

## 4. ERGEBNISSE

### 4.1 Generierung der wt-LCLs und pp65 mini LCLs

#### 4.1.1 Herstellung der Zelllinien

Im ersten Schritt wurden sowohl normale LCLs (wt-LCLs) als auch transgene pp65 mini-LCLs hergestellt (n = 10). Die Generierung der wt-LCLs gelang in allen Probanden mit einem medianen Zeitbedarf von 24 Tagen. Die Herstellung der pp65 mini-LCLs gelang in 9 von 10 Probanden mit einem medianen Zeitbedarf von 41 Tagen. Eine Zelllinie (Proband 8) proliferierte zu wenig, so dass nach der 2. Restimulation keine ausreichende Zellzahl mehr zur Durchführung aller Versuche zur Verfügung stand. Für diesen Probanden wurde deshalb nur die T-Zellgenerierung nach Peptidstimulation mit anschließender spezifischer und unspezifischer Expansion entsprechend Protokoll I und II durchgeführt, aber nicht die Generierung durch Kokultur mit pp65 mini-LCLs (Protokoll III).

**Tabelle 3: Zeitbedarf zur Etablierung der wt-LCLs und der pp65 mini-LCLs**

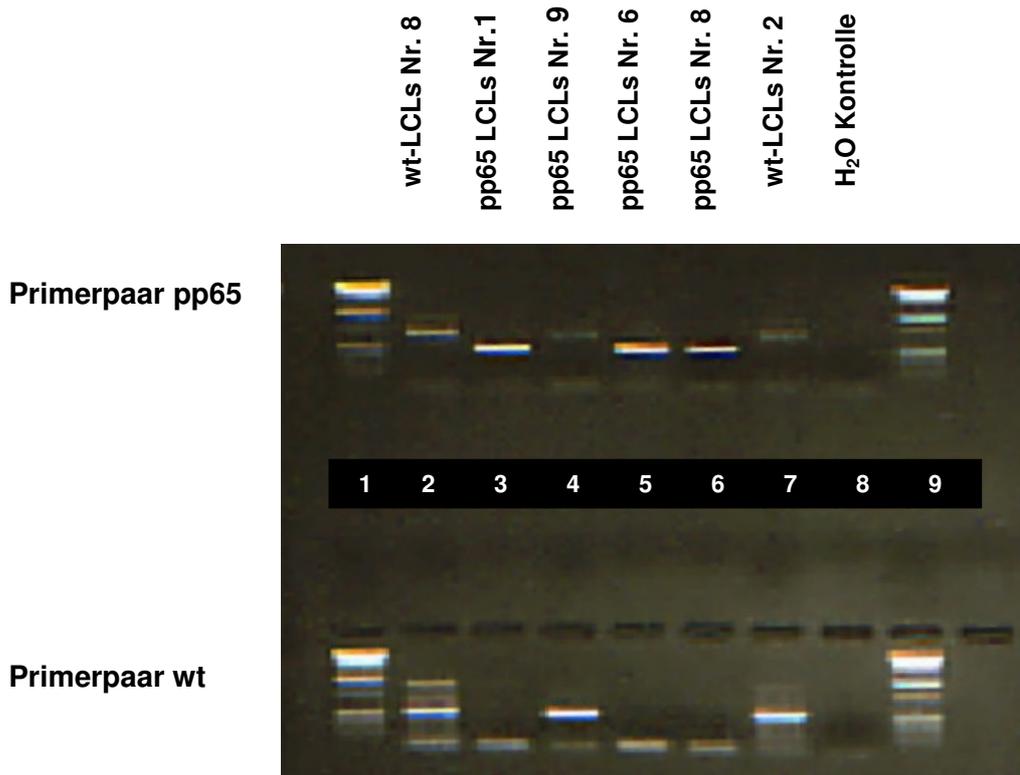
	wt-LCLs	pp65 mini-LCLs
Proband 1	25	43
Proband 2	42	34
Proband 3	34	28
Proband 4	17	31
Proband 5	34	46
Proband 6	17	56
Proband 7	24	41
Proband 8	18	50
Proband 9	24	nicht gelungen
Proband 10	28	34
<b>Medianer Zeitbedarf in Tagen</b>	<b>24</b>	<b>41</b>

Dargestellt ist der Zeitbedarf zur Herstellung der wt- und pp65 mini-LCLs in Tagen. Als erfolgreichen Abschluss der LCL-Generierung wurde das Erreichen einer Zellzahl von mindestens  $3 \times 10^7$  Zellen definiert.

#### 4.1.2 Ausschluss viraler Rekombination durch PCR

Vor der Anwendung der pp65 mini-LCLs in den weiteren Versuchen (zur spezifischen Expansion der T-Zellen und als Zielzellen im Zytotoxizitätstest) musste aus Sicherheitsgründen eine Koexistenz des pp65 mini-EBV-Plasmids mit endogenen Viren ausgeschlossen werden, um eine Rekombination zu vermeiden. Wir versicherten uns deshalb vor dem Beginn der Versuche der Seronegativität unserer Probanden für HBV, HCV und HIV. Da alle Probanden hingegen seropositiv für EBV waren, was sich aufgrund seiner hohen Prävalenz nicht vermeiden ließ, war eine Rekombination mit zufällig vorkommenden endogenen EBV-Viren in EBV-tragenden B-Lymphozyten im Falle einer Koexistenz prinzipiell möglich. Um dies zu verhindern, analysierten wir das Vorkommen zweier spezifischer DNA-Fragmente mittels PCR. Eines der beiden Fragmente ist dabei nur in kompletter EBV-DNA - wie in den wt-LCLs und dem geringen Prozentsatz der EBV-infizierten B-Zellen der Probanden – anwesend. Dieses Fragment amplifizierten wir durch das Primerpaar 1 („wt“). Das andere Fragment ist Bestandteil des pp65 Genes aus HCMV und damit auch des pp65 mini-EBV Plasmids, aber kommt nicht in wt-LCLs vor. Dieses Fragment amplifizierten wir mit dem Primerpaar 2 „pp65“.

Wir stellten primär für jeden Probanden möglichst mehrere pp65 Zelllinien her, um im Falle einer Koexistenz beider Fragmente in einer Zelllinie eine wt-negative Linie zur Verfügung zu haben. Von insgesamt 30 hergestellten pp65 Zelllinien von 9 Probanden enthielten nur 2 Zelllinien beide DNA-Transkripte, die eine Rekombination erlauben würden. Diese wurden entsprechend den Standards für S2 Zellentsorgung vernichtet. 25 der 30 pp65 mini-LCL Zelllinien waren frei vom wt-Genom. Von einem potentiellen Probanden (Nr. 9) zeigten alle 3 voraussichtlichen pp65 mini-LCL Zelllinien nur das wt-Genfragment und kein pp65-Fragment (**Abb. 7**). Hier war eine normale wt-LCL-Zelllinie entstanden, was sich durch spontanes Wachstum aus EBV-infizierten B-Zellen zusammen mit der Suppression der T-Zell-Immunantwort durch im Medium enthaltenes Ciclosporin erklären lässt. Die LCL-Linien dieses Probanden konnten somit nicht in die Versuche eingeschlossen werden. Die beiden am längsten in Kultur gehaltenen pp65 mini-LCL Zelllinien wurden wiederholt getestet und zeigten bis zum Ende der Kulturzeit (nach 4 Monaten) keine Koexistenz mit EBV-Wildtyp-Viren.



**Abbildung 8: Nachweis der wt- und pp65-DNA in LCLs und mini-LCLs durch PCR**

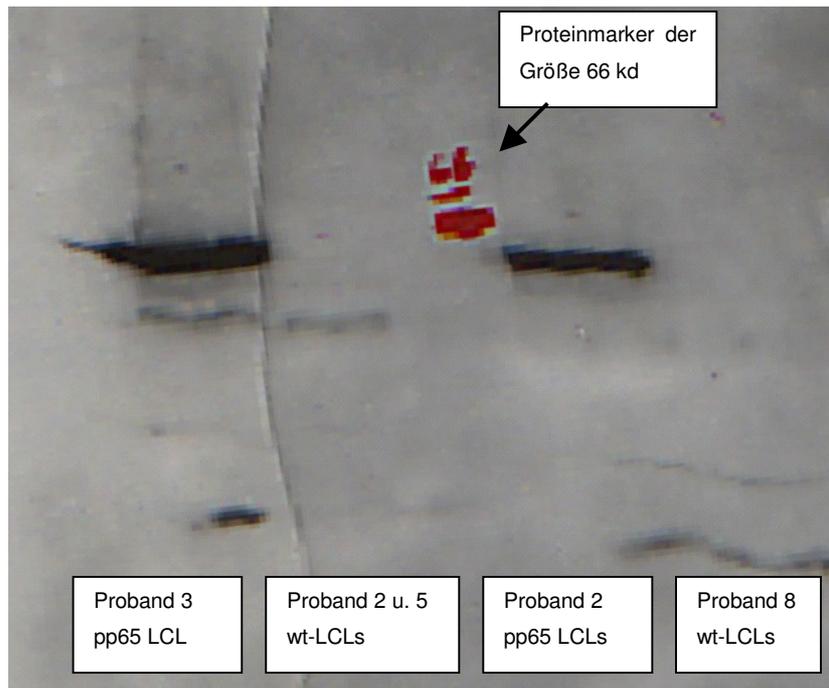
Nachweis von wt- und pp65-DNA mittels PCR. Nach der Isolierung der genomischen DNA aus den erfolgreich hergestellten LCL-Linien erfolgte der Nachweis mittels PCR. Das PCR-Amplifikat wurde auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Die Banden einer Spalte stammen jeweils von der gleichen Zelllinie, und wurden je mit einem Primerpaar zum Nachweis eines wt- und eines pp65-Transkripts getestet. Zwei repräsentative wt mini-LCL-Linien sind dargestellt (siehe Nummer 2 und 7).

**pp65-Transkript:** Für die pp65 mini-LCLs (hier als pp65 LCL bezeichnet) der Probanden 1, 6, und 8 (Nummer 3,5,6) sieht man je eine Bande als Nachweis für ein Fragment von pp65, was zeigt, dass diese Zelllinien tatsächlich das Gen für pp65 enthalten. Die wt LCLs der Probanden 8, 2, sowie die pp65 LCLs von Proband 9 (Nummer 2,4,7) dagegen enthalten das pp65 Gen nicht.

**wt-Transkript:** Die Banden der unteren Zeile, die durch Amplifikation mit dem Primer wt entstanden sind, weisen ein entsprechendes Fragment des wt-Gens in den wt-LCLs der Probanden 8, 2, sowie für die pp65-Zelllinie 9 nach (Nummer 2,4,7).

#### 4.1.3 Pp65-Expression auf Proteinebene

Um die Expression des pp65-Antigens zu testen, wurde ein Westernblot mit monoklonalen Antikörpern gegen pp65 durchgeführt. Die in der PCR getesteten pp65 mini-LCLs zeigten auch auf Proteinebene eine deutliche Expression des transgenen Proteins.



**Abbildung 9: Nachweis der pp65-Expression durch pp65 mini-LCLs im Westernblot**

Wt- und pp65 mini-LCLs (in der Abb. als pp65 LCLs bezeichnet) wurden nach ihrer erfolgreichen Generierung und dem Ausschluss viraler Rekombination durch PCR auf die Expression des pp65-Proteins getestet. Dazu wurde ein Westernblot mit einem pp65-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Proteingröße von 66 kd wurde mit einem Proteinmarker bestimmt und im Entwicklungsbild rot markiert. Diese Größe entspricht dem pp65 Protein und ist bei den beiden pp65 mini-LCL-Zelllinien von Proband 2 und 3 zu sehen. Die Kontrollen mit wt-LCLs von Proband 2, 5, und 8 zeigen keine Bande auf dieser Höhe, da sie das pp65 Protein nicht enthalten. Beispielhaft ist hier nur eine Auswahl einiger mini-LCL-Zelllinien dargestellt.

## 4.2 Generierung der T-Zellen nach Protokoll I, II, und III

### 4.2.1 Probandenauswahl

Es wurden gesunde, freiwillige Versuchspersonen zwischen 20 und 40 Jahren auf ihren HCMV-Serostatus getestet. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen Seroprävalenzen für HCMV von 60 bis 90 % in Industrieländern benötigten wir die serologische HCMV-Testung von 33 zufällig ausgewählten Personen, um 10 seropositive Probanden zu finden, was einer Prävalenz von 33% unter den Untersuchten entspricht.

## 4.2.2 HLA-Typisierung

Ein Ziel unserer Studie war es, spezifische T-Zelllinien unabhängig vom HLA-Typ herzustellen. Deswegen wurden die HLA-Typen aller zufällig ausgewählten Probanden mittels PCR bestimmt. Die HLA-Typisierung ergab entsprechend der Probandenauswahl eine zufällige Verteilung der HLA-Typen. In der Bevölkerung häufige Typen wie HLA A2 und B 51 waren auch hier häufig vertreten (5/10 HLA A2 und 4/10 HLA B 51).

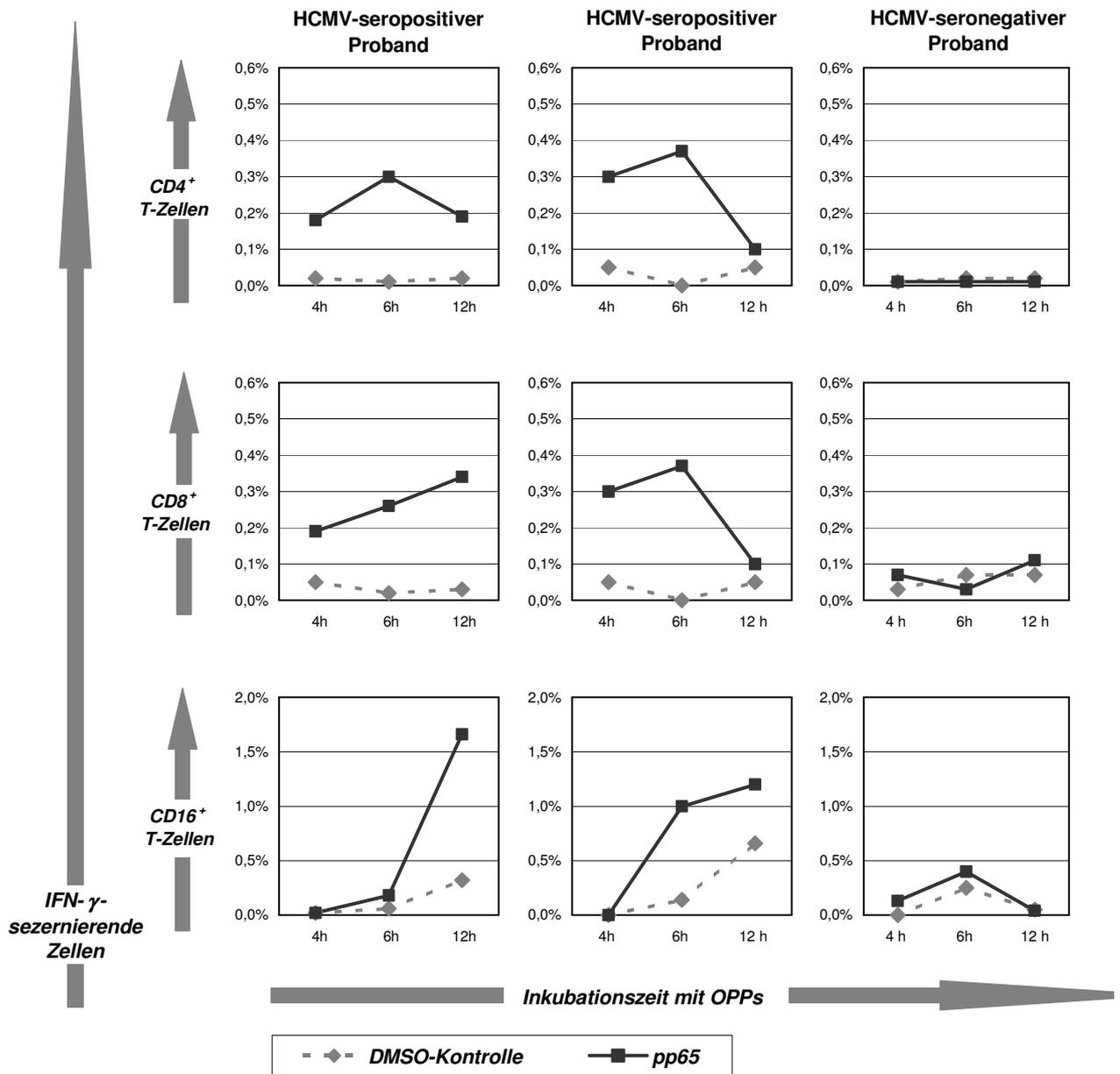
**Tabelle 4: HLA-Typen der HCMV-seropositiven Probanden**

	HLA-Klasse I						HLA-Klasse II					
	Locus A	Locus A	Locus B	Locus B	Bw4	Bw6	DRB	DRB3(52)	DRB5(51)	DRB4(53)	DQB1	DQB1
<b>Pr. 1</b>	A 31	A 32	B 14	B 51	+	+	DRB-1-1 DRB1-9			+	3	5
<b>Pr. 2</b>	A 30	A 68	B 18	B 44	+	+	DRB1-17 DRB1-11	+			3	2
<b>Pr. 3</b>	A 11	A 24	B 39	B 48		+	DRB1-3 DRB1-14	+			3	2
<b>Pr. 4</b>	A 01	A 25	B 08	B 08		+	DRB1-3 DRB1-3	+				2
<b>Pr. 5</b>	A 02	A 33	B 13	B 58	+		DRB1-12 DRB1-13	+			3	6
<b>Pr. 6</b>	A 03	A 03	B 35	B 44	+	+	DRB1-11 DRB1-13	+			3	
<b>Pr. 7</b>	A 01	A 02	B 08	B 51	+	+	DRB1-4 DRB1-13	+		+	3	6
<b>Pr. 8</b>	A 02	A 32	B 51	B 55	+	+	DRB1-8 DRB1-15		+		4	6
<b>Pr. 9</b>	A 02	A 24	B 62	B 55			DRB1-4 DRB1-13	+		+	3	6
<b>Pr. 10</b>	A 02	A 03	B 44	B 51	+		DRB1-4 DRB1-11	+		+	3	

Die Tabelle zeigt die HLA-Typen der HCMV-seropositiven Probanden, die mittels PCR bestimmt wurden. Die dazu verwendete DNA wurde aus den LCL-Zelllinien der Probanden gewonnen.

## 4.2.3. Bestimmung der geeigneten Inkubationszeit für die Peptidstimulation

Um die optimale Zeitspanne für die Stimulation mit den OPPs zu ermitteln, wurden die Inkubationszeiten von 4, 6 und 12 Stunden für je 3 HCMV-seropositive sowie 3 HCMV-seronegative Versuchspersonen getestet. Der größte Anteil IFN- $\gamma$ -sezernierender CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten fand sich nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden, der geringste Anteil nach 12 Stunden bei den HCMV-seropositiven Probanden (**Abb.10**). Unter den CD16<sup>+</sup> T-Lymphozyten stieg der Anteil IFN- $\gamma$ -sezernierender Zellen zum Teil mit der Inkubationszeit an. Nach 4 h waren praktisch noch keine IFN- $\gamma$ -sezernierenden CD16<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup> Zellen nachweisbar, während wir nach 12 h die höchste IFN- $\gamma$ -Sekretion fanden. Für die HCMV-seronegativen Probanden gab es, verglichen mit der DMSO-Kontrolle, zu keinem Zeitpunkt eine deutlich IFN- $\gamma$ -positive T-Zell-Population. Aufgrund dieser Ergebnisse wählten wir die Stimulationszeit von 6 h als die beste Inkubationszeit für die Stimulation der T-Zellen aus.



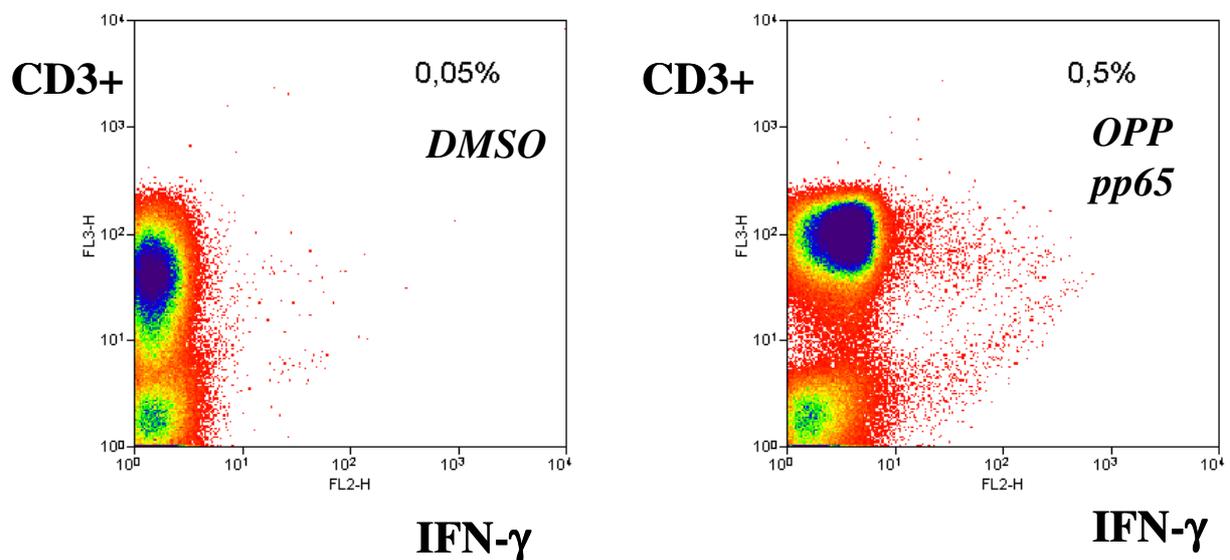
**Abbildung 10: Bestimmung der geeigneten Inkubationszeit für die Peptidstimulation**

Mit Hilfe des IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assay wurde die IFN- $\gamma$ -Sekretion frisch isolierter PBMCs nach Stimulation mit Peptidmischung bzw. DMSO als Negativ-Kontrolle zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen, um die optimale Inkubationszeit zu determinieren. Dargestellt sind getrennt die  $CD4^+$ ,  $CD8^+$  und  $CD16^+$  Lymphozyten für je zwei HCMV-seropositive sowie für einen HCMV-seronegativen Probanden. Die höchste Frequenz reagierender T-Zellen zeigt sich bei den HCMV-seropositiven Probanden nach 6 h und auch nach 12 h, wobei nach 6 h deutlich weniger  $CD16^+$  Zellen eine Antwort zeigen als nach 12 h. Ein repräsentatives Experiment ( $n = 3$ ) ist dargestellt.

#### 4.2.4 Selektion der pp65-spezifischen Zellen

Da für Protokoll I und II die pp65-spezifischen T-Zellen mit Hilfe ihrer IFN- $\gamma$ -Sekretion nach 6-stündiger Stimulation der PBMCs mit den OPPs gewonnen werden sollten, wurden die IFN- $\gamma$ -

sezernierenden Zellen mit verschiedenen, zuletzt mit Bead-tragenden Antikörpern markiert und durch Magnetsäulen positiv selektioniert. Es konnte von allen 8 Probanden eine IFN- $\gamma$ -positive Zellpopulation isoliert werden, die zahlenmäßig jedoch sehr gering war (< 100 000 Zellen). Diese Populationen wurden halbiert, wobei eine Hälfte spezifisch in Protokoll II, die andere unspezifisch durch Protokoll I weiter expandiert wurden, so dass die Ausgangspopulation für beide Protokolle identisch war. Alle 16 so gewonnenen Zellpopulationen konnten auf Anrieb expandiert werden, und trotz der geringen Ausgangszellzahl konnten erfolgreich T-Zelllinien generiert werden. Neben der Selektion wurde mit Hilfe eines PE-markierten AKs der Anteil der IFN- $\gamma$ -sezernierenden Zellen bei einer kleinen Fraktion der verarbeiteten Zellen innerhalb des IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assays mit Hilfe des FACS bestimmt (**Abb. 11**).



**Abbildung 11: Nachweis IFN- $\gamma$ -positiver T-Zellen (nach pp65-Stimulation) mittels FACS**

Im IFN- $\gamma$ -Sekretions-Assay wurden frisch isolierte PBMCs mit pp65-Peptiden bzw. DMSO (als Negativ-Kontrolle) stimuliert. Die spezifischen Lymphozyten reagierten mit IFN- $\gamma$ -Sekretion, was mit Hilfe markierter Antikörper im FACS dargestellt werden konnte. Durch Gating wurden in Dot-Plots alle CD3<sup>+</sup> Zellen sowie jeweils IFN- $\gamma$ -positive bzw. -negative Zellen dargestellt. Dabei ist die Fraktion IFN- $\gamma$  positiver Zellen unter den CD3<sup>+</sup> Zellen im rechten oberen Quadranten dargestellt. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse nach Stimulation eines Probanden mit deutlichem Anteil an CD3<sup>+</sup> Zellen. Das rechte Bild zeigt das Ergebnis nach pp65-OPP-Stimulation, das linke die Negativ-Kontrolle.

#### 4.2.5 Expansion der T-Zellen mit pp65 Antigen-spezifität

Ein wichtiges Ziel der Zellexpansion für die klinische Anwendung als Infusionstherapie ist eine effiziente und schnelle Expansion der Zellen ohne Verlust der pp65-Antigen-spezifität. Wir gingen von einer Ausgangszellzahl von ca. 10<sup>8</sup> PBMCs aus, welche man aus ca. 100 ml Blut

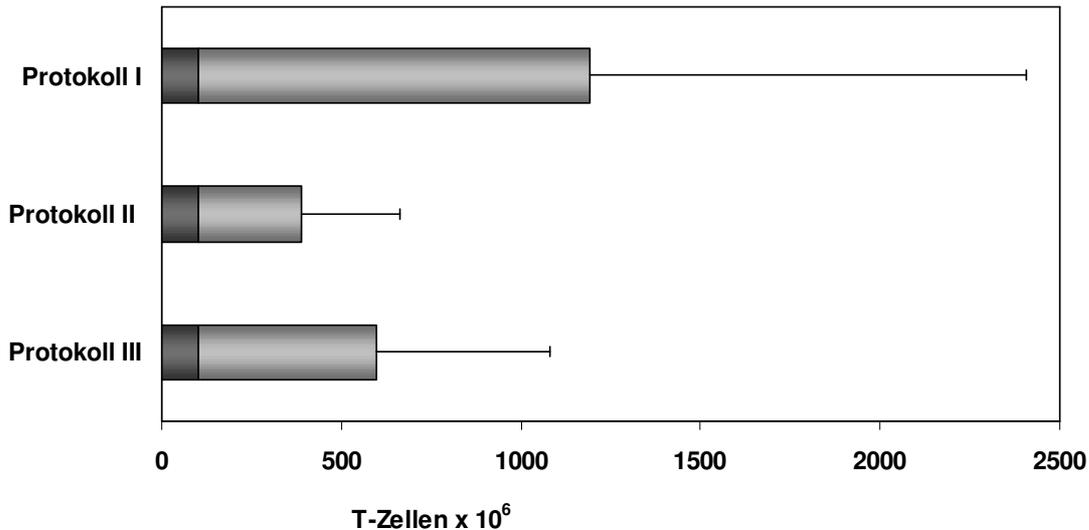
gewinnen kann, und führten 4 Stimulationen durch. Dies entspricht einem Zeitraum von 25 Tagen ab Blutentnahme. Bei jedem der 3 Protokolle konnten wir in diesem Zeitraum in je 7 von 8 Probanden (bzw. 6 von 7 für Protokoll III, siehe 4.1.1) ausreichende Zellzahlen für einen klinischen Einsatz gewinnen. Als ausreichend definierten wir eine Zellzahl von ca.  $10^8$  T-Zellen. Die genau erforderliche Infusionsdosis hängt unter anderen Faktoren z. B. von der Körperoberfläche des Patienten ab und kann durchaus höher sein. Für Protokoll I und II mussten die Zellen von Proband 2 eine Woche länger stimuliert werden, um ausreichende Zellzahlen zu erhalten, da sie nach der IFN- $\gamma$ -Selektion schlecht proliferierten. Im Protokoll III waren für Proband 6 einige zusätzliche Tage Wachstumszeit nötig.

Für die Kalkulation der gesamten Generierungszeit muss dabei der zusätzliche Zeitbedarf von 41 Tagen (Median) für die Herstellung der pp65 mini-LCLs in Protokoll II und III berücksichtigt werden. Die durchschnittlich höchste Expansionsrate wurde durch die unspezifische Expansion IFN- $\gamma$ -selektierter T-Zellen nach Protokoll I erreicht und war 10,9-fach. Für die pp65-spezifisch expandierten Zellen aus Protokoll II war die durchschnittliche Expansionsrate am niedrigsten mit 2,9-facher Expansion. Durch Koinkubation nach Protokoll III konnte im Mittel eine 5-fache Expansionsrate erzielt werden. Die reale Expansion ausgehend von den IFN- $\gamma$ -selektierten Zellen lag viel höher.

**Tabelle 5: Expansion der T-Zellen mit pp65 Antigen-spezifität**

	<b>Protokoll I in <math>10^6</math> Zellen</b>	<b>Protokoll II in <math>10^6</math> Zellen</b>	<b>Protokoll III in <math>10^6</math> Zellen</b>
<b>Proband 1</b>	3110	833	225
<b>Proband 2</b>	23	3,5	630
<b>Proband 3</b>	87	80	1400
<b>Proband 4</b>	208	105	292
<b>Proband 5</b>	2200	314	94
<b>Proband 6</b>	329	314	40
<b>Proband 7</b>	543	174	800
<b>Proband 8</b>	2220	500	K.A.

Die Tabelle zeigt die erreichten Zellzahlen nach einer Wachstumszeit von 25 Tagen. Ausgehend von je  $10^8$  frisch isolierten unselektionierten PBMCs gesunder Probanden wurden die selektierten Zellen 4-mal stimuliert und 4 Tage nach der letzten Stimulation gezählt.



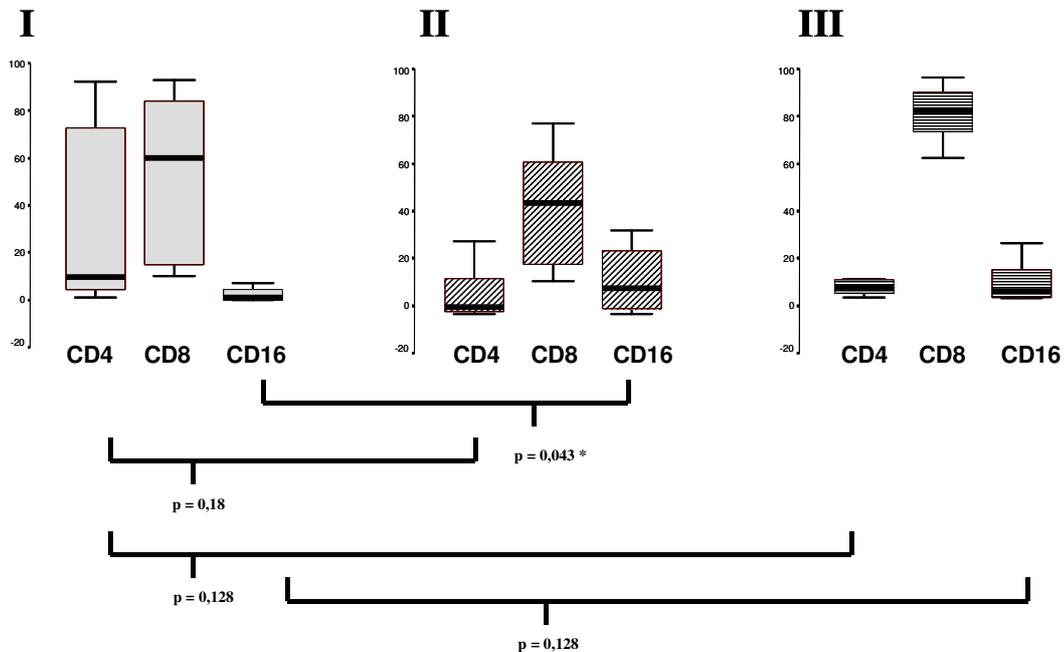
**Abbildung 12: Durchschnittliche Expansionsraten der T-Zellen mit pp65 Antigen-spezifität**

Die durchschnittliche Zellzahl aller 7 bzw. 8 Probanden wurde nach 25 Tagen Wachstumszeit für jedes Protokoll errechnet. Ausgehend von  $10^8$  PBMCs (dunkelgrau) erreichten wir bei Protokoll I eine 10,9-fache Expansion, was  $1090 \times 10^6$  Zellen entspricht. Bei Protokoll II konnten die Zellen 2,9-fach, bei Protokoll III im Durchschnitt 5-fach expandiert werden. Ebenfalls dargestellt ist die Standardabweichung. (P-Werte nach dem Wilcoxon-Test: Zwischen Protokoll I und II beträgt p 0,01, zwischen Protokoll II und III 0,48 und zwischen I und III 0,4, wobei für den fehlenden Wert von Proband 8 in Protokoll III der Mittelwert eingesetzt wurde.)

#### 4.2.6 Phänotypisierung

Für eine anhaltende Immunität und Funktion der T-Zellen in vivo ist das Zusammenspiel der zytotoxischen  $CD8^+$  Lymphozyten und der  $CD4^+$  Lymphozyten mit ihrer Helferfunktion wichtig. Anteile dieser beiden Lymphozytensubpopulationen zu selektionieren und zu expandieren ist eine wichtige Anforderung, die ein geeignetes Protokoll erfüllen sollte. Wir analysierten die Phänotypen der T-Zelllinien, die mit den 3 verschiedenen Protokollen generiert worden waren, jeweils am Tag 4 nach der 4. Stimulation. Eine Ausnahme war nur Proband 2, dessen Zelllinien erst nach der 5. Stimulation analysiert werden konnten, da zuvor noch keine ausreichende Zellanzahl für alle Tests zur Verfügung stand. Wie erwartet bestand der größte Anteil der Zellen bei allen 3 Protokollen im Median aus  $CD8^+$  T-Zellen. Der höchste  $CD4^+$  Zellanteil wurde in Protokoll I mit einem Medianwert von 9 % gefunden, in Protokoll II lag er bei 5 %, in Protokoll III bei 7 %. Deutliche Unterschiede fanden wir beim Anteil der  $CD3^- CD16^+$  NK-Zellen. Mit Hilfe des nicht parametrischen Wilcoxon-Tests überprüften wir die Signifikanz dieser Ergebnisse, und konnten insbesondere zwischen Protokoll I und II signifikante Unterschiede feststellen. Für das Protokoll I und III war der NK-Zellanteil mit 1 % bzw. 6% als Medianwert sehr gering, wogegen die spezifische Expansion nach OPP-Stimulation (II) mit einem Median von 14 % zu einem

signifikant höheren NK-Zellanteil führte. Für die CD 8<sup>+</sup> 56<sup>+</sup> Population lagen in den Protokollen keine signifikanten Unterschiede vor (Daten nicht gezeigt). Zusammengefasst enthielten die generierten Zellpopulationen aller 3 Protokolle sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wobei der NK-Zell-Anteil bei Protokoll I mit 1 % Medianwert am niedrigsten war. Dies hat den Vorteil, dass bei diesem Protokoll keine zusätzliche NK-Zell-Depletion nötig ist.



**Abbildung 13: Immunphänotypen antigenspezifischer Zelllinien je nach Generierungsstrategie**

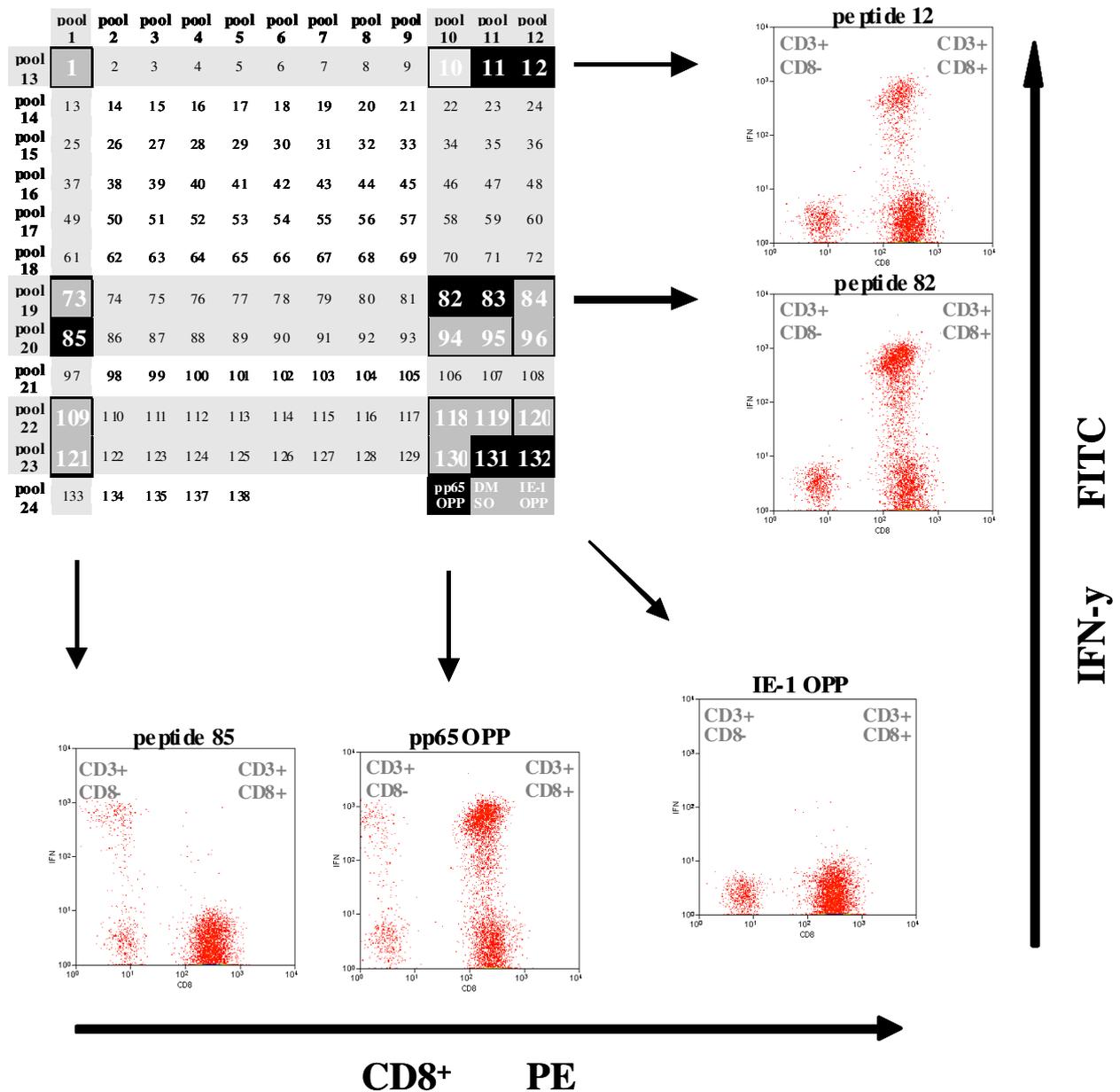
Der Anteil der Immunphänotypen in Prozent wurde für jedes Protokoll und jeden Probanden am Tag 4 nach der 4. Stimulation evaluiert. Dazu wurden die expandierten Zellen mit monoklonalen Antikörpern fluoreszenzmarkiert und im FACS analysiert. In der Abbildung ist der Median (schwarzer Querbalken) und die Standardabweichung jeweils dargestellt. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Wilcoxon-Tests überprüft und durch einen p-Wert auf dem Signifikanzniveau von < 0,05 definiert. Nach einer unspezifischen Expansion in Protokoll I lagen signifikant weniger CD3<sup>-</sup> CD16<sup>+</sup> T-Zellen vor als nach spezifischer Expansion in Protokoll II. Für die CD4<sup>+</sup> und die CD8<sup>+</sup> Lymphozyten fanden wir eine hohe Variabilität ohne eindeutige Unterschiede zwischen den einzelnen Protokollen (n = 8).

**Tabelle 6: Medianwerte der Immunphänotypen**

	Medianwerte		
	Protokoll I	Protokoll II	Protokoll III
CD3 <sup>+</sup> 4 <sup>+</sup>	9	5	7
CD3 <sup>+</sup> 8 <sup>+</sup>	60	56	80
CD16 <sup>+</sup> 3 <sup>-</sup>	1	14	6

#### **4.2.7 Multiple Epitop-Spezifitäten der T-Zelllinien**

Eine Spezifität der T-Zelllinien gegen multiple Antigene und Epitope kann verhindern, dass es durch Immunescape“-Mechanismen wie z. B. durch Drift-, Shift- oder Punktmutationen mit Aminosäureaustausch zu einer plötzlichen Wirkungslosigkeit einer infundierten T-Zelllinie kommt. Um herauszufinden, ob die generierten T-Zelllinien multiple Spezifitäten besaßen, wurde der aufwendige Nachweis des Epitop-Mappings durchgeführt. Wir wählten T-Zelllinien von 3 Probanden nach Protokoll I aus, welches sich zu diesem Zeitpunkt bereits als überlegen herausgestellt hatte, und stimulierten diese mit peptidgepulsten PBMCs im Verhältnis von 1:10. Um die IFN- $\gamma$ -Antwort der T-Zellen von der Antwort der PBMCs differenzieren zu können, färbten wir die PBMCs zusätzlich mit CFSE. Die Peptide, mit denen die PBMCs gepulst waren, enthielten insgesamt alle 138 Einzelpeptide des OPP von pp65. Zur besseren Praktikabilität der Versuche wurden diese in 24 verschiedenen Peptidpools zusammengefasst. Mittels intrazellulärer IFN- $\gamma$ -Färbung wurden die reagierenden Zellen mit Hilfe des FACS analysiert.

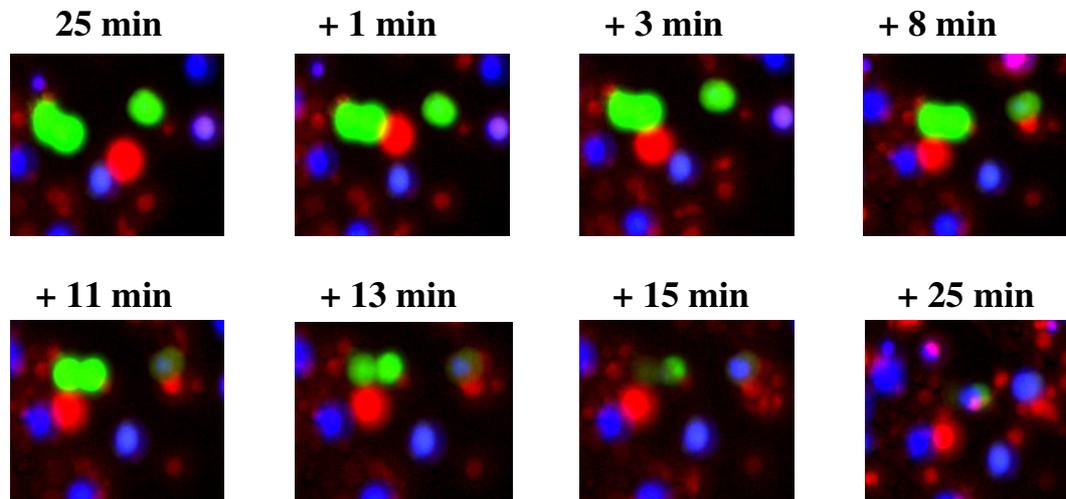


**Abbildung 14: Multispezifische T-Zellantworten der T-Zelllinien aus Protokoll I im FACS**

Für 3 Probanden mit verschiedenen HLA-Typen wurden Epitop-Mapping-Experimente durchgeführt. Dabei wurden T-Zelllinien aus dem neuen Protokoll I durch autologe, peptidgepulste PBMCs stimuliert. Die Einzelpeptide des pp65-OPPs wurden dabei in Gruppen aus je 2 Einzelpeptiden nach dem dargestellten Schema zusammengefasst, so dass primär anstelle von 138 Einzeltests nur 24 Tests durchgeführt werden mussten (siehe auch (Kern 1998)), die dann durch weitere Tests präzisiert werden konnten. Die Reaktionen der T-Zelllinien wurden durch intrazelluläre IFN- $\gamma$  Färbung im FACS untersucht. Durch Gating wurden speziell die CD3<sup>+</sup> T-Zellen dargestellt, wobei die IFN- $\gamma$ -Antwort auf der Y-Achse, der CD8<sup>+</sup> Phänotyp auf der X-Achse dargestellt ist. Der dargestellte Proband zeigt eine starke Reaktion der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf die Einzelpeptide 12, 82, sowie auf pp65 (gesamter OPP), und eine etwas schwächere Reaktion der CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> T-Zellen auf das Peptid 85. Auf den OPP von IE-1 ist dagegen keine Antwort detektierbar.

#### 4.2.8 T-Zellfunktion: Zytotoxizität

Eine der wichtigsten Funktionen der pp65-spezifischen T-Zellen ist die Lyse HCMV-infizierter Zellen. Die folgende Abbildung (**Abb. 15**) demonstriert, dass durch Protokoll I hergestellte T-Zelllinien pp65-exprimierende Zellen - in diesem Fall pp65 mini-LCLs - lysieren können.



**Abbildung 15: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme pp65-spezifischer Lyse durch eine T-Zelllinie**

Durch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe konnte das Geschehen während eines Zytotoxizitätstestes im Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. 25 Minuten nach Beginn der Kokultur beobachtet man nach Zell-Zell Kontakt der rot markierten pp65-spezifischen T-Zellen mit den Calcein-gefärbten grünen pp65 mini-LCLs die Lyse der Zielzellen. Nach dem Schrumpfen der Zielzellen geht die Zellmembran zugrunde, so dass der blaue DAPI-Farbstoff den Zellkern blau färbt. 25 Minuten später sind fast keine pp65 mini-LCLs mehr zu sehen, da sie durch die T-Zellen lysiert wurden. Diese Test wurde mit einer T-Zelllinie aus Protokoll I durchgeführt (Proband 6).

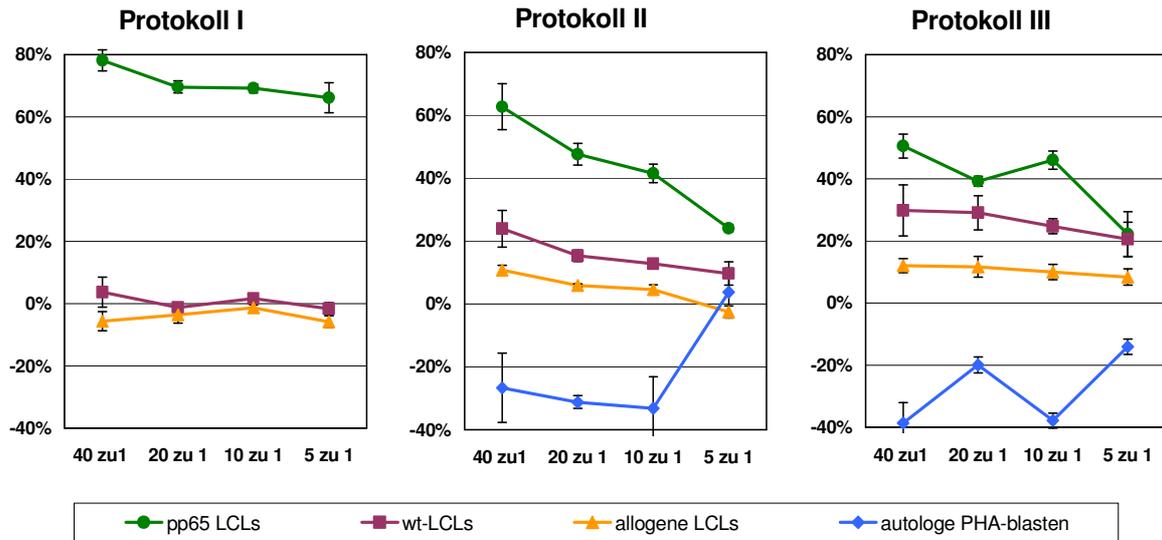
Um die pp65-spezifische lytische Aktivität zu quantifizieren, wurde von allen generierten T-Zelllinien ein nicht-radioaktiver, auf Calcein-Freisetzung basierender Zytotoxizitätstest durchgeführt. Die Zielzellen für spezifische Zell-Lyse waren autologe pp65 mini-LCLs. Diese präsentieren das endogen prozessierte pp65-Protein und sind daher theoretisch relevantere Ziele als peptidgepulste Zellen, welche exogen mit dem Antigen beladen sind. Initiale Versuchsreihen zeigten, dass sowohl pp65-peptidbeladene LCLs als auch pp65 mini-LCLs gleichermaßen lysiert werden (Daten nicht gezeigt). Da pp65 mini-LCLs auch einige EBV-Antigene exprimieren, benutzten wir zusätzlich wt-LCLs als Zielzellen, welche ausschließlich EBV-Antigene, nicht aber pp65-Antigene besitzen (siehe Kap. 4.1.2), um eine EBV-spezifische Lyse auszuschließen. Als weitere Kontrollen für Allo- und Autoreaktivität wurden autologe und allogene PHA-blasten eingeschlossen, sowie eine NK-Zell-sensitive Zelllinie K-562. Die spezifische Lyse der verschiedenen Zelllinien wurde bei einem Effektor zu Zielzell-Verhältnis

von je 40 zu 1, 20:1, 10:1 und 5:1 bestimmt. Der Vergleich der verschiedenen Zelllinien untereinander erfolgte bei dem Verhältnis 20: 1. (**Abb. 16, 17, und Tab. 7**)

In 6 von 7 Zelllinien, die nach Protokoll I generiert worden waren, fanden wir eine klare Reaktivität gegen **pp65**, eine der 7 Zelllinien zerstörte die Zielzellen nicht signifikant (10 % Lyse). Die mediane Lyserate für Protokoll I betrug insgesamt 60 % (zwischen 10 % und 82 %) inklusive der unspezifischen Zelllinie, und 64 % (39 % - 82 %) bei Ausschluss der unspezifischen Zelllinie. Für die Zelllinien aus Protokoll II war die zytotoxische Reaktivität mit 52 % (29 – 71 % ) Lyse geringer, für Protokoll III mit einem Median von 38 % ( 25 – 74 %) am niedrigsten. Für Protokoll II und III, die beide auf spezifischer Expansion durch pp65-mini-LCLs basierten, fanden wir ebenfalls eine leichte Zell-Lyse der wt-LCLs. Der Median lag bei 17 % für Protokoll II und 29 % für Protokoll III.

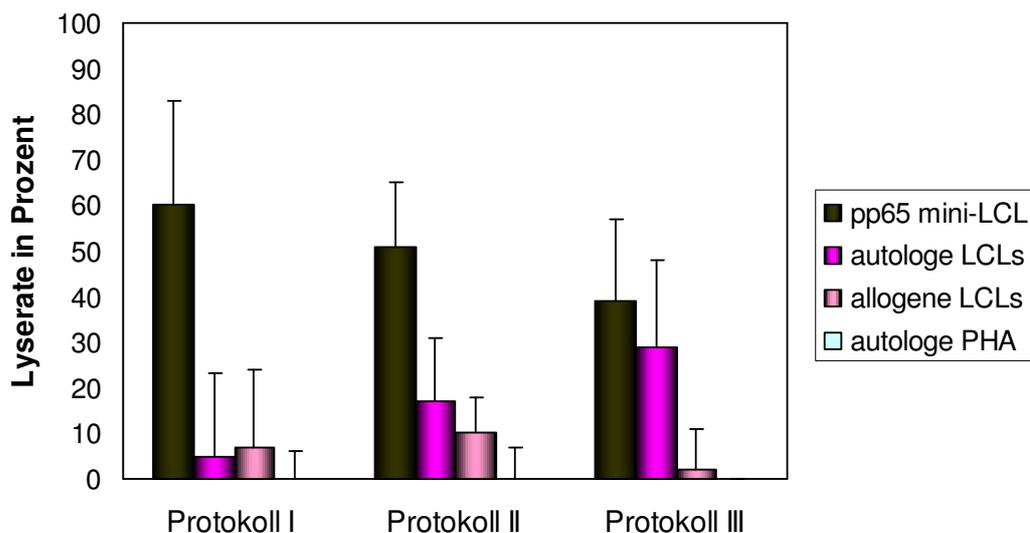
Die **Alloreaktivität** in Protokoll I lag für Proband 2 und 3 bei über 20%, nämlich bei 25 und 49%, für die anderen 6 Probanden bei höchstens 12% oder weniger. Die Zelllinien von Proband II und III könnten damit primär nicht für eine Infusion in die Patienten verwendet werden. Möglich wäre eine Verwendung evtl. nach Depletion von CD16<sup>+</sup> Zellen, da diese eine der Hauptursachen für unspezifische zytotoxische Aktivität sein können. In jedem Fall muss aber jede einzelne Zelllinie, bevor sie zur Infusion in den Patienten freigegeben wird, auf Auto- und Alloreaktivität getestet werden. Für Protokoll II lag die Alloreaktivität für Proband 2 und evtl. für Proband 7 zu hoch , im Protokoll III war dies bei Proband 7 der Fall. Eine **Lyse autologer Zellen** fand ausschließlich für eine Zelllinie aus Protokoll II - von Proband 7 - statt. Hier treffen die gleichen Maßnahmen zu wie bei der Alloreaktivität.

Signifikanten Angriff gegen die **NK-sensitive Zelllinie** K 562 fanden wir insbesondere für Zelllinien aus Protokoll II, was mit erhöhten NK-Zell-Anteilen in diesem Protokoll korreliert (siehe 4.2.6). Insgesamt sprechen die Ergebnisse dafür, dass die Kombination von Peptidstimulation, IFN- $\gamma$ -basierter Selektion spezifischer Zellen und anschließender unspezifischer Expansion in Protokoll I geeignet ist, T-Zelllinien mit spezifischer zytotoxischer Aktivität zu generieren, die verglichen mit dem etablierten Koinkubationsprotokoll III, mindestens gleichwertige oder bessere Effektorfunktion haben.



**Abbildung 16: Spezifische Lyse im Zytotoxizitätstest – Vergleich der 3 Protokolle anhand eines Beispiels**

Dargestellt ist eine repräsentative Analyse der T-Zelllinien des Probanden 5. Nach Protokoll I bis III hergestellte T-Zelllinien wurden am Tag 25 mit verschiedenen Zielzellen in verschiedenen Effektor-zu-Zielzell-Verhältnissen koinkubiert. Die Lyse wurde anhand Freisetzung des fluoreszierenden Farbstoffes Calcein gemessen und im Vergleich zu Maximallyse (durch Triton X) und Minimallyse (durch Medium) berechnet. Als Zielzellen sollten autologe pp65 mini-LCLs spezifisch zerstört werden. Bei Protokoll II und III findet sich eine geringe Lyse autologer wt-LCLs, während allogene LCLs praktisch kaum angegriffen werden. Autologe PHA-blasten sind bei zusätzlicher Anwesenheit von T-Zellen weniger anfällig für spontanen Zerfall als nur bei Zugabe von Medium, zu erkennen an der rein rechnerisch negativen Lyse. (Autologe PHA-Blasten in Protokoll I liegen bei -20- -40%, so dass sie unterhalb der abgebildeten Skala liegen )



**Abbildung 17: Vergleich zytolytischer Aktivitäten je nach Generierungsstrategie**

Die Lyseraten verschiedener Zielzellen wurden für die 3 verschiedenen Herstellungsprotokolle im Calcein-Zytotoxizitätstest verglichen. Dazu wurden die T-Zelllinien nach 25 Tagen Wachstumszeit mit fluoreszenzmarkierten Zielzellen für drei Stunden kokubiert und der durch Lyse der Zielzellen austretende Fluoreszenzfarbstoff gemessen. Daraus konnte die lysierte Zellfraktion errechnet werden. Die mediane Lyse wurde für jedes Protokolle bei einer Effektor zu Zielzell-Ratio von 20 zu 1 verglichen (n=8). Die mit Hilfe des Wilcoxon-Tests errechneten p-Werte liegen lediglich für das Killing von autologen LCLs zwischen Protokoll II und III (p=0,02) sowie zwischen Protokoll I und III (p=0,03) auf dem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ .

**Tabelle 7: Lyseraten aller T-Zelllinien im Zytotoxizitätstest**

	autologe pp65 mini- LCLs	autologe wt-LCLs	allogene wt-LCL	allogene PHA-Blasten	autologe PHA-Blasten
<b>Proband 1</b>					
Protokoll I	56	0	0		0
Protokoll II	49	0	0		0
Protokoll III	51	0	0		0
<b>Proband 2</b>					
Protokoll I	39	33	25		0
Protokoll II	61	19	24		0
Protokoll III	25	24	0		0
<b>Proband 3</b>					
Protokoll I	82	47	49		0
Protokoll II	71	43	12		0
Protokoll III	74	59	2		0
<b>Proband 4</b>					
Protokoll I	10	3	12		0
Protokoll II	29	20	5		0
Protokoll III	37	44	0		0
<b>Proband 5</b>					
Protokoll I	70	1	0		0
Protokoll II	48	15	6		0
Protokoll III	39	29	12		0
<b>Proband 6</b>					
Protokoll I	55	6	6		0
Protokoll II	44	13	11		0
Protokoll III	35	19	13		0
<b>Proband 7</b>					
Protokoll I	64	18	8	12	16
Protokoll II	52	23	21	21	18,5
Protokoll III	66	38	24		0
<b>Proband 8</b>					
Protokoll I	75	2	4	2	0
Protokoll II	68	0	9	0	0
Protokoll III	K.A.	K.A.	K.A.	K.A.	K.A.

Diese Tabelle zeigt die medianen Lyseraten in Prozent für alle Probanden und T-Zelllinien, die mit einem Calcein-Zytotoxizitätstest am Tag 25 nach Beginn bestimmt wurden. Das Effektor- zu Zielzellenverhältnis von 20 : 1 wurde für diese Tabelle ausgewählt. Die Zielzellen (in den Spalten) wurden nach Markierung mit Calcein mit den T-Zelllinien (in den Zeilen) für jeweils 3 Stunden inkubiert und die Lyse konnte anschließend durch Messung der Fluoreszenz im Überstand und Vergleich mit Spontanlyse und Maximallyse errechnet werden. Ergänzung zu 0% Lyse: Insbesondere bei Anwesenheit autologer PHA-Blasten als Zielzellen war die Spontanlyse im Vergleich zu Medium geringer, so dass sich mathematisch daraus eine negative Lyse ergab. Im Prinzip bedeutete dies jedoch vor allem, dass diese Zellen nicht lysiert wurden. Eine negative Lyse wurde deshalb hier als 0% angegeben.