

# 3 MATERIAL UND METHODEN

## 3.1 Probanden, Ethikkommission und Gentechnikgenehmigung

### 3.1.1 Probanden

33 gesunde freiwillige Testpersonen wurden serologisch auf ihren HCMV-IgG-Status untersucht. 10 Personen waren positiv für HCMV-IgG, von welchen 8 unsere Testpersonen wurden. Alle 8 Probanden waren seronegativ gegen HIV, HBV und HCV. 3 der HCMV-seronegativen Probanden wurden für die Vorversuche getestet.

Immulite <sup>®</sup> CMV-Antigenmix	DPC-Biermann, Bad Nauheim
--------------------------------------	---------------------------

### 3.1.2 Ethikvotum

Die Ethikkommission der Charité stimmte dem Vorhaben als Teilprojekt des Antrages Nr. 236/2002 über „Generierung und Charakterisierung von CMV-spezifischen T-Zell-Linien“ in ihrer 297. Sitzung am 16.01.2003 zu. Zur Auflage wurde dabei gemacht, dass vor Beginn der Arbeiten die Genehmigung für gentechnische S2-Arbeiten von der zuständigen Behörde vorliegen müsse (siehe 3.1.3).

### 3.1.3 Gentechnikgenehmigung

Am 21.02.2003 wurde die Zustimmung für gentechnische Arbeiten mit rekombinanten, replikationsdefekten Epstein-Barr-Viren, die das pp65-Gen des Humanen Zytomegalievirus enthalten, vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin für die Sicherheitsstufe 2 erteilt. Unter dem Nachweis, dass die primären humanen B-Zellen, die latent mit den replikationsdefekten EBV-Viren infiziert wurden, keine EBV-Partikel mehr abgeben, konnten die Zellen unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 1 verwendet werden.

## 3.2 Zellkultur

### 3.2.1 Allgemeines

Soweit nicht gesondert angegeben, wurde unter folgenden Bedingungen gearbeitet:

Medium: RPMI-Medium mit 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin

Inkubationsbedingungen: 37 Grad, 5 % CO<sup>2</sup> in einem befeuchteten Inkubator.

Zentrifugation: 8 min, 300 G, 20 Grad.

Verwendete Materialien und Geräte allgemein:

RPMI	Biochrom AG, Berlin
FCS	Biochrom AG, Berlin
Penicillin/Streptomycin	Gibco BRL, Gaithersburg
PBS (10x)	Sigma, Steinheim
Aqua dest	Delta select, Pfullingen
3,5 ml Transfer-Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
15 und 50 ml Plastikröhrchen (Falcon)	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes
24 und 96 WP	Costar <sup>®</sup> , NewYork
25 und 75 cm <sup>2</sup> Zellkulturflaschen	Costar <sup>®</sup> , NewYork
1, 2, 5, 10, 25 ml Plastikpipetten	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes
Sterilfilter (0,2 µm)	Fisher Scientific, Hampton
Sterile Pipetten (1, 2, 5, 10, 25 ml)	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes
Pipetierhilfe	Falcon, Becton Dickinson, Franklin Lakes
10, 100, 500 µl Pipetten	Eppendorf, Hamburg
10, 100, 500 µl Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Biofuge Fresco, Heraeus, Berlin
Inkubator	Heraeus, Berlin
Sterile Werkbank (Antares 48/72)	Heraeus, Berlin
Mikroskop	Leica, Braunschweig
Autoklav	Gössner, Hamburg
Kühlschrank	Liebherr, Oberhausen

### 3.2.2 Zellzählung

Die zu zählenden Zellen wurden je nach erwarteter Zelldichte verdünnt, mit Trypanblau gefärbt, und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Dazu wurden alle 4 Quadrate ausgezählt, der Mittelwert der Zellzahl lebender (nicht blau angefarbter) Zellen pro Quadrat errechnet, und mit der Verdünnung multipliziert. Dies ergab die Zellkonzentration  $\times 10^4$  pro ml Zellsuspension.

Trypanblau	Bio Whittaker, Walkersville
Zählkammer	Neubauer improved, Fein-Optik, Bad Blankenburg

### 3.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Nicht benötigte PBMCs, etablierte PHA-Blasten, LCLs, pp65 mini-LCLs und CTLs wurden eingefroren, soweit sie für eine spätere Verwendung vorgesehen waren. Dazu wurden die Zellen gezählt, 2-mal in supplementiertem RPMI gewaschen (bei 4 Grad), pelletiert, und das resuspendierte Pellet 20 min auf Eis gekühlt. Danach wurde das Pellet in gekühltem Einfriermedium in einer Konzentration von 5 bis  $10 \times 10^6$ /ml resuspendiert und zügig in

beschriftete 1 oder 1,8 ml Cryoröhrchen überführt. Die Cryoröhrchen wurden mit Hilfe einer temperaturkontrollierten Einfrierbox um 1 Grad pro Minute auf minus 70 Grad abgekühlt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff mit einer Temp. von –180 Grad überführt.

Einfrierbox	Nalgene, USA
Einfriermedium	90% FCS + 10 % DMSO
DMSO	Merck, Darmstadt
1 ml und 1,8 ml Cryoröhrchen	Nunc, Roskilde (Dänemark)
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Stickstofftank	Taylor-Wharton, Theodore (USA)
Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart

Zum Auftauen wurden die Cryoröhrchen in einem 37 Grad warmem Wasserbad bis knapp über den Schmelzpunkt erwärmt und anschließend in einem großen Volumen eiskalten Mediums vorsichtig resuspendiert. Nach 2-maligem Waschen in diesem Medium wurden die Zellen in warmes Medium überführt.

### 3.2.4 Ficollgradient zur Isolation von PBMCs

Mit Hilfe des Ficoll-Gradienten wurden PBMCs aus peripherem heparinisiertem Blut der Probanden isoliert. Dazu wurde das Blut 1 : 1 mit PBS gemischt und die Mischung vorsichtig über 3 ml Ficoll in 14 ml - Plastiköhrchen überschichtet. Nach Zentrifugation (400 G, 40 min, 20 Grad, ohne Dezeleration) wurde der Zellring mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und 2-mal mit PBS gewaschen.

Ficoll-Paque <sup>TM</sup> (endotoxin tested)	Amersham Pharmacia, Freiburg
14 ml – Plastiköhrchen	Greiner Cellstar, Utah

### 3.2.5 Herstellung der PHA-Blasten

Für jeden der 8 Probanden wurden  $10^7$  frisch isolierte bzw. aufgetaute PBMCs in 10 ml Zellkulturmedium einmalig mit 5µg PHA/ml versetzt, auf 5 Wells einer 24-Wellplatte (24-WP) verteilt und 7 Tage inkubiert. Ab dem zweiten Tag wurde das Medium mit 200U IL2/ml supplementiert. Nach 7 Tagen wurden die Zellen geerntet und bis zur weiteren Verwendung als Zielzellen im Zytotoxizitätstest eingefroren. 7 Tage vor dem geplanten Zytotoxizitätstest wurden die Zellen aufgetaut und bei Standardbedingungen in IL2-haltigem Medium (200 U/ml) inkubiert, wobei ebenfalls 2-täglich ein Mediumwechsel stattfand.

PHA	Sigma, Steinheim
IL-2	Chiron, München

### 3.2.6 Herstellung der wt-LCLs

$5 \times 10^6$  frische bzw. aufgetaute pelletierte PBMCs wurden in 200  $\mu$ l Viruskonzentrat des B95-8 Stammes resuspendiert und anschließend mit 1,8 ml RPMI-Medium aufgefüllt. Die eine Hälfte der Suspension wurde in 5 Wells (a 200  $\mu$ l) einer 96-Wellplatte (96-WP) verteilt, die andere Hälfte durch Zugabe von supplementiertem RPMI im Verhältnis 1 : 1 weiter verdünnt und auf 10 Wells der gleichen 96-WP verteilt. Da ein optimales Wachstum der LCLs unter anderem von der Zelldichte abhängt, erhielten wir so Wells mit verschiedener Zelldichte, nämlich 2,5 und  $5 \times 10^5$  PBMCs. Anfangs im wöchentlichen Abstand, später nach Bedarf, wurden 100  $\mu$ l des Überstandes durch frisches RPMI-Medium ersetzt. Nach Sichtbarwerden deutlicher Proliferation wurden je 3 Wells der 96-WP auf eine 24-WP überführt und von dort nach weiterem sichtbarem Wachstum zunächst in eine kleine, anschließend eine große Zellkulturflasche überführt. Man kann nicht ausschließen, dass manche EBV-Viren, die normalerweise in LCLs latent integriert sind, in die lytische Phase übergehen und infektiöse Viren freisetzen. Deshalb wurde, sobald die LCLs ausreichend proliferierten, 1  $\mu$ l Acyclovir/ml Medium zugegeben. Bei Erreichen einer Zellzahl von mind.  $3 \times 10^7$  wurden diese sofort eingesetzt bzw. für die spätere Verwendung eingefroren.

Ciclosporin A (CsA)	Sandoz AG, Nürnberg
B 95-8 Virus Stamm	Geschenk von C. Rooney, CAGT Houston
Aciclovir	Ratiopharm, Ulm

### 3.2.7 Herstellung transgener pp65 mini-LCLs

Pp65 mini-LCLs wurden durch Infektion von B-Zellen mit replikationsdefekten, Virion-verpackten pp65 mini-EBV-Plasmiden hergestellt. Die pp65 codierende Sequenz stammte vom HCMV-Stamm AD 169, und wurde in das mini-EBV-Plasmid p1478.A inseriert. Als Verpackungszelllinie wurde die erste-Generation-Verpackungszelllinie TR2-/293 verwendet (Kempkes 1995a; Kempkes 1995b; Delecluse 1999).

Von jedem Probanden wurden  $3 \times 10^6$  PBMCs in je 1 ml Virionkonzentrat, gemischt mit 1 ml CsA-Medium (Ciclosporin-A-enthaltendes Medium), aufgelöst, und anschließend auf 5 Wells einer 96-WP verteilt. Mit den Zellen wurde weiterhin analog wie mit den wt-LCLs verfahren.

Virion-verpackte pp65 mini-EBV-Plasmide	Geschenk von Moosmann, A., GSF, München
---	---

### 3.3 Selektion und Expansion der T-Zellen

#### 3.3.1 Determinierung der Inkubationszeit für die Peptidstimulation (Vorversuch)

4 h, 6 h und 12 h wurden als Inkubationszeit zur Stimulation mit den pp65-OPPs getestet. Dazu wurde für 3 HCMV-seronegative sowie für 3 HCMV-seropositive Probanden der IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assay für den OPP von pp65, für DMSO als Negativ-Kontrolle sowie für Con A (Concavalin A) als Positiv-Kontrolle wie unten beschrieben durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend (ohne Selektion) im FACS (siehe unten) analysiert.

ConA	Sigma, Steinheim
------	------------------

#### 3.3.2 Peptidstimulation für die Vorversuche sowie für Protokoll I und II

Frische PBMCs (für die T-Zellgenerierung aus 2 x 50ml Heparinblut je Proband) wurden nach ihrer Isolierung mittels Ficollgradient in supplementiertem RPMI mit einer Zellkonzentration von  $2 \times 10^7$ /ml resuspendiert. Auf einer 24-WP wurden 0,5 ml der Zellsuspension pro Well verteilt und entweder sofort oder nach maximal 12 h im Inkubator weiterverarbeitet. Dazu wurden die Zellsuspension mit 3 $\mu$ l pp65-OPP-Peptidgemisch/ml versetzt und anschließend für 6 h bzw. im Rahmen der Vorversuche zusätzlich für 4 h und 12 h stimuliert. Die Endkonzentration für jedes Einzelpeptid betrug dabei 1  $\mu$ g/ml. Für die DMSO-Kontrolle wurden ebenfalls 3  $\mu$ l/ml eingesetzt; für ConA 6  $\mu$ l/ml.

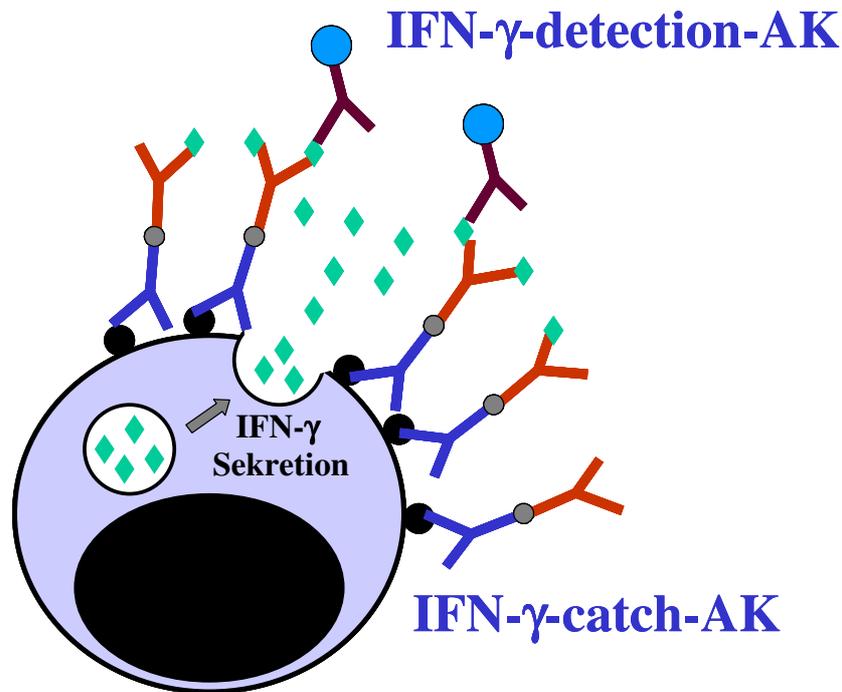
pp65 Peptidpool	Jerini, Berlin
-----------------	----------------

#### 3.3.3 Selektion der T-Zellen nach dem IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assay für Protokoll I und II

Nach der Peptidstimulation wurden die Zellen inklusive der adhärenenten Zellen (durch Spülen mit kaltem PBS) geerntet. Nach dem Waschen in PBS (10 min bei 4 Grad für das gesamte Protokoll des IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assay) wurden die pelletierten Zellen auf Eis mit einem Antikörper (AK) inkubiert, welcher an das CD45-Molekül der Lymphozyten bindet und eine weitere Bindungsstelle für IFN- $\gamma$  besitzt („IFN- $\gamma$ -catch-AK“) (für  $10^7$  Zellen: 400 $\mu$ l Medium, 100  $\mu$ l AK). Nach 5 min wurden die Zellen für die IFN- $\gamma$ -Sekretionsphase in warmem supplementiertem RPMI unter langsamer kontinuierlicher Rotation inkubiert, wobei die Zellkonzentration maximal  $10^6$  Zellen/ml betrug, und maximal 30ml Zellsuspension in den verwendeten 50ml-Falcons enthalten waren. Nach 45 min Inkubationszeit wurde durch Auffüllen der Falcons mit eiskaltem RPMI und anschließendem Waschen die IFN- $\gamma$ -Sekretion gestoppt und die Zellen, welche IFN- $\gamma$  gebunden hatten, wurden durch 10-minütige Inkubation auf Eis mit einem zweiten, PE-markierten „IFN- $\gamma$ -detection-AK“ markiert (für  $10^7$  Zellen: 400 $\mu$ l Medium, 100  $\mu$ l AK). Für die

Vorversuche konnten diese Zellen anschließend Oberflächen-gefärbt und im Durchflusszytometer (FACS) analysiert werden. Für die T-Zell-Generierung nach Protokoll I und II wurden die PE-markierten Zellen mit einem dritten, anti-PE-microbeads-AK (für  $10^7$  Zellen: 400µl Medium, 100 µl AK) 25 min lang bei 6 Grad C inkubiert und anschließend gewaschen.

**Abbildung 7: Prinzip des IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assay**



Das Prinzip des IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assay ist hier am Beispiel einer IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zelle dargestellt. Primär bindet ein chimärer monoklonaler AK „IFN- $\gamma$ -catch-AK“ mit einem Ende (hier blau gezeichnet) an den CD45 Rezeptor der Lymphozyten (schwarzer Punkt). Das rot gezeichnete Ende dieses AKs bindet IFN- $\gamma$ , falls dieses von der Zelle sezerniert wird. Um eine Bindung von IFN- $\gamma$  der Nachbarzellen durch engen räumlichen Kontakt zu vermeiden, ist während der 45-minütigen Inkubationszeit eine kontinuierliche Rotation der Zellen notwendig. Diejenigen Zellen, auf denen der IFN- $\gamma$ -catch-AK ein IFN- $\gamma$ -Molekül gebunden hat, können durch den PE-markierten IFN- $\gamma$ -detection AK im FACS sichtbar gemacht werden bzw. in einem weiteren Schnitt durch beads markiert und magnetisch isoliert werden.

Von den gewaschenen Zellen wurde anschließend durch ein bzw. zwei MACS Säulen magnetisch die Negativ-Fraktion von der Positiv-Fraktion getrennt. Die Negativ-Fraktion wurde mit 20 GY bestrahlt und zur Verwendung als autologe Stimulatorzellen zum Teil sofort verwendet bzw. zum Teil in mehreren Aliquots eingefroren. Die Positiv-Fraktion wurde gezählt und je nach Zellzahl auf mehrere Wells einer 96-WP in RPMI mit 100U IL-2/ml verteilt.

Für Protokoll I wurden pro Well selektierte T-Zellen 500.000 bestrahlte autologe PBMCs als Stimulatorzellen addiert, für Protokoll II 100.000 autologe, mit 20 GY bestrahlte PBMCs der Negativ-Fraktion.

IFN-gamma secretion Kit: IFN-gamma catch AK IFN-gamma detection AK (PE-gelabelt) Anti-PE-microbeads	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
Mini-MACS Magnet MACS-Säule	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach
Inkubator mit Rotationsvorrichtung Typ BK 6	Ehret, Emmendingen
Bestrahlungsgerät Gamma-Cell 40	Atomic Energy, Mississauga (Kanada)

### 3.3.4 Generierung der T-Zellen für Protokoll III

1-2 x 10<sup>7</sup> frische PBMCs wurden zusammen mit bestrahlten (30 Gy) autologen, pp65 exprimierenden mini-LCLs in einem Verhältnis von 40 : 1 in supplementiertem RPMI ohne IL2 koinkubiert, wobei pro Well einer 24-WP 10<sup>6</sup> PBMCs eingesetzt wurden. Die Zellen wurden für 10 Tage ohne Mediumwechsel inkubiert und anschließend wie unten beschrieben weiter restimuliert.

### 3.3.5 Expansion der T-Zellen durch Restimulation

Im wöchentlichen Abstand für mindestens 3 Wochen wurden alle T-Zelllinien restimuliert. Für Protokoll II und III wurden dazu nach dem Waschen und Zählen der T-Zellen autologe, bestrahlte pp65 mini-LCLs im Verhältnis 4 : 1 dazu gegeben. Bei Protokoll I und II wurde während der gesamten Expansionszeit eine IL2-konzentration von 100U IL2/ml aufrechterhalten. Für Protokoll III wurde am Tag 4 bis 6 der 2. Stimulation, abhängig vom mikroskopischen Aspekt, mit IL2 Zugabe (100U/ml) begonnen.

Für das Protokoll I wurden die gewaschenen und gezählten T-Zellen mit bestrahlten PBMCs (autologe Zellen der Negativ-Fraktion bzw. bei weiterem Bedarf bestrahlte allogene PBMCs aus buffycoats) in einem Verhältnis von 1 : 2 auf einer neuen Platte inkubiert. Für alle Protokolle wurde bei Restimulation eine T-Zellkonzentration von 1 x 10<sup>6</sup>/Well einer 24-WP eingesetzt.

buffycoats	Blutbank, Charité
------------	-------------------

## 3.4 Analytische Methoden

### 3.4.1 HLA-Typisierung

Um partielles oder komplettes MHC „mismatch“ (nicht passend) zu evaluieren und damit Kreuzreaktivität gegen allogene Zellen im Zytotoxizitätstest zu erklären bzw. auszuschließen, ließen wir die Probanden HLA-typisieren. Die Typisierung erfolgte serologisch und aus DNA

gegen die Major-Antigene des A- und B-Locus von HLA-Klasse I sowie für HLA-Klasse II im Institut für Rechtsmedizin der Charité Berlin.

### 3.4.2 PCR

DNA wurde aus den LCLs und den pp65 mini-LCLs mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit präpariert und in 70µl Aqua dest aufgelöst. Durch PCR wurden für die pp65-mini-LCLs sowie für die wt-LCLs die Anwesenheit oder Abwesenheit pp65 mini-EBV-spezifischer und Wildtyp-EBV-spezifischer Sequenzen überprüft.

Die Amplifikation der Sequenzen wurde mit je 32 Zyklen mit 30 Sekunden Denaturierung bei 94 Grad, Primer-Hybridisierung bei 61 Grad und Elongation bei 72 Grad durchgeführt. Anschließend wurden die Proben in einem 1,5 % Agarosegel mit 3 µg Ethidiumbromid pro 100 ml bei 180 Volt Gleichspannung für ca. 20 min aufgetrennt und unter UV-Licht evaluiert.

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden
Heizblock	Kleinfeld Labortechnik, Berlin
Ultrazentrifuge Centricon T-324	Kontron, Neufahrn
Cycler Gene Amp <sup>®</sup> , PCR System 9700	Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
Primer	Metabion, Martinsried: pp65 fw: 5'- GAC ACC TGC CCG TAG CTG AC-3' pp65 rev: 5'-GAC ACA GCA GCC CAA AAT GC-3' EBV-wt fw: 5'- ATC TAC ACG GAC CGC GTC C-3' EBV-wt rev: 5'-GAA TCG GGA TCC AGT GCC C-3'
DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
dNTPs	Amersham Pharmacia, Freiburg
1xTAE-buffer	40 mM Tris-base, 20 mM Acetylsäure, 2mM EDTA, ph 8
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Gibco BRL, Gaithersburg
Elektrophoresekammer	Renner GMB, Dannstadt
Gel Imager & E.A.S.Y. Enhanced Analysis System	Herolab, Wiesloch

### 3.4.3 Westernblot und Antikörperfärbung

Für den Proteinnachweis von pp65 wurden je 1 x 10<sup>6</sup> Zellen der Proben 2x mit PBS gewaschen (400G, 5 min, 4 Grad) und anschließend durch Zugabe von 50 µl Extrakt Buffer aufgeschlossen. Das Lysat wurde 15 Minuten bei 4 °C und 4000 G zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Proteinkonzentration auf Eis weiterverwendet, dazu wurde der Coomassie Protein Assay Reagent Kit eingesetzt. Die für den Western Blot eingesetzten 50 µg Protein wurden 1:1 mit SDS-Probenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12,5%-igen SDS-Gelen (nach der Vorschrift „Minigel und

Minigel-Twin“, Biometra, Göttingen). Anschließend wurden diese mit Hilfe des semi-trockenen Fastblot-Systems (Biometra) auf Nitrozellulosemembranen (48 cm<sup>2</sup>) transferiert und für eine halbe Stunde bei 250 mA aufgetrennt. Zur Beurteilung des Transfers sowie der angestrebten gleichstarken Proteinbeladung der einzelnen Taschen wurden die Nitrozellulosemembranen mit einer Ponceaulösung gefärbt und anschließend zweimal 5 Minuten in TBST gewaschen. Nach dem Westernblot wurden die Membranen eine Stunde bei Raumtemperatur in 5%-iger Blockmilch/TBST inkubiert, um unspezifische Bindungen der AK zu verhindern. Nach 2-maligem Waschen in TBST wurde die Membran mit dem primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:100 mit 3%-iger Blockmilch/TBST über Nacht inkubiert (4°C). Der Sekundär-AK wurde 1: 2000 in Blockpuffer verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Nach folgendem Waschen in TBST wurde zur Visualisierung des gebundenen Peroxidase-markierten Sekundärantikörpers der ECL Assay eingesetzt. Die Entwicklung der Membran erfolgte für ca. 10 min in der Dunkelkammer, die dann 2 x 3 min in Entwicklerlösung fixiert wurde.

Extrakt Buffer	10mM Tris/HCl pH 7.4, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM NaF, 20mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , 1% Triton-X-100, 10% Glycerol, 0.1% SDS, 0.5% Desoxycholat
Comassie Protein Reagent Kit	Biometra, Göttingen
TBST-Puffer	10mM Tris-Base, 150mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20 pH 7.6)
2*SDS-Probenpuffer	2ml 0.625M Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 5ml Glycerin, 0.5ml β-Mercaptomethanol, 0.1ml Bromphenolblau (1% in Ethanol) ad 10ml mit aqua dest.
Polyacrylamidgel	870µl aqua dest.; 660µl Acrylamid; 400µl 0.5% Sodiumdodecylsulfat (SDS); 400µl 0.625M Tris/HCl pH 6.8, 10 µl Tetramethyldiamin (Serva, Heidelberg), 25 µl Ammoniumpersulfatlösung (APS)
Nitrocellulose Membranen	Amersham Pharmacia, Freiburg
Semi-dry FastBlot System	Biometra, Göttingen
Primärantikörper: anti-pp65 clone 981	Biodesign International, Maine (USA)
Sekundärantikörper:	Anti-Rabbit IgG-peroxidase, Anti-Maus IgG-peroxidase Amersham Pharmacia, Freiburg
Transfer Puffer	25mM Tris-Base, 150mM Glyzerin, 10% Methanol
Ponceau Färbelösung	Sigma, Steinheim
Gel-Blotting Paper	Whatmann Schleicher & Schuell, Brentford (UK)
Dental Readymatic Entwickler und Fixierer	Kodak Chalon, France
ECL-Detection Reagents Kit	Amersham Pharmacia, Freiburg
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen

### 3.4.4 Real-Time PCR

Mit Hilfe des Farbstoffes SYBR® Green wurden quantitative „Real Time“ PCR-Informationen gemessen, und aus einer exponentiellen Probenanalyse der C<sub>T</sub>-Wert („Threshold Cycle“= Zyklenzahl, bei der erstmals ein signifikantes Reportersignal detektiert wird) ermittelt. Die

unspezifischen Signale der Primerdimere wurden über Dissoziationskurven spezifischer Schmelztemperaturen bestimmt. Die Detektion des Fluoreszenzanstieges erfolgte für jeden Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des ABI PRISM™ 5700 Sequence Detectors. Zur Verbesserung der Spezifität wurde zusätzlich eine fluoreszenzmarkierte Oligonukleotid-Sonde verwendet, die am 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (Fluoreszein-Derivat) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) markiert ist. Bei Anregung der intakten Sonde bei der Wellenlänge von 488 nm wird deren Fluoreszenz durch die räumliche Nähe vom Reporter-Farbstoff zum Quencher-Farbstoff durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt. Während der PCR hybridisieren Sonde und Primer gleichermaßen an den Matrizenstrang. In der Extensionsphase kommt es zur Hydrolyse der Sonde durch die 5'- 3'- Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, wobei die räumliche Nähe und somit auch der FET zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und die Emission des Reporters als Signal gemessen werden kann. Freie, nicht-gebundene Sonde wird nicht hydrolysiert. Die Fluoreszenz des Reporters steigt entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus an. Die Detektion des Fluoreszenzanstieges erfolgt für jeden Zyklus im geschlossenen Reaktionsgefäß mit Hilfe des ABI PRISM™ 7700 Sequence Detectors.

Die Etablierung eines TaqMan-Primerpaares erfolgte nach den Regeln der SOP (erstellt am Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin, Fr. Vogt). Dabei wurden die Primerpaare getestet und durch Titration ihre Effizienz bestimmt.

Die relative Quantifizierung der Expressionshöhe erfolgte unter Nutzung des ermittelten  $C_T$ -Wertes. Generell ist bei höherer Startkopienzahl der Probe der  $C_T$ -Wert umso geringer. Als konstitutiv gemessenes Gen wurde (noch genau nachschauen) verwendet. Für die quantitative Aussage zur Expression der zu untersuchenden Gene benötigt man die gleichzeitige Amplifikation des konstitutiv exprimierten Gens. Das dimensionslose Ergebnis wurde bei annähernd gleicher Effizienz beider Primerpaare über folgende Formel ermittelt:

$$\text{Ergebnis} = (1 + \text{Effizienz})^{-(\mathbf{C_T}_{\text{Genx}} - \mathbf{C_T}_{\text{konstitutiv exprimiertes Gen}})}$$

Arbeitsbedingungen:

Sonde: 12,5µl TM-Mastermix, 4,5µl destilliertes Wasser, 6µl Primermix, 1µl Sonde, 1µl Template; SYBR-Green: 12,5µl SYBR-Green-Mastermix, 5,5µl destilliertes Wasser, 6µl Primermix, 1µl Template;

Zykler: 1 Zyklus 2min bei 50°C, dann 1 Zyklus 10 min bei 95°C, dann 40 Zyklen je 15s bei 95°C und 1 min bei 60°C

TM Mastermix	AmpliTaq Gold <sup>®</sup> DNA-Polymerase dNTPs mit dUTP, Amersham Pharmacia, Freiburg 5mM MgCl <sub>2</sub> , ROX Referenzfarbstoff, Uracil-N-Glycosylase
SYBR-Green-Mastermix	TM-Mastermix (außer Uracil-N-Glycosylase) und SYBR-Green-Farbstoff
Fluoreszenzmarkierte Oligonukleotidsonde	Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
AmpliTaq DNA-Polymerase, Puffer, MgCl <sub>2</sub>	Applied Biosystems, PE, Rodgau-Jügesheim
SYBR-PCR Core Reagents+ Mastermix	Applied Biosystems PE, Rodgau-Jügesheim
ABI PRISM <sup>™</sup> 5700 Sequence Detector	Biometra, Göttingen
Thermocycler 9700	Perkin Elmer, Branchburg, USA

### 3.4.5 Oberflächenfärbung der Zellen und Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Phänotypisierung der Zellen wurden die Zellen nach dem Waschen in 50 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit jeweils optimierten Konzentrationen der gewünschten AK für 20 min bei 4 Grad inkubiert. Nach dem Färben wurden die Zellen gewaschen und im FACS analysiert oder mit 2% PFA (Paraformaldehyd) fixiert und innerhalb von 3 Tagen gemessen.

FACS-Puffer	PBS mit 5 % FCS und 0,01 % NaAcid
Anti CD 3 FITC/PERCP	Becton Dickinson, San Jose
Anti-CD 4 FITC/PE/PERCP	Becton Dickinson, San Jose
Anti-CD 8 PE/PERCP/APC	Becton Dickinson, San Jose
Anti-CD 16 FITC/PE	Becton Dickinson, San Jose
Anti-CD 56 PE	Becton Dickinson, San Jose
Paraformaldehyd	Sigma, Steinheim
1,2 ml FACS-Röhrchen	PPN Tubes, ICN Biomedicals, Aurora
FACS calibur inklusive Zubehör	Becton Dickinson, Heidelberg
Auswertungssoftware Cell Quest	Becton Dickinson, San Jose

### 3.4.6 Intrazelluläre Färbung zum Nachweis des pp65 Antigens

Je ca.  $1 \times 10^6$  Zellen der mini-LCLs mit pp65-Expression, sowie der wt-LCLs ohne pp65-Expression (B95-8 Linie) von je dem gleichen Probanden, wurden nach dem Waschen fixiert (mit 0,25% PFA, 30 min auf Eis) und anschließend für 15 min bei 37 Grad mit 0,2% Tween-20 in PBS permeabilisiert. Nach dem Färben mit einem anti-pp65 AK-gemisch (anti-human Maus IgG) im Verhältnis 1 : 10 für 20 min auf Eis wurden die Zellen gewaschen (in PBS + 0,1% Tween), und nach Inkubation mit 3% Ziegenerum mit einem FITC-markierten Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-IgG im Verhältnis 1 : 50 (20 min auf Eis) gefärbt. Nach dem Waschen wurden die Zellen wie oben beschrieben gemessen.

anti-pp 65 AK gemisch (1 : 1)	981-MAb, Biodesign, Saco, USA O83-MAb-FITC, Biodesign, Saco, USA
Sekundärantikörper FITC Ziege-anti-Maus-IgG	Dianova, Hamburg
3 % Ziegenserum	Seromed, Biochrom, Berlin
Tween-20	Serva, Heidelberg

### 3.4.7 Multispezifische T-Zellantworten

Um zu untersuchen, ob die generierten T-Zelllinien tatsächlich verschiedene T-Zellklone gegen mehrere verschiedene Peptide des Peptidpools enthielten, stimulierten wir die zu testenden T-Zelllinien für je 6 Stunden in Einzelversuchen mit autologen PBMCs, die mit den 139 Einzelpeptiden des pp65-OPP gepulst waren. Das Verhältnis betrug hierbei 1 : 10. Zur besseren Durchführbarkeit wurden die 139 Einzelpeptide zu 24 verschiedenen Peptidpools zusammengefasst, die je 11-12 Einzelpeptide enthielten, wobei man beachten muss, dass sich jedes Einzelpeptid je in einem vertikalen und horizontalen Pool befindet, wodurch die Kreuzung die Identifizierung erlaubt (Kern 2000). Eine Reaktion der T-Zelllinien wurde durch intrazelluläre IFN- $\gamma$ -Färbung (analog siehe 3.4.6) und mit Hilfe des FACS untersucht. Zur Differenzierung der IFN- $\gamma$ -Antwort der T-Zellen von den PBMCs färbten wir letztere zusätzlich mit CFSE.

### 3.4.8 Zytotoxizitätstestung

Um die Effektorfunktion der generierten T-Zelllinien durch spezifische Lyse von Zielzellen zu evaluieren, wurde ein Zytotoxizitätstest mit Hilfe von Calceinfreisetzung durchgeführt. Dabei wurden pro Well einer 96-WP je  $4 \times 10^3$  Calcein-markierte Zielzellen im Verhältnis von 1 : 5, 1 : 10, 1 : 20 und 1 : 40 mit T-Zellen der je 3 verschiedenen generierten Zelllinien aller Probanden inkubiert. Bei Lyse der Zellen wird Calcein freigesetzt, welches im Überstand mit einem Fluoreszenzmessgerät gemessen werden kann. Unter Einbeziehung von Maximallyse durch Triton X sowie Spontanlyse ohne Effektorzellen kann so der Anteil der lysierten Zellen errechnet werden. Um Fehler durch Ungenauigkeit beim Pipettieren zu minimieren, wurde jeder der verschiedenen Ansätze 3-fach durchgeführt und der Mittelwert hieraus verwendet.

Als Zielzellen wurden pp65 mini-LCLs, wt-LCLs, autologe und allogene PHA-Blasten, allogene LCLs, und die K562-Zelllinie verwendet. Zum Färben wurden ca.  $2 \times 10^6$  Zellen 2-mal in FCS-freiem Medium gewaschen und für 30 min bei 37 Grad mit 4  $\mu$ l Calcein pro 300  $\mu$ l Zellsuspension inkubiert. Um die Färbereaktion zu stoppen, wurde kaltes FCS-haltiges Medium zugegeben. Für jeden einzelnen der verschiedenen Ansätze wurden die definierte Anzahl der Zielzellen in 100  $\mu$ l/Well pipettiert. Neben den T-Zellen in verschiedenen Konzentrationen als Effektorzellen wurde zur Bestimmung der Spontanlyse je ein Triplet mit 100  $\mu$ l Medium

aufgefüllt; zur Bestimmung der Maximallyse je ein Triplet mit 2 % Triton-X-100. Nach 3 h Inkubationszeit wurden 90 µl des Überstandes vorsichtig abgezogen und photometrisch gemessen. Die spezifische Lyse wurde wie folgt berechnet:

Lyse in %: (Fluoreszenz der Probe – Fluoreszenz durch Spontanlyse) / (Fluoreszenz bei Maximallyse – Fluoreszenz durch Spontanlyse)

Calcein-AM	Molecular Probes, Eugene
Fluoreszenzmikroskop „Nikon Diaphot“	Nikon, Düsseldorf
Triton X – 100	Serva, Heidelberg
K 562-Zelllinie	DSM2, Heidelberg
Genios-Reader Spectra Fluor plus	Tecan, Crailshaim
Auswertungssoftware Magellan	Tecan, Crailshaim