median number of  $90 \times 10^6$  mononuclear cells (range:  $70\text{--}240 \times 10^6$ ) was stimulated with AdV3-hexon-peptides. After the IFN $\gamma$  secretion assay and immunomagnetic enrichment a median number of  $88 \times 10^3$  (range:  $2.2\text{--}640 \times 10^3$ ) AdV-specific, IFN $\gamma$  secreting cells was isolated. Phenotypical analysis of the AdV-specific T cell product by flow cytometry identified a median of 45 % AdV-specific CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells and 7.8 % AdV-reactive CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T cells within the CD3<sup>+</sup> T cells.

The development and optimization of technical standards showed by trend more consistent data regarding recovery of mononuclear cells by using of tubes instead of bags and leaving out pre-separation filters.

## CONCLUSION

In summary this work shows that AdV-specific T cells can be detected after peripheral blood stimulation with AdV antigens in healthy donors.

AdV-specific T cells could be enriched using an IFN $\gamma$  secretion and capture assay and an immunomagnetic separation. As the absolute cell numbers using 100 ml whole blood as initial volume are low due to low frequencies of AdV-specific T cells a further expansion of these enriched cells will be required to receive a sufficient number of cells for adoptive immunotherapy.

---

## ABKÜRZUNGEN UND DEFINITIONEN

### ABKÜRZUNGEN

|              |   |
|--------------|---|
| $\alpha$     | anti  |
| AdV          | Adenoviren  |
| AK           | Antikörper  |
| AMG          | Arzneimittelgesetz  |
| APC          | antigen presenting cell = Antigen präsentierende Zelle                                |
| BD           | Becton, Dickinson and Company   |
| BSA          | bovine serum albumin = Rinderalbumin  |
| CD           | cluster of differentiation = Differenzierungsantigen                                  |
| CMV          | Cytomegalievirus  |
| CPD          | Citrat-Phosphat-Dextrose-Antikoagulans  |
| CTL          | cytotoxic T lymphocyte = zytotoxische T-Zelle   |
| DC           | dendritic cell = dendritische Zelle   |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid  |
| DNS          | Desoxyribonukleinsäure  |
| DRFZ         | Deutsches Rheuma-Forschungszentrum  |
| EBV          | Epstein-Barr-Virus  |
| EDTA         | Ethylendiamintetraacetat  |
| ELISPOT      | enzyme-linked immunosorbent assay   |
| FACS         | fluorescence activated cell sorting   |
| FL           | Fluoreszenzintensität   |
| FSC          | forward scatter = Vorwärtsstreulicht  |
| GMP          | good manufacturing practice = gute Herstellungspraxis                                 |
| GvHD         | graft versus host disease = Spender gegen Empfänger Krankheit/Reaktion                |
| HLA          | humanes Leukozytenantigen   |
| HSCT         | hematopoietic stem cell transplantation<br>= hämatopoetische Stammzelltransplantation |
| IFN $\gamma$ | Interferon gamma  |
| Ig           | Immunglobulin   |
| Kbp          | Kilobasenpaar   |
| kg           | Kilogramm   |
| KG           | Körpergewicht   |
| KI           | Konfidenzintervall  |



|              |   |
|--------------|---|
| LZT          | Labor für Zelluläre Therapie  |
| MHC          | major histocompatibility complex = Haupthistokompatibilitätskomplex               |
| PBMC         | peripheral blood mononuclear cells = mononukleäre Zellen<br>des peripheren Blutes |
| PBS          | Phosphate Buffered Saline Lösung  |
| rpm          | rounds/rotations per minute = Umdrehungen pro Minute                              |
| RPMI         | Roswell Park Memorial Institute   |
| SSC          | side scatter = Seitwärtsstreulicht  |
| SEB          | Staphylokokken Enterotoxin B  |
| TH-Zelle     | T-Helfer-Zelle  |
| TNF $\alpha$ | Tumornekrosefaktor alpha  |
| VZV          | Varizella-Zoster-Virus  |

## DEFINITIONEN

|                         |  |
|-------------------------|--|
| AB-Serum                | humanes Serum der Blutgruppe AB  |
| AdV3 Pepmix-Stammlösung | Durchstechampulle mit lyophilisiertem Peptid-Mix<br>(25 $\mu$ g pro Ampulle) des Adenovirus 3 Hexonproteins,<br>bestehend aus einem Gemisch von 234 Einzelpeptiden<br>(15mer, 11 überlappende Peptide) aufgelöst in 40 $\mu$ l<br>DMSO 100% und 60 $\mu$ l PBS |
| Anti-Human CD28         | Antikörperlösung gegen humanes CD28-Antigen<br>0,2 mg/ml in PBS  |
| PBS (Dulbecco)          | Phosphate Buffered Saline Lösung ohne Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>  |

# 1 EINLEITUNG

Die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (HSCT) ist häufig die letzte Therapiemöglichkeit bei einer Reihe von Erkrankungen, diese schließen verschiedene hämatologische Malignitäten, solide Tumore, angeborene Stoffwechselerkrankungen, Immundefekte und Krankheiten mit Knochenmarkversagen ein (Ebell, 2006). Neben Transplantationskomplikationen, wie z. B. die Abstoßung oder die GvHD, stellen Infektionskomplikationen (bakterielle, Pilz- oder Virusinfektionen) eine Herausforderung dar. Virale Infektionen sind häufig kritische Komplikationen nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation, besonders problematisch sind Neuinfektionen oder Reaktivierungen durch Herpesviren (vor allem Cytomegalievirus, CMV; Epstein-Barr-Virus, EBV; Herpes-simplex-Virus, HSV und Humanes Herpesvirus 6, HHV-6) und Adenoviren (AdV) (Ebell, 2006).

Reaktivierungen durch humane AdV treten vor allem bei Kindern nach allogener HSCT auf und bei disseminierender AdV-Erkrankung ist eine hohe Morbidität und Mortalität die Folge (Flomenberg et al., 1994; Howard et al., 1999; Lion et al., 2003; Walls et al., 2003; de Mezerville et al., 2006).

Antivirale Chemotherapeutika (z.B. Ribavirin, Cidofovir) haben unterschiedlich erfolgreiche Ergebnisse in der Behandlung erbracht und zeichnen sich durch Nebenwirkungen wie Nephro- oder Myelotoxizität aus (Hromas et al., 1994b; Miyamura et al., 2000; Bordigoni et al., 2001; Hoffman et al., 2001; Legrand et al., 2001; La Rosa et al., 2001; Chakrabarti et al., 1999; Chakrabarti et al., 2002; Gavin et Katz, 2002; Ljungman et al., 2003; Ljungman et al., 2004; Lankester et al., 2004; Leruez-Ville et al., 2004; Muller et al., 2005; Yusuf et al., 2006; Symeonidis et al., 2007; Sivaprakasam et al., 2007).

Die Dauer der Rekonstitution des Immunsystems nach allogener HSCT variiert stark und hängt von verschiedenen Faktoren ab, wie z.B. vom Konditionierungsregime, Spendertyp und Ausmaß der T-Zelldepletion des Transplantats (Sivaprakasam et al., 2007). Ein erhöhtes Risiko für AdV-Reaktivierungen und die Entwicklung AdV-assoziiierter Morbidität korrelieren mit dem Mangel an endogener T-Zell-Immunität (Chakrabarti et al., 2000; Chakrabarti et al., 2002; Feuchtinger et al., 2005; Heemskerk et al., 2005; van Tol et al., 2005; Kampmann et al., 2005; Walls et al., 2005). Zudem scheint das Vorhandensein von Virus-spezifischen T-Zellen zur Bewältigung der Infektion beizutragen (Feuchtinger et al., 2005; Heemskerk et al., 2005). Die adoptive Immuntherapie mit humanen AdV-spezifischen T-Zellen stellt demzufolge eine Möglichkeit zur Heilung oder Prävention von AdV-assoziierten Komplikationen nach allogener HSCT dar (Leen et al., 2010). Erste Studien belegen die Wirksamkeit (Leen et al., 2006; Feuchtinger et al., 2008).

Auf der Grundlage dieser Fakten entstand diese Arbeit mit dem Ziel der Standardisierung des Herstellungsprozesses zur Generierung AdV-spezifischer T-Zellen.

## 1.1 HUMANE ADENOVIREN

Erstmals 1953 wurden humane AdV aus Tonsillen und Adenoidgewebe von Rowe et al. isoliert. Mehr als 80 AdV sind gegenwärtig bekannt, sie gehören alle dem Genus der Mastadenoviridae an (Echavarría, 2008). Bis heute wurden 56 Serotypen des humanen AdV charakterisiert (Jones et al., 2007; Walsh et al., 2009; Robinson et al., 2011).

Humane AdV können abhängig vom Serotyp unterschiedliche Krankheiten hervorrufen. Bei Immungesunden verlaufen AdV-Krankheiten in der Regel selbstlimitierend. Bei Immunsupprimierten, z.B. nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation, können lebensbedrohliche systemische AdV-Infektionen auftreten (Lion et al., 2003; Walls et al., 2003; de Mezerville et al., 2006).

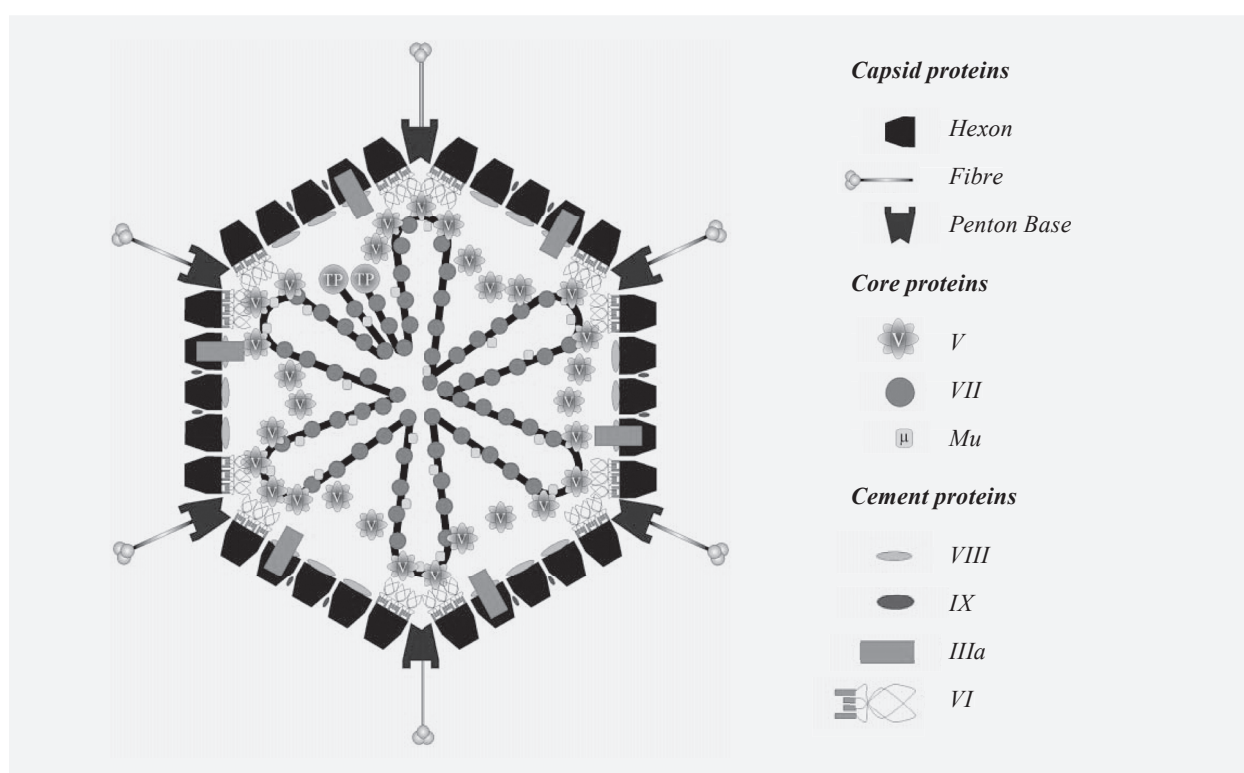
Zudem spielen modifizierte AdV eine Rolle als Vektoren für den Transfer fremder Gene sowohl im Rahmen von Gen- und Krebstherapien als auch für die Immunisierung gegen verschiedene Pathogene (Russell, 2000; Hall et al., 2010).

### a) Struktur und Klassifikation

AdV sind ubiquitäre, hüllenlose, lytische und 70–100 nm große Viren mit linearer Doppelstrang-DNS, das Genom umfasst 30–38 Kbp (Echavarría, 2008; Hall et al., 2010). Das ikosaedrische Kapsid besteht aus 252 Kapsomeren, davon sind 12 Pentone und 240 Hexone (Echavarría, 2008; Hall et al., 2010). Diese Hexone bestehen aus einem Trimer des Hexonproteins (Virusprotein = VP II) und sind durch weitere hexonassoziierte Proteine an ihren Kontaktstellen stabilisiert (VP IX, X, XI). An der Innenseite der Hexone befinden sich zwei weitere Proteine (VP VI und VIII), die mit Proteinen des Nukleoproteinkomplexes interagieren. Die Pentone bestehen aus einem Pentamer des Pentonbasisproteins (VP III) und dem pentonbasisassoziierten Protein VP IIIa. An den Pentonen setzen die – je nach Spezies – unterschiedlich langen Fibern (spikes) an, die aus Trimeren des glykosylierten Fiberproteins VP IV zusammengesetzt sind. Die Virus-DNS ist eng mit dem VP VII verbunden (Russell, 2000; Russell, 2009; Hall et al., 2010).

Die Hexone enthalten gruppenspezifische Antigene (Echavarría, 2008). Die Fibern spielen als Adhäsion und Hämagglutinin eine Rolle und vermitteln zusammen mit der Pentonbase die Aufnahme in die Zellen (Russell, 2000; Hall et al., 2010). Die Fiberproteine der meisten AdV binden an den zellulären Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Roelvink et al., 1998; Russell, 2009). Die Pentonbase wiederum vermittelt die Aufnahme via Interaktion mit spezifischen Integrinen (Wickham et al., 1993). Ausnahmen schließen die Gruppe-B-AdV, die an CD46 zu binden scheinen (Gaggar et al., 2005; Hall et al., 2010; Marttila et al., 2005; Segerman et al., 2003), sowie Spezies-D-AdV (Serotypen 8, 19a und 37) ein, die mit Sialinsäureresten als CAR auf den Zielzellen interagieren (Arnberg et al., 2000).

Das Hauptoberflächenprotein ist das trimerische Polypeptidhexon. Gruppen-reaktive Determinanten sind auf den Hexonproteinen aller humanen AdV präsent. Serotypen-spezifische Epitope sind sowohl auf den Fiber- als auch Hexonproteinen und geringfügig auf den Pentonen existent (Russell, 2009). Die verschiedenen Serotypen sind basierend auf den antigenen Determinanten und der Neutralisierung durch spezifische Tierseren identifiziert worden und wurden als Spezies A bis G klassifiziert. Die Basis für die Klassifizierung bilden Unterschiede in den Hämagglutinationsmustern mit Erythrozyten, DNS-Eigenschaften und Onkogenität (De Jong et al., 1999; Echavarría, 2008; Russell, 2000; Russell, 2009). Aktuell sind neue AdV-Klassifikationen in Diskussion, dabei sollen humane AdV auf Basis der vollständigen Genomsequenzanalyse identifiziert, charakterisiert und typisiert werden (Seto et al., 2011). Abb. 1 zeigt die Struktur mit ihren Hauptbestandteilen des Adenovirus.



**Abb. 1:** Struktur des Adenovirus (aus: Russell, 2000).

## b) Epidemiologie und klinische Manifestationen

Humane AdV sind weltweit verbreitet, Infektionen treten ohne Jahreszeitabhängigkeit auf (Robert Koch-Institut, 2010). Die Viren verursachen fünf bis zehn Prozent aller febrilen Erkrankungen in der Kindheit. Etwa die Hälfte der Infektionen verläuft bei Immunkompetenten inapparent, oder es handelt sich um selbst limitierende Erkrankungen. Epidemien adenoviraler Erkrankungen sind beschrieben worden (James et al., 2007), einschließlich des pharyngokonjunktivalen Fiebers in Sommerlagern und in Verbindung mit dem Besuch öffentlicher Schwimmbäder (Centers for Disease Control, 1992; Artieda et al., 2009), der Keratokonjunktivitis in medizinischen Einrich-

tungen (Melendez et al., 2009) sowie der schweren akuten respiratorischen Krankheit bei Soldaten (Metzgar et al., 2007). Die häufigsten Serotypen waren 3, 2, 1 und 5 unter der Zivilbevölkerung in einer Studie von Gray et al. (2007).

Humane AdV können in Adenoiden und Tonsillen, insbesondere in CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten, aber auch im Darmtrakt persistieren (Garnett et al., 2002; Garnett et al., 2009; Calcedo et al., 2009), weshalb es zu Reaktivierungen kommen kann. Von einer prolongierten Virusausscheidung über Monate bis Jahre wurde ebenfalls berichtet (Adrian et al., 1988). Eine gefährdende Rolle spielen adenovirale Komplikationen, einschließlich einer Virämie, bei immunsupprimierten Patienten (Ison, 2006).

Humane AdV verursachen nach einer Inkubationszeit von zwei bis zehn Tagen Infektionen von unterschiedlichen Organsystemen (Russell, 2009; Moro et al., 2009; Robert Koch-Institut, 2010). In Tab. 1 werden Spezies und entsprechende Serotypen sowie das ausgelöste klinische Bild dargestellt.

| Spezies | Serotypen       | Klinik  |
|---------|-----------------|---|
| A       | 12, 18, 31      | Infantile Gastroenteritis   |
| B       | 3, 7, 21 (B1)   | Erkrankungen des Respirationstraktes, Pharyngokonjunktivales Fieber, Konjunktivitis, Hepatitis, Myokarditis |
|         | 11, 34, 35 (B2) | Hämorrhagische Zystitis, interstitielle Nephritis   |
| C       | 1, 2, 5, 6      | Erkrankungen des oberen Respirationstraktes, Konjunktivitis, Hepatitis                                      |
| D       | 8, 19, 37       | Epidemische Keratokonjunktivitis  |
| E       | 4               | Erkrankungen des Respirationstraktes, Konjunktivitis  |
| F       | 40, 41          | Gastroenteritis   |
| G       | 52              | Gastroenteritis   |

**Tab. 1:** Auswahl von humanen AdV-Serotypen und assoziierte Krankheitsbilder (modifiziert nach Echavarría, 2008; Russell, 2009; Hall et al., 2010).

### c) Pathogenese

Humane AdV können aerogen durch Tröpfchen oder auf fäkal-oralem Wege (Russell, 2009), durch Kontakt mit kontaminiertem Material oder durch Exposition mit zervikalen Sekreten bei der Geburt auf das Neugeborene übertragen werden (Robert Koch-Institut, 2010). Durch AdV werden Lokalinfektionen hervorgerufen. Die meisten humanen AdV infizieren humane epitheliale Zelllinien und zeigen einen charakteristischen zytopathischen Effekt. Die Infektion ist zytozidaler Form, da AdV die zelluläre mRNS (messenger RNS = Boten-Ribonukleinsäure) und die Proteinbiosynthese der Wirtszelle fast vollständig unterbinden. Als Folge der vorherrschenden viralen Proteinbiosynthese zeigen sich im Verlauf der Virusvermehrung charakteristische intranukleäre Einschlusskörperchen.

## 1.2 ADV-INFEKTIONEN BEI KINDERN NACH ALLOGENER HÄMATOPOETISCHER STAMMZELLTRANSPLANTATION (HSCT)

Die Indikationen zur allogenen HSCT reichen von malignen bis zu nicht-malignen, angeborenen und erworbenen Erkrankungen der Blutbildung, des Immunsystems und des Stoffwechsels. Das myeloablative und immunsuppressive Konditionierungsregime vor der Transplantation bezweckt die Eradikation der zu behandelnden Erkrankung, die Unterdrückung des Empfänger-Immunsystems und damit die Vermeidung einer Transplantatabstoßung sowie die Bildung eines Raumes im Knochenmark, um die Ansiedlung der Spenderstammzellen zu gewähren (Ebell, 2006).

Das AdV-assoziierte Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko innerhalb der ersten sechs Monate nach allogener HSCT ist besonders bei Kindern eine herausfordernde Komplikation. Möglicherweise sind speziell Kinder und Jugendliche durch Reaktivierungen während der Immunsuppressionsphase nach allogener HSCT betroffen, da es Hinweise für die Persistenz der AdV besonders in dieser frühen Lebensphase gibt. DNS der AdV konnte in T-Lymphozyten aus Tonsillen oder Adenoiden nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde ein Peak im Alter von vier Jahren festgestellt, danach fiel der DNS-Anteil mit zunehmendem Alter ab (Garnett et al., 2002; Garnett et al., 2009).

### a) Inzidenz und Mortalität einer AdV-Infektion bzw. Reaktivierung nach allogener HSCT

In den letzten Jahren werden AdV bei Kindern nach allogener HSCT zunehmend als signifikante Pathogene nachgewiesen. Verschiedene Faktoren tragen dazu bei. Zum einen besteht ein verstärktes Bewusstsein für humane Adenoviren, zum anderen findet sich eine größere Sensitivität diagnostischer Methoden, und ein systematisches Screening wird durchgeführt (Shields et al., 1985; Blanke et al., 1995; Hale et al., 1999; Baldwin et al., 2000; Kojaoghlanian et al., 2003; Bruno et al., 2003; Heemskerk et al., 2005; van Tol et al., 2005). Van Tol et al. (2005) zeigten, dass die Nachweise von AdV bei pädiatrischen HSCT-Empfängern von 5,4% vor 1995 auf 22,5% nach 1995 angestiegen sind. Weiterhin wurde eine Altersabhängigkeit beobachtet: eine höhere Inzidenz der AdV-Infektion fand sich bei den Kindern  $\leq 5$  Jahren verglichen mit  $> 5$  Jahren (van Tol et al., 2005).

Die Inzidenz einer AdV-Infektion, die als Nachweis von AdV definiert ist, war bei Kindern nach allogener HSCT am höchsten und am niedrigsten bei Erwachsenen und Kindern nach autologer HSCT (Flomenberg et al., 1994; Howard et al., 1999).

Die Inzidenzraten einer AdV-Infektion bewegen sich bei pädiatrischen Patienten nach allogener HSCT zwischen 6 und 47%, bei Erwachsenen zwischen 3 und 14%. Die Häufigkeitsangaben einer symptomatischen AdV-Erkrankung oder Adenovirämie innerhalb des Patientenkollektivs mit AdV-Nachweis schwanken zwischen 29 und 82% stark (Shields et al., 1985; Flomenberg et al., 1994; Hale et al., 1999; Howard et al., 1999; Baldwin et al., 2000; Hoffman et al., 2001; La Rosa et

al., 2001; Morfin et al., 2004; Heemskerk et al., 2005; Myers et al., 2005; Kampmann et al., 2005; Lion et al., 2003; Lion et al., 2010; Kroes et al., 2007; Bil-Lula et al., 2010). Zudem entwickeln Kinder eine Infektion weitaus früher (< 30 Tage nach HSCT) als Adoleszenten oder Erwachsene (> 90 Tage nach HSCT) (Flomenberg et al., 1994; Hale et al., 1999; Howard et al., 1999; Baldwin et al., 2000; Walls et al., 2005, van Tol et al., 2005).

Mortalitätsraten bis 30% innerhalb der Patientengruppe mit AdV-Nachweis und -Komplikationen sind hoch und können bei Patienten mit einer disseminierten Erkrankung ohne präemptive Therapien Höhen bis 70% erreichen (Hale et al., 1999; Howard et al., 1999; Bordigoni et al., 2001; Hoffman et al., 2001; Muller et al., 2005; van Tol et al., 2005; de Mezerville et al., 2006; Yusuf et al., 2006; Kroes et al., 2007; Bil-Lula et al., 2010).

#### b) Risikofaktoren zur Entwicklung einer AdV-Infektion bzw. Reaktivierung

Nicht unwesentlich hängt die Entstehung einer AdV-Infektion bzw. Reaktivierung von Depletionsstrategien ab, die abhängig von der Spenderkompatibilität zur Vermeidung der Graft-versus-Host-Krankheit (GvHD) ausgewählt werden. Kinder ohne T-Zell-depletierende Maßnahmen (z.B. in vivo die Applikation von Antithymozytenglobulin (ATG) oder ex vivo die CD34<sup>+</sup> Selektion) entwickelten seltener Virämien (Handgretinger et al., 2001; Chakrabarti et al., 2002; Lang et al., 2003; Heemskerk et al., 2005; van Tol et al., 2005). Chakrabarti et al. (2002) erhoben Daten, die einen Zusammenhang zwischen Dosis und Art der Alemtuzumab-Verwendung und der Inzidenz einer AdV-Infektion zeigten. Dabei war die Inzidenz einer AdV-Infektion höher, wenn Alemtuzumab in einer Dosis von 50–100 mg in vivo verabreicht wurde, und niedriger nach einer in vitro Behandlung des Transplantats mit 10–20 mg Alemtuzumab. Die Lymphozytenerholung war der stärkste Prädiktor für eine AdV-Infektion, die nach in vivo-Applikation von Alemtuzumab signifikant verzögert war.

Das Alter (jüngere > ältere Kinder > Erwachsene) des Empfängers, GvHD, HLA-differenter und unverwandter Spender und unverwandte Nabelschnurbluttransplantate zählten zu weiteren Risikofaktoren der Entwicklung einer AdV-Komplikation (Flomenberg et al., 1994; Hale et al., 1999; La Rosa et al., 2001; Runde et al., 2001; Chakrabarti et al., 2004; van Tol et al., 2005; de Mezerville et al., 2006). Die Risiken für das Auftreten einer symptomatischen Erkrankung waren zudem umso größer, wenn AdV an mehr als einer Organlokalisierung nachgewiesen werden konnten (Flomenberg et al., 1994; Howard et al., 1999; Baldwin et al., 2000; Hoffman et al., 2001). Ebenso wurde ein tödlicher Ausgang durch AdV-assoziierte Komplikationen bei der Identifikation des Virus an zwei oder mehr Lokalisationen wahrscheinlicher (de Mezerville et al., 2006).

### 1.2.1 IMMUNREKONSTITUTION NACH ALLOGENER HSCT

De Vries et al. (2000) untersuchten prospektiv die Regenerierung der Lymphozyten-subpopulationen bei Kindern, die krankheitsfrei bezüglich eines hämatologischen Malignoms mindestens sechs Monate nach allogener Knochenmarktransplantation überlebten. Insbesondere die Regenerierung der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten benötigte mindestens drei bis sechs Monate. Olkinuora et al. (2007) zeigten ähnliche Ergebnisse. Lediglich 28% aller Patienten einer Studie von Koehl et al. (2007) erreichten die altersbezogene 50. Perzentile der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Lymphozyten innerhalb des ersten Jahres nach allogener HSCT.

Die AdV-assoziierte Mortalität war ebenso eng mit der Geschwindigkeit der Lymphozytenerholung verknüpft (Lion et al., 2003; Kampmann et al., 2005; Walls et al., 2005). Das Überleben einer Adenovirämie hing von einer Lymphozytenregenerierung mit absoluten Zahlen größer  $0,3 \times 10^9/l$  ab (Kampmann et al., 2005). Die kritische Rolle der Lymphozytenregenerierung nach HSCT hob auch eine Studie von Heemskerk et al. (2005) hervor. Patienten mit AdV-assoziiertem Tod hatten signifikant niedrigere Zellzahlen von Lymphozyten, T-Zellen und CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subsets (Walls et al., 2005; van Tol et al., 2005). Einen Zusammenhang zwischen der Inzidenz einer AdV-Infektion oder Erkrankung und dem Mangel an CD3<sup>+</sup> T-Lymphozyten, insbesondere auch AdV-spezifischen T-Zellen, nach allogener HSCT beschrieben einige Autoren (Chakrabarti et al., 2002; Feuchtinger et al., 2004; Feuchtinger et al., 2005; van Tol et al., 2005; Heemskerk et al., 2005; Myers et al., 2007; Bil-Lula et al., 2010).

Feuchtinger et al. (2005) charakterisierten das Auftreten AdV-spezifischer T-Zellen bei Kindern mit und ohne Adenovirusinfektion nach allogener HSCT. Bei 33% der AdV-Infizierten trat eine AdV-assoziierte Sterblichkeit auf, bei all diesen Kindern konnten keine AdV-spezifischen T-Zellen nachgewiesen werden. Patienten, die eine Infektion überstanden hatten, wiesen signifikant höhere Frequenzen AdV-spezifischer T-Zellen auf als Patienten ohne Infektion (Feuchtinger et al., 2005). Myers et al. (2007) zeigten, dass insbesondere Empfänger von HLA-identischen Fremdspendern oder haploidentischen Spendern -verglichen mit HLA-identischen verwandten Spendern- eine signifikant verzögerte Immunrekonstitution AdV-spezifischer T-Zellen hatten.

### 1.2.2 HUMANE ADV-SEROTYPEN UND KLINISCHE MANIFESTATIONEN

Bei pädiatrischen Empfängern von allogenen hämatopoetischen Stammzellen werden die Spezies A (Serotyp 31), B (Serotypen 3, 7, 11, 21, 34, 35) und C (Serotyp 1, 2, 5) am häufigsten isoliert (Hierholzer et al., 1992; Flomenberg et al., 1994; Flomenberg et al., 1995; Carrigan et al., 1997; Hale et al., 1999; Bordigoni et al., 2001; Kojaoghlanian et al., 2003; Lion et al., 2003; Heemskerk et al., 2005; Gray et al., 2007; Lion et al., 2010). Zu den klinischen Manifestationen zählen Erkrankungen des Urogenitaltraktes, Gastroenteritis, Hepatitis, thrombotisch-thrombozytopenische Purpura, Pneumonie, Enzephalitis und Multiorganversagen (Ito et al., 1991; Blanke et al., 1995; Walls et al., 2003; van Tol et al., 2005; Kampmann et al., 2005; Ison, 2006; de Mezerille et al., 2006;



Yusuf et al., 2006). Eine AdV-Virämie mit hoher Viruslast kann mit fatalem Ausgang assoziiert sein (Echavarría et al., 2001; Schilham et al., 2002; Lankester et al., 2002; Lion et al., 2003; Leruez-Ville et al., 2004; Heemskerk et al., 2005).

### 1.2.3 ADOPTIVE ZELLULÄRE IMMUNOTHERAPIE

Die Regeneration der Lymphozytensubpopulationen und AdV-spezifischer T-Zellen wird zur physiologischen Kontrolle einer AdV-Infektion bei Patienten nach allogener HSCT benötigt. Aufgrund der Gefahr akuter GvHD kann eine Reduktion der Immunsuppression nur eingeschränkt oder nicht durchgeführt werden (Chakrabarti et al., 2000; Chakrabarti et al., 2002; Chakrabarti et al., 2004). Andere supportive Möglichkeiten neben virostatischen Therapien schließen eine Substitution von Immunzellen ein. Letzteres ist als adoptiver Immuntransfer bekannt: ungerichtete Immunzellen, aber auch Antigen-spezifische T-Zellen kommen zur Anwendung. Infusionen von polyklonalen T-Lymphozyten haben einen sehr geringen Anteil Virus-spezifischer T-Zellen und bergen das Risiko einer GvHD. Eine sicherere Alternative wäre demzufolge, Virus-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) ex vivo herzustellen, zu vermehren und anschließend für einen adoptiven Transfer einzusetzen.

Dieses Prinzip wurde zunächst bei Infektionen durch die Herpesviren CMV und EBV erfolgreich angewandt (Riddell et al., 1992; Riddell et al., 1994; Papadopoulos et al., 1994; Heslop et al., 1996; Heslop et al., 1996; Walter et al., 1995; Rooney et al., 1995; Rooney et al., 1998; Gustafsson et al., 2000; Einsele et al., 2002; Peggs et al., 2003; Peggs et al., 2004; Bollard et al., 2004; Cobbold et al., 2005). Herausragend waren die anfänglichen Arbeiten von Riddell et al. (1992), die zeigten, dass die adoptive Übertragung von CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zell-Klonen bei Patienten mit einem Risiko für eine CMV-Erkrankung vor durch CMV verursachte Komplikationen schützte.

Unselektierte Spender-Lymphozyten-Infusionen bei AdV-Infizierten nach allogener HSCT waren partiell erfolgreich bezüglich der Reduktion viraler Replikation durchgeführt worden (Hromas et al., 1994a; Miyamoto et al., 1998; Howard et al., 1999; Chakrabarti et al., 2000; Chakrabarti et al., 2002; Bordigoni et al., 2001).

Ziel vieler Forschungsgruppen ist es geworden, AdV-spezifische T-Zellen mit reduzierter Alloreaktivität und GvHD-Minimierung herzustellen.

Erste klinische Erfahrungen adoptiver Therapien mit AdV-spezifischen T-Zellen wurden gemacht (Feuchtinger et al., 2006; Leen et al., 2006). Feuchtinger et al. (2004, 2006) gewannen mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay AdV-spezifische T-Zellen aus Vollblut oder Leukapheresaten von gesunden Spendern. Der adoptive Transfer war bei fünf von sechs Kindern mit einer in vivo Expansion der humanen AdV-spezifischen T-Zellen und dauerhaften Klärung der Infektion bzw. Abnahme der Viruslast erfolgreich. Keine wesentlichen akuten Nebenwirkungen traten auf, allerdings führte der adoptive Transfer bei einem Patienten nach 14 Tagen zur Verschlimmerung einer GvHD der Haut.

Weitere Fortschritte bestehen in der Applikation von T-Zell-Produkten multipler viraler Spezifität. Leen et al. (2006) führten die Verabreichung von Multivirus-spezifischen (CMV-EBV-AdV) CTLs ohne relevante Nebenwirkungen durch und zeigten, dass diese T-Lymphozyten-Linien in vivo zu multiplen Virus-spezifischen Populationen expandierten und eine klinisch messbare Aktivität gegen alle drei Viren boten. Bei Patienten mit AdV-Nachweis aus Blut oder Stuhl wurde eine maximale Zunahme der AdV-spezifischen T-Zellen beobachtet. Drei der Patienten hatten eine auffallende Reduktion der AdV-Viruslast bei gleichzeitigem Anstieg AdV-spezifischer T-Zellen.

### 1.2.3.1 Humane AdV-spezifische T-Zellen

Antigen-spezifische T-Zellen sind ein wesentlicher Teil der erworbenen Immunantwort zur Überwachung viraler Infektionen mit der Generierung eines immunologischen Gedächtnisses (Butz et al., 1998). Das T-Zell-Gedächtnis (T-cell memory  $T_M$ ) ist ein dynamischer Prozess, der einen Minimumlevel an Antigen-spezifischen T-Zellen beibehält. Es gibt zwei Hauptpopulationen von Gedächtniszellen, die  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen. Bei Ersteren geht man davon aus, dass sie als Hilfszellen für die  $CD8^+$  Gedächtnis-T-Zell-vermittelte Lyse fungieren. Zudem können auch  $CD4^+$  Gedächtnis-T-Zellen zytotoxisch sein (Poindexter et al., 1999). Das T-Zell-Gedächtnis stellt den effektivsten Schutz gegen viele Pathogene, einschließlich Adenovirus, dar (Hierholzer et al., 1992; Murphy et al., 2009).

Eine AdV-spezifische zelluläre Immunität wird während der Kindheit generiert und wahrscheinlich durch das T-Zell-Gedächtnis mit Effektor-Phänotyp dominiert. Diese AdV-spezifische Immunantwort wird mit zunehmendem Alter und ansteigenden Infektionen mit anderen Pathogenen geringer (Sester et al., 2002). Insgesamt existieren bis heute wenige Berichte über die erworbene zelluläre, AdV-spezifische Immunantwort und deren Kinetik bei gesunden Personen (Flomenberg et al., 1995; Smith et al., 1996).

Der Hauptteil der zellulären Immunantwort in vitro wird durch  $CD4^+$  T-Zellen vermittelt (Flomenberg et al., 1995; Flomenberg et al., 1996; Smith et al., 1996; Olive et al., 2001; Olive et al., 2002; Heemskerk et al., 2003; Heemskerk et al., 2005; Feuchtinger et al., 2004; Leen et al., 2004a; Perreau et al., 2005; Veltrop-Duits et al., 2006; Chatziandreou et al., 2007; Onion et al., 2007). Chatziandreou et al. (2007) zeigten, dass diese humanen AdV-spezifischen  $CD4^+$  T-Zellen überwiegend einen effector/memory Phänotyp ( $CCR7^+CD45RO^+$ ) besitzen. Von humanen AdV-spezifischen  $CD8^+$  T-Zellen wird zwar ebenfalls berichtet (Leen et al., 2004a; Feuchtinger et al., 2004; Tang et al., 2006; Chatziandreou et al., 2007), dennoch sind die spezifischen T-Lymphozyten größtenteils der  $CD4^+$  T-Zellpopulation zugehörig, auch hervorgehend aus Daten, die bei AdV-Infizierten allogenen HSCT-Empfängern mit spontaner Klärung einer Infektion erhoben wurden (Heemskerk et al., 2005; Feuchtinger et al., 2005).

$CD4^+$  T-Zellen können virales Wachstum durch Zytokinausschüttung eingrenzen oder durch Lyse infizierter Zellen agieren (Schoenberger et al., 1998; Adhikary et al., 2006; Brown et al., 2004). Heemskerk et al. (2006) untersuchten in vitro die antivirale Wirkung von humanen AdV-spezi-

fischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen: diese T-Zell-Klone waren befähigt, infizierte Zielzellen über Perforin-abhängige Mechanismen spezifisch zu lysieren. Chatziandreou et al. (2007) präsentierten hiermit konsistente in vitro-Daten, dass humane AdV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen hochspezifisch und zytotoxisch sind. Bezogen auf eine in vivo-Anwendung humaner AdV-spezifischer CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen besteht die Hoffnung auf eine vergleichbare Wirkweise.

Verschiedene Forschungsgruppen beschäftigen sich mit einer »Kartierung« von T-Zell-Zielantigenen, um herauszufinden, welches Antigen die stärkste Immunreaktion auslöst. Hamel et al. (2002) untersuchten, welches der Virionproteine (Hexon, Penton und Fiber) für die Stimulation der humanen AdV-spezifischen T-Zellen in vitro verantwortlich ist, und fanden, dass das Hexonprotein bei den meisten Probanden stark immunogen war. Auch Veltrop-Duits et al. (2006) und Onion et al. (2007) identifizierten das Hexonprotein als das am häufigsten von T-Zellen erkannte Antigen. In der Zwischenzeit wurde mit einem feineren Mapping der T-Zellpeptid-Epitope begonnen, und es wurde ein spezifisches CD4<sup>+</sup> T-Zell-Epitop beschrieben, das im großen Kapsidprotein Hexon lokalisiert ist, H910–924 (Olive et al., 2002; Tang et al., 2004). Leen et al. (2004b) erkannten fünf Hexon-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zell-Epitope. Diese Studien tragen dazu bei, potentielle Zielantigene für Immuntherapien zu entdecken.

Humane AdV-spezifische (CD4<sup>+</sup>) T-Lymphozyten erkennen des Weiteren konservierte Antigene von verschiedenen Serotypen, zeigen also eine Kreuzreaktivität gegen die verschiedenen Spezies (Flomenberg et al., 1995; Flomenberg et al., 1996; Smith et al., 1996; Smith et al., 1998; Olive et al., 2002; Heemskerk et al., 2003; Leen et al., 2004a; Feuchtinger et al., 2005; Chatziandreou et al., 2007). Dies bedeutet, dass humane AdV-Serotypen, die verschiedenen Spezies angehören, T-Zell-Epitope gemeinsam haben. Veltrop-Duits et al. (2006) bestätigten die Funde zur Kreuzreaktivität und zeigten, dass adulte humane T-Zellen vorzugsweise konservierte Sequenzen von Aminosäureresten des Strukturproteins vom AdV erkennen. Von einer Kreuzreaktivität profitierten am meisten Empfänger allogener HSCT, wenn sie humane AdV-spezifische T-Zellen eines Serotypen als adoptive Immuntherapie erhielten. Zu diesem Ergebnis kommen auch Feuchtinger et al. (2006). Die übertragenen humanen AdV-Spezies C-spezifischen T-Zellen führten zu einer Klärung von Infektionen, obwohl eine Infektion mit der humanen AdV-Spezies A bestanden hatte.

### 1.2.3.2 Generierung humaner AdV-spezifischer T-Zellen

Erste Publikationen im Hinblick auf zukünftig denkbare zelluläre Immuntherapien, die eine mögliche in vitro-Generierung von gegen AdV gerichtete CTLs demonstriert haben, stammen von Smith et al. aus den Jahren 1996 und 1998. Um T-Zell-Linien zu expandieren, wurden autologe dendritische Zellen mit AdV5 infiziert und anschließend mit autologen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) in Anwesenheit von niedrig dosiertem IL-2 in Kultur gebracht.

Andere Technologien befähigen zur Selektion von Antigen-spezifischen T-Zellen, die IFN $\gamma$  als Antwort auf Antigenstimulation produzieren (Brosterhus et al., 1999; Bissinger et al., 2002). Feuchtinger et al. (2004) zeigten, dass dieses Verfahren für humane AdV-spezifische T-Zellen

durchführbar ist und diese T-Zell-Linien expandieren. Weitere Veröffentlichungen mit der Nutzbarkeit der IFN $\gamma$ -Sekretion von humanen AdV-spezifischen T-Zellen folgten (Chatziandreou et al., 2007; Aïssi-Rothé et al., 2010).

Der Zugang über IFN $\gamma$  produzierende Zellen bietet verschiedene Vorteile. Es ist eine einfache und schnelle Methode und kann leicht mit anderen malignen und infektiösen Antigenen zur Antigen-spezifischen zellulären Immuntherapie standardisiert werden (van Driessche et al., 2005).

In einer Publikation von Regn et al. (2001) wurde die Generierung von humanen AdV-spezifischen CTLs beschrieben, die an Experimente von Smith et al. (1996) anknüpft. Vorrangiges Ziel war die Herstellung von CTLs, die gleichzeitig für AdV als auch für EBV spezifisch waren. Dafür wurde ein CD40-Ligand Co-Kultur-System entwickelt, um EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zell-Linien (LCL) effizient mit E1A/E3-deletiertem AdV5 zu infizieren. PBMC von gesunden AdV-seropositiven Spendern wurden wöchentlich mit diesen autologen AdV<sup>+</sup>-LCL stimuliert. Das Besondere an B-LCLs ist, dass sie geeignet sind, das Antigen im Kontext von HLA-Klasse I- und auch -Klasse II-Molekülen zu präsentieren, und somit proliferative und zytotoxische Immunantworten ausgelöst werden können (Heslop et al., 1996; Rooney et al., 1998).

Leen et al. (2006) unternahmen den erfolgreichen Versuch, durch genetische Modifikation von Antigen-präsentierenden Zell-Linien CMV-, EBV- und AdV-spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten aus einer einzigen Zellkultur zu produzieren.

Trotz großer Bemühungen bezüglich der Herstellung von Virus-spezifischen T-Zell-Linien für adoptive Immuntherapien existieren eine Vielzahl von Einschränkungen, die z.B. Zeit- und Kostenfaktoren betreffen (Leen et al., 2010).

## 2 ZIELE UND FRAGESTELLUNGEN

Auf der Grundlage der aufgeführten Fakten entwickelten sich die Ziele und Fragestellungen der vorliegenden Arbeit mit dem Zweck der Etablierung technischer und organisatorischer Standards zur Generierung humaner AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay und der Charakterisierung dieses T-Zell-Produkts. Mit dieser Arbeit wurde gleichzeitig nach einer Möglichkeit gesucht, mit überschaubarem Einsatz von Zeit und Material effizient AdV-spezifische Zellen von einem potentiellen Stammzell-Spender zu gewinnen.

Vor Herstellung dieses AdV-spezifischen T-Zell-Produkts sollte die humane AdV-spezifische Immunreaktion bei gesunden Probanden geprüft werden.

1. Folgende ZIELE bestanden:

- A Quantifizierung AdV-spezifischer T-Zellen im Vollblut gesunder Probanden zur Abschätzung der erwartbaren Generierbarkeit AdV-spezifischer T-Zell-Produkte.
- B Optimierung der Herstellungstechnik AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate:
  - Standardisierung des Herstellungsprozesses und damit eine Etablierung technischer und organisatorischer Standards und
  - Evaluierung des (T-Zell-)Endprodukts nach Standardisierung der Herstellung

Sester et al. (2002) hatten AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen bei gesunden Probanden mittels Vollblutstimulationsassay untersucht und gezeigt, dass ihre Methode zum Nachweis AdV-spezifischer Zellen geeignet ist. In dieser Arbeit sollte zur funktionellen Analyse der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen statt CD69 das Oberflächenantigen CD154 untersucht werden.

Frentsch et al. (2005) legten dar, dass die CD154-Expression einen guten Zutritt für Antigen-spezifische TH-Zellen bietet. CD154 ist ein Molekül auf T-Effektorzellen der TNF-Proteinfamilie, wird auf TH1- und TH2-Zellen induziert, bindet auf Zielzellen an CD40 und vermittelt über CD40 aktivierende Signale die Proliferation und Aktivierung von B-Zellen (Murphy et al., 2009).

CD69 ist ein frühes Aktivierungsantigen, das auf stimulierten T-, B-, NK-Zellen sowie Makrophagen exprimiert wird. Es spielt eine entscheidende Rolle in der T-Zell-Proliferation und ist insbesondere für T-Effektorzellen spezifisch (Murphy et al., 2009).

Von CD8<sup>+</sup> T-Effektorzellen ist IFN $\gamma$  das wichtigste freigesetzte Zytokin, aber auch TH1-Zellen werden als IFN $\gamma$  Produzenten erfasst. Durch die Analyse von CD154 können auch spezifische TH2-Zellen identifiziert werden (Murphy et al., 2009).

2. Folgende FRAGESTELLUNGEN sollten dabei untersucht werden:

- zu A
- In welcher Größenordnung können AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut gesunder Probanden nachgewiesen werden?
  - In welcher Höhe können AdV-reaktive CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen quantifiziert werden?
  - Unterscheiden sich AdV3-Hexon-PepMix- und AdV3-Hexonprotein-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen in ihrer Quantität? Hat ein Antigen einen Vorteil in der Stimulierbarkeit der Zellen?
  - Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Alter des Probanden und seiner AdV-spezifischen T-Zell-Antwort?
- zu B
- Wie können die Einzelschritte der Herstellung mononukleärer Zellen, der AdV-spezifischen Stimulation, der IFN $\gamma$  Sekretion und der immunmagnetischen Anreicherung optimiert werden?
  - Wie hoch ist der unspezifische Zellverlust während des Herstellungsprozesses?
  - Wie können die unspezifischen Zellverluste und damit der Verlust AdV-reaktiver T-Zellen während der Herstellung gering gehalten werden?
  - Wie ist das (T-Zell-)Endprodukt charakterisiert: Phänotyp und Viabilität?
  - In welcher Größenordnung zeigen die Zellen AdV-Reaktivität im Ausgangspräparat und Endprodukt?

### 3 MATERIAL UND METHODEN

#### 3.1 BLUTENTNAHME

Venöses Blut wurde gesunden Probanden nach entsprechender Aufklärung und deren Einwilligung mittels Blutentnahmesets unter Standardbedingungen entnommen.

Folgende Blutentnahmesets wurden verwendet:

- Vacutainer® Blood Collection Tubes mit konventionellem Stopper, sodium heparin 10 ml- oder 6 ml-Röhrchen (170 IU/ 10 ml bzw. 102 IU/6 ml) (Becton, Dickinson and Company)
- Vacutainer® Blood Collection Set mit Adapter (BD)
- Beutelsystem CPD Cord Blood Collection Set (25 ml CPD-Antikoagulans/Beutel = Citrat 0,658 g – Phosphat 0,056 g – Dextrose 0,638 g) (Pall Corporation)

#### 3.2 GERÄTE UND VERBRAUCHSARTIKEL

In Tab. 2 werden alle Geräte und Verbrauchsartikel zusammengefasst, die sowohl im Vollblutstimulationsassay (siehe Kap. 3.4) als auch im IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay und der immunmagnetischen Zellseparation (siehe Kap. 3.5) benutzt wurden.

| Geräte   | Hersteller                         |
|--|------------------------------------|
| Zentrifuge Multifuge® 4KR  | Heraeus                            |
| Kühlzentrifuge Cryofuge® 6000i GMP +4°C  | Heraeus                            |
| Ausgleichswaage für Zentrifugenbecher  | Heraeus                            |
| Sicherheitswerkbank  | Holten LaminAir                    |
| Kühlschrank +4°C, -20°C, -70°C   | Kühlraum LZT, Liebherr, Heraeus    |
| Inkubator (+37°C, 5% CO <sub>2</sub> )   | Labotect                           |
| pipetus® -akku Pipettierhilfe  | Hirschmann® Laborgeräte            |
| FACSCalibur™ Flow Cytometer  | Becton, Dickinson and Company (BD) |
| Vortexer   | neoLab®/BIBBY Sterilin             |
| Pipetten Eppendorf Research® variable (0,1–2,5 $\mu$ l, 1–10 $\mu$ l, 2–20 $\mu$ l, 10–100 $\mu$ l, 20–200 $\mu$ l, 100–1.000 $\mu$ l) | Eppendorf                          |
| Absaugsystem BioChem-VacuuCenter   | vacuubrand GmbH & Co. KG           |
| CellQuest Pro, FlowJo 8.4.1  | BD, Tree Star                      |

|   |  |
|---|--|
| Blutanalysiergerät/Cellcytometer  | Sysmex   |
| Neubauer-Zählkammer+Deckgläschen, Zähler                                | LaborOptik, IVO                                |
| Lichtmikroskop Olympus CX41   | Olympus  |
| +37°C Wasserbad   | GFL®   |
| MACSmix™ Tube Rotator (Rüttler)   | Miltenyi Biotec                                |
| Schüttelgerät für Beutelsysteme   | Heidolph                                       |
| CliniMACS   | Miltenyi Biotec                                |
| Schweißgerät Composeal Mobilea und Compo Dock                           | Fresenius HemoCare GmbH                        |
| Waage   | Precisa  |
| Plasmapresse  | Terumo   |
| Verbrauchsartikel   |  |
| Rundboden-Röhrchen Cellstar® 12 ml                                      | greiner bio-one                                |
| Falcon® Blue Max™ 50 ml Konisches Röhrchen, Polypropylene = PP          | BD   |
| Falcon® Blue Max™ Jr. 15 ml Konisches Röhrchen, PP                      | BD   |
| Röhrchen 5 ml, Polystyrene = PS (für FACS)                              | Sarstedt                                       |
| Pipettenspitzen ep Dualfilter T.I.P.S. 0,1–10 µl, 2–100 µl, 50–1.000 µl | Eppendorf                                      |
| Falcon®/Costar® serological pipet 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml              | Becton Dickinson Labware, Corning Incorporated |
| Reaktionsgefäße reaction tubes 1,5 ml                                   | Eppendorf, greiner bio-one                     |
| FACS Clean, FACS Rinse, FACS Flow™                                      | BD   |
| Pasteurpipetten (Transferpipette 3,5 ml)                                | Sarstedt                                       |
| 6/24/96 Well Zellkulturplatte/-schale Costar®                           | VITARIS AG, Corning Incorporated               |
| Transferbeutel 600 ml   | Baxter   |
| Transferbeutel 150 ml   | Miltenyi Biotec                                |
| Anstechdorne für Transferbeutel   | Impromediform GmbH                             |
| Tubing Set LS für CliniMACS, Pre-Separation Filter                      | Miltenyi Biotec                                |
| Trypanblau-Lösung   | Fluka Chemie                                   |

**Tab. 2:** Geräte und Verbrauchsartikel.

Alle Methoden, die zur Isolierung und Gewinnung von Zellen abzielten, wurden unter sterilen Voraussetzungen an einer Sicherheitswerkbank (Holten LaminAir) verrichtet.



### 3.3 PRINZIP DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Die Durchflusszytometrie oder FACS (für »fluorescence activated cell sorting«) eignet sich zur Zählung und Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften (Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften) von Einzelzellen in einer Suspension.

Mittels Einsatz von mit Fluoreszenzfarbstoff markierten monoklonalen Antikörpern und deren Bindung (Antigen-Antikörper-Reaktion) ist die Beurteilung von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Teilchen möglich. Zudem streut jede Zellart entsprechend ihrer Größe, Struktur ihrer Zellmembran und der Art ihrer intrazellulären Bestandteile (Granularität) das auftreffende Licht, generiert durch einen fokussierten Laserstrahl, in spezifischer Weise. Der größte Anteil des Lichtes wird vorwärts gestreut (Vorwärtsstreulicht, forward scatter = FSC) und stellt ein Maß für die Größe der Zelle dar. Ein weiterer Teil des Lichtes wird im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreut. Dieser als Seitwärtsstreulicht (side scatter = SSC) bezeichnete Vorgang ist proportional zur Oberflächenstruktur (Membranfältelung) und Granularität dieser Zelle.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Emission von optischen Signalen seitens einer Zelle, wenn diese einen Laserstrahl passiert. Die Zellen einer Suspension werden, durch hydrodynamische Fokussierung aneinandergereiht, an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei Anregung durch einen monochromatischen Laserstrahl wird der eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff auf ein höheres Energieniveau gehoben (Absorption) und fällt unter Abgabe von Photonen auf sein Ursprungsniveau zurück (Emission). Die emittierte Photonenkonzentration wird durch einen Photodetektor registriert und verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Weil sich die eingesetzten Farbstoffe in den Emissionsspektren unterscheiden, ist eine simultane Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarben durchführbar (Murphy et al., 2009; [www.bdbiosciences.com](http://www.bdbiosciences.com)).

In dieser Arbeit wurden die in Tab. 3 aufgeführten Fluorochrome eingesetzt.

| Fluorochrom              | Absorptionsmaximum in nm | Emissionsmaximum in nm | Abkürzung    |
|--------------------------|--------------------------|------------------------|--------------|
| Allophycocyanin          | 650                      | 660                    | APC (FL-4)   |
| Fluoresceinisothiocyanat | 495                      | 519                    | FITC (FL-1)  |
| Peridin Chlorophyll      | 490                      | 675                    | PerCP (FL-3) |
| Phycoerythrin            | 480; 565                 | 578                    | PE (FL-2)    |
| Propidiumiodid           | 536/550                  | 617/650                | PI (FL-3)    |

*Tab. 3: Fluorochrome mit den entsprechenden Absorptions- und Emissionsmaxima.*

Der in dieser Arbeit benutzte FACSCalibur™ (BD) arbeitet mit zwei Lasern (einem Argonlaser 488 nm und einer roten Laserdiode 635 nm), bis zu vier verschiedene Fluorochromfarbstoffe können gleichzeitig eingesetzt werden (www.bdbiosciences.com).

Durch Verwendung von Propidiumiodid (Sigma®; 0,1 mg/ml Stockkonzentration) können tote Zellen ausgeschlossen werden. Beriglobin® (Aventis Behring GmbH, 50 mg/ml; 1:50) wird jeder Färbemischung hinzugefügt. Es ist ein humanes Immunglobulin, das unspezifische Fc-Rezeptoren blockiert.

Tab. 4 führt die Antikörper auf, die im Vollblutstimulationsassay und im IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay zum Einsatz kommen. Dabei handelt es sich um Anti-Human IgG-Maus-Antikörper.

| Antikörper   | Fluorochrom | Ansatz | Hersteller      |
|--|-------------|--------|-----------------|
| <b>Vollblutstimulationsassay</b>   |             |        |                 |
| aCD4   | PerCP       | 1:10   | BD Pharmingen   |
| aCD154   | PE          | 1:50   | BD/Pharmingen   |
| aCD8   | PerCP       | 1:10   | BD              |
| aCD69  | PE          | 1:10   | BD              |
| aIFN $\gamma$  | APC         | 1:800  | BD/Pharmingen   |
| aCD14  | FITC        | 1:400  | DRFZ/BD         |
| <b>IFN<math>\gamma</math>-Sekretions-Assay</b>   |             |        |                 |
| aIFN $\gamma$ detection antibody (Large Scale IFN $\gamma$ Secretion Assay Enrichment Kit) | PE          | 1:10   | Miltenyi Biotec |
| aCD3   | FITC        | 1:20   | BD              |
| aCD4   | APC         | 1:10   | BD              |
| aCD8   | APC         | 1:10   | BD              |

*Tab. 4: Antikörper zur Durchflusszytometrie-Analyse.*

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm CellQuest Pro oder FlowJo.

Als Darstellung der FACS-Daten wurde das Punktdiagramm (Dot Plot) mit zwei Parametern gewählt, in dem jede Zelle als ein Punkt abgebildet wird.

### 3.4 VOLLBLUTSTIMULATIONSASSAY

Der Vollblutstimulationsassay ist eine Methode zur Identifizierung von Antigen-spezifischen T-Zellen im Vollblut nach einer kurzen Stimulationszeit mit einem Antigen (Nomura et al., 2000; Sester et al., 2002) und wurde zur Quantifizierung humaner AdV-spezifischer T-Zellen bei gesunden Probanden gewählt.

Durch Antigen-Stimulation kann eine Immunreaktion induziert werden und als Expression von Zytokinen, wie beispielsweise IFN $\gamma$ , und Oberflächenaktivierungsantigenen, wie CD154 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD69 auf CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, mittels Durchflusszytometrie gemessen werden.

Durch Hinzugabe von Brefeldin A, ein Metabolit aus Pilzen (*Eupenicillium brefeldianum*), wird der intrazelluläre Proteintransport vom endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat und damit die Sekretion von Proteinen (Zytokinen) gehemmt (Nebenführ et al., 2002). Nach Zusatz einer permeabilisierenden Lösung werden Lymphozyten durchlässig gemacht, mit Fluorochrom beladene Antikörper können in die Zelle gelangen und an exprimierte Proteine binden (intrazelluläre Zytokinfärbung).

Allen Versuchsansätzen wurde Anti-Human CD28 ( $\alpha$ -h CD28) hinzugefügt. CD28 ist ein Antigen, das auf ruhenden T-Zellen exprimiert wird und mit den kostimulatorischen Molekülen B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) auf Antigen-präsentierenden Zellen interagiert. Dieses 2. Signal wird zur weiteren Aktivierung von T-Zellen benötigt (Boesteanu et Katsikis, 2009; Sharpe, 2009).

Im Folgenden werden die Einzelschritte beschrieben. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei 1.200 rpm (rounds per minute) und +4°C für 10 min.

#### a) Stimulation, Erythrozytenlyse, Permeabilisierung

In Tab. 5 werden die verwendeten Reagenzien dargestellt.

| Reagenzien                            | Stockkonzentration   | Ansatz                  | Hersteller                              |
|---------------------------------------|--|-------------------------|---|
| SEB                                   | 1 $\mu$ g/ $\mu$ l   | 1 $\mu$ g/ml Vollblut   | Sigma <sup>®</sup>                      |
| Anti-Human CD28                       | 0,2 mg/ml  | 1 $\mu$ g/ml Vollblut   | BD/Pharmingen                           |
| AdV3 Hexonprotein PepMix <sup>™</sup> | 0,25 $\mu$ g/ $\mu$ l (25 $\mu$ g in 100 $\mu$ l PBS/DMSO) | 2,5 $\mu$ g/ml Vollblut | Jerini AG/JPT Peptide Technologies GmbH |
| DMSO 100%                             |  |                         | Sigma <sup>®</sup> /Apotheke Charité    |
| AdV3 Hexonprotein A-D                 | 0,4 mg/ml in 0,1% Essigsäure                               | 5 $\mu$ g/ml Vollblut   | GenExpress                              |
| Brefeldin A                           | 5 mg/ml in 70% Ethanol (Ethanol Rotipuran)                 | 10 $\mu$ g/ml Vollblut  | Sigma <sup>®</sup>                      |
| EDTA/PBS                              | 20 mMol  |                         | Miltenyi Biotec/DRFZ                    |
| FACS Lysing Solution                  | 10X (1 : 10 mit Aqua dest.)                                | 9 ml/Ansatz             | BD FACS <sup>™</sup> , Fresenius Kabi   |
| FACS Permeabilizing Solution 2        | 10X (1 : 10 mit Aqua dest.)                                | 500 $\mu$ l/Ansatz      | BD FACS <sup>™</sup>                    |
| PBS/BSA/Azid<br>PBS/BSA               |  |                         | Charité/DRFZ                            |

**Tab. 5:** Reagenzien des Vollblutstimulationsassays.

AdV3 Hexonprotein PepMix<sup>™</sup> befindet sich in einer Durchstechampulle und enthält ein lyophilisiertes Peptid-Gemisch (25  $\mu$ g pro Ampulle) des Adenovirus 3 Hexonproteins, bestehend aus 234 Einzelpeptiden (15mer, 11 überlappende Peptide), die in 40  $\mu$ l DMSO 100% und 60  $\mu$ l PBS aufgelöst und bei -20°C gelagert werden.

Für die Untersuchung wurden pro Proband 10–20 ml Blut entnommen. Unter sterilen Arbeitsbedingungen wurde je 1 ml Vollblut in Rundboden-Röhrchen pipettiert. In jedes Röhrchen wurden  $\alpha$ -h CD28 und dann die Antigene (AdV3 Hexonprotein A-D, AdV3 Hexonprotein PepMix™) hinzugefügt. Die Konzentration der Antigene ist Tab. 5 zu entnehmen. Eine so genannte Negativkontrolle enthielt lediglich  $\alpha$ -h CD28, eine Positivkontrolle wurde mit Staphylokokken Enterotoxin B (SEB) stimuliert. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden, zur Vergrößerung der Kontaktfläche schräg im Brutschrank (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>) stehend, wurden alle Proben mit Brefeldin A versetzt und erneut in schräger Lage im Brutschrank inkubiert. Nach weiteren vier Stunden endete die Stimulationszeit mit einer Gesamtstimulationsdauer von sechs Stunden durch Zusatz von 100  $\mu$ l kaltem 20 mM EDTA/PBS und Vortexen der Proben. Nach 10 min bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Erythrozytenlyse und eine gleichzeitige Fixierung der Zielzellen mit FACS Lysing Solution. Diese Suspension wurde gut gemischt und 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Im folgenden Schritt wurden die Zellen gewaschen, der Überstand wurde dekantiert, das Pellet gebrochen und mit einer permeabilisierenden Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur wurde in jedes Röhrchen PBS/BSA/Azid pipettiert, und es folgte ein Zentrifugationsschritt. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 1 ml PBS/BSA/Azid aufgenommen, die Zellsuspension in FACS-Röhrchen überführt. Über Nacht erfolgte die Lagerung im Kühlschrank bei +4°C.

#### b) Intrazelluläre Färbung und durchflusszytometrische Analyse

Die verwendeten Reagenzien und Antikörper wurden in Kap. 3.3 und Tab. 4 dargestellt. Zunächst wurden die Probenröhrchen zentrifugiert. In der Zwischenzeit wurden zwei Färbecocktails á 50  $\mu$ l pro Ansatz hergestellt, dies erfolgte im Dunkeln sowie auf Eis:

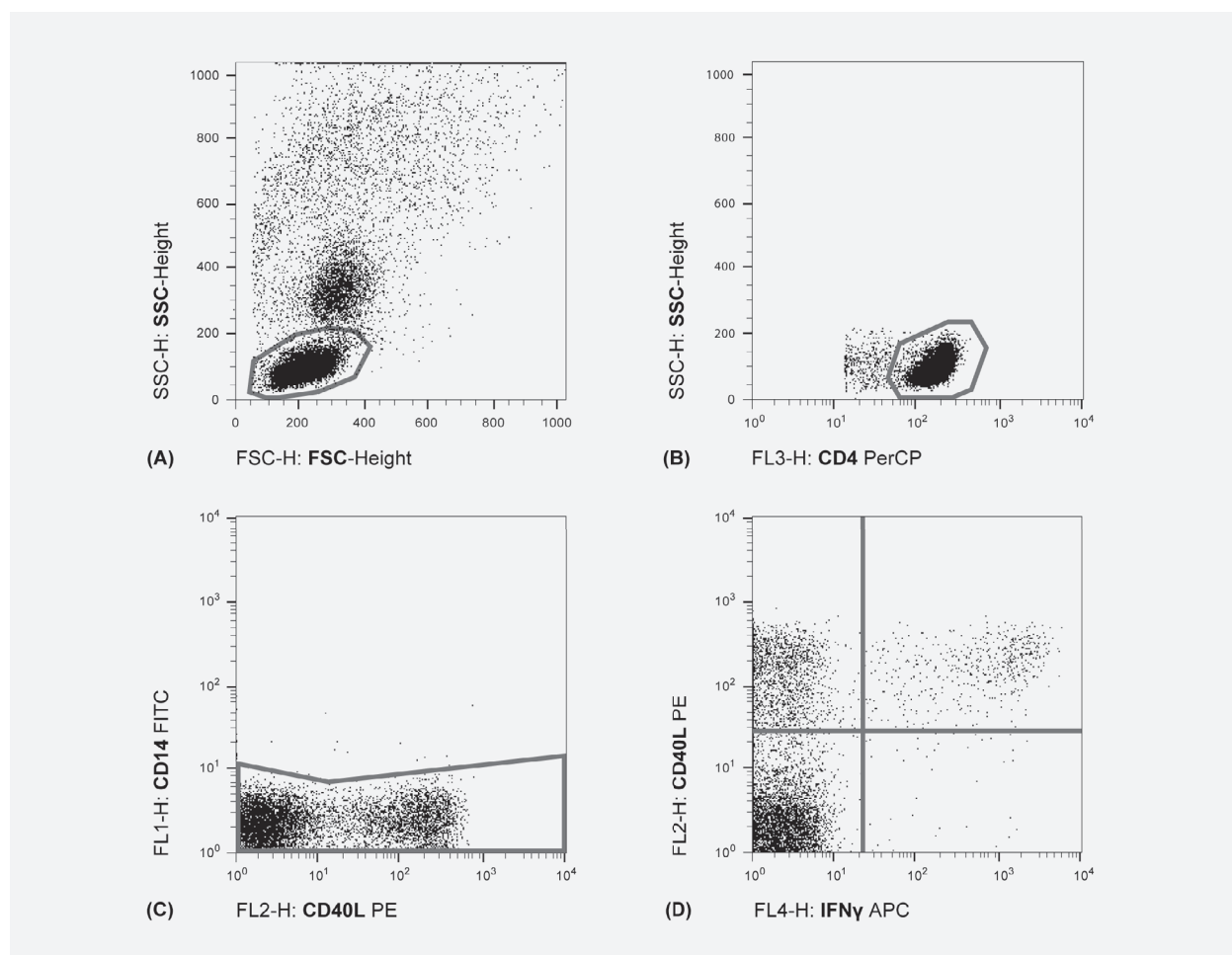
- A  $\alpha$ CD4 PerCP,  $\alpha$ CD154 PE,  $\alpha$ IFN $\gamma$  APC und  $\alpha$ CD14 FITC und
  - B  $\alpha$ CD8 PerCP,  $\alpha$ CD69 PE,  $\alpha$ IFN $\gamma$  APC und  $\alpha$ CD14 FITC
- zzgl. Beriglobin und PBS/BSA.

Nach Ende der Zentrifugation wurde vorsichtig der Überstand abgesaugt, das Pellet gebrochen und den Proben zügig in einem dunklen Raum 50  $\mu$ l Färbegemisch hinzugefügt. Dann erfolgte eine dreißigminütige Inkubation in Dunkelheit bei Raumtemperatur. Zum Waschen wurden 1.400  $\mu$ l PBS/BSA/Azid pro Röhrchen gebraucht. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 250  $\mu$ l PBS/BSA/Azid aufgenommen. Anschließend erfolgte die durchflusszytometrische Messung.

Vor der Messung wurden Einstellungen vorgenommen: Erstellen von Masken, Setzen von Gates, Einrichten eines Schwellenwerts. Während der Messung wurden die Gates modifiziert und den Fluoreszenzen angepasst. Ziel war eine Aufnahme von 200.000 Ereignissen bezogen auf Lymphozyten und CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen.

Folgendes Gating (siehe Abb. 2) wurde in der durchflusszytometrischen Analyse der AdV-spezifischen  $CD4^+CD154^+IFN\gamma^+$  und  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  T-Zellen vorgenommen:

- A Auswahl von Lymphozyten (FSC/SSC),
- B Selektion der  $CD4^+$  oder  $CD8^+$  T-Zell-Subpopulation (CD4 oder CD8 PerCP/SSC),
- C Ausschluss von Debris und Färbeartefakten sowie der CD14 positiven Ereignisse (CD154 oder CD69 PE /CD14 FITC) und
- D Darstellung  $IFN\gamma$  APC/CD69 PE oder  $IFN\gamma$  APC/CD154 PE.

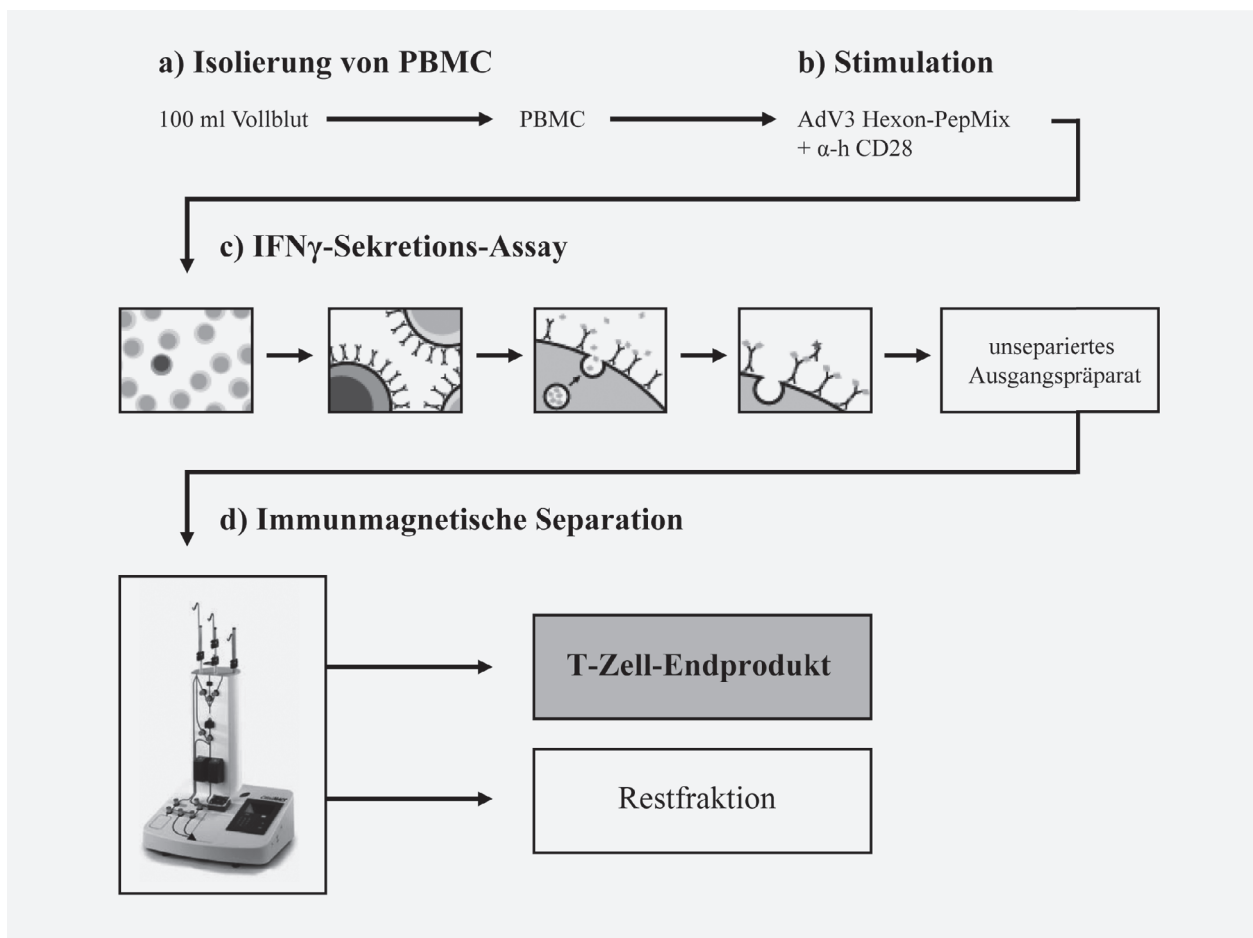


**Abb. 2:** Gatingstrategie zur Auswahl AdV-spezifischer  $CD4^+IFN\gamma^+$  bzw.  $CD4^+CD154^+IFN\gamma^+$  T-Zellen nach Vollblutstimulation. Beispielhaft werden 5% aller Events einer mit SEB stimulierten Probe gezeigt. Im Punktdiagramm A und B wird eine Schwelle (threshold) sichtbar, die in Bild A debris und in Bild B lediglich  $CD4^+$  bzw.  $CD8^+$  Ereignisse darstellt. Das Setzen eines Quadranten teilt das Punktdiagramm D in vier Felder und zeigt die gesuchten Zellpopulationen.

Die Bearbeitung aller durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo Software, Version 8.4.1 (Tree Star, USA).

### 3.5 IFN $\gamma$ -SEKRETIONS-ASSAY ZUR GENERIERUNG HUMANER ADV-SPEZIFISCHER T-ZELLEN

Aus dem Kollektiv von Probanden, die zur Quantifizierung AdV-spezifischer T-Zellen aus Vollblut zur Verfügung standen, wurden Personen für die Generierung humaner AdV-spezifischer T-Zellen mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay ausgewählt. 100 ml Blut wurden pro Proband entnommen. In der Abb. 3 wird der Herstellungsprozess schematisch dargestellt.



**Abb. 3: Herstellungsprozess zur Generierung eines AdV-spezifischen T-Zell-Produkts.**

- Als erstes erfolgt die Isolierung von mononukleären Zellen aus Vollblut (PBMC),
- anschließend wird eine sechsstündige Stimulation mit AdV3 Hexon-PepMix durchgeführt,
- mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay erfolgen die immunmagnetische Markierung IFN $\gamma$  sezernierender Zellen nach einer Sekretionsphase und
- zum Schluss erfolgt die immunmagnetische Zellseparation mittels CliniMACS<sup>®</sup> mit Erhalt der Zielpopulation, dem T-Zell-Endprodukt. (Bilder entnommen von: [www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com))

Zunächst wurde eine Standardisierung des Herstellungsprozesses und damit eine Etablierung technischer und organisatorischer Standards zur Generierung AdV-spezifischer T-Zellen vorgenommen. Dabei wurde das Augenmerk auf die in Abb. 3 dargestellten Arbeitsschritte (a-d) gelegt.

Die Verbrauchsartikel zur Herstellung AdV-spezifischer T-Zellen wurden in Tab. 2 unter Kap. 3.2 (s. S. 23) zusammengefasst. In Tab. 6 werden allgemeine Reagenzien aufgeführt.

| Reagenzien   | Hersteller                                       |
|--|--|
| PBS (Dulbecco)   | Biochrom AG                                      |
| 2 mMol EDTA/PBS  |  |
| (+37°C/+4°C) RPMI 1640 Kulturmedium<br>+ 1% Penicillin/Streptomycin (P/S) und<br>Amphotericin B<br>+ 10%/2% humanes AB-Serum | Biochrom AG<br>Sigma/Apotheke Charité<br>Cambrex |
| 2% humanes AB-Serum  | Cambrex  |
| DMSO 100%  | Sigma®   |
| Anti-Human CD28  | BD   |
| (+4°C) CliniMACS PBS/EDTA-Puffer<br>+ 0,5% humanes AB-Serum  | Miltenyi Biotec                                  |
| +4°C CliniMACS PBS/EDTA-Puffer   | Miltenyi Biotec                                  |
| Human-Albumin »Behring« 20%-Infusionslösung  | Baxter/CSL Behring AG                            |

**Tab. 6:** Allgemeine Reagenzien zur Herstellung eines T-Zell-Produkts.

### 3.5.1 ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES

Die Isolierung mononukleärer Zellen (PBMC), also von Lymphozyten und Monozyten aus dem Vollblut, erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation, beruhend auf den Eigenschaften des Polymers Ficoll. Aufgrund der höheren Dichte von Ficoll passieren Erythrozyten während der Zentrifugation die Ficoll-Phase (Dichte 1,077 g/ml) und sedimentieren. Zudem bewirkt Ficoll eine Agglutination der Erythrozyten und somit eine Sedimentationsbeschleunigung. Lymphozyten, Thrombozyten und Monozyten sammeln sich an der Plasma-Gradientenphase zwischen Ficoll und Plasma und stellen sich als weißlicher, trüber Ring dar (Murphy et al., 2009).

Venöses Vollblut wurde im Verhältnis 1:2 mit kaltem PBS-Puffer verdünnt. 10–15 ml raumtemperierte Ficoll-Trennlösung (isotone Biocoll-Trennlösung 1,077, Biochrom AG) wurde in ein 50 ml-Falcon®-Röhrchen pipettiert und danach vorsichtig mit 35–40 ml Blut-PBS-Gemisch überschichtet. Eine Verwirbelung von Blut und Ficoll musste vermieden werden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei Raumtemperatur und 2.000 rpm ohne Bremse für 30 min. Nach diesem Schritt ergaben sich vier Schichten: 1. Erythrozyten/Granulozyten, 2. Ficoll, 3. PBMC, 4. Plasma). Sorgfältig wurde das Plasma bis 2 cm oberhalb des PBMC-Ringes abgesaugt, die PBMC entnommen und in ein neues Falcon®-Röhrchen überführt. Alle nun folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis und alle Zentrifugationsschritte bei 1.200 rpm und +4°C für 10 min durchgeführt. Das Röhrchen wurde auf 50 ml mit PBS aufgefüllt und ein Waschgang vollzogen. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet dann durch Aufnahme in 1 ml PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 ml mit PBS aufgefüllt und es folgten ein bis zwei weitere Waschschriffe.

## Zählung der PBMC

Vor dem letzten Waschgang erfolgte eine Zellzählung. Aus der Zellsuspension wurden 20  $\mu$ l entnommen und in einem Reaktionsgefäß mit Trypanblau vermischt. Unter dem Lichtmikroskop wurde mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl ermittelt. Dazu wurden 10  $\mu$ l in eine Zählkammer pipettiert. Gezählt wurden nur die lebenden Zellen, d. h. nicht mit Trypanblau gefärbte Zellen. Alle vier Großquadrate wurden ausgezählt. Anschließend kam folgende Formel zur Anwendung (entsprechend Herstellerangaben):

$$\text{Anzahl der PBMC pro ml Volumen} = \text{mittlere Zahl pro Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Das maschinelle Zählgerät von Sysmex kam als Kontrolle zum Einsatz.

Nach der Zählung und dem letzten Waschschrift wurden die PBMC in 1 ml Kulturmedium mit AB-Serum und Antibiotikastammlösung resuspendiert und auf  $1 \times 10^7$  PBMC pro ml Medium eingestellt.

### 3.5.2 STIMULATION MIT ADV3-HEXON-PEPMIX

Vor dem Stimulationsprozess erfolgten eine Zählung, ein Waschgang mit 1.200 rpm bei +4°C für 10 min, danach die Einstellung mit Zellkulturmedium auf  $1 \times 10^7$  PBMC pro ml und die Verteilung der Zellsuspension auf die Zellkulturplatten (6 oder 24 well). Zu jedem Ansatz wurden  $\alpha$ -h CD28 (1  $\mu$ g/ml Zellsuspension) und AdV3 Hexon-PepMix™ (Jerini AG/JPT Peptide Technologies GmbH, s. S. 27; 2,5  $\mu$ g/ml Zellsuspension) hinzugefügt. Die Zellkulturplatten wurden für die Dauer der Stimulation von sechs bis sieben Stunden im Brutschrank (+37°C, 5% CO<sub>2</sub>) aufbewahrt. Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen durch mehrmaliges, sorgfältiges Spülen der Platten mit Kulturmedium, 2% AB-Serum enthaltend, in ein Röhrchen überführt, und ein Waschschrift bei 1.200 rpm bei +4°C für 10 min erfolgte. Im Anschluss erfolgten die Aufnahme in Kulturmedium mit 2% AB-Serum und eine Zellzählung.

#### Interne Qualitätskontrollen

Als Kontrollen wurden parallel eine unstimulierte Negativ- und eine Positivkontrollprobe (SEB, 1  $\mu$ g/ml) und eine mit AdV stimulierte Probe (AdV3 Hexon-PepMix™, 2,5  $\mu$ g/ml) in das Experiment eingeschlossen. Je  $1 \times 10^6$  PBMC wurden in 1 ml Kulturmedium und in ein 5 ml-Röhrchen (Sarstedt) aufgenommen. Die Stimulation erfolgte in 96-well-Kulturplatten in Anwesenheit von  $\alpha$ -h CD28 (1  $\mu$ g/ml).

Alle Versuchsschritte des IFN $\gamma$ -Sekretions-Assays wurden gleichartig durchgeführt. Es erfolgte keine immunmagnetische Anreicherung. Die durchflusszytometrischen Analysen erfolgten analog den oben beschriebenen Verfahren.



### 3.5.3 IMMUNMAGNETISCHE ZELLSEPARATION MITTELS IFN $\gamma$ -SEKRETIONS-ASSAY

Der IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay wurde zur Detektierung, Anreicherung und Analyse lebender IFN $\gamma$  produzierender Leukozyten, insbesondere Antigen-spezifischer T-Zellen, entwickelt. Durch Herstellung von CliniMACS<sup>®</sup>-Geräten mit geschlossenen Systemen ist diese Prozedur auch im Großmaßstab und für die klinische Anwendung möglich (Miltenyi Biotec).

Nach der Stimulation von PBMC mit einem Antigen wird eine IFN $\gamma$ -Sekretion induziert. Nachfolgend wird ein IFN $\gamma$  spezifischer Catchmatrix Reagens an die Zelloberfläche aller Leukozyten via CD45 geheftet. Das gebildete IFN $\gamma$  bindet an das Catchmatrix Reagens. Dann werden diese IFN $\gamma$  produzierenden Zellen mit IFN $\gamma$  Enrichment Reagens, das an magnetische Microbeads gekoppelt ist und spezifisch an IFN $\gamma$  bindet, magnetisch beladen und können über einer MACS-Säule, die sich in einem magnetischen Feld des CliniMACS<sup>®</sup> Separators befindet, angereichert werden (= immunmagnetische Zellseparation). Die markierten Zellen werden in der MACS-Säule zurückgehalten (T-Zell-Endprodukt), und diese ausgewählte Zellfraktion wird nach Entmagnetisierung herausgespült, während nicht magnetisch geladene Teilchen hindurch gelassen werden (sog. Restfraktion). Dann werden die Zellen mit einem PE-konjugierten IFN $\gamma$  detection Antikörper zur durchflusszytometrischen Analyse gefärbt.

#### a) IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay

Zu den speziellen Reagenzien des Sekretions-Assays zählen ein IFN $\gamma$  Catchmatrix Reagent (gegen humanes IFN $\gamma$  gerichteter, monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper, konjugiert mit einem Zelloberflächen-spezifischen monoklonalen Maus-IgG2a-Antikörper) sowie ein IFN $\gamma$  Enrichment Reagent (gegen humanes IFN $\gamma$  gerichteter, monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper, konjugiert mit MACS<sup>®</sup> paramagnetischen Mikrokügelchen). Beide Reagenzien sind im »Large Scale IFN $\gamma$  Secretion Assay Enrichment Kit« (Miltenyi Biotec) enthalten.

Alle Zentrifugationsschritte wurden in einer Kühlzentrifuge (+4°C) durchgeführt. Beutelsysteme wurden ohne Bremsvorgang zentrifugiert.

Im Einzelnen:

- nach erfolgter Zählung Belassung der PBMC in 50 ml-Röhrchen oder Überführung in 600 ml-Transferbeutel
- erneutes Waschen, Entfernen des Überstandes und Einstellung auf ein Volumen von 10 ml mit Kulturmedium und 2% AB-Serum
- Zusatz von 7,5 ml des IFN $\gamma$  Catchmatrix Reagens, Zellen resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert

### Sekretionsphase:

- Vorbereitung von 600 ml-Transferbeuteln oder 50 ml-Röhrchen mit entsprechenden Volumina +37°C Kulturmediums mit 10% AB-Serum
- Verdünnung der Zellsuspension auf die Ziel-Zelldichte von  $1 \times 10^6$ /ml
- anschließend Inkubation im Brutschrank für 45 min unter kontinuierlicher langsamer Rotation (max. 50 rpm)
- dann Beendigung des Prozesses durch Hinzufügen von +4°C PBS/EDTA-Puffer mit 0,5% AB-Serum und Lagerung für 10 min auf Eis
- im Anschluss Waschgang, Entfernung des Überstandes und Resuspension der Zellen in kaltem PBS/EDTA-Puffer
- bei Bestehen mehrerer Reagensröhrchen oder -beutel Zusammenführung der Zellen in ein Gefäß
- erneuter Waschgang, Einstellung der Zellsuspension auf 10 ml mit PBS/EDTA-Puffer mit 0,5% AB-Serum
- im folgenden Schritt Zusatz von 7,5 ml des IFN $\gamma$  Enrichment Reagens, Resuspendieren der Zellen und Inkubieren für 15 min auf Eis
- anschließend Auffüllen der Suspension mit +4°C Puffer und Waschgang
- vorsichtiges Entfernen des Überstandes und Aufnahme der Zellen in 100 ml +4°C Puffer, Transfer der Zellsuspension in 150 ml-Transferbeutel
- erneute Zählung, Entnahme ausreichender Volumina der Zellsuspension für spätere Analyse des unseparierten Ausgangspräparats und Kühlung

### b) Immunmagnetische Zellseparation

- Vorbereitung des CliniMACS Tubing Sets
- dazu wurde der Beutel mit der Zellsuspension mit einem PBS/EDTA-Puffer mit 0,5% AB-Serum enthaltenden Beutel verbunden
- Anschluss ans Tubing Set
- Einfügen des Pre-Separation-Filters nach Befeuchten mit Puffer
- Einbau des Tubing Sets in das CliniMACS® Plus Instrument
- immunmagnetische Zellseparation mit einem Enrichment-Programm
- am Ende der immunmagnetischen Anreicherung: Erhalt von einem Beutel mit dem T-Zell-Endprodukt (Ziel-Zellpopulation) und einem Beutel mit der Restfraktion
- sofortige Lagerung dieser Proben auf Eis
- Zählung der Zellzahlen des T-Zell-Endprodukts mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer (s. o.) und der Restfraktion mit dem Sysmex Cytometer
- Entnahme von Zellsuspensionen für die durchflusszytometrische Analyse

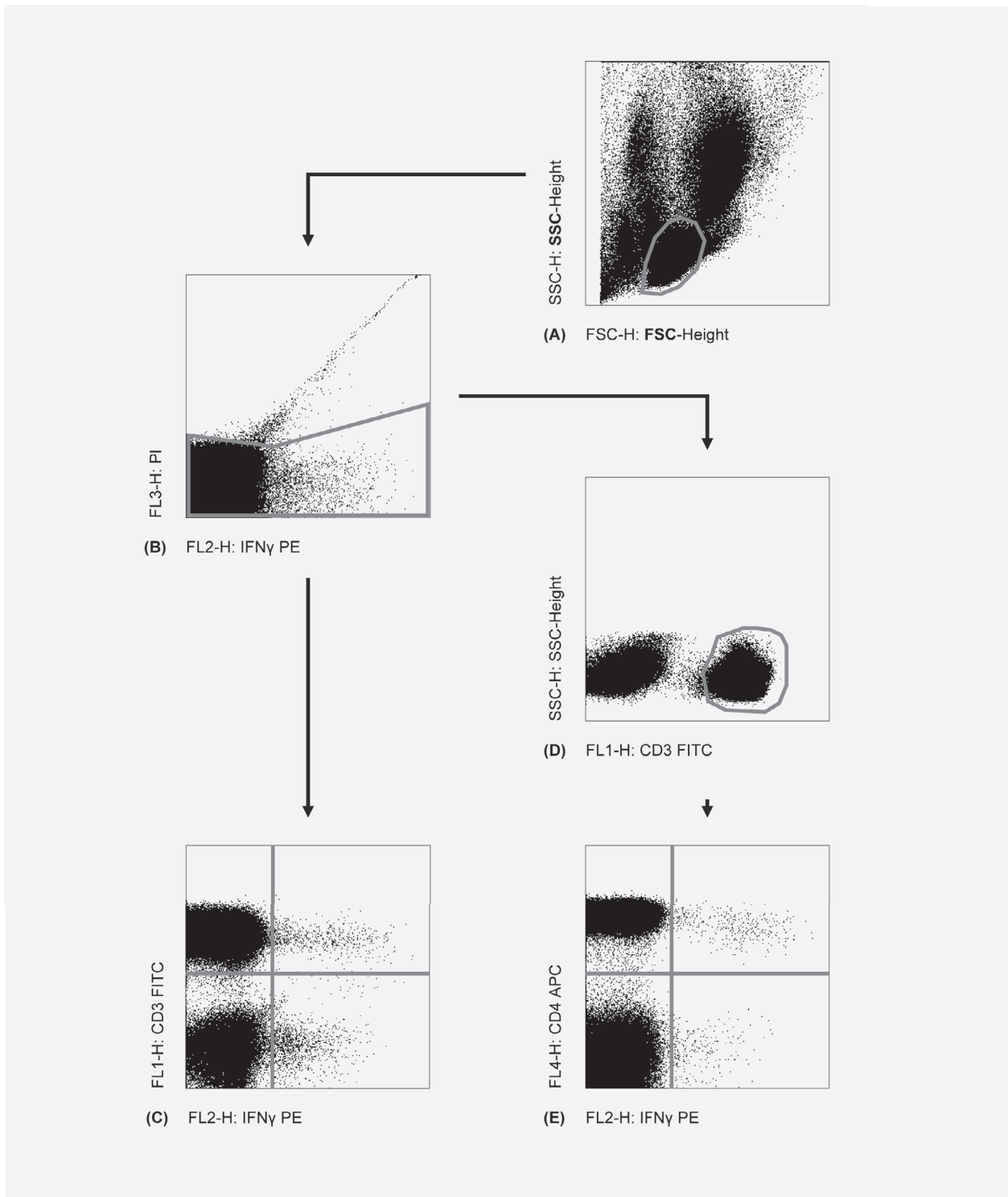
### c) Analyse mittels Durchflusszytometrie

In Tab. 4 (s. S. 26) sind die Antikörper für die durchflusszytometrische Analyse gelistet. Der spezielle anti IFN $\gamma$  detection antibody ist ein monoklonaler Maus-IgG1-Antikörper.

- Arbeiten in Dunkelheit, alle Zentrifugationsschritte erfolgten bei +4°C und 1.200 rpm
- Anfertigung von Färbecocktails: 100  $\mu$ l Gesamtvolumen je Probe in PBS/EDTA-Puffer mit 0,5% AB-Serum
- folgende Färbemischungen wurden hergestellt:  $\alpha$ IFN $\gamma$  PE ( $\alpha$ IFN $\gamma$  detection Antikörper),  $\alpha$ CD3 FITC,  $\alpha$ CD8 APC bzw.  $\alpha$ IFN $\gamma$  PE,  $\alpha$ CD3 FITC,  $\alpha$ CD4 APC plus Beriglobin
- Waschgang aller entnommenen Proben (unsepariertes Ausgangspräparat, T-Zell-Endprodukt und Restfraktion)
- Entfernen des Überstandes, sorgfältige Resuspension des Zellpellets im Färbecocktail und zehnminütige Inkubation bei +4°C
- Beendigung der Prozedur durch Hinzufügen von 1 ml +4°C kalten Puffer, anschließend Waschgang
- Aufnahme des Pellets in 500  $\mu$ l +4°C PBS/EDTA-Puffer
- kurz vor der Durchflusszytometrie Zusatz von Propidiumiodid (Endkonzentration von 0,5  $\mu$ g/ml)
- Analyse mit dem FACSCalibur™

Vor der Messung wurden Einstellungen vorgenommen: Erstellen von Masken, Setzen von Gates. Während der Messung wurden die Gates modifiziert und den Fluoreszenzen angepasst. Ziel war Aufnahme von 200.000 events in der Lymphozytenpopulation, dies gelang aufgrund der geringen Zellzahlen nicht für die Probe des T-Zell-Endprodukts.

Die folgende Abb. 4 zeigt die Gatingstrategie.



**Abb. 4:** Gatingstrategie zur Charakterisierung des AdV-spezifischen T-Zell-Endprodukts.

A. Auswahl der Lymphozytenpopulation (FSC/SSC),

B. Ausschluss der toten Zellen (IFN $\gamma$  PE/PI),

C. Darstellung der AdV-reaktiven CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen (IFN $\gamma$  PE/CD3 FITC)  
oder

D. Auswahl der CD3<sup>+</sup> T-Zellen (CD3 FITC/SSC) und

E. im letzten Schritt Darstellung der AdV-reaktiven CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> / CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>T-Zellen (IFN $\gamma$  PE/CD4 APC)

Die Bearbeitung aller durchflusszytometrisch erhobenen Daten erfolgte mit dem Programm FlowJo Software, Version 8.4.1 (Tree Star, USA).

### 3.6 STATISTISCHE ANALYSE

Mittels SPSS 18 und Excel (Microsoft Office) wurden statistische Analysen durchgeführt: Berechnung des arithmetischen Mittelwerts, des Medians, Kolmogorov-Smirnov-Test, T-Test bei gepaarten Stichproben sowie die Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson, und Abbildungen wurden erstellt. In Abb. 7 und 8 werden als Punkt Ausreißer, als Sternchen extreme Ausreißer dargestellt. Mittels GraphPad Prism, Version 5 (GraphPad Software für Mac OS X) wurden sowohl statistische Berechnungen (95%-Konfidenzintervall, Median, Range) als auch die Erstellung von Graphiken, z.B. Box-Whisker-Plots mit der Darstellung von kleinstem und größtem Datenwert, unterem und oberem Quartil sowie Median durchgeführt.

Bei Nichtannahme einer Normalverteilung bzw. zu kleinem Stichprobenumfang erfolgte die Angabe von Median, Minimum und Maximum.

Bei allen Testverfahren wird eine Theorie überprüft, die man als Nullhypothese bezeichnet. Diese wird durch das Ergebnis des Tests bestätigt oder verworfen. Das Signifikanzniveau mit 5% bzw. 1% festgelegt. Beim Vergleich von Messwerten von zwei oder mehr Stichproben kann eine Hypothese über die Differenz zwischen ihnen aufgestellt werden. Mithilfe des P-Werts (oder Wahrscheinlichkeitswert) wird dann ermittelt, mit welcher Wahrscheinlichkeit die Hypothese zutrifft bzw. irgendeine beobachtete Differenz der Messergebnisse zweier Stichproben/Gruppen zufällig auftritt (Harris, Taylor, Taylor, 2007).  $P \leq 0,05$  wird als (statistisch) signifikant und  $P \leq 0,01$  als hoch signifikant gewertet. Je kleiner der P-Wert ist, desto unwahrscheinlicher ist es, dass eine Differenz zufällig zustande kommt (Harris, Taylor, Taylor, 2007).

Der Kolmogorov-Smirnov-Test als nichtparametrischer Test ist ein Test zur Überprüfung der Hypothese, dass die Daten einer Normalverteilung entsprechen, und gibt eine Einschätzung, ob eine parametrische Statistik angewendet werden kann (Harris, Taylor, Taylor, 2007).

Der Mittelwertvergleich mittels T-Test bei gepaarten (unabhängigen) Stichproben wurde unter der Annahme der Normalverteilung durchgeführt. Dieser parametrische Test prüft, ob auftretende Unterschiede zwischen den Mittelwerten durch zufällige Schwankungen entstanden sind und ob sich ein Erwartungswert (Mittelwert) für alle Personen (eine normalverteilte Grundgesamtheit) generalisieren lässt (Guggenmoos-Holzmann, Wernecke, 1996).

Die Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson für metrisch skalierte Daten dient zur Prüfung auf einen (linearen) Zusammenhang zwischen Datenreihen, der Korrelationskoeffizient stellt das Maß für lineare Abhängigkeit dar (Sachs, Hedderich, 2006; Guggenmoos-Holzmann, Wernecke, 1996).

Bei Darstellung der humanen AdV-spezifischen T-Zell-Frequenzen wurde auf zwei Stellen hinter dem Komma gerundet. Die Berechnungen unter Kap. 4.1 erfolgten mit vier Nachkommastellen. Zur Vereinfachung werden verkürzte AdV-Antigenbezeichnungen benutzt: bei der Verwendung von »Hexonprotein« handelt es sich um AdV3 Hexonprotein A-D, »Hexon-PepMix« wird beim Einsatz von AdV3 Hexonprotein PepMix™ gebraucht.

## 4 ERGEBNISSE

Im ersten Teil der Arbeit (Kap. 4.1) wird die Quantifizierung AdV-spezifischer T-Zellen im Vollblut einer gesunden Population von 23 Probanden dargestellt. Neben dem Zytokinnachweis von IFN $\gamma$  wird auch die Koexpression von Oberflächen-Aktivierungsmarkern (CD154, CD69) zur Charakterisierung dieser Zellen untersucht. Weiterhin werden Art des Antigens und Alter der Probanden hinsichtlich der Identifizierung und Quantifizierung AdV-reaktiver T-Zellen analysiert.

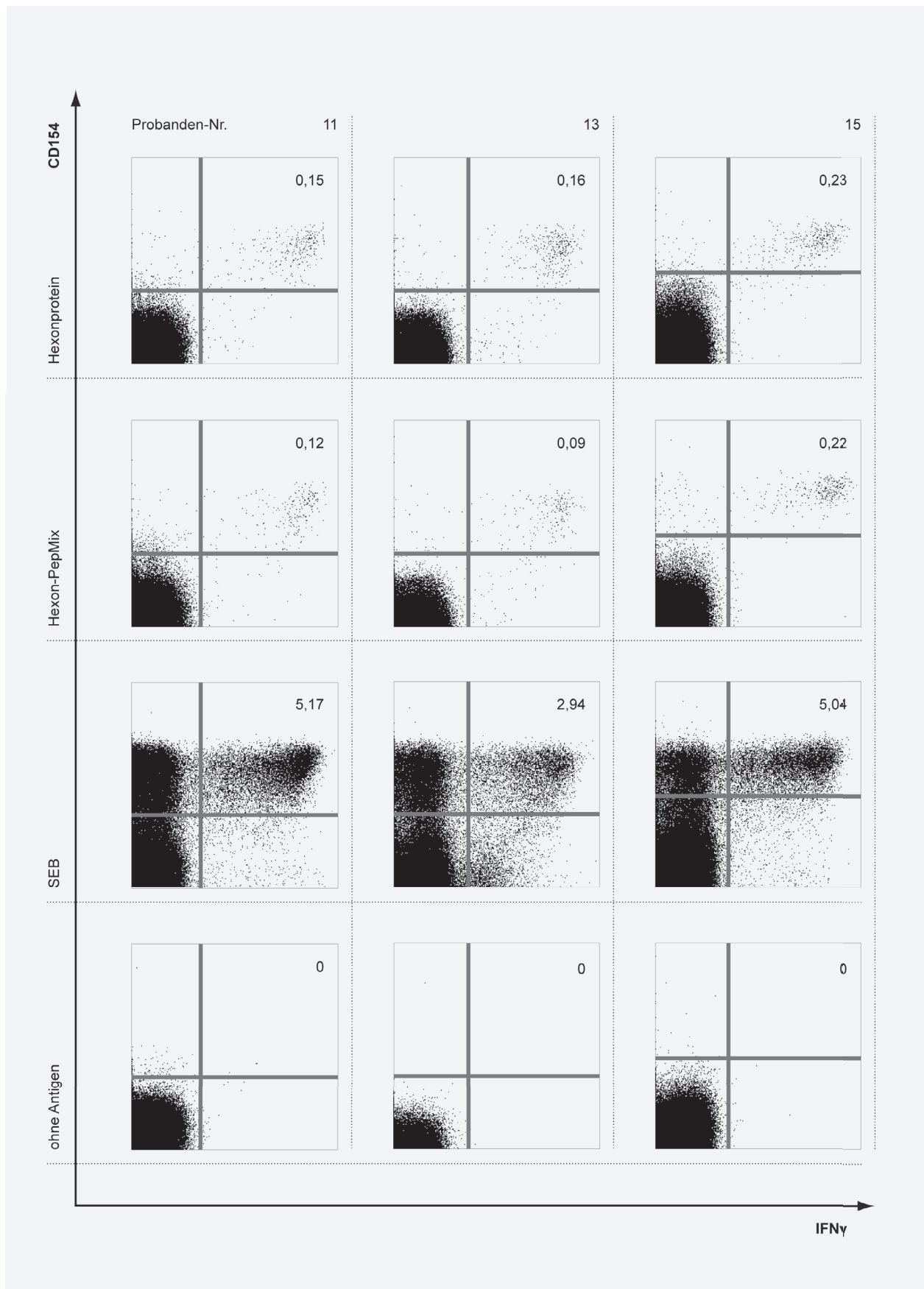
Der zweite Teil (Kap. 4.2 und 4.3) zeigt die Ergebnisse der Optimierung technischer Standards für die Herstellung AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate sowie der Charakterisierung des Endprodukts.

Die Quantifizierung AdV-spezifischer T-Zellen bei gesunden Probanden (potentiellen Spendern) sowie die Optimierung der Herstellung und Charakterisierung der resultierenden Endprodukte erlaubten schlussendlich die Einschätzung, wie realistisch die Gewinnung Virus-spezifischer T-Zellen aus möglichst wenig Ausgangsmaterial für den Routineeinsatz bei HSCT-Patienten sein mag.

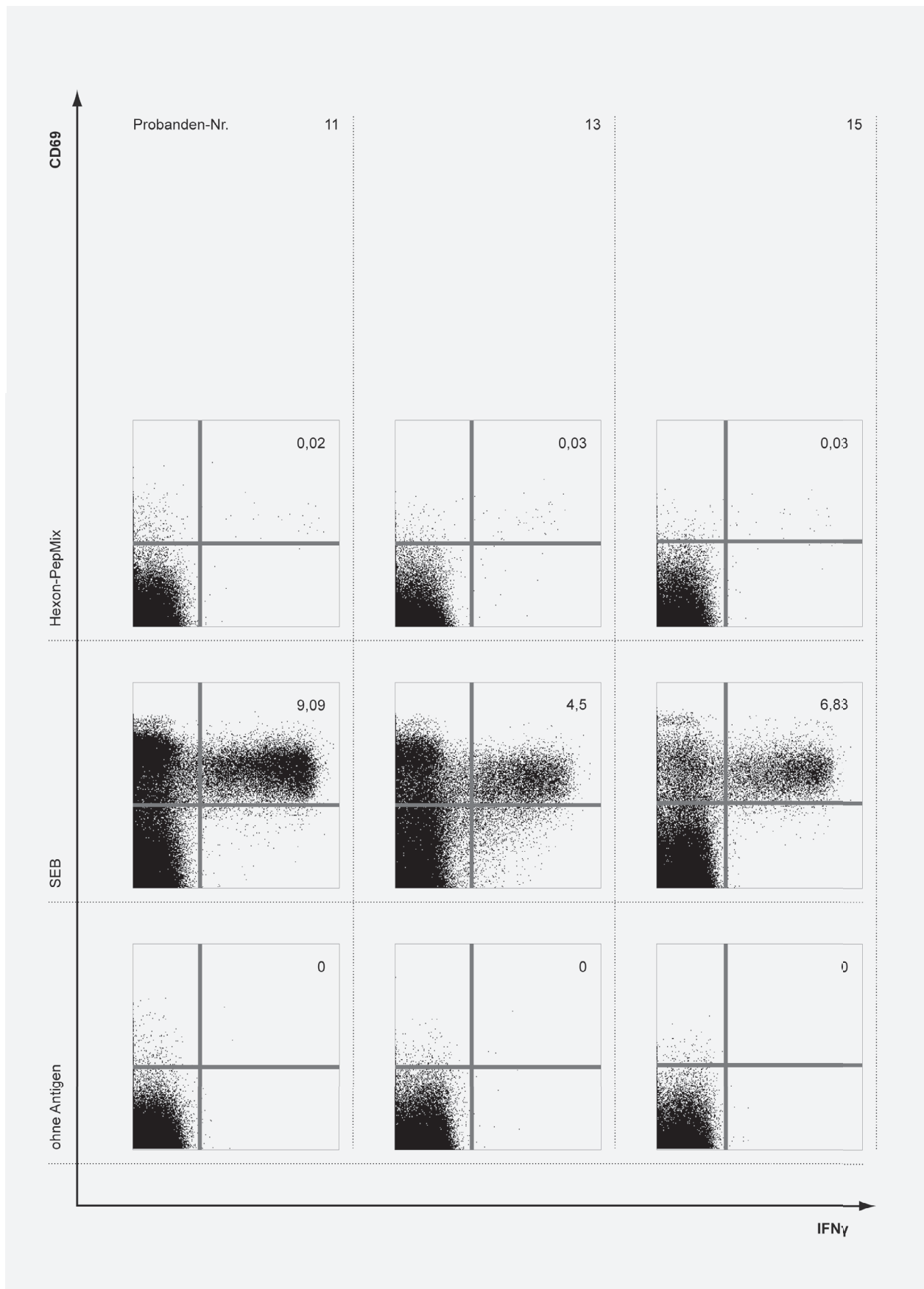
### 4.1 ADV-SPEZIFISCHE T-ZELLEN IM VOLLBLUT GESUNDER PROBANDEN

Vollblutproben von 23 Probanden im mittleren Alter von  $30,8 \pm 9,7$  (Range: 18–52) Jahren wurden von Oktober 2005 bis Juli 2006 untersucht. Von den Spendern waren 15 weiblichen (65%) und 8 (35%) männlichen Geschlechts.

Es erfolgte eine sechsstündige Stimulation mit Hexonprotein des Adenovirus Typ 3 (AdV3), einer Peptidmischung dieses Hexonproteins (PepMix), einer Positivkontrolle (SEB) und einer Negativkontrolle. Die letzten vier Stunden war Brefeldin A hinzugefügt, so dass eine intrazelluläre Färbung von fixierten Zellen durchgeführt wurde. Die folgenden Abbildungen zeigen beispielhaft die durchflusszytometrischen Analysen (siehe Methoden) bei je drei Probanden, die AdV-spezifische T-Zell-Frequenzen oberhalb der Nachweisgrenze (Abb. 5) bzw. unterhalb dieser Grenze (Abb. 6) aufweisen.

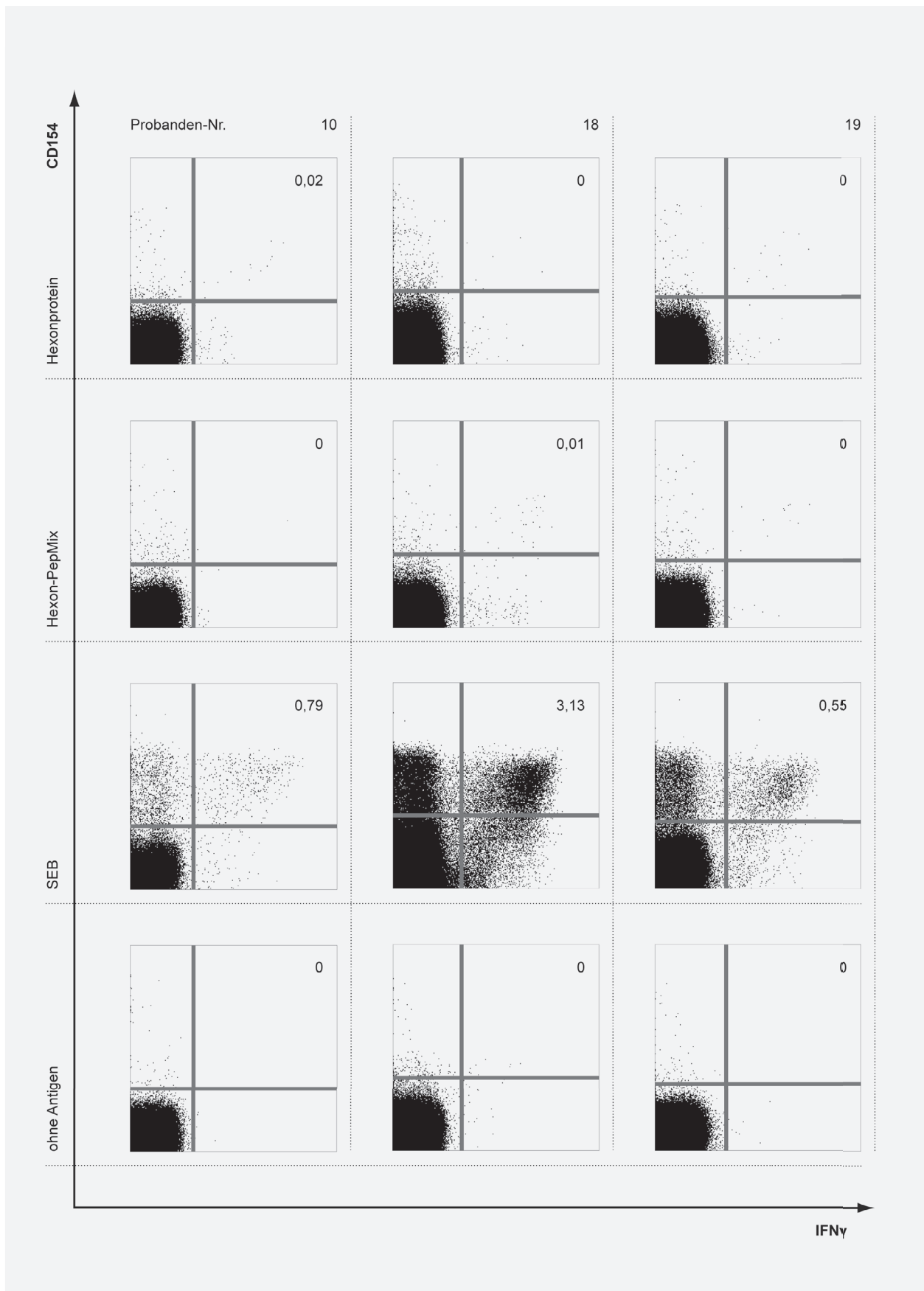


**Abb. 5a:** Dargestellt sind drei repräsentative FACS-Analysen (Proband 11, 13 und 15) mit Angabe der Frequenzen (%) der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix, AdV3-Hexonprotein, SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen-Zusatz als Negativkontrolle.

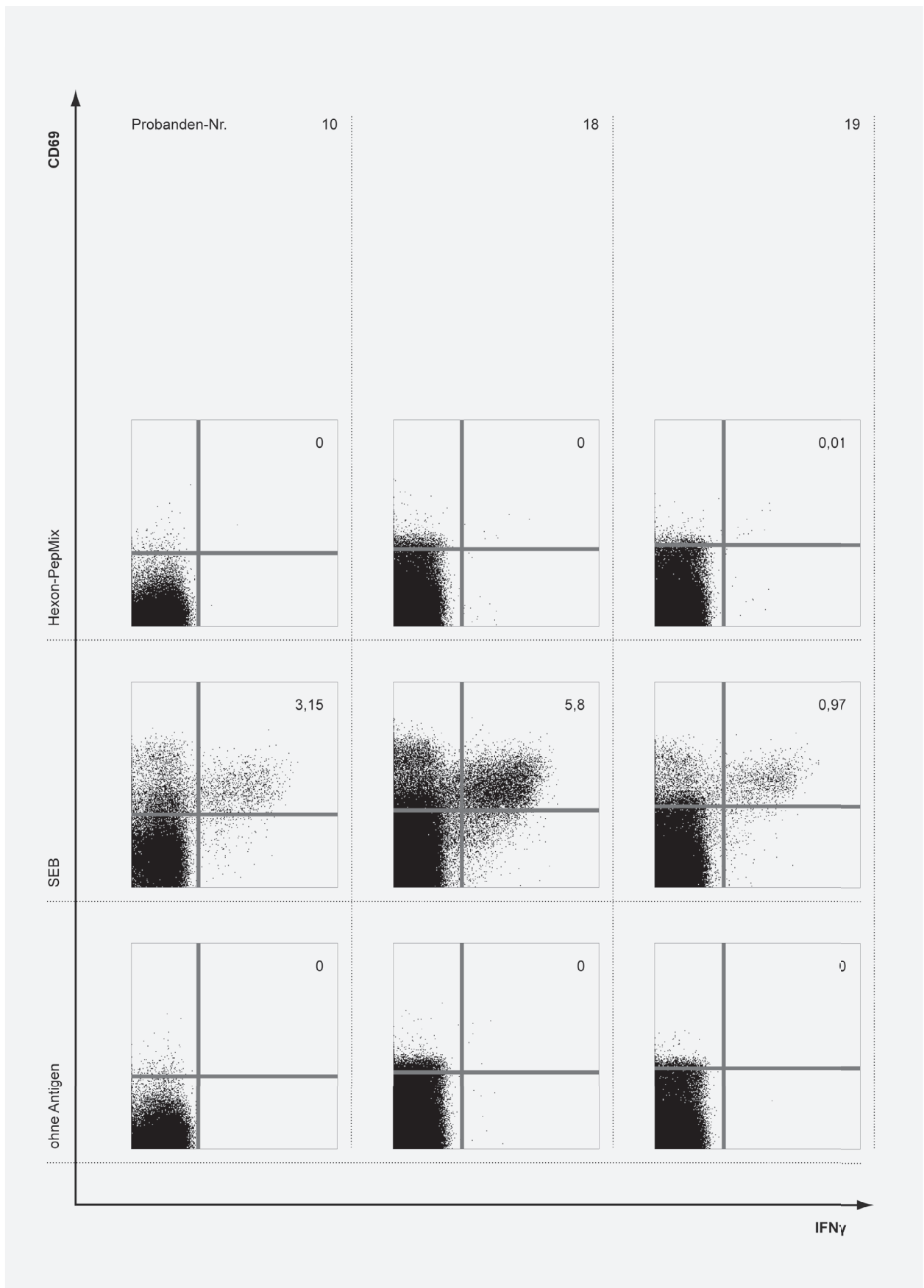


**Abb. 5b:** Dargestellt sind drei repräsentative FACS-Analysen (Proband 11, 13 und 15) mit Angabe der Frequenzen (%) der AdV-spezifischen  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  T-Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix, AdV3-Hexonprotein, SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen-Zusatz als Negativkontrolle.





**Abb. 6a:** Dargestellt sind drei repräsentative FACS-Analysen (Proband 10, 18 und 19) mit Angabe der Frequenzen (%) der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix, AdV3-Hexonprotein, SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen-Zusatz als Negativkontrolle.



**Abb. 6b:** Dargestellt sind drei repräsentative FACS-Analysen (Proband 10, 18 und 19) mit Angabe der Frequenzen (%) der AdV-spezifischen  $CD8^+CD69^+IFN\gamma^+$  T-Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix, AdV3-Hexonprotein, SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen-Zusatz als Negativkontrolle.

#### 4.1.1 ADV-SPEZIFISCHE CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> UND CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-ZELLEN

Im Vorausblick auf die Methode des IFN $\gamma$ -Sekretions-Assays werden in diesem Abschnitt die AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (Tab. 7) sowie CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> (Tab. 8) T-Zellen betrachtet. Parallel zu den Ergebnissen der AdV-spezifischen T-Zellen werden die Negativ- (ohne Antigen) und Positivkontrollen (mit SEB stimuliert) gezeigt. Die Kontrolle ohne Antigen gibt Auskunft über spontan, unspezifisch IFN $\gamma$ <sup>+</sup> produzierende Zellen. Es fand sich eine so genannte Hintergrundaktivität in den Negativkontrollen, deshalb wurden die Daten durch Abzug der Negativkontrolle von den AdV-spezifischen T-Zell-Frequenzen korrigiert.

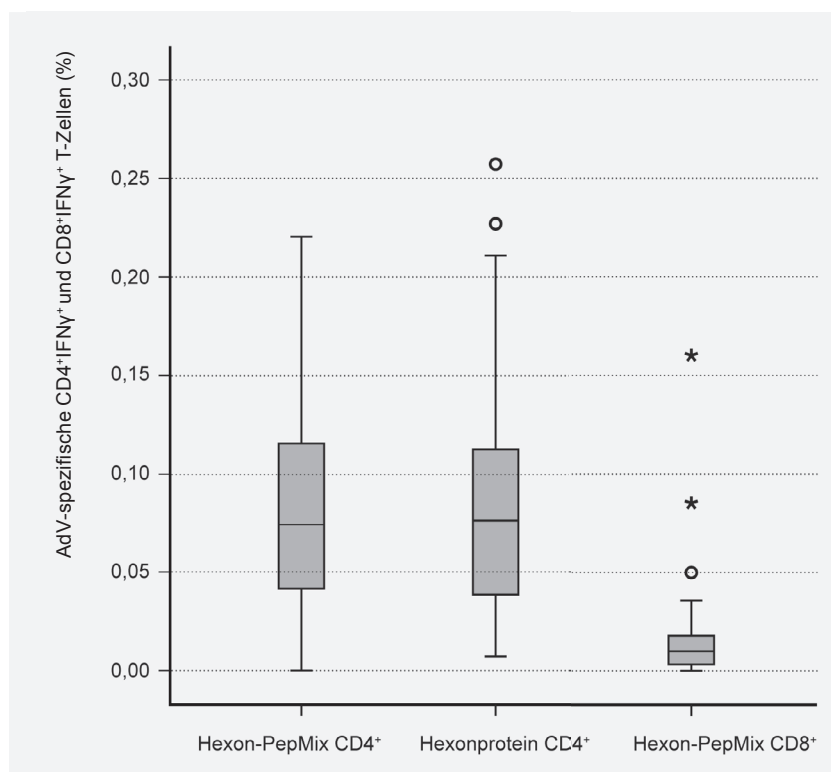
| Nr.           | ohne Antigen  | Hexon-PepMix unkor. | Hexon-PepMix korr. | Hexonprotein unkor. | Hexonprotein korr. | SEB              |
|---------------|---------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| 1             | 0,02          | 0,05                | 0,03               | 0,04                | 0,03               | 1,33             |
| 2             | 0,03          | 0,14                | 0,11               | 0,26                | 0,23               | 2,44             |
| 3             | 0,02          | 0,07                | 0,05               | 0,07                | 0,06               | 3,24             |
| 4             | 0,02          | 0,07                | 0,06               | 0,06                | 0,04               | 1,51             |
| 5             | 0,02          | 0,09                | 0,07               | 0,05                | 0,03               | 0,08             |
| 6             | 0,01          | 0,07                | 0,05               | 0,06                | 0,05               | 2,83             |
| 7             | 0,18          | 0,16                | 0                  | 0,23                | 0,06               | 1,02             |
| 8             | 0,01          | 0,09                | 0,07               | 0,05                | 0,04               | 0,56             |
| 9             | 0             | 0,08                | 0,08               | 0,08                | 0,08               | 1,18             |
| 10            | 0,01          | 0,03                | 0,02               | 0,09                | 0,09               | 1,02             |
| 11            | 0,02          | 0,15                | 0,12               | 0,19                | 0,16               | 5,57             |
| 12            | 0,01          | 0,16                | 0,15               | 0,12                | 0,11               | 0,79             |
| 13            | 0,01          | 0,14                | 0,13               | 0,22                | 0,21               | 5,16             |
| 14            | 0             | 0,21                | 0,21               | 0,15                | 0,14               | 6,42             |
| 15            | 0,02          | 0,24                | 0,22               | 0,28                | 0,26               | 5,78             |
| 16            | 0,01          | 0,09                | 0,08               | 0,10                | 0,09               | 2,13             |
| 17            | 0,01          | 0,02                | 0,01               | 0,05                | 0,04               | 4,03             |
| 18            | 0,01          | 0,07                | 0,06               | 0,02                | 0,01               | 5,23             |
| 19            | 0             | 0,01                | 0                  | 0,02                | 0,01               | 0,76             |
| 20            | 0             | 0,09                | 0,08               | 0,09                | 0,08               | 5,50             |
| 21            | 0             | 0,13                | 0,13               | 0,12                | 0,12               | 5,28             |
| 22            | 0,01          | 0,10                | 0,09               | 0,08                | 0,08               | 2,94             |
| 23            | 0,01          | 0,05                | 0,03               | 0,07                | 0,06               | 4,54             |
| <b>Median</b> | <b>0,01</b>   | <b>0,09</b>         | <b>0,07</b>        | <b>0,08</b>         | <b>0,08</b>        | <b>2,83</b>      |
| <b>Range</b>  | <b>0–0,18</b> | <b>0,01–0,24</b>    | <b>0–0,22</b>      | <b>0,02–0,28</b>    | <b>0,01–0,26</b>   | <b>0,08–6,42</b> |

**Tab. 7:** AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von 23 gesunden Probanden (%) nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix), AdV3-Hexonprotein sowie SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen als Negativkontrolle (unkorr. = unkorrigierte Daten, korr. = Abzug der Negativkontrolle).

| Nr.           | ohne Antigen  | Hexon-PepMix unkorrr. | Hexon-PepMix korr. | SEB              |
|---------------|---------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| 1             | 0,02          | 0,02                  | 0                  | 0,98             |
| 2             | 0,01          | 0,02                  | 0,01               | 1,46             |
| 3             | 0,11          | 0,06                  | 0                  | 6,29             |
| 4             | 0,02          | 0,03                  | 0,01               | 2,03             |
| 5             | 0,01          | 0,10                  | 0,09               | 1,93             |
| 6             | 0,01          | 0,01                  | 0                  | 3,92             |
| 7             | 0,06          | 0,04                  | 0                  | 0,32             |
| 8             | 0,01          | 0,02                  | 0,01               | 1,34             |
| 9             | 0             | 0,01                  | 0                  | 0,68             |
| 10            | 0             | 0,01                  | 0,01               | 3,68             |
| 11            | 0,02          | 0,04                  | 0,02               | 9,33             |
| 12            | 0,02          | 0,19                  | 0,16               | 0,79             |
| 13            | 0,01          | 0,04                  | 0,03               | 5,52             |
| 14            | 0             | 0,01                  | 0,01               | 5,57             |
| 15            | 0,02          | 0,06                  | 0,04               | 7,18             |
| 16            | 0,01          | 0,02                  | 0                  | 2,86             |
| 17            | 0,02          | 0,01                  | 0                  | 4,62             |
| 18            | 0,01          | 0,02                  | 0,01               | 7,11             |
| 19            | 0             | 0,02                  | 0,02               | 1,14             |
| 20            | 0,03          | 0,05                  | 0,02               | 6,39             |
| 21            | 0,02          | 0,02                  | 0                  | 3,02             |
| 22            | 0,01          | 0,06                  | 0,05               | 3,21             |
| 23            | 0,02          | 0,03                  | 0,01               | 4,56             |
| <b>Median</b> | <b>0,01</b>   | <b>0,02</b>           | <b>0,01</b>        | <b>3,21</b>      |
| <b>Range</b>  | <b>0–0,11</b> | <b>0,01–0,19</b>      | <b>0–0,16</b>      | <b>0,32–9,33</b> |

**Tab. 8:** *AdV-spezifische CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von 23 gesunden Probanden (%) nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix) sowie SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen als Negativkontrolle (unkorr. = unkorrigierte Daten, korr. = Abzug der Negativkontrolle).*

Im Box-Whisker-Plot (Abb. 7) werden die korrigierten Ergebnisse der Frequenzen der AdV-spezifischen  $CD4^+IFN\gamma^+$  und  $CD8^+IFN\gamma^+$  T-Zellen graphisch dargestellt.



**Abb. 7:** AdV-spezifische T-Zellen (%) im peripheren Blut von 23 gesunden Probanden.  $CD4^+$  Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix) oder AdV3-Hexonprotein sowie  $CD8^+$  Zellen nach AdV3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass im Vollblut gesunder Probanden nach sechsständiger Stimulation mit einem AdV3-Antigen AdV-spezifische  $CD4^+IFN\gamma^+$  und  $CD8^+IFN\gamma^+$  T-Zellen nachgewiesen werden können. AdV-reaktive  $CD8^+IFN\gamma^+$  T-Zellen finden sich in geringerer Zahl als  $CD4^+IFN\gamma^+$  T-Zellen. Die Frequenzen liegen allerdings im Schnitt zwischen 1 : 10.000 bis 1 : 1.000.

#### 4.1.2 KOEXPRESSION VON AKTIVIERUNGSANTIGENEN AUF ADV-SPEZIFISCHEN T-ZELLEN

Dieser Abschnitt widmet sich der Fragestellung, wie sich der Nachweis von Aktivierungsantigenen (CD69 auf  $CD8^+$  und CD154 auf  $CD4^+$  T-Zellen) neben  $IFN\gamma^+$  auf die Quantität (und Qualität) der Population der AdV-spezifischen T-Zellen auswirkt.

In den folgenden zwei Tabellen werden die Ergebnisse der AdV-reaktiven  $CD154^+IFN\gamma^+$  von  $CD4^+$  sowie  $CD69^+IFN\gamma^+$  von  $CD8^+$  T-Zellen gemeinsam mit der Negativ- (ohne Antigen) und Positivkontrolle (SEB) gezeigt.

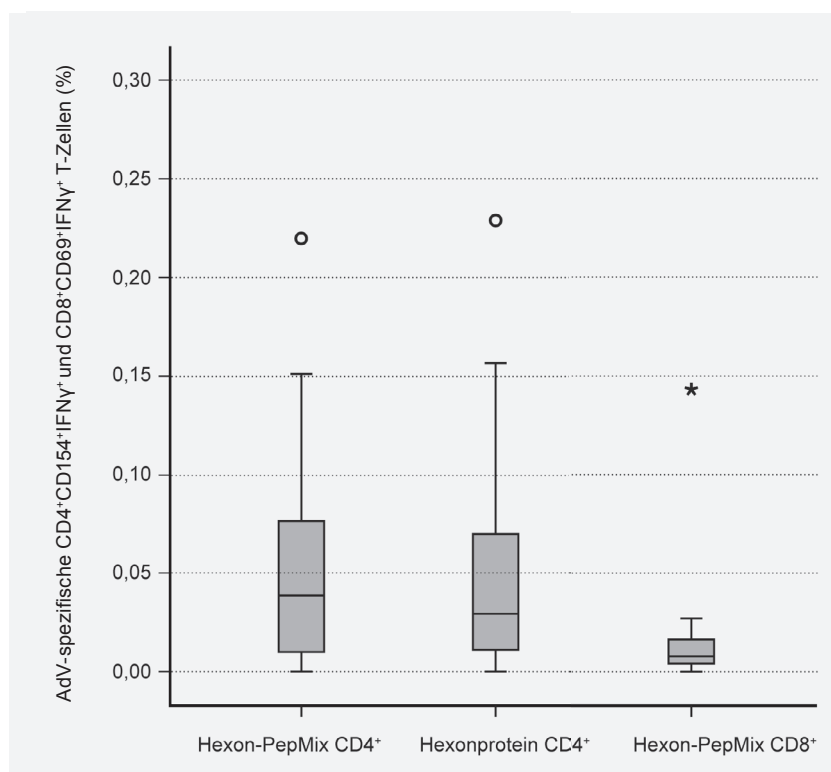
| Nr.           | ohne Antigen  | Hexon-Pep-Mix unkorrr. | Hexon-PepMix korrr. | Hexonprotein unkorrr. | Hexonprotein korrr. | SEB              |
|---------------|---------------|------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------|------------------|
| 1             | 0             | 0,02                   | 0,02                | 0,01                  | 0,01                | 0,94             |
| 2             | 0             | 0,02                   | 0,02                | 0,01                  | 0,01                | 2,10             |
| 3             | 0             | 0,03                   | 0,03                | 0,03                  | 0,03                | 2,51             |
| 4             | 0             | 0,04                   | 0,04                | 0,04                  | 0,04                | 1,22             |
| 5             | 0             | 0,01                   | 0,01                | 0                     | 0                   | 0,05             |
| 6             | 0             | 0,01                   | 0,01                | 0,01                  | 0,01                | 1,56             |
| 7             | 0,06          | 0,06                   | 0                   | 0,09                  | 0,03                | 0,63             |
| 8             | 0             | 0,04                   | 0,04                | 0,03                  | 0,03                | 0,35             |
| 9             | 0             | 0,05                   | 0,05                | 0,06                  | 0,06                | 1,03             |
| 10            | 0             | 0                      | 0                   | 0,02                  | 0,02                | 0,79             |
| 11            | 0             | 0,12                   | 0,12                | 0,15                  | 0,15                | 5,17             |
| 12            | 0             | 0,12                   | 0,11                | 0,09                  | 0,09                | 0,64             |
| 13            | 0             | 0,09                   | 0,09                | 0,16                  | 0,16                | 2,94             |
| 14            | 0             | 0,15                   | 0,15                | 0,13                  | 0,13                | 5,20             |
| 15            | 0             | 0,22                   | 0,22                | 0,23                  | 0,23                | 5,04             |
| 16            | 0             | 0,07                   | 0,07                | 0,07                  | 0,07                | 2,00             |
| 17            | 0             | 0,01                   | 0,01                | 0,01                  | 0,01                | 3,08             |
| 18            | 0             | 0,01                   | 0,01                | 0                     | 0                   | 3,13             |
| 19            | 0             | 0                      | 0                   | 0                     | 0                   | 0,55             |
| 20            | 0             | 0,07                   | 0,07                | 0,06                  | 0,06                | 4,27             |
| 21            | 0             | 0,08                   | 0,08                | 0,07                  | 0,07                | 3,58             |
| 22            | 0             | 0,08                   | 0,08                | 0,06                  | 0,06                | 2,34             |
| 23            | 0             | 0,04                   | 0,04                | 0,03                  | 0,03                | 3,39             |
| <b>Median</b> | <b>0</b>      | <b>0,04</b>            | <b>0,04</b>         | <b>0,04</b>           | <b>0,03</b>         | <b>2,10</b>      |
| <b>Range</b>  | <b>0–0,06</b> | <b>0–0,22</b>          | <b>0–0,22</b>       | <b>0–0,23</b>         | <b>0–0,23</b>       | <b>0,05–5,20</b> |

**Tab. 9:** *AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von 23 gesunden Probanden (%) nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix), AdV3-Hexonprotein sowie SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen als Negativkontrolle (unkorr. = unkorrigierte Daten, korrr. = Abzug der Negativkontrolle).*

| Nr.           | ohne Antigen  | Hexon-PepMix unkorr. | Hexon-PepMix korr. | SEB              |
|---------------|---------------|----------------------|--------------------|------------------|
| 9             | 0             | 0                    | 0                  | 0,65             |
| 10            | 0             | 0                    | 0                  | 3,15             |
| 11            | 0             | 0,02                 | 0,02               | 9,09             |
| 12            | 0,02          | 0,16                 | 0,14               | 0,68             |
| 13            | 0             | 0,03                 | 0,02               | 4,50             |
| 14            | 0             | 0,01                 | 0,01               | 5,11             |
| 15            | 0             | 0,03                 | 0,03               | 6,83             |
| 16            | 0             | 0,01                 | 0                  | 2,54             |
| 17            | 0             | 0,01                 | 0                  | 3,90             |
| 18            | 0             | 0                    | 0                  | 5,80             |
| 19            | 0             | 0,01                 | 0,01               | 0,97             |
| 20            | 0,02          | 0,03                 | 0,01               | 6,07             |
| 21            | 0             | 0,01                 | 0,01               | 2,41             |
| 22            | 0,01          | 0,02                 | 0,01               | 2,72             |
| 23            | 0             | 0,01                 | 0,01               | 3,81             |
| <b>Median</b> | <b>0</b>      | <b>0,01</b>          | <b>0,01</b>        | <b>3,81</b>      |
| <b>Range</b>  | <b>0–0,02</b> | <b>0–0,16</b>        | <b>0–0,14</b>      | <b>0,65–9,09</b> |

*Tab. 10: AdV-spezifische CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut von 15 gesunden Probanden (%) nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix) sowie SEB als Positivkontrolle und ohne Antigen als Negativkontrolle (unkorr. = unkorrigierte Daten, korr. = Abzug der Negativkontrolle).*

Bei Charakterisierung AdV-spezifischer CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zellen mittels Koexpression zweier Aktivierungsmarker ergaben sich etwas niedrigere Werte als bei alleinigem Nachweis der IFN $\gamma$ -Expression. Dabei ergab sich ebenfalls kein Unterschied zwischen den spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptiden oder dem AdV3-Hexonprotein sowie wiederum etwas niedrigere Frequenzen von spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen gegenüber den CD4<sup>+</sup> Zellen. Auch dies ist in Abb. 8 graphisch dargestellt. Verglichen mit den Daten der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen fand sich in den Negativkontrollen mit Einsatz der Aktivierungsmarker keine oder selten Hintergrundaktivität durch unspezifisch aktivierte Zellen. Um die Resultate gleichartig wie unter 4.1.1 zu behandeln, wurden korrigierte Datensätze erstellt.



**Abb. 8:** AdV-spezifische T-Zellen (%) im peripheren Blut von 23 bzw. 15 gesunden Probanden. CD4<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit Adv3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix) oder Adv3-Hexonprotein sowie CD8<sup>+</sup> Zellen nach Adv3-Hexon-Peptid-Mischung (PepMix).

#### 4.1.3 STATISTISCHER VERGLEICH DER STIMULATION MIT ADV3-HEXON-PEPMIX VERSUS ADV3-HEXONPROTEIN

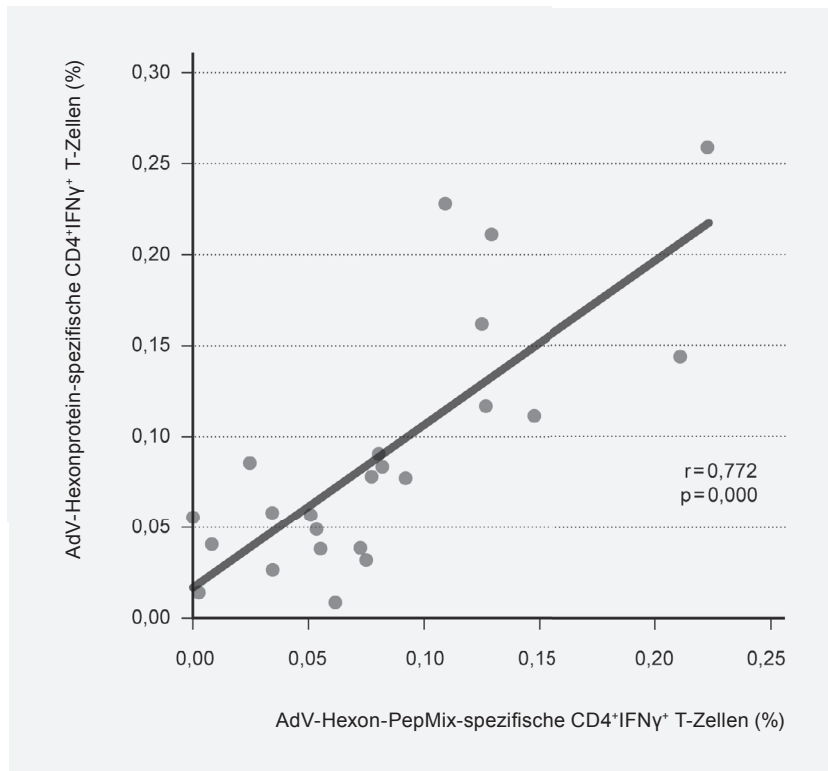
##### a) AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen

Nach deskriptiver Darstellung der Werte wurden die beiden für die Stimulation verwandten Antigene (Adv3-Hexon-PepMix, Adv3-Hexonprotein) miteinander statistisch verglichen, und zwar zunächst hinsichtlich der IFN $\gamma$ -Expression. Nach Prüfung auf Normalverteilung wurden die Mittelwerte der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen mittels T-Test verglichen und gezeigt, dass sich bei Stimulation mit der gewählten Hexon-Peptid-Mischung gegenüber der Verwendung von Hexonprotein kein Unterschied ergab (Tab. 11). Bestätigt wurde dies durch eine hoch signifikante Korrelation zwischen den Hexon-PepMix- und Hexonprotein-spezifischen CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 9).

|                          |          |
|--------------------------|----------|
|                          | n = 23   |
| Mittelwert               | -0,00841 |
| T                        | -0,915   |
| Signifikanz p (2-seitig) | 0,370    |

**Tab. 11:** Vergleich AdV-spezifischer CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut nach Stimulation mit Adv3-Hexon-Peptiden versus Hexonprotein mittels T-Test.





**Abb. 9:** Korrelation der Hexon-PepMix- und Hexonprotein-spezifischen CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen. Prozentuale Angabe der AdV-spezifischen T-Zellfrequenzen von 23 Probanden. [*r* = Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson, *p* = Signifikanz (2-seitig)]

Darüber hinaus wurde ebenfalls mittels T-Test verglichen, ob sich die IFN $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptiden unterschieden. Dabei fanden sich signifikant niedrigere CD8<sup>+</sup> Zellen gegenüber den CD4<sup>+</sup> Zellen (Tab. 12). Auch war keine eindeutige Korrelation zwischen diesen zwei T-Zell-Fraktionen gegeben (Korrelationskoeffizient  $r = 0,353$ , Signifikanz  $p$  (2-seitig) = 0,099).

|                            |         |
|----------------------------|---------|
|                            | n = 23  |
| Mittelwert                 | 0,05913 |
| T                          | 4,966   |
| Signifikanz $p$ (2-seitig) | 0,009   |

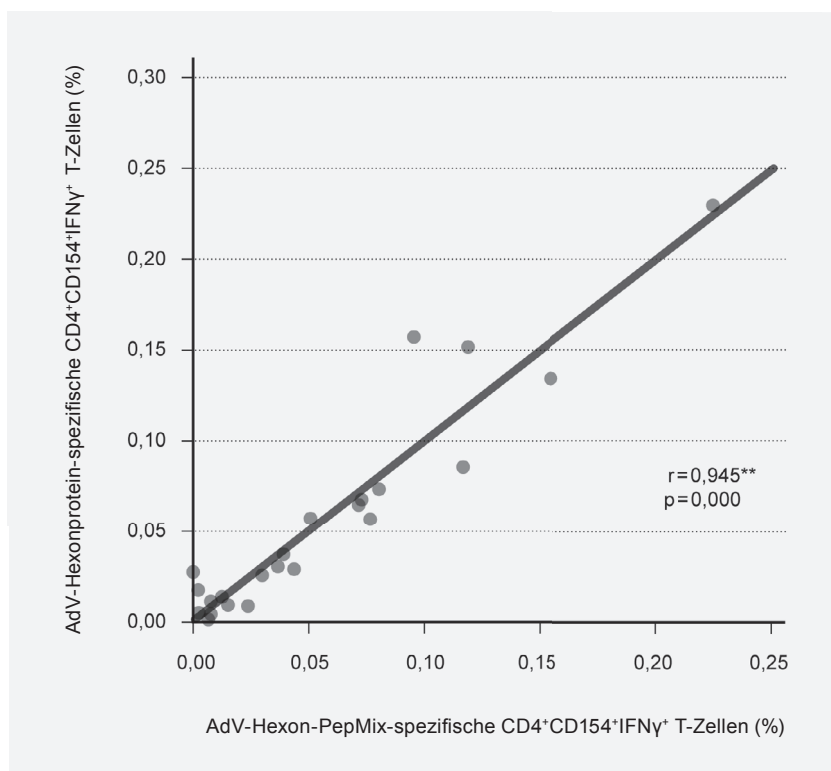
**Tab. 12:** Vergleich AdV3-Hexon-PepMix-spezifischer CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut mittels T-Test.

#### b) AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen

Dieselben Mittelwertvergleiche und Korrelationen wurden auch für die Koexpression zweier Aktivierungsmarker durchgeführt. Dabei ergab sich ein identisches Bild, mit vergleichbarer Stimulierbarkeit von CD4<sup>+</sup> Zellen durch Hexon-Peptide und Hexonprotein (Tab. 13), eine entsprechend signifikante Korrelation zwischen den beiden Antigenen (Abb. 10) sowie signifikant niedrigere, AdV-spezifische CD8<sup>+</sup> versus CD4<sup>+</sup> Zellen (Tab. 14), die auch bei der Korrelationsanalyse keinen eindeutigen Zusammenhang aufwiesen [Korrelationskoeffizient  $r = 0,348$ , Signifikanz  $p$  (2-seitig) = 0,204].

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
|                          | n = 23    |
| Mittelwert               | -0,000233 |
| T                        | -0,057    |
| Signifikanz p (2-seitig) | 0,955     |

**Tab. 13:** Vergleich AdV-spezifischer CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptiden versus Hexonprotein mittels T-Test.



**Abb. 10:** Korrelation der Hexon-PepMix- und Hexonprotein-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen.

Prozentuale Angabe der AdV-spezifischen T-Zellfrequenzen von 23 Probanden.

[\*\*Korrelation ist auf Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant]

|                          |          |
|--------------------------|----------|
|                          | n = 15   |
| Mittelwert               | 0,054376 |
| T                        | 3,565    |
| Signifikanz p (2-seitig) | 0,003    |

**Tab. 14:** Vergleich AdV3-Hexon-PepMix-spezifischer CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im peripheren Blut mittels T-Test.

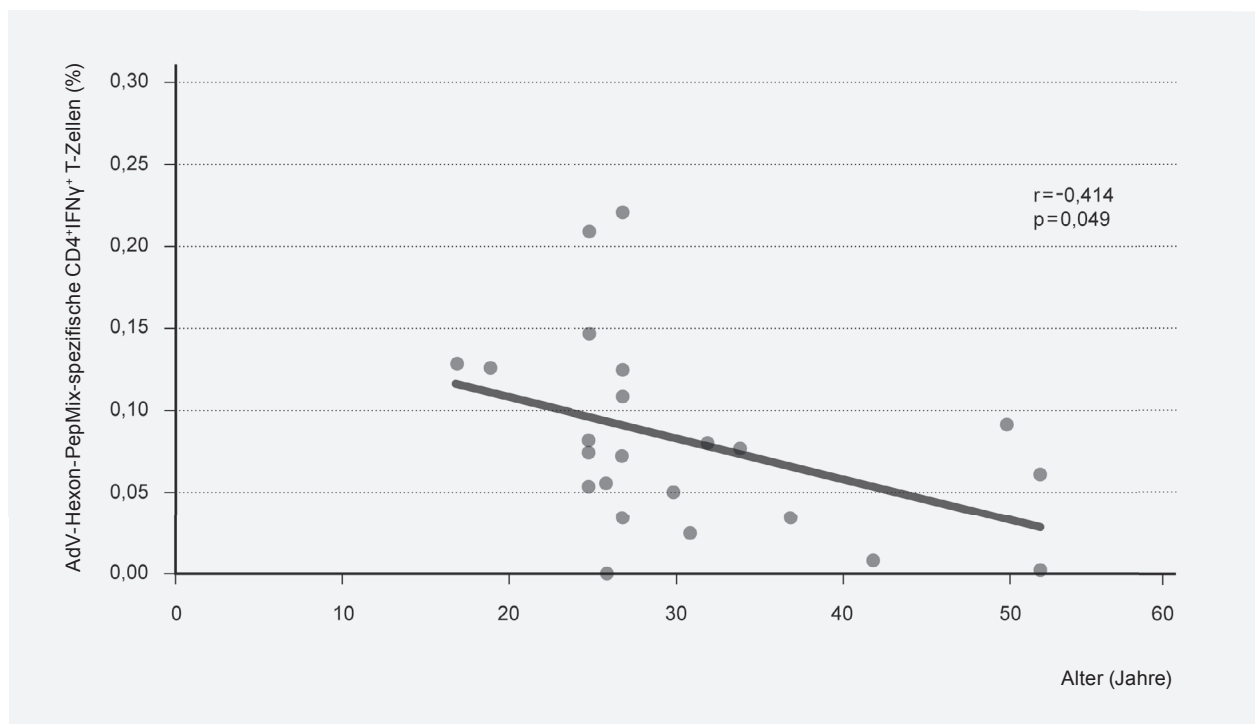
Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das AdV3-Hexonprotein wie auch die AdV3-Hexon-Peptid-Mischung in gleicher Weise geeignet sind, spezifische CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen zu stimulieren. Dabei lassen sich bei gesunden Probanden im Mittel deutlich mehr spezifische CD4<sup>+</sup> als CD8<sup>+</sup> Zellen nachweisen. Individuell korrelieren die beiden Zellfraktionen aber nicht gut miteinander, sodass im Einzelfall durchaus mal die eine oder andere Population dominieren kann.

#### 4.1.4 ADV-SPEZIFISCHE T-ZELLANTWORT IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER

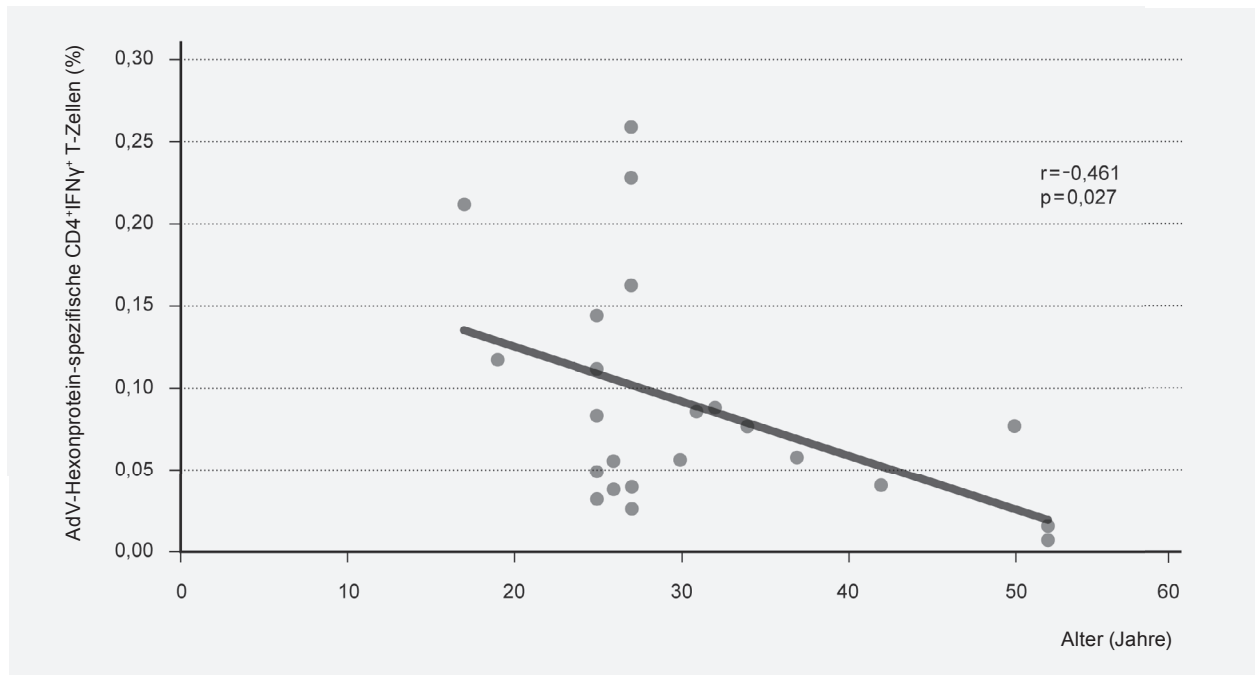
Die Altersspanne der getesteten Personen lag zwischen 18 und 52 Jahren. In dieser Altersspanne wurde geprüft, ob das Alter einen Einfluss auf die Höhe der humanen AdV-spezifischen T-Zellen hat. Es wurde die Korrelationsanalyse nach Bravais-Pearson durchgeführt.

##### a) AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen

Die folgenden Abbildungen 11 und 12 zeigen in der Tat auf niedrigem Signifikanzniveau, dass die AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen mit zunehmendem Alter eine abnehmende Tendenz haben. Dies war unabhängig davon, ob mit AdV3-Hexon-Peptiden (Abb. 11) oder AdV3-Hexonprotein (Abb. 12) stimuliert wurde. Bei den AdV-spezifischen CD8<sup>+</sup> Zellen (ohne Abbildung) bestand keine Altersabhängigkeit ( $r = -0,091$ , Signifikanz  $p$  (2-seitig) = 0,680).



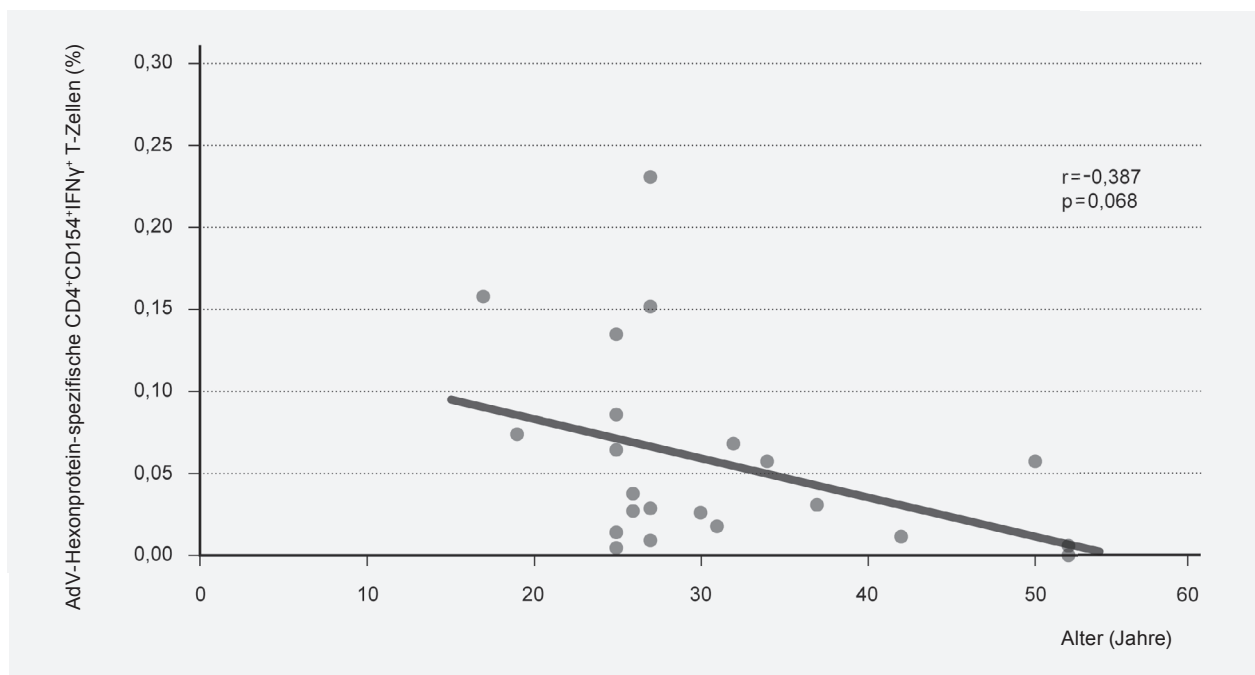
**Abb. 11:** Korrelation von Alter der Probanden in Jahren ( $n = 23$ ) und Prozent der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut nach Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix. [ $r$  = Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson,  $p$  = Signifikanz (2-seitig)]



**Abb. 12:** Korrelation von Alter der Probanden in Jahren ( $n = 23$ ) und Prozent der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut nach Stimulation mit AdV3-Hexonprotein

b) AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen

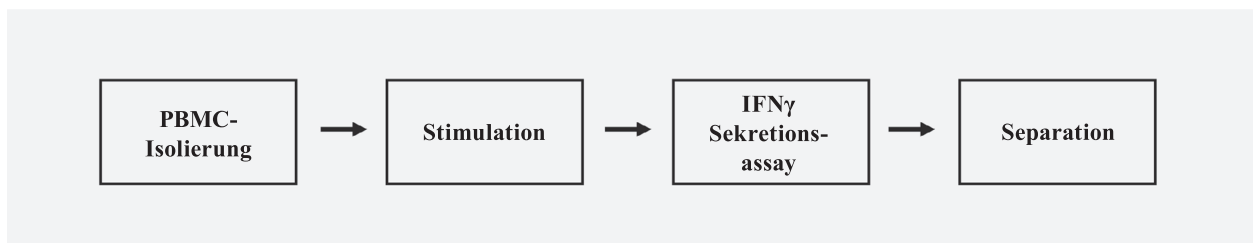
Macht man die gleiche Analyse mit T-Zellen, die zwei Aktivierungsmarker koexprimieren, ergibt sich dieser Alterstrend lediglich noch für CD4<sup>+</sup> Zellen nach Stimulation mit AdV3-Hexonprotein (Abb. 13).



**Abb. 13:** Korrelation von Alter der Probanden in Jahren ( $n = 23$ ) und Prozent der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen im peripheren Blut nach Stimulation mit AdV3-Hexonprotein

## 4.2 STANDARDISIERUNG DES HERSTELLUNGSPROZESSES ZUR GENERIERUNG HUMANER ADV-SPEZIFISCHER T-ZELL-TRANSPLANTATE

Aus Vollblut von sechs verschiedenen Probanden (weiblich:  $n = 3$  und männlich:  $n = 3$ , Altersrange: 25–42 Jahre) wurde im Zeitraum Juni 2006 bis Mai 2007 eine Standardisierung des Herstellungsprozesses zur Generierung eines humanen AdV-spezifischen T-Zell-Produkts mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay (Abb. 14) durchgeführt. Ein Proband spendete zweimal Blut, so dass insgesamt sieben Versuche dargestellt werden.



*Abb. 14: Herstellungsprozess zur Generierung AdV-spezifischer T-Zell-Produkte.*

Der Herstellungsprozess sollte folgende Voraussetzungen berücksichtigen:

- Der Prozess musste im Rahmen einer allogenen Stammzelltransplantation realisierbar und der zusätzliche Blutbedarf für den Spender zumutbar sein.
- Die Herstellung musste hinsichtlich der Methodik und eingesetzten Reagenzien GMP-konform und AMG-gerecht sein.

Wie unter »Material und Methoden« ausführlich dargestellt, bestand der Herstellungsprozess aus den in Abb. 14 dargestellten vier Schritten, die im Folgenden im Rahmen von sieben Validierungsläufen analysiert und versuchsweise optimiert wurden.

### 4.2.1 ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN DES PERIPHEREN BLUTES

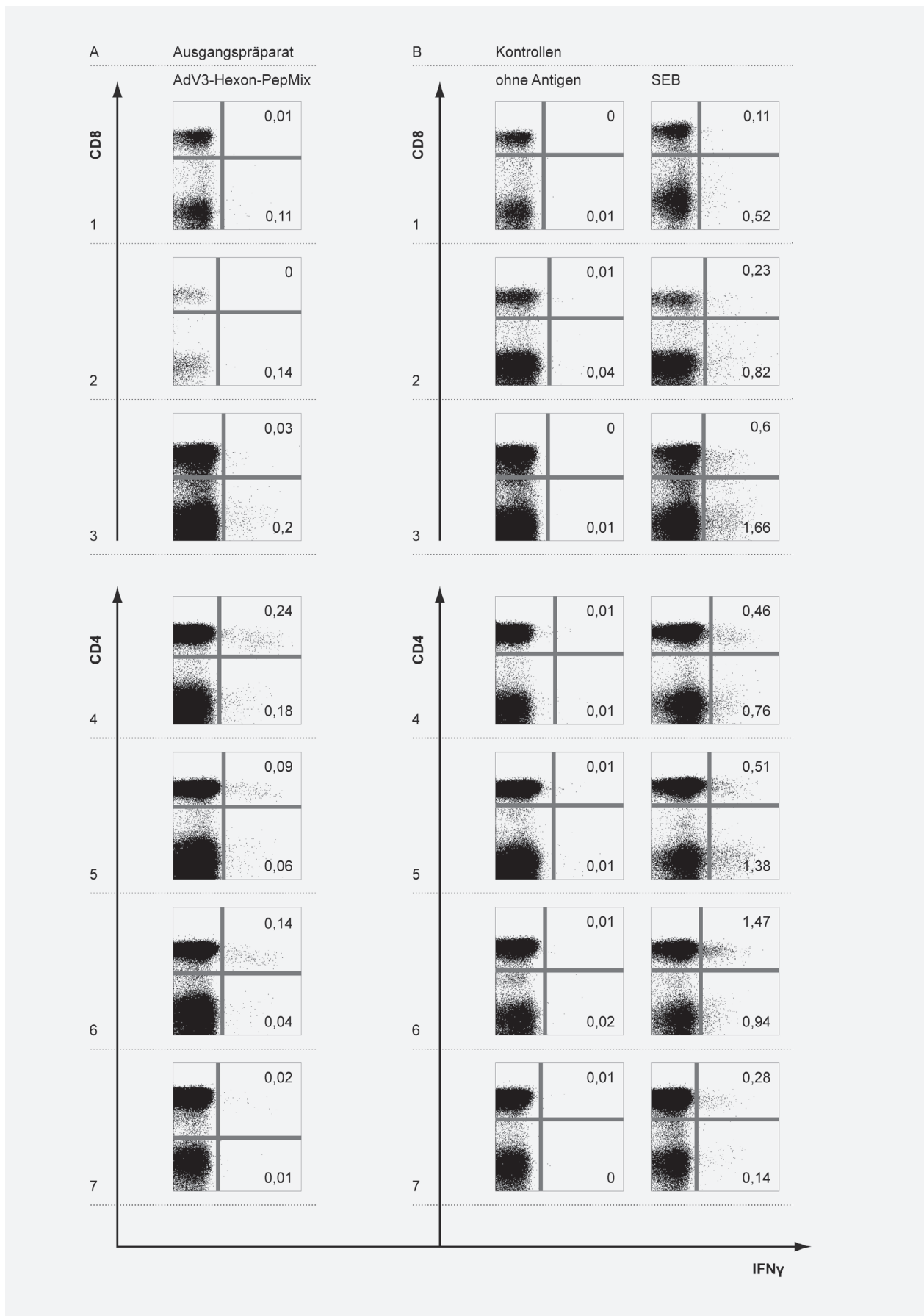
Als Ausgangsmaterial diente Vollblut mit einem medianen Volumen von 109 ml (Range: 96–120 ml,  $n = 7$ ). Im Vollblut belief sich die Zahl der Leukozyten im Median auf 6.090/ $\mu$ l (95%-KI: 4.055/ $\mu$ l–10.179/ $\mu$ l). Nach Dichtegradienten-Zentrifugation mittels Ficoll ergab sich eine absolute mediane PBMC-Zahl von  $98 \times 10^6$  (95%-KI:  $68$ – $182 \times 10^6$ ) und somit eine Recovery der mononukleären Zellen im Vergleich zu den initialen Leukozyten von 16,6% (95%-KI: 10,5–25,5%).

#### 4.2.2 STIMULATION MIT ADV3-HEXON-PEPMIX

Ein wesentlicher und zeitintensiver Herstellungsschritt war die Generierung aktivierter, IFN $\gamma$  produzierender T-Zellen durch Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix, nachdem zuvor gezeigt werden konnte, dass dieses Stimulans äquivalent zum Hexonprotein war. Beantwortet werden sollte, wie hoch der unspezifische Zellverlust in dieser Herstellungsphase als auch die Spezifität der gewonnenen T-Zellen waren.

Von den  $98 \times 10^6$  PBMC (siehe oben) gingen nach Abzug der Zwischenkontrollen  $90 \times 10^6$  (95%-KI:  $59 - 169 \times 10^6$ ,  $n = 7$ ) in die Stimulationsphase. Danach wurden im Median  $77 \times 10^6$  PBMC (95%-KI:  $57 - 153 \times 10^6$ ) rückgewonnen. Das entsprach einer Recovery von 96% (95%-KI: 85–99%).

Bei den sieben Validierungsläufen zur Herstellung AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate lag der prozentuale Anteil von Virus-spezifischen CD4 $^+$  und CD8 $^+$  Zellen in der initialen, mononukleären Zellfraktion in dem anhand der Vorversuche getesteten Bereich. In der Abb. 15 sind die durchflusszytometrischen Analysen mit den jeweiligen Positiv- und Negativ-Kontrollen gezeigt. Durch die FACS-Analyse eingeschlossen wurden viable CD3 $^+$ CD4 $^+$ IFN $\gamma^+$  oder CD3 $^+$ CD8 $^+$ IFN $\gamma^+$  Zellen, wobei angenommen werden kann, dass die CD3 $^+$ CD4 $^+$ IFN $\gamma^+$  Zellen den CD8 $^+$  Zellen und die CD3 $^+$ CD8 $^+$ IFN $\gamma^+$  Zellen den CD4 $^+$  Zellen entsprechen. Danach lag der Anteil AdV3-Hexon-PepMix-spezifischer CD4 $^+$  T-Zellen im Median bei 0,14% (Range: 0,02–0,24%) und der CD8 $^+$  T-Zellen bei 0,03% (Range: 0–0,18%). Die Negativ-Kontrolle lag bei den CD4 $^+$  T-Zellen im Median bei 0,01% (Range: 0,01–0,04%) und bei den CD8 $^+$  T-Zellen ebenso bei 0,01% (Range: 0–0,02%), die Positiv-Kontrolle lag bei den CD4 $^+$  T-Zellen bei 0,52% (Range: 0,28–1,66%) und bei den CD8 $^+$  T-Zellen bei 0,6% (Range: 0,11–1,38%).

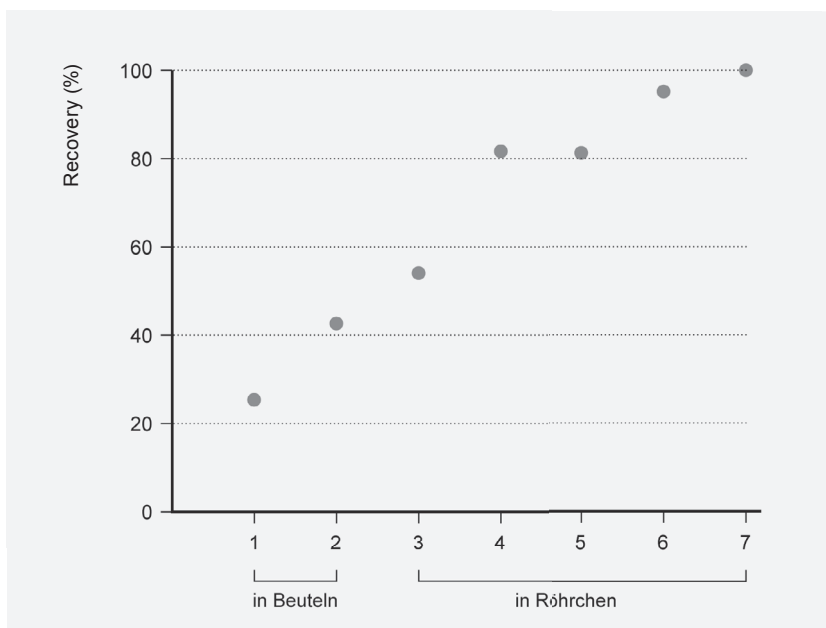


**Abb. 15:** Durchflusszytometrische Analysen der initialen, mononukleären Zellfraktion. Prozentuale Angabe der CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen (A) nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptiden, (B) Negativ-Kontrolle (ohne Antigen-Stimulation) und Positiv-Kontrolle (nach SEB-Stimulation).

### 4.2.3 IMMUNMAGNETISCHE ZELLSEPARATION MITTELS IFN $\gamma$ -SEKRETIONS-ASSAY

#### a) IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay

Nach AdV3-Peptid-Stimulation umfassen die weiteren, unter Kap. 3.5.3 (Material und Methoden) beschriebenen Schritte die Sekretionsphase von IFN $\gamma$ , die Markierung der IFN $\gamma$ -positiven T-Zellen mit den entsprechenden monoklonalen Antikörpern und die Vorbereitung der konsekutiven, immunmagnetischen Sortierung dieser so markierten Zellen, inklusive zahlreicher Waschschrte und Einstellungen auf definierte Zellkonzentrationen. In den sieben Validierungsversuchen wurden zwei in einem geschlossenen 600 ml Plastikbeutel-System und fünf in offenen 50 ml Plastik-Röhrchen durchgeführt und dabei die unspezifischen Zellverluste verglichen. Bei der Verwendung der Beutel betrug die mediane Recovery lediglich 34% (Range: 25–43%), bei den Röhrchen 82% (Range: 54–100%). Damit erwies sich trotz kleiner Fallzahl das Röhrchen-Verfahren als tendenziell überlegen (siehe auch Abb. 16).



**Abb. 16:** Recovery (%) der mit AdV3-Hexon-Peptiden stimulierten PBMC nach IFN $\gamma$ -Sekretion, Antikörper-Markierung, zahlreichen Waschschrten und definierten Zell-Resuspendierungen entweder in 600 ml Plastik-Beuteln ( $n = 2$ , Versuche 1–2) oder 50 ml Plastik-Röhrchen ( $n = 5$ , Versuche 3–7).

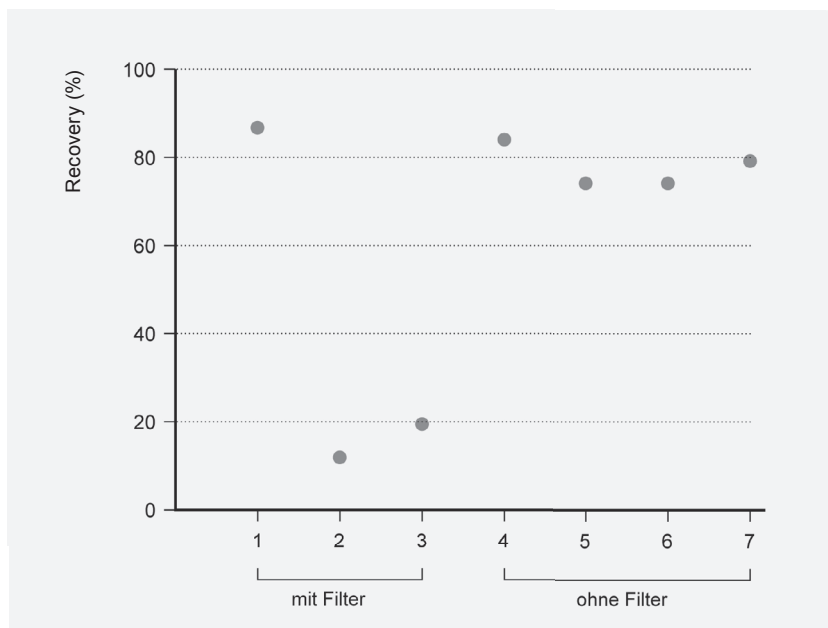
#### b) Immunmagnetische Zellseparation

Als nächster Schritt wurde vor immunmagnetischer Sortierung der markierten Zellen mittels CliniMACS-Säule der Firma Miltenyi geprüft, ob die sonst übliche Entfernung von Zellaggregaten mittels Vorfilter sinnvoll erscheint. Mit Vorfilter ergab sich in drei Versuchen aber lediglich eine mediane Recovery der PBMC von 20% (Range: 12–87%), in vier Versuchen ohne Vorfiltrierung eine Recovery von 77% (Range: 74–84%). Wie auch aus Abb. 17 ersichtlich, sollte also eher auf eine Vorfiltrierung verzichtet werden.



Für alle Versuche zusammen lagen die absoluten Werte der kernhaltigen Zellen vor immunmagnetischer Sortierung im Median bei  $77 \times 10^6$  (Range:  $15\text{--}170 \times 10^6$ ). Nach Sortierung lagen die beiden Fraktionen der positiv und negativ selektierten Zellen zusammen im Median bei  $61 \times 10^6$  (Range:  $4\text{--}126 \times 10^6$ ), mithin lag der unspezifische Zellverlust bei ca.  $16 \times 10^6$  bzw. 21 %.

Die positive Endfraktion aller sieben Versuche lag im Median bei absoluten Werten von  $88 \times 10^3$ , mit einer großen Schwankung zwischen  $2\text{--}640 \times 10^3$  und tendenziell konsistenteren Werten bei Passagierung der Zellen in Röhren statt Beuteln und Weglassen der Vorfiltrierung (s. Abb. 17).



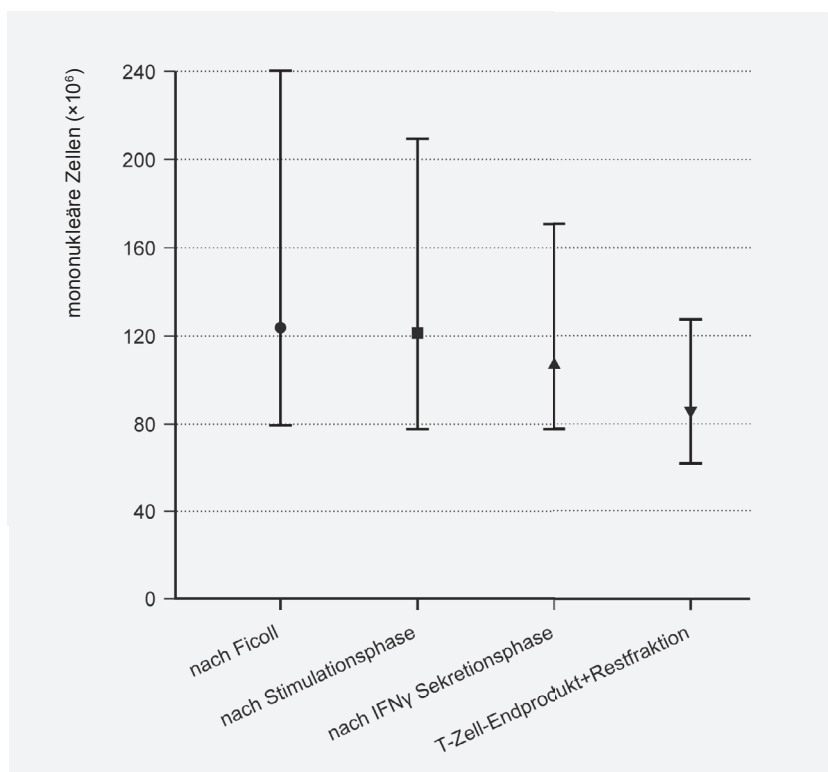
**Abb. 17:** Recovery (%) der mit AdV3-Hexon-Peptiden stimulierten PBMC nach immunmagnetischer Sortierung der  $IFN\gamma$ -positiven Zellen mittels CliniMACS mit Vorfiltrierung ( $n = 3$ , Versuche 1–3) oder ohne Vorfiltrierung ( $n = 4$ , Versuche 4–7).

### 4.3 EVALUIERUNG DES OPTIMIERTEN HUMANEN ADV-SPEZIFISCHEN T-ZELL-TRANSPLANTATS

Unter Weglassen der unbefriedigenden Versuche mit Beutel-Herstellung und Vorfiltrierung blieben vier Validierungsläufe mit optimierter Herstellung, die herangezogen wurden, um die Recovery bzw. den unspezifischen Zellverlust über den gesamten Herstellungsverlauf eines Ausgangs-Blutvolumens von 100 ml abzuschätzen und das resultierende T-Zell-Endprodukt zu charakterisieren.

### 4.3.1 QUANTIFIZIERUNG DES UNSPEZIFISCHEN ZELLVERLUSTS

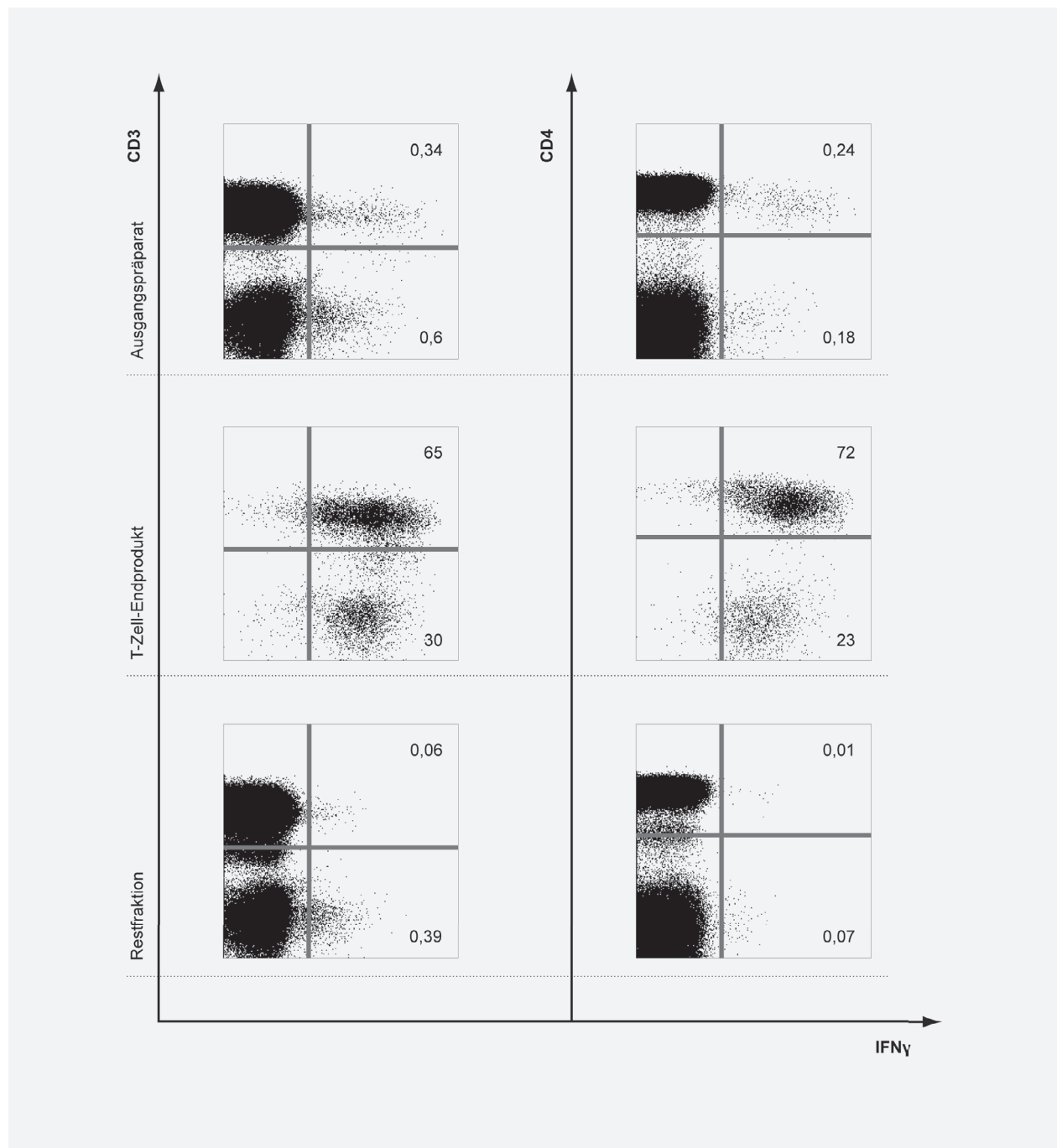
Bei den vier optimalen Zellprozessierungen mit einem medianen Ausgangsvolumen von 110 ml Vollblut (Range: 100–120 ml) lag die initiale Zellzahl bei  $643 \times 10^6$  (Range:  $488 - 790 \times 10^6$ ). Der weitere Verlauf nach Dichtegradient-Zentrifugation, AdV3-Hexon-Peptid-Stimulation,  $\text{IFN}\gamma$ -Sekretion und immunmagnetischer Zellsortierung ist in Abb. 18 dargestellt. Danach zeigt sich, dass nach Anreicherung der mononukleären Zellen mittels Ficoll noch ca. 18% der Zellen vorhanden waren. Der weitere unspezifische Zellverlust betrug ca. 32%, die Recovery mithin im Median 68% (Range: 53–77%). Bei den beiden, nach immunmagnetischer Sortierung resultierenden, Endfraktionen entfielen auf die gewünschte AdV-spezifische T-Zell-Fraktion  $248 \times 10^3$  (Range:  $88 - 640 \times 10^3$ ) Zellen, der große Rest auf die nicht markierten, unspezifischen Zellen.



**Abb. 18:** Absolute Zellzahlen ( $\times 10^6$ ) im Rahmen der Prozessierung von der initialen, mononukleären Zellfraktion nach Dichtegradient-Zentrifugation (Ficoll) bis zu den beiden positiv und negativ selektierten Endfraktionen. Median mit Range angezeigt.

### 4.3.2 CHARAKTERISIERUNG DES T-ZELL-ENDPRODUKTS

Die vier optimierten Validierungsläufe wurden herangezogen, um das Endprodukt weiter zu charakterisieren. Abb. 19 zeigt anhand der beispielhaften FACS-Analyse eines Herstellungslaufs die Anreicherung der AdV-spezifischen  $CD3^+$  bzw.  $CD4^+$  T-Zellen von initial unter 1% auf eine Größenordnung von 60–70%.



**Abb. 19:** FACS-Analyse eines repräsentativen Probanden mit prozentualer Angabe der AdV-spezifischen  $CD3^+IFN\gamma^+$  Zellen (Spalte 1) bzw.  $CD3^+CD4^+IFN\gamma^+$  Zellen (Spalte 2) im Ausgangspräparat (Zeile 1) und im positiv-selektionierten Endprodukt (Zeile 2). Zeile 3 zeigt die Kontrolle des negativen Abfall-Produkts.

In Tab. 15 sind alle vier optimierten Einzelläufe zusammengestellt, mit prozentualer Angabe der Viabilität und Zusammensetzung des Endprodukts. Alle Prozessierungen ergaben eine vergleichbare Anreicherung der T-Zellen wie in dem Einzelbeispiel. Auch zeigte sich im Endprodukt das Überwiegen von CD4<sup>+</sup> gegenüber CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

| Nr.           | viable Lymphozyten | CD3 <sup>+</sup> | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> | CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> |
|---------------|--------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1             | 97                 | 68               | 75                                | 25                                |
| 2             | 98                 | 74               | 60                                | 40                                |
| 3             | 96                 | 67               | 74                                | 26                                |
| 4             | 79                 | 77               | 89                                | 11                                |
| <b>Range</b>  | <b>79–98</b>       | <b>67–77</b>     | <b>60–89</b>                      | <b>11–40</b>                      |
| <b>Median</b> | <b>97</b>          | <b>71</b>        | <b>74</b>                         | <b>26</b>                         |

*Tab. 15: Prozentuale Verteilung der Zellpopulationen im T-Zell-Endprodukt.*

Aus diesen prozentualen Angaben errechnen sich die in Tab. 16 aufgeführten absoluten Zellzahlen der T-Zellen bzw. Subfraktionen. Dabei wird deutlich, dass diese durchaus von Proband zu Proband um etwa den Faktor 10 schwanken können und dass sich aus 100 ml Vollblut mit dieser Methode T-Zellen in der Größenordnung von  $10^4$ – $10^5$  anreichern lassen.

| Nr.           | viable Lymphozyten | CD3 <sup>+</sup> | CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> | CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> |
|---------------|--------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 1             | 177                | 120              | 90                                | 30                                |
| 2             | 445                | 331              | 199                               | 132                               |
| 3             | 56                 | 38               | 28                                | 10                                |
| 4             | 23                 | 18               | 16                                | 1,9                               |
| <b>Range</b>  | <b>23–445</b>      | <b>18–331</b>    | <b>16–199</b>                     | <b>1,9–132</b>                    |
| <b>Median</b> | <b>117</b>         | <b>79</b>        | <b>59</b>                         | <b>20</b>                         |

*Tab. 16: Absolute Zellzahlen ( $\times 10^3$ ) der Zellpopulationen im T-Zell-Endprodukt.*

#### 4.3.3 ADV-SPEZIFITÄT DER T-ZELLEN IM ENDPRODUKT VERSUS AUSGANGSPRÄPARAT

Während die vorangegangenen Tabellen zeigen, dass das mittels AdV3-Hexon-Peptid-Stimulation und immunmagnetischer Sortierung der IFN $\gamma$ -sezernierenden Zellen gewonnene Endprodukt ein überwiegendes CD4<sup>+</sup> T-Zell-Produkt ist, wurden die so gewonnenen Zellen hinsichtlich ihrer AdV-Spezifität und entsprechenden IFN $\gamma$ -Sekretion analysiert. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 17 und zeigen, dass im Median wenigstens die Hälfte der Zellen im T-Zell-Endprodukt in der Tat Virus-reaktiv und diese im Vergleich zum Ausgangsmaterial erfreulich angereichert sind.

| Nr.           | AdV-reaktive CD3 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> |                   | AdV-reaktive CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> |                   | AdV-reaktive CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> |                   |
|---------------|---|-------------------|---|-------------------|---|-------------------|
|               | unsepariertes Ausgangspräparat                          | T-Zell-Endprodukt | unsepariertes Ausgangspräparat                          | T-Zell-Endprodukt | unsepariertes Ausgangspräparat                          | T-Zell-Endprodukt |
| 1             | 0,42  | 95                | 0,24  | 72                | 0,18  | 23                |
| 2             | 0,15  | 25                | 0,09  | 16                | 0,06  | 9,2               |
| 3             | 0,18  | 49                | 0,14  | 43                | 0,04  | 6,3               |
| 4             | 0,03  | 49                | 0,02  | 47                | 0,01  | 2,1               |
| <b>Range</b>  | <b>0,03–0,42</b>  | <b>25–95</b>      | <b>0,02–0,24</b>  | <b>16–72</b>      | <b>0,01–0,18</b>  | <b>2,1–23</b>     |
| <b>Median</b> | <b>0,17</b>   | <b>49</b>         | <b>0,12</b>   | <b>45</b>         | <b>0,05</b>   | <b>7,8</b>        |

*Tab. 17: Prozent der AdV-reaktiven T-Zellen und Subfraktionen im T-Zell-Transplantat nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptiden im Vergleich zum Ausgangsmaterial.*

Aus den relativen Größen der Virus-reaktiven Zellen im Ausgangsmaterial und Endprodukt wurden die absoluten Zahlen errechnet. Tab. 18 zeigt, dass sich etwa ein Drittel der initialen Virus-spezifischen T-Zellen bzw. T-Zell-Subfraktionen im Endprodukt wiederfinden lassen und der Rest im Herstellungsprozess verloren geht.

| Nr.           | AdV-reaktive CD3 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> |                   | AdV-reaktive CD4 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> |                   | AdV-reaktive CD8 <sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> |                   |
|---------------|---|-------------------|---|-------------------|---|-------------------|
|               | unsepariertes Ausgangspräparat                          | T-Zell-Endprodukt | unsepariertes Ausgangspräparat                          | T-Zell-Endprodukt | unsepariertes Ausgangspräparat                          | T-Zell-Endprodukt |
| 1             | 230   | 115               | 130   | 87                | 100   | 27                |
| 2             | 180   | 84                | 110   | 54                | 70  | 30                |
| 3             | 98  | 19                | 78  | 16                | 20  | 2,4               |
| 4             | 12  | 8,6               | 8   | 8                 | 4   | 0,37              |
| <b>Range</b>  | <b>12–230</b>   | <b>8,6–115</b>    | <b>8–130</b>  | <b>8–87</b>       | <b>4–100</b>  | <b>0,37–30</b>    |
| <b>Median</b> | <b>139</b>  | <b>51</b>         | <b>94</b>   | <b>35</b>         | <b>45</b>   | <b>15</b>         |

*Tab. 18: Absolute Zellzahlen ( $\times 10^3$ ) der AdV-reaktiven T-Zellen und Subfraktionen im T-Zell-Transplantat nach Stimulation mit AdV3-Hexon-Peptiden im Vergleich zum Ausgangsmaterial.*

Zusammenfassend kann man also festhalten, dass sich bei dem bewusst niedrig gehaltenen Ausgangs-Blutvolumen von 100 ml Virus-reaktive T-Zellen in der Größenordnung von  $10^4$ – $10^5$  nachweisen und sich mittels AdV-Hexon-Peptid-Stimulation und immunmagnetischer Sortierung der IFN $\gamma$ -produzierenden Zellen gut anreichern lassen. Allerdings ist trotz diverser Optimierungen ein unspezifischer Zellverlust einzukalkulieren. Das Endprodukt ist ein überwiegendes CD4<sup>+</sup> T-Zell-Produkt, wobei mit interpersonellen Schwankungen wenige Nicht-T-Zellen als auch in wechselnder Größenordnung Nicht-AdV3-reaktive-T-Zellen im Endprodukt verbleiben.

## 5 DISKUSSION

Komplikationen durch humane Adenoviren sind besonders bei Kindern nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation mit hoher Morbidität und Mortalität vergesellschaftet. Ein erhöhtes Risiko für humane AdV-Erkrankungen korreliert mit dem Mangel an T-Zell-Immunität. Virus-spezifische T-Zellen tragen zur Klärung von AdV-assoziierten Komplikationen bei. Die adoptive Immuntherapie mit humanen AdV-spezifischen T-Zellen stellt demzufolge eine Möglichkeit zur Bewältigung oder Prävention von Komplikationen durch Adenoviren dar.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde eine Quantifizierung von AdV-spezifischen T-Zellen im Vollblut gesunder Probanden durchgeführt. Insbesondere sollte herausgearbeitet werden, welches das geeignetere Stimulans – AdV3 Hexonprotein oder AdV3 Hexon-PepMix – ist und ob Unterschiede bezüglich der AdV-Reaktivität von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und andere Einflussfaktoren, z.B. Alter des Probanden, existieren. Weiterhin wurde untersucht, wie zuverlässig sich andere Aktivierungsantigene wie CD154 oder CD69 neben IFN $\gamma$  identifizieren lassen.

Der zweite Teil der Arbeit befasste sich mit einer Standardisierung des Herstellungsprozesses zur Generierung eines humanen AdV-spezifischen T-Zell-Produkts mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assays sowie einer Evaluierung dieses Produkts und des Prozesses. Insbesondere sollten Viabilität, Phänotyp und AdV-Reaktivität der T-Zellen herausgearbeitet werden.

### 5.1 ADV-SPEZIFISCHE T-ZELLEN IM VOLLBLUT GESUNDER PROBANDEN

Zur Identifizierung und Quantifizierung humaner AdV-spezifischer T-Zellen wurde eine Vollblut-Stimulation benutzt, dabei konnten nach sechsständiger Stimulation mit AdV3-Antigenen von T-Zellen reaktiv gebildete Zytokine und/oder Oberflächen-Aktivierungsantigene nachgewiesen und quantifiziert werden.

#### a) AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen

Innerhalb der Lymphozytenpopulation konnten im Vollblut AdV-reaktive CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen identifiziert werden. Im Median wurden 0,07% (Range: 0–0,22%) AdV3-Hexon-PepMix- und 0,08% (Range: 0,01–0,26%) -Hexonprotein-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. Die Quantität dieser Zellpopulation ist ohne akute Erkrankung erwartungsgemäß klein. Innerhalb der Lymphozytenpopulation waren im Median 0,01% (Range: 0–0,16%) AdV3-Hexon-PepMix-spezifische CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen vertreten. Dass die Hauptimmunantwort durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen

vermittelt wird, korreliert mit Daten anderer Arbeitsgruppen (Olive et al., 2001; Olive et al., 2002; Sester et al., 2002; Heemskerk et al., 2003; Feuchtinger et al., 2005; Veldrop-Duits et al., 2006; Onion et al., 2007; Calcedo et al., 2009; Hutnick et al., 2010). Jedoch benutzten einige Gruppen Verfahren wie IFN $\gamma$  ELISPOT-Assay oder ELISA, so dass ein direkter Vergleich der Frequenzen oftmals nicht möglich ist.

Mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay untersuchten Feuchtinger et al. (2005) AdV-spezifische, IFN $\gamma$  freisetzende CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei gesunden Probanden. Im Mittel zeigten 0,38% der vitalen CD3<sup>+</sup> T-Zellen eine IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Sekretion nach 16-stündiger PBMC-Stimulation mit AdV-Lysat. Dies ist ein deutlich höheres Resultat als die in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse. Vermutlich sind die Gründe dafür in der Stimulationsdauer oder im Stimulans zu finden. Bei längerer Stimulationsdauer muss auch eine Proliferation der aktivierten Zellen in Betracht gezogen werden (Godoy-Ramirez et al., 2004).

Nach wiederum zwölfstündiger PBMC-Stimulation mit AdV5-Hexonprotein wiesen Onion et al. (2007) im Mittel 0,09% AdV5-spezifische CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nach. Keine Aussage wurde zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen gemacht. Trotz der Verwendung von PBMC und längerer Stimulationsdauer unterscheiden sich diese Ergebnisse nicht wesentlich von den in dieser Arbeit erhobenen Daten. Im Rückschluss reicht die kurze Stimulationsdauer von sechs Stunden aus, um AdV-reaktive Zellen zu identifizieren. Auch die Vollblutverwendung zeigt, dass die Antigenpräsentation funktioniert und Memory-T-Zellen reagieren.

Im Rahmen von Studien zu AdV-Vektoren und auf AdV-basierende Vakzine wiesen Hutnick et al. (2010) AdV5-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und auch in geringerer Zahl CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nach PBMC-Stimulation nach. Interessanterweise waren die AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen vornehmlich monofunktional, produzierten IL-2, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  und exprimierten die Memorymarker CD27 und CD45RO. Im Gegensatz dazu waren die AdV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen eher polyfunktional, exprimierten Effektor-ähnliche Kombinationen aus IFN $\gamma$ , MIP1 $\alpha$  und Perforin, und generell fehlte die Expression von CD27 und CD45RO. Es zeigte sich also ein naiver Phänotyp. Möglicherweise bedeutet dies, dass die CD8<sup>+</sup> T-Zellen erst durch Antigenkontakt aktiviert werden und nicht vom Memorytyp sind. Dies wäre eine Erklärung für die niedrigen AdV-reaktiven CD8<sup>+</sup>(CD69<sup>+</sup>)IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellfrequenzen. Nach einer AdV-Infektion verbleibt womöglich ein Pool aus CD4<sup>+</sup> Memory-T-Zellen, die CD8<sup>+</sup> Population übt ihre Effektorfunktionen aus und mit Bewältigung der akuten Infektion versterben diese Zellen. Fraglich ist, ob die Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Rezeptoren ungenügend ist, so dass AdV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen in geringerer Zahl vorliegen bzw. nur in der Akutphase notwendig sind.

Calcedo et al. (2009) identifizierten nach sechsstündiger PBMC-Stimulation AdV5-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen in mittlerer Höhe von 0,15%, auch bei diesen handelte es sich vornehmlich um zentrale Memory-T-Zellen. AdV-spezifische CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen konnten in geringerer Zahl nachgewiesen werden.

Die relativ hohe Hintergrundaktivität in den Negativkontrollen ohne Antigen in der vorliegenden Arbeit ist als ungünstig anzusehen, da es sich um unspezifisch aktivierte Zellen handelt. Diese Zel-

len würden auch bei einem IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay angereichert werden und die Spezifität bliebe unklar. Die Hintergrundaktivität im Sinne einer IFN $\gamma$  Freisetzung bewegte sich in der Negativkontrolle in der CD4<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation zwischen 0 und 0,18% und in der CD8<sup>+</sup> Zellpopulation zwischen 0 und 0,11%.

#### b) Koexpression von Aktivierungsantigenen auf AdV-spezifischen T-Zellen

Nach sechsstündiger Stimulation mit einem AdV3-Antigen wurden AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der Lymphozytenpopulation im Vollblut identifiziert. Die Frequenzen der AdV-spezifischen Immunantwort sind etwas niedriger als der Prozentsatz aller IFN $\gamma$  produzierenden Zellen. Im Median wurden 0,04% (Range: 0–0,22%) AdV3-Hexon-PepMix- und 0,03% (Range: 0–0,23%) -Hexonprotein-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> sowie 0,01% (Range: 0–0,14%) AdV3-Hexon-PepMix-reaktive CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. Positiv anzumerken ist, dass sich die Hintergrundaktivität in der Negativkontrolle ohne Antigen durch Einsatz der Oberflächen-Aktivierungsantigene CD154 und CD69 reduzierte. Die CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Expression betrug in der CD4<sup>+</sup> Lymphozytenpopulation 0–0,06% und die CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Expression zeigte in der CD8<sup>+</sup> Population einen Range von 0–0,02% ohne Antigenzusatz. Durch Einsatz von Oberflächen-Aktivierungsantigenen, wie CD154 oder CD69, könnte demzufolge ein Gewinn in der Qualität der AdV-Reaktivität zu verzeichnen sein, da sich der Anteil unspezifisch aktivierter Zellen reduzieren ließe.

Eine methodisch ähnliche Arbeit existiert von Sester et al. (2002): sie untersuchten AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im Vollblut von gesunden Probanden. Es wurden höhere Maximalfrequenzen (Range:  $\leq$ 0,05–0,62%) identifiziert und erst ab einer Frequenz von 0,05% wurde eine AdV-spezifische Reaktion definiert. Verglichen mit dieser Arbeit zeigt sich eine Diskrepanz zur Höhe der Frequenzen, wobei sich die Frage stellt, ob die Antigenwahl -Volllysat eines nicht benannten Serotypen/Spezies-, das große Kollektiv von n = 171 sowie der Einsatz des Oberflächenantigens CD69 auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine Rolle spielen. AdV-spezifische CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen konnten nicht nachgewiesen werden.

AdV3-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen wurden auch von Meier et al. (2008) untersucht. Nach einer sechsstündigen Vollblutstimulation mit AdV3-Hexonprotein oder -PepMix wurden im Median 0,08% AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen reaktiviert, d. h. doppelt so viele wie in der vorliegenden Arbeit. Wahrscheinlich ist hierbei die Positivselektion der Probanden von Bedeutung.

Abweichungen zu anderen Studien sind vorhanden und können auf methodische Unterschiede zurückzuführen sein. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Charakterisierung der AdV-spezifischen Zellen ohne CD3-Oberflächenmarker vorgenommen. Da die Antigene CD4 und CD8 fast ausschließlich auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen vorkommen, wurde auf diesen Marker verzichtet, um zusätzlich neben IFN $\gamma$  die Aktivierungsantigene wie CD154 und CD69 zu identifizieren. Das CD4-Antigen wird von einigen Gruppen von Thymozyten, TH1- und TH2-Zellen, Monozyten und Makropha-



gen exprimiert. Monozyten wurden in dieser Arbeit durch Einsatz von  $\alpha$ CD14 ausgeschlossen. Das CD8-Antigen wird ebenfalls von einigen Gruppen von Thymozyten sowie von zytotoxischen T-Zellen exprimiert (Murphy et al., 2009).

Um Rückschlüsse auf eine Verteilung der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> AdV-spezifischen Zellen innerhalb der Gesamt-CD3<sup>+</sup> T-Zellpopulation zu ziehen, wäre beispielsweise in der FACS-Analyse der Verzicht der Schwelle zur alleinigen Darstellung der CD4 bzw. CD8 positiven Population vorteilhaft gewesen. Außerdem hätte die vorherige Bestimmung eines Blutbildes mit Differenzierung der Leukozyten-Untergruppen in Betracht gezogen werden können, damit eine Aussage zu absoluten Zellzahlen AdV-spezifischer T-Zellen des jeweiligen Spenders ermöglicht worden wäre.

### c) Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix versus -Hexonprotein

Statistisch gab es keinen Unterschied zwischen den AdV3-Hexon-PepMix oder -Hexonprotein-spezifischen T-Zellen innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation bei alleiniger IFN $\gamma$  Produktion oder zusätzlicher Expression von CD154. Meier et al. (2008) konnten auch keinen Unterschied zwischen AdV3-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen bei der Verwendung von Hexon-PepMix oder Hexonprotein in einer Vollblutstimulation feststellen. Allerdings wurden höhere Hexon-PepMix-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellfrequenzen detektiert, verglichen mit Hexonprotein, wenn PBMC als Ausgangsmaterial verwendet wurden.

Signifikant unterschieden sich in der vorliegenden Arbeit die Frequenzen der Hexon-PepMix-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen von den -spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.

Generell ist die Wahl des AdV-Antigens zur Stimulation ein bestimmender Faktor hinsichtlich der Detektion einer AdV-spezifischen Immunreaktion. Verschiedene Autoren zeigten, dass Abschnitte des Hexonproteins (Protein II) die bevorzugten Ziel-Epitope bei der Antigen-Erkennung und Immunregulation humaner AdV-spezifischer T-Zellen enthalten (Heemskerk et al., 2006; Leen et al., 2004b; Tang et al., 2004; Onion et al., 2007). Aus diesem Grund kam das Hexonprotein bzw. eine Peptidmischung des Hexonproteins in dieser Arbeit zur Anwendung.

Angesichts der Kreuzreaktivitäten von AdV-spezifischen T-Zellen (Olive et al., 2002; Heemskerk et al., 2003; Leen et al., 2004a; Heemskerk et al., 2006; Veltrop-Duits et al., 2006; Onion et al., 2007; Chatziandreou et al., 2007; Hutnick et al., 2010) scheint es nicht relevant zu sein, welcher AdV-Serotyp als Antigen zur optimalen Stimulation AdV-reaktiver Zellen in Frage kommt.

Yeung et al. (2009) identifizierten aus AdV-positiven Kulturen von Proben des Respirationstraktes am häufigsten den AdV-Serotypen 3 (44%), gefolgt von 2 (25%) und 1 (17%); 73% der Proben waren von Patienten  $\leq$  4 Jahre. Ähnliche Ergebnisse publizierten Gray et al. (2007): unter Zivilisten, davon 76%  $<$  7 Jahre, fand sich der AdV-Serotyp 3 mit einer Prävalenz von 34% am häufigsten. In Hinblick auf das Vorkommen des AdV-Serotypen 3 (Spezies B) in der immunkompetenten Bevölkerung im Rahmen von Infektionserkrankungen scheint diese Antigen-Wahl als Stimulans in der vorliegenden Arbeit angemessen gewesen zu sein.

#### d) AdV-spezifische T-Zellantwort in Abhängigkeit vom Alter

Bei Analyse der AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen wurde eine altersabhängige Abnahme entdeckt, nicht jedoch der CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>, da diese auf niedrigem oder fehlendem Niveau zu finden sind. Eine Tendenz der Abnahme mit zunehmendem Alter der Probanden zeigte sich auch bei den AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen.

Sester et al. (2002) beschrieben ebenso eine altersabhängige Abnahme der AdV-spezifischen T-Zellen. Die Ursache dieser Fakten ist nicht geklärt, da keine Arbeiten zur Kinetik der Immunreaktionen nach AdV-Infektion existieren bzw. zu beantworten gilt, ob und wie das Virus nach akuter AdV-Krankheit im Körper verbleibt und Viruspeptide einen langfristigen Prozess der endogenen Immunstimulation von T-Zellen aufrechterhalten, denn wie Hutnick et al. (2010) darlegten, handelt es sich bei den CD4<sup>+</sup> vor allem um Gedächtnis-T-Zellen.

Hinweise für eine Persistenz der AdV lieferte Garnett et al. (2002, 2009). DNS des AdV wurde in T-Lymphozyten aus Tonsillen oder Adenoiden nachgewiesen. Interessanterweise wurde ein Peak im Alter von vier Jahren festgestellt, danach fiel der DNS-Anteil mit zunehmendem Alter ab. Außerdem umfassten weniger als 15% der Proben, die adenovirale DNS enthielten, infektiöses Virus. Calcedo et al. (2009) bewiesen die Existenz einer AdV-spezifischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulation in Darm-assoziierten Schleimhäuten. Die Persistenz von adenoviralem Material unterstützt zum einen die Hypothese der Reaktivierungen von AdV-Infektionen bei Patienten nach HSCT. Die Abnahme der T-Zell-vermittelten Immunität im Alter hingegen könnte Hinweis für eine abnehmende bzw. fehlende Persistenz der Adenoviren im Alter sein, und entsprechend findet man weniger AdV-reaktive T-Zellen.

Eine altersabhängige Abnahme für VZV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen beschrieb Asanuma et al. (2000). Die unterschiedliche Latenz der Herpesviren wurde hierbei für die Ungleichheit der Virus-spezifischen Gedächtnis-CD4<sup>+</sup> T-Zellfrequenzen verantwortlich gemacht.

Nach diesen Daten der Zellzahlabnahme AdV-spezifischer T-Zellen könnte überlegt werden, ob insbesondere für jüngere Stammzelltransplantatempfänger eher junge Probanden für die Generierung AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate herangezogen werden sollten. Allerdings hat dieser Anspruch eher einen geringen Stellenwert, da jeder potentielle Spender wichtig ist und das Alter bei der begrenzten Auswahl somit kein Entscheidungskriterium darstellen kann.

#### e) Andere Einflüsse auf die Reaktivität AdV-spezifischer T-Zellen

In dieser Arbeit wurde eine Stimulationsdauer von sechs Stunden gewählt. Nomura et al. (2000) zeigten, dass CMV-spezifische Immunantworten bei einer Stimulationsdauer von 10–16 Stunden relativ stabil waren, bei Zeiten > 16 Stunden rasch abfielen. Am besten waren die Ergebnisse für eine Stimulationsdauer von sechs Stunden. In Kontrast dazu fanden Godoy-Ramirez et al. (2004) Spitzenfrequenzen >1% für VZV- und CMV-spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 72–120 Stunden Stimulationsdauer in 1:5 oder 1:10 mit Kulturmedium verdünnten Blutproben. Diese Frequen-

zen wurden allerdings durch eine Proliferation von aktivierten Zellen erklärt. Angesichts geringer humaner AdV-spezifischer T-Zellfrequenzen könnte die Verdünnung der Vollblutproben zur Verbesserung der Antigenpräsentation geeignet sein, um höhere AdV-spezifische Immunreaktionen zu identifizieren.

Zandvliet et al. (2011) zeigten kürzlich Daten zur Kinetik der IFN $\gamma$  Produktion durch Virus-spezifische T-Zellen nach Antigen-Stimulation. Nach Stimulation von PBMC mit einem AdV5-Hexon-Peptidpool wurden höchste IFN $\gamma$ -Level bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach vier bis acht Stunden nachgewiesen. Die Frequenzen der AdV-reaktiven CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen waren nicht ausreichend hoch genug, um eine Kinetik darstellen zu können.

Meier et al. (2008) zeigten, dass eine Verlängerung der Stimulationsdauer auf 16 Stunden für AdV3-Hexon-PepMix-spezifische CD4<sup>+</sup>CD154<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen beim Gebrauch von PBMC keine höheren Frequenzen erbrachte als eine sechsstündige Inkubationszeit.

Eine weitere Frage stellte sich hinsichtlich der Verarbeitung der Zellen nach Ende der Inkubationszeit. Im Rahmen der Arbeit wurden die Zellen nach Ende der Stimulation fixiert, über Nacht bei +4°C gelagert, und am nächsten Morgen erfolgten die Färbung und Durchflusszytometrie. Keinen Unterschied zwischen sofortiger Fixierung und Färbung, Einfrieren der Zellen oder entsprechend der in dieser Arbeit untersuchten Variante fanden Nomura et al. (2000).

## 5.2 STANDARDISIERUNG DES HERSTELLUNGSPROZESSES ZUR GENERIERUNG HUMANER ADV-SPEZIFISCHER T-ZELL-TRANSPLANTATE

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte eine Standardisierung des Herstellungsprozesses zur Generierung AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate auf der Basis eines IFN $\gamma$ -Sekretions-Assays nach sechs- bis siebenstündiger Stimulation von PBMC mit AdV3-Hexon-PepMix. Sieben Experimente von sechs verschiedenen Probanden wurden in dieser Arbeit gezeigt. Jedes einzelne Experiment wurde für sich betrachtet und/oder mit Folgeexperimenten verglichen.

Im Rahmen der Prozessstandardisierung wurde das Augenmerk auf eine quantitative Ergebnisbeurteilung der folgenden Arbeitsschritte gelegt:

- A Isolierung von PBMC,
- B Stimulationsprozess,
- C immunmagnetische Zellseparation mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay.

### a) Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

PBMC sind einkernige Blutzellen, vornehmlich Lympho- und Monozyten, diese mussten zunächst aus Vollblut isoliert werden.

Ein gesunder Erwachsener hat 3.800–10.500 Leukozyten pro  $\mu\text{l}$  Blut, davon in der Differenzierung zwischen 15 und 50% Lymphozyten und 1–12% Monozyten (Herold et al., 2009). In dieser Arbeit hatten die Probanden im Median 6.090/ $\mu\text{l}$  Leukozyten, was der Norm entspricht.

Das Ziel bestand darin, 100 ml Vollblut von einem Probanden zu entnehmen. De facto wurden im Median 109 ml Vollblut gewonnen. Die mediane PBMC-Recovery von 16,6% (Range: 6,5–32,3%) spiegelt zum einen die unspezifischen Zellverluste bei einer Dichtegradientenzentrifugation wider, zum anderen aber auch die gewünschte Abreicherung von Granulozyten. In diesem Arbeitsschritt ist auch die methodische Geübtheit des Anwenders entscheidend.

100 ml Vollblut ist eine Menge, die für einen designierten Spender als möglichst geringes Zusatzprodukt akzeptabel erscheint, nachdem der freiwillige Stammzellspender bereits durch die eigentliche Stammzellentnahme nicht unerheblich belastet ist. Andere Arbeitsgruppen nutzen neben Vollblut mit Volumina zwischen 100 und 500 ml auch zusätzliche Leukaphereseprodukte (Feuchtinger et al., 2004; Chatziandreou et al., 2007; Aïssi-Rothé et al. 2010), was bei einem motivierten Familienspender für das eigene Kind noch hinnehmbar ist, als generelles Zusatzprodukt eines unverwandten Volontärspenders kaum vertretbar sein wird. Diese 100 ml Vollblut könnten im Rahmen der Spendervoruntersuchung gewonnen und daraus bis zur Transplantation ca. 14 Tage später ausreichend viele AdV-reaktive T-Zellen durch Expansion generiert werden.

### b) Stimulation mit AdV3-Hexon-PepMix

Zur Stimulation AdV-reaktiver Zellen wurde das Antigen AdV3-Hexon-PepMix benutzt. Die eingestellte Zelldichte der PBMC betrug  $1 \times 10^7$  /ml Kulturmedium, die auch in anderen Arbeiten angewandt wurde (Chatziandreou et al., 2007; Feuchtinger et al., 2008; Meier et al., 2008). Entsprechend Herstellerangaben bei der Verwendung von Peptid-Antigenlösungen wurde sechs bis sieben Stunden stimuliert. Meier et al. (2008) sahen keinen Nutzen in der Verlängerung der Stimulationsdauer. Zandvliet et al. (2011) zeigten, dass nach Stimulation mit einem AdV-Peptidpool eine maximale IFN $\gamma$ -Produktion nach vier bis acht Stunden identifizierbar war. Feuchtinger et al. (2004) benutzten ein Volllysatprodukt des AdV-Serotypen 6 und stimulierten 16 Stunden. Ebenso 16 Stunden stimulierten Chatziandreou et al. mit einem AdV5-Lysatprodukt (2007). Aïssi-Rothé et al. (2010) führten eine sechsstündige Stimulation mit einem Peptidpool des AdV5-Hexonproteins durch.

Ein unspezifischer Zellverlust im Anschluss an die Stimulation durch Waschen der Zellen und Spülen der Kulturplatten bei einer medianen Recovery der PBMC von 96% war kaum zu verzeichnen und stellte kein technisches Problem dar. In den Qualitätskontrollen zeigten sich wenig unspezifisch aktivierte Zellen in der Negativprobe ohne Antigenzusatz und ausreichend stimulierbare Zellen in der SEB-stimulierten Probe.

### c) Immunmagnetische Zellseparation mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay

Der IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay ermöglicht eine quantitative Analyse Antigen-spezifischer T-Zellen und erlaubt durch Anreicherung eine funktionale Charakterisierung sowie weiterführende Experimente (Manz et al., 1995; Brosterhus et al., 1999; Bissinger et al., 2002; Campbell, 2003).

Der Prozess des IFN $\gamma$ -Sekretions-Assays wird durch mehrere Einzelschritte und Zellsuspensions-transfers verkompliziert. Um eine GMP-konforme Herstellung im Sinne einer Reinraumgewinnung zu etablieren, wurde zur Verringerung von Kontaminationen versucht, mit geschlossenen Systemen, d. h. mit Beutelsystemen, zu arbeiten. Dabei stellte sich heraus, dass die Verwendung von diesen Systemen möglicherweise einen größeren Zellverlust bedeutete. Es fand sich eine mediane Recovery der mononukleären Zellen von 34% in Beutelsystemen und 82% in Röhren. Vielleicht sind die Adhäsion der Zellen im Beutel und eine damit verbundene ineffizientere Herauslösung der Zellen nach dem Waschvorgang dafür verantwortlich. Die Rückgewinnungsraten sprachen gegen die Verwendung von Beutelsystemen, so dass suggestiv denkbar ist, dass das Behältnis Einfluss auf die Recovery hat. Bei Einstellung der Zellen auf  $1 \times 10^6$ /ml entstehen Volumina  $> 200$  ml, so dass eine Verteilung auf mehrere 50-ml-Röhren notwendig ist. In den Experimenten 4–7 konnte ein geringerer Zellverlust durch größere Spülvolumina und zusätzliche Waschschrte erzielt werden.

Nach der immunmagnetischen Zellseparation variierten die Rückgewinnungsraten der absoluten Zahlen der mononukleären Zellen stark. Vom Hersteller Miltenyi Biotec wird der Einbau eines Vorfilters, insbesondere für CD34<sup>+</sup> Selektionen, zur Auflösung von Zellaggregaten und Entfernung von Thrombozyten empfohlen. Allerdings zeigten sich hohe unspezifische Zellverluste, so dass Versuche ohne Filter unternommen wurden. Es konnte nur eine kleine Fallzahl von  $n = 7$  untersucht werden. Die mediane Recovery der mononukleären Zellen betrug mit Filter 20% und ohne Filter 77%.

Generell kann für den gesamten Versuchsablauf festgestellt werden, dass aufgrund der Komplexität und Vielzahl der Arbeitsschritte auch die Schulung und entsprechende Übung des jeweiligen Ausführenden eine Rolle spielt, um die unspezifischen Zellverluste gering zu halten.

Im Rahmen der Standardisierung des Herstellungsprozesses bewegten sich die absoluten Zellzahlen der kernhaltigen Zellen im (T-Zell)-Endprodukt, d. h. IFN $\gamma$ -produzierende Zellen, zwischen  $2$  und  $640 \times 10^3$  mit einem Median von  $88 \times 10^3$ . Eine erste Publikation zur Herstellung von AdV-spezifischen T-Zellen auf Basis der IFN $\gamma$ -Sekretion stammt von Feuchtinger et al. (2004). Im Mittel wurden  $3,4 \times 10^6$  IFN $\gamma$  sezernierende Zellen nach der Separation nachgewiesen. In Relation zur Ausgangszellzahl von  $0,1 - 2 \times 10^9$  PBMC, die zur Stimulation eingesetzt wurde, sind die Resultate der vorliegenden Arbeit mit Feuchtinger et al. (2004) vergleichbar. Der vorliegenden Arbeit annähernd gleiche Ergebnisse zeigten Feuchtinger et al. 2008. Dabei fanden sie  $3 \times 10^5$  viable Zellen im Endprodukt nach der Separation nach vorheriger Stimulation von  $0,1 - 1 \times 10^9$  PBMC. Zuvor hatten Feuchtinger et al. (2004) die Stimulation mit einem AdV6-Volllysat durchgeführt, 2008 nutzten sie als Antigen ein AdV5-Hexonprotein.

Bei gleichem Ausgangsvolumen von 100 ml, jedoch 16-stündiger Stimulation mit einem AdV-Spezies-C-Lysat wiesen Chatziandreou et al. (2007)  $1-7 \times 10^5$  AdV-spezifische Zellen nach immunmagnetischer Separation nach. Neuere Ergebnisse stammen von Aïssi-Rothé et al. (2010), die eine mittlere Zellzahl von  $1 \times 10^6$  für das (T-Zell-)Endprodukt bei einem Ausgangsmaterial von  $0,2-1 \times 10^9$  PBMC angaben.

Die kleine Fallzahl und die Veränderung einzelner Arbeitsschritte innerhalb der Standardisierungstreihe in der vorliegenden Arbeit limitieren die statistische Vergleichbarkeit der Daten. Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass der routinierte Umgang mit den Methoden Voraussetzung für einen Anwender sein sollte. Weiterhin ist zu überdenken, ob automatisierte Verfahren menschliche Fehlerquoten ersetzen könnten, z.B. bei der PBMC-Gewinnung mittels Dichtegradientenzentrifugation. Ein begrenztes Ausgangsmaterial von 100 ml Vollblut stand zur Verfügung, bekannt war die geringe AdV-Reaktivität, unspezifische Zellverluste sind als normal anzusehen und bei einer Expansion der AdV-reaktiven T-Zellen sollte eine transplantationswürdige Zellzahl zu erreichen sein.

### 5.3 EVALUIERUNG DES OPTIMierten HUMANEN ADV-SPEZIFISCHEN T-ZELL-TRANSPLANTATS

In dieser Arbeit konnten aus zirka 100 ml Vollblut nach Standardisierung des Herstellungsverfahrens auf Basis des IFN $\gamma$ -Sekretions-Assays zwischen 88 und  $640 \times 10^3$  Zellen (Median:  $248 \times 10^3$ ) mittels immunmagnetischer Separation isoliert werden, die eine durch AdV3-Antigen induzierte IFN $\gamma$ -Expression zeigten. Wie bereits unter Kap. 5.2c) beschrieben, konnten andere Forschungsgruppen vergleichbare Resultate erzielen.

In den folgenden Abschnitten werden kurz der unspezifische Zellverlust sowie qualitative Aspekte des (T-Zell-)Endprodukts, wie der Phänotyp, die Viabilität und natürlich die AdV-Reaktivität, diskutiert.

#### a) Quantifizierung des unspezifischen Zellverlusts

Die Gesamt-recovery der mononukleären Zellen – Ausgangspräparat vor Stimulation und Restfraktion plus T-Zell-Endprodukt nach immunmagnetischer Separation – betrug im Median 68%, d. h. zirka ein Drittel aller mononukleären Zellen gingen verloren. Die erwähnte Anwenderschulung und ein routinierter Umgang mit den methodischen Techniken sind hierbei verbesserungsfähig, wengleich ein gewisser unspezifischer Verlust immer zu verzeichnen sein wird. Vergleichbare Daten anderer Arbeitsgruppen fehlen.

## b) Charakterisierung des T-Zell-Endprodukts

Hinsichtlich der Viabilität des (T-Zell-)Endprodukts wurden in dieser Arbeit respektable Ergebnisse erzielt. Im Median wurde eine 97-prozentige Viabilität gemessen, die in der Durchflusszytometrie durch Propidiumiodid-Einsatz ermittelt wurde. Im Gegensatz dazu gaben Feuchtinger et al. (2008) eine Viabilität von 40% an, die mittels Trypanblau-Zählmethodik erfasst wurde. Diese niedrige Lebendigkeit der Zellen wurde mit einer unspezifischen Anreicherung toter Zellen aufgrund des Prozesses erklärt (Feuchtinger et al., 2008). In Vorarbeiten erzielten Feuchtinger et al. (2004) eine mittlere Viabilität von 91%. Aïssi-Rothé et al. (2010) gaben eine mittlere Viabilität von 76% an. In der vorliegenden Arbeit konnten im (T-Zell-)Endprodukt im Median 71% CD3<sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der viablen Lymphozyten identifiziert werden. Von diesen waren im Median 74% CD4<sup>+</sup> und 26% CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>). Auch Aïssi-Rothé et al. (2010) zeigten eine Prädominanz der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation.

Bei Färbung mit einem anti-CD4-Antikörper kann nur indirekt auf die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Subpopulation geschlossen werden. Da auch anti-CD3 benutzt wurde, muss es sich bei den CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> um CD8<sup>+</sup> T-Zellen (= CTL) handeln. Mit den Nachweismethoden musste aufgrund der niedrigen Zellzahlen der AdV-spezifischen Zellen sparsam umgegangen werden, deshalb wurde auf eine direkte Färbung mit  $\alpha$ -CD8-Antikörpern verzichtet. Entgegen den Empfehlungen mancher Forscher wurde anti-CD3 verwendet, aufgrund der Downregulation des T-Zell-Rezeptors (TCR) und damit von CD3 muss die Benutzung dieses Oberflächenmarkers kritisch beurteilt werden (Campbell, 2003).

## c) AdV-Spezifität der T-Zellen im Endprodukt versus Ausgangspräparat

Mit der eingesetzten Peptidmischung des Hexonproteins des AdV-Serotypen 3 konnte in dieser Arbeit nach sechs- bis siebenständiger Stimulationsdauer eine T-Zellantwort induziert werden. Vor der immunmagnetischen Separation fand sich im Ausgangspräparat eine mediane Frequenz von 0,17% AdV-reaktiven CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen innerhalb der viablen Lymphozyten. Von den CD3<sup>+</sup> T-Zellen waren im Median 0,12% AdV-reaktive CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und 0,05% CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen. Die Resultate anderer Arbeitsgruppen bewegten sich auf ähnlichem oder höherem Niveau, abhängig von verschiedenen Faktoren, wie z.B. das AdV-Antigen oder eine Positivselektion der Probanden (Feuchtinger et al., 2004; Feuchtinger et al., 2008; Aïssi-Rothé et al., 2010). Feuchtinger et al. (2004) stimulierten 16 Stunden mit einem AdV6-Lysat und wiesen eine AdV-Reaktivität i. S. einer IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Sekretion im Mittel von 0,6% für CD3<sup>+</sup> T-Zellen im Ausgangspräparat nach. 2008 wiederum setzten Feuchtinger et al. AdV5-Hexonprotein als Stimulans ein und verzeichneten nach 16-stündiger Stimulation eine mittlere Frequenz von 0,06% für spezifische CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im unseparierten Ausgangsmaterial (Feuchtinger et al., 2008). Eine 2010 veröffentlichte Arbeit ist methodisch mit dieser vergleichbar: eine sechsständige Stimulation mit einem AdV5-Hexonpeptid erfolgte, dabei zeigte sich bezogen auf CD4 oder CD8 positive Zellen eine jeweils 0,2-prozentige AdV-Reaktivität der CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen (Aïssi-Rothé et al., 2010).

Im (T-Zell-)Endprodukt nach der immunmagnetischen Separation der vorliegenden Arbeit fand sich eine Dominanz der AdV-Reaktivität in der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population, wie es aus Vorarbeiten bekannt war. Von CD3<sup>+</sup> T-Zellen wurden im Median 45% AdV-spezifische CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen identifiziert, hingegen im Median 7,8% AdV-reaktive CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen. Dieses Resultat ist vereinbar mit den Daten anderer Forscher (Feuchtinger et al., 2004; Feuchtinger et al., 2008; Chatziandreu et al., 2007; Aïssi-Rothé et al., 2010). Eine medianer Anteil von 49% (Range: 25–95%) AdV-reaktiver CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen im T-Zell-Endprodukt kommt dem Ziel eines 50%-spezifischen T-Zellprodukts nahe.

Im 4. Versuchsansatz wurde ein Proband mit einer bekannten niedrigen Ausgangsfrequenz AdV-reaktiver T-Zellen ausgewählt. Im Ausgangspräparat fanden sich von viablen Lymphozyten 0,03% AdV-reaktive CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen, im (T-Zell-)Endprodukt wurden 49% AdV-reaktive CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen. Erfreulicherweise sind demzufolge auch Probanden mit niedrigen Ausgangsfrequenzen geeignet, um AdV-reaktive Zellen anzureichern.

Auf Basis der durchflusszytometrischen Analysen wurden absolute Zellzahlen ermittelt, dabei beliefen sich die AdV-reaktiven CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen auf Zahlen zwischen 12 und 230×10<sup>3</sup> im Ausgangspräparat und halbierten sich durch die Separation auf 8,6–115×10<sup>3</sup> im T-Zell-Endprodukt. Die Recovery für diese AdV-reaktiven CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen betrug im Median 48%. Dieses Resultat setzt sich aus einer medianen Recovery von 58% für IFN $\gamma$ <sup>+</sup> produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen und einer niedrigeren Recovery von 20% für AdV-reaktive CD8<sup>+</sup> T-Zellen zusammen. Ebenso wie es zu unspezifischen Zellverlusten kommt, gehen auch spezifische, AdV-reaktive Zellen während der Herstellungsprozesses verloren. Betrachtet man des Weiteren die Verlustraten, dann wird erkennbar, dass die »fehlenden« AdV-reaktiven Zellen nicht ausschließlich in der Restfraktion zu finden sind. Eine mittlere Recovery von 61,8% für AdV-reaktive CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen ermittelten Feuchtinger et al. (2008), verglichen mit dieser Arbeit handelt es sich um ein besseres Resultat. Feuchtinger et al. (2006) deuteten an, dass die Reinheit des isolierten Zellprodukts, die prinzipiell der AdV-Reaktivität entspricht, von der Frequenz der präexistierenden AdV-spezifischen Immunantwort des Probanden abhängt. Dies konnte in dieser Arbeit zum Teil bestätigt werden. Feuchtinger et al. dokumentierten eine mittlere Reinheit von 85% (2004) bzw. 63% (2008) bezogen auf CD3<sup>+</sup> T-Zellen. Aïssi-Rothé et al. (2010) kamen auf eine mit der vorliegenden Arbeit vergleichbare Reinheit von 52%. Hinsichtlich von Alloreaktivitäten sind diese Daten wesentlich und eine weitere Phänotypisierung (NK-, B-Zellen) einschließlich funktioneller Tests sollten sich anschließen.



## 5.4 AUSBLICK

Im Rahmen dieser Arbeit konnten mittels Vollblut-Stimulation bei 23 Probanden AdV-spezifische T-Zellen detektiert werden. Die Hauptimmunantwort wurde durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit einem TH1-Effektorzelltyp vermittelt, unabhängig davon, ob AdV3-Hexon-Peptide oder AdV3-Hexonprotein als Stimulans eingesetzt wurde. Weiterhin zeigte sich eine altersabhängige Abnahme der AdV-spezifischen Immunreaktionen.

Mittels IFN $\gamma$ -Sekretions-Assay erfolgte eine Standardisierung zur Herstellung AdV-spezifischer T-Zell-Transplantate sowie die anschließende Phänotypisierung des Endprodukts mittels Durchflusszytometrie. Bei einer medianen Reinheit von knapp 50% für die AdV-reaktiven CD3<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> T-Zellen müssen sich weitere Charakterisierungen der Zellen sowie Funktionstests (z. B. Zytotoxizität) anschließen. Eine adoptive T-Zell-Immuntherapie muss eine sichere Therapie sein, denn alloreaktive T-Zellen bergen das Risiko zur Auslösung einer GvHD und Verschlimmerung viraler Reaktivierungen.

Die Vielzahl der komplexen Arbeitsschritte bei der Herstellung eines AdV-reaktiven T-Zell-Produkts erfordern die Geübtheit der Anwender, aber auch methodische Optimierungen könnten überdacht werden.

Die geringen Zahlen angereicherter AdV-reaktiver Zellen werden einer Expansion bedürfen, um transfusionswürdige Zahlen zu erreichen. Es bleibt weiterhin zu untersuchen, welche Vorbedingungen Patienten mitbringen, die zur Klärung einer AdV-Komplikation nach adoptiver Immuntherapie in der Lage sind. Ein früher Zeitpunkt, möglichst vor dem Auftreten von Symptomen, z. B. bei Anstieg der Viruslast, scheint wesentlich zu sein (Feuchtinger et al., 2006). Zukünftige Verfahren werden möglicherweise die Herstellung von AdV-reaktiven T-Zellen auf der Basis von durch Aktivierung induzierter CD137- oder CD154-Expression einschließen (Zandvliet et al., 2011; Khanna et al., 2011; Leibold et al., 2012). Auch eine Anreicherung von Virus-spezifischen T-Zellen über die Expression von CD25 wird entwickelt (Lugthart et al., 2012). Des Weiteren wird die gleichzeitige Generierung von T-Zell-Produkten gegen verschiedene Viren (CMV, EBV, AdV) und andere Antigene künftig im Vordergrund stehen (Zandvliet et al., 2011; Khanna et al., 2011; Lugthart et al., 2012).

Bei allen Neuheiten werden der personelle, zeitliche und materielle Aufwand und die damit verbundenen Kosten sowie die Qualität der T-Zell-Produkte die essentiellen Faktoren sein, die eine Weiterentwicklung der Methoden limitieren oder fördern.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

- Adhikary D, Behrends U, Moosmann A, et al. Control of Epstein-Barr virus infection in vitro by T helper cells specific for virion glycoproteins. *J Exp Med* 2006;203(4):995–1006.
- Adrian T, Schäfer G, Cooney MK, et al. Persistent enteral infections with adenovirus types 1 and 2 in infants: no evidence of reinfection. *Epidemiol Infect* 1988;101(3):503–9.
- Aïssi-Rothé L, Decot V, Venard V, et al. Rapid generation of full clinical-grade human antiadenovirus cytotoxic T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2010;33(4):414–24.
- Arnberg N, Edlund K, Kidd AH, et al. Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor. *J Virol* 2000;74(1):42–8.
- Artieda J, Pineiro L, Gonzalez MC, et al. A swimming pool-related outbreak of pharyngoconjunctival fever in children due to adenovirus type 4, Gipuzkoa, Spain, 2008. *Euro Surveill* 2009;14(8):6–8.
- Asanuma H, Sharp M, Maecker HT, et al. Frequencies of memory T cells specific for varicella-zoster virus, herpes simplex virus, and cytomegalovirus by intracellular detection of cytokine expression. *J Infect Dis* 2000;181(3):859–66.
- Baldwin A, Kingman H, Darville M, et al. Outcome and clinical course of 100 patients with adenovirus infection following bone marrow transplantation. *Bone marrow transplant* 2000;26(12):1333–8.
- Bil-Lula I, Ussowicz M, Rybka B, et al. PCR diagnostics and monitoring of adenoviral infections in hematopoietic stem cell transplantation recipients. *Arch Virol* 2010;155(12):2007–15.
- 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.
- Blanke C, Clark C, Broun R et al. Evolving pathogens in allogeneic bone marrow transplantation: increased fatal adenoviral infections. *Am J Med* 1995;99(3):326–8.
- Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Semin Immunol* 2009;21(2):69–77.
- Bollard CM, Kuehnle I, Leen A, et al. Adoptive immunotherapy for posttransplantation viral infections. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10(3):143–55.
- Bordigoni P, Carret AS, Venard V, et al. Treatment of adenovirus infections in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2001;32(9):1290–7.
- Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H, et al. Enrichment and detection of live antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol* 1999;29(12):4053–9.

- Brown DM, Román E, Swain SL. CD4 T cell responses to influenza infection. *Semin Immunol* 2004;16(3): 171–7.
- Bruno B, Gooley T, Hackman RC, et al. Adenovirus infection in hematopoietic stem cell transplantation: effect of ganciclovir and impact on survival. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9(5): 341–52.
- Butz EA, Bevan MJ. Massive expansion of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells during an acute virus infection. *Immunity* 1998;8(2): 167–75.
- Calcedo R, Vandenberghe LH, Roy S, et al. Host immune responses to chronic adenovirus infections in human and nonhuman primates. *J Virol* 2009;83(6): 2623–31.
- Campbell JDM. Detection and enrichment of antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells based on cytokine secretion. *Methods* 2003;31(2): 150–9.
- Carrigan DR. Adenovirus infections in immunocompromised patients. *Am J Med* 1997;102(3A): 71–4.
- Chakrabarti S, Collingham KE, Fegan CD, et al. Fulminant adenovirus hepatitis following unrelated bone marrow transplantation: failure of intravenous ribavirin therapy. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(11): 1209–11.
- Chakrabarti S, Collingham KE, Fegan CD, et al. Adenovirus infections following haematopoietic cell transplantation: is there a role for adoptive immunotherapy? *Bone Marrow Transplant* 2000;26(3): 305–7.
- Chakrabarti S, Mautner V, Osman H, et al. Adenovirus infections following allogeneic stem cell transplantation: incidence and outcome in relation to graft manipulation, immunosuppression, and immune recovery. *Blood* 2002;100(5): 1619–27.
- Chakrabarti S, Milligan DW, Moss PA, et al. Adenovirus infections in stem cell transplant recipients: recent developments in understanding of pathogenesis, diagnosis and management. *Leuk Lymphoma* 2004;45(5): 873–85.
- Chatziandreu I, Gilmour KC, McNicol AM, et al. Capture and generation of adenovirus specific T cells for adoptive immunotherapy. *Br J Haematol* 2007;136(1): 117–26.
- Cobbold M, Khan N, Pourgheysari B, et al. Adoptive transfer of cytomegalovirus-specific CTL to stem cell transplant patients after selection by HLA-peptide tetramers. *J Exp Med* 2005;202(3): 379–86.
- De Jong JC, Wermenbol AG, Verweij-Uijterwaal MW, et al. Adenoviruses from human immunodeficiency virus-infected individuals, including two strains that represent new candidate serotypes Ad50 and Ad51 of species B1 and D, respectively. *J Clin Microbiol* 1999;37(12): 3940–5.
- De Mezerville MH, Tellier R, Richardson S, et al. Adenoviral infections in pediatric transplant recipients: a hospital-based study. *Pediatr Infect Dis J* 2006;25(9): 815–8.
- De Vries E, van Tol MJ, van den Bergh RL, et al. Reconstitution of lymphocyte subpopulations after paediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25(3): 267–75.

- Ebell, W.: Hämatopoetische Stammzelltransplantation. In: Gadner, H., Gaedicke, G., Niemeier, C., Ritter, J.: Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 2006, S. 66–67.
- Echavarria M, Forman M, van Tol MJ, et al. Prediction of severe disseminated adenovirus infection by serum PCR. *Lancet* 2001;358(9279):384–5.
- Echavarria M. Adenoviruses in immunocompromised hosts. *Clin Microbiol Rev* 2008;21(4):704–15.
- 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.
- Feuchtinger T, Lang P, Hamprecht K, et al. Isolation and expansion of human adenovirus-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells according to IFN-gamma secretion for adjuvant immunotherapy. *Exp Hematol* 2004;32(3):282–9.
- Feuchtinger T, Lücke J, Hamprecht K, et al. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005;128(4):503–9.
- Feuchtinger T, Matthes-Martin S, Richard C, et al. Safe adoptive transfer of virus-specific T-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2006;134(1):64–76.
- Feuchtinger T, Richard C, Joachim S, et al. Clinical grade generation of hexon-specific T cells for adoptive T-cell transfer as a treatment of adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother* 2008;31(2):199–206.
- Flomenberg P, Babbitt J, Drobyski WR, et al. Increasing incidence of adenovirus disease in bone marrow transplant recipients. *J Infect Dis* 1994;169(4):775–81.
- Flomenberg P, Piaskowski V, Truitt RL, et al. Characterization of human proliferative T cell responses to adenovirus. *J Infect Dis* 1995;171(5):1090–6.
- Flomenberg P, Piaskowski V, Truitt RL, et al. Human adenovirus-specific CD8<sup>+</sup> T-cell responses are not inhibited by E3-19K in the presence of gamma interferon. *J Virol* 1996;70(9):6314–22.
- Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, et al. Direct access to CD4<sup>+</sup> T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005;11(10):1118–24.
- Gaggar A, Shayakhmetov DM, Liszewski MK, et al. Localization of regions in CD46 that interact with adenovirus. *J Virol* 2005;79(12):7503–13.
- Garnett CT, Erdman D, Xu W, et al. Prevalence and quantitation of species C adenovirus DNA in human mucosal lymphocytes. *J Virol* 2002;76(21):10608–16.
- Garnett CT, Talekar G, Mahr JA, et al. Latent species C adenoviruses in human tonsil tissues. *J Virol* 2009;83(6):2417–28.
- Gavin PJ, Katz BZ. Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics* 2002;110(1):e9.

- Godoy-Ramirez K, Franck K, Mahdavi S, et al. Optimum culture conditions for specific and nonspecific activation of whole blood and PBMC for intracellular cytokine assessment by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2004;292(1–2): 1–15.
- Gray GC, McCarthy T, Lebeck MG, et al. Genotype prevalence and risk factors for severe clinical adenovirus infection, United States 2004–2006. *Clin Infect Dis* 2007;45(9): 1120–31.
- Guggenmoos-Holzmann, Irene, Wernecke, Klaus-Dieter: *Medizinische Statistik*. Berlin, Wien: Blackwell Wissenschafts-Verlag, 1996.
- Gustafsson A, Levitsky V, Zou JZ, et al. Epstein-Barr virus (EBV) load in bone marrow transplant recipients at risk to develop posttransplant lymphoproliferative disease: prophylactic infusion of EBV-specific cytotoxic T cells. *Blood* 2000;95(3): 807–14.
- Hale GA, Heslop HE, Krance RA, et al. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1999;23(3): 277–82.
- Hall K, Blair Zajdel ME, Blair GE. Unity and diversity in the human adenoviruses: exploiting alternative entry pathways for gene therapy. *Biochem J* 2010;431(3): 321–36.
- Hamel Y, Blake N, Gabrielsson S, et al. Adenovirally transduced dendritic cells induce bispecific cytotoxic T lymphocyte responses against adenovirus and cytomegalovirus pp65 or against adenovirus and Epstein-Barr virus EBNA3C protein: a novel approach for immunotherapy. *Hum Gene Ther* 2002;13(7): 855–66.
- Harris Michael, Taylor Gordon, Taylor Jacquelyn: *Startwissen Mathematik und Statistik*. 1. Auflage, München: Spektrum Akademischer Verlag, 2007.
- Heemskerk B, Veltrop-Duits LA, van Vreeswijk T, et al. Extensive cross-reactivity of CD4<sup>+</sup> adenovirus-specific T cells: implications for immunotherapy and gene therapy. *J Virol* 2003;77(11): 6562–6.
- Heemskerk B, Lankester AC, van Vreeswijk T, et al. Immune reconstitution and clearance of human adenovirus viremia in pediatric stem-cell recipients. *J Infect Dis* 2005;191(4): 520–30.
- Heemskerk B, van Vreeswijk T, Veltrop-Duits LA, et al. Adenovirus-specific CD4<sup>+</sup> T cell clones recognizing endogenous antigen inhibit viral replication in vitro through cognate interaction. *J Immunol* 2006;177(12): 8851–9.
- Herold, Gerd und Mitarbeiter: *Innere Medizin*. Herold. Köln, 2009.
- Heslop HE, Brenner MK, Rooney CM. Donor T cells to treat EBV-associated lymphoma. *N Engl J Med* 1994;331(10): 679–80.
- 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.
- Hierholzer JC. Adenoviruses in the immunocompromised host. *Clin Microbiol Rev* 1992;5(3): 262–74.
- Hodge G, Hodge S, Han P. Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMCs compared to whole blood as shown by Annexin V binding: relevance to cytokine production. *Cytokine* 2000;12(12): 1763–8.

- Hoffman JA, Shah AJ, Ross LA, et al. Adenoviral infections and a prospective trial of cidofovir in pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001;7(7):388–94.
- Hoffmeister B, Bunde T, Rudawsky IM, et al. Detection of antigen-specific T cells by cytokine flow cytometry: the use of whole blood may underestimate frequencies. *Eur J Immunol* 2003;33(12):3484–92.
- Holzknicht, Barbara Juliane: Direkter ex vivo Nachweis Myelin Basic Protein (MBP)-spezifischer T-Helferzellen bei Multiple Sklerose Patienten; Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Medizinische Fakultät – Universitätsklinikum Charité, publiziert am 14.07.2003, urn:nbn:de:kobv:11-10020735.
- Howard DS, Phillips II GL, Reece DE, et al. Adenovirus infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 1999;29(6):1494–501.
- Hromas R, Cornetta K, Srour E, et al. Donor leukocyte infusion as therapy of life-threatening adenoviral infections after T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood* 1994a;84(5):1689–90.
- Hromas R, Clark C, Blanke C, et al. Failure of ribavirin to clear adenovirus infections in T cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994b;14(4):663–4.
- Hutnick NA, Carnathan D, Demers K, et al. Adenovirus-specific human T cells are pervasive, polyfunctional, and cross-reactive. *Vaccine* 2010;28(8):1932–41.
- Ison MG. Adenovirus infections in transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2006;43(3):331–9.
- Ito M, Hirabayashi N, Uno Y, et al. Necrotizing tubulointerstitial nephritis associated with adenovirus infection. *Hum Pathol* 1991;22(12):1225–31.
- James L, Vernon MO, Jones RC, et al. Outbreak of human adenovirus type 3 infection in a pediatric long-term care facility—Illinois, 2005. *Clin Infect Dis* 2007;45(4):416–20.
- Jones MS 2nd, Harrach B, Ganac RD, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis. *J Virol* 2007;81(11):5978–84.
- Kampmann B, Cubitt D, Walls T, et al. Improved outcome for children with disseminated adenoviral infection following allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 2005;130(4):595–603.
- Khanna N, Stuehler C, Conrad B, et al. Generation of a multipathogen-specific T-cell product for adoptive immunotherapy based on activation-dependent expression of CD154. *Blood* 2011;118(4):1121–31.
- Koehl U, Bochennek K, Zimmermann SY, et al. Immune recovery in children undergoing allogeneic stem cell transplantation: absolute CD8<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup> count reconstitution is associated with survival. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(5):269–78.
- Kojaoghlanian T, Flomenberg P, Horwitz MS. The impact of adenovirus infection on the immunocompromised host. *Rev Med Virol* 2003;13(3):155–71.

- Kroes AC, de Klerk EP, Lankester AC, et al. Sequential emergence of multiple adenovirus serotypes after pediatric stem cell transplantation. *J Clin Virol* 2007;38(4):341–7.
- La Rosa AM, Champlin RE, Mirza N, et al. Adenovirus infections in adult recipients of blood and marrow transplants. *Clin Infect Dis* 2001;32(6):871–6.
- Lang P, Handgretinger R, Niethammer D, et al. Transplantation of highly purified CD34<sup>+</sup> progenitor cells from unrelated donors in pediatric leukemia. *Blood* 2003;101(4):1630–6.
- Lankester AC, van Tol MJ, Claas EC, et al. Quantification of adenovirus DNA in plasma for management of infection in stem cell graft recipients. *Clin Infect Dis* 2002;34(6):864–7.
- Lankester AC, Heemskerk B, Claas EC, et al. Effect of ribavirin on the plasma viral DNA load in patients with disseminating adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004;38(11):1521–5.
- Leen AM, Sili U, Savoldo B, et al. Fiber-modified adenoviruses generate subgroup cross-reactive, adenovirus-specific cytotoxic T lymphocytes for therapeutic applications. *Blood* 2004a;103(3):1011–9.
- Leen AM, Sili U, Vanin EF, et al. Conserved CTL epitopes on the adenovirus hexon protein expand subgroup cross-reactive and subgroup-specific CD8<sup>+</sup> T cells. *Blood* 2004b;104(8):2432–40.
- Leen AM, Myers GD, Sili U, et al. Monoculture-derived T lymphocytes specific for multiple viruses expand and produce clinically relevant effects in immunocompromised individuals. *Nat Med* 2006;12(10):1160–6.
- Leen AM, Tripic T, Rooney CM. Challenges of T cell therapies for virus-associated diseases after hematopoietic stem cell transplantation. *Expert Opin Biol Ther* 2010;10(3):337–51.
- Legrand F, Berrebi D, Houhou N, et al. Early diagnosis of adenovirus infection and treatment with cidofovir after bone marrow transplantation in children. *Bone Marrow Transplant* 2001;27(6):621–6.
- Leibold J, Feucht J, Halder A, et al. Induction of T<sub>helper</sub>1-driven antiviral T-cell lines for adoptive immunotherapy is determined by differential expression of IFN- $\gamma$  and T-cell activation markers. *J Immunother* 2012;35(9):661–9.
- Leruez-Ville M, Minard V, Lacaille F, et al. Real-time blood plasma polymerase chain reaction for management of disseminated adenovirus infection. *Clin Infect Dis* 2004;38(1):45–52.
- Lion T, Baumgartinger R, Watzinger F, et al. Molecular monitoring of adenovirus in peripheral blood after allogeneic bone marrow transplantation permits early diagnosis of disseminated disease. *Blood* 2003;102(3):1114–20.
- Lion T, Kosulin K, Landlinger C, et al. Monitoring of adenovirus load in stool by real-time PCR permits early detection of impending invasive infection in patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2010;24(4):706–14.
- Ljungman P, Ribaud P, Eyrich M, et al. Cidofovir for adenovirus infections after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: a survey by the Infectious Diseases Working Party of the European Group for Blood and Marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2003;31(6):481–6.

- Ljungman P. Treatment of adenovirus infections in the immunocompromised host. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004;23(8):583–8.
- Lugthart G, Albon SJ, Ricciardelli I, et al. Simultaneous generation of multivirus-specific and regulatory T cells for adoptive immunotherapy. *J Immunother* 2012;35(1):42–53.
- Manz R, Assenmacher M, Pflüger E, et al. Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92(6):1921–25.
- Marttila M, Persson D, Gustafsson D, et al. CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol* 2005;79(22):14429–36.
- Meier S, Stark R, Frentsch M, et al. The influence of different stimulation conditions on the assessment of antigen-induced CD154 expression on CD4<sup>+</sup> T cells. *Cytometry A* 2008;73(11):1035–42.
- Melendez CP, Florentino MM, Martinez IL, et al. Outbreak of epidemic keratoconjunctivitis caused by adenovirus in medical residents. *Mol Vis* 2009;15:557–62.
- Metzgar D, Osuna M, Kajon AE, et al. Abrupt emergence of diverse species B adenoviruses at US military recruit training centers. *J Infect Dis* 2007;196(10):1465–73.
- Miyamura K, Hamaguchi M, Taji H, et al. Successful ribavirin therapy for severe adenovirus hemorrhagic cystitis after allogeneic marrow transplant from close HLA donors rather than distant donors. *Bone Marrow Transplant* 2000;25(5):545–8.
- Morfin F, Boucher A, Najjoulallah F, et al. Cytomegalovirus and adenovirus infections and diseases among 75 paediatric unrelated allogeneic bone marrow transplant recipients. *J Med Virol* 2004;72(2):257–62.
- Moro MR, Bonville CA, Suryadevara M, et al. Clinical features, adenovirus types, and local production of inflammatory mediators in adenovirus infections. *Pediatr Infect Dis J* 2009;28(5):376–80.
- Muller WJ, Levin MJ, Shin YK, et al. Clinical and in vitro evaluation of cidofovir for treatment of adenovirus infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2005;41(12):1812–6.
- Murphy, Kenneth, Travers, Paul, Walport, Mark: *Janeway Immunologie*. 7. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- Myers GD, Krance RA, Weiss H, et al. Adenovirus infection rates in pediatric recipients of alternate donor allogeneic bone marrow transplants receiving either antithymocyte globulin (ATG) or alemtuzumab (Campath). *Bone Marrow Transplant* 2005;36(11):1001–8.
- Myers GD, Bollard CM, Wu MF, et al. Reconstitution of adenovirus-specific cell-mediated immunity in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(11):677–86.
- Nebenführ A, Ritzenthaler C, Robinson DG, Brefeldin A: deciphering an enigmatic inhibitor of secretion. *Plant Physiol* 2002;130(3):1102–8.



- Nomura LE, Walker JM, Maecker HT. Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4<sup>(+)</sup> T cells. *Cytometry* 2000;40(1):60–8.
- Olive M, Eisenlohr LC, Flomenberg P. Quantitative analysis of adenovirus-specific CD4<sup>+</sup> T-cell responses from healthy adults. *Viral Immunol* 2001;14(4):403–13.
- Olive M, Eisenlohr L, Flomenberg N, et al. The adenovirus capsid protein hexon contains a highly conserved human CD4<sup>+</sup> T-cell epitope. *Hum Gene Ther* 2002;13(10):1167–78.
- Olkinuora H, Talvensaari K, Kaartinen T, et al. T cell regeneration in pediatric allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2007;39(3):149–56.
- Onion D, Crompton LJ, Milligan DW, et al. The CD4<sup>+</sup> T-cell response to adenovirus is focused against conserved residues within the hexon protein. *J Gen Virol* 2007;88(Pt9):2417–25.
- Ott PA, Berner BR, Herzog BA, et al. CD28 costimulation enhances the sensitivity of the ELISPOT assay for detection of antigen-specific memory effector CD4 and CD8 cell populations in human diseases. *J Immunol Methods* 2004;285(2):223–35.
- Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 1994;330(17):1185–91.
- Peggs KS, Verfuert S, Pizzey A, et al. Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 2003;362(9393):1375–7.
- Peggs KS, Mackinnon S. Augmentation of virus-specific immunity after hematopoietic stem cell transplantation by adoptive T-cell therapy. *Hum Immunol* 2004;65(5):550–7.
- Perreau M, Kremer EJ. Frequency, proliferation, and activation of human memory T cells induced by a nonhuman adenovirus. *J Virol* 2005;79(23):14595–605.
- Poindexter NJ, Smith MA, Haynes AE, et al. Regulatory function of human CD4<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes. *Transpl Immunol* 1999;7(1):45–9.
- Regn S, Raffegerst S, Chen X, et al. Ex vivo generation of cytotoxic T lymphocytes specific for one or two distinct viruses for the prophylaxis of patients receiving an allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant* 2001;27(1):53–64.
- 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.
- Riddell SR, Walter BA, Gilbert MJ, et al. Selective reconstitution of CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte responses in immunodeficient bone marrow transplant recipients by the adoptive transfer of T cell clones. *Bone Marrow Transplant* 1994;14(4):S78–84.
- Robinson CM, Seto D, Jones MS, Dyer DW, Chodosh J. Molecular evolution of human species D adenoviruses. *Infect Genet Evol* 2011;11(6):1208–17.
- Roelvink PW, Lizonova A, Lee JG, et al. The coxsackievirus-adenovirus receptor protein can function as a cellular attachment protein for adenovirus serotypes from subgroups A, C, D, E, and F. *J Virol* 1998;72(10):7909–15.

- Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 1995;345(8941):9–13.
- Rooney CM, Smith CA, Ng CY, et al. Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 1998;92(5):1549–55.
- Rowe WP, Huebner RJ, Gilmore LK, et al. Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 1953;84(3):570–3.
- Runde V, Ross S, Trensche R, et al. Adenoviral infection after allogeneic stem cell transplantation (SCT): report on 130 patients from a single SCT unit involved in a prospective multi center surveillance study. *Bone Marrow Transplant* 2001;28(1):51–7.
- Russell WC. Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol* 2000;81(Pt 11):2573–604.
- Russell WC. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 2009;90(Pt 1):1–20.
- Sachs, Lothar, Hedderich, Jürgen: *Angewandte Statistik. Methodensammlung mit R. 12., vollst. neu bearb. Auflage*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2006.
- Schilham MW, Claas EC, van Zaane W, et al. High levels of adenovirus DNA in serum correlate with fatal outcome of adenovirus infection in children after allogeneic stem-cell transplantation. *Clin Infect Dis* 2002;35(5):526–32.
- 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.
- Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, et al. Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol* 2003;77(17):9183–91.
- Sester M, Sester U, Alarcon Salvador S, et al. Age-related decrease in adenovirus-specific T cell responses. *J Infect Dis* 2002;185(10):1379–87.
- Seto D, Chodosh J, Brister JR, Jones MS; Members of the Adenovirus Research Community. Using the whole-genome sequence to characterize and name human adenoviruses. *J Virol* 2011;85(11):5701–2.
- Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol Rev* 2009;229(1):5–11.
- Shields AF, Hackman RC, Fife KH, et al. Adenovirus infections in patients undergoing bone-marrow transplantation. *N Engl J Med* 1985;312(9):529–33.
- Sivaprakasam P, Carr TF, Coussons M, et al. Improved outcome from invasive adenovirus infection in pediatric patients after hematopoietic stem cell transplantation using intensive clinical surveillance and early intervention. *J Pediatr Hematol Oncol* 2007;29(2):81–5.
- Smith CA, Woodruff LS, Kitchingman GR, et al. Adenovirus-pulsed dendritic cells stimulate human virus-specific T-cell responses in vitro. *J Virol* 1996;70(10):6733–40.
- Smith CA, Woodruff LS, Rooney C, et al. Extensive cross-reactivity of adenovirus-specific cytotoxic T-cells. *Hum Gene Ther* 1998;9(10):1419–27.
- Suni MA, Picker LJ, Maino VC. Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1998;212(1):89–98.

- Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N Engl J Med* 2006;355(10): 1018–28.
- Symeonidis N, Jakubowski A, Pierre-Louis S, et al. Invasive adenoviral infections in T-cell-depleted allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: high mortality in the era of cidofovir. *Transpl Infect Dis* 2007;9(2): 108–13.
- Tang J, Olive M, Champagne K, et al. Adenovirus hexon T-cell epitope is recognized by most adults and is restricted by HLA DP4, the most common class II allele. *Gene Ther* 2004;11(18): 1408–15.
- Tang J, Olive M, Pulmanusahakul R, et al. Human CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell responses to adenovirus capsid proteins. *Virology* 2006;350(2): 312–22.
- Van Driessche A, Gao L, Stauss HJ, et al. Antigen-specific cellular immunotherapy of leukemia. *Leukemia* 2005;19(11): 1863–71.
- Van Tol MJ, Kroes AC, Schinkel J, et al. Adenovirus infection in paediatric stem cell transplant recipients: increased risk in young children with a delayed immune recovery. *Bone Marrow Transplant* 2005;36(1): 39–50.
- Veltrop-Duits LA, Heemskerk B, Sombroek CC, et al. Human CD4<sup>+</sup> T cells stimulated by conserved adenovirus 5 hexon peptides recognize cells infected with different species of human adenovirus. *Eur J Immunol* 2006;36(9): 2410–23.
- Walls T, Shankar AG, Shingadia D. Adenovirus: an increasingly important pathogen in paediatric bone marrow transplant patients. *Lancet Infect Dis* 2003;3(2): 79–86.
- Walls T, Hawrami K, Ushiro-Lumb I, et al. Adenovirus infection after pediatric bone marrow transplantation: is treatment always necessary? *Clin Infect Dis* 2005;40(9): 1244–49.
- Walsh MP, Chintakuntlawar A, Robinson CM, et al. Evidence of molecular evolution driven by recombination events influencing tropism in a novel human adenovirus that causes epidemic keratoconjunctivitis. *PLoS One* 2009;4(6): e5635.
- 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.
- Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, et al. Integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 1993;73(2): 309–19.
- Yeung R, Eshaghi AR, Lombos E, et al. Characterization of culture-positive adenovirus serotypes from respiratory specimens in Toronto, Ontario, Canada: September 2007-June 2008. *Virol J* 2009;6: 11.
- Yusuf U, Hale GA, Carr J, et al. Cidofovir for the treatment of adenoviral infection in pediatric hematopoietic stem cell transplant patients. *Transplantation* 2006;81(10): 1398–404.
- Zandvliet ML, van Liempt E, Jedema I, et al. Simultaneous isolation of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells specific for multiple viruses for broad antiviral immune reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *J Immunother* 2011;34(3): 307–319.

---

## INTERNETADRESSEN

Centers for Disease Control (CDC). Outbreak of pharyngoconjunctival fever at a summer camp – North Carolina, 1991. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1992;41(19):342–4.

Erhältlich unter: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00016704.htm>

(abgerufen am 11.07.2011)

Robert Koch-Institut: RKI-Ratgeber für Ärzte: Keratoconjunctivitis epidemica und andere Konjunktivitiden durch Adenoviren (Stand: 18.03.2010) unter:

[http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber\\_](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Keratoconjunctivitis.html?nn=2374512)

[Keratoconjunctivitis.html?nn = 2374512](http://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Merkblaetter/Ratgeber_Keratoconjunctivitis.html?nn=2374512) (abgerufen am 11.07.2011)

[http://www.bdbiosciences.com/documents/BD\\_FACSCalibur\\_instructions.pdf](http://www.bdbiosciences.com/documents/BD_FACSCalibur_instructions.pdf)

(abgerufen am 11.07.2011)

[http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets\\_en/288/DS130\\_091\\_329.pdf](http://www.miltenyibiotec.com/download/datasheets_en/288/DS130_091_329.pdf)

(abgerufen am 27.01.2012)

[http://www.miltenyibiotec.com/en/PG\\_250\\_370\\_CliniMACS\\_Plus\\_Instrument.aspx](http://www.miltenyibiotec.com/en/PG_250_370_CliniMACS_Plus_Instrument.aspx)

(abgerufen am 27.01.2012)

---

## ANHANG

### EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

»Ich, Andra Zimmermann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Charakterisierung eines Adenovirus-spezifischen T-Zell-Produkts nach Standardisierung des Herstellungsprozesses-Vorbereitung für den klinischen Einsatz bei pädiatrischen Patienten nach allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation mit Komplikationen durch Adenoviren oder präemptiv* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe »Uniform Requirements for Manuscripts (URM)« des ICMJE [www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§ 156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.«

---

## ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN

### Publikation 1: Poster

Sophie Gaubert, Andra Zimmermann, Sebastian Voigt, Simone Rossa, Andreas Thiel, Olga Arbach and Wolfram Ebell: *Towards rational adoptive T-cell therapy for adenovirus infection in paediatric allogeneic stem cell transplants.*

4th International Symposium on the Clinical Use of Cellular Products: Cellular Therapy 2007, Universität Regensburg.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Gewinnung mononukleärer Zellen aus Vollblut, Stimulation, IFN $\gamma$  Sekretionsassay und Separation mittels CliniMACS mit Erhalt des AdV-spezifischen T-Zell-Produkts und durchflusszytometrische Analyse

### Publikation 2: Poster

Sophie Gaubert, Andra Zimmermann, Olga Arbach, Simone Rossa, Andreas Thiel, Sebastian Voigt and Wolfram Ebell: *Adenovirus-specific T cell therapy in paediatric stem cell transplants: Isolation and expansion of donor-derived T lymphocytes.*

37th Annual Meeting of the German Society for Immunology 2007, Universität Heidelberg.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der Gewinnung mononukleärer Zellen aus Vollblut, Stimulation, IFN $\gamma$  Sekretionsassay und Separation mittels CliniMACS mit Erhalt des AdV-spezifischen T-Zell-Produkts und durchflusszytometrische Analyse

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

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



## DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. Gaedicke, dem ehemaligen Direktor der Klinik für Allgemeine Pädiatrie am Campus Virchow-Klinikum der Charité, danke ich für die Überlassung dieses Themas und für die freundliche Unterstützung und Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit.

Mit der Betreuung der Arbeit war Herr Dr. med. Ebell befasst, er ist Oberarzt der Station für Stammzelltransplantation der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Onkologie und Hämatologie am Virchow-Klinikum der Charité. Ihm danke ich herzlich für sein Engagement, seine fachliche Kritik und Beratung, seine Anregungen, die den klinischen Bezug des Themas betreffen, und konstruktive wissenschaftliche Gespräche sowie Durchsicht der Arbeit.

Mit der Einführung in die Materie sowie der Anleitung war Frau Dr. med. Arbach betraut. Ihr danke ich ganz herzlich für die stetige Ansprechbarkeit, Diskussion von Ergebnissen und weiterem Vorgehen sowie ihren Einsatz bei experimentellen Teilen dieser Arbeit. Auch Herrn Dr. med. Voigt danke ich für die initiale Einarbeitung im Labor für Zelluläre Therapie der Charité am Standort Virchow-Klinikum. Dem Labor für Zelluläre Therapie und seinen Mitarbeitern, allen voran Frau Dr. Gaubert und Frau Roßa, gilt mein besonderer Dank für die sehr gute und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die gemeinsame Experimentierfreudigkeit und Hilfe bei allen Versuchen sowie fachliche und inhaltliche Unterstützung in technischen, organisatorischen und wissenschaftlichen Fragen. Auch möchte ich mich Frau Guirassy für ihren Einsatz in organisatorischen Belangen bedanken.

An dieser Stelle möchte ich vor allem allen Probanden danken, die zum Teil mehrmals ihr Blut zur Verfügung gestellt haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Der ehemaligen Arbeitsgruppe (Klinische Immunologie) von Herrn Dr. med. Thiel und den Kollegen des Deutschen Rheuma-Forschungszentrums (DRFZ) danke ich für die Anleitung in methodischen Techniken sowie den wissenschaftlichen Exkursionen und Diskussionen. Der AG Thiel und dem DRFZ gilt auch mein Dank bei der Einarbeitung in die Durchflusszytometrie und Bereitstellung von Laborräumlichkeiten sowie notwendigen Geräten.

Für die statistische Begleitung danke ich Paul Böhm und Jenni Kuppe.

Allen Freunden, insbesondere Ines Becker und Lisa Hollinde, möchte ich für die moralische Unterstützung und die Durchsicht der Arbeit danken.

Meinem Lebensgefährten Volker Böhm danke ich zum einen für die Gestaltung der Arbeit und zum anderen für den Rückhalt, die Geduld und das Verständnis während des Entstehungsprozesses dieser Arbeit.