

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Die Diversität Cytomegalovirus-spezifischer T-Zellen
nach Selektion mittels B-Zell-Vektoren**

von

Martina Wiesner

aus

..
München

2005

Erklärung

Diese Promotion wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt betreut und von Prof. Dr. Horst Domdey vor der Fakultät vertreten.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt.

München, am 09.06.2005

Martina Wiesner

Dissertation eingereicht am 09.06.2005

1. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt
2. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 21.09.2005

Teile dieser Arbeit werden wie folgt veröffentlicht:

Wiesner, M., Zentz, C., Hammer, M., Cobbold, M., Kern, F., Kolb, H.-J., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., Moosmann, A. Selection of CMV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T cells by mini-EBV-transformed B cell lines. *Europ. J. Immunol.* 2005 accepted for publication.

Wiesner, M., Zentz, C., Mayr, C., Hammerschmidt, W., Zeidler, R., Moosmann., A. Human B cell immortalization by CD40-Ligation is accompanied by telomerase activation. In preparation.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Antigenpräsentation.....	3
1.3	Cytomegalovirus	6
1.4	Adoptive Immuntherapie der CMV-Infektion.....	8
1.5	Adoptive Immuntherapie gegen Epstein-Barr-Virus	11
1.6	Das mini-EBV-System	12
1.7	Aufgabenstellung und Zielsetzung.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Verwendete Materialien.....	16
2.1.1	Bakterienstämme	16
2.1.2	Zelllinien	16
2.1.3	Viren.....	17
2.1.4	Plasmide	18
2.1.5	Oligonukleotide	18
2.1.6	Antikörper	20
2.1.7	Peptide und HLA-Peptid-Tetramere.....	20
2.1.8	Sonstige Reagenzien	22
2.1.9	Kits.....	23
2.1.10	Dienstleistungen	23
2.1.11	Verbrauchsmaterialien	24
2.1.12	Geräte	24
2.2	Arbeiten mit Bakterien	25
2.2.1	Kultivierung und Konservierung von <i>E. coli</i>	25
2.2.2	Transformation und Elektroporation von <i>E. coli</i>	25
2.2.2.1	<i>Transformation</i>	25
2.2.2.2	<i>Elektroporation</i>	26
2.3	RNA-Arbeitstechniken	26

2.4 DNA-Arbeitstechniken.....	26
2.4.1 Extraktion zellulärer DNA	26
2.4.2 Präparative Plasmidaufreinigung.....	27
2.4.3 Präparation von mini-EBV-Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	27
2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	28
2.4.4.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	28
2.4.4.2 „Overlap and extension“ Technik.....	28
2.4.4.3 Amplifizierung mini-EBV- und Wildtyp-EBV-spezifischer-Sequenzen.....	29
2.4.4.4 Nested-PCR für HLA-C-Typisierung	29
2.4.4.5 TRAP-Assay.....	29
2.4.5 Southern-Blot-Hybridisierung	30
2.4.5.1 Telomer-Längen-Analyse.....	30
2.4.5.2 Telomerase-Aktivitäts-Assay	31
2.5 Proteinarbeitstechniken	32
2.5.1 Westernblot Analyse.....	32
2.6 Zellkultur und Analyse von Zellen.....	33
2.6.1 Zellkulturbedingungen	33
2.6.2 Aufbewahrung von Zellen.....	34
2.6.3 Isolierung primärer humaner Lymphozyten.....	34
2.6.4 Detektion von Antikörpern gegen CMV in Humanserum oder -plasma	34
2.6.5 Generierung von mini-EBV-Virionen	35
2.6.6 Infektion von B-Zellen mit EBV oder EBV-Vektoren	35
2.6.7 Generierung polyklonaler T-Zelllinien	36
2.6.8 Einzelzellklonierung von T-Zellen	36
2.6.9 Phänotypisierung von Zellen mittels FACS-Analyse.....	36
2.6.9.1 Färbung von Oberflächenmolekülen.....	37
2.6.9.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen	37
2.6.10 Magnetische Separation von T-Zellpopulationen.....	37
2.6.11 Bioplex Immunoassay.....	38
2.6.12 IFN- γ -ELISA	39
2.6.13 IFN- γ -ELISpot Assay.....	39
2.6.14 Zytotoxizitäts-Analysen	40

2.7 Arbeiten mit Viren.....	41
2.7.1 Epstein-Barr-Virus.....	41
2.7.2 Cytomegalovirus.....	41
2.7.3 Rekombinante Vacciniaviren	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Etablierung und Charakterisierung von B-Blasten	43
3.1.1 Generierung und Langzeitkultivierung von B-Blasten	43
3.1.2 Überprüfung der generierten Zelllinien auf Abwesenheit von Wildtyp-EBV .	44
3.1.3 Langzeitkultivierung der B-Blasten.....	44
3.1.4 Bestimmung von Telomerase-Aktivität und Nachweis stabiler Telomerlängen in Langzeit-B-Blastenkulturen	45
3.1.5 Karyotypisierung zweier B-Blastenlinien	49
3.1.6 Charakterisierung von Oberflächenmarkern verschiedener B-Blastenlinien...	50
3.1.7 Verwendung von B-Blasten in T-Zell-Assays	52
3.2 Reaktivierung von pp65-spezifischen T-Zellen.....	54
3.2.1 Proliferation von generierten T-Zelllinien	55
3.2.2 Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen.....	56
3.2.3 Antigen-spezifische IFN- γ -Produktion der T-Zellen	58
3.2.4 Zytotoxizitäts-Analysen der T-Zelllinien.....	60
3.2.5 Expansion Epitop-spezifischer, IFN- γ -produzierender T-Zellen	62
3.2.6 Einzelzellklonierung der pp65-spezifischen T-Zelllinien.....	63
3.2.7 HLA-Restriktionen der pp65-spezifischen Klone	64
3.2.8 Identifizierung von T-Zell-Epitopen.....	67
3.2.9 Reaktivität CMV-spezifischer Klone gegen pp65-Vaccinia- oder CMV- infizierte Stimulatoren.....	73
3.3 Verwendung allogener, HLA-kompatibler mLCLs zur Generierung pp65- spezifischer T-Zelllinien	75
3.3.1 Proliferation allogen stimulierter T-Zelllinien	76
3.3.2 FACS-Analyse der T-Zelllinien	77
3.3.3 Zytotoxizitäts-Analysen autolog und allogen stimulierter T-Zelllinien	79

3.4	Beeinflussung der T-Zellentwicklung bei EBV-negativen Spendern durch Zugabe von Zytokinen oder Antikörpern	82
3.4.1	Zytokinprofil der generierten T-Zelllinien.....	83
3.4.2	Proliferation der generierten T-Zelllinien	85
3.4.3	Phänotypische Analyse der T-Zelllinien.....	86
3.4.4	Zytotoxische Reaktivität der Zelllinien.....	87
3.5	Reaktivierung von IE1 und oder pp65/IE1-spezifischen T-Zellen.....	90
3.5.1	Proliferation der T-Zelllinien	92
3.5.2	Phänotypische Analyse der T-Zelllinien.....	94
3.5.3	Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen.....	95
3.5.4	Antigenspezifische IFN- γ -Produktion der T-Zelllinien.....	97
3.5.5	Zytotoxizitäts-Analysen der T-Zelllinien.....	100
3.5.6	Einzelzellklonierung der pp65_IE1-stimulierten T-Zelllinien	102
4	Diskussion	107
5	Zusammenfassung	125
6	Abkürzungen	127
7	Literaturverzeichnis	129

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem besteht aus einer Vielzahl von Molekülen und Zellen mit der Fähigkeit zwischen „selbst“ und „fremd“ zu unterscheiden. Zum einen soll es den Körper vor den unterschiedlichsten Krankheitserregern wie Bakterien, Viren, Parasiten und Pilzen schützen, zum anderen maligne körpereigene Zellen bekämpfen, die aufgrund von (epi-)genetischen Veränderungen ihre ursprünglichen Eigenschaften verloren haben und somit als „fremd“ gelten. Die vielfältigen Schutzmechanismen lassen sich der angeborenen oder der adaptiven (erworbenen) Immunantwort zuordnen. Die adaptive Immunantwort lässt sich weiter unterteilen in eine humorale und eine zelluläre Komponente.

Zur angeborenen Immunantwort gehören das Komplementsystem, Phagozyten, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und lösliche Mediatoren, die eine ganze Reihe von verschiedenen Effektormechanismen umfassen. Die Effektormechanismen werden durch verschiedene Rezeptoren vermittelt, die keinen oder geringen allelischen Polymorphismus aufweisen. Im Gegensatz zur adaptiven Immunantwort führt die angeborene Immunantwort nicht zu einer anhaltenden schützenden Immunität oder einem immunologischen Gedächtnis. Die Zellen des angeborenen Immunsystems spielen aber bei der Auslösung und der anschließenden Steuerung der adaptiven Immunreaktion eine entscheidende Rolle. Darüber hinaus hat die angeborene Immunität die Aufgabe, einer Infektion während der vier bis sieben Tage, die bis zum Einsetzen der adaptiven Immunantwort vergehen, entgegen zu treten.

Die adaptive Immunantwort basiert auf der klonalen Selektion von Lymphozyten, die eine Vielzahl hochspezifischer Rezeptoren besitzen. Neben der Beseitigung von Krankheitserregern führt die adaptive Immunantwort zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses, das bei einer erneuten Infektion mit dem gleichen Pathogen eine schnellere und wirksamere Reaktion erlaubt.

Die Hauptfunktion der humoralen Immunantwort ist es, extrazelluläre Mikroorganismen zu zerstören und die Verbreitung intrazellulärer Infektionen zu verhindern. Dies wird durch Antikörper erreicht, die von B-Lymphozyten sezerniert werden. Die löslichen Antikörper binden an das zu bekämpfende Pathogen, das daraufhin von akzessorischen Zellen und

Molekülen des humoralen Immunsystems entfernt wird. Die Herstellung von Antikörpern erfordert gewöhnlich das Eingreifen von T-Helferzellen (Th-Zellen), die spezifisch sind für ein Peptidfragment des Antigen, das von der B-Zelle erkannt wurde. Dies induziert eine beträchtliche Expansion der Antigen-spezifischen B-Zellen. Anschließend differenzieren die klonal expandierten Nachkommen im spezialisierten Milieu des lymphatischen Gewebes zu Antikörper-sezernierenden Zellen oder zu B-Gedächtniszellen. Während der Differenzierung werden durch somatische Hypermutationen in den Immunglobulingenen der variablen Region die Antigen-bindenden Eigenschaften des Antikörpers nochmals verändert. Das kann zu einem Verlust der Antigenbindung und zum Tod der B-Zelle führen oder zu einer erhöhten Affinität des Antikörpers für dieses bestimmte Antigen und damit zur selektiven Expansion. Bei der Selektion der Antigen-spezifischen B-Zellen spielt die Interaktion mit follikulären dendritischen Zellen (DC) und Antigen-spezifischen Th-Zellen eine entscheidende Rolle.

Die wichtigsten Effektorzellen der zellulären Immunantwort sind die zytotoxische $CD8^+$ Effektorzellen (*Cytotoxic T Cells*, CTLs), die in der Lage sind Virus-infizierte Zellen oder Tumorzellen zu erkennen und zu zerstören. Die CTLs erkennen dabei fremde Peptide, welche, gebunden an MHC-Klasse-I-Moleküle (MHC = *Major Histocompatibility Complex*,) an die Zelloberfläche transportiert worden sind. Die Lyse der betroffenen Zelle erfolgt durch Freisetzung von Perforin und Granzym, sowie durch die Expression des Fas-Liganden, der, indem er auf den Zielzellen an Fas bindet, deren Apoptose induziert. Unterstützt werden die CTLs dabei von $CD4^+$ Th-Zellen. Th1-Zellen unterstützen die zytotoxischen Effektorfunktionen von NK-Zellen, $CD8^+$ T-Zellen und Makrophagen. Th2-Zellen unterstützen hingegen die humorale Immunantwort. Diese Spezialisierung von Th1- und Th2-Zellen wird dadurch möglich, dass beide Klassen von $CD4^+$ T-Zellen jeweils ihr eigenes charakteristisches Spektrum von Zytokinen produzieren.

1.2 Antigenpräsentation

Antigenpräsentierende Zellen (APCs) spielen in der Immunantwort eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung zwischen Antigen und Effektorzellen. Als APCs können Makrophagen, B-Lymphozyten und Dendritische Zellen (DCs) dienen, wobei DCs als die potentesten APCs gelten (Reid *et al.*, 2000). Diesen Zelltypen gemeinsam ist neben der Expression beider Klassen von MHC-Molekülen die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle wie B7.1 und B7.2. Das erste Signal der APC-Effektorzellen-Wechselwirkung wird durch die Interaktion des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit dem Peptid-Antigen-MHC-Komplex bereitgestellt. Gemäß der „Zwei-Signale“-Hypothese liefern kostimulatorische Moleküle das zweite Signal, das für die Aktivierung naiver T-Zellen notwendig ist (Bretscher, 1999). Das Fehlen von kostimulatorischen Signalen dagegen kann bei naiven Antigen-spezifischen T-Zellen einen Zustand dauerhafter Nicht-Reaktivität - Anergie genannt - auslösen.

MHC-Moleküle sind membranständige Glykoproteine, die Peptide aus extrazellulären bzw. zytosolischen Proteinen binden und sie T-Lymphozyten für die Erkennung präsentieren. Klassische MHC-Moleküle lassen sich durch Struktur und Funktion in Klasse-I und -II unterteilen. MHC-Klasse-I-Moleküle sind auf fast allen zellkernhaltigen Vertebratenzellen zu finden. MHC-Klasse-II-Moleküle werden dagegen nur auf speziellen APCs, wie z.B. B-Zellen, Makrophagen und DCs exprimiert. MHC-Klasse-I-Moleküle bestehen aus einer in der Membran verankerten schweren α -Kette und einer nicht verankerten leichten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin. MHC-Klasse-II-Moleküle hingegen sind Heterodimere aus schweren Ketten (α und β), die beide in der Membran verankert sind. Sie werden von den Genen des *Major Histocompatibility Complex* (MHC) kodiert. Diese Glykoproteine werden beim Menschen als *Human Leukocyte Antigens* (Becker *et al.*) bezeichnet. Die Gene für die MHC-Moleküle sind in einem Cluster im Haupthistokompatibilitätskomplex auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 angeordnet. Für die schweren Ketten von MHC-Molekülen finden sich beim Menschen je drei Gencluster: HLA-A, -B und -C für die Klasse I, HLA-DP, -DQ und -DR für die Klasse II. Diese Gene zeichnen sich durch einen außergewöhnlich starken Polymorphismus aus. Die N-terminalen Domänen der schweren Ketten der MHC-Moleküle bilden eine längliche Furche, welche die Bindung von Peptiden über nicht kovalente Wechselwirkungen erlaubt.

Peptide, die an MHC-Klasse-I-Moleküle binden, sind in der Regel acht bis elf Aminosäuren lang, wobei die endständige Carboxyl- bzw. Aminogruppe mehr oder weniger unabhängig

von der Seitenkette der entsprechenden Aminosäure mit den konservierten Resten der Peptidbindungsfurche in Wechselwirkung tritt. Die Seitenketten einiger Aminosäuren verankern das Peptid am MHC-Molekül und werden deshalb Verankerungsreste (*anchor residues*) genannt. Dabei ist die Position der Ankerreste in der Peptidsequenz vom HLA-Allel abhängig, ebenso die an dieser Position bevorzugte Art der Aminosäure. Die auf dem HLA-Molekül „gegenüberliegenden“ Reste sind daher nicht konserviert. Die C-terminale Aminosäure ist bei den meisten HLA-Klasse-I-Allelen ein Verankerungsrest, die N-terminale meist nicht, dafür oft die zweite oder dritte Aminosäure vom N-Terminus aus gesehen. Es ergibt sich also für jedes Allel ein „Peptidmotiv“ (Falk *et al.*, 1991), welches Länge und Besetzung der für die Bindung entscheidenden Positionen eines idealen Liganden beschreibt. Im Gegensatz zu MHC-Klasse-I-Molekülen ist die Länge der Peptide, die von MHC-Klasse-II-Molekülen gebunden werden, nicht beschränkt. Diese Peptide sind wenigstens 13 Aminosäuren lang, wobei beide Enden nicht gebunden werden. Die Bindungstaschen sind weniger strikt, so dass es schwierig ist, ein MHC-II-spezifisches Sequenzmotiv für die Peptidbindung zu erkennen. Trotzdem lassen sich auch hier Bindungsmuster mit verschiedenen allelen Formen von MHC-II-Molekülen identifizieren.

Die Beladung der MHC-Moleküle mit Peptiden erfolgt für Klasse I und II auf unterschiedlichen Wegen, die sich aus der unterschiedlichen Herkunft der Peptide ergeben. MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren vor allem Peptide von intrazellulären Antigenen, d.h. gesunde Zellen präsentieren hauptsächlich Selbstantigene. Die wichtigste Rolle bei der Herstellung der Peptide kommt dabei dem Proteasom zu, einem Multienzymkomplex. Normalerweise werden Peptide im Rahmen des allgemeinen Proteinabbaus der Zelle generiert, dessen Aufgabe es ist, defekte, falsch gefaltete oder unvollständige Proteine abzubauen (Goldberg, 2003). Proteasomen sind auch indirekt beteiligt zelluläre Prozesse zu regeln, um die Zellen an neue Konditionen anzupassen. Es konnte gezeigt werden, dass das Proteasom nicht nur für den Abbau zelleigener Proteine verantwortlich ist, sondern auch für die MHC-Klasse-I-vermittelte Antigenpräsentation (Schwarz *et al.*, 2000). Um Antigene effizienter zu prozessieren, ersetzt die Zelle einige der konstitutiv exprimierten Untereinheiten des Proteasoms durch so genannte „Immun-Untereinheiten“. Dieses neu gebildete Proteasom wird nun Immunproteasom genannt. Das Immunproteasom ist in professionellen APCs konstitutiv, bei anderen Zellen wird der Austausch der Untereinheiten durch IFN- γ induziert (Kloetzel *et al.*, 2004). Durch diesen Austausch werden verstärkt Peptide hergestellt, die als MHC-Klasse-I-Peptide dienen können. Die durch das Proteasom gebildeten Peptide gelangen

mit Hilfe des Transportproteins TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*) in das endoplasmatische Retikulum (ER). Dort bildet sich mit Hilfe von Chaperonen der Peptid/MHC-Komplex, der über den sekretorischen Weg zur Membran gebracht wird, wo er dann CD8⁺ T-Zellen präsentiert wird.

Peptide, die auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden, stammen dagegen von exogenen Proteinen, die in das endosomale Kompartiment gelangen. Die Aufnahme eines exogenen Proteins kann entweder unspezifisch durch Pinozytose und Phagozytose oder spezifisch durch rezeptorvermittelte Endozytose geschehen (Watts, 1997). Die Proteine werden in angesäuerten Vesikeln durch lysosomale Proteasen abgebaut. Die sogenannte MHC-II-assoziierte invariante Kette heftet sich im ER an neusynthetisierte MHC-Klasse-II-Moleküle und verhindert so dessen Bindung an intrazelluläre Peptide und partiell gefaltete Proteine im Lumen. Sie dirigiert die Moleküle zu den angesäuerten Vesikeln und wird dort schrittweise abgebaut (Kropshofer *et al.*, 1997). Das MHC-II-Molekül bindet nun an ein Peptidantigen und wird an die Zelloberfläche transportiert. Dort wird der Peptid/MHC-II-Komplex von CD4⁺ T-Zellen erkannt.

Die T-Zell-Rezeptoren (*T cell Receptor*; TCRs) sind den Immunglobulinen in der Struktur ähnlich und werden von homologen Genen codiert. Eine T-Zelle erkennt nur eine bestimmte Kombination aus Peptid und MHC-Molekül. Alle T-Zellen durchlaufen während ihrer Reifungsphase im Thymus zwei Arten von Selektionsprozessen, die für die Funktionalität der spezifischen Immunantwort eines Individuums von entscheidender Bedeutung sind. Die positive Selektion stellt sicher, dass alle reifen T-Zellen auf Fremdartigene antworten können, die von körpereigenen MHC-Molekülen auf APCs vorgezeigt werden. Die negative Selektion hingegen eliminiert autoreaktive T-Zellen. Ergänzend kann es in der Peripherie zu einer Inaktivierung selbstreaktiver T-Zellen durch Anergie kommen. So wird sichergestellt, dass das zelluläre Immunsystem tolerant gegenüber körpereigenen antigenen Epitopen ist, Fremdartigene aber zuverlässig erkennt.

Neben den klassischen MHC-Molekülen gibt es noch „nicht-klassische MHC-Moleküle, wie HLA-E und -G. Sie sind weniger polymorph und ihre Expression ist variabel, was ihre exprimierte Menge auf der Zelloberfläche und ihr Vorkommen in Geweben betrifft. Ihnen kommt im Allgemeinen eine besondere Rolle in der Immunabwehr zu. So bindet z.B. HLA-E an den Rezeptor CD94:NK92A auf NK-Zellen, was zu einer Hemmung der NK-Aktivität

führt, sodass normale syngene Zellen nicht einem zytotoxischen Angriff von NK-Zellen zum Opfer fallen.

1.3 Cytomegalovirus

Das humane Cytomegalovirus (CMV), auch Humanes Herpesvirus 5 (HHV5) genannt, gehört zur Gruppe der weit verbreiteten β -Herpesviren. Alle humanen Herpesviren besitzen eine doppelsträngige DNA und ein von einer Virushülle umgebenes Nukleokapsid aus 162 Kapsomeren (Apperley *et al.*, 1989). Das CMV-Genom enthält mehr als 200 bekannte Gene und codiert über 250 strukturelle und nicht strukturelle Proteine (Chee *et al.*, 1990). Es wurde erstmals 1956 von Smith aus der Speicheldrüse und den Nieren eines Kindes isoliert (Smith, 1956).

Die Primärinfektion mit CMV verläuft meist symptomlos, es kann jedoch zu subklinischer Hepatitis, zu einer unspezifischen Fieberreaktion, zu einem Mononukleose-ähnlichen Krankheitsbild oder zu schweren Defekten bei pränataler Infektion des Fötus im Zusammenhang mit Erstinfektion der Mutter kommen. Das Virus bzw. dessen Genom persistiert meist lebenslang in latent infizierten Zellen, ohne sich zu replizieren (Bein *et al.*, 1993). Orte der latenten Infektion sind vor allem Monozyten und Endothelzellen. Hierbei unterläuft das Virus die Immunabwehr des Menschen und entzieht sich damit einer wirksamen Eliminierung durch das Immunsystem (Bailey *et al.*, 1995). Das CMV-Genom codiert für eine Reihe von Proteinen, die dem Virus helfen, dem Immunsystem zu entgehen, ein Prozess, der als Immunevasion bezeichnet wird. Mindestens fünf virale Proteine (US2, US3, US6, US10 und US11) interferieren mit der HLA-restringierten Antigenpräsentation durch Inhibition von TAP-Peptidtransportern und Dislokation bzw. Abbau von HLA-Molekülen (Hewitt, 2003; Mocarski, 2002). Durch Stabilisierung der Expression des nichtklassischen MHC-Moleküls HLA-E durch das virale UL40 sowie durch Expression des viralen HLA-Analogs UL18 wird auch die durch NK-Zellen vermittelte Virusabwehr beeinträchtigt. Zusätzlich codiert CMV für mehrere Chemokinrezeptor- und Zytokin-Analoga (Mocarski, 2002).

CMV kann unter bestimmten Umständen reaktiviert werden, so z.B. bei Tumorerkrankungen, während der Schwangerschaft, bei einigen Anämien, sowie bei Suppression des Immunsystems durch HIV oder durch zytostatische und/oder immunsuppressive Therapien.

Trotz neuer Diagnose- und Therapieverfahren stellt die CMV-Reaktivierung bzw. -Neuinfektion bei immunsupprimierten Patienten ein großes Problem dar. So erkrankten 40-70% dieser Patienten im Anschluss an eine Stammzelltransplantation (SCT) an CMV-assoziierten Krankheiten (Meyers *et al.*, 1986). Neben Infektionen der Lunge, des Magen-Darm-Trakts und der Leber (Bombi *et al.*, 1987; Reed *et al.*, 1990) weist vor allem die interstitielle Pneumonie eine sehr hohe Letalität auf (Emanuel *et al.*, 1988; Reed *et al.*, 1987; Winston *et al.*, 1990). Insgesamt sind CMV bzw. CMV-assoziierte Krankheiten für bis zu 25% der Todesfälle nach SCT verantwortlich (Boeckh *et al.*, 2003), wobei das Risiko für seronegative Transplantierte 3-5mal höher als für seropositive Empfänger ist, wenn CMV des Spenders mit dem Transplantat übertragen wird (Lim *et al.*, 2004).

Die antivirale Therapie bei Patienten nach allogener SCT erfolgt routinemäßig mit Virostatika wie Ganciclovir (GCV) und Foscarnet, sobald CMV mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) im Blut nachgewiesen werden kann. GCV ist ein Herpesvirus-spezifischer Guanosin-Antimetabolit. Es wird durch die virale Kinase UL 97 phosphoryliert und in die virale DNA eingebaut, was zum Abbruch oder einer deutlichen Reduzierung der viralen DNA-Synthese während der Elongation führt. Allerdings zeigt GCV erhebliche Nebenwirkungen wie Leukopenie und Thrombopenie (Crumpacker, 1996). Eine Alternative zu GCV ist Foscarnet, ein kompetitiver Inhibitor der viralen DNA-Polymerase. Hier wird der Einsatz vor allem durch Nierentoxizität und Hyperkaliämie limitiert (Sissons *et al.*, 2002). Durch präemptive Behandlung mit Virostatika konnte zwar eine Unterdrückung des Virus in den ersten 100 Tagen nach Knochenmarkstransplantation erreicht werden, aber auf lange Sicht ist Behandlung von CMV auf Grund der Nebenwirkungen weniger gut geeignet (Ljungman, 1998).

1.4 Adoptive Immuntherapie der CMV-Infektion

Trotz der immunevasiven Mechanismen von CMV können im Blut gesunder Seropositiver ein hoher prozentualer Anteil CMV-spezifischer, CD8⁺ T-Zellen detektiert werden (Jin *et al.*, 2000; Kern *et al.*, 1999). Bei Reaktivierung des latenten Virus verhindern diese eine Ausbreitung im Wirt. Nach der Beseitigung einer akuten Virusinfektion sterben die meisten zytotoxischen T-Zellen (Appay *et al.*), doch einige entwickeln sich zu Gedächtniszellen (Reddehase, 2002). Das Phosphoprotein pp65 wurde als Hauptziel der CMV-spezifischen CTL-Antwort identifiziert (Longmate *et al.*, 2001; McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996). Daneben konnte gezeigt werden, dass auch das „*immediate early*“-Protein IE1 ein wichtiges Ziel der zellulären Immunantwort ist (Alp *et al.*, 1991; Gyulai *et al.*, 2000; Kern *et al.*, 1999). In kleineren Mengen können auch gegen pp150, gB oder gH gerichtete CTLs nachgewiesen werden (Retiere *et al.*, 2000; Tabi *et al.*, 2001). Das Phosphoprotein pp65 ist eine Hauptkomponente des viralen Teguments und damit Bestandteil des Virions. pp65 kann deshalb ohne Neusynthese unmittelbar nach Infektion prozessiert und durch HLA-Klasse-I präsentiert werden (Reusser *et al.*, 1991). Das Nichtstruktur-Protein IE1 wird sehr früh und über den ganzen Replikationszyklus des CMV exprimiert und wird ebenfalls früh als Antigen präsentiert (Arrode *et al.*, 2000).

Eine fehlende Rekonstitution der CMV-spezifischen Immunantwort nach allogener SCT ist entscheidend für die Entwicklung einer CMV-Erkrankung (Krause *et al.*, 1997; Ljungman, 1995; Reusser *et al.*, 1991; Walter *et al.*, 1995). Die Häufigkeit CMV-spezifischer CTLs korreliert bei Transplantationspatienten direkt mit einem positiven klinischen Verlauf (Ljungman *et al.*, 1985; Reusser *et al.*, 1991), und ein adoptiver Immuntransfer nach Transplantation mit CMV-spezifischen CTLs reduzierte signifikant die Inzidenz schwerer CMV-Infektionen (Abb. 1.1; Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995).

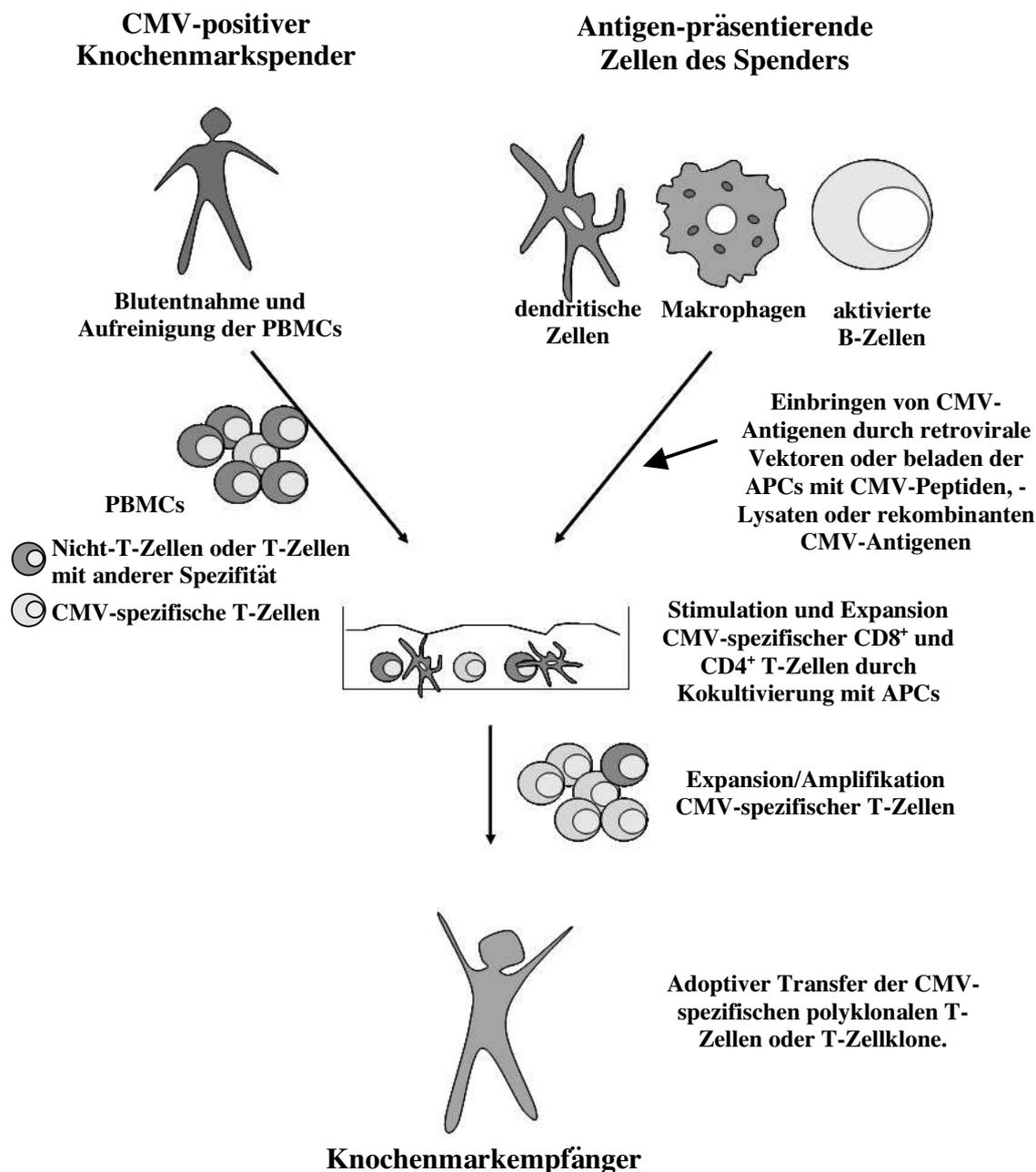


Abb. 1.1: Schematischer Verlauf einer CMV-spezifischen adoptiven Immuntherapie nach Knochenmarkstransplantation. Die adoptive Immuntherapie beruht auf der Transfusion von Effektorzellen mit dem Ziel, das Immunsystem des Empfängers zu unterstützen. Um eine Abstoßung des Transplantats zu vermeiden, werden CMV-spezifische T-Zellen des Knochenmarkspenders mit autologen APCs *in vitro* stimuliert und expandiert. CMV-spezifische T-Zellen werden zur Prophylaxe und Behandlung Virus-assoziiertes Krankheiten eingesetzt.

Für eine lang andauernde Persistenz transferierter CD8⁺ T-Zellen scheint die Anwesenheit von CD4⁺ T-Zellen wichtig zu sein (Walter *et al.*, 1995). Diese sezernieren Wachstumsfaktoren wie Interleukin 2 (IL-2) und vermitteln kostimulatorische Signale, z.B. über CD40/CD40L, was wiederum die Antigenpräsentation und die kostimulatorische Kapazität von APCs erhöht (Sarawar *et al.*, 2001; Schoenberger *et al.*, 1998). Es konnte gezeigt werden, dass eine Abnahme der CMV-Antwort der infundierten CTLs besonders bei Patienten auftrat, bei denen keine CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen werden konnten (Walter *et al.*, 1995). Dagegen führt die gemeinsame Infusion CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu einer starken und lang anhaltenden CMV-spezifischen Zytotoxizität (Heslop *et al.*, 1996; Walter *et al.*, 1995). Der ausschließliche Transfer von CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen führte zur Expansion CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen, wenn der Patient bereits Vorläuferzellen besaß (Einsele *et al.*, 2002b).

Für die Generierung CMV-spezifischer CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen aus seropositiven Spendern durch Stimulation der mononukleären Zellen des Blutes (PBMCs) mit APCs sind verschiedene Methoden beschrieben worden. Die Verwendung autologer, CMV-infizierter Fibroblasten eignet sich zwar prinzipiell zur Generierung Virus-spezifischer T-Zellen *in vitro* (Borysiewicz *et al.*, 1983; Walter *et al.*, 1995), weist aber auch Nachteile auf, da es sich bei Fibroblasten nicht um professionelle APCs handelt. Sie exprimieren nur begrenzt HLA-Klasse-I-Moleküle. MHC-Klasse-II- und Zelladhäsionsmoleküle werden dagegen erst nach Behandlung mit IFN- γ - und dann nur schwach - exprimiert. Eine andere Methode verwendet EBV-transformierte LCLs, in denen durch retrovirale Vektoren pp65 zur Expression gebracht wird (Sun *et al.*, 2000 1999). Ein Hauptproblem hier ist die schlechte Transduzierbarkeit von B-Zellen. Die Verwendung rekombinanter Viren, die Antigene in DCs oder CD40-B-Blasten einbringen (Bonini *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 2002; Keever-Taylor *et al.*, 2001) ist zwar möglich, scheint aber weniger interessant durch die Verwendung von infektiösen Vaccinia- oder Influenzaviren. Erfolgversprechend ist dagegen die Verwendung von DCs, die entweder mit CMV-Peptiden (Kleihauer *et al.*, 2001; Szmania *et al.*, 2001; Vannucchi *et al.*, 2001) oder Lysaten aus CMV-infizierten Zellen oder mit rekombinanten CMV-Antigen (Einsele *et al.*, 2002a; Peggs *et al.*, 2001) beladen werden. Die Zahl der aus Monozyten generierten DCs ist allerdings beschränkt durch die Zahl der im peripheren Blut vorhandenen Monozyten. Außerdem ist ihre Anwendung an die koordinierte Ausführung eines mehrstufigen Kultivierungsprotokolls zur Ausdifferenzierung der DC gebunden. In dieser Hinsicht hat die

Verwendung von aktivierten B-Zellen große Vorteile, da sie leicht in größerer Zahl aus peripheren Blut isoliert und *in vitro* einfach amplifiziert werden können.

1.5 Adoptive Immuntherapie gegen Epstein-Barr-Virus

Über 95% der gesunden Erwachsenen sind mit Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert. Die Infektion findet meist im Kindesalter durch Aufnahme über die oralen Schleimhäute statt und verläuft zumeist symptomfrei. Bei einer Primärinfektion im Jugendlichen- oder Erwachsenenalter kommt es in bis zu 50% der Fälle (Faulkner *et al.*, 2000) zur infektiösen Mononukleose („Pfeiffersches Drüsenfieber“), die durch Lymphoproliferation und allgemeine Entzündungserscheinungen gekennzeichnet ist. Nach Abheilung der Mononukleose oder nach symptomloser Primärinfektion persistiert bei gesunden Seropositiven das Virus in B-Zellen des peripheren Blutes.

EBV gehört zu den γ -Herpesviren und ist mit schweren malignen Erkrankungen, wie dem nasopharyngealen Karzinom (Raab-Traub, 1992), dem Burkitt-Lymphom (Magrath *et al.*, 1992), der posttransplantär lymphoproliferativen Erkrankung (PTLD) (Thomas, 1991) oder dem Hodgkin-Lymphom (Weiss *et al.*, 1989) assoziiert, an deren Entstehung EBV höchstwahrscheinlich beteiligt ist (Rickinson und Kieff, 2001). EBV-assoziierte Tumorerkrankungen leiten sich nicht nur von B-Zellen ab, sondern auch von epithelialen Zellen, T-Zellen und möglicherweise lymphoiden Vorläuferzellen.

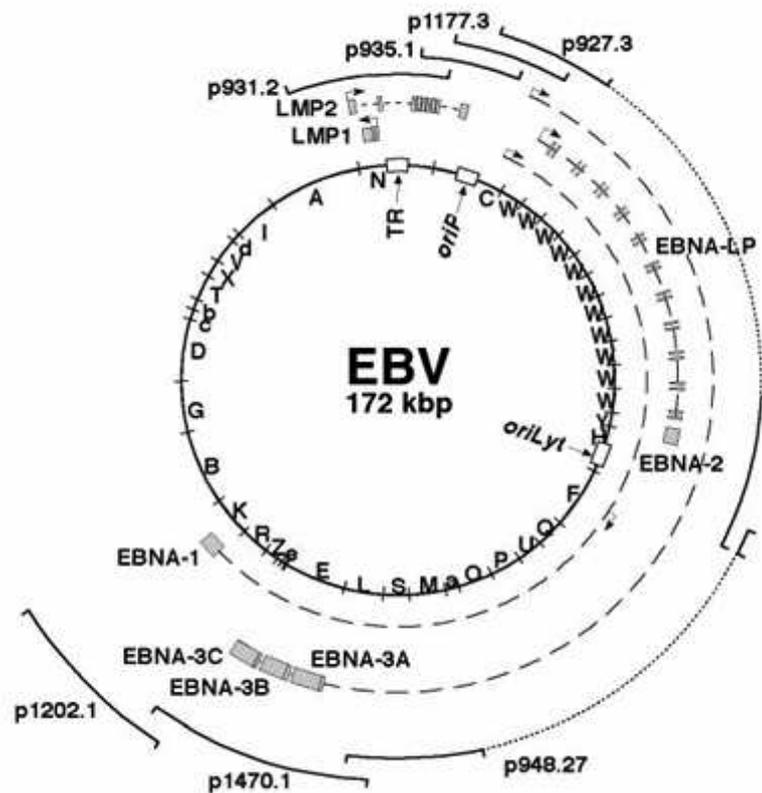
In vitro infiziert das Virus hocheffizient humane B-Zellen (Pope *et al.*, 1968). Dabei entstehen unbegrenzt proliferierende B-Zelllinien, lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) genannt, in denen EBV überwiegend latent vorliegt. Bei *in vitro* generierten LCLs, bei der infektiösen Mononukleose und bei Lymphomen von Immunsupprimierten werden alle sechs EBV-kodierten nukleären Antigene (EBNA1, 2, 3A, 3B, 3C, EBNA-LP) und die latenten Membranproteine LMP1 und 2 exprimiert. Dieser Zustand wird als Latenz III bezeichnet. In den malignen Reed-Sternberg Zellen der EBV-positiven Hodgkin-Erkrankung befindet sich das Virus im so genannten Latenztyp II, bei dem nur die latenten EBV-Antigene EBNA1, BARF0, LMP1 und LMP2 exprimiert werden (Herbst *et al.*, 1991; Oudejans *et al.*, 1995). Das Burkitt-Lymphom ist das Musterbeispiel für die so genannte Latenz I (Rowe *et al.*, 1992), bei der nur EBNA1 exprimiert wird.

Polyklonale EBV-spezifische CTLs wurden bereits erfolgreich zur Prävention und Behandlung der PTLD eingesetzt (Gustafsson *et al.*, 2000; Haque *et al.*, 1998; Heslop *et al.*, 1996; Khanna *et al.*, 1999; Rooney *et al.*, 1998). Allerdings konnte bei Patienten mit EBV-positivem Hodgkin-Lymphom bei schwerem Krankheitsverlauf kein Behandlungserfolg durch Einsatz EBV-spezifischer CTLs erzielt werden (Gottschalk *et al.*, 2002; Heslop *et al.*, 2000). Durch die Verwendung von LCLs zur Stimulation werden EBV-spezifische T-Zelllinien generiert, die sich bevorzugt, aber nicht ausschließlich, gegen die EBV-Proteine EBNA3A-C richten, die in den malignen Reed-Sternberg Zellen der EBV-positiven Hodgkin-Erkrankung nicht exprimiert werden (Rickinson *et al.*, 1997). Protokolle zur Generierung LMP1- oder LMP2-spezifischer CTLs setzen auf den Einsatz von Adenoviren für den Gentransfer (Gahn *et al.*, 2001; Gottschalk *et al.*, 2003; Ranieri *et al.*, 1999; Su *et al.*, 2001), weil hohe Transduktionsraten erzielt werden und die Vektoren - anders als Vaccinia-Virus- oder Herpes-Virus-Vektoren - keinen Einfluss auf die Funktionen der DCs haben. Bei der Verwendung von viralen Vektoren muss immer berücksichtigt werden, dass durch die starke Überexpression eventuell T-Zellen mit einer niedrigen Affinität und Avidität gegenüber dem Antigen generiert werden.

1.6 Das mini-EBV-System

Die Entwicklung von EBV-basierten Vektoren stützt sich auf die besondere Effizienz und Spezifität der Infektion von B-Zellen mit EBV, die zu einer Immortalisierung der B-Zellen *in vitro* führt. Durch Zusammenfügen subgenomischer EBV-Fragmente konnte ein erster synthetischer, B-Zell-immortalisierender EBV-Vektor konstruiert werden (Kempkes *et al.*, 1995).

A



B

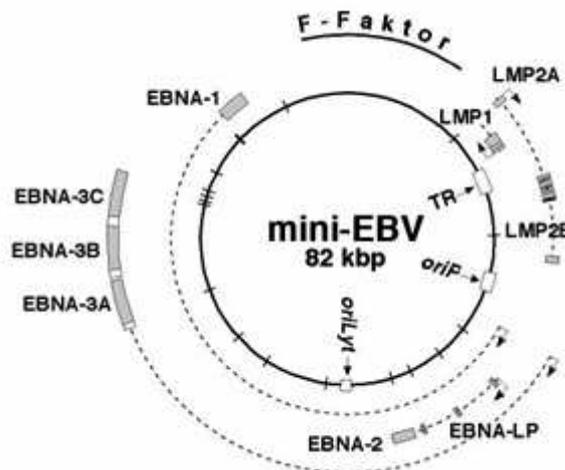


Abb. 1.2: Plasmid-Karten des Genoms des EBV-Stammes B95.8 (A) und des mEBV-Plasmids 1478.A (B). Die Nomenklatur der Elemente des EBV-Genoms baut auf der hier wiedergegebenen Bezeichnung für die bei *Bam*HI-Hydrolyse entstehenden Fragmente auf (Einzelbuchstaben in der EBV-Karte). Exemplarisch dargestellt sind die Leserahmen (Kästen in grau) und Primärtranskripte (gestrichelte Linien) der latenten Gene des EBV. Weiße Kästen markieren regulatorische Elemente. Außen um das EBV-Genom sind die subgenomischen Fragmente gezeigt (mit Codenummern bezeichnet), aus denen das mEBV-Plasmid durch „*chromosomal building*“-Technik konstruiert wurde (Kempkes *et al.*, 1995).

Dieses mini-EBV-(mEBV)-Konstrukt (Abb. 1.2 B; Codebezeichnung 1478.A) auf einem mini-F-Faktor-abgeleiteten Replikon und ist ein in *E.coli* propagierbarer und modifizierbarer Vektor. Es wurde konsekutiv aus sieben rekombinanten Plasmiden mit teilweise überlappenden Fragmenten des EBV-Genoms aufgebaut. Die Konstruktion erfolgte in *E.coli* mit der „*chromosomal building*“-Technik (O'Connor *et al.*, 1989). Diese Technik ermöglicht durch homologe Rekombination den Um- und Aufbau von Plasmiden, deren Größe die Verwendung herkömmlicher gentechnologischer Methoden problematisch macht. Dieses mEBV umfasst sämtliche für die latenten Proteine codierenden Sequenzen des EBV-Genoms sowie die regulatorischen Elemente, die für die latente bzw. lytische Replikation (*oriP* und *oriLyt*) sowie für die Verpackung in Viruspartikel (TR) nötig sind. Dieses mEBV-Plasmid enthält 41% der Sequenz des EBV-Stamms B95.8 (Abb. 1.1 A).

Mit der Entwicklung der Verpackungszelllinie 293/TR2 wurde die Virus-freie Verpackung der mEBV-Vektoren in infektiöse Partikel möglich (Delecluse *et al.*, 1999). Durch Elimination der *terminal repeats* (TR), die als Signal in *cis* für die Verpackung des EBV-Genoms unentbehrlich sind, wurde nun ein unverpackbares Helfer-EBV-Genom hergestellt. Durch stabile Transfektion der Zelllinie HEK293 mit diesem TR-EBV-Genom entstand die Verpackungszelllinie 293/TR2. Das Helfer-EBV-Genom unterstützt den lytischen Zyklus von EBV und kann fremde DNA in eine Virionhülle verpacken, wenn diese die Verpackungssignale trägt. Durch Transfektion eines Expressionsplasmids für das Protein BZLF1 wird der lytische Zyklus induziert. Kotransfizierte mEBV-DNA wird daraufhin von der Zelllinie in infektiöse Partikel verpackt, die effizient humane B-Zellen infizieren und zur Wachstumstransformation führen (Delecluse *et al.*, 1999). Die Infektiosität der Partikel wird noch verbessert, wenn ein weiteres virales Glykoprotein überexprimiert wird (Neuhierl *et al.*, 2002). Die so entstehenden B-Zelllinien, mini-LCLs (mLCLs) genannt, besitzen einen aktivierten Phänotyp (Moosmann *et al.*, 2002), enthalten aber kein lytisch replikationsfähiges Virus.

Durch den Einbau einer pp65-Expressionskassette kann pp65 konstitutiv in mLCLs exprimiert werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass pp65-mLCLs sich zur Generierung von pp65-spezifischen T-Zelllinien aus seropositiven Spendern eignen (Moosmann *et al.*, 2002). Detaillierte Analysen zeigten eine HLA-restringierte, pp65-spezifische Zytotoxizität der pp65-mLCL-stimulierten T-Zelllinien. In allen generierten Linien dominierten pp65-spezifische über EBV-spezifische T-Zellen.

1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Die bisherige Analyse der mini-LCL-stimulierten T-Zelllinien konzentrierte sich hauptsächlich auf die zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen. Klinische Studien haben aber gezeigt, dass für eine lang anhaltende Immunität nach Stammzelltransplantation (SCT) der adoptive Transfer von CMV-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen wichtig ist (Einsele *et al.*, 2002b; Peggs *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 1995). Neuere Studien unterstreichen die Rolle der CD4⁺ T-Zellen bei der Etablierung eines funktionierenden CD8⁺ T-Zellgedächtnis (Janssen *et al.*, 2003; Shedlock *et al.*, 2003). Darüber hinaus wirken CD4⁺ T-Zellen antiviral durch die Sekretion von Zytokinen, wie IFN- γ und TNF- α , und können ebenfalls zytotoxisch aktiv gegen Virus-befallene Zellen werden (Appay *et al.*, 2002; Savoldo *et al.*, 2002b).

Die vorliegende Arbeit sollte untersuchen, ob das mini-EBV-System geeignet ist T-Zellen zu generieren, die viele verschiedene CMV-Epitope - durch MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle präsentiert - erkennen. T-Zellkulturen von Spendern mit unterschiedlichen HLA-Typen sollten etabliert und analysiert werden. Dabei stand eine eingehende Analyse der Epitop-Spezifitäten der generierten T-Zellen im Vordergrund. Des Weiteren sollte geklärt werden, ob sich mLCLs zur Primärstimulation von naiven T-Zellen eignen.

Da neben pp65 auch IE1 ein weiteres wichtiges CMV-Antigen darstellt (Gyulai *et al.*, 2000), sollten zwei neue mEBV-Plasmide konstruiert werden, damit auch Spender erreicht werden können, die keine ausgeprägte Immunantwort gegen pp65 besitzen. Es gibt nur wenige gesunde Seropositive, die keine Immunität gegen zumindest eines dieser beiden Antigene besitzen (Gyulai *et al.*, 2000). Ein Vektor sollte eine Expressionskassette für IE1 enthalten, der zweite eine Kassette für ein Fusionsprotein bestehend aus pp65 und IE1 (pp65_IE1). Mit Hilfe der generierten IE1-mLCLs und pp65_IE1-mLCLs sollten autologe T-Zellen stimuliert und ihre Eigenschaften eingehend charakterisiert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ , F80dlacZDM15, D(lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), supE44, l ⁻ , thi-1, gyrA96, relA1
<i>E. coli</i> DH10B	F ⁻ , mcrA, D(mrr-hsdRMS-mcrBC), F80dlacZ M15, DlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, D(ara, leu) 7697, galU, galK, l ⁻ , rpsL, nupG

2.1.2 Zelllinien

Sämtliche verwendete prokaryotische bzw. eukaryotische Zellkulturen stammen, wenn nicht anders vermerkt, aus der Sammlung der Abteilung Genvektoren (W. Hammerschmidt) der GSF, München.

B95.8	Lymphoblastoide Krallenaffenzelllinie, latent/lytisch EBV-infiziert (Miller <i>et al.</i> , 1972)
293/TR2	Adenovirus Typ 5-immortalisierte, humane Nierenzelllinie 293 mit rekombinantem, „terminal repeat“-deletiertem EBV-Genom auf der Basis eines bakteriellen F-Faktor-Plasmids (Delecluse <i>et al.</i> , 1999)
K562	Humane chronische, myelogene Leukämie (CML)-Zelllinie aus dem Knochenmark (Lozzio <i>et al.</i> , 1975)
MRC-5	Humane embryonale Lungenfibroblasten (Jacobs <i>et al.</i> , 1970)
BSC-40	Epitheliale Nierenzelllinie aus der Grünen Meerkatze (Brockman <i>et al.</i> , 1974)
CD40L	Murine L-Zellen (Bindegewebsfibroblasten), stabil CD40-Ligand exprimierend (Garrone <i>et al.</i> , 1995)

Zusätzlich wurden im Rahmen dieser Arbeit aus primären B-Lymphozyten verschiedener Spender hergestellte mini-LCLs, LCLs und B-Blasten verwendet.

2.1.3 Viren

EBV B95.8	EBV-Laborstamm
CMV AD169	CMV-Laborstamm, fibroblastenadaptiert
vvWyeth	Wildtyp-Vacciniavirus (Stamm Wyeth)
vvpp65	Rekombinantes Vacciniavirus (Stamm Wyeth) mit pp65-Expressionskassette
MVA.pSC11	Rekombinantes, modifiziertes Vacciniavirus Ankara
MVA IE1	Rekombinantes Vacciniavirus Ankara mit IE1 Expressionskassette
MVA pp65	Rekombinantes Vacciniavirus Ankara mit pp65 Expressionskassette

EBV B95.8 und CMV AD169 wurden von ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) bezogen. Dank an N. Blake, Birmingham für die freundliche Überlassung von vvWyeth; Dank an A. B. Rickinson, Birmingham für die freundliche Überlassung von vvpp65; herzlichen Dank an N. Khan, Birmingham für die freundliche Überlassung von MVA.pSC11, MVA IE1 und MVA pp65.

2.1.4 Plasmide

p2548.30	<i>tet-shuttle</i> -Plasmid zur Modifikation von EBV-Vektoren (W. Hammerschmidt, GSF, München)
p2572	Resolvase-Expressionsplasmid (W. Hammerschmidt, GSF, München)
p2670	BALF4-Expressionsplasmid (B. Neuhierl, GSF, München)
p2961	mini-EBV p1478A ohne Drosophila hsp-neo (Ch. Mancao, GSF, München)
p3117	eukaryotisches Expressionsplasmid mit SV40-Promotor auf der Basis von pSG-5 von Stratagene (A. Moosmann, GSF, München)
p509	BZLF1-Expressionsplasmid (Hammerschmidt <i>et al.</i> , 1988)
pP	mini-EBV p1478A mit pp65-Expressionskassette (A. Moosmann, GSF, München)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden konstruiert und verwendet:

p3457 (IE1-mini-EBV)	p2961 mit IE1-Expressionskassette
p3458 (pp65 IE1-mini-EBV)	p2961 mit pp65 IE1-Expressionskassette
p3116	p2548.30 mit Linker YYCBOT

2.1.5 Oligonukleotide

Die Sequenzen der Oligonukleotide sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Primer zum Nachweis des Gens Chloramphenicol-Acetyltransferase (Überprüfung der Zelllinien auf Anwesenheit von mini-EBV-spezifischen Sequenzen)

cam-up: TTC TGC CGA CAT GGA AGC CAT C

cam-down: GGA GTG AAT ACC ACG ACG ATT TCC

Primer zum Nachweis des Gens BXLF1 (gp85) (Überprüfung der Zelllinien auf An- bzw. Abwesenheit von Wildtyp-EBV)

gp85c: TGG TCA GCA GCA GAT AGT GAA CG

gp85d: TGT GGA TGG GTT TCT TGG GC

Primer zum Nachweis des Gens β -Globins (Saiki *et al.*, 1988)

PC04 CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC
GH20 GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

Primer zur Konstruktion des IE1-Expressionsplasmids

IE1/fwd: GCT CTG GCG CGC CAT GGA GTC CTC TGC CAA GAG
IE1/re: GCG ACC TCG AGT TAC TGG TCA GCC TTG CTT CT

Primer zur Konstruktion des pp65_IE1-Expressionsplasmids

pp65/fwd: GCT CTG GCG CGC CAT GGA GTC GCG CGG TCG CCG T
pp65over/re: CTT GGC AGA GGA CTC CAT ACC TCG GTG CTT TTT GGG
IE1over/fwd: CCC AAA AAG CAC CGA GGT ATG GAG TCC TCT GCC AAG AG
IE1/re: GCG ACC TCG AGT TAC TGG TCA GCC TTG CTT CT

Oligonucleotide für Linker YYCBOT

YYCBOT: TCG AGT CTA GAA CCG GTA GAT CTC ATA TGG AGC T
TOBCYY: CCA TAT GAG ATC TAC CGG TTC TAG AC

Primer zur Typisierung von HLA-C (Turner *et al.*, 1998)

CI2F: CGA GGK GCC CGC CCG GCG A
CI3R: AGA TGG GGA AGG CTC CCC ACT
CE2F: GTA AAA CGA CGG CCA GTT CGG GCG GGT CTC AGC C
CE2R: TCS TGA CCT SCG CCC C
CE3F: GTA AAA CGA CGG CCA GTT GAC CRC GGG GGC GGG
CE3R: GAT GGG GAA GGC TCC CCA CT

2.1.6 Antikörper

Spezifität	Klon	Konjugat	Herkunft
CD3	UCHT1	PE-Cy5	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	S3.5	PE	CALTAG Laboratories, Hamburg
CD8	RPA-T8	FITC APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD19	HIB-19	PE	BD Biosciences, Heidelberg
CD21	WEHI-B2	FITC	Chemicon, Hofheim
CD45RO	UCHL1	PE-Cy5	BD Biosciences, Heidelberg
CD56	B159	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD80	L307.4	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD86	2331 (FUN-1)	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CCR-7	150503	FITC	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
HLA-DR	G46-6 (L243)	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
HLA-ABC	G46-2.6 W6/32	FITC ungekoppelt	BD Biosciences, Heidelberg Acris, Hiddenhausen
IL-2	MQ1-17H12	Alexa Fluor 488	CALTAG Laboratories, Hamburg
IFN- γ	B27	Alexa Fluor 488	CALTAG Laboratories, Hamburg
IgG	Goat-Anti-Mouse IgG (H+L)	HRP	Promega, Mannheim
pp65	2 und 6	ungekoppelt	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK
IE1	DDG9 und CCH2	ungekoppelt	Novocastra, Newcastle upon Tyne, UK

2.1.7 Peptide und HLA-Peptid-Tetramere

Die tetrameren HLA-Peptid-Komplexe wurden von ProImmune Limited (Oxford, England) bezogen.

Peptide wurden von Jerini (Berlin) mit einem Reinheitsgrad von 70% mit unmodifizierten Enden erworben. Die IE1-Peptidbank wurde von Mimotopes (Bonn) erstanden. Die pp65-Peptidbank wurde freundlicher Weise von M. Hammer (Berlin) zur Verfügung gestellt (Kern, 2002

Abkürzung	HLA	Antigen	Position	Sequenz
YSE ^{a)}	A1	pp65	363-373	YSEHPTFTSQY
NLV ^{a)}	A2	pp65	495-503	NLVPMVATV
TPR ^{a)}	B7	pp65	417-426	TPRVTGGGAM
RPH	B7	pp65	265-274	RIPHERNGFTV
EFF	B44	pp65	512-521	EFFWDANDIY
GPI	A11	pp65	16-24	GPISGHVLK
IPS ^{a)}	3501	pp65	123-131	IPSINVHHY
FPT	B3502	pp65	188-195	FPTKDVAL
ATV	A11	pp65	501-509	ATVQQQNLK
GPI	A11	pp65	16-24	GPISGHVLK
RRR ^{b)}	B14	pp65	539-547	RRRHRQDAL
NQW ^{b)}	B3501	pp65	173-181	NQWKEPDVY
VAF	Cw12	pp65	294-302	VAFTSHEHF
CED	B60	pp65	232-240	CEDVPSGKL
HER	B60	pp65	267-275	HERNGFTVL
VLE ^{a)}	A2	IE1	316-324	VLEETSVML
CRV	B7	IE1	309-317	CRVLCCYVL
ELK ^{a)}	B8	IE1	199-207	ELKRKMMYM
QIK	B8	IE1	88-96	QIKVRVDMV
CLG ^{a)}	A2	EBV LMP2	426-434	CLGGLLTMV
RPP ^{a)}	B7	EBV EBNA3A	379-387	RPPIFIRRL
QAK ^{a)}	B8	EBV EBNA3A	158-166	QAKWRLYTL
YPL ^{a)}	B35	EBV EBNA3A	458-466	YPLHEYHGM

a) auch als Tetramer vorhanden

b) in dieser Arbeit identifizierte Epitope

2.1.8 Sonstige Reagenzien

Alle hier nicht aufgeführten Reagenzien wurden von Roth (Karlsruhe), VWR (Darmstadt) oder Sigma (St. Louis, USA) in Analysenqualität bezogen.

1 kb DNA-Leiter	Gibco BRL, Lifetechnology, Eggenstein
Agarose, 02333	Biozym, Hess. Oldendorf
Bacto-Agar	Invitrogen, Karlsruhe
BATDA Reagent, C136-100	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
BenchMark™ Protein Ladder	Gibco BRL, Lifetechnology, Eggenstein
DNA-modifizierende Enzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot Roche Diagnostics GmbH, Mannheim New England Biolabs, Frankfurt
ECL™ Western Blotting Detection Reagents, RPN2106	Amersham Pharmacia, Freiburg
FACSFlow, FACSClean, FACSRinse	BD Biosciences, Heidelberg
Ficoll-Paque™ PLUS, 17-1440-03	Amersham Pharmacia, Freiburg
Fotales Kälberserum, S0115	Biochrome AG, Berlin
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, USA
Humanes Serum Typ AB, 14-490E	Cambrex, Apen
Hygromycin B, P02-015	PAA, Linz
Metafectene™, 124.10	Biontex, München
PCR-Reagenzien	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Penicillin	Gibco BRL, Lifetechnology, Eggenstein
Proleukin®, 17152	Chiron GmbH, München
pUC Mix 8	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
rekombinantes humanes IL-4	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon-Rot Roche Diagnostics GmbH, Mannheim New England Biolabs, Frankfurt
Taq-Polymerase	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
TriPure Isolationsreagenz, 1667157	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
Trypsin	Gibco BRL, Lifetechnology, Eggenstein
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, USA
Zellkulturmedium RPMI 1640	Gibco BRL, Lifetechnology, Eggenstein

2.1.9 Kits

Alkaline Phosphatase Kit, 172-1063	Bio-Rad, München
AP Conjugate Kit, 170-6432	Bio-Rad, München
Bio-Plex Cytokine Assay,	Bio-Rad, München
Biotin Luminescent Detection Kit, 1811592	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
FIX & PERM Cell Permeabilization Kit, GAS-004	CALTAG, An Der Grub, Österreich
IFN- γ ELISA, 3420-1H-20	Mabtech, Hamburg
IFN- γ ELISpot Kit, 3429-2H	Mabtech, Hamburg
MACS® Separationssystem	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
NucleoBond® BAC 100 Kit	Macherey-Nagel, Duren
Plasmidaufreinigungskits	Qiagen, Hilden
QIAamp® DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates, 11922-010	Invitrogen, Karlsruhe
TeloTAGGG Telomerase Length Assay, 2209136	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA ^{PLUS} , 2013789	Roche Diagnostics GmbH, Penzberg
CMVscan	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.10 Dienstleistungen

DNA-Sequenzierungen	Sequiserie, Vaterstetten
Karyotypisierung	C. Mayr, TU, München
Leukozytenkonzentrate aus 500ml Blut anonymen Spender	Landesklinik für Blutgruppenserologie und Transfusionsmedizin Salzburg
Oligosynthesen	Metabion, Planegg-Marinsried

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

Blottingpapier GB40	Schleicher & Schüll, Dassel
Einmalpipetten	Costar, Bodenheim
Elektroporationskuvetten	peqlab Biotechnologie, Erlangen
Hybond™-ECL-Zellulosemembran	Amersham Biosciences, Freiburg
Hybond™-N ⁺ -Nylonmembran	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm™ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
MaxiSorp, 96-Lochplatten, 439454	Nunc, Wiesbaden
MultiScreen™-HA, MAHAN4510	Millipore, Schwalbach
PCR-Reaktionsgefäße	Abgene, Hamburg
Röhrchen, steril 15ml/50ml	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter	Millipore, Schwalbach
Zellkulturflaschen und -schalen	BD Biosciences, Heidelberg
	Nunc, Wiesbaden
Zellkultur-Multiwell-Platten	BD Biosciences, Heidelberg
Zentrifugengefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg

2.1.12 Geräte

Avanti J25 Zentrifuge	Beckmann, Heidelberg
Axiovert 10 Fluoreszenzmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Biophotometer	Eppendorf, Hamburg
Bio-Plex Protein Array System	Bio-Rad, München
Durchflußcytometer „FACSCalibur“	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophorese-Dokumentation	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Elektrophoresekammern	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Elektroporator „Gene Pulser“	Bio-Rad, München
Fluorimeter Multilabel Counter	Perkin Elmer, Rodgau-Jugesheim
Inkubator für Zellkultur	Kendro, Langenselbold
L7-55 Ultrazentrifuge	Beckmann, Heidelberg
Mighty Small II Gel Elektrophorese Einheit	Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Mikroliterpipetten	Gilson, Den Haag, Holland

Multifuge 3L-R	Kendro, Langensfeld
PCR-Maschine „Mastercycler“	Eppendorf, Hamburg
SemiPhor, Semidry Blottingsystem	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg
UV-Transilluminator	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1 Kultivierung und Konservierung von *E. coli*

Bakterien wurden als Suspensionskultur in LB-Medium (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% NaCl) oder zu Vereinzeln von Kolonien auf LB-Agar-Platten (15 g Bacto-Agar ad 1 l LB-Medium) kultiviert. Bei Selektion auf Resistenz gegen Antibiotika wurden dem LB-Medium Ampicillin (100 µg/ml), Chloramphenicol (30 µg/ml), Kanamycin (50 µg/ml) oder Tetracyclin (30 µg/ml) zugegeben. Zur Lagerung von Bakterien über längere Zeiträume wurde eine konfluent gewachsene Bakterienkultur mit 50% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2 Transformation und Elektroporation von *E. coli*

2.2.2.1 Transformation

Die Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Stämme erfolgte nach einem Protokoll von Hanahan (Hanahan, 1983). Die kompetenten Bakterien wurden bei -80°C aufbewahrt. Für eine Transformation wurden 100 µl dieser Bakterien zusammen mit ca. 50 ng eines Ligationsansatzes 10 - 30 min auf Eis inkubiert und anschließend für 45 s auf 42°C im Wasserbad erwärmt. Nach Zugabe von 1 ml SOC-Medium und einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 30°C bzw. bei 37°C wurde die Zellsuspension auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei der geeigneten permissiven Temperatur im Brutschrank inkubiert.

2.2.2.2 Elektroporation

EBV Plasmid-DNA wurde durch Elektroporation in DH10B *E.coli* transfiziert. Die Herstellung elektrokompenter DH10B Bakterien erfolgte nach einem Protokoll von Sheng *et al.* (Sheng *et al.*, 1995). 50 μ l kompetente Bakterien wurden mit 1 μ g Plasmid-DNA 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette (0,1 cm Elektrodenabstand) überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 1,8 kV, 100 Ω und 25 μ F mit einer Zeitkonstante von 2 s. Die Bakterien wurden sofort in SOC-Medium überführt und nach einer 60-minütigen phänotypischen Expression bei 37°C bzw. im Falle des temperatursensitiven Rekombinationssystems bei 30°C auf Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C, 37°C oder 42°C.

2.3 RNA-Arbeitstechniken

Die Isolierung gesamtzellulärer RNA erfolgte mit dem TriPure Isolation Reagent der Firma Roche Diagnostics. Die Präparation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4 DNA-Arbeitstechniken

Die Anwendung allgemein üblicher Techniken, die im Umgang mit Nukleinsäuren benutzt wurden, wie z. B. Phenol-/Chloroformextraktion, Ethanolpräzipitation, Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, Auftrennung von DNA-Fragmenten über Agarosegele, Aufarbeitung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolyse, Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, Behandlung von DNA-Fragmenten mit Klenow-Polymerase, Ligierung freier DNA-Enden und Präparation von Plasmid-DNA über alkalische Lyse erfolgte in Anlehnung an Standardprotokolle (Sambrook *et al.*, 2001) oder nach Angaben der Hersteller.

2.4.1 Extraktion zellulärer DNA

Zur Isolierung von DNA aus PBMCs und kultivierten Zellen wurde der QIAamp DNA Mini Kit von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.4.2 Präparative Plasmidaufreinigung

Die präparative Plasmidaufreinigung aus stationären *E.coli*-Übernachtskulturen erfolgte mit Hilfe von DNA-Adsorptionssäulen nach Angabe des Herstellers (Qiagen). Die eluierte DNA wurde mit 0,7 vol. Isopropanol gefällt, mit 70%-igem Ethanol gewaschen und in einem geeigneten Volumen Aqua dest. aufgenommen.

2.4.3 Präparation von mini-EBV-Plasmid-DNA aus *E. coli*

2 l Übernachtskultur wurde für 15 min bei 5000 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert. Die Bakterienlyse und DNA-Präparation erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (Sambrook *et al.*, 2001). Anschließend wurde die isolierte DNA in insgesamt 15 ml TE-Puffer aufgenommen, in dem 16 g Cäsiumchlorid (CsCl) hinzugegeben und aufgelöst worden waren. Diese Mischung wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen (35 ml), in dem 400 µl Ethidiumbromid (1 % w/v) vorgelegt waren, überführt. Die UZ-Röhrchen wurden mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Die Zentrifugation erfolgte über 72 h bei 35000 rpm und 20°C. Anschließend wurde unter UV-Licht (365 nm) die untere Bande, die der „supercoiled“-Plasmid-DNA entspricht, mit einer Einmalkanüle entnommen. Die Plasmid-DNA-Mischung wurde in ein neues UZ-Röhrchen (11,5 ml) überführt und diese mit 1,55 g/ml CsCl-Lösung aufgefüllt. Nach erneuter Zentrifugation für 48 h bei 35000 rpm und Raumtemperatur wurde wiederum die untere Plasmid-DNA-Bande entnommen und das restliche Ethidiumbromid durch Ausschütteln mit CsCl-gesättigtem Isopropanol extrahiert. Nach Zugabe von TE-Puffer auf das fünffache Volumen und DNA-Präzipitation mit Isopropanol wurde die mini-EBV-Plasmid-DNA in TE-Puffer aufgenommen.

Alternativ dazu wurde mini-EBV Plasmid-DNA auch mittels EndoFree® Plasmid Kit der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die Menge und Reinheit der erhaltenen DNA war geringer als nach Reinigung über CsCl-Gradienten, aber für Transfektion in die Verpackungszelllinie 293/TR⁻ ausreichend.

2.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

2.4.4.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

IE1 cDNA (UL123) und pp65 cDNA (UL83) wurden durch reverse Transkription der entsprechenden mRNA aus AD169-infizierten MRC-5-Zellen gewonnen. Die isolierte RNA wurde in einem Einschrittverfahren mit dem „SuperScript™ One-Step RT-PCR for Long Templates“-Kit der Firma Invitrogen nach Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben und amplifiziert.

Hierbei erfolgte die cDNA-Synthese für 30 min bei 55°C. Anschließend wurde die PCR direkt durchgeführt.

Primer:	Annealing-Temperatur:
IE1/fwd:IE1/re	55°C
IE1over/fwd:IE1/re	56°C
pp65/fwd:pp65over/re	58°C

PCR-Programm: 94°C / 2 min; 35 Zyklen: 94°C / 15 s, 55°C-58°C / 30 s, 68°C / 2 min; 72°C / 10 min; 6°C

Da die Primer IE1/fwd und IE1/re Restriktionsschnittstellen enthielten, konnte das PCR-Produkt enzymatisch hydrolysiert und in das Plasmid p3117 ligiert werden.

2.4.4.2 „Overlap and extension“ Technik

Die Klonierung der pp65_IE1-Chimäre erfolgte nach der „overlap and extension“-Technik von Ho *et al.* (Ho *et al.*, 1989). Die beiden Produkte aus der RT-PCR mit den Primern pp65/fwd:pp65over/re und IE1over/fwd:IE1/re enthalten einen Überlappungsbereich, der am 3'-Ende von pp65 und am 5'-Ende von IE1 liegt. In einem zweiten Schritt wurden diese beiden PCR-Produkte in einer weiteren PCR-Reaktion als Matrize eingesetzt. Durch die Überlappung konnte ein Strang von jedem Fragment als Primer für das andere Fragment verwendet werden. Zusammen mit den beiden flankierenden Primern pp65/fwd und IE1/re konnte so das chimäre Gen amplifiziert werden.

Da die Primer 5'- und 3'-flankierende Restriktionsschnittstellen enthielten, konnten die PCR-Produkte enzymatisch hydrolysiert und in das Plasmid p3117 ligiert werden.

2.4.4.3 Amplifizierung mini-EBV- und Wildtyp-EBV-spezifischer-Sequenzen

Alle mini-LCLs wurden auf die Anwesenheit von mini-EBV-spezifischen Sequenzen und die Abwesenheit von Wildtyp-EBV-spezifischen Sequenzen hin kontrolliert. Ebenso wurden die generierten B-Blasten auf EBV-Freiheit getestet.

Als Kontrolle für die PCR wurden die Primer PC04 und GH20 verwendet um das Hauskeeping-Gen β -Globin nachzuweisen.

Standardprotokoll für die Überprüfung von mini-LCLs und B-Blasten

Reaktionsansatz

3 μ l zelluläre DNA

2 μ l $MgCl_2$ (25 μ M)

2 μ l dNTPs (je 50 mM)

0,5 μ l Primer-Mix (cam-up/cam-down/gp85c/gp85d; 25 μ M oder PC04/GH20; 25 μ M)

2 μ l 10x Taq-Polymerase Puffer

1 μ l Taq-DNA-Polymerase (1U/ μ l)

H₂O ad 20 μ l

PCR-Programm: 95°C / 5 min; 35 Zyklen: 95°C / 1 min, 59°C / 1 min, 72°C / 1 min;
72°C / 10 min; 4°C

2.4.4.4 Nested-PCR für HLA-C-Typisierung

Exon 2 und 3 des HLA-C-Lokus wurden wie von Cereb *et al.* beschrieben mittels der Primer CI2F und CI3R amplifiziert (Cereb *et al.*, 1996). Das Produkt dieser PCR wurde 1:100 verdünnt und als Matrize für Nested-PCR, die Exon 2 (Primer CE2F und CE2R) und Exon 3 (CE3F und CE3R) separat amplifiziert wurden, eingesetzt. Die gewonnenen DNA-Fragmente wurden anschließend sequenziert.

PCR-Programm: 95°C/1 min; 30 Zyklen: 95°C/1 min, 54°C/1 min, 72°C/1 min; 72°C/4 min; 4°C

2.4.4.5 TRAP-Assay

Für die Bestimmung der Telomerase-Aktivität in verschiedenen Zellextrakten wurde der TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} Kit der Firma Roche verwendet. Dieser enzymatische Immuno-Assay ermöglicht die photometrische Quantifizierung der Telomerase Aktivität einer Probe und basiert auf dem Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP) (Kim *et al.*, 1994). Aus den Zellen wurde zunächst ein Gesamtproteinextrakt hergestellt. Nach

Zugabe eines Biotin-markierten, synthetischen Primers fügte die enthaltene Telomerase an das 3'-Ende repetitive Sequenzen der Abfolge TTAGGG an. Dieses Elongationsprodukt wurde nun durch PCR amplifiziert. Anschließend wurden die Proben denaturiert und mit einer Digoxigenin-markierten Sonde hybridisiert. Die entstandenen Produkte wurden über ihre Biotinmarkierung auf einer mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte immobilisiert. Mittels eines anti-Digoxigenin, Peroxidase-(HRP)-gekoppelten Antikörpers und des sensitiven Peroxidasesubstrats TMB (enthält 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) konnten die Amplifikate detektiert werden. Der im Kit enthaltene interne Standard erlaubt den Ausschluß falsch-negativer Ergebnisse. Alle Arbeitsschritte erfolgten nach Angaben des Herstellers. Die Relative Telomerase Aktivität (Li *et al.*) der verschiedenen Proben in einem Experiment wurde wie folgt berechnet:

$$RTA = \frac{(A_S - A_{S,0})/A_{S,IS}}{(A_{TS} - A_{TS,0})/A_{TS,IS}} \times 100$$

AS:	Absorption der Probe
AS,0:	Absorption der hitzeinaktivierten Probe
AS,IS:	Absorption des internen Standards der Probe
ATS:	Absorption des Kontroll-Templates
ATS,0:	Absorption des Lyse-Puffers
ATS,IS:	Absorption des internen Standards des Kontroll-Templates

2.4.5 Southern-Blot-Hybridisierung

2.4.5.1 Telomer-Längen-Analyse

Für die Untersuchung der Telomer-Längen in B-Blasten wurde der TeloTAGGG Telomere Length Assay der Firma Roche verwendet.

Hierbei wurden 2 µg zelluläre DNA mit den Restriktionsenzymen *Rsa* I und *Hinf* I gespalten und in einem 0,8%igen Agarosegel in TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt. Um Strangbrüche in der DNA hervorzurufen, wurde das Gel 5-10 min mit 0,25 M HCl behandelt. Danach wurde die DNA in Denaturierungspuffer denaturiert und durch kapillaren Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond™ N+) übertragen (Southern, 1975). Der Transfer wurde nach 2-3 Stunden beendet. Die DNA wurde durch UV-Bestrahlung (120 mJ) kovalent an die Membran gebunden. Die Prähybridisierung erfolgte in mitgeliefertem Hybridisierungspuffer bei 42°C für 45 min. Nach dieser Zeit wurde der Puffer erneuert, die

Digoxygenin-markierte Telomer-spezifische Sonde zugegeben und für weitere 3 Stunden bei 42°C inkubiert. Anschließend wurde die Nylonmembran 2x 5 min bei Raumtemperatur in Waschpuffer I und 2x15 min bei 50°C in Waschpuffer II gewaschen. Die Membran wurde mit dem mitgelieferten Waschpuffer gespült und freie Bindungsstellen über Nacht bei 4°C mit im Kit enthaltender Blockierungslösung abgesättigt. Die Inkubation mit dem gegen Digoxygenin gerichteten und HRP-gekoppelten Antikörper in Blockierungslösung erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min. Die Membran wurde anschließend zweimal für 15 min in Waschpuffer gewaschen und anschließend im beigelegten Detektionspuffer äquilibriert. Danach wurde der Southern Blot nach Angaben des Herstellers entwickelt. Die Auflagezeit des Films richtete sich nach der Intensität des Signals.

TBE-Puffer:	100 mM Tris/HCl, 100 mM Borsäure, 0,2 mM EDTA, pH 8,0
Denaturierungspuffer:	0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl
Waschpuffer I	2x SSC, 0,1 % SDS
Waschpuffer II	0,2x SSC, 0,1 % SDS
2x SSC	300 mM NaCl, 30 mM NaAc

2.4.5.2 Telomerase-Aktivitäts-Assay

Der TRAP-Assay wurde wie unter 2.4.4.5 beschrieben durchgeführt. Um die dabei entstandene jeweils um 6 bp ansteigende Leiter sichtbar zu machen, wurden die Fragmente mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Papageorgiou *et al.*) aufgetrennt und auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond™ N+) transferiert. Dabei wurde ein 12%iges nichtdenaturierendes Acrylamidgel verwendet. Die Fragmente wurden anschließend durch kapillaren Transfer auf die Nylonmembran übertragen. Der Biotin-markierte Primer erlaubte die Sichtbarmachung der Fragmente durch ein Biotin Luminescence Detection Kit der Firma Roche. Die Detektion erfolgte nach Angaben des Herstellers.

5 x TBE:	0,5 M Tris/HCl, 0,5 M Borsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0
12% PAA (18 ml):	7,2 ml Acrylamid (30%)
1,8 ml 5 x TBE	
9 ml H ₂ O	
300 µl 10% APS	
15 µl TEMED	
Laufpuffer:	0,5 x TBE

2.5 Proteinarbeitstechniken

2.5.1 Westernblot Analyse

Ca. 10^6 Zellen pro Ansatz wurden in 200 μ l Lämmli-Puffer aufgenommen und 10 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) über ein 12%iges Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Als Molekulargewichtsstandard wurde die Prestained Protein Ladder von MBI verwendet. Die SDS-PAGE erfolgte bei 35 mA. Nach der Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine mit Hilfe eines Elektrotransfer-Verfahrens (Semidry) auf eine Hybond-ECL-Zellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte für 1 Std bei 25 mA/Gel in Transferpuffer. Nach Übertragen der Proteine auf die Membran wurden diese für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocklösung geschwenkt, um unspezifische Proteinbindestellen abzusättigen. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper gegen pp65 oder IE1 (15 μ M Endkonzentration) in Waschpuffer bei 4°C inkubiert. Vor Zugabe des zweiten Antikörpers wurde die Membran zweimal für 20 min gewaschen. Die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Maus HRP gekoppelt, Verdünnung 1:10000) erfolgte 2 Std lang bei Raumtemperatur in Waschpuffer. Anschließend wurde die Membran erneut zweimal gewaschen. Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Detektionssystem der Firma Amersham Pharmacia nach den Angaben des Herstellers.

Transferpuffer:	50 mM Tris; 105 mM Glycerin; 1,3 mM SDS, 20% Methanol
Blocklösung:	20 mM Tris/HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 4% Magermilchpulver
Waschlösung:	20 mM Tris/HCl (pH 7,4); 150 mM NaCl; 1% Magermilchpulver; 0,04% Tween-20

2.6 Zellkultur und Analyse von Zellen

Zellpelletierungen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 300 g und 20°C durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Um tote von lebenden Zellen unterscheiden zu können, wurde die Zellsuspension mit einem Volumen einer 0,5%igen Trypanblau-Lösung in PBS gemischt. Tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und sind daher im Gegensatz zu vitalen Zellen im Mikroskop an ihrer Blaufärbung zu erkennen.

2.6.1 Zellkulturbedingungen

Alle Zellen wurden in einem Inkubator bei 37°C mit einer Atmosphäre von 5% CO₂ kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640, versetzt mit 10% Kälberserum, 100 µg/ml Streptomycin und 100 U/ml Penicillin, verwendet. Bei der Kultur der Zelllinie 293/TR² wurde 100 µg/ml Hygromycin zur Erhaltung des rekombinanten EBV-Genoms zugesetzt.

Die adhären Zellen MRC-5, BSC-40 und 293/TR² wurden in Kulturmedium vermehrt und alle 2-3 Tage, im Falle von MRC-5 einmal pro Woche, 1:4 verdünnt. Die adhären Fibroblastenzelllinie CD40L wurde ebenfalls in Kulturmedium vermehrt und einmal pro Woche 1:40 verdünnt. Adhären Zellen wurden zur Subkultivierung mit PBS serumfrei gewaschen, dann mit 0,05% Trypsin / 0,02% EDTA von der Wachstumsfläche gelöst, einmal in Medium gewaschen und in entsprechender Verdünnung wieder ausplattiert.

Um die Proliferation zu stoppen, wurden vor der Kokultur mit primären B-Lymphozyten die Zellen für 120 min mit einer 50Gy γ -Strahlung behandelt.

Suspensionszellkulturen wurden ein- bis zweimal wöchentlich zwei- bis zehnfach verdünnt subkultiviert.

2.6.2 Aufbewahrung von Zellen

In Gegenwart von Dimethylsulfoxid (DMSO) können Zellen in flüssigem Stickstoff eingefroren und über längere Zeit gelagert werden. Zum Einfrieren wurden die Zellen wie angegeben abzentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium resuspendiert und in ein 2 ml Kryoröhrchen pipettiert. Um die Zellen schonend abzukühlen, wurde das Röhrchen in ein allseitig verschlossenes Styroporbehältnis gegeben und bei -80°C tiefgefroren. Einige Tage später wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen in einem Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und mit vorgewärmtem Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und in ein Kulturgefäß überführt.

Einfriermedium: 10% DMSO
 40% FCS
 50% RPMI 1640

2.6.3 Isolierung primärer humaner Lymphozyten

Als Quelle für humane Lymphozyten diente frisch abgenommenes venöses Blut freiwilliger Spender oder Leukozytenkonzentrate (buffy coats). Die Proben wurden 1:1 mit PBS vermischt und über einen 30%igen Ficoll-Gradienten aufgereinigt. Dafür wurden die Proben bei 1000 g 20 min lang durch ein Ficoll-Kissen zentrifugiert, um Erythrozyten und Granulozyten abzutrennen. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase abgenommen und fünfmal mit PBS gewaschen, um Reste von Ficoll zu entfernen und Thrombozyten abzureichern. Diese Fraktion mononukleärer Zellen, sogenannten PBMCs (peripheral blood mononuclear cells), wurde als Ausgangsmaterial für B-Zellinfektionen mit EBV-Vektoren, die Generierung von B-Blasten und zur T-Zell-Reaktivierung verwendet.

2.6.4 Detektion von Antikörpern gegen CMV in Humanserum oder -plasma

Der „CMVscan“-Kartentest ist ein passiver Latexagglutinationstest zum Nachweis von Antikörpern gegen Cytomegalovirus in Humanserum oder -plasma. Für die vorliegende Arbeit genügte eine qualitative Durchführung des Tests. Bei dem Test agglutinieren zuvor mit CMV-Antigenen sensibilisierte Latexpartikel bei Vorhandensein von CMV-Antikörpern. Nach einer angemessenen Reaktionszeit sind die agglutinierten Partikel mit bloßem Auge zu erkennen.

Zuerst wurde von ca. 500 µl Vollblut durch Zentrifugation (2500 rpm, 10 min, RT) das Serum abgetrennt. 25 µl Serum wurden mit der gleichen Menge an Verdünnungspuffer gemischt und auf ein Testfeld der mitgelieferten Karten aufgetragen. Das verdünnte Serum wurde mit einem Plastikrührstäbchen gleichmäßig auf dem Testfeld verteilt. Anschließend wurde das Latexreagenz gründlich gemischt und ein freifallender Tropfen (ca. 15 µl) in jedes Serum-Testfeld gegeben. Durch Drehen der Karte wurde das Latex-Antigen gleichmäßig in den Testfeldern verteilt. Nach 6 - 8 min konnte der Test ausgelesen werden. Als Kontrolle dienten mitgelieferte CMV-positive und -negative Seren.

2.6.5 Generierung von mini-EBV-Virionen

Die Generierung von mini-EBV-Virionen erfolgte mit Hilfe der EBV-Verpackungszelllinie 293/TR² (Delecluse *et al.*, 1999). Zur Produktion von infektiösen mini-EBV-Virionen wurden 293/TR² in Standardmedium ohne Hygromycin 30 - 50% konfluent ausplattiert. Die Zellen einer 15cm-Schale wurden zwei Tage danach in serumhaltigen Standardmedium mit 24 µg mini-EBV-Plasmid, 12 µg p509(BZLF1) und 12 µg pRA (BALF4), komplexiert mit 50 µl Metafectene nach Angaben des Herstellers transfiziert. Nach 24 und 72 Stunden wurde das Medium vorsichtig abgenommen und durch 12 ml frisches ersetzt. 96 Stunden nach Transfektion wurde das virionhaltige Medium abgenommen, zur Abtrennung von Zellbestandteilen bei 1000 g für 10 min zentrifugiert, filtriert (0,8 µm) und portioniert bei -80°C gelagert. Der abgenommene Überstand wurde durch frisches Medium ersetzt und der Vorgang an Tag 5 und 6 wiederholt.

2.6.6 Infektion von B-Zellen mit EBV oder EBV-Vektoren

Für die Generierung von mini-LCLs wurden eine halbe Million frisch aufgearbeitete oder kryokonservierte PBMCs oder B-Blasten in 100 µl Medium mit 100 µl mini-EBV-virionhaltigem Zellkulturüberstand in einer Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte infiziert. Das Medium wurde mit 1 µg/ml Cyclosporin A supplementiert. Für die Negativkontrolle (auf endogene EBV-Infektion) wurde statt des mini-EBV-Überstandes 100 µl Medium, für die Herstellung von LCLs 10 µl B95.8-Kulturüberstand verwendet. Einen Tag nach Viruszugabe, und danach einmal wöchentlich, wurde die Hälfte des Mediums durch frisches ersetzt. Während der ersten vier Wochen wurde dem Standardmedium Cyclosporin A (1 µg/ml) zugesetzt, um eine T-Zell-Reaktivierung zu unterbinden. In den meisten Fällen

wurde ein Auswachsen immortalisierter Zellen erstmals nach drei bis sechs Wochen beobachtet. Die Zellen wurden vorsichtig in größere Kulturgefäße expandiert.

2.6.7 Generierung polyklonaler T-Zelllinien

Als Quelle für T-Zellen dienten kryokonservierte oder frische PBMCs. Durch Restimulation mit einer autologen, Antigen-exprimierenden mini-LCL wurden daraus polyklonale T-Zelllinien generiert. Es wurde ein Restimulationsprotokoll verwendet, das gegenwärtig zum Zweck des adoptiven T-Zell-Transfers in klinischer Anwendung ist (Roskrow *et al.*, 1998). Pro Vertiefung einer 24-Loch-Platte wurden 1×10^6 PBMCs und $2,5 \times 10^4$ mit 50 Gy bestrahlte mini-LCL-Zellen in 1 ml Standardmedium kokultiviert. Dies entspricht einem Effektor/Stimulator-Verhältnis (E:S) von 40:1. Ab Tag 10 und dann alle sieben Tage wurden die Zellen geerntet und mit bestrahlten mini-LCLs im Verhältnis E:S = 4:1 in frischem Medium weiter kultiviert. Ab Tag 15 wurde dem Medium 90 U/ml rekombinantes Interleukin-2 (rIL-2) zugesetzt. Die Zellen wurden ab dem fünfzehnten Tag zwischen den mini-LCL-Stimulationen nach Bedarf 1-2 mal pro Woche mit frischem Medium versorgt.

2.6.8 Einzelzellklonierung von T-Zellen

Für Einzelzellklonierungen wurden statistisch 0,5 T-Zellen zwischen Tag 35 und 45 pro Vertiefung einer 96-Loch-Rundbodenplatte zusammen mit bestrahlten PBMCs von vier verschiedenen anonymen Spendern (je 1×10^6 /ml) und bestrahlten mLCLs (1×10^5 /ml) ausplattiert. Das Medium wurde supplementiert mit 0,5 µg/ml PHA und 1000 U/ml rIL-2. Wenn nicht anders vermerkt, wurden Einzelzellklonierungen in Standardmedium mit 5% humanem Serum durchgeführt.

2.6.9 Phänotypisierung von Zellen mittels FACS-Analyse

Einzelzellen einer Zellsuspension können mittels Durchflußzytometrie in einem FACSTM-Gerät analysiert werden. Nach Färbung von Zellen mit Antikörpern oder tetrameren HLA-Klasse-I/Peptid-Komplexen („Tetramere“), die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind, kann man in der FACS-Analyse auf der Basis einzelner Zellen bestimmen, wie viele Zellen einer Population ein bestimmtes Protein exprimieren und welches relative Expressionsniveau auf der Oberfläche erreicht wird. Erkennt der Antikörper ein Antigen, das sich im Zytoplasma befindet, müssen die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden.

2.6.9.1 Färbung von Oberflächenmolekülen

Für die Detektion von verschiedenen Oberflächenmolekülen wurden ca. 1×10^5 - 1×10^6 Zellen einmal in kalten PBS/ 2% FCS gewaschen und mit spezifischen Antikörpern 20 min auf Eis inkubiert. Für die Antigen-spezifische Färbung von T-Zellen mit Tetrameren wurden die Zellen zuvor für 20 min bei 37°C mit Phycoerythrin-(PE)-markierten Tetramer inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS/ 2% FCS gewaschen und sofort per Durchflußzytometrie analysiert.

2.6.9.2 Intrazelluläre Färbung von Zytokinen

Zur Quantifizierung Antigen-spezifischer T-Zellen, die das Effektorzytokin Interferon- γ (IFN- γ) sezernieren, wurden die Zellen in ihrer Ruhephase, d.h. frühestens vier Tage nach der letzten Restimulation, mit Antigen-präsentierenden Zellen koinkubiert. Dem Medium wurde nach einer Stunde Brefeldin A bis zu einer Endkonzentration von 10 μ g/ml zugesetzt und weitere 5-6 Stunden inkubiert. Dieses inhibiert den anterograden Transport der Proteine vom Endoplasmatischen Retikulum zum Golgi-Apparat durch Zerstörung der Vesikel (Lippincott-Schwartz *et al.*, 1991; Wood *et al.*, 1991). IFN- γ akkumuliert dadurch im Zytoplasma und kann intrazellulär nachgewiesen werden.

Zur Detektion von IFN- γ wurden die Zellen unter Anwendung des „CytoFix-/CytoPerm-Reagent“ von CALTAG für 15 min permeabilisiert und für weitere 15 min bei Raumtemperatur mit Alexa-488-markiertem IFN- γ -Antikörper inkubiert und fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS/ 2% FCS gewaschen und per Durchflußzytometrie analysiert.

2.6.10 Magnetische Separation von T-Zellpopulationen

Zur magnetischen Separation von Zellen wurde das Verfahren von Miltenyi Biotech verwendet. Es beruht auf der Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern, an die superparamagnetische, ca. 50 nm große Partikel gekoppelt sind. In einer mit paramagnetischer Matrix ausgekleideten Säule, die sich in einem starken magnetischen Feld befindet, werden die Zellen durch die Antikörper in der Säule magnetisch festgehalten. Nicht markierte Zellen durchlaufen die Säule. Nach Entfernen des magnetischen Feldes konnten die markierten Zellen von der Säule gespült und anschließend im FACS analysiert werden.

Färbung und Separation von verschiedenen Zellpopulationen erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Zur Separation der T-Zellen, die Interferon- γ sezernieren, wurde ein Verfahren verwendet, bei dem das sekretierte Zytokin an der Oberfläche der sezernierenden Zelle durch einen dort gebundenen Antikörper abgefangen und durch einen weiteren PE-gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht wird. Die Separation erfolgte mittels magnetischer anti-PE-Beads. Die T-Zellen wurden in ihrer Ruhephase über Nacht mit Antigen-präsentierenden Zellen koinkubiert. Anschließend erfolgte die Färbung und Separation nach dem Protokoll des Herstellers.

2.6.11 Bioplex Immunoassay

Zur Quantifizierung verschiedener Zytokine wurde das Bioplex Protein Array System der Firma Bio-Rad angewandt, mit welchem in einem Ansatz simultan mehrere Proteine analysiert werden können. Das Prinzip dieses modifizierten Sandwich-Immunoassays beruht auf der Verwendung unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Polystyrenkügelchen (so genannte Beads), an die spezifische Antikörper kovalent gebunden sind. In einer Mikrotiterplatte wurden die frischen oder aufgetauten Zellkulturüberstände von verschiedenen T-Zelllinien bzw. ein bekannter Standard des jeweiligen Proteins zusammen mit den Antikörpergekoppelten Beads in die Vertiefungen pipettiert und für 30 min auf einem Schüttler bei 300 rpm inkubiert. Hierbei wurden die im Überstand präsenten Zytokine an den auf der Oberfläche der Beads kovalent gekoppelten Antikörper gebunden. Anschließend wurde die Platte mittels Vakuumfiltration gewaschen und ein zweiter, biotinylierter Detektionsantikörper zugegeben, der spezifisch an ein anderes Epitop der gesuchten Zytokine bindet. Danach wurde die Platte für weitere 30 min unter gleichmäßigem Schütteln inkubiert. Nach Entfernung von überschüssigem Detektionsantikörper durch erneutes Waschen, wurde PE-konjugiertes Streptavidin zugegeben. Es folgte ein Inkubationsschritt für 10 min. Ungebundenes Streptavidin wurde durch weitere Waschschrte entfernt. Die Quantifizierung der Zytokine erfolgte im Array Reader der Firma Bio-Rad.

2.6.12 IFN- γ -ELISA

Zur Bestimmung der induzierten Aktivierung spezifischer T-Zellen wurde ein IFN- γ -ELISA eingesetzt. T-Zellen wurden mit allogenen oder autologen mLCLs oder mit Peptid-beladenen B-Blasten ca. 18 h kokultiviert. 96-Loch-Platten (MaxiSorp) wurden über Nacht mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes IFN- γ (Mabtech) bei 4°C beschichtet, anschließend gewaschen und mit Waschlösung für eine Stunde blockiert. Die Überstände wurden auf die vorbehandelten Platten transferiert und für 2 h Stunden auf der Platte belassen. Die nachfolgenden Antikörperinkubationen und Waschschrte erfolgten nach Angaben des Herstellers (Mabtech). Nach sechs weiteren Waschschrten wurde die Substratlösung der Firma BIO-RAD auf die Platten gegeben und die Absorption bei 405 nm in zeitlichen Abständen mehrmals gemessen.

PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2- 7,4
Waschlosung	0,05% Tween 20 in PBS

2.6.13 IFN- γ -ELISpot Assay

Die ELISpot-Technik erlaubt es, die Zytokinproduktion einzelner Zellen zu detektieren (Versteegen *et al.*, 1988). Es wurde ein ELISpot Kit zur Detektion von IFN- γ verwendet. Hierbei werden Zellen auf einer mit monoklonalem Antikörper beschichteten 96-Loch Zelluloseester-Platte ausgesät. Je Vertiefung werden 1×10^4 Stimulatoren in 100 μ l Standardmedium vorgelegt und verschiedene Zahlen von T-Zellen oder PBMCs in je 100 μ l dazugegeben. Während einer etwa achtzehnstündigen Inkubation bindet von den Zellen produziertes IFN- γ den Antikörper und kann nach Entfernen der Zellen durch einen sekundären, biotinylierten Antikörper markiert werden. Streptavidin-gekoppelte, alkalische Phosphatase bindet an das Biotin und wird mittels BCIP/NBT Substrat nachgewiesen. Auf der Membran bilden sich blaue Punkte, die unter einem Binokular-Mikroskop ausgezählt werden können.

2.6.14 Zytotoxizitäts-Analysen

Die Zytotoxizität von T-Zelllinien wurde durch die Messung der freigesetzten Menge eines Markierungsreagenz aus zuvor zytoplasmatisch markierten, lebenden Zielzellen ermittelt. Als Markierungsreagenz wurde der organische Komplexlignand BATDA (Bis (actoxymethyl) 2,2':6'2''-terpyridin-6,6''-dicarboxylat) (Blomberg *et al.*, 1996) verwendet, der im Zellinneren zu TDA hydrolysiert wird und dann die Membran nicht mehr passieren kann. Der in den Überstand freigesetzte Komplexlignand wird mit Europium(III)-Ionen umgesetzt und der gebildete fluoreszierende Komplex durch zeitaufgelöste Fluorometrie nachgewiesen.

Zytotoxizitäts-Analysen wurden mit T-Zelllinien durchgeführt, bei denen die letzte Restimulation mindestens vier Tage zurück lag. Etwa 1×10^6 Zellen wurden mit $1 \mu\text{l}$ BATDA-Reagenz für 20 - 30 min bei 37°C markiert und anschließend fünfmal mit PBS gewaschen. Verschiedene Zahlen von Effektorzellen wurden in jeweils $100 \mu\text{l}$ Standardmedium ohne Phenolrot in 96-Loch-Spitzbodenplatten vorgelegt und jeweils 10000 markierte Zielzellen in ebenfalls $100 \mu\text{l}$ dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 - 4 Stunden bei 37°C wurden je $20 \mu\text{l}$ Überstand abgenommen und in die Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte überführt, je $200 \mu\text{l}$ Europium-Lösung dazugegeben, 15 min geschüttelt und die Fluoreszenz des gebildeten Europium-Chelatkomplexes zeitaufgelöst im Fluorimeter gemessen. Für jede Zielzellart wurden parallel die Maximalfreisetzung (vollständige Lyse mit 0,5% Triton X-100) und die Spontanfreisetzung (Zielzellen ohne Zugabe von Effektoren) ermittelt. Die Ergebnisse wurden als relative spezifische Lyse angegeben. Diese wurde aus den einzelnen Freisetzungswerten wie folgt berechnet:

$$L = \frac{F - S}{M - S}$$

L = relative spezifische Lyse

F = Freisetzungswert der einzelnen Proben

M = Maximalfreisetzung

S = Spontanfreisetzung

2.7 Arbeiten mit Viren

2.7.1 Epstein-Barr-Virus

Als Quelle für humanes Wildtyp-EBV zur Generierung von lymphoblastoiden Zelllinien (LCLs) diente die mit Referenzstamm B95.8 partiell lytisch, infizierte, lymphoide Krallenaffen-Zelllinie gleichen Namens. B95.8 Zellen sezernieren bei fortlaufender Kultivierung infektiöses EBV in den Kulturüberstand. Die Überstände dieser Zelllinie können nach Filtration (0,45 µm) unmittelbar für die Infektion und Immortalisierung von B-Zellen verwendet werden. Solche Überstände bleiben bei Lagerung bei 4°C mehrere Wochen für diesen Zweck verwendbar.

2.7.2 Cytomegalovirus

Subkonfluente MRC-5-Zellen wurden mit dem humanen Cytomegalovirus des Referenzstamms AD169 infiziert, indem 0,1 infektiöse Viren pro Zelle (multiplicity of infection, MOI=0,1) auf die Fibroblasten gegeben wurde. Die Kultivierung wurde fortgesetzt, bis 80-90% der Zellen zytopathische Effekte (runde oder elliptische Form, gelockerte Adhärenz, teils vergrößerte Zellen) zeigten. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und wurde dann zur Weiterinfizierung oder zum Anlegen von Virusstocks verwendet. Zum Anlegen eines Virusstocks wurde der Überstand abgenommen und 10 min bei 1000 g zentrifugiert. Falls nach der Ernte des Überstandes die meisten infizierten Zellen noch adhärirten, wurden sie vorsichtig mit frischem Medium überschichtet und nach weiteren 24 Stunden der Überstand erneut geerntet. Die Prozedur wurde solange die Zellen adhären blieben wiederholt.

Zur Abschätzung der Virustiter wurden die Überstände in Verdunnungsreihen zur Infektion von Fibroblasten in 96-Loch-Platten verwendet. Zwei Wochen nach Infektion wurden infizierte und nicht infizierte Löcher gezählt.

2.7.3 Rekombinante Vacciniaviren

Zur Propagierung von rekombinanten Vacciniaviren wurden konfluente Zellen der Linie BSC-40 mit 2×10^7 Viren pro 175-cm²-Flasche infiziert. Sobald ca. 90% der BSC-40-Zellen einen zytopathischen Effekt zeigten, wurden die Zellen geerntet, indem noch adhärenente Zellen mit einer Pipette abgespült wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml PBS resuspendiert. Zum Zellaufschluß wurde die Suspension dreimal im Wechsel in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Wasserbad bei 37°C aufgetaut und 20 s kräftig resuspendiert. Danach wurden die Zelltrümmer bei 300 g für 5 min abzentrifugiert und der virushaltige Überstand bei -80°C gelagert.

Zur Titerbestimmung wurden Vaccinia-Präparate in Verdünnungsreihen auf BSC-40-Zellen oder MRC-5-Zellen in 96-Loch-Platten titriert.

Zur Verwendung als Zielzellen wurden Fibroblasten, mini-LCLs oder B-Blasten 12 Stunden vor Verwendung mit rekombinanten Vacciniaviren (MOI=10) infiziert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Charakterisierung von B-Blasten

3.1.1 Generierung und Langzeitkultivierung von B-Blasten

CD40-aktivierte B-Zellen, auch B-Blasten genannt, sind hocheffiziente Antigen-präsentierende Zellen (Schultze *et al.*, 1997; von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2002). Die CD40-Ligand-(CD40L)-stimulierten B-Blasten wurden in den hier gezeigten Experimenten als EBV-freie Zielzellen oder als Stimulatoren in T-Zellassays verwendet. Zunächst wurde das Verfahren zur effizienten Herstellung von B-Blasten etabliert und optimiert.

In den bisher publizierten Protokollen wurden B-Blasten aus großen Zellzahlen primärer B-Zellen hergestellt. Dafür wurden 2×10^6 PBMCs in 6-Loch-Platten mit CD40L-Zellen kokultiviert (Garrone *et al.*, 1995; Schultze *et al.*, 1997). Bei einem von fünf Spendern konnte unter Verwendung hoher Anfangszellzahlen eine Kontamination der Kulturen mit endogenem Wildtyp-EBV des Spenders beobachtet werden. Um das Risiko einer Kontamination durch EBV zu verringern, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten B-Blasten aus kleinen Anfangszellzahlen hergestellt.

Die für die B-Zellkulturen notwendigen CD40L-Zellen wurden letal bestrahlt (50Gy). Unabhängig von der Anzahl der Vertiefungen wurden anschließend pro Multi-Loch-Platte $7,5 \times 10^5$ CD40L-Zellen ausplattiert. Nach 12 - 18 h waren die Zellen adhärirt und konnten zur Kokultivierung mit PBMCs und B-Blasten verwendet werden. CD40L-stimulierte B-Blasten wurden aus PBMCs generiert, indem $2,5 \times 10^4$, 5×10^4 oder 1×10^5 PBMCs in einer Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte mit CD40L-Zellen kokultiviert wurden. Das Medium wurde mit IL-4 (2 ng/ml) und Cyclosporin A (1 µg/ml) supplementiert. Die kultivierten Zellen wurden alle 3 - 5 Tage auf neue Platten mit frischen CD40L-Zellen transferiert und vorsichtig expandiert. Langzeitkulturen wurden in 6-Loch-Platten kultiviert und zweimal pro Woche 1:2 expandiert.

3.1.2 Überprüfung der generierten Zelllinien auf Abwesenheit von Wildtyp-EBV

Um zu verifizieren, dass die auswachsenden B-Blasten nicht durch endogenes Wildtyp-EBV des Spenders immortalisiert waren, wurde in unregelmäßigen Abständen, spätestens aber alle vier Monate, die Abwesenheit spezifischer Wildtyp-EBV-Sequenzen (gp85), wie unter 2.4.4.3 beschrieben, überprüft. Abbildung 3.1 A zeigt ein Beispiel einer solchen Analyse von 4 Spendern. Als Kontrolle dienten mit B95.8 immortalisierte LCLs des gleichen Spenders (Abb. 3.1 B). Alle auf diese Weise hergestellten B-Blasten waren zu allen getesteten Zeitpunkten frei von EBV.

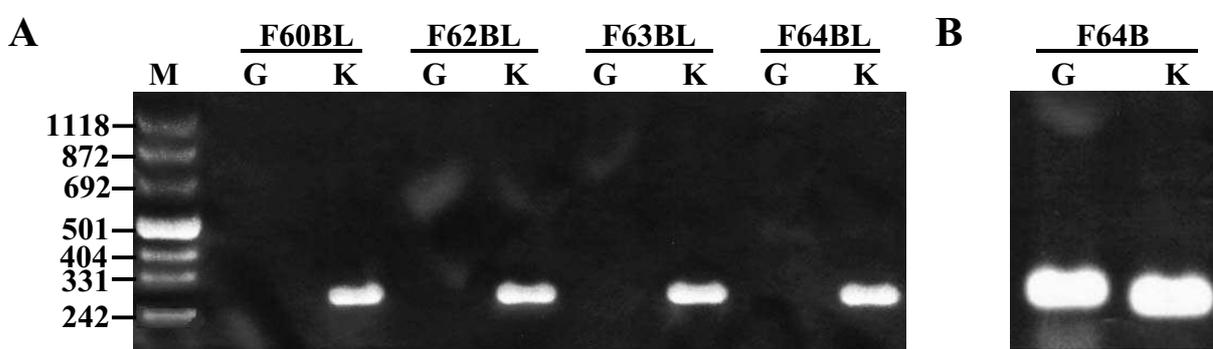


Abb. 3.1: PCR-Analyse der DNA aus B-Blasten (BL) von vier Spendern auf EBV-spezifische DNA. (A) Bei den vier Spendern F60, F62, F63 und F64 konnte das Gen für das Glykoprotein gp85 aus EBV nicht nachgewiesen werden (mit G gekennzeichnete Spuren). Mit K gekennzeichnete Spuren zeigen den Nachweis eines Kontroll-Locus auf dem humanem Genom (β -Globin), der bei allen Proben positiv war. **(B)** gp85 konnte in B95.8-immortalisierten Linien nachgewiesen werden (Spur G); hier gezeigt für Spender F64. Spur K zeigt die Kontrolle für das Gen β -Globin. M: DNA-Marker pUC8

3.1.3 Langzeitkultivierung der B-Blasten

Bisher wurde für B-Blasten eine Kultivierungsdauer von von maximal 76 Tagen beschrieben (Banchereau *et al.*, 1991; Lapointe *et al.*, 2003; Schultze *et al.*, 1997; von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2002). Oft konnte ein Absterben der Kulturen nach einigen Wochen aus unbekanntem Grund beobachtet werden (Banchereau *et al.*, 1991), oder es wurde eine Kontamination durch endogenes EBV beobachtet, sodass in kurzer Zeit EBV-transformierte B-Zellen in der Kultur dominierten (Banchereau *et al.*, 1991; Schultze *et al.*, 1997). Ausgehend von kleinen Anfangszellzahlen konnten im Rahmen dieser Arbeit EBV-freie B-Blasten bis zu 800 Tagen in Kultur gehalten werden (Abb. 3.2).

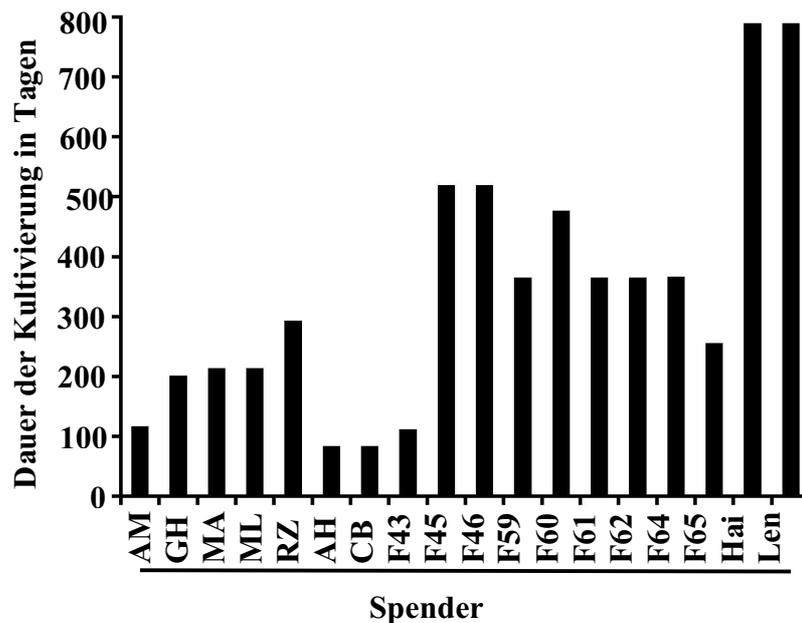


Abb. 3.2: Langzeitkultivierung von B-Blasten. Alle B-Blasten zeigten unverminderte Proliferation im gesamten Betrachtungszeitraum und waren EBV-frei.

Die Versuche, B-Blasten aus 25 Spendern zu expandieren, waren bei allen Spendern erfolgreich und aus allen EBV-positiven und -negativen Normalspendern konnten eine oder mehrere unabhängige B-Blastenlinien generiert werden. Nach einer Etablierungsphase von etwa 50 Tagen proliferierten alle B-Blasten-Linien kontinuierlich weiter. Kulturen, die nicht mehr aktuell benötigt wurden, wurden zur späteren Verwendung kryokonserviert. Alle kryokonservierten Kulturen zeigten am Ende ihrer Kultivierung unverminderte Proliferation und waren EBV-frei. Die kontinuierliche Stimulation durch CD40L und IL-4 war bei der Langzeitkultivierung essentiell. EBV-freie B-Zelllinien, die unabhängig von der Zugabe von IL-4 und der Stimulation durch CD40L proliferierten, konnten nie beobachtet werden.

3.1.4 Bestimmung von Telomerase-Aktivität und Nachweis stabiler Telomerlängen in Langzeit-B-Blastenkulturen

In EBV-transformierten B-Zellen ist zunächst eine Abnahme der Telomerlänge zu beobachten (Counter *et al.*, 1992), und die meisten transformierten Zellen sterben nach maximal 160 Zellteilungen (Counter *et al.*, 1992; Kataoka *et al.*, 1997). Die Entwicklung einer starken Telomerase-Aktivität, und damit eine Stabilisierung der Telomerenden, scheint eine Voraussetzung für die Immortalisierung EBV-transformierter B-Zellen zu sein. Neben einem Anstieg der Telomerase-Aktivität ist eine Änderung des Karyotyps von diploid zu aneuploid

zu beobachten (Counter *et al.*, 1994; Kataoka *et al.*, 1997; Okubo *et al.*, 2001; Tahara *et al.*, 1997). Die Induktion einer hohen Telomerase-Aktivität während des Immortalisierungsprozesses von EBV-infizierten B-Zelllinien ist typisch, und eine Publikation berichtet einen Aktivitätsanstieg um mehr als das 50fache (Kataoka *et al.*, 1997). In Abbildung 3.3 ist am Beispiel der Spender Hai und Len gezeigt, dass die generierten B-Blasten-Linien eine hohe Telomerase-Aktivität über den gesamten Zeitraum der Kultivierung zeigten. Die relative Telomerase Aktivität wurde, wie unter 2.4.4.5 beschrieben, mittels des TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} Kit der Firma Roche bestimmt. Hierbei wird die mittlere Telomerase-Aktivität in Relation zu einem Standard (im Kit enthalten) ermittelt. Frisch isolierte PBMCs zeigten eine relative Telomerase-Aktivität von 5 (Spender Len) bzw. 3 (Spender Hai). Im Vergleich hierzu war die Aktivität zu späteren Zeitpunkten bis zu 40fach erhöht.

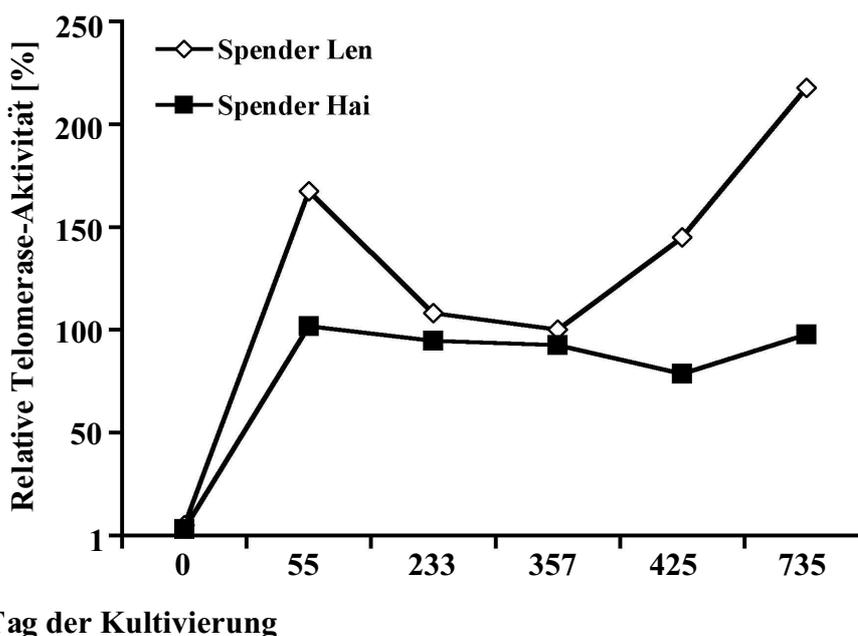


Abb. 3.3: Telomerase-Aktivität von B-Blasten-Linien zweier Spender, gemessen zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Zur Bestimmung der Aktivität wurde der TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} Kit der Firma Roche verwendet, der auf dem TRAP-Assay basiert (Kim *et al.*, 1994).

In frisch etablierten Zellen, die keine Telomeraseaktivität zu Anfang aufweisen, korreliert die Telomerlänge *in vitro* mit dem Replikationspotential der Zellen. Zellen, die eine kritische Länge ihrer Telomere unterschreiten, zeigen Anzeichen der Seneszenz (Allsopp *et al.*, 1995). Die Länge der Telomere in CD40-stimulierten B-Blastenlinien wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Southern-Blot-Analyse der terminalen Restriktionsfragmente bestimmt. Diese Fragmente entstehen, wenn die genomische DNA mit den Restriktionsenzymen *Hinf* I und *Rsa* I enzymatisch hydrolysiert wird. Zur Abschätzung der mittleren Telomerlänge wurde mit Hilfe des Programms „NIH Image“ (Research Service Branch) ein Densitogramm der einzelnen Spuren erstellt. In das Densitogramm wurde eine Gerade, die 80% der Maximalintensität entspricht, gelegt. Die Gerade bildet mit der Kurve des Densitogramms zwei Schnittpunkte, die der oberen bzw. unteren Grenze der in Abbildung 3.4 B angegebenen mittleren Telomerlänge entspricht. Diese blieb, nach anfänglicher Verkürzung, über den gesamten Zeitraum der Kultivierung stabil. Bei den untersuchten B-Blasten des zweiten Spenders verkürzten sich die Telomere zunächst ebenfalls, aber nach dem Anstieg der Telomerase-Aktivität ab Tag 425 (Abb. 3.3) konnte eine stetige Zunahme der mittleren Telomerlänge beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Somit wurden bei B-Blasten von beiden Spendern eine Stabilisierung der Telomere und dauerhafte Telomerase-Aktivität beobachtet.

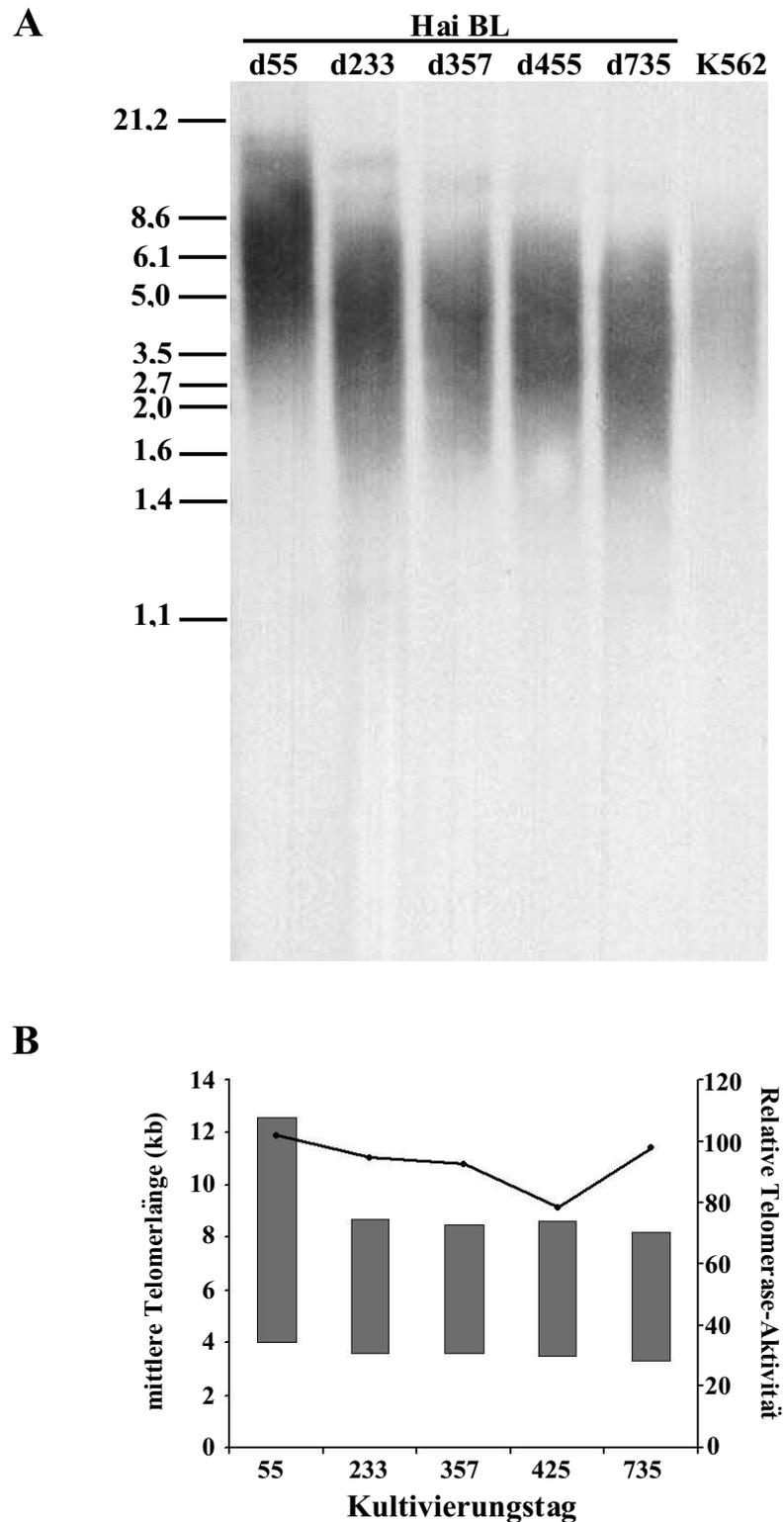


Abb. 3.4: Telomerlänge und Korrelation mit Telomerase-Aktivität. (A) Southern-Blot der terminalen Restriktionsfragmente des Spenders Hai zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung. Als Kontrolle wurde eine permanente Leukämiezelllinie analysiert (K562). (B) Telomerase-Aktivität (schwarze Linie), ermittelt mit dem TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS} Kit der Firma Roche, und mittlere Telomerlängen (graue Balken), ermittelt wie im Text beschrieben.

3.1.5 Karyotypisierung zweier B-Blastenlinien

Karyotypisierungen wurden freundlicherweise von Frau Dr. Christine Mayr am Institut für Humangenetik der Technischen Universität München durchgeführt. Bei allen untersuchten Kulturen wurde „chromosome painting“ mit anschließender Bänderungsanalyse durchgeführt (Eils *et al.*, 1998). Untersucht wurde die B-Blasten-Linie von Spender Hai an Tag 776 und die B-Blasten-Linie des Spenders Len an Tag 110, 295, 499 und 768. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.1 zusammengefaßt.

Tab. 3.1: Karyotypen von B-Blasten-Kulturen der Spender Hai und Len

Linie	Kulturtag	Karyotyp
Hai BL	776	46, XY, der(4)t(2;4)(p13;p16)
Len BL	110	46, XY
Len BL	295	46, XY, t(14;18)(p32;q22)
Len BL	499	46, XY, t(14;18)(p32;q22)
Len BL	768	46, XY, t(14;18)(p32;q22)

B-Blasten des Spenders Len zeigten an Tag 110 einen normalen Chromosomensatz. Ab Tag 295 hatten dagegen alle Zellen ein einheitliches Muster einer Translokation [t(14;18)(p32;q22)], das sich bis Tag 768 nicht mehr änderte. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten muß eine massive Selektion zugunsten eines Zellklons mit dieser Translokation stattgefunden haben. Auch bei Spender Hai zeigten alle Zellen zum Zeitpunkt der Untersuchung eine einheitliche Chromosomen-Aberration. Hier wurde an die komplette Sequenz des Chromosoms 4 eine Kopie des Chromosoms 2 ab p13 angehängt, wobei Chromosom 2 weiterhin intakt vorlag. Ausgehend von der Annahme, dass die gleiche Mutation nicht unabhängig voneinander in verschiedenen Zellen stattgefunden hat, muss angenommen werden, dass die Linien monoklonal waren.

3.1.6 Charakterisierung von Oberflächenmarkern verschiedener B-Blastenlinien

Wie kürzlich beschrieben sind B-Blasten an Tag 8 zu über 80% $CD19^+CD3^-$ und bereits nach ca. drei Wochen einheitlich $CD19^+CD3^-$ (Lapointe *et al.*, 2003; Schultze *et al.*, 1997). Eine solche frühe Analyse der in dieser Arbeit generierten B-Blasten Linien war auf Grund der kleinen Anfangszellzahlen nicht möglich. Für eine genauere Charakterisierung der in dieser Arbeit verwendeten B-Blasten-Linien wurden FACS-Analysen zu späteren Zeitpunkten der Kultivierung (ab Tag 50) durchgeführt (Abb. 3.5). Alle untersuchten Zelllinien waren einheitlich $CD19^+CD3^-$ ab diesem Zeitpunkt.

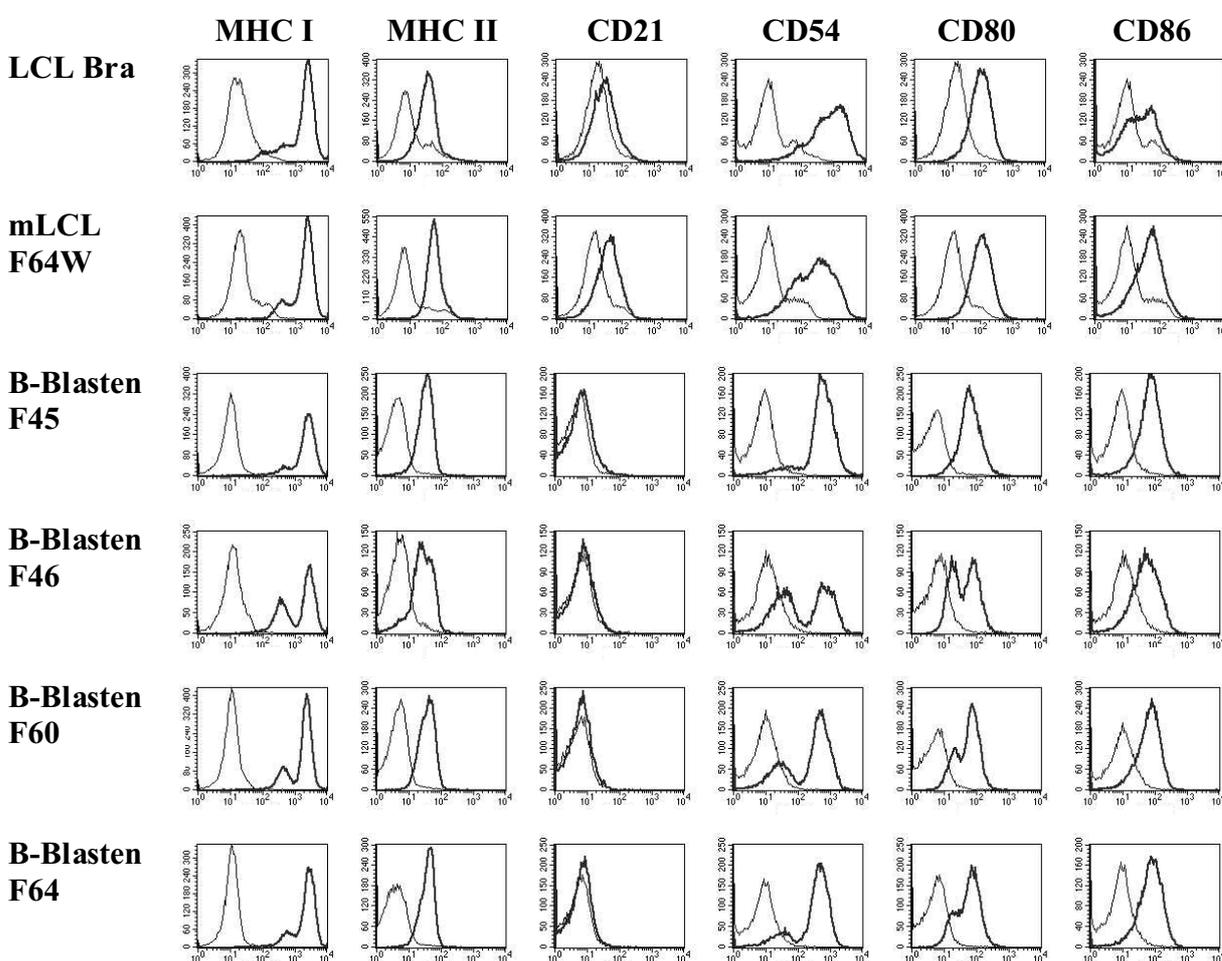


Abb. 3.5: Vergleich der Expression von Oberflächenmarkern auf $CD19^+$ -B-Blasten. Untersucht wurden Marker, die für die T-Zell-Stimulation wichtig sind. Die dünnere Linie gibt die Fluoreszenz der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper an. Untersucht wurden LCLs des Spenders Bra (ca. Tag 250), die Kontroll-mLCL (W) des Spenders F64 (ca. Tag 330) und vier B-Blastenlinien der Spender F45, F46, F60 und F64. (F45/46 ca. Tag 420; F60/62 ca. Tag 330)

Für B-Blasten konnten vergleichbare Mengen an MHC-Molekülen beider Klassen, Adhäsionsmolekülen (CD54) und kostimulatorischen Molekülen (CD80 und CD86), wie bei LCLs bzw. mLCLs (Kontrolllinie W, mit p1495 immortalisiert) nachgewiesen werden. Einziger Unterschied zwischen LCLs/mLCLs und B-Blasten war die fehlende Expression von CD21 auf B-Blasten. Bereits Lapointe *et al.* konnten zeigen, dass dieser Marker an Tag acht der Kultivierung von CD40-stimulierten B-Blasten nicht mehr exprimiert wird (Lapointe *et al.*, 2003). CD21 ist unter anderem der Rezeptor für das Epstein-Barr-Virus.

Da B-Blasten zu verschiedenen Zeitpunkten als Antigen-präsentierende Zellen eingesetzt werden sollten, war es von Bedeutung, dass die Expression der untersuchten Marker über den gesamten Zeitraum stabil blieb. Daher wurden verschiedene B-Blasten-Linien zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS-Analyse untersucht. In Abbildung 3.6 ist als Beispiel die B-Blastenlinie des Spenders Hai gezeigt.

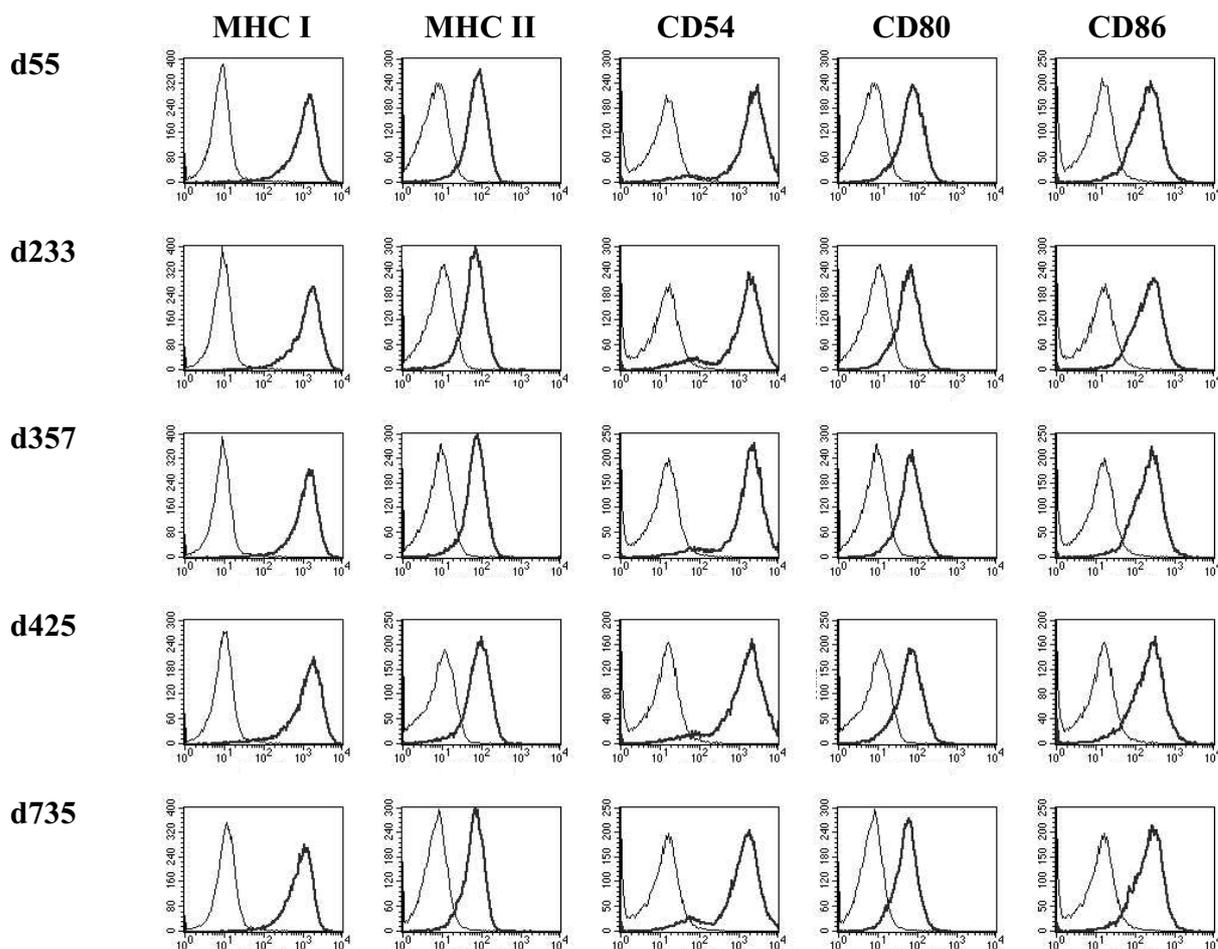


Abb. 3.6: Phänotypische Untersuchung der B-Blastenlinie des Spenders Hai zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Die Expression von Oberflächenmolekülen blieb über den Zeitraum der Kultivierung stabil. Die dünnere Linie gibt die Fluoreszenz der Isotypkontrolle der jeweiligen Antikörper wieder.

Wie für den Spender Hai gezeigt, blieb die Expression von Markern, die für die Stimulation von T-Zellen wichtig sind, über den Zeitraum der Kultivierung stabil. Die Stimulation mit CD40L und IL-4 führte zu einheitlichen Populationen von B-Zellen mit aktiviertem Phänotyp und hoher Expression von Adhäsionsmolekülen wie CD54, kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 und MHC-Molekülen beider Klassen.

3.1.7 Verwendung von B-Blasten in T-Zell-Assays

Im Rahmen dieser Arbeit wurden B-Blasten als Zielzellen in Zytotoxizitäts-Assays und als Stimulatoren in T-Zell-Assays zur Bestimmung der Zytokinproduktion der T-Zellen eingesetzt. Hierzu wurden B-Blasten mit den gewünschten Peptiden oder Peptid-Pools für 1 h bei 37°C beladen und anschließend direkt eingesetzt. Dabei wurde stets eine Konzentration von 5 µg/ml pro Peptid verwendet. Die Verwendung von autologen B-Blasten ermöglichte die Analyse der Aktivität der generierten T-Zelllinien im EBV-freien Kontext. In Abbildung 3.7 sind zwei Beispiele für die pp65_IE1-spezifische T-Zelllinie des Spenders F45 gezeigt, deren Herstellung weiter unten beschrieben ist. Für den IFN- γ ELISA (Abb. 3.7 A) wurden 2×10^3 T-Zellen am Tag 44 der Kultivierung mit 1×10^4 Peptid-beladenen, autologen B-Blasten in einer Vertiefung einer 96-Loch-Platte stimuliert. Der Assay wurde, wie unter 2.6.11 beschrieben, durchgeführt. Da alle Peptide in DMSO gelöst worden waren, wurde unbeladene B-Blasten als Negativ-Kontrolle jeweils die entsprechende Menge des Lösungsmittels zugesetzt. Abb. 3.7 B zeigt einen Europium-Freisetzungsversuch zur Ermittlung der spezifischen Zytotoxizität der gleichen T-Zelllinie an Tag 50. Hierbei dienten 1×10^4 beladene, autologe B-Blasten als Zielzellen für 8×10^5 T-Zellen (Effektor:Zielzell-Verhältnis = 8:1). Der Versuch wurde, wie unter 2.6.14 beschrieben, durchgeführt.

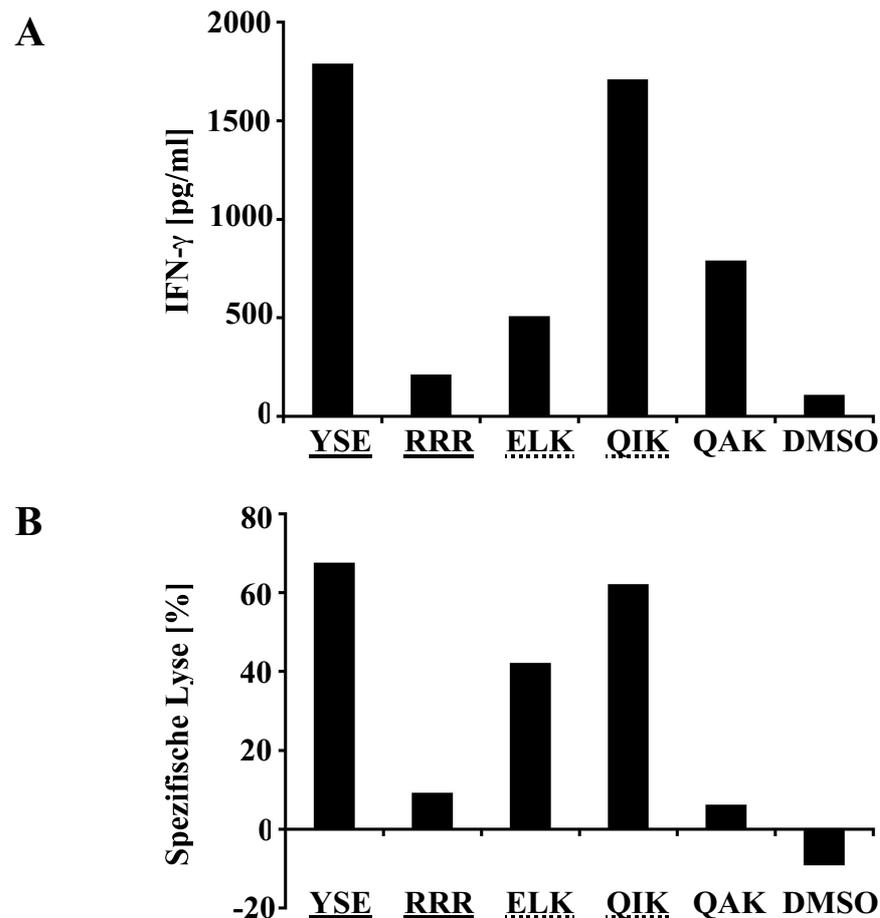


Abb. 3.7: T-Zell-Assay der T-Zelllinie F45 N unter Verwendung von autologen, Peptid-beladenen B-Blasten als Stimulatoren und Zielzellen. (A) IFN- γ -ELISA durchgeführt an Tag 44 der Kultivierung. **(B)** Zytotoxische Aktivität der T-Zellen gegenüber den beladenen B-Blasten wurde an Tag 50 untersucht. Verwendete Peptide sind mit ihrer 3-Buchstaben-Abkürzung angegeben (siehe 2.1.6). pp65-Epitope sind durch einer durchgezogenen Linie, IE1-Epitope mit einer unterbrochenen Linie unter ihren Abkürzungen gekennzeichnet.

In beiden Assays ist gezeigt, dass die generierte T-Zelllinie F45 N spezifisch B-Blasten erkannte, die mit pp65-Peptid (YSE) oder mit IE1-Peptiden (ELK und QIK) beladen waren (verwendete Peptide siehe 2.1.6). Es konnte bei diesem Spender keine T-Zell-Reaktivität gegen das pp65-Peptid RRR festgestellt werden. QAK-spezifische T-Zellen scheinen zwar in der Lage zu sein IFN- γ zu sezernieren, aber ihre lytische Reaktivität scheint eingeschränkt zu sein. Die Ergebnisse zeigen, dass B-Blasten gute Antigen-präsentierende Zellen sind, die sich sowohl als Stimulatoren in Zytokin-Assays als auch als Zielzellen in Zytotoxizitäts-Assays eignen und die Ermittlung des Spektrums an Reaktivitäten einer komplexen T-Zellkultur erlauben.

3.2 Reaktivierung von pp65-spezifischen T-Zellen

CMV-Infektionen sind immer noch ein schwerwiegendes klinisches Problem bei immunsupprimierten Patienten, die zum Beispiel Empfänger einer allogenen Stammzelltransplantation sind (Boeckh *et al.*, 2003). Das Fehlen von Virus-spezifischen T-Zellen bei solchen Patienten scheint die Ursache für die Komplikationen zu sein (Cwynarski *et al.*, 2001). Auf der Suche nach Alternativen zur medikamentösen Behandlung konnte gezeigt werden, dass der adoptive Transfer CMV-spezifischer T-Zellen zur Wiederherstellung der T-Zell-Immunität erfolgreich ist (Einsele *et al.*, 2002b; Peggs *et al.*, 2003; Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995).

Für die Selektion und Expansion CMV-spezifischer T-Zellen *in vitro* aus peripheren Blut wurden viele Arten von Antigen-präsentierende Zellen (APCs) und Methoden zur Herstellung CMV-spezifischer T-Zellen untersucht. Unsere Gruppe konnte bereits zeigen, dass sich autologe mLCLs zur Generierung von pp65-spezifischen T-Zelllinien eignen (Moosmann *et al.*, 2002). Bisher lag der Fokus bei der Untersuchung der generierten T-Zelllinien dabei auf den CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen. In klinischen Studien über CMV wurde aber bereits gezeigt, dass für eine langanhaltende Immunität gegenüber CMV die Applikation von CD8⁺ und CD4⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen nötig ist (Einsele *et al.*, 2002b; Peggs *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 1995). Daher sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich mLCLs zur Generierung CD4⁺ und CD8⁺ CMV-spezifischer T-Zellen eignen. Darüber hinaus sollte durch geeignete Wahl der Spender ein möglichst breites Spektrum an HLA-Typen abgedeckt werden (Tab. 3.2). In den folgenden Abschnitten werden die Ergebnisse für die in Tabelle 3.2 aufgeführten Spender gezeigt. Alle vier Spender waren CMV- und EBV-positiv. Bei der Auswahl wurde auch darauf Wert gelegt, dass für die Charakterisierung der T-Zelllinien Peptide und Tetramere für mindestens ein CMV- und ein EBV-Epitop zur Verfügung standen.

Tab. 3.2: HLA-Typen der Spender

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQ	HLA-DRB1	DRB3/4/5
F45	1, 68	8, 14	7, 8	3, 6	13, 15	3, 5
F46	3, 11	7, 3501	4, 7	6	13, 15	3, 5
F60	2, 26	7, 38	7, 1203	1, 6	8, 13	3
F62	3	3501, 52	4, 1202	1, 6	1, 15	3

3.2.1 Proliferation von generierten T-Zelllinien

Die Verwendung von FCS könnte in der klinischen Anwendung Probleme bereiten, weshalb das hier verwendete Medium mit 2% humanem Serum AB (statt mit 10% FCS) supplementiert wurde. PBMCs wurden mit der autologen pp65-mLCL, wie unter 2.6.7 beschrieben, stimuliert. In Abbildung 3.8 ist das Wachstumsverhalten der T-Zelllinien der vier Spender gezeigt. Als Kontrolle ist eine mit 10% FCS kultivierte T-Zelllinie des Spenders TW gezeigt. Unter diesen Bedingungen war es möglich, T-Zelllinien zu generieren. Die Zellen proliferierten allerdings weniger stark als bei Zugabe von 10% FCS.

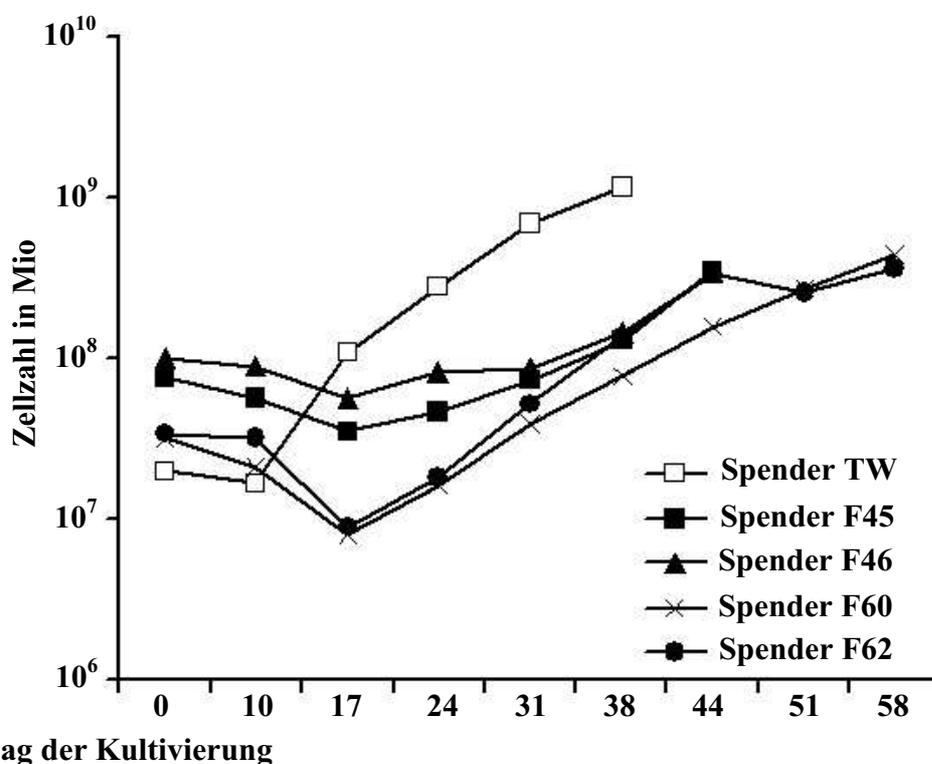


Abb. 3.8: Expansion von pp65-mLCL-stimulierten T-Zelllinien. Bei den Spendern F45, F46, F60 und F62 wurden 2% humanes Serum AB dem Kulturmedium zugesetzt. Zum Vergleich wurden Zellzahlen einer T-Zellkultur des Spenders TW angegeben (kultiviert mit 10% FCS).

3.2.2 Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen

Die generierten T-Zelllinien wurden auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD8 und CD4 untersucht (Abb. 3.9 A). Epitop-spezifische, CD8-positive T-Zellen konnten mittels HLA/Peptid-Tetramer-Färbungen (siehe Abschnitt 2.6.9) identifiziert werden. Bei allen vier Spendern konnten pp65-spezifische T-Zellen expandiert werden. In Abbildung 3.9 B sind die Ergebnisse der Tetramer-Analysen von zwei Spendern (F46 und F60) exemplarisch dargestellt.

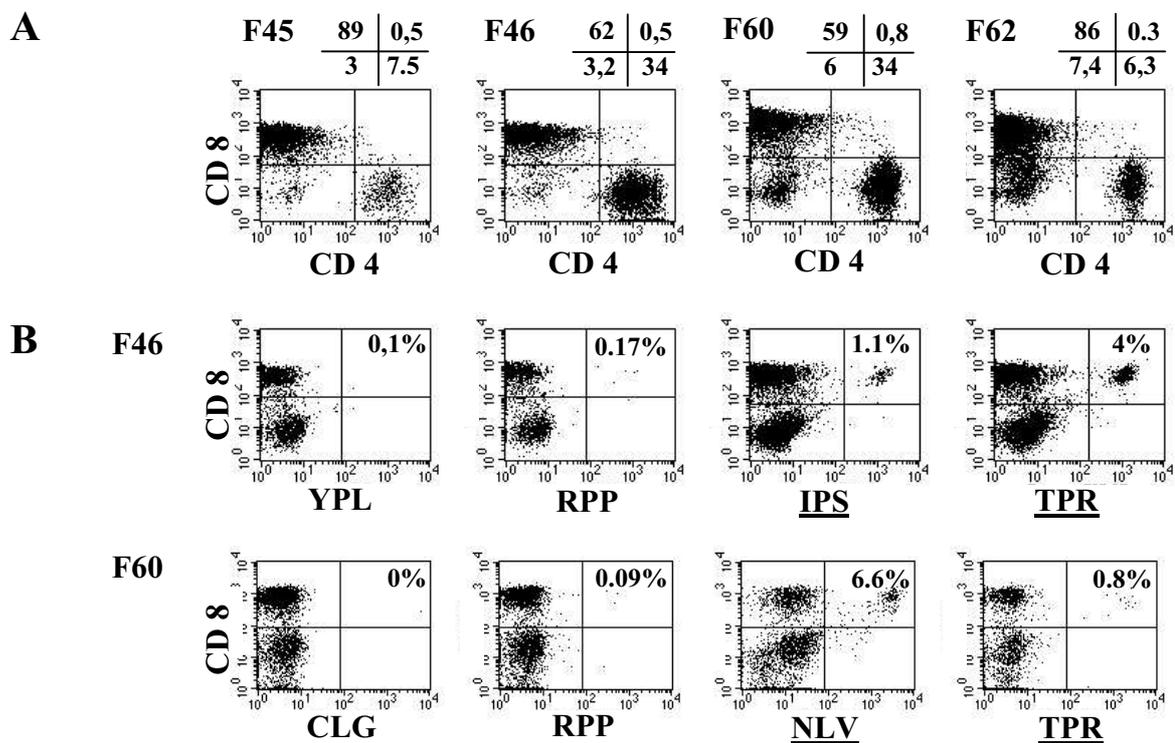


Abb. 3.9: Phänotypische Untersuchung generierter T-Zelllinien. (A) Der Phänotyp der unterschiedlichen T-Zelllinien wurde an Tag 35 (F45 und F46) bzw. an Tag 44 (F60 und F62) untersucht. In allen Fällen dominierten CD8⁺ T-Zellen die Kulturen. Je nach Spender konnten zwischen 6,3% und 34% CD4⁺ T-Zellen detektiert werden. (B) Epitop-spezifische T-Zellen wurden mit HLA-Klasse-I/Peptid-Komplexen detektiert. Gezeigt sind die Ergebnisse einer solchen Analyse für die Spender F46 und F60. Verwendete Tetramere sind mit ihrer 3-Buchstaben-Abkürzung angegeben (siehe 2.1.6). Unterstrichene Buchstaben stehen für pp65-Epitope, unmarkierte für Epitope aus latenten EBV-Proteinen.

FACS-Analysen der T-Zellkulturen ergaben, dass bei allen Zelllinien die CD8⁺ T-Zellen dominierten. Spenderabhängig konnten aber auch zwischen 6,3% und 34% CD4⁺ T-Zellen detektiert werden. Bei allen Spendern war eine Expansion pp65-spezifischer T-Zellen (IPS

und TPR bei Spender F46; NLV und TPR bei Spender F60) zu beobachten. TPR schien dabei in Spender F46 - innerhalb der detektierbaren Spezifitäten - immundominant zu sein (4%), wobei dieses CD8-Epitop in Spender F60 nur eine untergeordnete Rolle zu spielen schien (0,8%); bei diesem Spender wurden NLV-spezifische T-Zellen stärker expandiert (6,6%). In Abb. 3.10 ist die Expansion von T-Zellen mit unterschiedlicher Spezifität für alle vier Spender dargestellt, ermittelt durch relative Tetramerfärbungen der T-Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung. Die Daten beschränken sich auf die Epitope, für die Tetramere zur Verfügung standen.

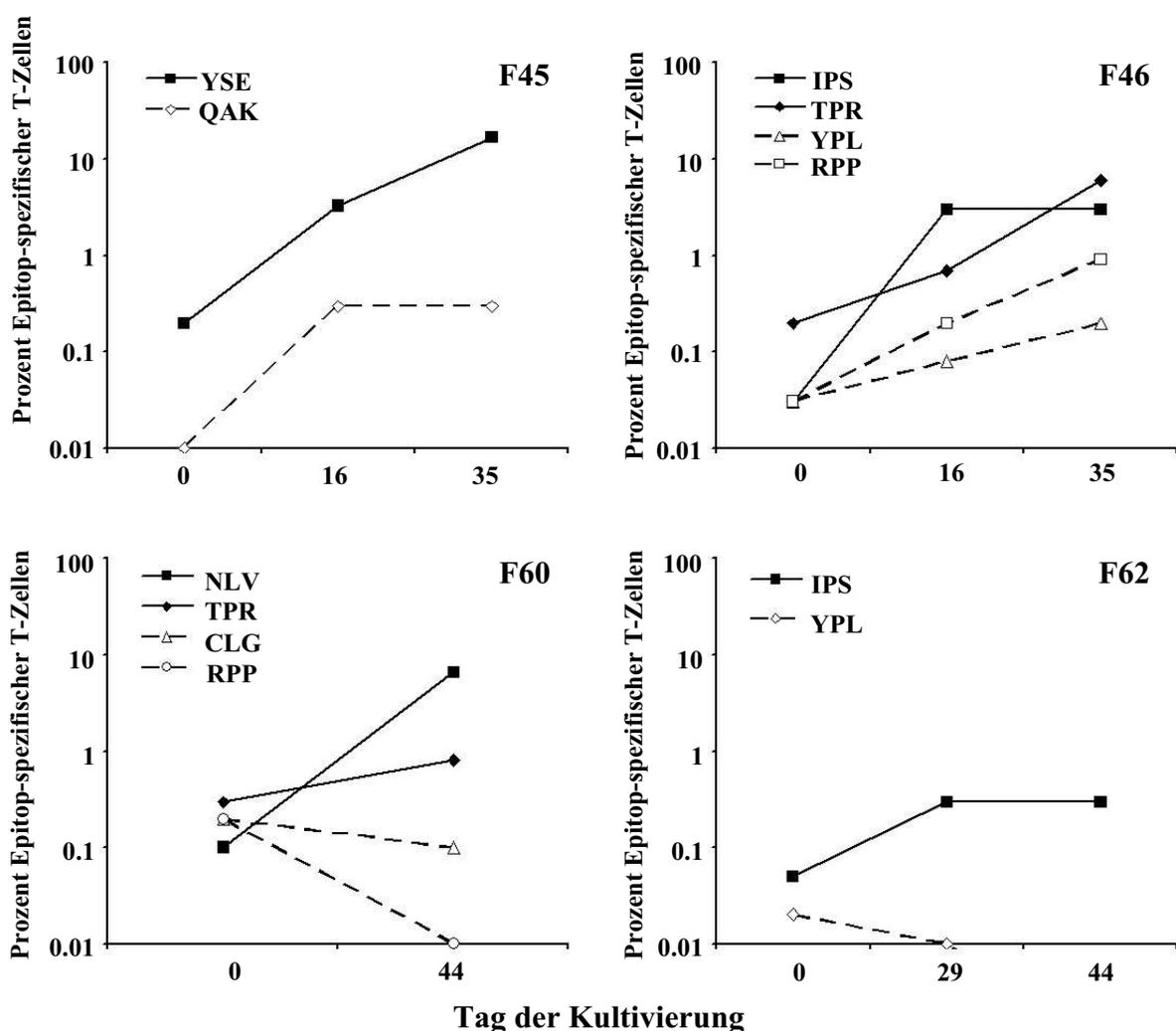


Abb. 3.10: Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen. Der Anteil der T-Zellen, die spezifisch für verschiedene Epitope von pp65 und latenten EBV-Antigenen sind, wurde durch Tetramer-Färbung bestimmt (siehe 2.6.9). CMV-pp65-Epitope sind durch durchgehende, EBV-Epitope durch unterbrochene Linien dargestellt.

Im Gegensatz zu CMV-spezifischen T-Zellen konnten EBV-spezifische T-Zellen in den meisten Fällen nicht in dem gleichen Maß expandiert werden, und in einigen Fällen wurde sogar eine Abnahme der EBV-spezifischen T-Zellen beobachtet. So wurden zum Beispiel in frisch isolierten PBMCs des Spenders F60 T-Zellen nachgewiesen, die gegen das Epitop CLG aus dem latenten Antigen LMP2 gerichtet waren. Nach einigen Wochen jedoch waren T-Zellen mit dieser Spezifität nicht mehr detektierbar. Ebenso verhielt es sich mit YPL-spezifischen T-Zellen des Spenders F62. In allen Linien dominierten pp65-spezifische T-Zellen. Die *ex vivo*-Analysen zeigten, dass in den meisten Fällen die Zahl der Vorläuferzellen, die spezifisch für pp65-Epitope waren, größer war als die Zahl EBV-spezifischer Vorläuferzellen.

3.2.3 Antigen-spezifische IFN- γ -Produktion der T-Zellen

FACS- und Tetramer-Analysen lassen nur eine Aussage über die Anwesenheit bestimmter Marker oder T-Zellrezeptoren, nicht aber über die Funktion der Zellen zu. Daher wurden die T-Zellen auf Effektorfunktionen, zum Beispiel die Sekretion von IFN- γ untersucht. Mittels des sehr sensitiven IFN- γ -ELISAs konnte die Spezifität und HLA-Restriktion der T-Zelllinien untersucht werden und somit eine Aussage über die Funktionalität der generierten T-Zellen getroffen werden. Als Stimulatoren wurden autologe mLCLs, autologe, Peptid-beladene B-Blasten und allogene, HLA-kompatible oder -inkompatible mLCLs verwendet. Diese Analysen zeigten, dass die pp65-mLCL-stimulierten T-Zellen nur pp65 erkannten. Sie reagierten sowohl mit IFN- γ -Sekretion, wenn die Stimulatoren pp65-Antigene endogen exprimierten als auch wenn sie exogen mit pp65-Peptiden beladen wurden (Abb. 3.11). Die Erkennung der Zielzellen war in allen Fällen HLA-restringiert. Exemplarisch sind Ergebnisse des Spenders F45 an Tag 35 (3.11 A) und F60 an Tag 44 (3.11 B) dargestellt. Zur Stimulation der T-Zellen wurden, wie unter 2.6.12 beschrieben, immer 1×10^4 APCs eingesetzt. Im Fall des Spenders F45 wurden 1×10^4 Effektoren, im Falle des Spenders F60 nur $2,5 \times 10^3$ Effektoren pro Ansatz eingesetzt. Dies erklärt den detektierten Unterschied der IFN- γ -Produktion. Aufgrund der Sensitivität des ELISAs konnte die Spezifität der T-Zelllinien zu sehr frühen Zeitpunkten der Kultivierung (Tag 17) untersucht werden. Gezeigt werden hier allerdings Ergebnisse zu relativ späten Zeitpunkten der T-Zell-Kulturen, um die Daten besser mit den Ergebnissen der Zytotoxizitäts-Analysen (siehe nachfolgender Abschnitt 3.2.4) vergleichen zu können. Die Ergebnisse entsprechen aber denen früherer Zeitpunkte.

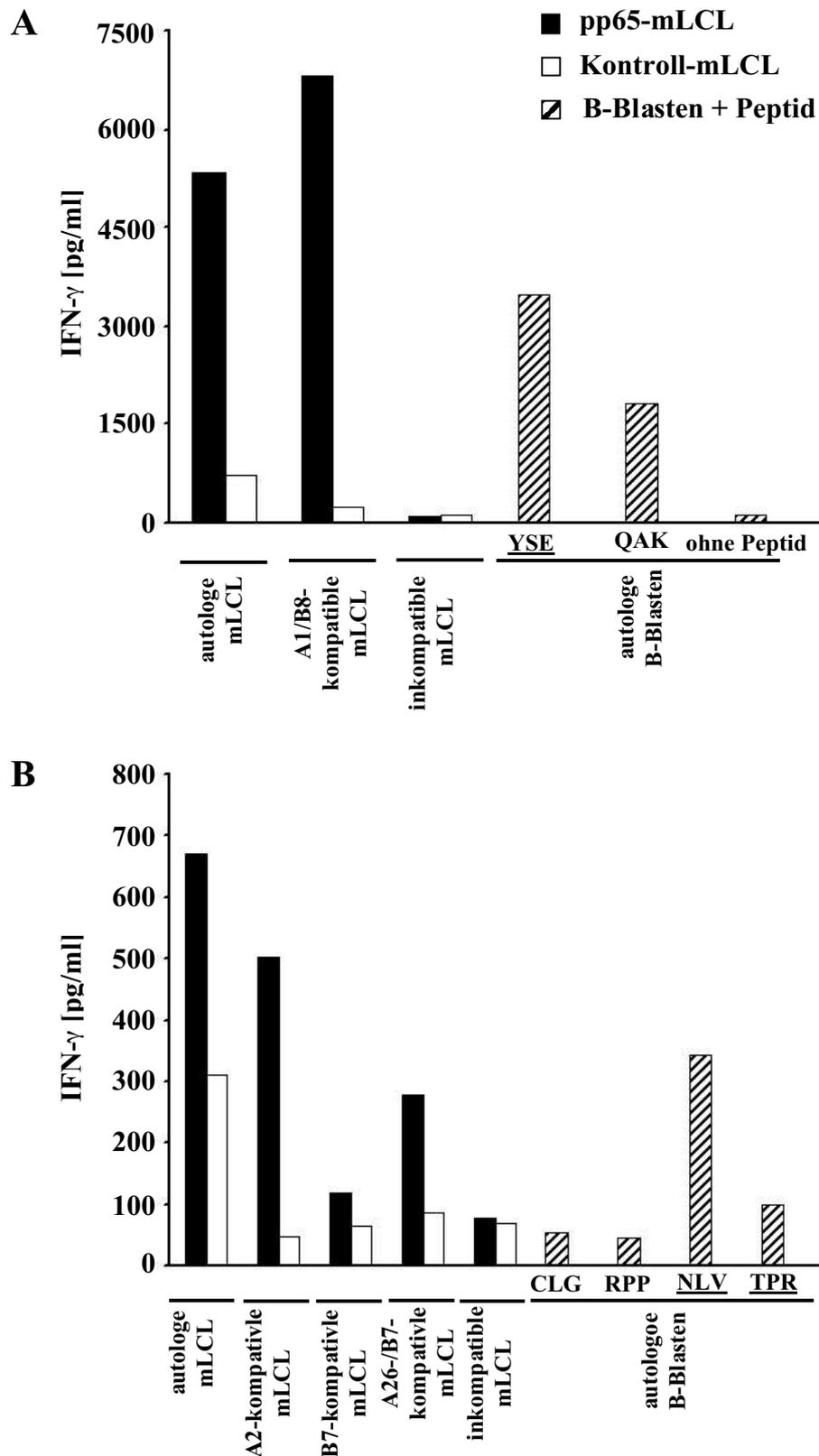


Abb. 3.11: IFN- γ -Produktion der T-Zelllinien der Spender F45 (A) und F60 (B) nach Stimulation mit HLA-kompatiblen und -inkompatiblen Antigen-präsentierenden Zellen. Gezeigt sind Analysen von Tag 37 (F45) bzw. Tag 44 (F60). Von Spender F45 wurden 1×10^4 T-Zellen, bei Spender F60 $2,5 \times 10^3$ T-Zellen pro Ansatz eingesetzt (jeweils 1×10^4 Stimulator-Zellen). pp65-Epitope sind unterstrichen.

3.2.4 Zytotoxizitäts-Analysen der T-Zelllinien

Die Antigen-spezifische Lyse von Zellen, die das Zielgen exprimieren, ist die wichtigste Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen. Zur Analyse der Zytotoxizität werden Zielzellen mit einem Markierungsreagenz behandelt, das nur im Falle des Zelltodes beim daraufhin erfolgenden Zerfall der Zellmembran wieder freigesetzt werden kann. In dieser Arbeit wurde der organische Chelatligand BATDA zur Markierung eingesetzt, der in der Zelle zu TDA hydrolysiert wird (Blomberg *et al.*, 1996).

TDA-Freisetzungsversuche wurden ab Tag 25 der Kultivierung, wie in Abschnitt 2.6.14 beschrieben, durchgeführt. Als Zielzellen wurden autologe mLCLs, autologe, Peptid-beladene B-Blasten und allogene, HLA-kompatible oder -inkompatible mLCLs verwendet. Abbildung 3.12 zeigt die Ergebnisse von Experimenten mit T-Zellen des Spenders F45 an Tag 44 und des Spenders F60 an Tag 37. Die T-Zelllinien zeigten gegenüber pp65-exprimierenden Zielzellen eine spezifische Lyse von bis zu 100% der Zielzellen bei einem Effektor:Zielzell-Verhältnis von 8:1. Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Analysen deckten sich mit den Daten der IFN- γ -ELISA-Assays (Abb. 3.11). Wie bereits durch Tetramer-Analysen gezeigt werden konnte (Abb. 3.10), blieb bei Spender F45 der prozentuale Anteil QAK-spezifischer T-Zellen ab Tag 16 der Kultivierung gleich. Die geringe Lyse QAK-beladener B-Blasten an Tag 44, verglichen mit der Reaktivität der T-Zellen gegen QAK-beladene B-Blasten im IFN- γ -ELISA-Assay an Tag 37 (Abb. 3.11), zeigt, dass die zytotoxische Reaktivität dieser Zellen geringer ist als ihre IFN- γ -Sekretionsaktivität. In der T-Zelllinie des Spenders F60 konnten zu allen Zeitpunkten der Kultivierung nur sehr wenige EBV-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden, was in Einklang mit der in allen durchgeführten Assays festgestellten geringen Reaktivität der T-Zellen gegen EBV war.

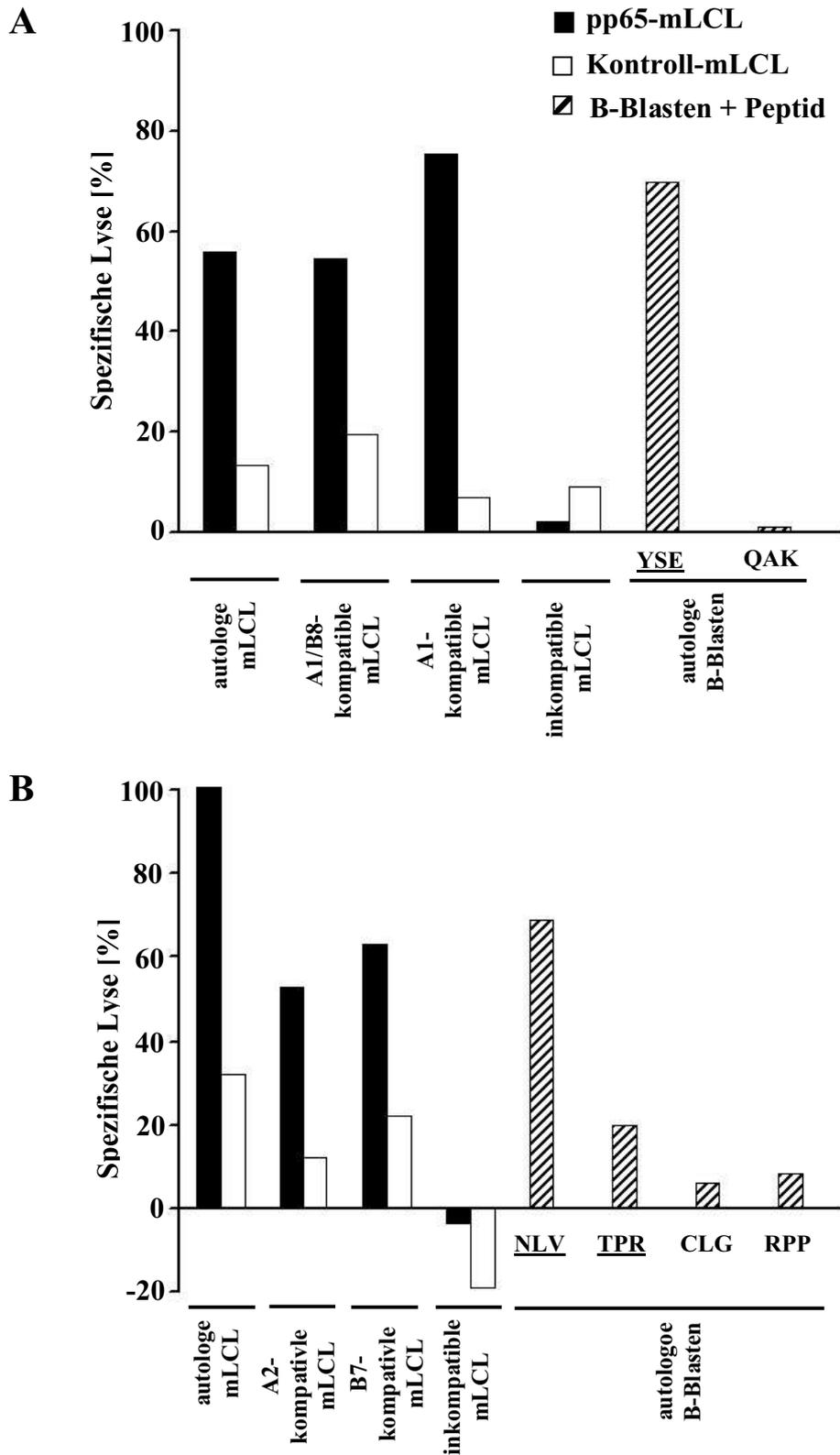


Abb. 3.12: Zytotoxische Reaktivität der T-Zelllinien von Spender F45 (A) und F60 (B). Experimente wurden an Tag 44 (F45) bzw. Tag 37 (F60) der Kultivierung durchgeführt. Gezeigt sind die Ergebnisse für das Effektor:Zielzell-Verhältnis von 8:1. pp65-Epitope sind unterstrichen.

3.2.5 Expansion Epitop-spezifischer, IFN- γ -produzierender T-Zellen

Um eine Aussage über die Anzahl funktioneller, Epitop-spezifischer T-Zellen zu machen, wurde ein IFN- γ -ELISpot-Assay durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob die mittels Tetramer-Analyse identifizierten Epitop-spezifischen Zellen auch funktional waren und wie hoch der Anteil solcher Zellen war.

IFN- γ -ELISpot-Assays wurden *ex vivo* und zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung durchgeführt (Abb. 3.13). Dafür wurden 1×10^4 mit dem jeweiligen Peptid beladene B-Blasten zur Stimulation verwendet. T-Zellen wurden in unterschiedlicher Verdünnung zugegeben, um eine Quantifizierung der IFN- γ -produzierenden Zellen zu ermöglichen (siehe 2.6.13). Für einige der bekannten Epitope waren zum Zeitpunkt der Arbeit zwar die Peptide, nicht aber die dazugehörigen Tetramere verfügbar. Somit konnten im ELISpot-Assay mehr Epitop-spezifischer T-Zellspezifitäten untersucht werden.

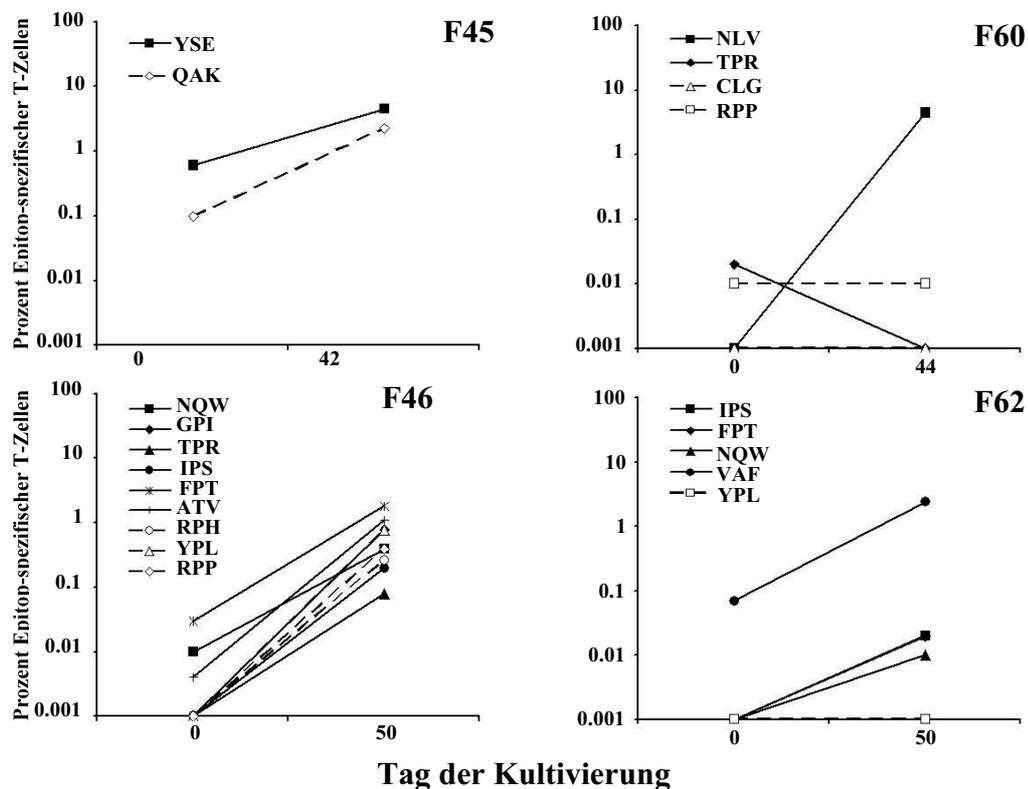


Abb. 3.13: Expansion Epitop-spezifischer, IFN- γ sezernierender T-Zellen: Der Anteil Epitop-spezifischer T-Zellen wurde mittels IFN- γ -ELISpot ermittelt. pp65-Epitop-spezifische T-Zellen werden durch durchgehende Linien, EBV-Epitop-spezifische T-Zellen durch unterbrochene Linien dargestellt.

Beide Analysen zeigten übereinstimmend, dass zu allen Zeitpunkten CMV-spezifische T-Zellen dominierten. Die Dominanz CMV- über EBV-Epitop-spezifischer T-Zellen konnte in den meisten Fällen über die Dauer der Kultivierung bewahrt werden. Betrachtet man ein individuelles Epitop eines Spenders, ließ sich zumeist beobachten, dass der Anteil Tetramer-positiver Zellen höher war als der Anteil IFN- γ -sezernierender Zellen.

3.2.6 Einzelzellklonierung der pp65-spezifischen T-Zelllinien

Der Anteil Epitop-spezifischer T-Zellen, die durch Tetramer-Färbung und ELISpot-Assays gefunden werden konnte, betrug nie mehr als 20% der Gesamtzellpopulation. Die Anwesenheit weiterer Spezifitäten, eventuell gegen noch unbekannte pp65-Epitope gerichtet, schien daher wahrscheinlich. Formale Einzelzellklonierungen sollten Aufschluss über die Spezifität der verbleibenden T-Zellen geben. Einzelzellklonierungen wurden, wie unter 2.6.8 beschrieben, an Tag 45 (Spender F45 und F46) oder an Tag 31 (Spender F62) durchgeführt und die Klone wurden expandiert. Zwischen 44 und 85 Klone jedes Spenders wurden auf pp65-Spezifität mittels IFN- γ -ELISA untersucht. Als Stimulatoren wurden autologe pp65-mLCLs und Kontroll-mLCLs verwendet. Zusätzlich wurden die Klone auf die Expression von CD8 und CD4 untersucht. Die Anzahl der Klone und ihre gefundene Spezifität sind in Tabelle 3.3 dargestellt. Aufgrund der Vielzahl der getesteten Klone werden in den nachfolgenden Abschnitten nur exemplarisch einige Ergebnisse von ausgewählten Klonen gezeigt, die aber die Gesamtheit der Klone mit der gefundenen Spezifität repräsentieren.

Tab. 3.3: Klonale Analyse der pp65-mLCL stimulierten T-Zellkulturen mittels IFN- γ -ELISA

Spender	Antigen-Spezifität					
	CMV		EBV oder andere		nicht-reaktiv	
	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺
F45	61	0	9	1	7	7
F46	16	11	8	2	4	3
F62	59	4	2	0	12	3

Der Großteil der Klone aller Spender zeigte CMV-spezifische IFN- γ -Sekretion. Die meisten CMV-spezifischen Klone waren CD8⁺, doch bei zwei Spendern konnten auch CD4⁺ T-Zellklone gefunden werden. mLCLs sind also auch in der Lage, pp65-Epitope auf MHC-Klasse-II-Molekülen zu präsentieren und somit spezifische CD4⁺-T-Zellen zu stimulieren. Durch Einzelzellklonierungen konnte gezeigt werden, dass bei T-Zellen mit der Fähigkeit zur Langzeitproliferation die pp65-spezifischen dominieren.

3.2.7 HLA-Restriktionen der pp65-spezifischen Klone

Um die HLA-Restriktion der einzelnen CMV-spezifischen Klone zu bestimmen, wurde ihre Reaktivität gegen allogene Zielzellen getestet, die möglichst nur in einem HLA-Klasse-I- oder II-Allel übereinstimmten. Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die gefundenen HLA-Restriktionen aller Klone, die auf diese Weise getestet worden waren. Bei allen Spendern konnten wenigstens drei unterschiedliche HLA-Restriktionen gefunden werden.

Abbildung 3.14 zeigt exemplarisch Analysen von drei CD8⁺- und drei CD4⁺-Klonen des Spenders F46. Es wurden CD8⁺-Klone mit der HLA-Restriktion durch HLA-B07, A11 und B3501 identifiziert. Analog wurden für CD4⁺ T-Zellklone desselben Spenders ebenfalls drei unterschiedliche HLA-Klasse-II-Restriktionen unterschieden (HLA-DRB1-13, DRB5 und DRB1-15).

Tab. 3.4: HLA-Restriktionen pp65-spezifischer T-Zellklone.

Spender	HLA-Restriktion		Anzahl der Klone
	Klasse I	Klasse II	
F45	A68		8
	B14		11
	n.b. ^{a)}		20
F46	A11		4
	B7		4
	B35		8
		DRB1-13	5
		DRB1-15	1
		DRB5	2
F62	A3		3
	Cw12		15
		DRB1-1	4

a) n.b.: nicht bestimmt; diese CD8⁺ Klone reagierten nur auf autologe pp65-exprimierende mLCLs, nicht aber auf HLA-Klasse-I-kompatible mLCLs.

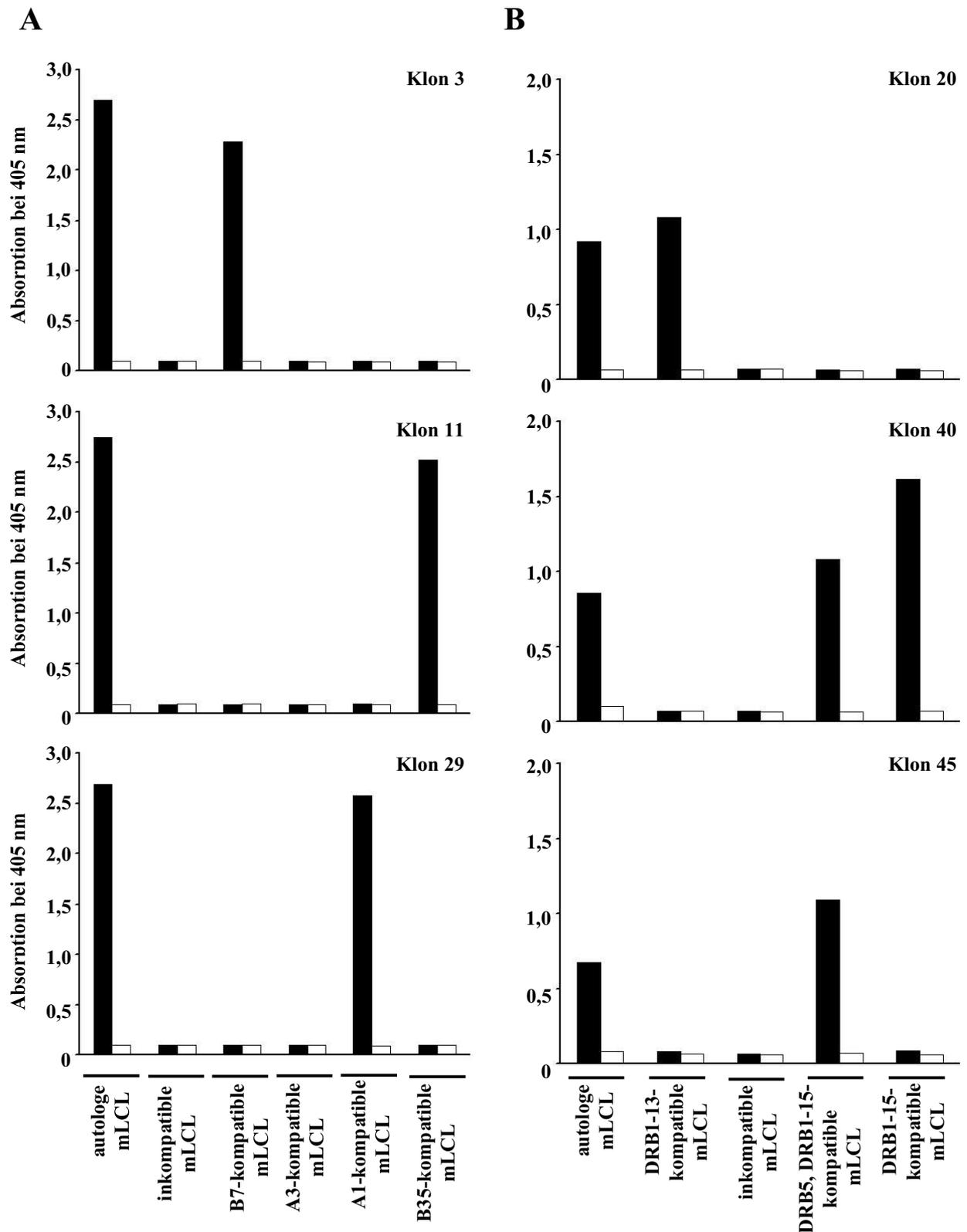


Abb. 3.14: Antigen-Spezifität und HLA-Restriktion von T-Zell-Klonen. Gezeigt sind Klone des Spenders F46. Drei CD8⁺-Klone (A) und drei CD4⁺-Klone (B) wurden mittels IFN- γ -ELISA auf ihre Reaktivität gegenüber verschiedenen Stimulatoren getestet. Schwarze Balken stehen für die jeweilige pp65-exprimierende mLCL, weiße Balken für die Kontroll-mLCL.

3.2.8 Identifizierung der T-Zell-Epitope

Einige pp65-spezifische T-Zellklone des Spenders F45 waren HLA-B14-restringiert (Tab. 3.4). Für dieses HLA-Allel war bisher noch kein CMV-Epitop beschrieben worden. Darüber hinaus zeigten einige CMV-spezifische Klone des Spenders F45 keine Reaktivität gegenüber bekannten pp65-Epitopen des jeweiligen HLA-Allels (HLA-A11: GPI; HLA-B35: IPS, FPT; Daten nicht gezeigt). Um die Epitop-Spezifität dieser Klone zu bestimmen, wurde eine überlappende Peptid-Bank verwendet, die die gesamte Sequenz von pp65 abdeckt (Kern *et al.*, 2002). Jedes einzelne Peptid dieser Bank ist 15 Aminosäuren lang und die einzelnen Peptide überlappen sich um 11 Aminosäuren, das heißt Peptid 1 besteht aus den Aminosäuren 1-15 von pp65, Peptid 2 aus den Aminosäuren 5-19 und so weiter. Diese Wahl des Überlappungsbereiches und die Länge der Peptide bedeutet, dass jede mögliche pp65-Sequenz von bis zu 12 Aminosäuren in der Peptidbank enthalten ist. Da CD8-Epitope in der Regel 8-11 Aminosäuren nie länger als 12 Aminosäuren sind, sollte die Identifizierung aller CD8-Epitope (Kern *et al.*, 2000; Maecker *et al.*, 2001) und der meisten CD4-Epitope (Maecker *et al.*, 2001) möglich sein. Die 138 Peptide wurden so in einer zweidimensionalen Matrix in zweimal 12 Gruppen angeordnet, was die Identifizierung der T-Zellepitope mittels 24 Einzelreaktionen erlaubt.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132
24	133	134	135	136	137	138						

Abb. 3.15 Zusammensetzung der Peptid-Gruppen zur Identifizierung neuer T-Zell-Epitope. 138 Peptide (jedes 15 Aminosäuren lang; benachbarte Peptide besitzen einen gemeinsamen Überlappungsbereich von 11 Aminosäuren), die die gesamte Sequenz von pp65 abdecken, wurden in 24 Gruppen g (grau unterlegt) angeordnet.

Für die Epitop-Identifizierung wurden autologe B-Blasten mit den 24 Peptid-Gruppen beladen und zur Stimulation der T-Zellklone eingesetzt. Die IFN- γ -Konzentration in den Überständen wurde mittels ELISA quantitativ bestimmt. In Abbildung 3.16 sind exemplarisch Ergebnisse mit dem Klon 14 des Spenders F46 und dem Klon 39 des Spenders F45 dargestellt.

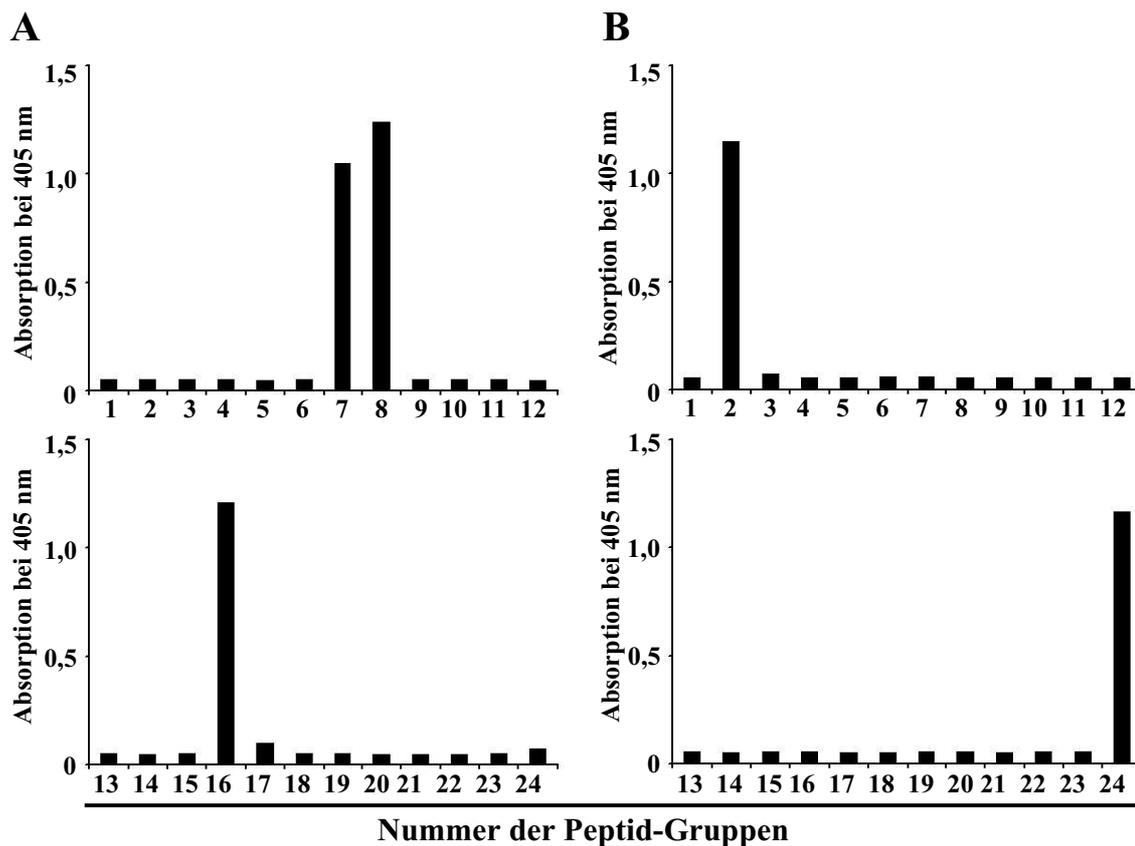


Abb. 3.16: Identifizierung von Epitopen, die von CD8⁺, pp65-spezifischen T-Zellklonen erkannt werden. Gezeigt ist in (A) der HLA-B3501-restringierte Klon 14 des Spenders F46 und in (B) der HLA-B14-restringierte Klon 39 des Spenders F45. Zur Identifizierung des Epitops wurde eine Peptid-Bank benutzt, wie in Abb. 3.15 gezeigt. T-Zellklone wurden mit B-Blasten stimuliert, die zuvor mit den 24 Peptidgruppen beladen worden waren. Anschließend wurde die Konzentration von IFN- γ im Überstand mittels ELISA quantitativ bestimmt.

Klon 14 des Spenders F46 reagierte auf die Peptid-Gruppen 7, 8 und 16 (3.16 A). Somit sollte das gesuchte Peptid im Überlappungsbereich der Peptide 43 und 44 liegen. Dieser Bereich hat die Sequenz NQWKEPDVYYT. Eine Reaktivität von T-Zellen eines Spenders, der ebenfalls das HLA-Allel B3501 trug, gegen diesen Bereich von pp65 wurde bereits beschrieben (Kern *et al.*, 2000). Allerdings wurde das genaue Epitop und die HLA-Restriktion nicht untersucht. Da viele beschriebene HLA-B3501-Epitope ein Tyrosin an ihrem C-terminalen Ende tragen, wurde die Reaktivität der B3501-restringierten Klone gegen das Nonamer NQWKEPDVY getestet. Da zwei von zwei getesteten Klonen eine starke Reaktion gegen diese Sequenz zeigten, wurde die Sequenz NQWKEPDVY als neues HLA-B3501-restringiertes, pp65-Epitop identifiziert (Abb. 3.17).

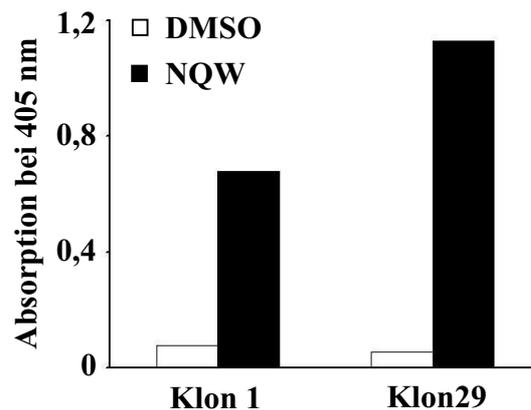


Abb. 3.17: Neu identifiziertes HLA-B3501 Epitop NQWKEPDVY. Getestet wurde die Reaktivität der T-Zell-Klone 1 und 29 des Spenders F46 auf Peptid-beladene B-Blasten mittels IFN- γ -ELISA. Als Kontrolle dienten B-Blasten, die nur mit einer entsprechenden Menge Lösungsmittel behandelt wurden (DMSO).

Auf die gleiche Weise wurden HLA-A11-restringierte Klone des Spenders F46 getestet. Es konnte gezeigt werden, dass drei von drei getesteten Klonen das Nonamer ATVQGQNLK erkannten. Dies bestätigte Daten, die kürzlich von Kondo *et al.* veröffentlicht worden waren (Kondo *et al.*, 2004). In einigen Spendern scheint somit das Epitop ATV immundominant über das HLA-A11-Epitop GPI zu sein, das bisher als dominant in Spendern mit diesem HLA-Allel galt (Solache *et al.*, 1999). Analog konnte das HLA-Cw12-restringierte Epitop VAFTSHEHF, das ebenfalls kurz zuvor von Kondo *et al.* beschrieben worden war, bestätigt werden. VAF-spezifische Klone des Spenders F62 erkannten pp65-exprimierende Zielzellen nur dann, wenn sie das HLA-Allel Cw1202, nicht aber, wenn sie das HLA-Allel Cw1203 trugen (Abb. 3.18). Die Feintypisierung des HLA-C-Lokus wurde wie unter 2.4.4.4 durchgeführt.

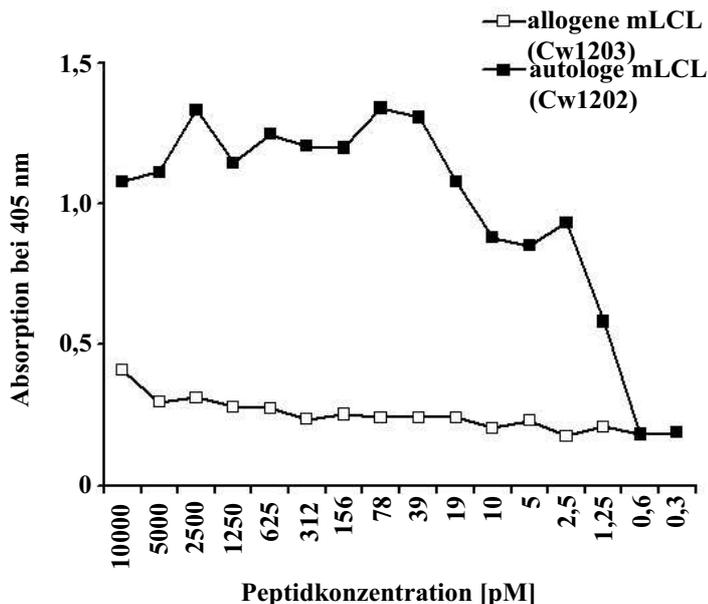


Abb. 3.18: HLA-Restriktion des pp65-Epitops VAFTSHEHF. Es wurde mittels IFN- γ -ELISA getestet, ob ein T-Zellklon des Spenders F62, der das Cw12-restringierte Epitop VAF erkannte, nur autologe Zellen, die das Allel Cw1202 trugen, oder auch autologe Zellen mit dem Cw1203-Allel erkannte. Die Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des Peptids beladen.

Mit Hilfe der Peptid-Bank wurden auch die HLA-B14-restringierten CD8⁺ T-Zellklone des Spenders F45 analysiert. Klone mit dieser Restriktion erkannten das 15-mer PAAQPKRRRHRPDAL. Die darin enthaltene nonamere Sequenz RRRHRPDAL stimmte mit dem beschriebenen HLA-B14-Motif xRxxRxxxL überein (DiBrino *et al.*, 1994). Fünf von fünf getesteten Klonen erkannten diese Sequenz. RRRHRPDAL konnte daher als neues potentiell immundominantes pp65-Epitop bestätigt werden. Für einen Überblick aller bestätigten und neu gefundenen Epitope siehe Tabelle 3.5.

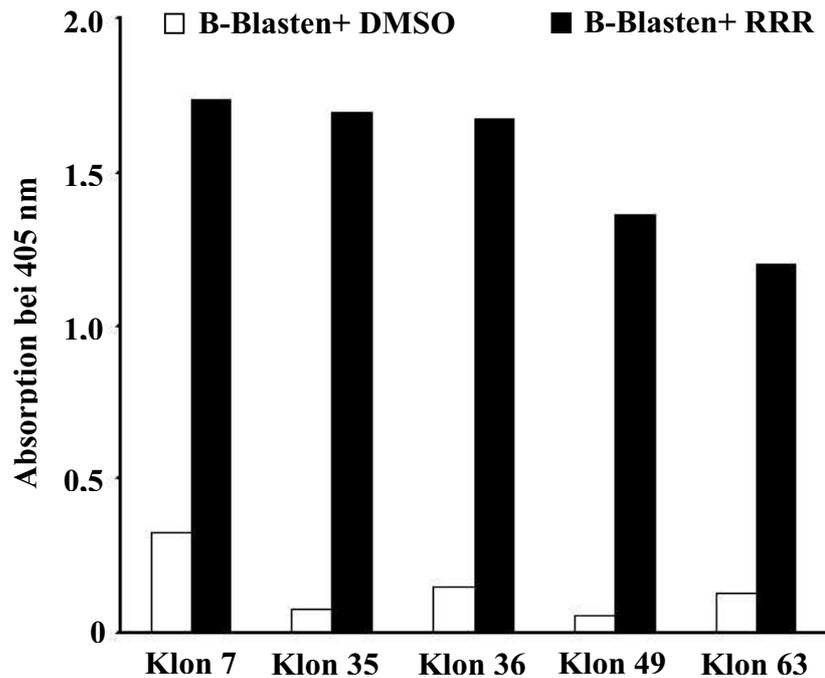


Abb. 3.19: Neu identifiziertes HLA-B14-restringiertes Epitop RRRHRPDAL. Getestet wurde die Reaktivität von B14-spezifischen Klonen des Spenders F45 gegen autologe Peptid-beladene B-Blasten mittels IFN- γ -ELISA.

Auch CD4⁺ T-Zellen wurden mittels der Peptidbank auf ihre Epitop-Spezifität untersucht. Ausgewählt wurde je ein Klon jeder identifizierten HLA-Klasse-II-Restriktion. Zwei kürzlich beschriebene CMV-Epitope konnten bestätigt werden (Khattab *et al.*, 1997; Li Pira *et al.*, 2004). Hierbei handelt es sich um ein HLA-DRB1-1- und ein DRB1-13-restringiertes Epitop (Tab. 3.5). Die Aminosäuren von Position 489 bis 507 wurden in dieser Arbeit von Klonen erkannt, die DRB5-restringiert waren. Diese Sequenz (AGILARNLVPMVATVCQN) wurde kürzlich als wahrscheinlich DR11-restringiertes Epitop beschrieben (Khattab *et al.*, 1997; Li Pira *et al.*, 2004). Diese Sequenz kann also anscheinend durch mindestens zwei Klasse-II-Moleküle repräsentiert werden. Zudem enthält diese Sequenz auch das dominante HLA-Klasse-I-Epitop (HLA-A2) NLVPMVATV. Darüber hinaus konnte ein bisher nicht beschriebenes CD4-Epitop identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um ein HLA-DRB1-15-restringiertes Epitop mit der Sequenz MSIVVYALPLKMLNI (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: HLA-Restriktionen und Epitop-Spezifitäten der pp65-spezifischen Klone

Spender	HLA-Restriktion	Anzahl HLA-restringierter Klone	erkanntes Epitop	Aminosäure-Position in pp65	Anzahl Epitop-spezifischer Klone	Referenz
F45	A68	8	n. b.	-	-	-
	B14	11	RRRHRQDAL	539-547	5/5	diese Arbeit
	n. b. ^{a)}	20	n. b.	-	-	-
F46	A11	4	ATVQQQLNK	501-509	3/3	Kondo 2004
	B7	4	TPRVTGGGAM	417-426	1/4	Weekes 1999
	B35	8	NQWKEPDVY	173-181	2/2	diese Arbeit
	DRB1-13	5	(QPFM)RPHERNGFTVL(CPKN) ^{b)}	261-279	1/1	Li Pira 2004
	DRB1-15	1	MSIYVYALPLKMLNI	109-123	1/1	diese Arbeit
	DRB5	2	(AGIL)ARNLVPMVATV(QGQN) ^{b)}	489-507	1/1	Khattab 1997
F62	A3	3	n. b.	-	-	-
	Cw12	15	VAFTSHEHF	294-302	2/3	Kondo 2004
	DRB1-1	4	(GQNL)KYQEFFWDAND(IYRI) ^{b)}	505-523	1/1	Khattab 1997

a) CD8⁺-T-Zell-Klone, die keine der verfügbaren HLA-kompatiblen Zielzellen erkannten

b) Zwei benachbarte 15-mer Peptide mit einem Überlappungsbereich von 11 Aminosäuren wurden erkannt.

3.2.9 Reaktivität CMV-spezifischer Klone gegen pp65-Vaccinia- oder CMV-infizierte Stimulatoren

Um die pp65-Spezifität noch durch ein weiteres unabhängiges System zu verifizieren, wurde die spezifische IFN- γ -Sekretierung von HLA-B35-restringierten Klonen des Spenders F46 mittels ELISA qualitativ bestimmt. Als Stimulatoren wurden HLA-B35-kompatible Fibroblasten und autologe B-Blasten verwendet. Die Fibroblasten wurden entweder mit dem CMV-Laborstamm AD169 oder mit einem rekombinanten Vacciniavirus mit pp65-Expressionskassette (MVA pp65; siehe 2.1.2) infiziert. B-Blasten wurden nur mit MVA pp65 infiziert. Sowohl Fibroblasten als auch B-Blasten wurden zur Kontrolle mit einem rekombinanten Vaccinia-Virus ohne Expressionskassette infiziert. Die Infektion der Zellen erfolgte wie unter 2.7 beschrieben. Zusätzlich wurden auch die autologe pp65-mLCL und Kontroll-mLCL zur Stimulation eingesetzt. Die Ergebnisse eines solchen Experiments sind in Abbildung 3.20 für vier Klone des Spenders F46 dargestellt.

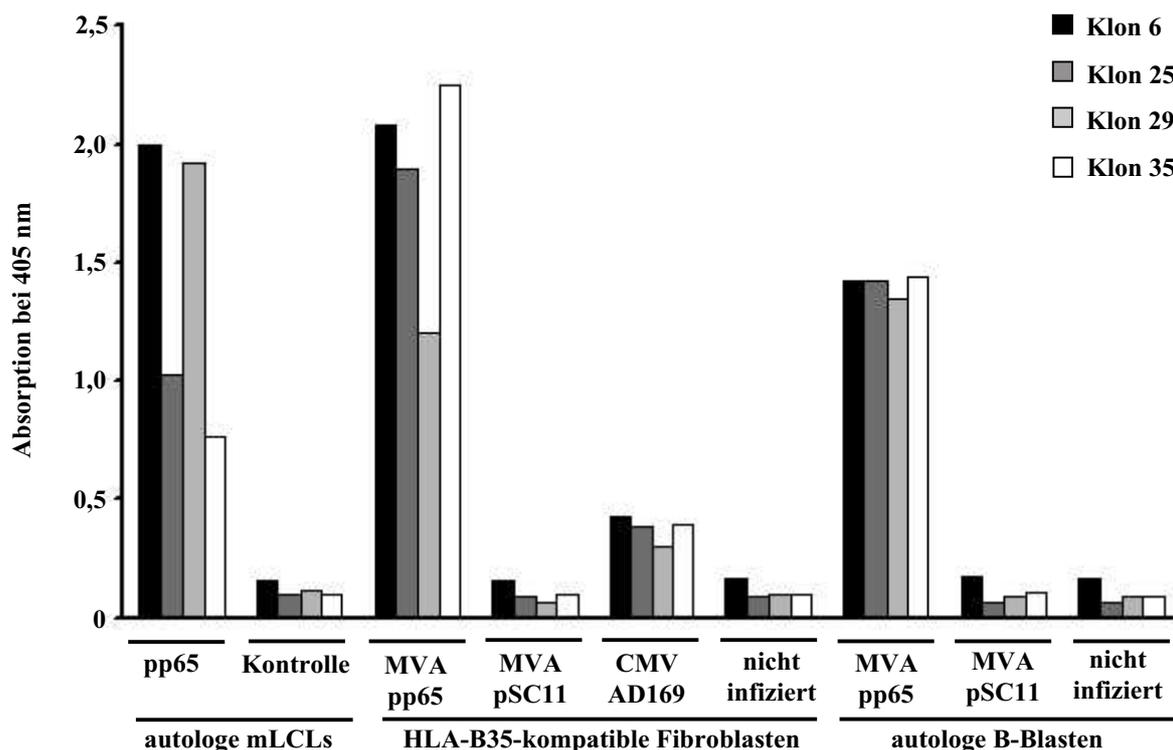


Abb. 3.20: CMV-spezifische IFN- γ -Sekretierung. CMV-spezifische, HLA-B35-restringierte Klone zeigen spezifische Reaktivität gegen Vaccinia-infizierte, HLA-B35-kompatible Fibroblasten und autologe B-Blasten und gegen CMV-infizierte Fibroblasten. Also Kontrolle dienten die autologe pp65-mLCL und Kontroll-mLCL.

Alle Klone zeigten eine hohe Reaktivität gegen MVA pp65 infizierte Zellen, CMV AD169 infizierte Fibroblasten wurden wesentlich schwächer erkannt. Fibroblasten und B-Blasten, die nicht oder mit einem Vacciniastamm ohne Expressionskassette infiziert worden waren, wurden nicht erkannt. Somit konnte gezeigt werden, dass endogen prozessiertes CMV effektiv von den generierten Klonen erkannt wird.

3.3 Verwendung allogener, HLA-kompatibler mLCLs zur Generierung pp65-spezifischer T-Zelllinien

Infektionen mit CMV - zum Beispiel nach Knochenmarktransplantationen - sind trotz der Einführung neuer antiviraler Präventionsmaßnahmen und Behandlungsmethoden immer noch ein ernstes Problem (Ljungman, 1992; Einsele, 1995; Boeckh, 1999; Einsele, 2000; Eckle, 2000). Die meisten beschriebenen Strategien zur Generierung von Virus-spezifischen T-Zellen sind sehr zeitaufwendig, wie zum Beispiel die Verwendung Peptid-beladener Dendritischer Zellen (DCs) (Kleihauer *et al.*, 2001; Vannucchi *et al.*, 2001), mit CMV-Antigen beladener DCs (Peggs *et al.*, 2001; Szmania *et al.*, 2001) oder genetisch modifizierter APCs (Koehne *et al.*, 2000; Kondo *et al.*, 2002). Auch die Generierung der in dieser Arbeit verwendeten autologen mLCLs benötigt 6-8 Wochen. Mit dem Anlegen einer großen, viele HLA-Kombinationen abdeckenden mLCL-Bank könnte Zeit gespart werden. Deswegen sollte untersucht werden, ob sich HLA-kompatible, allogene mLCLs zur Stimulation CMV-spezifischer T-Zellen eignen. Es wurden PBMCs der Spender GH und TW mit autologen und allogenen pp65-exprimierenden mLCLs stimuliert (Tab. 3.6). Bei der Wahl der allogenen Stimulatoren wurde darauf geachtet, dass sie in mindestens drei HLA-Klasse-I-Allelen übereinstimmten.

Tab. 3.6: HLA-Typen der Spender und HLA-kompatibler Spender

T-Zell-Spender	HLA-kompatible Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C
GH		1, 3	35, 57	4, 6
	AM	1, 26	35, 57	4
TW		1	8, 62	3, 7
	Tu226	1	8, 44	4, 7

3.3.1 Proliferation allogen stimulierter T-Zelllinien

Für diese Versuche wurde Blut von Laborspendern verwendet. Für den Spender GH wurden $2,5 \times 10^6$ PBMCs pro Linie, für den Spender TW 1×10^6 PBMCs pro Linie eingesetzt. Polyklonale T-Zelllinien wurden wie unter 2.6.7 beschrieben generiert. T-Zelllinien In Abbildung 3.21 ist die Proliferation der autolog und allogen stimulierten T-Zelllinien der Spender GH und TW dargestellt.

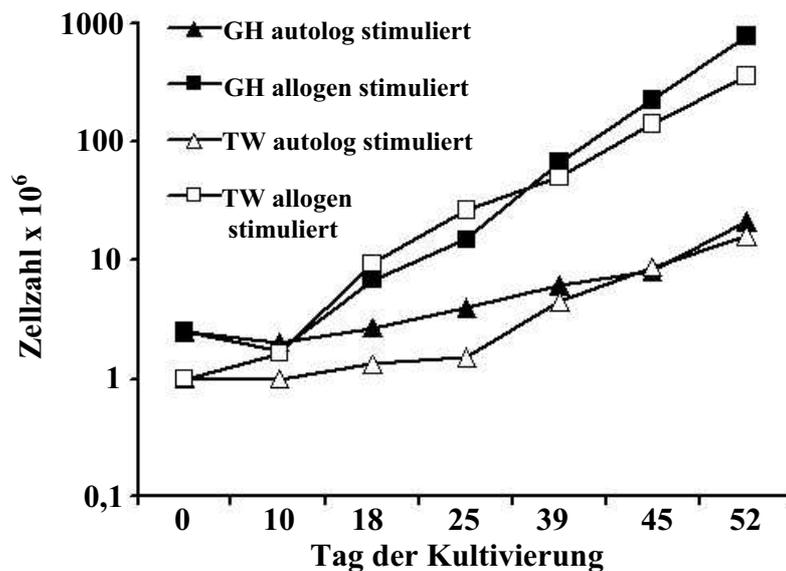


Abb. 3.21: Proliferation autolog und allogen stimulierter T-Zelllinien. PBMCs der Spender GH (schwarze Symbole) und des Spenders TW (weiße Symbole) wurden mit autologen pp65-exprimierenden mLCLs und mit allogenen pp65-exprimierenden mLCLs eines HLA-kompatiblen Spenders stimuliert.

T-Zelllinien, die mit allogenen pp65-exprimierenden mLCLs stimuliert wurden, zeigten eine sehr viel stärkere Proliferation als autolog stimulierte T-Zellen. Eine so starke Proliferation konnte auch in späteren Experimenten mit anderen Spender in autologen Stimulationen nie beobachtet werden. Während der 52 tägigen Kultur vermehrten sich die mit allogenen Stimulatoren kokultivierten T-Zellen um den Faktor 315 (Wentworth *et al.*) bzw. 355 (GH), die autolog stimulierten T-Zellen nur um den Faktor 8 (GH) bzw. 16 (Wentworth *et al.*).

3.3.2 FACS-Analyse der T-Zelllinien

Um einen ersten Überblick über die Zusammensetzung der unterschiedlich stimulierten T-Zellkulturen zu erhalten, wurden FACS-Analysen durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von CD8 und CD4. In Abbildung 3.22 ist die Verteilung von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen für alle Linien dargestellt. Autolog stimulierte T-Zelllinien wurden an Tag 45, allogene stimulierte Linien an Tag 56 untersucht.

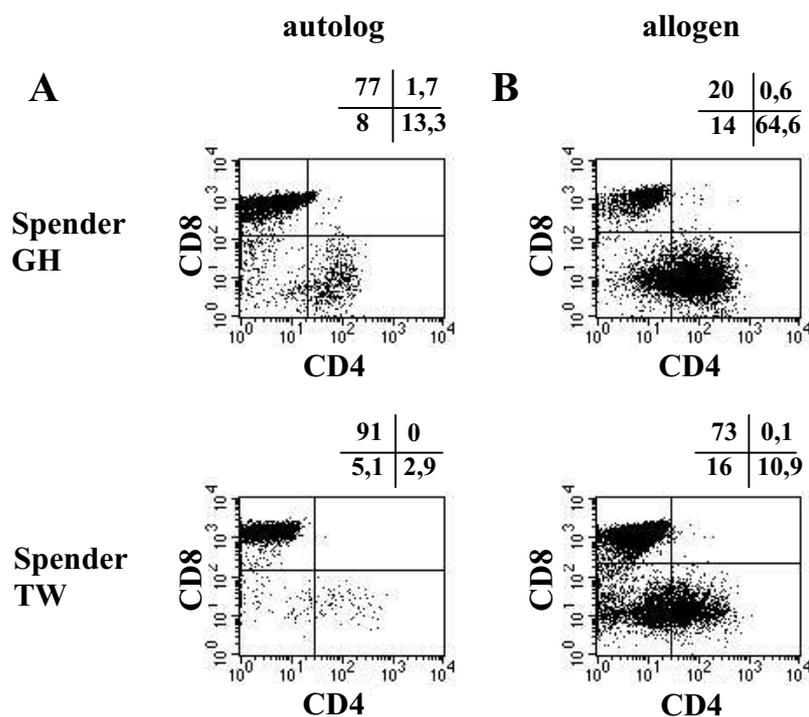


Abb. 3.22: Expansion von CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen. (A) T-Zelllinien der Spender GH und TW wurden mit autologen, pp65-exprimierenden mLCLs stimuliert. (B) PBMCs der gleichen Spender wurden mit allogenen, HLA-kompatiblen, pp65-exprimierenden mLCLs stimuliert. Der Phänotyp der unterschiedlichen T-Zelllinien wurde an Tag 45 (autolog stimulierte Linien) und an Tag 56 (allogene stimulierte Linien) untersucht.

Die FACS-Analysen ergaben, dass in autolog stimulierten T-Zelllinien CD8⁺-T-Zellen dominierten. In beiden allogenen stimulierten Linien hingegen war eine stärkere Expansion CD4⁺-T-Zellen zu beobachten, die bei Spender GH besonders ausgeprägt war und zu einer Dominanz CD4-positiver T-Zellen führte.

Der Anteil Epitop-spezifischer CD8⁺-T-Zellen wurde mittels Tetramer-Färbung ermittelt. In Abbildung 3.23 ist die Expansion Epitop-spezifischer Zellen für die autolog und allogene stimulierten T-Zelllinien beider Spender gezeigt.

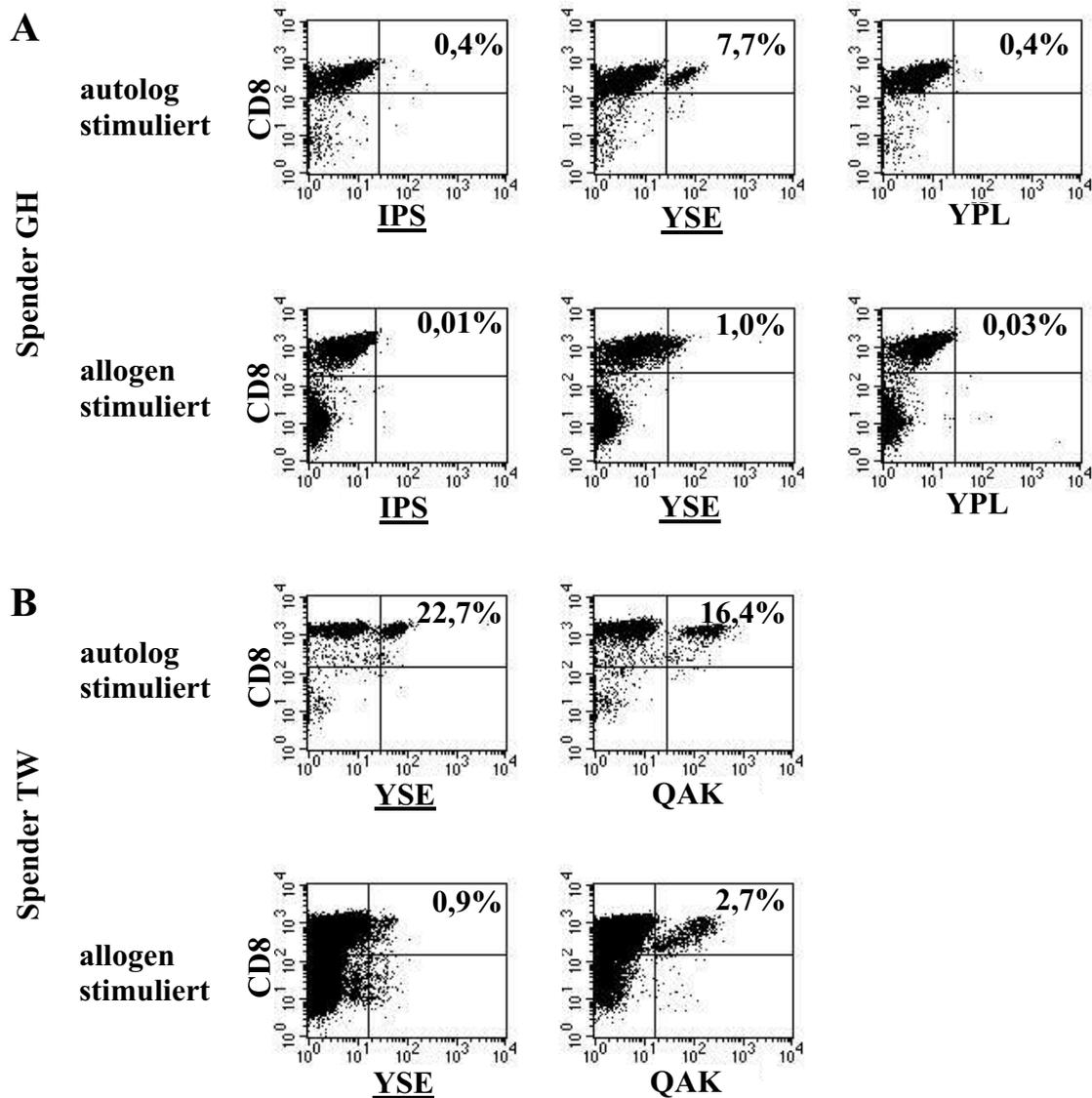


Abb. 3.23: Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen. Mittels Tetramer-Analyse wurden Epitop-spezifische T-Zellen in allogenen und autologen stimulierten T-Zelllinien an Tag 28 detektiert. Gezeigt sind die Ergebnisse einer solchen Analyse für Spender GH (A) und Spender TW (B). pp65-spezifische Epitope sind durch Unterstreichung gekennzeichnet.

Bei Spender TW konnte die Anwesenheit von T-Zellen mit Spezifität gegen ein CMV-Epitop (YSE) und ein EBV-Epitop (QAK), bei Spender GH gegen dasselbe EBV-Epitop sowie gegen zwei CMV-Epitope (YSE und IPS) klar nachgewiesen werden, und zwar jeweils

sowohl in der autolog als auch in der allogenen stimulierten T-Zelllinie. Der Anteil spezifischer T-Zellen in der allogenen stimulierten T-Zelllinie war jedoch stets kleiner als in der autolog stimulierten T-Zelllinie und zwar um den Faktor 6 bis 20.

3.3.3 Zytotoxizitäts-Analysen autolog und allogenen stimulierter T-Zelllinien

Die Antigen-spezifische Lyse von Zellen, die das Zielgen exprimieren, ist die wichtigste Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen. Da in klinischen Studien über CMV schon gezeigt wurde, dass für eine langanhaltende Immunität gegenüber CMV die Applikation von CD8⁺ und CD4⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen nötig ist (Einsele *et al.*, 2002b; Peggs *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 1995), war die stärkere Expansion von CD4⁺-T-Zellen in allogenen stimulierten T-Zelllinien nicht unbedingt negativ zu bewerten. Wichtig ist die mögliche Anwesenheit Antigen-spezifischer CD8⁺- und CD4⁺-T-Zellen und die Abwesenheit alloreaktiver T-Zellen. Stellvertretend wurde hier die möglicherweise auf CD8⁺-T-Zellen zurückgehende zytotoxische Reaktivität untersucht, in dem autologe mLCLs und allogene, HLA-kompatible mLCLs als Zielzellen eingesetzt wurden. Unter anderen wurden auch die allogenen mLCLs eingesetzt, die zur allogenen Stimulation der T-Zelllinien verwendet worden waren. In Abbildung 3.24 sind die Ergebnisse für die generierten Linien des Spenders GH gezeigt. Die Linien des Spenders TW waren vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

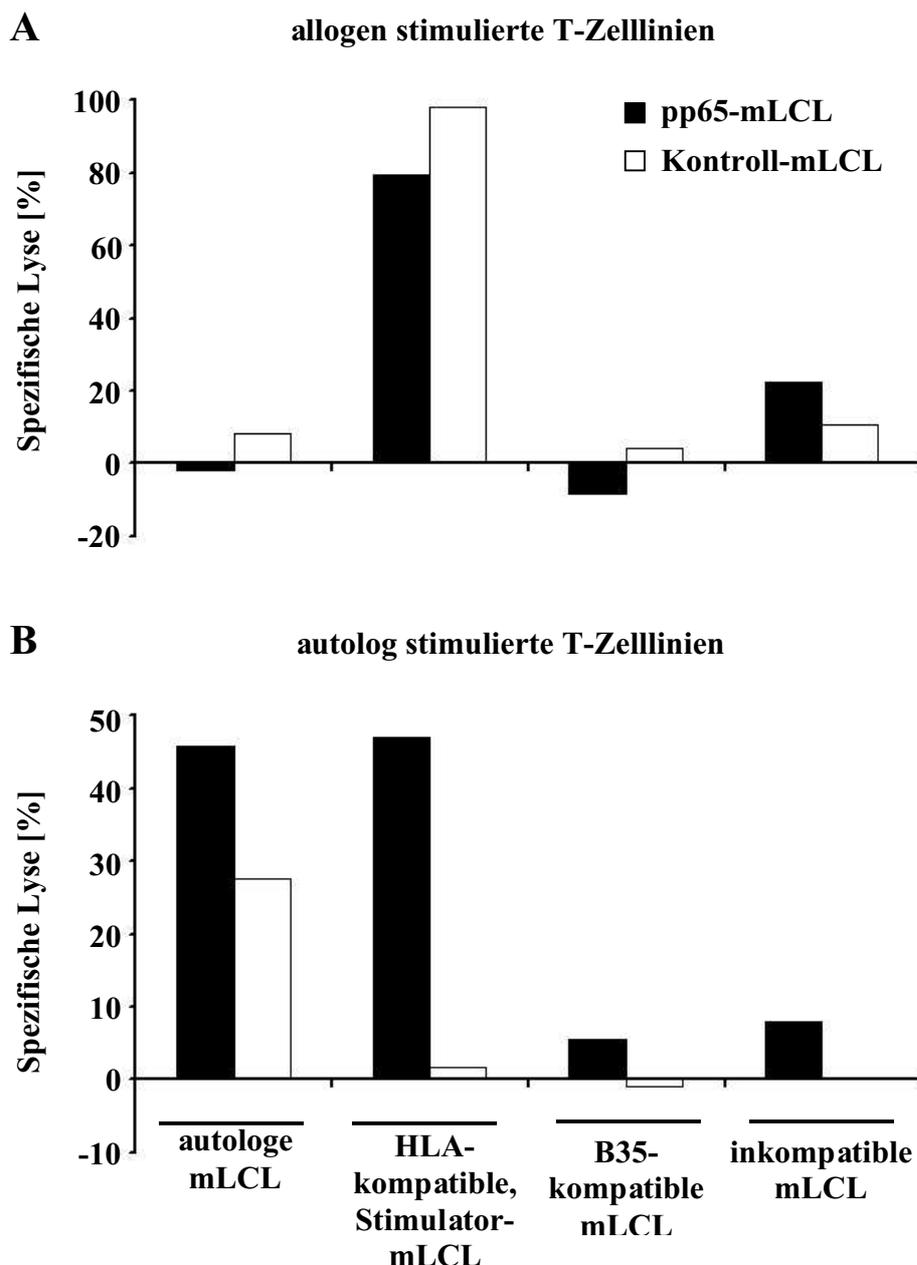


Abb. 3.24: Zytotoxische Reaktivität von T-Zelllinien des Spenders GH. In (A) sind die Ergebnisse einer Zytotoxizitäts-Analyse an Tag 51 der allogenen stimulierten T-Zelllinie gezeigt. Verwendet wurde zur Stimulation eine pp65-mLCLs eines A1-, B53- und B57-kompatiblen Spenders. In (B) sind die Ergebnisse an Tag 40 der autolog stimulierten T-Zelllinie dargestellt.

Die autolog stimulierte T-Zelllinie erkannte autologe pp65-exprimierende und HLA-A1/B35-kompatible, pp65 exprimierende Zielzellen. Die Erkennung der pp65-freien, autologen Kontroll-mLCL war deutlich niedriger. Die Stimulation mit allogenen, HLA-kompatiblen mLCLs führte zur Generierung von Zelllinien, die autologe mLCLs nicht erkannten, unabhängig davon, ob die Zielzellen pp65 exprimierten oder nicht. Darüber hinaus konnte

eine pp65-unspezifische Reaktivität gegen Zellen beobachtet werden, die zur allogenen Stimulation der T-Zellen eingesetzt worden waren. Obwohl in allogenen stimulierten T-Zelllinien CMV-spezifische, CD8-positive T-Zellen mittels Tetramer-Färbung detektiert wurden, war ihre Anzahl und/oder Aktivität zu gering, um ihre Funktion im Lyseassay feststellen zu können. Die Lyse von pp65- und Kontroll-mLCLs des HLA-kompatiblen zur Stimulation eingesetzten Spenders war sehr stark, was auf eine dominierende Alloreaktivität innerhalb der zytotoxischen T-Zellen schließen lässt. Es handelt sich um eine Erkennung bestimmter HLA-assoziiierter oder -restringierter Alloantigene und nicht um eine Erkennung invarianter B-Zellantigene. Dies konnte durch das Fehlen der Reaktivität gegen Zielzellen gezeigt werden, die mit den Stimulatoren HLA-inkompatibel waren. Die maximal erreichte Lyse, der zur Stimulation eingesetzten mLCLs, war sehr hoch (nahe 100%). Dies steht in Einklang mit der von alloreaktiven Zellen aus gesehenen höheren Antigendichte auf den Ziel-mLCLs.

3.4 Beeinflussung der T-Zellentwicklung bei EBV-negativen Spendern durch Zugabe von Zytokinen oder Antikörpern

Wenn naive T-Zellen das erste Mal auf ein Antigen treffen, differenzieren sie entweder in Th1- oder Th2-Zellen (Mosmann *et al.*, 1986), die auf Grund ihres Zytokinprofils unterschieden werden können. Th1-Zellen produzieren IFN- γ , Interleukin-2 (IL-2) und Lymphotoxin- α (LT- α). Th2-Zellen hingegen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-9 und IL-13 und notwendig, um die humorale Immunantwort beispielsweise zur Abwehr parasitärer Würmer zu induzieren. Diese ersten Erkenntnisse wurden in der Maus gewonnen, können aber auf den Menschen übertragen werden (Del Prete *et al.*, 1991). Die Entwicklung Antigen-spezifischer CD4⁺-Zellen in Th1- oder Th2-Zellen wird durch viele Faktoren, besonders aber durch das Zytokinmilieu während der Anfangsphase der Immunantwort beeinflusst (Abbas *et al.*, 1996). Entscheidende Funktionen haben dabei IL-4, das für die Entwicklung zu Th2-Zellen benötigt wird, und IL-12, das wiederum die Th1-Entwicklung unterstützt (Ma *et al.*, 1996; Wynn *et al.*, 1995). Weiterhin ist bekannt, dass IL-10 insbesondere auf Th1-Antworten immunsuppressiv wirkt (Moore *et al.*, 2001). Die Th-Subpopulationen können sich durch die unterschiedliche Zytokin-Sekretion auch gegenseitig in ihrer Entwicklung hemmen.

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob mit Hilfe des mLCL-Systems eine Generierung EBV-spezifischer T-Zellen aus EBV-negativen Spendern möglich ist. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die T-Zellkulturen bei Stimulation von T-Zellen eines negativen Spenders, von CD4-T-Zellen dominiert wurden (A. Moosmann, persönliche Mitteilung). Dabei fiel auf, dass die Proliferation dieser Antigen-nichtspezifischen T-Zellen meist ähnlich oder sogar stärker war als die Proliferation von T-Zellkulturen EBV-positiver Spender. Die Vermehrung entsprechender nichtspezifischer T-Zellen wurde also bei Seropositiven anscheinend durch die spezifischen T-Zellen inhibiert. Diese EBV-spezifischen T-Zellen weisen, ebenso wie die bisher beschriebenen CMV-spezifischen T-Zellen, generell ein typisches Th1-Verhalten auf, geprägt durch die Sekretion von Zytokinen wie IFN- γ . Daher lag es nahe, zu untersuchen, ob die nichtspezifische T-Zellexpansion bei Seronegativen sich durch Zugabe von Th1-Zytokinen oder durch Abfangen von Th-2-Zytokinen reduzieren ließ. Um das Verhältnis CD8-/CD4-positiver T-Zellen zu verschieben und eine unspezifische Reaktion zu unterdrücken, wurden T-Zelllinien eines EBV-negativen Spenders (AM) in Gegenwart eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-4 (10 μ g/ml), eines monoklonalen Antikörpers gegen IL-10 (10 μ g/ml) oder von rekombinantem IL-12 (0,1 ng/ml) generiert.

Zur Kontrolle wurden T-Zelllinien eines EBV-positiven Spenders (Wentworth *et al.*) unter den gleichen Bedingungen generiert. Für die Stimulation wurde die jeweils autologe KontrollmLCL verwendet.

3.4.1 Zytokinprofil der generierten T-Zelllinien

Um den Effekt der zugegebenen Antikörper und IL-12 auf die Zytokinproduktion der T-Zelllinien zu untersuchen, wurde an Tag 6 der Kultivierung die Anwesenheit verschiedener Zytokine im Überstand der Kulturen quantifiziert, wie unter 2.6.11 beschrieben (Abb. 3.25).

Im Gegensatz zu T-Zellkulturen des EBV-positiven Spenders TW produzierten Kulturen des EBV-negativen Spenders AM größere Mengen an IL-2, ein Effektorzytokin, das hauptsächlich von Th1-Zellen synthetisiert wird und für die Aktivierung naiver T-Zellen wichtig ist (O'Garra, 1998 #484; Ben-Sasson, 1990; LeGros, 1990). Die Produktion wurde durch Supplementierung des Mediums mit IL-12 reduziert. Die Zugabe von Antikörpern gegen IL-10 und IL-4 hatte auf die Sekretion von IL-4 ebenso keinen Einfluss, wie die Zugabe von IL-12. Bei Betrachtung des Zytokins IL-4 fand sich zu diesem frühen Zeitpunkt kein Unterschied zwischen EBV-positivem und -negativem Spender. Wie zu erwarten war, konnte durch Applikation eines anti-IL-10-Antikörpers die Menge an IL-10 im Überstand deutlich verringert werden. Insgesamt sezernierten Kulturen des EBV-negativen Spenders mehr IL-10 und weniger IFN- γ als Kulturen des positiven Spenders. Beides sprach für die These, dass bei seronegativen Spendern vermehrt Th2-Stimulation stattfand. Durch IL-12-Zugabe konnte zwar die IL-10-Sekretion nicht reduziert werden, wohl aber wurde die IFN- γ -Produktion bei beiden Spendern sehr deutlich, auf das mindestens 10fache erhöht. Es ist bekannt, dass IL-12 die Produktion verschiedenster Zytokine induziert. Insbesondere wird die IFN- γ -Produktion angeregt (Curfs *et al.*, 1997), was durch die hier gezeigten Daten bestätigt werden konnte. Die Sekretion von IFN- γ wurde durch IL-12-Zugabe in beiden Kulturen drastisch gesteigert.

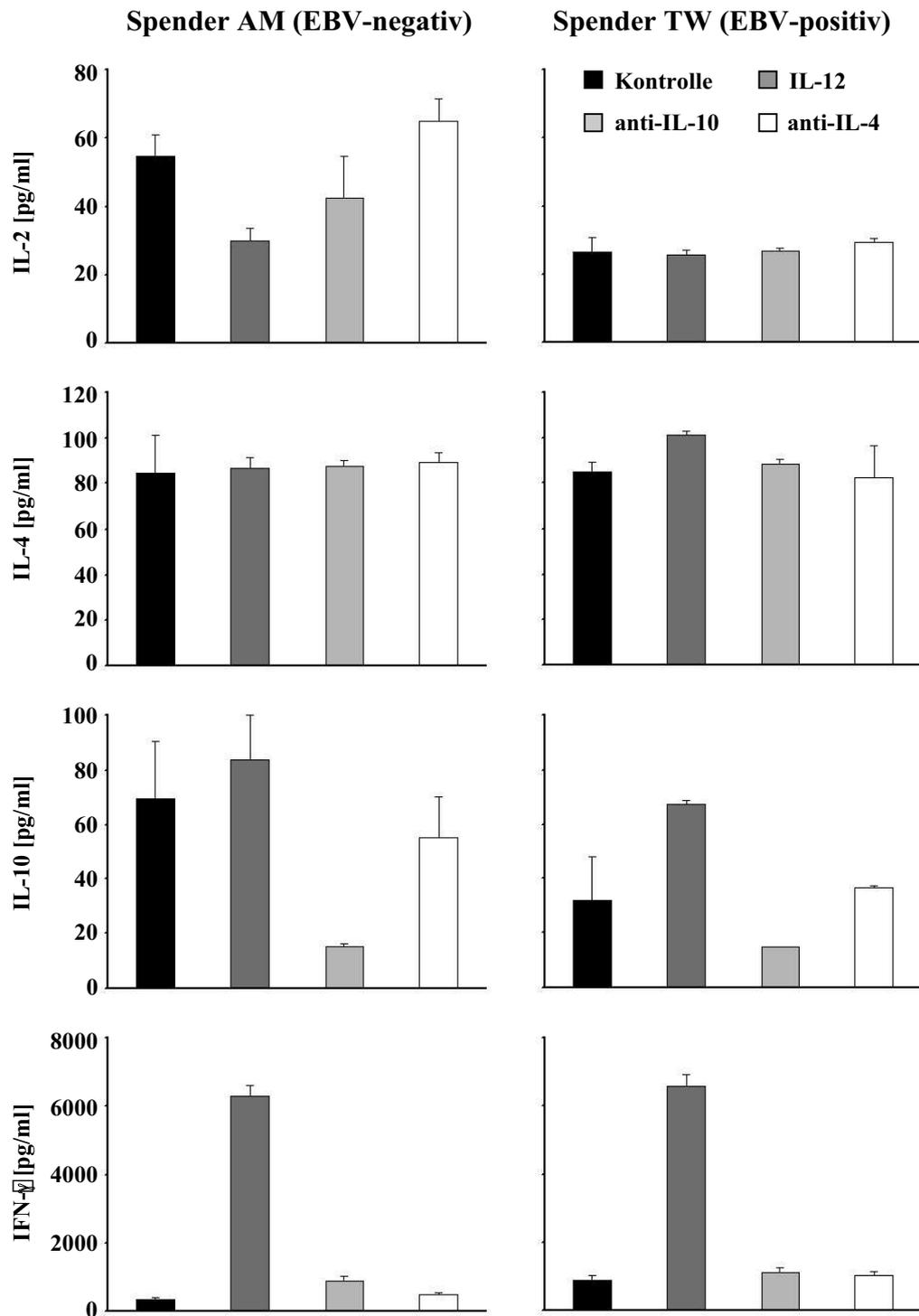


Abb. 3.25: Einfluss unterschiedlicher Faktoren auf die Zytokinproduktion der T-Zelllinien der Spender AM (EBV-negativ) und TW (EBV-positiv). PBMCs wurden mit der jeweiligen autologen Kontroll-mLCL stimuliert. Das Medium wurde mit IL-12 (0,1 ng/ml), anti-IL-10-Antikörper (10 µg/ml) oder anti-IL-4-Antikörper (10 µg/ml) supplementiert. K = Standardmedium ohne Zusätze. Zytokine in den Überständen der T-Zellkulturen wurden mittels Bioplex-Immunoassay, wie unter 2.6.11 beschrieben, quantifiziert.

3.4.2 Proliferation der generierten T-Zelllinien

Zwischen T-Zelllinien, die unter Standardbedingungen oder in Gegenwart von anti-IL-4- und anti-IL-10-Antikörpern generiert worden waren, konnte kein Unterschied bezüglich ihrer Proliferation, CD8/CD4-Verteilung und Spezifität festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb werden in den nachfolgenden Abschnitten nur die Ergebnisse der Linien gezeigt, die mit Standardmedium oder in Gegenwart von IL-12 generiert worden waren. In Abbildung 3.27 ist die Proliferation der zwei generierten Linien der Spender AM und TW während 59 Tage dargestellt. IL-12 wurde über den gesamten Zeitraum der Kultivierung gegeben.

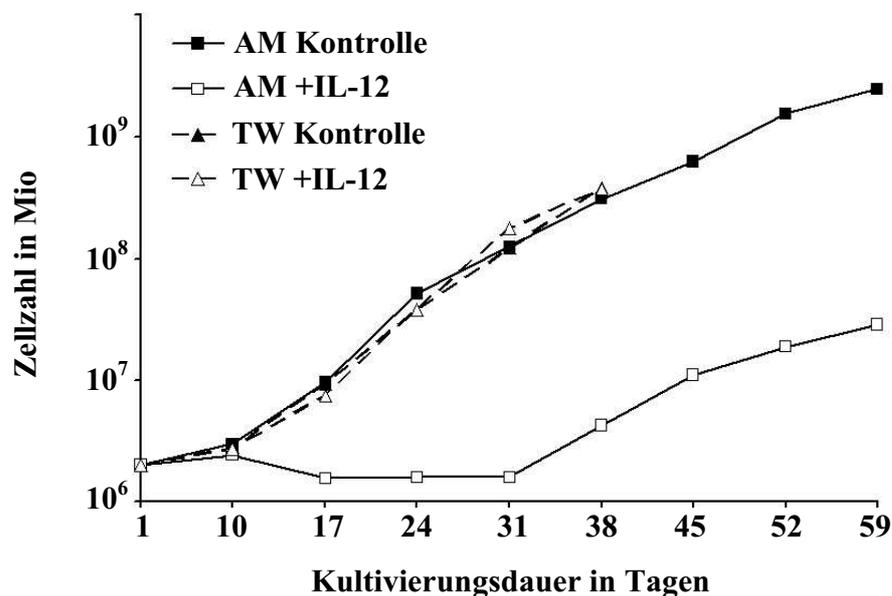


Abb. 3.27: Expansion von Zelllinien des EBV-negativen Spenders AM und des EBV-positiven Spenders. Linien wurden unter Standardbedingungen (schwarze Symbole) oder in Gegenwart von 0,1 ng/ml IL-12 (weiße Symbole) generiert. Vitale Zellen in allen Kulturen wurden wöchentlich mit Trypanblau unter dem Lichtmikroskop gezählt.

Es ergab sich ein sehr starker und deutlicher Unterschied im Proliferationsverhalten mini-LCL-stimulierter T-Zelllinien. Die Proliferation von T-Zellen eines seropositiven Spenders (Wentworth *et al.*) blieb von der IL-12-Zugabe gänzlich unbeeinflusst. Ebenfalls genauso stark proliferierte eine T-Zelllinie eines EBV-negativen Spenders (AM), kultiviert ohne IL-12-Zugabe. Die Zugabe von IL-12 dagegen bewirkte einen drastischen Rückgang bzw. Stagnation der Anzahl lebender Zellen zwischen Kultivierungstag 10 und 31.

3.4.3 Phänotypische Analyse der T-Zelllinien

Die generierten T-Zelllinien wurden auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD8 und CD4 untersucht. Abbildung 3.26 zeigt die phänotypische FACS-Analyse der Zelllinien der beiden Spender an Tag 38 mit und ohne Zugabe von IL-12.

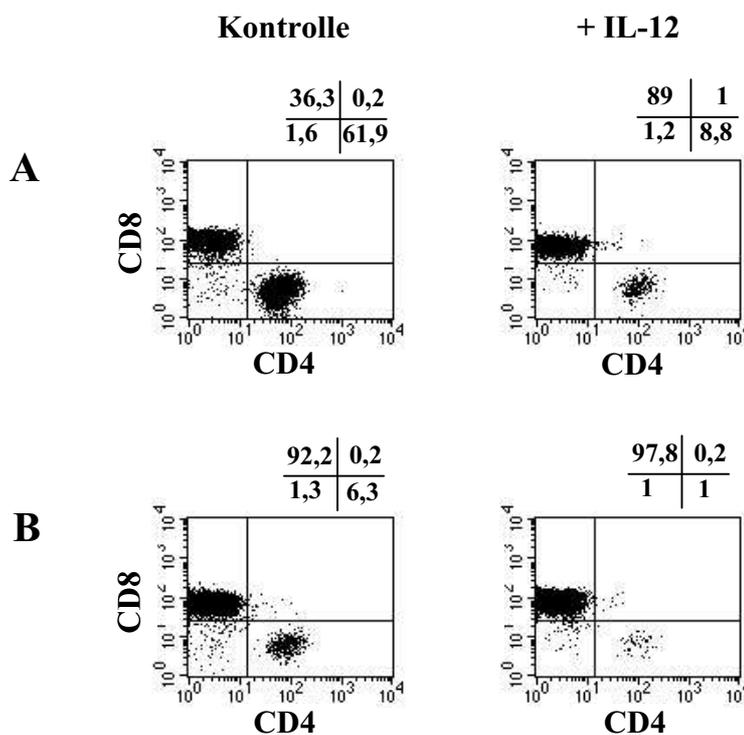


Abb. 3.26: Phänotypische Analyse der Zelllinien des EBV-negativen Spenders AM (A) und des EBV-positiven Spenders TW (B). Die Expression von CD4 und CD8 wurde an Tag 38 untersucht.

Die Stimulation der T-Zelllinie des EBV-negativen Spenders AM mit der autologen KontrollmLCL führte zu CD4-dominierten (61,9% CD4⁺) T-Zellkulturen. Durch Zugabe von IL-12 in das Kulturmedium kam es zu einer Verschiebung der Verhältnisse zugunsten der CD8-positiven Zellen (8,8% CD4⁺ und 89% CD8⁺). Die Stimulation der T-Zellen des EBV-positiven Spenders TW führte mit und ohne Zugabe von IL-12 zu CD8-dominierten Kulturen, wobei auch hier eine - wenn auch nicht so ausgeprägte - Abnahme der CD4-positiven T-Zellen bei Zugabe von IL-12 beobachtet werden konnte.

3.4.4 Zytotoxische Reaktivität der Zelllinien

Es sollte untersucht werden, ob die Unterdrückung der (vermuteten nichtspezifischen) Th2-Zellen eine Selektion zugunsten von (potentiell spezifischen) cytotoxischen T-Zellen ermöglichte. Mittels TDA-Freisetzungsversuchen sollte, wie in Abschnitt 2.6.14 beschrieben, untersucht werden, ob die generierten T-Zelllinien in der Lage sind in EBV-spezifischer Weise Zellen zu erkennen und zu lysieren. Als Zielzellen wurden autologe und allogene, HLA-kompatible LCLs verwendet. Zusätzlich wurden als EBV-freie Zielzellen autologe B-Blasten eingesetzt. Die Ergebnisse zeigten, dass die Applikation von IL-12 keinen Einfluss auf die Spezifität der T-Zelllinien des EBV-positiven Spenders hatte. In Abbildung 3.28 werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nur die Ergebnisse eines Lyse-Assays der Linien des EBV-negativen Spenders AM gezeigt. Dargestellt sind nur ausgewählte Daten die mit einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von 8:1 erhalten wurden.

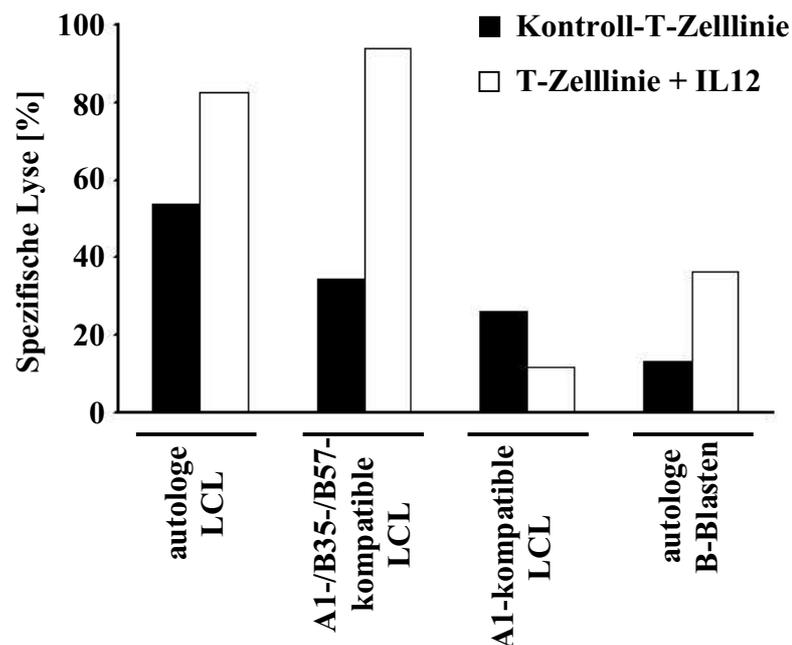


Abb. 3.28: Zytotoxische Reaktivität der T-Zelllinien des EBV-negativen Spenders AM. Linien wurden in Standardmedium (schwarze Balken) und in Gegenwart von IL-12 (weiße Balken) generiert. Gezeigt sind TDA-Freisetzungsversuche an Tag 71 (Kontroll-T-Zelllinie) bzw. an Tag 78 (T-Zelllinie +IL-12) für das Effektor/Zielzell-Verhältnis von 8:1.

T-Zelllinien des EBV-negativen Spenders AM lysierten autologe und HLA-kompatible LCLs nur schwach. Wurden die T-Zelllinien des gleichen Spenders in Gegenwart von IL-12 generiert, konnten spezifische Lysen EBV-exprimierender Zellen von bis zu 90% erreicht werden (Effektor/Zielzell-Verhältnis von 8:1). Allerdings erkannte die in Gegenwart von IL-12 generierte T-Zelllinie - wenn auch in geringerem Maße - auch autologe, EBV-freie B-Blasten (35% Lyse). Insgesamt schie die HLA-restringierte Erkennung von EBV-positiven Zielzellen durch Kultivierung der Zellen in Gegenwart von IL-12 versträrkt worden zu sein.

Um zu überprüfen, ob diese Reaktivität von der Präsenz HLA-Klasse-I-Molekülen abhängig war, wurde die Erkennung über diesen Liganden durch Zugabe eines anti-HLA-ABC-Antikörpers (W6/32) unterbunden. Ein TDA-Freisetzungsversuch wurde wie beschrieben durchgeführt, wobei dem Kulturmedium 25 μ g/ml anti-HLA-ABC-Antikörper zugesetzt wurde (Abb. 2.29).

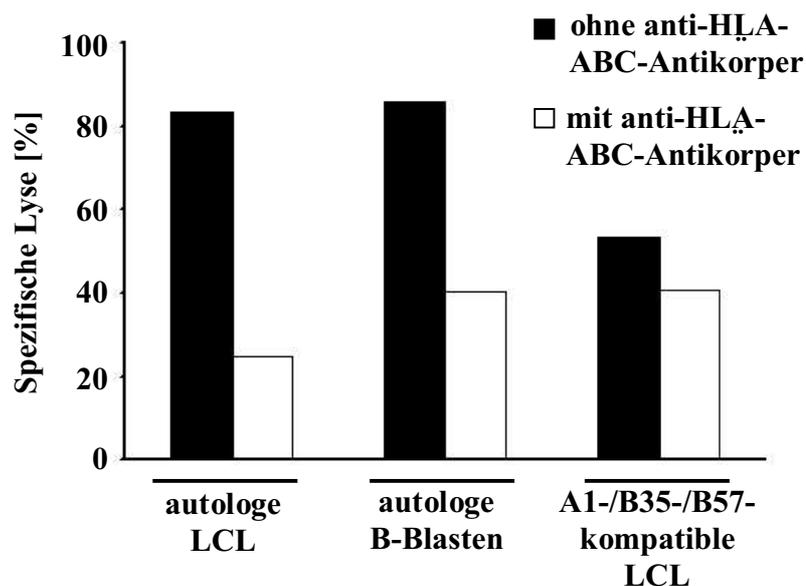


Abb. 3.29: Inhibierung der spezifischen Lyse durch anti-HLA-ABC-Antikörper. Die zytotoxische Reaktivität der in Gegenwart von IL-12 generierten T-Zelllinie des EBV-negativen Spenders AM wurde mittels Zugabe eines gegen HLA-ABC gerichteten Antikörpers unterdrückt (25 μ g/ml). Effektor/Zielzellverhältnis = 16:1.

Bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von 16:1 wurden autologe, EBV-freie B-Blasten ebenso stark lysiert wie autologe LCLs. Durch Zugabe des gegen HLA-ABC gerichteten Antikörpers konnte die Lyse der Zellen reduziert werden. HLA-kompatible Zellen wurden ebenfalls erkannt. Die spezifische Lyse wurde auch hier durch Zugabe des Antikörpers reduziert, was darauf hinweist, dass die Erkennung der Zielzellen HLA-abhängig ist.

Dieser Teil der Experimente zeigt eine HLA-abhängige Lyse bei einem EBV-negativen T-Zellspender mit allogener Stimulation, die durch Zugabe von IL-12 verstärkt auftrat. IL-12, eventuell in Kombination mit anderen Zytokinen, könnte somit ein nützliches Hilfsmittel bei der T-Zellgenerierung mittels mLCLs aus EBV-negativen Spendern sein. Aus Mangel an weiteren EBV-negativen Spendern konnten leider keine weiterführenden Experimente zur Generierung EBV-spezifischer T-Zellen aus EBV-negativen Spendern gemacht werden.

3.5 Reaktivierung von IE1 und oder pp65/IE1-spezifischen T-Zellen

Es wurde gezeigt, dass die Rekonstitution der CMV-spezifischen Immunantwort nach allogener Stammzelltransplantation vor CMV-Infektion bzw. -Erkrankungen schützt (Ljungman, 1991; Riddell, 1992; Walter, 1995; Krause, 1997; Einsele, 2002; Peggs, 2003). Zunächst wurde das Matrixprotein pp65 als ein Hauptziel der zytotoxischen T-Zell-Antwort identifiziert (Longmate *et al.*, 2001; McLaughlin-Taylor *et al.*, 1994; Wills *et al.*, 1996). Später konnte gezeigt werden, dass die Anzahl gesunder Spender, die eine CD4-vermittelte Reaktivität gegen ein weiteres CMV-Antigen - IE1 - zeigen, ebenfalls hoch ist (Davignon *et al.*, 1995). Durch Entwicklung von neuen Nachweismethoden, wie zum Beispiel Tetramer-Färbungen und intrazelluläre Detektion der Zytokinproduktion nach Peptidstimulation, konnten auch IE1-spezifische, CD8-positive T-Zellen in gesunden Menschen und in Patienten nach allogener Stammzelltransplantation in relativ großen Zellzahlen nachgewiesen werden (Gyulai *et al.*, 2000; Kern *et al.*, 1999; Khan *et al.*, 2002; Retiere *et al.*, 2000). Die Häufigkeit IE1-spezifischer T-Zellen in gesunden, CMV-positiven Menschen legt die Vermutung nahe, dass auch diese T-Zellen eine wichtige Rolle bei der Kontrolle des Virus-infizierter Zellen *in vivo* spielen.

Um die beiden wichtigsten bekannten CMV-T-Zell-Antigene und damit einen großen Teil der CMV-spezifischen T-Zellimmunität abzudecken, wurden zwei zusätzliche mEBV-Vektoren, wie unter 2.4.4 beschrieben, konstruiert. Damit sollten vor allem Spender erreicht werden, die gegen pp65 allein nicht oder nur schwach reagieren. Ein Vektor enthielt das Gen für das Protein IE1. Der zweite Vektor enthielt ein artifizielles Gen, das das chimäre Protein pp65_IE1 exprimiert. Mit diesem zweiten Vektor-Konstrukt sollte eine Expansion von T-Zelllinien erreicht werden, die Epitope aus beiden Proteinen erkennen. Die beiden neuen mEBV-Vektoren wurden mittels der Verpackungszelllinie 293/TR2 verpackt und anschließend PBMCs mit den virionhaltigen Überständen infiziert. Die auswachsenden mLCLs verschiedener Spender wurden auf die Expression beider Proteine mittels Immunoblot-Analyse, untersucht. Die Ergebnisse einer solchen Analyse sind für die verschiedenen Linien des Spenders F60 in Abbildung 3.30 gezeigt.

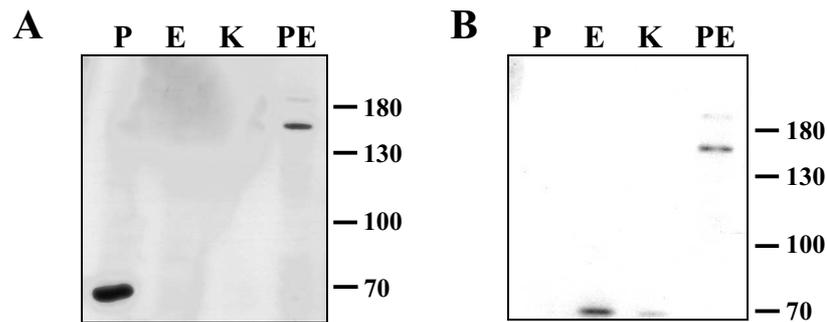


Abb. 3.30: Immunoblot-Analyse zum Nachweis der Proteine pp65 (A) und IE1 (B) mit monoklonalen Antikörpern. Gezeigt sind die Ergebnisse für die Analyse einer Kontroll-mLCL (K), pp65-mLCL (P), IE1-mLCL (E) und einer pp65_IE1-mLCL (PE) des Spenders F60.

Die Expression des Proteins pp65 konnte in mLCLs nachgewiesen werden, die entweder mit dem pp65-mEBV oder mit dem pp65_IE1-mEBV immortalisiert worden waren. Analog dazu konnten Zielepitope von IE1 in mit IE1-mEBV- oder pp65_IE1-mEBV-immortalisierten mLCLs detektiert werden. Das Fusionsprotein pp65_IE1 migrierte etwas über der erwarteten Position von 140 kDa.

In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ergebnisse für die in Tabelle 3.8 aufgeführten Spender gezeigt. Alle Spender waren CMV- und EBV-positiv. Bei der Auswahl der Spender wurde darauf Wert gelegt, dass für die Charakterisierung der T-Zelllinien Peptide und Tetramere für mindestens ein pp65- und ein IE1-Epitop zu Verfügung standen. Nur für Spender F46 stand kein IE1-spezifisches Tetramer zur Verfügung.

Tab. 3.8: HLA-Typen der Spender

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	HLA-DQ	HLA-DRB1	DRB3/4/5
F45	1, 68	8, 14	7, 8	3, 6	13, 15	3, 5
F46	3, 11	7, 3501	4, 7	6	13, 15	3, 5
F60	2, 26	7, 38	7, 1203	1, 6	8, 13	3
F61	2, 34	14, 44	4, 8	2, 5	1, 7	4
F64	2, 29	1501, 44	3, 16	2, 6	7, 13	3, 4

3.5.1 Proliferation der T-Zelllinien

In Abschnitt 3.2.1 konnte gezeigt werden, dass die Generierung von T-Zellen mit Medium, das mit 2% Humanserum supplementiert war, möglich war. Jedoch proliferierten die Zellen langsamer als bei Zugabe von 10% FCS (Abb. 3.8). Für die Generierung der T-Zelllinien, die in den nachfolgenden Abschnitten beschrieben werden, wurde das Medium mit 5% Humanserum supplementiert. In Abbildung 3.31 ist exemplarisch das Wachstumsverhalten der T-Zelllinien der Spender F45, F60, und F61 gezeigt. Die Linien proliferierten unter diesen Bedingungen ähnlich gut wie bei Zugabe von 10% FCS.

Keine der T-Zelllinien zeigte eine ungewöhnlich starke oder schwache Proliferation. Die geringe Proliferation der IE1-stimulierten T-Zelllinie des Spenders F60 war wahrscheinlich auch die ungenügende Proliferation der Stimulator-mLCL zurückzuführen. Daher standen zur Restimulation der T-Zellen oft nicht genügend Zellen zur Verfügung, so dass meist nur ein Effektor/Stimulator-Verhältnis von 1:6 statt 1:4 eingesetzt werden konnte. Meist waren die Proliferationsraten der T-Zelllinie eines Spenders aber ähnlich.

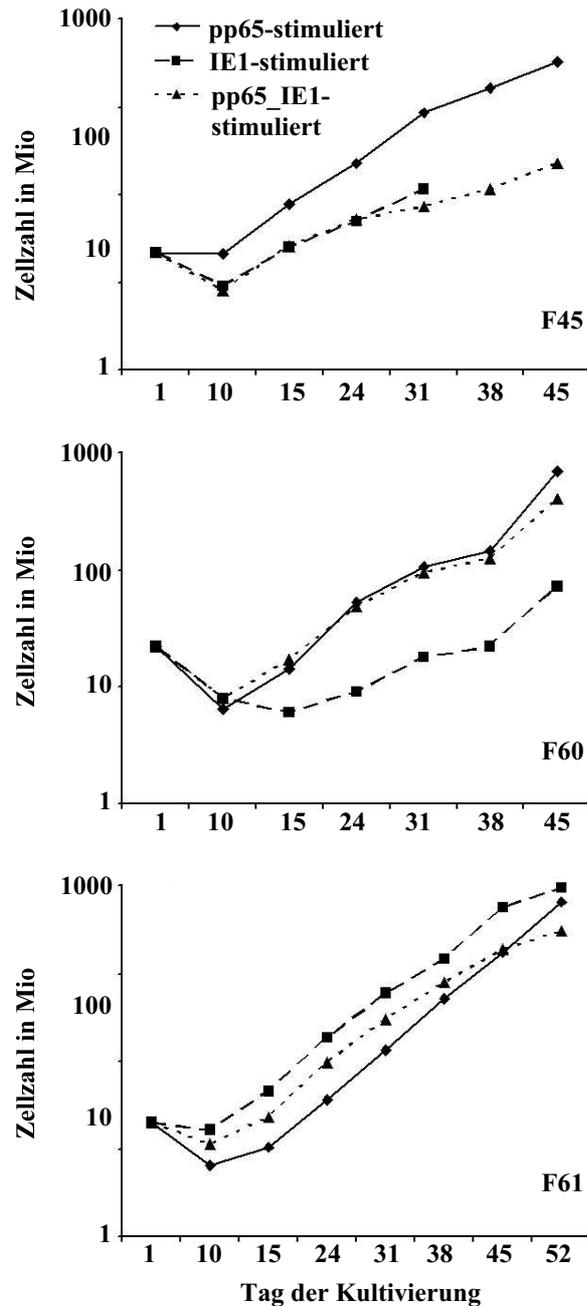


Abb. 3.31: Expansion unterschiedlich stimulierter T-Zelllinien der Spender F45, F60 und F61. Dem Kulturmedium wurde 5% Humanserum zugesetzt. Mit autologen, pp65-mLCL stimulierte T-Zelllinien sind mit durchgezogene Linien, mit IE1-mLCL stimulierte mit unterbrochene und mit pp65-IE1-stimulierte mit gepunktete Linien dargestellt.

3.5.2 Phänotypische Analyse der T-Zelllinien

Wie bereits beschrieben und in Abschnitt 3.2.2 gezeigt, dominieren CD8-positive T-Zellen bei Stimulation von PBMCs mit autologen pp65-mLCLs die generierten T-Zelllinien (Moosmann *et al.*, 2002). Hier sollte nun gezeigt werden, ob die Stimulation mit IE1 einen Einfluss auf das Verhältnis von CD8⁺ zu CD4⁺ T-Zellen hat. In Abbildung 3.32 sind exemplarisch für die Spender F61 und F45 die FACS-Analysen der jeweils drei generierten T-Zelllinien dargestellt.

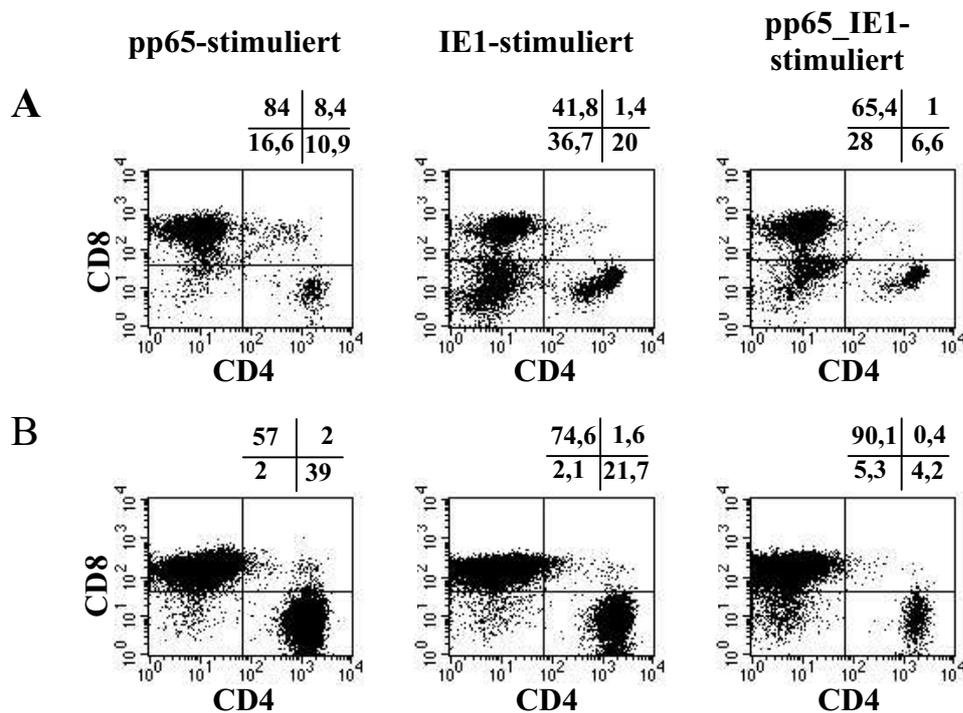


Abb. 3.32: Phänotypische Analysen der T-Zelllinien der Spender F45 (A) und F61 (B). Die Expression von CD4 und CD8 wurde an Tag 29 (F45) bzw. an Tag 37 (F61) untersucht. In allen Fällen dominierten CD8⁺ T-Zellen die Kulturen.

Bei allen Linien dominierten CD8⁺ T-Zellen. Bei Spender F45 kam es zu einer relativ starken Expansion CD4-positiver T-Zellen (20%) bei Verwendung IE1-exprimierender mLCLs zur Stimulation. Durch Stimulation mit pp65_IE1-mLCL kam es hingegen zu einer leichten Abnahme von CD4-positiven T-Zellen (6.6%) gegenüber der Verwendung der pp65-mLCL (10,9%). Bei Spender F61 konnten bei Stimulation mit pp65-mLCL 39% CD4-positiver T-Zellen detektiert werden. Durch Stimulation mit IE1 wurden 21,7% CD4-T-Zellen gefunden, bei Stimulation mit dem Fusionsprotein kam es zu einer noch drastischeren Abnahme CD4-positiver T-Zellen (4,2%). Es konnte keine einheitliche Tendenz bei Stimulation mit den

unterschiedlichen mLCLs erkannt werden. Bei den Spendern F46, F60 und F64 waren die Unterschiede im Verhältnis CD8-/CD4-positiver T-Zellen in den unterschiedlichen T-Zelllinien nicht so ausgeprägt (Daten nicht gezeigt). Die Kulturen waren in allen Fällen von CD8⁺-T-Zellen dominiert. Des Weiteren waren in allen Fällen CD4⁺ T-Zellen vorhanden und damit die Chance gegeben, auch Antigen-spezifische CD4-T-Zellen zu finden.

3.5.3 Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen

Um die Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen zu untersuchen, wurden zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung HLA/Peptid-Tetramer-Analysen der verschiedenen T-Zellkulturen durchgeführt. In Abbildung 3.33 sind die Ergebnisse für die T-Zelllinien aller Spender gezeigt, für die IE1-Tetramer verfügbar waren, also vier der insgesamt fünf Spender. T-Zelllinien der Spender, die mit pp65-mLCLs stimuliert worden waren, verhielten sich in Phänotyp und Funktion wie in Kapitel 3.2 beschrieben und werden hier nicht erläutert.

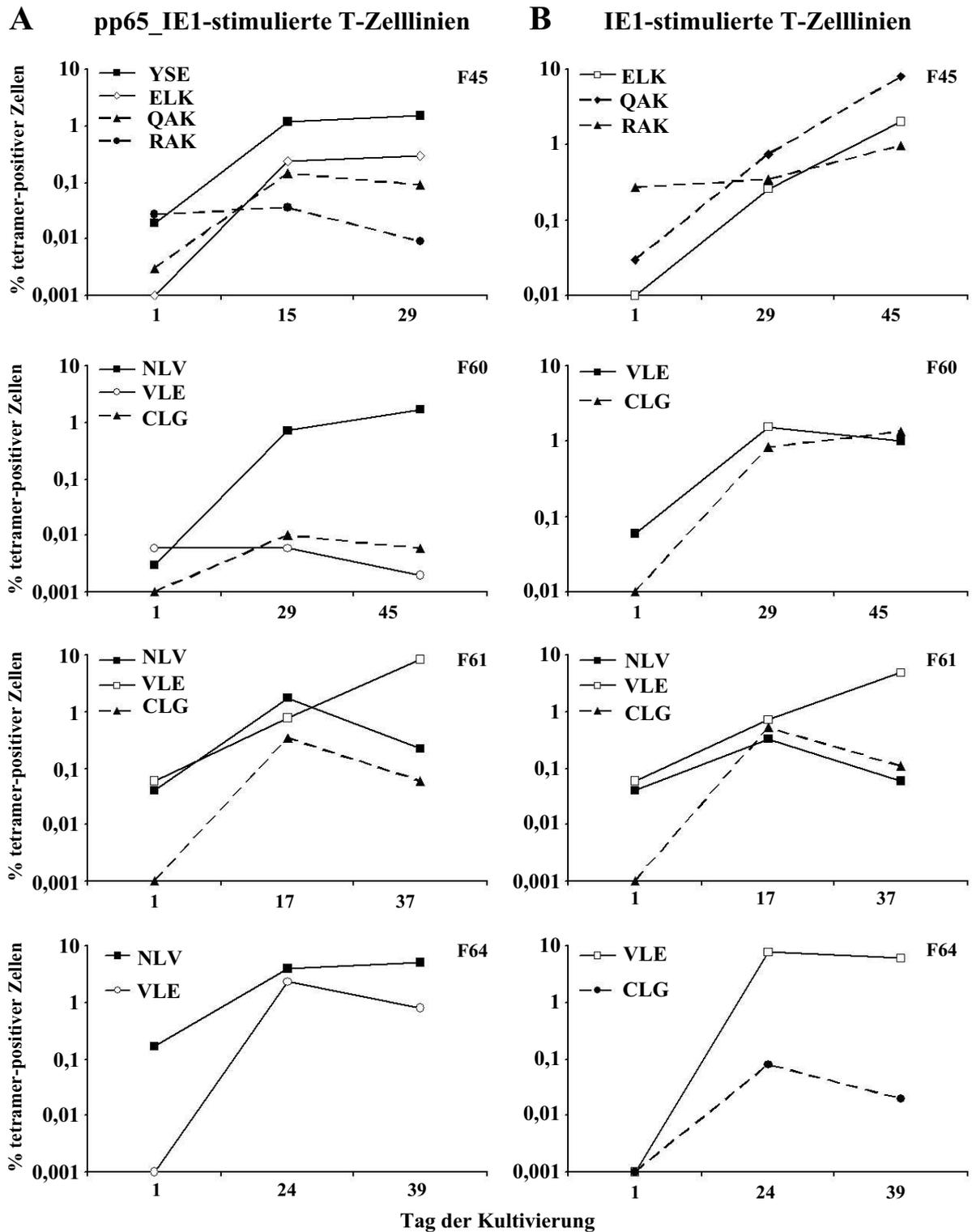


Abb. 3.33: Expansion Epitop-spezifischer T-Zellen. Der Anteil der T-Zellen die spezifisch für verschiedene Epitope von pp65-, IE1-, und latenten EBV-Antigenen sind, wurden durch HLA/Peptid-Tetramer-Färbung bestimmt. In (A) sind die Ergebnisse von pp65_IE1-stimulierten T-Zelllinien dargestellt, in (B) sind die Daten von IE1-stimulierten Linien gezeigt. CMV-pp65-Epitope sind durch durchgehende Linien und schwarze Symbole, CMV-IE1-Epitope durch durchgehende Linien und weiße Symbole und EBV-Epitope durch unterbrochene Linien mit schwarzen Symbolen gekennzeichnet. Daten für die IE1-stimulierte T-Zelllinie des Spenders F45 können nur bis Tag 29 angegeben werden, da vor der nächsten Analyse eine Kontamination der Kultur festgestellt wurde.

Bei allen untersuchten Spendern konnten IE1-Epitop-spezifische T-Zellen nachgewiesen werden. Bei Spender F61 dominierten nach 37 Tagen IE1-Epitop spezifische T-Zellen bei Stimulation mit pp65_IE1-mLCL. Bei den anderen drei Spendern war dagegen die häufigste nachweisbare Epitop-Spezifität gegen pp65 gerichtet. Die Expansion IE1-spezifischer, CD8⁺ T-Zellen wurde bei Stimulation mit der autologen pp65_IE1-mLCL bei Spender F60 unterdrückt. Bei allen anderen Spendern konnten beide Spezifitäten ko-expanded werden. Bei zwei von drei HLA-A2-positiven Spendern konnten VLE-Epitop-spezifische T-Zellen expandiert werden, obwohl bisher beschrieben wurde, dass VLE-spezifische T-Zellen nur bei einer Minderheit der HLA-A2-positiven Spender gefunden werden kann (Khan *et al.*, 2002)

3.5.4 Antigen-spezifische IFN- γ -Produktion der T-Zelllinien

Die Tetramer-Analysen gaben einen ersten Aufschluss über die Zusammensetzung der generierten T-Zelllinien. Zur Untersuchung ihrer Effektorfunktionen wurde die Sekretion von IFN- γ mittels ELISA untersucht. Mit Hilfe des IFN- γ -ELISAs konnte die Spezifität und HLA-Restriktion der Linien untersucht werden und somit eine Aussage über deren Funktionalität getroffen werden. Als Stimulatoren wurden autologe und allogene, HLA-kompatible mLCLs verwendet, die entweder kein Fremdantigen, pp65, IE1 oder das Fusionsprotein pp65_IE1 exprimierten. Zusätzlich wurden Peptid-beladene autologe B-Blasten zur Stimulation eingesetzt. In Abbildung 3.34 sind exemplarisch die Ergebnisse einer Analyse der IE1-stimulierten T-Zelllinien der Spender F46 (3.34 A) und F64 (3.34 B) an Tag 38 gezeigt. Zur Stimulation der T-Zellen wurden, wie unter 2.6.12 beschrieben, immer 1×10^4 Stimulatorzellen eingesetzt. Pro Ansatz wurden immer 1×10^3 T-Zellen eingesetzt.

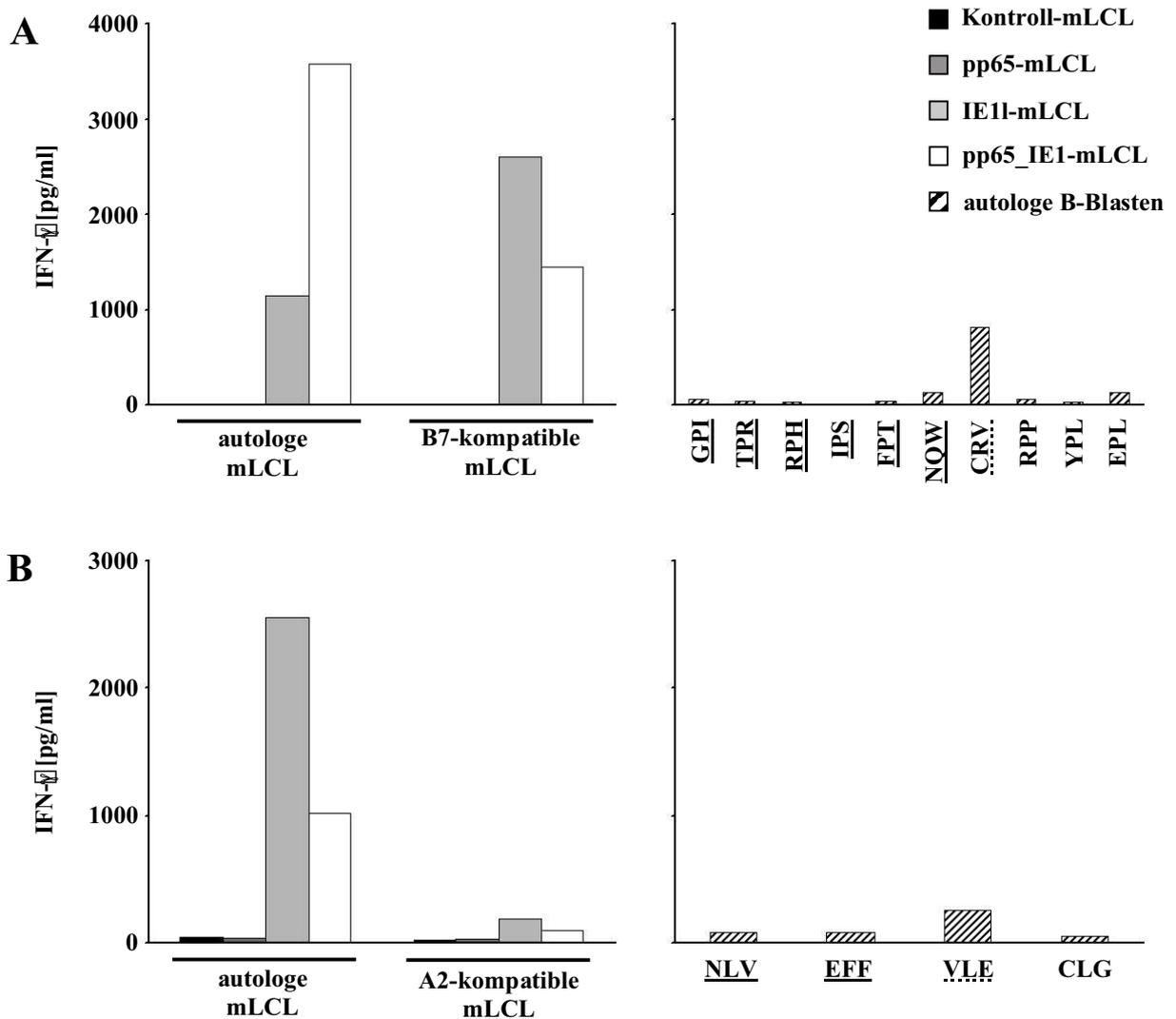


Abb. 3.34: IFN- γ -Produktion der IE1-stimulierten T-Zelllinien der Spender F46 (A) und F64 (B), nach Stimulation mit autologen und HLA-kompatiblen Antigen-präsentierenden Zellen. Gezeigt sind Analysen von Tag 38. pp65-Epitope sind mit einer durchgehenden, IE1-Epitope mit einer unterbrochenen Linie unterstrichen. Es standen nicht für alle HLA-Typen der Spender geeignete HLA-kompatible mLCLs zu Verfügung, es konnten deshalb nicht alle HLA-Restriktionen der Spender bestimmt werden.

Die IE1-stimulierten T-Zelllinien der beiden Spender zeigten nur dann eine starke spezifische Reaktivität gegen autologe mLCLs und allogene, HLA-B7- bzw. -A2-kompatible mLCLs, wenn diese IE1-exprimierten. Zusätzlich zeigte die T-Zelllinie des Spenders F46 Reaktivität gegen autologe B-Blasten, die mit dem HLA-B7-restringierten IE1-Peptid CRV (siehe 2.1.6) beladen worden waren. Die T-Zelllinie des Spenders F64 zeigte hingegen nur eine schwache Reaktivität gegen das HLA-A2-restringierte IE1-Peptid VLE. Bei diesem Spender dürften daher andere Epitope von größerer Bedeutung sein.

T-Zelllinien der gleichen Spender, die mit autologen, pp65_IE1-exprimierenden mLCLs stimuliert worden waren, wurden zum gleichen Zeitpunkt der Kultivierung auf die gleiche Weise untersucht. Die Ergebnisse für diese beiden Linien sind in Abbildung 3.35 gezeigt.

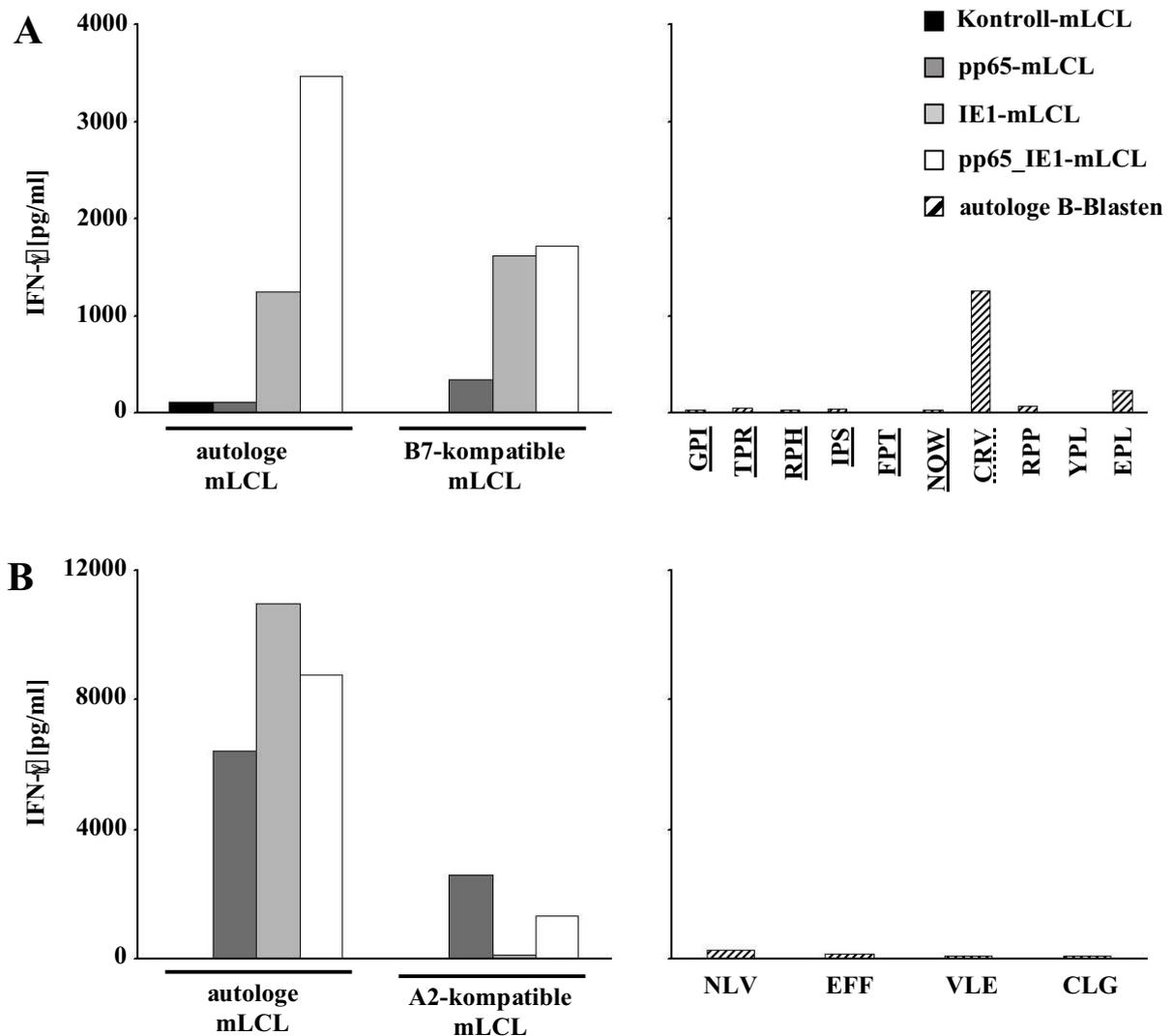


Abb. 3.35: IFN-̳-Produktion der der pp65_IE1-stimulierten T-Zelllinien der Spender F46 (A) und F64 (B). nach Stimulation mit autologen und HLA-kompatiblen Antigen-präsentierenden Zellen. Gezeigt sind Analysen von Tag 38. pp65-Epitope sind mit einer durchgehenden, IE1-Epitope mit einer unterbrochenen Linie unterstrichen.

Die mit pp65_IE1-exprimierenden mLCL generierte T-Zelllinie des Senders F46 zeigte eine starke Reaktivität vor allem gegen autologe bzw. und allogene, HLA-B7-kompatible mLCLs, die IE1-Epitope exprimierten. pp65-exprimierende mLCLs wurden nicht oder nur sehr schwach erkannt. Autologe B-Blasten, die mit bekannten pp65-Peptiden beladen worden

waren, wurden ebenfalls nicht erkannt. Dagegen zeigte die pp65_IE1-stimulierte Linie, wie auch die nur mit IE1-stimulierte Linie eine starke Reaktivität gegen das IE1-Peptid CRV (siehe auch Abb. 3.34). Leider stand für dieses Peptid kein Tetramer zur Verfügung, um die CRV-spezifischen T-Zellen mittels FACS-Analyse zu quantifizieren. Die T-Zelllinie des Spenders F64 zeigte Reaktivität gegen autologe mLCLs, die pp65 und/oder IE1 exprimierten. HLA-A2-kompatible mLCLs wurden nur erkannt, wenn sie pp65-positiv waren. Auch die T-Zelllinien aller anderen Spender zeigten eine Epitop-spezifische und HLA-restringierte Erkennung von Zellen (Daten nicht gezeigt). Die pp65_IE1-stimulierte T-Zelllinie des Spenders F61 zeigte nur Reaktivität gegenüber pp65-exprimierenden T-Zellen. Mittels FACS-Analyse konnte bei dieser Linie auch keine Expansion von IE1-Epitop-spezifischen T-Zellen beobachtet werden.

3.5.5 Zytotoxizitäts-Analysen der T-Zelllinien

Mittels TDA-Freisetzungsversuchen sollte, wie in Abschnitt 2.6.14 beschrieben, untersucht werden, ob die generierten T-Zelllinien in der Lage sind, Antigen-spezifisch Zellen zu erkennen und zu lysieren. Als Zielzellen wurden autologe mLCLs verwendet, die kein Fremdantigen oder pp65 und/oder IE1 exprimierten. Zur Bestimmung der Epitop-Spezifität wurden zusätzlich Peptid-beladene, autologe B-Blasten eingesetzt. Die Ergebnisse der Zytotoxizitäts-Analysen deckten sich in allen Fällen mit den Daten der IFN- γ -ELISAs. In Abbildung 3.36 sind exemplarisch die Ergebnisse für die T-Zelllinien des Spenders F64 an Tag 38 für das Effektor:Zielzell-Verhältnis = 4:1 dargestellt. Bei diesem Spender waren nach pp65_IE1-Stimulation sowohl spezifische IFN- γ -Sekretions-Aktivität als auch die spezifische zytotoxische Aktivität gegen beide CMV-Antigene deutlich ausgeprägt.

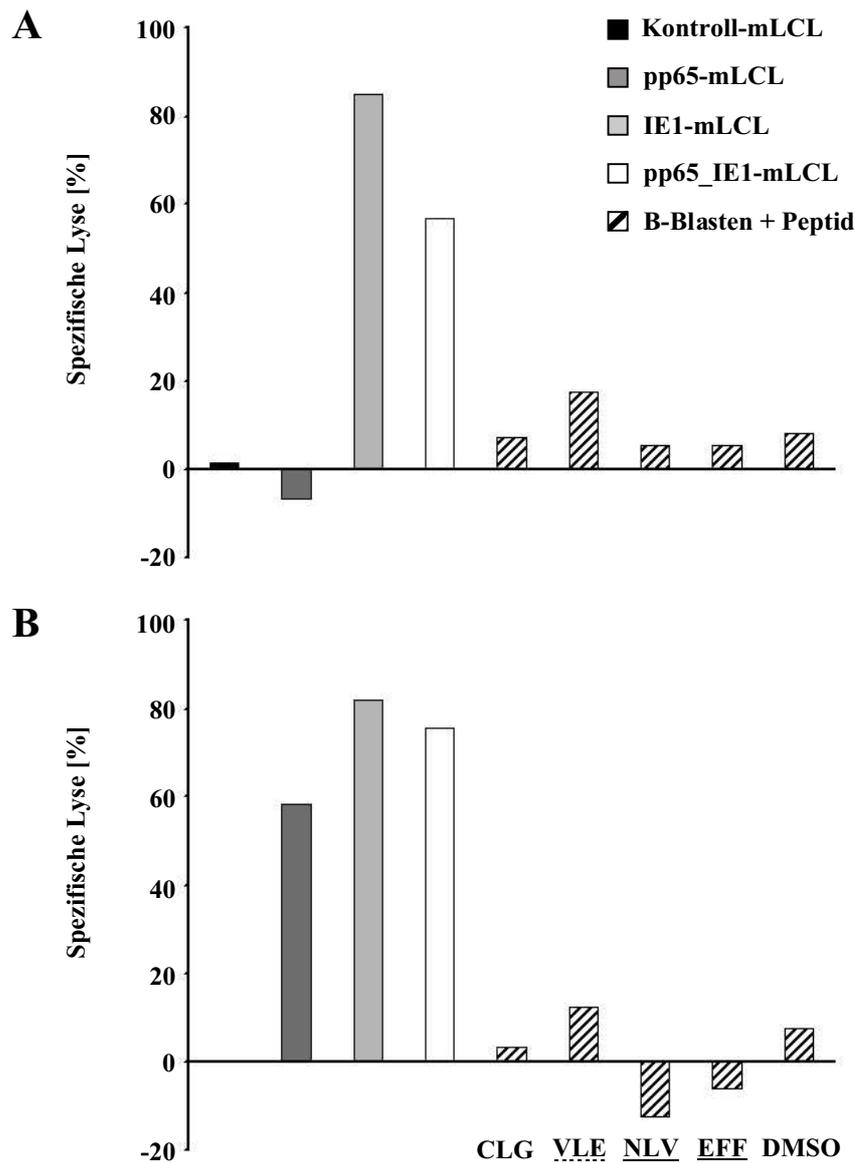


Abb. 3.36: Zytotoxische Reaktivität der T-Zelllinien des Spenders F64 gegen autologe mLCLs oder Peptid-beladene, autologe B-Blasten. In (A) sind die Daten für die IE1-stimulierte T-Zelllinie, in (B) die Daten für die pp65_IE1-stimulierte T-Zelllinie gezeigt. pp65-Epitope sind unterstrichen, IE1-Epitope mit einer unterbrochenen Linie unterstrichen.

Alle untersuchten Zelllinien zeigten eine starke, Antigen-spezifische zytotoxische Reaktivität gegen Zielzellen, die IE1 und/oder pp65 exprimierten. Die Lyse von Zielzellen, die nur EBV-Antigene exprimierten, war sehr schwach. Bereits bei einem niedrigen Effektor:Zielzell-Verhältnis von 4:1 konnten spezifische Lysen von 60-85% erreicht werden, die zytotoxische Aktivität war also hoch. Lyseexperimente mit B-Blasten und bekannten CMV-Epitopen

ergaben nur geringe Erkennung. Die Hauptaktivitäten dieser Zelllinien schienen sich also gegen weitere, eventuell noch unbekannte Epitope zu richten.

3.5.6 Einzelzellklonierung der pp65_IE1-stimulierten T-Zelllinien

In den vorherigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von PBMCs mit autologen pp65_IE1-exprimierenden mLCLs in fast allen Fällen zur Expansion von T-Zelllinien führte, die Epitope aus beiden Proteinen erkannten. mLCLs, die das Fusionsprotein exprimieren, eignen sich demnach sehr gut für die Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus CMV-positiven Spendern. Formale Einzelzellklonierungen sollten nun Aufschluss über die nähere Zusammensetzung der so generierten T-Zelllinien bringen und Hinweise auf weitere Zielepitope der pp65- oder IE1-spezifischen T-Zell-Antwort liefern. Einzelzellklonierungen der pp65_IE1-stimulierten T-Zelllinien wurden, wie unter 2.6.8 beschrieben, an Tag 38 für die Spender F45 und F60 durchgeführt. Für Spender F61 wurde eine Einzelzellklonierung aus an Tag 45 kryokonservierten T-Zellkulturen durchgeführt. 15 Klone von Spender F60 und 49 Klone von Spender F45 wurden auf ihre Spezifität mittels IFN- γ -ELISA untersucht. Als Stimulatoren wurden autologe Kontroll-mLCLs, pp65-mLCLs, IE1-mLCLs oder pp65_IE1-mLCLs verwendet. Bei Spender F61 konnten nur 10 Klone expandiert werden, die ebenso auf ihre Antigen-spezifische Reaktivität mittels IFN- γ -ELISA untersucht wurden. Zusätzlich wurden die Klone auf die Expression von CD8 und CD4 getestet. Die Spezifität der einzelnen Klone ist in Tabelle 3.9 dargestellt.

Tab. 3.9: Klonale Analyse der pp65_IE1-stimulierten T-Zellkulturen

Spender	Antigen-Spezifität							
	CMV-IE1		CMV-pp65		EBV oder andere		nicht reaktiv	
	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4	CD8	CD4
F45	15	2	18	0	3	1	3	7
F60	2	0	6	0	2	3	0	2
F61	2	0	4	0	1	0	2	1

Der Großteil der T-Zellklone war CD8 positiv. Bei allen Spendern dominierten CMV-spezifische Klone, EBV-spezifische oder unreaktive Klone waren seltener. Zusätzlich können bei allen Spendern IE1-spezifische und pp65-spezifische CD8⁺-T-Zellklone, bei Spender F45 auch zwei CD4-positive, IE1-spezifische Klone expandiert werden. Obwohl bei diesem

Spender CMV-spezifische Klone deutlich dominierten, zeigten ca. 20% der Klone keine Antigen-spezifische IFN- γ -Sekretion. Nur wenige Klone des Spenders F60 konnten expandiert werden, wobei nur etwa die Hälfte der Klone eine CMV-spezifische Reaktivität zeigten. Bei allen Spendern waren unter den CMV-spezifischen T-Zellklonen mehr pp65-spezifische Klone zu finden.

Aus Mangel an HLA-kompatiblen, IE1- oder pp65_IE1-exprimierenden mLCLs wurden HLA-Restriktionen der einzelnen Klone zum Teil mittels Peptid-beladener autologer B-Blasten ermittelt. pp65-spezifische T-Zellklone, die keines der bekannten und verfügbaren Epitope erkannten, wurden, wie unter 3.2.8 beschrieben, mittels einer überlappenden pp65-Peptidbank untersucht. Für die IE1-spezifischen Klone wurde eine solche Peptidbank mit insgesamt 122 Peptiden hergestellt (Tab. 3.10). Zusätzlich wurden noch sieben weitere Peptide in diese Peptid-Bank aufgenommen, um Sequenzunterschiede zwischen einzelnen CMV-Stämmen abzudecken (hellgrau unterlegte Peptide am Ende der Tabelle).

Tab. 3.10: Liste der IE1-Peptide

1	MESSAKRKMDFDNP	34	LDKVHEPFEEEMKCIG	67	LTHIDHIFMDILTTC	100	SDSLVSPPEPVPAT
2	AKRKMDFDNPDEGFS	35	HEPFEEEMKCIGLTMQ	68	DHIFMDILTTCVETM	101	VSPPEPVPATIPLS
3	MDPNDPDEGPSSKVP	36	EEMKCIGLTMQSMYE	69	MDILTTCVETMCNEY	102	ESPVPATIPLSSVIV
4	NPDEGPSSKVPRPET	37	CIGLTMQSMYENYIV	70	TTCVETMCNEYKVTS	103	PATIPLSSVIVAENS
5	GPSSKVPRPETPVTK	38	TMQSMYENYIVPEDK	71	ETMCNEYKVTSDACM	104	PLSSVIVAENSQEE
6	KVPRPETPVTKATTF	39	MYENYIVPEDKREMW	72	NEYKVTSDACMMTMY	105	VIVAENSQEESEQS
7	PETPVTKATTFLOQM	40	YIVPEDKREMWMACI	73	VTSDACMMTMYGGIS	106	ENSQEESEQSDEEE
8	VTKATTFLOQMLTKE	41	EDKREMWMADIKELH	74	ACMMTMYGGISLLSE	107	QEESEQSDEEEEGA
9	TTFLQTMLRKEVNSQ	42	EMWMACIKELHDVSK	75	TMYGGISLLSEFCRV	108	EQSDEEEEGAQEER
10	QTMLRKEVNSQLSLG	43	ACIKELHDVSKGAAN	76	GISLLSEFCRVLSSY	109	EEEEEGAQEEREDTV
11	RKEVNSQLSLGDLPLF	44	ELHDVSKGAANKLGG	77	LSEFCRVLCYVLEE	110	EGAQEEREDTVSVKS
12	NSQLSLGDLPLFPELA	45	VSKGAANKLGGALQA	78	CRVLCYVLEETSVM	111	EEREDTVSKSEPVS
13	SLGDLPLFPELAEESL	46	AANKLGGALYAKARA	79	CCYVLEETSVM LAKR	112	DTVSVKSEPVS EIEE
14	PLFPELAEESLKTTFE	47	LGGALQAKARAKKDE	80	LEETSVM LAKRPLIT	113	VKSEPVS EIEEVAPE
15	ELAEESLKTTFEQVTE	48	LQAKARAKKDELRRK	81	SVMLAKRPLITKPEV	114	PVSEIEEVAPEEEED
16	ESLKTTFEQVTEDCNE	49	ARAKKDELRRKMMYM	82	AKRPLITKPRVISVM	115	IEEVAPEEEEDGAE
17	TFEQVTEDCNENPEK	50	KDELRRKMMYMCYRN	83	LITKPEVISVMKRRI	116	APEEEEDGAEPTAS
18	VTEDCNENPEKDVLA	51	RRKMMYMCYRNIEFF	84	PEVISVMKRRIEIEIC	117	EEDGAEPTASGGKS
19	CNENPEKDVLAELVK	52	MYMCYRNIEFFTKNS	85	SVMKRRIEIEICMKVF	118	AEEPTASGGKSTHPM
20	PEKDVLAELVKQIKV	53	YRNIEFFTKNSAFP	86	RRIEIEICMKVFAQYI	119	TASGGKSTHPMVTRS
21	VLAELVKQIKVVRVDM	54	EFFTKNSAFPKTNG	87	EICMKVFAQYILGAD	120	GKSTHPMVTRSKADQ
22	LVKQIKVVRVDMVRHR	55	KNSAFPKTNGCSQA	88	KVFAQYILGADPLRV	121	LKAKARAKKDELKRK
23	IKVVRVDMVRHRIKEH	56	FPKTTNGCSQAMAAL	89	QYILGADPLRVCSPS	122	ARAKKDELKRKMIYM
24	VDMVRHRIKEHMLKK	57	TNGCSQAMAALQNL	90	GADPLRVCSPSVDL	123	KDELKRKMIYMCYRN
25	RHRIKEHMLKKYTQT	58	SQAMAALQNLQPQSP	91	RLVCSPSVDLRAIA	124	KRKMIYMCYRNVEFF
26	KEHMLKKYTQTEEF	59	AALQNLQPQSPDEIM	92	SPSVDLRAIAEESD	125	LTEFCRVLCYILEE
27	LKKYTQTEEFKFTGAF	60	NLPQSPDEIMAYAQA	93	DDLRAIAEESDEEEA	126	CRVLCYILEETSVM
28	TYTEEFKFTGAFNMMG	61	CSPDEIMAYAQKIFK	94	AIAEESDEEEAIVAY	127	CCYILEETSVM LAKR
29	EKFTGAFNMMGGCLQ	62	EIMAYAQKIFKILDE	95	ESDEEEAIVAYTLAT	128	LEETSVM LAKRPLIT
30	GAFNMMGGCLQNALD	63	YAQKIFKILDEERDK	96	EEAIVAYTLATAGVS	129	ESDEEDAIAAYTLAT
31	MMGGCLQNALDILDK	64	IFKILKEERDKVLTH	97	VAYTLATAGVSSSDS		
32	CLQNALDILDKVHEP	65	LDEERDKVLTHIDHI	98	LATAGVSSSDSLVSP		
33	ALDILDKVHEPFEEEM	66	RDKVLTHIDHIFMDI	99	GVSSSDSLVSPPEP		

■ Nummer der Peptide

■ Zusätzliche Peptide, um Sequenzvarianten zwischen einzelnen CMV-Stämmen abzudecken

Diese 129 Peptide wurden, wie schon für pp65 beschrieben (Kern *et al.*, 2002), in Gruppen gemischt, so dass wieder jedes Peptid in genau zwei Gruppen vorlag (Abb. 3.37). Aufgrund der überschaubaren Anzahl von 129 Peptiden ergaben sich 23 Gruppen, sodass die Identifizierung der T-Zellepitope mit 23 Einzelreaktionen möglich war.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
13	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
14	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
15	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
16	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
17	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
18	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
19	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
20	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96
21	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108
22	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
23	121	122	123	124	125	126	127	128	129			

Abb. 3.37 Zusammensetzung der IE1-Peptid-Gruppen zur Identifizierung neuer T-Zell-Epitope. 129 Peptide (jedes 15 Aminosäuren lang; benachbarte Peptide besitzen einen gemeinsamen Überlappungsbereich von 11 Aminosäuren), die die gesamte Sequenz von IE1 abdecken, wurden in 23 Gruppen angeordnet (grau unterlegt).

Mit Hilfe der überlappenden Peptidbanken konnten sowohl für CD8-positive Klone des Spenders F45 als auch für Klone des Spenders F61 15-mer-Sequenzen identifiziert werden, die von den T-Zellklonen erkannt wurden, aber kein bisher bekanntes CMV-Epitop enthielten. Ein Klon des Spenders F45 erkannte die aus pp65 stammende Sequenz HVVCAHELVCSEMENT, ein anderer Klon das IE1-Peptid mit der Sequenz PETPVTKATTFlyTM. Jeweils ein Klon des Spenders F61 erkannte je zwei überlappende IE1-Peptide mit der Sequenz CRVLCCYVLEETSVM und CCYVLEETSVMlakr bzw. CCYVLEETSVMlakr und LEETSVMlakrPLIT. Für beide Klone konnte mittels HLA-kompatibler mLCLs gezeigt werden, dass sie HLA-B14 restringiert waren (Daten nicht gezeigt). In Tabelle 3.11 sind alle identifizierten Sequenzen angegeben. Zusätzlich sind alle Klone angegeben, deren Restriktion und Epitop-Spezifität durch Peptid-beladene, autologe B-Blasten oder HLA-kompatible mLCLs bestimmt werden konnte.

Tab. 3.11 HLA-Restriktionen und Epitop-Spezifitäten der pp65- und IE1-spezifischen CD8⁺-T-Zell-Klone

Spender	HLA-Restriktion	identifiziertes Epitop	Aminosäure-Position in pp65	Aminosäure-positon in IE1	Anzahl Epitop-spezifischer Klone	Referenz
F45	A1	YSEHPTFTSQY ^{a)}	363-373		14	Retiere 2000
	B8	QIKVRVDMV ^{a)}		88-96	10	Kern 1999
	n. b. ^{b)}	HHVCAHELVCSMENT	n. b. ^{b)}		1	diese Arbeit
	n. b. ^{b)}	PETPVTKATTFLQTM		n. b. ^{b)}	1	diese Arbeit
F60	A2	NLVPMVATV ^{a)}	495-503		3	Will 1996
	B7	TPRVTGGGAM ^{a)}	417-426		2	Weekes 1999
F61	B14	(CRVL)CCYVLEETSVM(LAKR) ^{c)}		n. b. ^{b)}	1	diese Arbeit
	B14	(CCYV)LEETSVM(LAKR)(PLIT) ^{c)}		n. b. ^{b)}	1	diese Arbeit

a) mittels autologer, Peptid-beladener B-Blasten oder HLA-kompatibler mLCLs ermittelt

b) HLA-Restriktion konnte nicht mittels HLA-kompatibler mLCLs bestimmt werden

c) zwei benachbarte 15-mer Peptide mit einem Überlappungsbereich von 11 Aminosäuren wurden erkannt

Das HLA-A2-restringierte IE1-Epitop VLEETSVM(LAKR) liegt in den beiden 15-mer-Sequenzen, die von den HLA-B14-restringierten Klonen des Spenders F61 erkannt werden. VLE-beladene, autologe B-Blasten wurden aber nicht von den beiden Klonen erkannt. Durch Synthetisierung unterschiedlicher 9-mer-Sequenzen, die innerhalb des jeweiligen Überlappungsbereiches liegen, könnten somit zwei neue HLA-B14-restringierte IE1-Epitope gefunden werden. Durch Anlegen einer größeren, mehrere HLA-Typen umfassenden IE1-mLCL-Bank oder durch Peptidbeladung von existierenden Kontroll-mLCLs oder B-Blasten anderer Spender, könnte die HLA-Restriktion der beiden Klone des Spenders F45 bestimmt werden und durch Synthese neuer Peptide ein weiteres IE1-Epitop und ein neues pp65-Epitop identifiziert werden.

4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Herstellung und eingehende Analyse von Cytomegalovirus-(CMV)-spezifischen T-Zellen, welche durch Stimulation von frisch isolierten PBMCs mit autologen, antigenpräsentierenden mini-LCL (mLCL) generiert worden waren. Des Weiteren wurde der Einfluss von Zytokinen und Antikörpern auf die T-Zellentwicklung innerhalb dieses Systems und die Auswirkung der Verwendung allogener, HLA-kompatibler mLCLs als Stimulatoren untersucht.

mLCLs sind aktivierte B-Zelllinien, die stabil mit Virus-analogen Genvektoren infiziert wurden, die ein rekombinantes mini-EBV-(mEBV)-Genom enthielten (Kempkes *et al.*, 1995). Die latente Infektion mit EBV oder mEBV ist gekennzeichnet durch eine stabile und episomale Aufrechterhaltung der Virus- oder Vektorgenome. Das mEBV-Plasmid enthält alle für die 11 latenten Gene kodierenden Abschnitte des EBV-Genoms, die für die latente und lytische DNA-Replikation notwendigen Elemente *oriP* und *oriLyt*, und die zur Verpackung nötigen „*terminal repeats*“ (TR). Insgesamt enthält das mEBV 41% der Sequenz des EBV-Genoms. Mittels „*chromosomal building*“-Technik (O'Connor *et al.*, 1989) können Fremdantigene in das mEBV-Plasmid eingeführt werden, die dann von den mLCLs exprimiert werden. Als CMV-Antigene wurden mEBV-Vektoren mit dem Phosphoprotein pp65, dem „*immediate early*“-Protein IE1 oder dem Fusionsprotein pp65_IE1 für die Aufgabenstellung neu konstruiert bzw. zum Vergleich (pp65) (Moosmann *et al.*, 2002) eingesetzt.

Alle T-Zelllinien wurden unter anderem auf ihre Reaktivität gegenüber autologen und allogenen mLCLs und autologen, Peptid-beladenen B-Blasten untersucht. Aus der Verwendung von B-Blasten ergab sich ein wichtiger Teilaspekt dieser Arbeit, der hier zuerst diskutiert werden soll. CD40-aktivierte B-Blasten sind bekannt als potente Antigen-präsentierende Zellen, die zur Stimulation von Virus- oder Tumor-spezifischen T-Zellen eingesetzt werden können (Lapointe *et al.*, 2003; Schultze *et al.*, 1997; von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2002). Bisher konnten B-Blasten höchstens bis zu 10 Wochen kultiviert werden. Hauptprobleme waren oft das Absterben der Kulturen nach wenigen Wochen aus unbekanntem Gründen oder die Durchseuchung der B-Blastenkulturen mit endogenem Wildtyp-EBV (Banchereau *et al.*, 1991; Schultze *et al.*, 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei einem von fünf Spendern ebenfalls eine Kontamination mit endogenem Wildtyp-

EBV nach sechs Wochen beobachtet werden, wenn anfänglich große Zellzahlen eingesetzt wurden (2×10^6 pro Kulturgefäß) (Schultze *et al.*, 1997). Ein Absterben der Kulturen konnte allerdings nie beobachtet werden. O’Nions und Allday haben kürzlich beschrieben, dass CD40-stimulierte B-Blasten nicht absterben, sondern einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase unterliegen. In ihren Experimenten besaßen diese Zellen nur in einem Zeitraum von 7-14 Tage nach der ersten Stimulation den Phänotyp von B-Blasten. Danach schienen sie zu Plasmazellen auszudifferenzieren und B-Blasten konnten nur für einen Zeitraum von 3-4 Wochen in Kultur gehalten werden.

Unter Verwendung kleinerer Anfangszellzahlen (5×10^4 PBMCs pro Ansatz) und ohne vorherige Separation konnten CD40L-stimulierte B-Blasten im Rahmen dieser Arbeit bis zu 800 Tagen kultiviert werden (Abb. 3.2). Die B-Blasten waren über den gesamten Zeitraum hinweg frei von endogenem Wildtyp-EBV der Spender (Abb. 3.1). Sowohl aus EBV-negativen als auch EBV-positiven Normalspendern konnten EBV-freie B-Blastenlinien generiert werden, was die Möglichkeiten dieses Ansatzes gut dokumentiert. Normalerweise können humane Zellen *in vitro* - mit Ausnahme von embryonalen Stammzellen - nur eine begrenzte Anzahl von Teilungen durchleben. Dieses Phänomen der replikativen Seneszenz wurde häufig als Modell für das Altern von Zellen *in vivo* herangezogen (Goldstein, 1990; Hayflick *et al.*, 1961). Bei jeder Teilung der Zelle verkürzen sich die Telomere der Chromosomen um 50 bis 100 Basenpaare (Harley *et al.*, 1995; Huffman *et al.*, 2000). Telomere sind spezielle Strukturen am Ende eukaryotischer Chromosomen, bestehend aus Proteinen und einer simplen, sich wiederholenden DNA-Sequenz, die evolutionär hoch konserviert ist (Moyzis *et al.*, 1988; Zakian, 1989). Beim Menschen werden 5-15 kb bestehend aus TTAGGG-Wiederholungen am Ende jedes Chromosoms gefunden (Allshire *et al.*, 1988; Brown, 1989; Cross *et al.*, 1989; de Lange *et al.*, 1990). Telomere werden durch das Ribonukleoprotein Telomerase verlängert, das die repetitiven Telomere-Sequenzen *de novo* anhängt (Greider *et al.*, 1985; Greider *et al.*, 1987). Damit wird gewährleistet, dass das gesamte Chromosom bis zum Ende repliziert wird. Darüber hinaus schützen die Telomere die Enden der Chromosomen vor illegitimer Rekombination (Blackburn, 1991; Zakian, 1989). Die Verkürzung der Telomere führt zu proliferativer Seneszenz und Apoptose (Stewart *et al.*, 2000).

Durch transformierende Viren wie z.B. EBV können einige Zellen dieses Phänomen der Seneszenz überwinden. Dabei wird nur ein sehr kleiner Teil der transformierten Zellen

immortalisiert (Sack, 1981). In EBV-transformierten B-Zellen ist zunächst eine Abnahme der Telomerlänge zu beobachten (Counter *et al.*, 1992). Die Induktion einer hohen Telomerase-Aktivität, und damit die Stabilisierung der Telomere, scheint eine Voraussetzung für die Immortalisierung EBV-transformierter B-Zellen zu sein (Counter *et al.*, 1994; Kataoka *et al.*, 1997; Tahara *et al.*, 1997). Mit der Immortalisierung geht eine hohe Telomerase-Aktivität und eine Änderung des Karyotyps einher (Kataoka *et al.*, 1997; Okubo *et al.*, 2001; Tahara *et al.*, 1997), was die genetische Instabilität unterstreicht, die zur permanenten Proliferation *in vitro* führen kann.

In dieser Arbeit konnte anhand von B-Blastenlinien der beiden Spender Len und Hai gezeigt werden, dass sich in Langzeitkulturen von B-Blasten ähnliche Vorgänge in den Zellen abspielten wie bei der Immortalisierung EBV-transformierter Zellen. Bei beiden Spendern konnte ein starker Anstieg der Telomerase-Aktivität gegenüber frisch isolierten PBMCs beobachtet werden (Abb. 3.3). Bei der B-Blastenlinie des Spenders Hai blieb diese Aktivität über den Zeitraum der Kultivierung stabil, wohingegen sie bei der Linie des Spenders Len zunächst absank, um danach wieder anzusteigen. In beiden Fällen korrelierte die Telomerase-Aktivität mit der Telomerlänge (Abb. 3.4; gezeigt für Spender Hai).

Wie oben bereits erwähnt, gehen mit der Immortalisierung EBV-transformierter Zellen eine hohe Telomerase-Aktivität und eine Änderung des Karyotyps einher (Kataoka *et al.*, 1997; Okubo *et al.*, 2001; Tahara *et al.*, 1997). Tabelle 3.1 zeigt die Karyotypen der beiden untersuchten B-Zelllinien. Beide Linien zeigten zu späten Zeitpunkten der Kultivierung ebenfalls einen für die jeweilige Linie charakteristischen, einheitlichen, abnormalen Karyotyp in den Metaphasen aller untersuchten Zellen. Das Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass die immortalisierten Zelllinien letztlich monoklonal waren. Die Zelllinie des Spenders Len wurde zu mehreren Zeitpunkten getestet. Alle untersuchten Zellen zeigten an Tag 110 noch einen normalen Chromosomensatz, jedoch an Tag 295 die beschriebene Mutation. Folglich muss zwischen Tag 110 und 295 eine massive Selektion von Zellen mit dieser Translokation stattgefunden haben. Es ist möglich, dass die *in vitro*-Kultur solche Zellen selektionierte, die bereits *in vivo* diese Mutation trugen. Eine Alternative wäre die Selektion einer oder mehrerer Zellen, die im Laufe der Kultivierung diese Mutation erworben haben. Die Translokation t(14;18)(q32;q22) ist im allgemeinen schwer zu unterscheiden von der Translokation t(14;18)(q32;q21), welche als Marker für das folliculäre Lymphom gilt (Bordeleau *et al.*, 2000; Knutsen *et al.*, 1991), aber auch bei gesunden Menschen gefunden werden kann

(Limpens *et al.*, 1991; Wendtner *et al.*, 2003). Die Translokation findet man bei 80-95% der follikulären und bei 12-38% der diffus-großzelligen B-Zell-Lymphome (Kramer *et al.*, 1996; Weiss *et al.*, 1987). Bei dieser Translokation gerät das Gen *bcl-2* (B-cell-lymphoma-2) unter die Transkriptionskontrolle des IgH-Lokus, was zu einer verstärkten Expression des anti-apoptotischen Bcl-2-Proteins führt (Korsmeyer, 1999; Tsujimoto *et al.*, 1985). Eventuell hat die Translokation in der B-Zelllinie des Spenders Len ähnliche Auswirkungen. Ein Vergleich der Bcl-2-Expression dieser B-Zelllinie mit einer anderen B-Zelllinie, die diese Translokation nicht besitzt, könnte Aufschluss darüber geben.

Für die weitere Verwendung von B-Blasten zur Stimulation von T-Zellen bzw. als Zielzellen in T-Zell-Assays war es zudem wichtig zu wissen, ob die Zellen auch über einen längeren Zeitraum alle nötigen Oberflächenmoleküle exprimierten (Abb. 3.4 und 3.5). T-Zellen erkennen Peptidfragmente von Proteinen des Erregers, die als Komplexe aus Peptid und MHC-Molekül an der Oberfläche der Antigen-präsentierenden Zelle vorliegen, wobei MHC-Klasse-I-Peptidkomplexe von CD8⁺-T-Zellen und MHC-Klasse-II-Peptidkomplexe von CD4⁺-T-Zellen erkannt werden. CD54, auch ICAM-1 genannt, gehört zu den interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs) und bindet an das T-Zell-Integrin LFA-1 (lymphocyte function-associated Antigen-1) (Hogg *et al.*, 1993). Man nimmt an, dass dies das wichtigste Adhäsionsmolekül für die Lymphozytenaktivierung ist, da Antikörper gegen LFA-1 sowohl die Aktivierung naiver T-Zellen als auch die der cytotoxischen Effektorzellen effektiv hemmen (Hogg *et al.*, 1993). Die am besten charakterisierten kostimulatorischen Moleküle auf Antigen-präsentierenden Zellen sind die strukturverwandten Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) (Azuma *et al.*, 1993; Freeman *et al.*, 1991). Sie sind homodimere Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie und interagieren mit CD28 auf naiven T-Zellen bzw. mit CTLA-4 auf aktivierten T-Zellen (Sharpe, 1995; Tivol *et al.*, 1995; Waterhouse *et al.*, 1995). Die Expression dieser wichtigen Oberflächenmoleküle auf B-Blasten wurde mit der auf LCLs oder mLCLs verglichen. Auf allen untersuchten Zellen konnte eine starke Expression der MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle detektiert werden. Auf allen untersuchten Zelllinien konnte auch Expression von CD54, CD80 und CD86 nachgewiesen werden. Die Zelllinien hatten ein ähnliches Expressionsniveau für alle untersuchten Marker.

Im Gegensatz zu LCLs und mLCLs konnte auf B-Blasten keine Expression von CD21 nachgewiesen werden. Die hauptsächliche Funktion des Komplementrezeptors II (CR2/CD21) ist die Bindung des C3d-Fragments des Komplementsystems auf

Immunkomplexen (Carroll, 1998). Daneben ist aber auch bekannt, dass er der wichtigste Ligand für die Adsorption von EBV-Virionen darstellt (Klein *et al.*, 1978; Nemerow *et al.*, 1989; Tanner *et al.*, 1987) und in die B-Zell-Aktivierung, -Proliferation und -Differenzierung involviert ist (Ahearn *et al.*, 1989; Fearon, 1993). Das Fehlen dieses Oberflächenmoleküls schien aber auf die Fähigkeit der B-Blasten als Stimulatoren keinen Einfluss zu haben (eigene Ergebnisse und Lapointe *et al.*, 2003). Darüber hinaus ließen sich B-Blasten trotz des fehlenden Rezeptors mit EBV infizieren (Daten nicht gezeigt). Dies steht in Einklang mit früheren Beobachtungen (Banchereau *et al.*, 1991), die ebenfalls die Infizierbarkeit von B-Blasten mit EBV zeigten und deckt sich mit den Beobachtungen meiner Arbeitsgruppe, bei denen rekombinantes EBV eingesetzt wurde, das das CD21-bindende Glykoprotein nicht exprimiert (Neuhierl *et al.*, 2002). Allerdings konnten O’Nions und Allday B-Blasten zwar mit EBV-infizieren, aber eine Wachstumstransformation trat nicht auf, so dass die Zellen 7 Tage nach Infektion abstarben, obwohl sie weiter mit CD40L-Zellen kokultiviert wurden (O’Nions *et al.*, 2004). Die Expression von CD21 wurde im Rahmen dieser Veröffentlichung allerdings nicht untersucht und B-Blasten konnten, wie bereits erwähnt, in der publizierten Arbeit nur 3-4 Wochen kultiviert werden. O’Nions *et al.* verwendeten für ihre Versuche angereicherte B-Zellen aus Leukozytenkonzentraten, die aus mehreren Spendern gewonnen wurden. Zudem erfolgte die Kultivierung ohne Cyclosporin A, das das Wachstum von T-Zellen unterdrückt. Durch das in dieser Arbeit etablierte Protokoll war es möglich B-Blastenlinien von allen Spendern zu etablieren, die einen einheitlichen Phänotyp zeigten, der dem anderer aktivierter B-Zellen in fast allen Punkten entsprach.

Wie die Analyse der Oberflächenmarker zu vermuten liess, konnte gezeigt werden, eigneten sich B-Blasten gut als Zielzellen in Zytotoxizitäts-Assays oder zur Stimulation der Zytokinproduktion bei T-Zellen und zeigten in diesen Versuchen nur einen sehr geringen Hintergrund (Abb. 3.7). Zur Stimulierung CMV- und/oder EBV-spezifischer T-Zellen können B-Blasten mit einem oder mehreren Peptidpitopen beladen werden (Lapointe *et al.*, 2003; Schultze *et al.*, 1997; von Bergwelt-Baildon *et al.*, 2002). Diese Art der Stimulierung ist sehr effizient, beschränkt sich aber auf bekannte Epitope. Die Verwendung einer Peptidbank würde dieses Problem umgehen, ist aber sehr kostenintensiv. Auch können CD40-aktivierte B-Blasten mit einem retroviralen Vektor infiziert werden (Kondo *et al.*, 2002) oder mit CMV-Lysat oder -Protein beladen werden (Lapointe *et al.*, 2003). In allen Fällen schließt sich an die Generierung der B-Blasten ein weiterer Schritt an, um die Zellen zur T-Zellstimulation einsetzen zu können. Deswegen wurden B-Blasten, trotz ihrer hervorragenden Eigenschaften

als Antigen-präsentierende Zellen und ihrer Proliferationseigenschaften, im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Generierung von Virus-spezifischen T-Zelllinien eingesetzt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden autologe mLCLs zur Generierung CMV-spezifischer, zytotoxisch aktiver T-Zelllinien eingesetzt, die das Antigen von Interesse konstitutiv exprimierten. Diese mLCLs sind aktivierte B-Zelllinien, die stabil ein rekombinantes mEBV-Episom tragen. Dieser mEBV-Vektor sorgt sowohl für die Wachstumstransformation der B-Zellen als auch für die konstitutive Expression eines beliebig gewählten Modellantigens in der mLCL (Moosmann *et al.*, 2002). Die effiziente, routinemäßige Generierung autologer mLCLs, die frei von Wildtyp-EBV oder Helfer-Virus sind, basiert auf einem Verpackungssystem für EBV-Vektoren (Delecluse *et al.*, 1999). Die Zelllinie 293/TR-2 wurde durch stabile Transfektion von humanen Nierenzellen der Linie HEK293 mit einem EBV-Genom hergestellt, dem die zur Verpackung des Genoms in Viruspartikel nötigen „terminal repeats“ (TR) fehlen. Infektiose EBV-Partikel können erst gebildet werden, wenn die Zelle mit einem verpackbaren, also die TR enthaltenden EBV-Vektor, und einem Plasmid zur Überexpression des viralen Faktors BZLF-1 transfiziert wird. Daraufhin induziert BZLF-1 den lytischen Zyklus von EBV, das TR-negative EBV-Helfer-Genom liefert die genetischen Informationen zur Synthese der Kapsidproteine und sonstiger lytischer Faktoren, und die TR-positive EBV-Vektor-DNA - in diesem Fall der mEBV-Vektor - wird in die neu gebildeten Viruspartikel verpackt. Durch einen einzigen Infektionsschritt mit den mEBV-Partikeln erhält man wachstumstransformierte B-Zellen mit dem Phänotyp einer professionellen, Antigen-präsentierenden Zelle, die das gewünschte Fremdanigen präsentieren.

Als Fremdanigene wurden pp65 und IE1 des humanen CMV ausgewählt. Zytotoxische T-Zellantworten wurden zunächst gegen das Tegument-Protein pp65 festgestellt (Boppana *et al.*, 1996; Wills *et al.*, 1996), später aber auch gegen IE1 (Gyulai *et al.*, 2000; Kern *et al.*, 1999). Dass gerade diese beiden Proteine des Cytomegalovirus zu starken Reaktivitäten führen, kann mit der Tatsache erklärt werden, dass Peptide dieser Proteine relativ früh nach Infektion der Zelle über MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche der betroffenen Zellen präsentiert werden (Arrode *et al.*, 2000; Reusser *et al.*, 1991). Darüber hinaus können in gesunden Spendern eine große Anzahl CD4⁺-T-Zellen gefunden werden, deren Reaktivität sich gegen pp65 und IE1 richtet (Davignon *et al.*, 1995; Kern *et al.*, 1999; Vaz-Santiago *et al.*, 2001). Viele gesunde CMV-positive Spender zeigen in der Regel Reaktivität gegen beide Antigene (Gyulai *et al.*, 2000). Es scheint daher sinnvoll, Antigene aus verschiedenen Stadien

der Replikation des Virus für eine möglichst viele Spender umfassende Immuntherapie zu verwenden. Um eventuell vorhandene Reaktivitäten zu stimulieren, die gegen beide wichtigen CMV-Antigene gerichtet sind, wurde zusätzlich ein mEBV-Vektor konstruiert, der für ein pp65_IE1-Fusionskonsprotein kodiert.

CMV-Infektionen sind für viele Komplikationen und Todesfälle nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation und Organtransplantation oder bei HIV-Patienten verantwortlich (Boeckh *et al.*, 2003; Bueno *et al.*, 2002; Hibberd *et al.*, 1995; Komanduri *et al.*, 1998; Ljungman, 2002; MacGregor *et al.*, 1995). Obwohl neue antivirale Medikamente einen großen Fortschritt bei der Prävention oder Bekämpfung von Herpesvirus-Infektionen gebracht haben (Peggs *et al.*, 2004), bleibt die lang anhaltende Kontrolle persistierender Herpesviren von der Fähigkeit des Empfängers abhängig, eine adäquate Immunantwort gegen das jeweilige Pathogen auszubilden. Das Forschungsinteresse bei Ansätzen zum adoptiven Transfer CMV-spezifischer T-Zellen fokussierte sich bisher hauptsächlich auf CD8⁺ T-Zellen, da die ersten Studien gezeigt hatten, dass die Applikation dieser Zellen ausreichte für die Prävention CMV-assoziiierter Krankheiten kurz nach der Transplantation (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995). In klinischen Studien konnte aber gezeigt werden, dass für eine lang anhaltende Immunität gegenüber CMV die Applikation von CD8⁺ und CD4⁺ Antigen-spezifischen T-Zellen nötig ist (Einsele *et al.*, 2002b; Peggs *et al.*, 2003; Walter *et al.*, 1995).

Ein Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher auf der Untersuchung der Frage, ob durch Stimulation mit autologen mLCLs sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ CMV-spezifische T-Zellen expandiert werden können und wie die generierten T-Zellpopulationen zusammengesetzt sind. Dafür wurden zufällig gewählte EBV- und CMV-positive Spender mit unterschiedlichen HLA-Typen verwendet. Ausgeschlossen wurden Spender nur, wenn sie einen HLA-Typ besaßen, der es nicht erlaubte, Epitop-spezifische T-Zellen mit den vorhandenen Tetrameren oder Peptiden näher zu analysieren. Bei der Verwendung von pp65-, IE1- und pp65_IE1-mLCLs zur Stimulation dominierten in allen Fällen CD8⁺ T-Zellen deutlich über CD4⁺ T-Zellen (Abb. 3.32).

Im Falle von pp65-mLCL-stimulierten T-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass bei allen vier Spendern - mit Ausnahmen eines Epitops bei Spender F60 (TPR-Epitop) - alle untersuchten CMV-Epitop-Spezifitäten über den gesamten Zeitraum der Kultivierung mit HLA-Peptid-Tetrameren detektiert und expandiert werden konnten (Abb. 3.10). Bei Stimulation mit

autologen IE1-mLCLs konnten bei allen Spendern, soweit Tetramere zur Verfügung standen, IE1-spezifische T-Zellen detektiert werden (Abb. 3.33 B). Entsprechend konnten bei pp65_IE1-mLCL-stimulierten T-Zelllinien bei allen Spendern sowohl pp65- als auch IE1-Epitop-spezifische T-Zellen expandiert werden (Abb. 3.33 A). Drei von vier Zelllinien wurden von pp65-spezifischen, die T-Zelllinie des Spenders F61 von IE1-Epitop-spezifischen (VLE-Epitop) T-Zellen dominiert. Im Gegensatz dazu konnten EBV-Epitop-spezifische T-Zellen bei Stimulation mit pp65-mLCL und pp65_IE1-mLCL nur bei einem Teil der Spender expandiert werden. Mit Hilfe der HLA/Peptid-Tetramere kann wahrscheinlich nur ein kleiner Teil der *ex vivo* vorkommenden Spezifität abgefragt werden, so dass Aussagen über die Dominanz nur bei einzelnen Epitopen gemacht werden können. Daher kann die Analyse mittels HLA/Peptid-Tetrameren die Zusammensetzung der polyklonalen T-Zelllinien nur zum Teil beschreiben. Daher wurden zusätzliche Analysen durchgeführt, die nicht von der genauen Epitop-Spezifität abhängig sind, wie die unten diskutierten ELISA- und Zytotoxizitäts-Experimente.

Ein gezielter negativer Einfluss von pp65 auf die Prozessierung und Präsentation eines koexprimierten CMV-Antigens ist kontrovers diskutiert worden (Gilbert *et al.*, 1996; Kern *et al.*, 1999). Die Koexpansion pp65- und IE1-Epitop-spezifischer T-Zellen in drei von vier Fällen legt die Vermutung nahe, dass die zur Stimulation verwendeten mLCLs IE1 ebenso gut präsentierten wie pp65. Mit IE1-mLCL stimulierte Linien zeigten Reaktivität gegen autologe und HLA-kompatible mLCLs, wenn diese IE1 oder das Fusionskonstrukt pp65_IE1 exprimierten (Abb. 3.34 und 3.36 A). Das bedeutet, dass die Prozessierung und Präsentation von IE1-Peptiden in pp65_IE1-mLCLs durch die Expression des Fusionsproteins pp65_IE1 nicht in dem Maße verändert wird, dass deutliche Auswirkungen auf ihre Erkennung durch IE1-spezifische T-Zellen entstehen.

Mittels IFN- γ -ELISAs konnte gezeigt werden, dass alle generierten T-Zelllinien nur dann IFN- γ sezernierten, wenn die zur Stimulation eingesetzten Zellen CMV-Antigene exprimierten und die Zellen HLA-kompatibel waren (Abb. 3.11, 3.34 und 3.35). Dabei erkannten pp65-stimulierte mLCLs immer autologe und HLA-kompatible, pp65-exprimierende mLCLs und IE1-stimulierte ebensolche IE1-exprimierenden mLCLs. Bei der Stimulation mit autologen pp65_IE1-mLCLs erkannten die Linien in den meisten Fällen sowohl pp65- als auch IE1-exprimierende Zellen, mit Ausnahme der T-Zelllinie des Spenders F46, die nur IE1-exprimierende mLCLs (Abb. 3.35), und der T-Zelllinie des Spenders F60,

die nur pp65-exprimierende mLCLs (Daten nicht gezeigt) detektierte. Spender F46 scheint somit nur wenige pp65-spezifische Vorläuferzellen, Spender F60 nur sehr wenige IE1-spezifische Vorläuferzellen zu besitzen. Die Wahl des Fusionskonstrukts zur Stimulierung von T-Zellen, die gegen die beiden wichtigen Antigene von CMV gerichtet sind, scheint somit sinnvoll, da in drei von fünf Fällen T-Zellen beider Spezifitäten expandiert werden konnten. Außerdem schließt die Verwendung des Fusionskonstrukts auch Spender ein, die hauptsächlich Reaktivität gegen nur eines der beiden Epitope zeigen.

In TDA-Freisetzungsversuchen zeigten alle generierten T-Zelllinien entsprechend ihrer Spezifität eine starke HLA-restringierte Lyse (50-100%) von CMV-exprimierenden Zielzellen bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von 8:1 (Abb. 3.12 und 3.36). Kontroll-mLCLs oder HLA-inkompatible Zielzellen wurden weitaus schwächer lysiert (1-30%). Aussagen über Spezifität und HLA-Restriktionen der T-Zelllinien, die auf Grund der Daten aus IFN- γ -ELISA-Experimenten getroffen worden waren, konnten in allen Fällen durch die Daten der Zytotoxizitätsanalysen bestätigt werden. Sämtliche polyklonalen T-Zelllinien aller Spender zeigten eine Antigen-spezifische und HLA-restringierte Reaktivität. Für alle T-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass sie lytisch reaktiv gegen CMV-Antigen-exprimierende Zellen sind und diese Reaktivität einhergeht mit IFN- γ -Produktion.

Mittels HLA/Peptid-Tetrameren und Peptiden kann nur das Vorhandensein von bekannten CD8-Epitopen abgefragt werden. Höchstwahrscheinlich enthielten die Zellkulturen weitere CD8-Spezifitäten und eventuell auch CMV-spezifische CD4⁺ T-Zellen. Diese Spezifitäten und ihre relative Häufigkeit sollten ebenfalls ermittelt werden. Um die polyklonalen pp65- und pp65_IE1-mLCL stimulierten T-Zelllinien genauer zu analysieren, wurden von jeweils drei Linien Einzelzellklonierungen durchgeführt und alle proliferierenden Klone untersucht. Bei allen getesteten Linien war die Mehrheit der ausgewachsenen Klone CMV-spezifisch (Tab. 3.3 und 3.9). Die Klonierbarkeit einer Einzelzelle ist ein Hinweis auf ein gutes proliferatives Potential, da im Anschluss an eine bereits erfolgte polyklonale Expansion die Klone >10⁶fach expandiert werden konnten. Im Falle der Stimulation mit pp65- und pp65_IE1-mLCLs sind die meisten dieser langlebigen T-Zellen CMV-spezifisch. Die meisten der CMV-spezifischen T-Zellklone waren CD8-positiv, aber in drei Ansätzen konnten auch CD4⁺ T-Zellklone gefunden werden, die gegen pp65 oder IE1 reaktiv waren. Bei Stimulation mit pp65_IE1-mLCLs wurden meist mehr pp65-spezifische als IE1-spezifische Klone

gefunden. Nur bei der Linie des Spenders F45 war das Verhältnis pp65- und IE1-spezifischer Klone fast gleichwertig.

Die Verwendung von CMV-Antigen-exprimierenden mLCLs ermöglicht also die Stimulation von Antigen-spezifischen CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen. Somit präsentieren mLCLs CMV-Antigene sowohl über MHC-Klasse-I- als auch über MHC-Klasse-II-Moleküle. Der gängigen Meinung nach werden über MHC-Klasse-II-Moleküle internalisierte - also exogene - Antigene in endosomalen Kompartimenten fragmentiert und auf die MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. Neuere Analysen von MHC-Klasse-II-gebundenen Peptiden ergaben aber, dass ein großer Anteil der Peptide von endogenen Antigenen stammte (Rammensee *et al.*, 1999). Tewari und Kollegen fanden vor kurzem einen cytosolischen Abbauweg MHC-Klasse-II-restringierter Peptide, der Proteasom und TAP abhängig ist (Tewari *et al.*, 2005). Außerdem wurde kürzlich gezeigt, dass ein cytosolisches Modellantigen (Nimmerjahn *et al.*, 2003) und das EBV-Antigen EBNA1 (Paludan *et al.*, 2005) in LCLs über Autophagie in vesikuläre Kompartimente gelangen. Die Trennung zwischen Klasse-I- und -II-Präsentation ist also weniger scharf als ursprünglich angenommen. Ähnliche Mechanismen könnten bei mLCLs bei der Antigenpräsentation zum Tragen kommen.

Für Klone, die aus pp65-mLCL-stimulierten T-Zelllinien generiert worden waren, konnte mit Hilfe HLA-kompatibler mLCLs ihre HLA-Restriktion ermittelt werden (Abb. 3.14). Für pp65-spezifische CD8⁺ T-Zellklone konnten mindestens zwei unterschiedliche HLA-Restriktionen für jeden Spender gefunden werden. Beim Spender F46 konnten sowohl für HLA-Klasse-I als auch für HLA-Klasse-II jeweils drei verschiedene Restriktionen identifiziert werden. Für die Untersuchung der HLA-Restriktion der Klone, die aus pp65_IE1-mLCL-stimulierten T-Zelllinien generiert worden waren, stand nur eine begrenzte Zahl an HLA-kompatiblen IE1- und/oder pp65-IE1-exprimierender mLCLs zur Verfügung. Dennoch konnten einige HLA-Restriktionen anhand der Erkennung HLA-kompatibler mLCLs bestimmt werden, teilweise wurde die HLA-Restriktion-Analyse über die Erkennung autologer, Peptid-beladener B-Blasten ergänzt (Tab. 3.11). Durch die Stimulation mit pp65- und pp65_IE1-mLCLs werden somit T-Zelllinien generiert, die ein breites Spektrum an HLA-restringierten Epitopen erkennen. Es kann angenommen werden, dass ein Großteil der im Spender vorliegenden Diversität an pp65- bzw. IE1-spezifischen T-Zellen durch diese Methode *in vitro* expandiert werden kann, da zum einen T-Zellen mit einer Spezifität expandiert worden waren, die für den HLA-Typ nicht als dominant galt, zum anderen konnten

T-Zell-Spezifitäten nach mehreren Restimulationen detektiert werden, die bei frisch isolierten PBMCs auf Grund ihrer geringen Häufigkeit noch nicht detektiert werden konnten.

In dieser Arbeit konnten zwei neue CD8⁺ T-Zellepitope für pp65 identifiziert werden. Mit Hilfe einer überlappenden Peptidbank, die die gesamte Sequenz von pp65 abdeckt (Kern *et al.*, 2002), konnte das HLA-B14 restringierte Epitop RRRHRQDAL (Abb. 3.19) und das HLA-B3501-restringierte Epitop NQWKWPDVY (Abb. 3.17) gefunden werden. Das HLA-B14-restringierte Epitop ist das erste gefundene pp65-Epitop, das über diesen HLA-Typ präsentiert wird. Für das HLA-Allel B3501 wurde bisher das Nonamer IPSINVHHY als pp65-Epitop charakterisiert (Gavin *et al.*, 1993). Weitere Untersuchungen werden Aufschluss über die relative Immundominanz des neuen Epitops NQW geben. Darüber hinaus konnte ein neues CD4⁺-Epitop gefunden werden, und einige kürzlich gefundene pp65-Epitope konnten bestätigt werden (Tab. 3.5). Bemerkenswert ist, dass dominante Epitop-Spezifitäten innerhalb der klonierten T-Zellpopulation gefunden wurden, die in PBMCs *ex vivo* nicht detektiert werden konnten. Dies ist ein Indiz dafür, dass mittels mEBV-transformierter mLCLs auch T-Zellpopulationen mit geringen Vorläuferzahlen im Blut expandiert werden können. Darüber hinaus konnte mit einer überlappenden Peptidbank, die die gesamte Sequenz von IE1 abdeckt (Tab. 3.10), gezeigt werden, dass innerhalb der Sequenzen (CRVL)CCYVLEETSVM(LAKR) bzw. (CCYV)LEETSVM(LAK)(RPLIT) ein HLA-B14-restringiertes Epitop liegen muss (Tab. 3.11). Durch Klonierung mehrerer pp65_IE1-mLCL stimulierter Linien sollte es möglich sein, mit Hilfe der überlappenden Peptidbanken von pp65 und IE1 neue Epitope für beide Proteine zu bestimmen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass pp65-spezifische T-Zellklone auch in der Lage sind, CMV-infizierte Zellen zu erkennen (Abb. 3.20). Alle vier getesteten, HLA-B35-restringierten NQW-spezifischen Klone erkannten CMV- oder MVA-pp65-infizierte, HLA-B35-kompatible Fibroblasten und autologe, MVA-pp65-infizierte B-Zellen, nicht aber uninfizierte oder mit Kontroll-MVA-infizierte Zellen.

Die Stimulation mit pp65_IE1-mLCLs ist somit eine geeignete Methode, um ohne Klonierung, ohne Isolation bestimmter Subpopulationen, ohne Anwendung allogener oder autologer „feeder“-Zellen und ohne unspezifische Stimuli CMV-spezifische T-Zellen zu expandieren. Ohne Probleme werden Zellzahlen erreicht, die den Bedarf bei einer adoptiven T-Zell-Therapie decken würden. Bei der EBV-spezifischen T-Zelltherapie genügen zwei bis vier Gaben von $1-2 \times 10^7$ Zellen pro m² Körperoberfläche des Patienten für eine mehrere Monate anhaltende Immunrestauration (Heslop *et al.*, 1996 1998). IE1- oder pp65-

exprimierende mLCLs sind weniger gut für die Generierung einer möglichst umfassenden T-Zellantwort geeignet, da jeweils einer der hier untersuchten Spender keine Reaktivität gegen pp65 oder IE1 zeigte. Optimal scheint die Verwendung pp65_IE1-mLCLs zu sein, da vorhandene T-Zellen beider Spezifitäten reaktiviert und expandiert werden können. Die Expression als Fusionsprotein hat allem Anschein nach keinen Einfluss auf die effiziente Prozessierung und Präsentation der beiden Antigene.

CMV-spezifische T-Zellen für den adoptiven Transfer wurden bisher immer unter Verwendung autologer Antigen-präsentierender Zellen generiert (Einsele *et al.*, 2002b). Hier sollte getestet werden, ob durch Anlegen einer großen allogenen pp65-mLCL-Bank, die sehr viele HLA-Kombinationen umfasst, der Zeitraum, der zur Generierung CMV-spezifischer T-Zellen bisher benötigt wird, verkürzt werden kann. T-Zellen zweier Spender wurden mit pp65-mLCLs stimuliert, die in zwei oder mehr HLA-Klasse-I-Allelen übereinstimmten (Tab. 3.6). Allogen stimulierte T-Zelllinien proliferierten dabei viel stärker als autolog stimulierte T-Zelllinien (Abb. 3.21). Obwohl in allogenen stimulierten T-Zelllinien CMV-spezifische, CD8-positive T-Zellen mittels HLA/Peptid-Tetramer-Färbung detektiert wurden (Abb. 3.23), war ihre Anzahl und/oder Aktivität zu gering, um ihre Funktion im Lyseassay bestätigen zu können (Abb. 3.24). Die Lyse von pp65- und Kontroll-mLCLs des HLA-kompatiblen zur Stimulation eingesetzten Spenders war sehr stark, was auf eine dominierende Alloreaktivität innerhalb der zytotoxischen T-Zellen schließen lässt. Dies ist auf die hohe Dichte von Alloantigenen auf der Oberfläche der zur Stimulation eingesetzten allogenen mLCL zurückzuführen. Die Experimente zeigten dennoch, dass CMV-spezifische T-Zellen auch im allogenen Stimulationssystem expandiert werden können. Allerdings wird, wie zu erwarten war, ihre Expansion durch alloreaktive T-Zellen stark überlagert. Ein therapeutischer Einsatz wäre nur dann möglich, wenn eine Isolation der spezifischen T-Zellen und eine extrem gute Kontrolle der Abwesenheit alloreaktiver Zellen durchgeführt werden würde. Da dies sehr aufwendig ist, sind momentan autolog stimulierte T-Zellen für den adoptiven T-Zell-Transfer die bessere Option.

Nach wie vor stellt die Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus CMV-negativen Spendern ein großes Problem dar. Auch die Verwendung dendritischer Zellen (DCs) scheint dieses Problem nicht hinreichend zu lösen. DCs sind sehr potente Antigen-präsentierende Zellen (APCs). Sie sind in der Lage, sowohl naive T-Zellen zu primen, als auch eine starke sekundäre, MHC-Klasse-I-restringierte T-Zellantwort hervorzurufen (Brossart *et al.*, 1998;

Nestle *et al.*, 1998; Porgador *et al.*, 1995; Steinman, 1991). Kleihauer *et al.* (2001) benutzten mit NLV-Peptid-beladenen DCs zur Stimulierung autologer PBMCs, konnten aber nur bei zwei von elf CMV-negativen Spendern zytotoxische Reaktivität der expandierten Zellen gegen pp65 nachweisen. Szmania *et al.* (2001) beluden autologe DCs ebenfalls mit dem NLV-Peptid von pp65, führten aber zuvor noch eine Positivselektion HLA/Peptide-Tetramer-positiver Zellen durch. Nach drei bis vier Stimulationsrunden konnte aber auch so nur bei zwei von zehn CMV-negativen Spendern eine Zytotoxizität gegenüber pp65 festgestellt werden. Peggs *et al.* (2001) beluden autologe DCs mit CMV-Antigen, das aus CMV-infizierten humanen Lungenfibroblasten gewonnen wurde. Mit dieser Methode gelang es nicht, bei sechs untersuchten CMV-negativen Spender, eine pp65-spezifische Antwort zu generieren.

Ungeklärt ist bisher die Frage, ob mLCLs sich auch zur Primärstimulation von naiven T-Zellen eignen. LCLs scheinen prinzipiell zur Aktivierung einer primären MHC-restringierten, EBV-spezifischen T-Zell-Antwort fähig zu sein (Savoldo *et al.*, 2002b; Sun *et al.*, 1999a). Die mit Hilfe von LCLs aus EBV-negativen Spendern generierten T-Zelllinien wurden meist von zytotoxisch aktiven CD4⁺ T-Zellen dominiert, deren Reaktivität HLA-abhängig war. Mittels Selektion von CD25⁺ T-Zellen nach Stimulation mit autologen LCLs konnten Savoldo und Kollegen auch T-Zellkulturen aus EBV-seronegativen Spendern generieren, die von EBV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen dominiert wurden (Savoldo *et al.*, 2002a). Allerdings konnte bei diesen Spendern meist EBV-DNA nachgewiesen werden.

Vorversuche zur Stimulation von Virus-spezifischen T-Zelllinien aus EBV- und CMV-negativen Spendern mittels mLCLs führten ebenfalls zu CD4-dominierten T-Zellkulturen. Treffen naive T-Helferzellen (Th) das erste Mal auf ein Antigen, können sie entweder zu Th1 oder Th2 differenzieren. Die Avidität des T-Zell-Rezeptors (TCR) zum Antigen/MHC-Komplex, die kostimulatorischen Moleküle auf der Oberfläche der APC und das Zytokinmilieu entscheiden über die Entwicklung der Th-Vorläufer-Zellen (Glimcher *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2002; Murphy *et al.*, 2002). Beide Subpopulationen können durch ihre sekretierten Zytokine unterschieden werden (Mosmann *et al.*, 1986). Th1-Zellen produzieren IFN- γ , Interleukin-2 (IL-2) und Lymphotoxin- β (LT- β). Th2-Zellen hingegen produzieren IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13. Diese von Mosman *et al.* in der Maus gewonnen Erkenntnisse können auch auf den Menschen übertragen werden (Del Prete *et al.*, 1991). IL-12 wurde zwar als Produkt von EBV-transformierten B-Zellen entdeckt (Heufler *et al.*, 1996;

Kobayashi *et al.*, 1989 1990), jedoch sind andere APCs, wie z. B. Makrophagen oder DCs Hauptproduzenten von IL-12 (D'Andrea, 1992). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IL-12 die Differenzierung von Antigen-spezifischen T-Zellen Richtung Th1-Zellen unterstützt (Hsieh *et al.*, 1993; Macatonia *et al.*, 1995). IL-4 dagegen scheint das wichtigste Zytokin für die Entwicklung von Th-2-Zellen zu sein, denn IL-4- oder IL-4-Rezeptor-Knockout-Mäuse können keine Th2-Zellpopulation entwickeln (Kopf *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 1991; Noben-Trauth *et al.*, 1997). Zudem induziert IL-4 die Hochregulation von MHC-Klasse-II-Molekülen auf Antigen-präsentierenden B-Zellen (Nelms *et al.*, 1999). IL-10, auch CSIF (*Cytokine Synthesis Inhibiting Factor*) genannt, ist eines der wichtigsten immunmodulatorischen Zytokine (Moore *et al.*, 2001; Mosmann *et al.*, 1989) und wird von einer Vielzahl von Zellen sezerniert, unter anderen auch von Makrophagen, Th2- und B-Zellen. Seine Hauptfunktion ist die Unterdrückung der Zytokinproduktion von Makrophagen (McInnes *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 1995). Darüber hinaus inhibiert IL-10 die Synthese von IFN- γ und IL-1 β in Th1- und CD8⁺-Zellen und unterdrückt die IFN- γ oder IL-4-induzierte Antigenpräsentation über MHC-Klasse-II stark (Hashimoto *et al.*, 2001; Palma *et al.*, 2002).

Diese Faktoren könnten also einen Einfluss auf die T-Zellentwicklung bei Stimulation mit mLCLs haben. Es sollte nun untersucht werden, ob durch Zugabe von IL-12 oder durch Abfangen von IL-4 und IL-10 mit Antikörpern während der Stimulierung der T-Zellen die Entwicklung zu Gunsten von Th1-Zellen beeinflusst werden kann. Im Gegensatz zu T-Zellkulturen des EBV-positiven Spenders TW produzierten Kulturen des EBV-negativen Spenders AM mehr IL-2. IL-2 ist ein Effektorzytokin, das hauptsächlich von Th1-Zellen synthetisiert wird und für die Aktivierung naiver T-Zellen wichtig ist (Ben-Sasson *et al.*, 1990; Le Gros *et al.*, 1990; O'Garra, 1998). Die Produktion konnte durch Supplementierung des Mediums mit IL-12 soweit reduziert werden, dass die Mengen an produzierten IL-2 für beide Spender vergleichbar waren. Obwohl IL-2 traditionell als Th1-Zytokin charakterisiert wird, wird es von naiven T-Zellen exprimiert und ist für das „Primen“ von Th2-Zellen wichtig (Mowen und Glimcher, 2004). Der IL-2-Rezeptor besteht aus der IL-2-bindenden Untereinheit IL-2R β (CD25) und den signalvermittelnden Untereinheiten IL-2R α und γ . Die CD25-Untereinheit ist auch ein Marker für CD4⁺CD25⁺regulatorische T-Zellen (Treg) und IL-2 scheint eine Rolle bei der Entwicklung und Funktion dieser Klasse von T-Zellen zu spielen (Nelson, 2004). *In vitro* können CD4⁺CD25⁺ Tregs die Proliferation der T-Zellen nach Stimulation durch ihren TCR unterdrücken (Bluestone *et al.*, 2003). Ein Modell besagt, dass *in vivo* die Entwicklung zu Gunsten von Effektor-T-Zellen von der Stärke der Expression der

kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 und der Anwesenheit von inflammatorischen Molekülen, wie IL-12, abhängig ist (Bluestone *et al.*, 2003). Ein ähnlicher Mechanismus könnte in den autolog stimulierten T-Zelllinien des EBV-negativen Spenders eine Rolle spielen.

Die Zugabe von IL-12 hatte noch einen weiteren Effekt. IL-12 erhöhte deutlich die IFN- γ -Produktion, sowohl bei der T-Zelllinie des EBV-negativen als auch bei der des EBV-positiven T-Zell-Spenders. Es ist bekannt, dass IL-12 die Produktion verschiedener Zytokine, insbesondere die IFN- γ -Produktion, anregt (Curfs *et al.*, 1997). IFN- γ aktiviert den Stat1 Signalweg (Meraz *et al.*, 1996), was zur Expression des Th1-spezifischen Transkriptionsfaktors T-bet führt (Ho *et al.*, 2002). T-bet wiederum ist ein Transaktivator für IFN- γ und induziert die Expression der β 2-Untereinheit des IL-12-Rezeptors. Wie die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, hat die Zugabe von IL-12 einen starken Einfluss auf die Zytokinproduktion der Zelllinien innerhalb der ersten Tage.

Die Proliferation von T-Zellen des seropositiven Spenders (Wentworth *et al.*) blieb von der IL-12-Zugabe unbeeinflusst (Abb. 3.27). Wurden T-Zellen des EBV-negativen Spenders (AM) ohne Zugabe von IL-12 kultiviert, proliferierten sie ebenso wie die des EBV-positiven Spenders. Die Zugabe von IL-12 bewirkte allerdings eine drastische Proliferationsblockade zwischen Kultivierungstag 10 und 31. Beim EBV-negativen Spender wurden durch mLCLs somit hauptsächlich T-Zellen stimuliert, die sensitiv gegenüber IL-12 oder einem sekundären Produkt wie IFN- γ sind. Dies unterstützt die Vermutung, dass bei dem EBV-negativen Spender durch Stimulation mit Kontroll-mLCLs hauptsächlich Treg oder Th2-Zellen expandiert wurden.

Im Gegensatz zu T-Zelllinien des EBV-positiven Spenders zeigten T-Zelllinien des EBV-negativen Spenders eine relativ schwache Lyse autologer und HLA-kompatibler LCLs (Abb. 3.28). Durch Zugabe von IL-12 konnten die Lyse auf eine Effizienz von bis zu 90% gesteigert werden. In diesem Fall wurden jedoch auch autologe EBV-freie B-Blasten - wenn auch nicht so stark - lysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Erkennung zum großen Teil HLA-abhängig war (Abb. 3.29). Ein Teil der nicht reprimierbaren Reaktivität könnte auf die Anwesenheit eines Superantigens hindeuten. Superantigene sind immunstimulatorische und mit verschiedenen Krankheiten assoziierte Proteine bakteriellen oder viralen Ursprungs. Anders alsprozessierte Antigenpeptide binden Superantigene außerhalb der

Peptidbindungsfurche der MHC-Moleküle und interagieren mit der V α -Domäne des T-Zell-Rezeptors (TCR) (Li *et al.*, 1999; Papageorgiou *et al.*, 1997). Dies führt zur Stimulation eines großen Anteils der T-Zellpopulation (5-20%). Die Superantigen/TCR-Interaktion ist auf die V α -Domäne beschränkt. Daher sollten sowohl CD8- als auch CD4-T-Zellen stimuliert werden. Superantigene sind in einer Reihe von Krankheitsbildern involviert, wie z. B. toxisches Schocksyndrom, Lebensmittelvergiftung (Dinges *et al.*, 2000; McCormick *et al.*, 2000) und einigen Autoimmunkrankheiten (Renno *et al.*, 1996). Ihre Virulenz wird damit begründet, dass sie zum einen eine ungewöhnlich große Zahl von T-Zellen stimulieren und zum anderen zur massiven Ausschüttung pyrogener und proinflammatorischer Zytokine, wie IL-1, TNF α , TNF β und auch IL-2 führen. Sutkowski (2001) haben gezeigt, dass EBV das humane endogene Retrovirus HERV-K18 transaktiviert, welches für ein Superantigen codiert. Die Ausbildung von B-Gedächtniszellen ist ein T-Zell-abhängiger Prozess (Liu *et al.*, 1997). EBV macht sich also die Superantigen-stimulierten T-Zellen zunutze, um eine persistierende Infektion im B-Zell-Gedächtnispool zu etablieren. EBV zählt zu den onkogenen Viren und es gibt Hinweise, die belegen, dass Th-Zellen zur Pathogenese des Virus beitragen (Sutkowski *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten scheinen das Mitwirken eines Superantigens bei der Stimulierung naiver T-Zellen nahe zu legen. So proliferierten T-Zellen eines EBV-negativen Spenders bei Stimulation mit autologen mLCLs sehr stark und produzierten viel IL-2.

Aus diesen Experimenten lässt sich schließen, dass IL-12 oder funktionell ähnliche Zytokine, z. B. IFN- γ ein nützliches Hilfsmittel bei der T-Zellgenerierung mittels mLCLs sein könnten. Ob man mit diesen Hilfsmitteln EBV-Antigen-spezifische T-Zellen aus seronegativen Spendern mit hinreichender Spezifität ohne Alloreaktivität generieren kann, konnte nicht abschließend geklärt werden, wird aber Ziel zukünftiger Untersuchungen sein.

Die Restauration der antiviralen zellulären Immunantwort ist eine attraktive Alternative zur antiviralen Chemotherapie. Fortschritte in methodischen Entwicklungen und konzeptionelle Erkenntnisse haben in den letzten Jahren die Entwicklung einer Vielzahl von Ansätzen erlaubt, Antigen-spezifische T-Zellen zu generieren. Dabei werden z. B. Monozyten, DCs oder lymphoblastoide B-Zelllinien als APCs verwendet, die entweder exogen mit Peptiden oder Proteinen beladen werden, oder - nach Transduktion mit einem viralen Vektor - endogen Antigene präsentieren (Einsele *et al.*, 2004). Unter anderem werden auch CMV-infizierte Fibroblasten zur Generierung CD8⁺ und CD4⁺ positiver, CMV-spezifischer T-Zellen

verwendet (Riddell *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1995). Des Weiteren können auch durch die Verwendung von rekombinanten Viren Antigene in DCs oder CD40-B-Blasten eingebracht werden (Bonini *et al.*, 2001; Hamel *et al.*, 2002; Keever-Taylor *et al.*, 2001). Dazu werden APCs entweder mit einem retroviralen Vektor transfiziert oder mit Vaccinia- oder Adenoviren infiziert, die für das gewünschte Antigen kodieren. Ein großer Vorteil dieser Methoden ist, dass alle wichtigen Epitope auf verschiedenen MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Allerdings birgt die Verwendung von Vaccinia- oder Adenoviren die Gefahr, eine antivirale Immunantwort im Empfänger hervorzurufen, wenn dieser zuvor Kontakt mit diesen Viren hatte. Eine sichere Alternative ohne Verwendung infektiöser Viren ist das Beladen von APCs mit Peptiden. Die Kokultivierung von CMV-Peptid-beladenen DCs mit autologen PBMCs führte zur Stimulation von CD4⁺ und CD8⁺, CMV-spezifischen T-Zellen (Kleihauer *et al.*, 2001; Peggs *et al.*, 2002). Repetitive Restimulation mit Peptid-beladenen DCs führt zu Kulturen, die hauptsächlich aus CMV-spezifischen T-Zellen bestehen (>80%) (Bissinger *et al.*, 2002). Ein generelles Problem bei der Verwendung von LCLs und B-Zelllinien zur Generierung CMV-spezifischer T-Zellen ist ihre schlechte Transfizierbarkeit (Retiere *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 1999b). Außerdem stellt die Verwendung von replikationsfähigem EBV ein schwer abschätzbares Risiko bei adoptiven Transfer so generierter T-Zellen dar. Der Vorteil der Verwendung des mEBV-Systems ist offensichtlich. Es wird Zeit und Arbeitsaufwand gespart, da das mEBV-System Wachstumstransformation der B-Zellen und Einführung des Antigenexpressionsvektors in einem Schritt vereinigt. Es wird weder replikationsfähiges EBV noch ein zweites rekombinantes Virus benötigt. Zudem erlaubt die Verwendung von mLCLs die Expansion aller im Spender für das gewünschte Antigen vorhandenen Epitop-spezifischen T-Zellen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mLCLs ein großes Potential für die Generierung CMV-spezifischer T-Zellen sowohl aus seropositiven als auch aus seronegativen Spendern besitzen. Durch die Verwendung von pp65_IE1-mLCLs werden zwei wichtige CMV-Antigene abgedeckt. Zudem sind mLCLs leicht zu generieren. T-Zellen, die mittels autologer mLCLs generiert wurden, zeigten eine starke CMV-spezifische und HLA-restringierte Reaktivität. Nach den Erfahrungen bei Gabe von EBV-spezifischen T-Zellen nach allogener Stammzelltransplantation (Haque *et al.*, 1998; Heslop *et al.*, 1996; Khanna *et al.*, 1999; Rooney *et al.*, 1998), sollte der Einsatz derart generierter CMV-spezifischer T-Zellen zur Prophylaxe und Therapie von CMV-assoziierten Krankheiten möglich sein. Die Spezifität und mögliche Alloreaktivität der generierten T-Zellen wurde *ex vivo* bestimmt, aber

erst in einer klinischen Studie kann letztlich die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit der generierten und transferierten CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen getestet werden. Obwohl die Verwendung von mLCLs erhebliche Sicherheitsvorteile insbesondere gegenüber LCLs hat, können weitere Verbesserungen des Systems seine Attraktivität erhöhen. Deswegen befasst sich ein weiteres Projekt mit der Optimierung der Verpackungszelllinie 293/TR-2, um ihr onkogenes Potential noch weiter zu minimieren. Auch die mEBV-Vektoren sind Ziel solcher Optimierungen. Mit der Möglichkeit der Ausschaltung sämtlicher onkogener Eigenschaften des Virus wird das EBV-System zunehmend für eine klinische Anwendung interessanter. Zurzeit werden zudem Stimulationsprotokolle getestet, um T-Zellen in geschlossenen Systemen in großem Maßstab zu generieren und damit das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

5 Zusammenfassung

Der fehlende Wiederaufbau einer Cytomegalovirus-(CMV)-spezifischen T-Zell-Antwort nach allogener Stammzelltransplantation führt zu einem erhöhten Risiko einer CMV-Erkrankung. Der adoptive Immuntransfer von CMV-spezifischen T-Zellen bietet hier eine vielversprechende Therapieoption. Entscheidend für eine effiziente Immuntherapie ist die gleichzeitige Gabe von CMV-spezifischen zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Helfer-Zellen, die gegen verschiedene Zielepitope und Zielantigene gerichtet sind. Benötigt wird daher ein Antigen-Präsentationssystem, das die Expansion einer Vielfalt spezifischer T-Zellen ermöglicht.

Aufgabe dieser Arbeit war die Herstellung und Untersuchung der Spezifität und Diversität von CMV-spezifischen T-Zellen, die mit Hilfe eines innovativen Antigen-Präsentationssystems hergestellt wurden: des mini-EBV-Systems. Das mini-EBV-System beruht auf rekombinanten Epstein-Barr-Virus-Vektoren (mini-EBVs), in die das Gen eines beliebigen Antigens eingebaut werden kann. Diese Vektoren führen zur Wachstumstransformation von B-Zellen zu sogenannten mini-LCLs (mini-lymphoblastoide Zelllinien), die das gewünschte Antigen exprimieren. Zudem sind mini-LCLs Virus-frei und daher im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz als besonders sicher anzusehen. Als die beiden wichtigsten CMV-Antigene wurden das Phosphoprotein pp65 und das „*immediate early*“-Protein IE1 beschrieben. Deren Gene wurden einzeln oder als Fusionskonstrukt pp65_IE1 in den mini-EBV-Vektor eingebaut. Mit diesen Vektoren konnten für alle untersuchten Spender mini-LCLs hergestellt werden, die die jeweiligen Antigene stabil exprimierten.

Die Stimulation von PBMCs mit den autologen CMV-Antigen-exprimierenden mLCLs ermöglichte die Generierung pp65-spezifischer T-Zellen bei vier von vier CMV-seropositiven Spendern bzw. IE1-spezifischer T-Zellen bei fünf von fünf Spendern. Sämtliche T-Zelllinien zeigten eine HLA-restringierte, CMV-spezifische Zytotoxizität und eine spezifische Produktion des Zytokins Interferon- γ . Nach Stimulation mit pp65_IE1-exprimierenden mini-LCLs konnten T-Zellen gegen beide Antigene bei fünf von fünf Spendern nachgewiesen werden. Durch Einzelzellklonierungen konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe von mini-LCLs sowohl CD8⁺ als auch CD4⁺ CMV-spezifische T-Zellen gegen pp65 und IE1 generiert werden können, die eine Vielzahl an Epitopen erkennen, die durch verschiedene HLA-

Moleküle präsentiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten zudem für pp65 zwei neue CD8-Epitope und ein neues CD4-Epitop identifiziert werden.

Als EBV-freie Zielzellen für verschiedene T-Zell-Analysen konnten von 25 von 25 Spendern durch Stimulation des CD40-Rezeptors stabile B-Zelllinien (B-Blasten) generiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass sich diese Zellen über einen sehr langen Zeitraum - bis zu 800 Tagen - kultivieren lassen, dabei Virus-frei bleiben und verschiedene Oberflächenmoleküle konstant exprimieren, die für die effiziente Antigen-Präsentation gegenüber T-Zellen essentiell sind. Solche stabilen B-Blastenlinien stellen daher eine neue Kategorie von Antigen-präsentierenden Zellen mit vielversprechenden Anwendungsmöglichkeiten dar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mini-LCLs die Generierung CMV-spezifischer T-Zellen umfassender Spezifität und Funktion ermöglichen. Der Einsatz des mini-EBV-Systems in der adoptiven Immuntherapie ist daher eine attraktive Option für die Zukunft.

6 Abkürzungen

amp	Ampicillin
APC	Antigen-präsentierende Zelle (<i>antigen presenting cell</i>)
BATDA	Bis (actoxymethyl) 2,2':6'2''-terpyridin-6,6''-dicarboxylat
bp	Basenpaare
ca.	zirka
cam	Chloramphenicol
CD...	<i>cluster of differentiation</i> (Oberflächenmarker)
CMV	Cytomegalovirus
CTL	zytotoxische T-Zelle (<i>cytotoxic T-lymphocyte</i>)
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EBNA	<i>Epstein-Barr nuclear antigen</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenzaktivierter Zellsortierer (<i>fluorescence-activated cell sorter</i>)
FCS	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
h	Stunde
HHV	humanes Herpesvirus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
IE	<i>immediate early</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LB	Luria-Bertani-Bakterienmedium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (<i>lymphoblastoid cell line</i>)
LMP	latentes Membranprotein
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
Mio	Millionen

NK	natürliche Killerzelle
PBMC	periphere mononukleäre Zellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
pp65	Phosphoprotein 65
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
tet	Tetracyclin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TR	<i>terminal repeats</i>

7 Literaturverzeichnis

Abbas, A. K., Murphy, K. M., und Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature* 383, 787-793.

Ahearn, J. M., und Fearon, D. T. (1989). Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv Immunol* 46, 183-219.

Allshire, R. C., Gosden, J. R., Cross, S. H., Cranston, G., Rout, D., Sugawara, N., Szostak, J. W., Fantes, P. A., und Hastie, N. D. (1988). Telomeric repeat from *T. thermophila* cross hybridizes with human telomeres. *Nature* 332, 656-659.

Allsopp, R. C., und Harley, C. B. (1995). Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 219, 130-136.

Alp, N. J., Allport, T. D., Van Zanten, J., Rodgers, B., Sissons, J. G., und Borysiewicz, L. K. (1991). Fine specificity of cellular immune responses in humans to human cytomegalovirus immediate-early 1 protein. *J Virol* 65, 4812-4820.

Appay, V., Zaunders, J. J., Papagno, L., Sutton, J., Jaramillo, A., Waters, A., Easterbrook, P., Grey, P., Smith, D., McMichael, A. J., Cooper, D. A., Rowland-Jones, S. L., und Kelleher, A. D. (2002). Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol* 168, 5954-5958.

Apperley, J. F., Dowding, C., Hibbin, J., Buitter, J., Matutes, E., Sissons, P. J., Gordon, M., und Goldman, J. M. (1989). The effect of cytomegalovirus on hemopoiesis: in vitro evidence for selective infection of marrow stromal cells. *Exp Hematol* 17, 38-45.

Arrode, G., Boccaccio, C., Lule, J., Allart, S., Moinard, N., Abastado, J. P., Alam, A., und Davrinche, C. (2000). Incoming human cytomegalovirus pp65 (UL83) contained in apoptotic infected fibroblasts is cross-presented to CD8(+) T cells by dendritic cells. *J Virol* 74, 10018-10024.

Azuma, M., Ito, D., Yagita, H., Okumura, K., Phillips, J. H., Lanier, L. L., und Somoza, C. (1993). B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28. *Nature* 366, 76-79.

Bailey, T. C., Buller, R. S., Ettinger, N. A., Trulock, E. P., Gaudreault-Keener, M., Langlois, T. M., Fornoff, J. E., Cooper, J. D., und Storch, G. A. (1995). Quantitative analysis of cytomegalovirus viremia in lung transplant recipients. *J Infect Dis* 171, 1006-1010.

Banchereau, J., de Paoli, P., Valle, A., Garcia, E., und Rousset, F. (1991). Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science* 251, 70-72.

Becker, C., Pohla, H., Frankenberger, B., Schuler, T., Assenmacher, M., Schendel, D. J., und Blankenstein, T. (2001). Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. *Nat Med* 7, 1159-1162.

Bein, G., Bitsch, A., Hoyer, J., Steinhoff, J., Fricke, L., Machnik, H., Dennin, R., und Kirchner, H. (1993). A longitudinal prospective study of cytomegalovirus pp65 antigenemia in renal transplant recipients. *Transpl Int* 6, 185-190.

- Ben-Sasson, S. Z., Le Gros, G., Conrad, D. H., Finkelman, F. D., und Paul, W. E. (1990). IL-4 production by T cells from naive donors. IL-2 is required for IL-4 production. *J Immunol* *145*, 1127-1136.
- Bissinger, A. L., Rauser, G., Hebart, H., Frank, F., Jahn, G., und Einsele, H. (2002). Isolation and expansion of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes using interferon-gamma secretion assay. *Exp Hematol* *30*, 1178-1184.
- Blackburn, E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature* *350*, 569-573.
- Blomberg, K., Hautala, R., Lovgren, J., Mukkala, V. M., Lindqvist, C., und Akerman, K. (1996). Time-resolved fluorometric assay for natural killer activity using target cells labelled with a fluorescence enhancing ligand. *J Immunol Methods* *193*, 199-206.
- Bluestone, J. A., und Abbas, A. K. (2003). Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* *3*, 253-257.
- Boeckh, M., Nichols, W. G., Papanicolaou, G., Rubin, R., Wingard, J. R., und Zaia, J. (2003). Cytomegalovirus in hematopoietic stem cell transplant recipients: Current status, known challenges, and future strategies. *Biol Blood Marrow Transplant* *9*, 543-558.
- Bombi, J. A., Cardesa, A., Llebaria, C., Rives, A., Carreras, E., Granena, A., und Jimenez de Anta, M. T. (1987). Main autopsy findings in bone marrow transplant patients. *Arch Pathol Lab Med* *111*, 125-129.
- Bonini, C., Lee, S. P., Riddell, S. R., und Greenberg, P. D. (2001). Targeting antigen in mature dendritic cells for simultaneous stimulation of CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* *166*, 5250-5257.
- Boppana, S. B., und Britt, W. J. (1996). Recognition of human cytomegalovirus gene products by HCMV-specific cytotoxic T cells. *Virology* *222*, 293-296.
- Bordeleau, L., und Berinstein, N. L. (2000). Molecular diagnostics in follicular non-Hodgkin's lymphoma: a review. *Semin Oncol* *27*, 42-52.
- Borysiewicz, L. K., Morris, S., Page, J. D., und Sissons, J. G. (1983). Human cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes: requirements for in vitro generation and specificity. *Eur J Immunol* *13*, 804-809.
- Bretscher, P. A. (1999). A two-step, two-signal model for the primary activation of precursor helper T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 185-190.
- Brockman, W. W., und Nathans, D. (1974). The isolation of simian virus 40 variants with specifically altered genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *71*, 942-946.
- Brossart, P., Grunebach, F., Stuhler, G., Reichardt, V. L., Mohle, R., Kanz, L., und Brugger, W. (1998). Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* *92*, 4238-4247.
- Brown, W. R. (1989). Molecular cloning of human telomeres in yeast. *Nature* *338*, 774-776.

- Bueno, J., Ramil, C., und Green, M. (2002). Current management strategies for the prevention and treatment of cytomegalovirus infection in pediatric transplant recipients. *Paediatr Drugs* 4, 279-290.
- Carroll, M. C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* 16, 545-568.
- Cereb, N., Kong, Y., Lee, S., Maye, P., und Yang, S. Y. (1996). Nucleotide sequences of MHC class I introns 1, 2, and 3 in humans and intron 2 in nonhuman primates. *Tissue Antigens* 47, 498-511.
- Chee, M. S., Satchwell, S. C., Preddie, E., Weston, K. M., und Barrell, B. G. (1990). Human cytomegalovirus encodes three G protein-coupled receptor homologues. *Nature* 344, 774-777.
- Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., und Bacchetti, S. (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *Embo J* 11, 1921-1929.
- Counter, C. M., Botelho, F. M., Wang, P., Harley, C. B., und Bacchetti, S. (1994). Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes. *J Virol* 68, 3410-3414.
- Cross, S. H., Allshire, R. C., McKay, S. J., McGill, N. I., und Cooke, H. J. (1989). Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature* 338, 771-774.
- Crumpacker, C. S. (1996). Ganciclovir. *N Engl J Med* 335, 721-729.
- Curfs, J. H., Meis, J. F., und Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clin Microbiol Rev* 10, 742-780.
- Cwynarski, K., Ainsworth, J., Cobbold, M., Wagner, S., Mahendra, P., Apperley, J., Goldman, J., Craddock, C., und Moss, P. A. (2001). Direct visualization of cytomegalovirus-specific T-cell reconstitution after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 97, 1232-1240.
- Davignon, J. L., Clement, D., Alriquet, J., Michelson, S., und Davrinche, C. (1995). Analysis of the proliferative T cell response to human cytomegalovirus major immediate-early protein (IE1): phenotype, frequency and variability. *Scand J Immunol* 41, 247-255.
- de Lange, T., Shiue, L., Myers, R. M., Cox, D. R., Naylor, S. L., Killery, A. M., und Varmus, H. E. (1990). Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10, 518-527.
- Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., und Romagnani, S. (1991). Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J Clin Invest* 88, 346-350.
- Delecluse, H. J., Pich, D., Hilsendegen, T., Baum, C., und Hammerschmidt, W. (1999). A first-generation packaging cell line for Epstein-Barr virus-derived vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5188-5193.

- DiBrino, M., Parker, K. C., Margulies, D. H., Shiloach, J., Turner, R. V., Biddison, W. E., und Coligan, J. E. (1994). The HLA-B14 peptide binding site can accommodate peptides with different combinations of anchor residues. *J Biol Chem* 269, 32426-32434.
- Dinges, M. M., Orwin, P. M., und Schlievert, P. M. (2000). Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev* 13, 16-34, table of contents.
- Eils, R., Uhrig, S., Saracoglu, K., Satzler, K., Bolzer, A., Petersen, I., Chassery, J., Ganser, M., und Speicher, M. R. (1998). An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosomal rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet Cell Genet* 82, 160-171.
- Einsele, H., und Hebart, H. (2004). CMV-specific immunotherapy. *Hum Immunol* 65, 558-564.
- Einsele, H., Rauser, G., Grigoleit, U., Hebart, H., Sinzger, C., Riegler, S., und Jahn, G. (2002a). Induction of CMV-specific T-cell lines using Ag-presenting cells pulsed with CMV protein or peptide. *Cytotherapy* 4, 49-54.
- Einsele, H., Roosnek, E., Rufer, N., Sinzger, C., Riegler, S., Loffler, J., Grigoleit, U., Moris, A., Rammensee, H. G., Kanz, L., Kleihauer, A., Frank, F., Jahn, G., und Hebart, H. (2002b). Infusion of cytomegalovirus (CMV)-specific T cells for the treatment of CMV infection not responding to antiviral chemotherapy. *Blood* 99, 3916-3922.
- Emanuel, D., Cunningham, I., Jules-Elysee, K., Brochstein, J. A., Kernan, N. A., Laver, J., Stover, D., White, D. A., Fels, A., Polsky, B., und et al. (1988). Cytomegalovirus pneumonia after bone marrow transplantation successfully treated with the combination of ganciclovir and high-dose intravenous immune globulin. *Ann Intern Med* 109, 777-782.
- Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., und Rammensee, H. G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-296.
- Faulkner, G. C., Krajewski, A. S., und Crawford, D. H. (2000). The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* 8, 185-189.
- Fearon, D. T. (1993). The CD19-CR2-TAPA-1 complex, CD45 and signaling by the antigen receptor of B lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 5, 341-348.
- Freeman, G. J., Gray, G. S., Gimmi, C. D., Lombard, D. B., Zhou, L. J., White, M., Fingerroth, J. D., Gribben, J. G., und Nadler, L. M. (1991). Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7. *J Exp Med* 174, 625-631.
- Gahn, B., Siller-Lopez, F., Pirooz, A. D., Yvon, E., Gottschalk, S., Longnecker, R., Brenner, M. K., Heslop, H. E., Aguilar-Cordova, E., und Rooney, C. M. (2001). Adenoviral gene transfer into dendritic cells efficiently amplifies the immune response to LMP2A antigen: a potential treatment strategy for Epstein-Barr virus--positive Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 93, 706-713.

- Garrone, P., Neidhardt, E. M., Garcia, E., Galibert, L., van Kooten, C., und Banchereau, J. (1995). Fas ligation induces apoptosis of CD40-activated human B lymphocytes. *J Exp Med* *182*, 1265-1273.
- Gavin, M. A., Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Greenberg, P. D., und Bevan, M. J. (1993). Alkali hydrolysis of recombinant proteins allows for the rapid identification of class I MHC-restricted CTL epitopes. *J Immunol* *151*, 3971-3980.
- Gilbert, M. J., Riddell, S. R., Plachter, B., und Greenberg, P. D. (1996). Cytomegalovirus selectively blocks antigen processing and presentation of its immediate-early gene product. *Nature* *383*, 720-722.
- Glimcher, L. H., und Murphy, K. M. (2000). Lineage commitment in the immune system: the T helper lymphocyte grows up. *Genes Dev* *14*, 1693-1711.
- Goldberg, A. L. (2003). Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* *426*, 895-899.
- Goldstein, S. (1990). Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* *249*, 1129-1133.
- Gottschalk, S., Edwards, O. L., Sili, U., Huls, M. H., Goltsova, T., Davis, A. R., Heslop, H. E., und Rooney, C. M. (2003). Generating CTLs against the subdominant Epstein-Barr virus LMP1 antigen for the adoptive immunotherapy of EBV-associated malignancies. *Blood* *101*, 1905-1912.
- Gottschalk, S., Heslop, H. E., und Rooney, C. M. (2002). Treatment of Epstein-Barr virus-associated malignancies with specific T cells. *Adv Cancer Res* *84*, 175-201.
- Greider, C. W., und Blackburn, E. H. (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* *43*, 405-413.
- Greider, C. W., und Blackburn, E. H. (1987). The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* *51*, 887-898.
- Gustafsson, A., Levitsky, V., Zou, J. Z., Frisan, T., Dalianis, T., Ljungman, P., Ringden, O., Winiarski, J., Ernberg, I., und Masucci, M. G. (2000). 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* *95*, 807-814.
- Gyulai, Z., Endresz, V., Burian, K., Pincus, S., Toldy, J., Cox, W. I., MERIC, C., Plotkin, S., Gonczol, E., und Berencsi, K. (2000). Cytotoxic T lymphocyte (CTL) responses to human cytomegalovirus pp65, IE1-Exon4, gB, pp150, and pp28 in healthy individuals: reevaluation of prevalence of IE1-specific CTLs. *J Infect Dis* *181*, 1537-1546.
- Hamel, Y., Blake, N., Gabrielsson, S., Haigh, T., Jooss, K., Martinache, C., Caillat-Zucman, S., Rickinson, A. B., Hachein-Bey, S., Fischer, A., und Cavazzana-Calvo, M. (2002). 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* *13*, 855-866.

- Hammerschmidt, W., und Sugden, B. (1988). Identification and characterization of oriLyt, a lytic origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. *Cell* 55, 427-433.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Haque, T., Amlot, P. L., Helling, N., Thomas, J. A., Sweny, P., Rolles, K., Burroughs, A. K., Prentice, H. G., und Crawford, D. H. (1998). Reconstitution of EBV-specific T cell immunity in solid organ transplant recipients. *J Immunol* 160, 6204-6209.
- Harley, C. B., und Villeponteau, B. (1995). Telomeres and telomerase in aging and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 5, 249-255.
- Hashimoto, T., Nakamura, M., Oshika, Y., Tsuchida, T., Yamazaki, H., Kijima, H., Ueyama, Y., Minoguchi, K., Adachi, M., und Ota, H. (2001). Interleukin-10 relieves the inhibitory effects of interferon-gamma on normal human lung fibroblasts. *Int J Mol Med* 7, 149-154.
- Hayflick, L., und Moorhead, P. S. (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Herbst, H., Dallenbach, F., Hummel, M., Niedobitek, G., Pileri, S., Muller-Lantzsch, N., und Stein, H. (1991). Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4766-4770.
- Heslop, H., Rooney, C., Brenner, M., Krance, R., Carrum, G., Gahn, B., Bollard, C., Khan, S., Gee, A., Popat, U., Gresik, M., Przepiorka, D., Kuehnle, I., und Grilley, B. (2000). Administration of neomycin resistance gene-marked EBV-specific cytotoxic T-lymphocytes as therapy for patients receiving a bone marrow transplant for relapsed EBV-positive Hodgkin disease. *Hum Gene Ther* 11, 1465-1475.
- Heslop, H. E., Ng, C. Y., Li, C., Smith, C. A., Loftin, S. K., Krance, R. A., Brenner, M. K., und Rooney, C. M. (1996). Long-term restoration of immunity against Epstein-Barr virus infection by adoptive transfer of gene-modified virus-specific T lymphocytes. *Nat Med* 2, 551-555.
- Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N., und Schuler, G. (1996). Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 26, 659-668.
- Hewitt, E. W. (2003). The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion. *Immunology* 110, 163-169.
- Hibberd, P. L., und Snyderman, D. R. (1995). Cytomegalovirus infection in organ transplant recipients. *Infect Dis Clin North Am* 9, 863-877.
- Ho, I. C., und Glimcher, L. H. (2002). Transcription: tantalizing times for T cells. *Cell* 109 Suppl, S109-120.
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., und Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.

- Hogg, N., und Landis, R. C. (1993). Adhesion molecules in cell interactions. *Curr Opin Immunol* 5, 383-390.
- Hsieh, C. S., Macatonia, S. E., Tripp, C. S., Wolf, S. F., O'Garra, A., und Murphy, K. M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 260, 547-549.
- Huffman, K. E., Levene, S. D., Tesmer, V. M., Shay, J. W., und Wright, W. E. (2000). Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem* 275, 19719-19722.
- Jacobs, J. P., Jones, C. M., und Baille, J. P. (1970). Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. *Nature* 227, 168-170.
- Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., von Herrath, M. G., und Schoenberger, S. P. (2003). CD4⁺ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8⁺ T lymphocytes. *Nature* 421, 852-856.
- Jin, X., Demoitie, M. A., Donahoe, S. M., Ogg, G. S., Bonhoeffer, S., Kakimoto, W. M., Gillespie, G., Moss, P. A., Dyer, W., Kurilla, M. G., Riddell, S. R., Downie, J., Sullivan, J. S., McMichael, A. J., Workman, C., und Nixon, D. F. (2000). High frequency of cytomegalovirus-specific cytotoxic T-effector cells in HLA-A*0201-positive subjects during multiple viral coinfections. *J Infect Dis* 181, 165-175.
- Kataoka, H., Tahara, H., Watanabe, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., Furuichi, Y., und Sugimoto, M. (1997). immortalization of immunologically committed Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines accompanied by a strong telomerase activity. *Differentiation* 62, 203-211.
- Keever-Taylor, C. A., Margolis, D., Konings, S., Sandford, G. R., Nicolette, C. A., Lawendowski, C., und Burns, W. H. (2001). Cytomegalovirus-specific cytolytic T-cell lines and clones generated against adenovirus-pp65-infected dendritic cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 7, 247-256.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B., und Hammerschmidt, W. (1995). immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *J Virol* 69, 231-238.
- Kern, F., Bunde, T., Faulhaber, N., Kiecker, F., Khatamzas, E., Rudawski, I. M., Pruss, A., Gratama, J. W., Volkmer-Engert, R., Ewert, R., Reinke, P., Volk, H. D., und Picker, L. J. (2002). Cytomegalovirus (CMV) phosphoprotein 65 makes a large contribution to shaping the T cell repertoire in CMV-exposed individuals. *J Infect Dis* 185, 1709-1716.
- Kern, F., Faulhaber, N., Frommel, C., Khatamzas, E., Prosch, S., Schonemann, C., Kretzschmar, I., Volkmer-Engert, R., Volk, H. D., und Reinke, P. (2000). Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur J Immunol* 30, 1676-1682.

- Kern, F., Surel, I. P., Faulhaber, N., Frommel, C., Schneider-Mergener, J., Schonemann, C., Reinke, P., und Volk, H. D. (1999). Target structures of the CD8(+)-T-cell response to human cytomegalovirus: the 72-kilodalton major immediate-early protein revisited. *J Virol* 73, 8179-8184.
- Khan, N., Shariff, N., Cobbold, M., Bruton, R., Ainsworth, J. A., Sinclair, A. J., Nayak, L., und Moss, P. A. (2002). Cytomegalovirus seropositivity drives the CD8 T cell repertoire toward greater clonality in healthy elderly individuals. *J Immunol* 169, 1984-1992.
- Khanna, R., Bell, S., Sherritt, M., Galbraith, A., Burrows, S. R., Rafter, L., Clarke, B., Slaughter, R., Falk, M. C., Douglass, J., Williams, T., Elliott, S. L., und Moss, D. J. (1999). Activation and adoptive transfer of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells in solid organ transplant patients with posttransplant lymphoproliferative disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10391-10396.
- Khattab, B. A., Lindenmaier, W., Frank, R., und Link, H. (1997). Three T-cell epitopes within the C-terminal 265 amino acids of the matrix protein pp65 of human cytomegalovirus recognized by human lymphocytes. *J Med Virol* 52, 68-76.
- Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., und Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266, 2011-2015.
- Kleihauer, A., Grigoleit, U., Hebart, H., Moris, A., Brossart, P., Muhm, A., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., Sinzger, C., Riegler, S., Jahn, G., Kanz, L., und Einsele, H. (2001). Ex vivo generation of human cytomegalovirus-specific cytotoxic T cells by peptide-pulsed dendritic cells. *Br J Haematol* 113, 231-239.
- Klein, G., Yefenof, E., Falk, K., und Westman, A. (1978). Relationship between Epstein-Barr virus (EBV)-production and the loss of the EBV receptor/complement receptor complex in a series of sublines derived from the same original Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer* 21, 552-560.
- Kloetzel, P. M., und Ossendorp, F. (2004). Proteasome and peptidase function in MHC-class-I-mediated antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 16, 76-81.
- Knutsen, T., Bixenman, H. A., Lawce, H., und Martin, P. K. (1991). Chromosome analysis guidelines preliminary report. *Cancer Genet Cytogenet* 52, 11-17.
- Kobayashi, M., Fitz, L., Ryan, M., Hewick, R. M., Clark, S. C., Chan, S., Loudon, R., Sherman, F., Perussia, B., und Trinchieri, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 170, 827-845.
- Koehne, G., Gallardo, H. F., Sadelain, M., und O'Reilly, R. J. (2000). Rapid selection of antigen-specific T lymphocytes by retroviral transduction. *Blood* 96, 109-117.
- Komanduri, K. V., Viswanathan, M. N., Wieder, E. D., Schmidt, D. K., Brecht, B. M., Jacobson, M. A., und McCune, J. M. (1998). Restoration of cytomegalovirus-specific CD4+ T-lymphocyte responses after ganciclovir and highly active antiretroviral therapy in individuals infected with HIV-1. *Nat Med* 4, 953-956.

- Kondo, E., Akatsuka, Y., Kuzushima, K., Tsujimura, K., Asakura, S., Tajima, K., Kagami, Y., Kodera, Y., Tanimoto, M., Morishima, Y., und Takahashi, T. (2004). Identification of novel CTL epitopes of CMV-pp65 presented by a variety of HLA alleles. *Blood* *103*, 630-638.
- Kondo, E., Topp, M. S., Kiem, H. P., Obata, Y., Morishima, Y., Kuzushima, K., Tanimoto, M., Harada, M., Takahashi, T., und Akatsuka, Y. (2002). Efficient generation of antigen-specific cytotoxic T cells using retrovirally transduced CD40-activated B cells. *J Immunol* *169*, 2164-2171.
- Kopf, M., Le Gros, G., Bachmann, M., Lamers, M. C., Bluethmann, H., und Kohler, G. (1993). Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* *362*, 245-248.
- Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 gene family and the regulation of programmed cell death. *Cancer Res* *59*, 1693s-1700s.
- Kramer, M. H., Hermans, J., Parker, J., Krol, A. D., Kluin-Nelemans, J. C., Haak, H. L., van Groningen, K., van Krieken, J. H., de Jong, D., und Kluin, P. M. (1996). Clinical significance of bcl2 and p53 protein expression in diffuse large B-cell lymphoma: a population-based study. *J Clin Oncol* *14*, 2131-2138.
- Krause, H., Hebart, H., Jahn, G., Muller, C. A., und Einsele, H. (1997). Screening for CMV-specific T cell proliferation to identify patients at risk of developing late onset CMV disease. *Bone Marrow Transplant* *19*, 1111-1116.
- Kropshofer, H., Hammerling, G. J., und Vogt, A. B. (1997). How HLA-DM edits the MHC class II peptide repertoire: survival of the fittest? *Immunol Today* *18*, 77-82.
- Kuhn, R., Rajewsky, K., und Muller, W. (1991). Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice. *Science* *254*, 707-710.
- Lapointe, R., Bellemare-Pelletier, A., Housseau, F., Thibodeau, J., und Hwu, P. (2003). CD40-stimulated B lymphocytes pulsed with tumor antigens are effective antigen-presenting cells that can generate specific T cells. *Cancer Res* *63*, 2836-2843.
- Le Gros, G., Ben-Sasson, S. Z., Seder, R., Finkelman, F. D., und Paul, W. E. (1990). Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. *J Exp Med* *172*, 921-929.
- Li, H., Llera, A., Malchiodi, E. L., und Mariuzza, R. A. (1999). The structural basis of T cell activation by superantigens. *Annu Rev Immunol* *17*, 435-466.
- Li Pira, G., Bottone, L., Ivaldi, F., Pelizzoli, R., Del Galdo, F., Lozzi, L., Bracci, L., Loregian, A., Palu, G., De Palma, R., Einsele, H., und Manca, F. (2004). Identification of new Th peptides from the cytomegalovirus protein pp65 to design a peptide library for generation of CD4 T cell lines for cellular immunoreconstitution. *Int Immunol* *16*, 635-642.
- Li, Z., Dullmann, J., Schiedlmeier, B., Schmidt, M., von Kalle, C., Meyer, J., Forster, M., Stocking, C., Wahlers, A., Frank, O., Ostertag, W., Kuhlcke, K., Eckert, H. G., Fehse, B., und Baum, C. (2002). Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* *296*, 497.

- Lim, J. B., Kwon, O. H., Kim, H. S., Kim, H. O., Choi, J. R., Provenzano, M., und Stroncek, D. (2004). Adoptive immunotherapy for cytomegalovirus (CMV) disease in immunocompromised patients. *Yonsei Med J* 45 *Suppl*, 18-22.
- Limpens, J., de Jong, D., van Krieken, J. H., Price, C. G., Young, B. D., van Ommen, G. J., und Kluin, P. M. (1991). Bcl-2/JH rearrangements in benign lymphoid tissues with follicular hyperplasia. *Oncogene* 6, 2271-2276.
- Lippincott-Schwartz, J., Yuan, L., Tipper, C., Amherdt, M., Orci, L., und Klausner, R. D. (1991). Brefeldin A's effects on endosomes, lysosomes, and the TGN suggest a general mechanism for regulating organelle structure and membrane traffic. *Cell* 67, 601-616.
- Liu, Y. J., und Banchereau, J. (1997). Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 9, 235-240.
- Ljungman, P. (1995). Cytomegalovirus pneumonia: presentation, diagnosis, and treatment. *Semin Respir Infect* 10, 209-215.
- Ljungman, P. (1998). Immune reconstitution and viral infections after stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 21 *Suppl* 2, S72-74.
- Ljungman, P. (2002). Beta-herpesvirus challenges in the transplant recipient. *J Infect Dis* 186 *Suppl* 1, S99-S109.
- Ljungman, P., Lonnqvist, B., Wahren, B., Ringden, O., und Gahrton, G. (1985). Lymphocyte responses after cytomegalovirus infection in bone marrow transplant recipients--a one-year follow-up. *Transplantation* 40, 515-520.
- Longmate, J., York, J., La Rosa, C., Krishnan, R., Zhang, M., Senitzer, D., und Diamond, D. J. (2001). Population coverage by HLA class-I restricted cytotoxic T-lymphocyte epitopes. *Immunogenetics* 52, 165-173.
- Lozzio, C. B., und Lozzio, B. B. (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45, 321-334.
- Ma, X., Aste-Amezaga, M., und Trinchieri, G. (1996). Regulation of interleukin-12 production. *Ann N Y Acad Sci* 795, 13-25.
- Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., und O'Garra, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol* 154, 5071-5079.
- MacGregor, R. R., Pakola, S. J., Graziani, A. L., Montzka, D. P., Hodinka, R. L., Nichols, C. W., und Friedman, H. M. (1995). Evidence of active cytomegalovirus infection in clinically stable HIV-infected individuals with CD4+ lymphocyte counts below 100/microliters of blood: features and relation to risk of subsequent CMV retinitis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 10, 324-330.

- Maecker, H. T., Dunn, H. S., Suni, M. A., Khatamzas, E., Pitcher, C. J., Bunde, T., Persaud, N., Trigona, W., Fu, T. M., Sinclair, E., Bredt, B. M., McCune, J. M., Maino, V. C., Kern, F., und Picker, L. J. (2001). Use of overlapping peptide mixtures as antigens for cytokine flow cytometry. *J Immunol Methods* 255, 27-40.
- Magrath, I., Jain, V., und Bhatia, K. (1992). Epstein-Barr virus and Burkitt's lymphoma. *Semin Cancer Biol* 3, 285-295.
- McCormick, J. K., Tripp, T. J., Olmsted, S. B., Matsuka, Y. V., Gahr, P. J., Ohlendorf, D. H., und Schlievert, P. M. (2000). Development of streptococcal pyrogenic exotoxin C vaccine toxoids that are protective in the rabbit model of toxic shock syndrome. *J Immunol* 165, 2306-2312.
- McInnes, I. B., Illei, G. G., Danning, C. L., Yarboro, C. H., Crane, M., Kuroiwa, T., Schlimgen, R., Lee, E., Foster, B., Flemming, D., Prussin, C., Fleisher, T. A., und Boumpas, D. T. (2001). IL-10 improves skin disease and modulates endothelial activation and leukocyte effector function in patients with psoriatic arthritis. *J Immunol* 167, 4075-4082.
- McLaughlin-Taylor, E., Pande, H., Forman, S. J., Tanamachi, B., Li, C. R., Zaia, J. A., Greenberg, P. D., und Riddell, S. R. (1994). Identification of the major late human cytomegalovirus matrix protein pp65 as a target antigen for CD8⁺ virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Med Virol* 43, 103-110.
- Meraz, M. A., White, J. M., Sheehan, K. C., Bach, E. A., Rodig, S. J., Dighe, A. S., Kaplan, D. H., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Campbell, D., Carver-Moore, K., DuBois, R. N., Clark, R., Aguet, M., und Schreiber, R. D. (1996). Targeted disruption of the Stat1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell* 84, 431-442.
- Meyers, J. D., Flournoy, N., und Thomas, E. D. (1986). Risk factors for cytomegalovirus infection after human marrow transplantation. *J Infect Dis* 153, 478-488.
- Miller, G., Shope, T., Lisco, H., Stitt, D., und Lipman, M. (1972). Epstein-Barr virus: transformation, cytopathic changes, and viral antigens in squirrel monkey and marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 383-387.
- Mocarski, E. S., Jr. (2002). Immunomodulation by cytomegaloviruses: manipulative strategies beyond evasion. *Trends Microbiol* 10, 332-339.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., und O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19, 683-765.
- Moosmann, A., Khan, N., Cobbold, M., Zentz, C., Delecluse, H. J., Hollweck, G., Hislop, A. D., Blake, N. W., Croom-Carter, D., Wollenberg, B., Moss, P. A., Zeidler, R., Rickinson, A. B., und Hammerschmidt, W. (2002). B cells immortalized by a mini-Epstein-Barr virus encoding a foreign antigen efficiently reactivate specific cytotoxic T cells. *Blood* 100, 1755-1764.
- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., und Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136, 2348-2357.

- Mosmann, T. R., und Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7, 145-173.
- Moyzis, R. K., Buckingham, J. M., Cram, L. S., Dani, M., Deaven, L. L., Jones, M. D., Meyne, J., Ratliff, R. L., und Wu, J. R. (1988). A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 6622-6626.
- Murphy, K. M., und Reiner, S. L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2, 933-944.
- Nelms, K., Keegan, A. D., Zamorano, J., Ryan, J. J., und Paul, W. E. (1999). The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. *Annu Rev Immunol* 17, 701-738.
- Nelson, B. H. (2004). IL-2, regulatory T cells, and tolerance. *J Immunol* 172, 3983-3988.
- Nemerow, G. R., Houghten, R. A., Moore, M. D., und Cooper, N. R. (1989). Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* 56, 369-377.
- Nestle, F. O., Alijagic, S., Gilliet, M., Sun, Y., Grabbe, S., Dummer, R., Burg, G., und Schadendorf, D. (1998). Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4, 328-332.
- Neuhierl, B., Feederle, R., Hammerschmidt, W., und Delecluse, H. J. (2002). Glycoprotein gp110 of Epstein-Barr virus determines viral tropism and efficiency of infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15036-15041.
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., und Mautner, J. (2003). Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33, 1250-1259.
- Noben-Trauth, N., Shultz, L. D., Brombacher, F., Urban, J. F., Jr., Gu, H., und Paul, W. E. (1997). An interleukin 4 (IL-4)-independent pathway for CD4⁺ T cell IL-4 production is revealed in IL-4 receptor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10838-10843.
- O'Connor, M., Peifer, M., und Bender, W. (1989). Construction of large DNA segments in *Escherichia coli*. *Science* 244, 1307-1312.
- O'Garra, A. (1998). Checkpoints for regulation of development and interferon gamma production by Th1 cells in TCR-transgenic models. *Eur Cytokine Netw* 9, 41-42.
- O'Nions, J., und Allday, M. J. (2004). Proliferation and differentiation in isogenic populations of peripheral B cells activated by Epstein-Barr virus or T cell-derived mitogens. *J Gen Virol* 85, 881-895.
- Okubo, M., Tsurukubo, Y., Higaki, T., Kawabe, T., Goto, M., Murase, T., Ide, T., Furuichi, Y., und Sugimoto, M. (2001). Clonal chromosomal aberrations accompanied by strong telomerase activity in immortalization of human B-lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. *Cancer Genet Cytogenet* 129, 30-34.

- Oudejans, J. J., Jiwa, M., van den Brule, A. J., Grasser, F. A., Horstman, A., Vos, W., Kluin, P. M., van der Valk, P., Walboomers, J. M., und Meijer, C. J. (1995). Detection of heterogeneous Epstein-Barr virus gene expression patterns within individual post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Am J Pathol* 147, 923-933.
- Palma, J. P., Yauch, R. L., Kang, H. K., Lee, H. G., und Kim, B. S. (2002). Preferential induction of IL-10 in APC correlates with a switch from Th1 to Th2 response following infection with a low pathogenic variant of Theiler's virus. *J Immunol* 168, 4221-4230.
- Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., und Munz, C. (2005). Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307, 593-596.
- Papageorgiou, A. C., und Acharya, K. R. (1997). Superantigens as immunomodulators: recent structural insights. *Structure* 5, 991-996.
- Peggs, K., Verfuether, S., und Mackinnon, S. (2001). Induction of cytomegalovirus (CMV)-specific T-cell responses using dendritic cells pulsed with CMV antigen: a novel culture system free of live CMV virions. *Blood* 97, 994-1000.
- Peggs, K., Verfuether, S., Pizzey, A., Ainsworth, J., Moss, P., und Mackinnon, S. (2002). Characterization of human cytomegalovirus peptide-specific CD8(+) T-cell repertoire diversity following in vitro restimulation by antigen-pulsed dendritic cells. *Blood* 99, 213-223.
- Peggs, K. S., und Mackinnon, S. (2004). Augmentation of virus-specific immunity after hematopoietic stem cell transplantation by adoptive T-cell therapy. *Hum Immunol* 65, 550-557.
- Peggs, K. S., Verfuether, S., Pizzey, A., Khan, N., Guiver, M., Moss, P. A., und Mackinnon, S. (2003). Adoptive cellular therapy for early cytomegalovirus infection after allogeneic stem-cell transplantation with virus-specific T-cell lines. *Lancet* 362, 1375-1377.
- Pope, J. H., Horne, M. K., und Scott, W. (1968). Transformation of foetal human leukocytes in vitro by filtrates of a human leukaemic cell line containing herpes-like virus. *Int J Cancer* 3, 857-866.
- Porgador, A., und Gilboa, E. (1995). Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with a class I-restricted peptide are potent inducers of cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 182, 255-260.
- Raab-Traub, N. (1992). Epstein-Barr virus and nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 3, 297-307.
- Rammensee, H., Bachmann, J., Emmerich, N. P., Bachor, O. A., und Stevanovic, S. (1999). SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50, 213-219.
- Ranieri, E., Herr, W., Gambotto, A., Olson, W., Rowe, D., Robbins, P. D., Kierstead, L. S., Watkins, S. C., Gesualdo, L., und Storkus, W. J. (1999). Dendritic cells transduced with an adenovirus vector encoding Epstein-Barr virus latent membrane protein 2B: a new modality for vaccination. *J Virol* 73, 10416-10425.

- Reddehase, M. J. (2002). Antigens and immunoevasins: opponents in cytomegalovirus immune surveillance. *Nat Rev Immunol* 2, 831-844.
- Reed, E. C., und Meyers, J. D. (1987). Treatment of cytomegalovirus infection. *Clin Lab Med* 7, 831-852.
- Reed, E. C., Wolford, J. L., Kopecky, K. J., Lilleby, K. E., Dandliker, P. S., Todaro, J. L., McDonald, G. B., und Meyers, J. D. (1990). Ganciclovir for the treatment of cytomegalovirus gastroenteritis in bone marrow transplant patients. A randomized, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 112, 505-510.
- Reid, S. D., Penna, G., und Adorini, L. (2000). The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Curr Opin Immunol* 12, 114-121.
- Renno, T., und Acha-Orbea, H. (1996). Superantigens in autoimmune diseases: still more shades of gray. *Immunol Rev* 154, 175-191.
- Retiere, C., Prod'homme, V., Imbert-Marcille, B. M., Bonneville, M., Vie, H., und Hallet, M. M. (2000). Generation of cytomegalovirus-specific human T-lymphocyte clones by using autologous B-lymphoblastoid cells with stable expression of pp65 or IE1 proteins: a tool to study the fine specificity of the antiviral response. *J Virol* 74, 3948-3952.
- Reusser, P., Riddell, S. R., Meyers, J. D., und Greenberg, P. D. (1991). Cytotoxic T-lymphocyte response to cytomegalovirus after human allogeneic bone marrow transplantation: pattern of recovery and correlation with cytomegalovirus infection and disease. *Blood* 78, 1373-1380.
- Rickinson, A. B., und Moss, D. J. (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15, 405-431.
- Riddell, S. R., Watanabe, K. S., Goodrich, J. M., Li, C. R., Agha, M. E., und Greenberg, P. D. (1992). Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of T cell clones. *Science* 257, 238-241.
- Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S. K., Sixbey, J. W., Gan, Y., Srivastava, D. K., Bowman, L. C., Krance, R. A., Brenner, M. K., und Heslop, H. E. (1998). Infusion of cytotoxic T cells for the prevention and treatment of Epstein-Barr virus-induced lymphoma in allogeneic transplant recipients. *Blood* 92, 1549-1555.
- Roskrow, M. A., Suzuki, N., Gan, Y., Sixbey, J. W., Ng, C. Y., Kimbrough, S., Hudson, M., Brenner, M. K., Heslop, H. E., und Rooney, C. M. (1998). Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with EBV-positive relapsed Hodgkin's disease. *Blood* 91, 2925-2934.
- Rowe, M., Lear, A. L., Croom-Carter, D., Davies, A. H., und Rickinson, A. B. (1992). Three pathways of Epstein-Barr virus gene activation from EBNA1-positive latency in B lymphocytes. *J Virol* 66, 122-131.
- Sack, G. H., Jr. (1981). Human cell transformation by simian virus 40--a review. *In Vitro* 17, 1-19.

- Saiki, R. K., Chang, C. A., Levenson, C. H., Warren, T. C., Boehm, C. D., Kazazian, H. H., Jr., und Erlich, H. A. (1988). Diagnosis of sickle cell anemia and beta-thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* *319*, 537-541.
- Sambrook, J., und Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, (N.Y.): Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sarawar, S. R., Lee, B. J., Reiter, S. K., und Schoenberger, S. P. (2001). Stimulation via CD40 can substitute for CD4 T cell function in preventing reactivation of a latent herpesvirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 6325-6329.
- Savoldo, B., Cubble, M. L., Durett, A. G., Goss, J., Huls, M. H., Liu, Z., Teresita, L., Gee, A. P., Ling, P. D., Brenner, M. K., Heslop, H. E., und Rooney, C. M. (2002a). Generation of EBV-specific CD4⁺ cytotoxic T cells from virus naive individuals. *J Immunol* *168*, 909-918.
- Savoldo, B., Huls, M. H., Liu, Z., Okamura, T., Volk, H. D., Reinke, P., Sabat, R., Babel, N., Jones, J. F., Webster-Cyriaque, J., Gee, A. P., Brenner, M. K., Heslop, H. E., und Rooney, C. M. (2002b). Autologous Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T cells for the treatment of persistent active EBV infection. *Blood* *100*, 4059-4066.
- Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., und Melief, C. J. (1998). T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature* *393*, 480-483.
- Schultze, J. L., Michalak, S., Seamon, M. J., Dranoff, G., Jung, K., Daley, J., Delgado, J. C., Gribben, J. G., und Nadler, L. M. (1997). CD40-activated human B cells: an alternative source of highly efficient antigen presenting cells to generate autologous antigen-specific T cells for adoptive immunotherapy. *J Clin Invest* *100*, 2757-2765.
- Schwarz, K., de Giuli, R., Schmidtke, G., Kostka, S., van den Broek, M., Kim, K. B., Crews, C. M., Kraft, R., und Groettrup, M. (2000). The selective proteasome inhibitors lactacystin and epoxomicin can be used to either up- or down-regulate antigen presentation at nontoxic doses. *J Immunol* *164*, 6147-6157.
- Sharpe, A. H. (1995). Analysis of lymphocyte costimulation in vivo using transgenic and 'knockout' mice. *Curr Opin Immunol* *7*, 389-395.
- Shedlock, D. J., und Shen, H. (2003). Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* *300*, 337-339.
- Sheng, Y., Mancino, V., und Birren, B. (1995). Transformation of *Escherichia coli* with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic Acids Res* *23*, 1990-1996.
- Sissons, J. G., und Carmichael, A. J. (2002). Clinical aspects and management of cytomegalovirus infection. *J Infect* *44*, 78-83.
- Smith, M. G. (1956). Propagation in tissue cultures of a cytopathogenic virus from human salivary gland virus (SGV) disease. *Proc Soc Exp Biol Med* *92*, 424-430.

- Solache, A., Morgan, C. L., Dodi, A. I., Morte, C., Scott, I., Baboonian, C., Zal, B., Goldman, J., Grundy, J. E., und Madrigal, J. A. (1999). Identification of three HLA-A*0201-restricted cytotoxic T cell epitopes in the cytomegalovirus protein pp65 that are conserved between eight strains of the virus. *J Immunol* *163*, 5512-5518.
- Southern, E. M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* *98*, 503-517.
- Steinman, R. M. (1991). The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* *9*, 271-296.
- Stewart, S. A., und Weinberg, R. A. (2000). Telomerase and human tumorigenesis. *Semin Cancer Biol* *10*, 399-406.
- Su, Z., Peluso, M. V., Raffegerst, S. H., Schendel, D. J., und Roskrow, M. A. (2001). The generation of LMP2a-specific cytotoxic T lymphocytes for the treatment of patients with Epstein-Barr virus-positive Hodgkin disease. *Eur J Immunol* *31*, 947-958.
- Sun, Q., Burton, R. L., Dai, L. J., Britt, W. J., und Lucas, K. G. (2000). B lymphoblastoid cell lines as efficient APC to elicit CD8⁺ T cell responses against a cytomegalovirus antigen. *J Immunol* *165*, 4105-4111.
- Sun, Q., Burton, R. L., Pollok, K. E., Emanuel, D. J., und Lucas, K. G. (1999a). CD4(+) Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T-lymphocytes from human umbilical cord blood. *Cell Immunol* *195*, 81-88.
- Sun, Q., Pollok, K. E., Burton, R. L., Dai, L. J., Britt, W., Emanuel, D. J., und Lucas, K. G. (1999b). Simultaneous ex vivo expansion of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T lymphocytes using B-lymphoblastoid cell lines expressing cytomegalovirus pp65. *Blood* *94*, 3242-3250.
- Sutkowski, N., Conrad, B., Thorley-Lawson, D. A., und Huber, B. T. (2001). Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* *15*, 579-589.
- Szmania, S., Galloway, A., Bruorton, M., Musk, P., Aubert, G., Arthur, A., Pyle, H., Hensel, N., Ta, N., Lamb, L., Jr., Dodi, T., Madrigal, A., Barrett, J., Henslee-Downey, J., und van Rhee, F. (2001). Isolation and expansion of cytomegalovirus-specific cytotoxic T lymphocytes to clinical scale from a single blood draw using dendritic cells and HLA-tetramers. *Blood* *98*, 505-512.
- Tabi, Z., Moutaftsi, M., und Borysiewicz, L. K. (2001). Human cytomegalovirus pp65- and immediate early 1 antigen-specific HLA class I-restricted cytotoxic T cell responses induced by cross-presentation of viral antigens. *J Immunol* *166*, 5695-5703.
- Tahara, H., Tokutake, Y., Maeda, S., Kataoka, H., Watanabe, T., Satoh, M., Matsumoto, T., Sugawara, M., Ide, T., Goto, M., Furuichi, Y., und Sugimoto, M. (1997). Abnormal telomere dynamics of B-lymphoblastoid cell strains from Werner's syndrome patients transformed by Epstein-Barr virus. *Oncogene* *15*, 1911-1920.

- Tanner, J., Weis, J., Fearon, D., Whang, Y., und Kieff, E. (1987). Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50, 203-213.
- Tewari, M. K., Sinnathamby, G., Rajagopal, D., und Eisenlohr, L. C. (2005). A cytosolic pathway for MHC class II-restricted antigen processing that is proteasome and TAP dependent. *Nat Immunol* 6, 287-294.
- Thomas, E. D. (1991). Frontiers in bone marrow transplantation. *Blood Cells* 17, 259-267.
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., und Sharpe, A. H. (1995). Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547.
- Tsujimoto, Y., Cossman, J., Jaffe, E., und Croce, C. M. (1985). Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science* 228, 1440-1443.
- Turner, S., Ellexson, M. E., Hickman, H. D., Sidebottom, D. A., Fernandez-Vina, M., Confer, D. L., und Hildebrand, W. H. (1998). Sequence-based typing provides a new look at HLA-C diversity. *J Immunol* 161, 1406-1413.
- Vannucchi, A. M., Glinz, S., Bosi, A., Caporale, R., und Rossi-Ferrini, P. (2001). Selective ex vivo expansion of cytomegalovirus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes using dendritic cells pulsed with a human leucocyte antigen A*0201-restricted peptide. *Br J Haematol* 113, 479-482.
- Vaz-Santiago, J., Lule, J., Rohrlich, P., Jacquier, C., Gibert, N., Le Roy, E., Betbeder, D., Davignon, J. L., und Davrinche, C. (2001). Ex vivo stimulation and expansion of both CD4(+) and CD8(+) T cells from peripheral blood mononuclear cells of human cytomegalovirus-seropositive blood donors by using a soluble recombinant chimeric protein, IE1-pp65. *J Virol* 75, 7840-7847.
- Versteegen, J. M., Logtenberg, T., und Ballieux, R. E. (1988). Enumeration of IFN-gamma-producing human lymphocytes by spot-ELISA. A method to detect lymphokine-producing lymphocytes at the single-cell level. *J Immunol Methods* 111, 25-29.
- von Bergwelt-Baildon, M. S., Vonderheide, R. H., Maecker, B., Hirano, N., Anderson, K. S., Butler, M. O., Xia, Z., Zeng, W. Y., Wucherpfennig, K. W., Nadler, L. M., und Schultze, J. L. (2002). Human primary and memory cytotoxic T lymphocyte responses are efficiently induced by means of CD40-activated B cells as antigen-presenting cells: potential for clinical application. *Blood* 99, 3319-3325.
- Walter, E. A., Greenberg, P. D., Gilbert, M. J., Finch, R. J., Watanabe, K. S., Thomas, E. D., und Riddell, S. R. (1995). 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* 333, 1038-1044.
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M. I., Egan, R. W., und Billah, M. M. (1995). Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J Biol Chem* 270, 9558-9563.

- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H., und Mak, T. W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctl α -4. *Science* 270, 985-988.
- Watts, C. (1997). Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules. *Annu Rev Immunol* 15, 821-850.
- Weiss, L. M., Movahed, L. A., Warnke, R. A., und Sklar, J. (1989). Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 320, 502-506.
- Weiss, L. M., Warnke, R. A., Sklar, J., und Cleary, M. L. (1987). Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N Engl J Med* 317, 1185-1189.
- Wendtner, C. M., Kurzeder, C., Theiss, H. D., Kofler, D. M., Baumert, J., Delecluse, H. J., Janz, A., Hammerschmidt, W., und Hallek, M. (2003). High level of transgene expression in primary chronic lymphocytic leukemia cells using helper-virus-free recombinant Epstein-Barr virus vectors. *Exp Hematol* 31, 99-108.
- Wentworth, P. A., Celis, E., Crimi, C., Stitely, S., Hale, L., Tsai, V., Serra, H. M., Del Guercio, M. F., Livingston, B., Alazard, D., und et al. (1995). In vitro induction of primary, antigen-specific CTL from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with synthetic peptides. *Mol Immunol* 32, 603-612.
- Wills, M. R., Carmichael, A. J., Mynard, K., Jin, X., Weekes, M. P., Plachter, B., und Sissons, J. G. (1996). The human cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response to cytomegalovirus is dominated by structural protein pp65: frequency, specificity, and T-cell receptor usage of pp65-specific CTL. *J Virol* 70, 7569-7579.
- Winston, D. J., Ho, W. G., und Champlin, R. E. (1990). Cytomegalovirus infection and interstitial pneumonia after bone marrow transplantation. *Cancer Treat Res* 50, 113-128.
- Wood, S. A., Park, J. E., und Brown, W. J. (1991). Brefeldin A causes a microtubule-mediated fusion of the trans-Golgi network and early endosomes. *Cell* 67, 591-600.
- Wynn, T. A., Jankovic, D., Hieny, S., Zioncheck, K., Jardieu, P., Cheever, A. W., und Sher, A. (1995). IL-12 exacerbates rather than suppresses T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN-gamma. *J Immunol* 154, 3999-4009.
- Zakian, V. A. (1989). Structure and function of telomeres. *Annu Rev Genet* 23, 579-604.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die diese Arbeit und mich mit Rat und Tat unterstützt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt dabei Dr. Andreas Moosmann für die sehr interessante Thememstellung dieser Doktorarbeit, für seine hervorragende Betreuung, den wissenschaftlichen Rat, seine unerschöpfliche Hilfsbereitschaft und seine Geduld.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für sein Interesse an meiner Arbeit, anregende Diskussionen und fachliche Ratschläge, von denen ich viel profitiert habe.

Bei Herrn Prof. Dr. Horst Domdey bedanke ich mich herzlich für die Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu betreuen, und für seine aufmunternden Worte.

Mein besonderer Dank geht an alle freiwilligen Blutspender und an Dr. Gilbert Reisbach für seine Hilfsbereitschaft in allen Lebenslagen.

Herzlichen Dank auch an die Mitglieder der Arbeitsgruppe Hammerschmidt für praktische Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die „Teestunden“.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei den Ex-Kollegen Dr. Annette Janz und Dr. Bernhard Neuhierl für ihren wissenschaftlichen Rat und meiner Labornachbarin Caro für die vielen Gespräche und ihre ansteckend gute Laune.

Zuletzt noch ein dickes Dankeschön an Mark-Peter fürs Korrekturlesen, die viele Schokolade, seine Seelenruhe und Unterstützung.

Lebenslauf

Personliche Angaben:

Name: Martina Wiesner
Geburtsdatum: 16.12.1974
Geburtsort: Munchen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Ausbildung:

1981-1985 Volksschule Vaterstetten
1985-1988 Gymnasium Markt Schwaben
1988-1991 Mädchenrealschule Heilig Blut, Erding
1991-1995 Asam-Gymnasium Munchen
Mai 1985 Erlangen der allgemeinen Hochschulreife

1996-2002 Studium der Biologie an der Technischen Universität München

Mai 2001 - Januar 2002 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Biotechnologie bei Prof. Dr. Buchner an der Technischen Universität München
Thema: „*Reinigung und Charakterisierung von Ssf1 und Hch1*“

Januar 2002 Abschluss des Studiums der Biologie (Diplom)

Juni 2002 - Juli 2005 Promotion an der Fakultät für Chemie und Pharmazie an der Ludwig-Maximiliansuniversität München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. Hammerschmidt an der GSF, Institut für Genvektoren, München.
Thema: „*Die Diversität Cytomegalovirus-spezifischer T-Zellen nach Selektion mittels B-Zell-Vektoren*“