

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

**Gezielte Reaktivierung spezifischer zytotoxischer T-Zellen  
mit Epstein-Barr-Virus-Vektoren**

von

**Andreas Moosmann**

aus

**Tübingen**

2002

## **Erklärung**

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt betreut.

## **Ehrenwörtliche Versicherung**

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 19. 3. 2002

Andreas Moosmann

Dissertation eingereicht am 19. 3. 2002

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am 12. 7. 2002

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Spezifische Immunität	1
1.2	Antigene und Antigenpräsentation	2
1.3	Professionelle antigenpräsentierende Zellen	3
1.4	Herpesviren	4
1.5	Das Epstein-Barr-Virus	4
1.6	EBV-assoziierte Transformation in vivo: Tumorerkrankungen	5
1.7	Transformation durch EBV in vitro	6
1.8	Immunität gegenüber EBV	7
1.9	Das humane Cytomegalovirus	9
1.10	Immunität gegenüber CMV	11
1.11	Antivirale Therapie mit spezifischen T-Zellen	12
1.12	mini-EBV-Plasmide und EBV-Vektoren	13
1.13	Schlußfolgerung und Zielsetzung	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterienstämme	18
2.1.2	Zelllinien	18
2.1.3	Viren	19
2.1.4	Plasmide	19
2.1.5	Antikörper	20
2.1.6	HLA/Peptid-Tetramere	21
2.1.7	Sonstige Reagenzien	21
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	22
2.1.9	Geräte	22
2.1.10	Dienstleistungen	23

2.2	Arbeiten mit DNA und Proteinen	23
2.3	Arbeiten mit Bakterien	24
2.3.1	Bakterienkultur	24
2.3.2	Transformation von Bakterien	24
2.4	Arbeiten mit eukaryonten Zellen	25
2.4.1	Kultivierung permanenter Zelllinien	25
2.4.2	Isolierung primärer humaner Lymphozyten	27
2.4.3	Generierung von mini-EBV-Virionen	27
2.4.4	Infektion von B-Zellen mit EBV oder EBV-Vektoren	28
2.4.5	PCR-Analyse von mini-LCLs	29
2.4.6	Generierung polyklonaler T-Zelllinien	29
2.4.7	FACS-Analysen	30
2.4.8	Interferon- -Sekretionsanalyse	31
2.4.9	Tetramer-Analysen	31
2.4.10	Zytotoxizitäts-Analysen	32
2.5	Arbeiten mit Viren	33
2.5.1	Epstein-Barr-Virus	33
2.5.2	Cytomegalovirus	34
2.5.3	Rekombinante Vacciniaviren	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1	Konstruktion von mini-EBV-Plasmiden	37
3.1.1	Einbau eines Fremdgens in ein mini-EBV-Plasmid	37
3.1.2	Konstruktion von HPV-mini-EBV-Plasmiden	40
3.1.3	Konstruktion eines EpCAM-mini-EBV-Plasmids	42
3.1.4	Konstruktion eines pp65-mini-EBV-Plasmids	44
3.2	Generierung mini-EBV-immortalisierter B-Zelllinien (mini-LCLs)	45
3.2.1	Herstellung infektiöser mini-EBV-Virionen	45
3.2.2	Generierung von pp65mini-LCLs	46

3.2.3	Mini-LCLs sind frei von Wildtyp-Virus	47
3.2.4	pp65 wird in mini-LCLs exprimiert	47
3.2.5	pp65mini-LCLs exprimieren HLA Klasse I und II, Kostimulatoren und Adhäsionsmoleküle	49
3.3	Reaktivierung von pp65-spezifischen T-Zellen	50
3.3.1	Mit pp65mini-LCLs können T-Zelllinien stimuliert und expandiert werden	51
3.3.2	pp65mini-LCL-stimulierte T-Zelllinien sind zytotoxisch aktiv und lysieren pp65mini-LCLs	52
3.3.3	pp65-reaktive T-Zelllinien werden von CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen dominiert	54
3.3.4	TDA-Freisetzung und Chrom-Freisetzung sind vergleichbar	54
3.3.5	Unabhängig generierte mini-LCLs haben als Zielzellen gleiche Eigenschaften	55
3.3.6	Allogene HLA-inkompatible mini-LCLs werden nicht lysiert	57
3.3.7	pp65mini-LCL-stimulierte T-Zellen bleiben bei Langzeitkultivierung pp65-reaktiv	58
3.3.8	pp65-reaktive T-Zelllinien sezernieren antigenspezifisch Interferon-	58
3.3.9	pp65mini-LCLs reaktivieren pp65-reaktive T-Zellen nur aus CMV-positiven Spendern	60
3.3.10	pp65-reaktive T-Zelllinien lysieren CMV-infizierte, pp65-Vaccinia-infizierte und pp65-Peptid-gepulste Fibroblasten	65
3.3.11	Direkte Visualisierung pp65-epitopspezifischer T-Zellen durch Tetramer-Färbung	68
3.3.12	Reaktivierung von T-Zelllinien aus (CMV+/EBV+)-Spendern	70
3.3.13	Verschiebung von Spezifitäten bei Langzeitkultivierung	74
3.3.14	Ermittlung des HLA-Restriktionsspektrums mit CMV-infizierten Fibroblasten	79
3.3.15	Überblick über die pp65-Tetramerfärbungen	81

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
4.1	Vektorkonstruktion und B-Zell-Immortalisierung	82
4.2	pp65: Modellantigen und therapeutisches Zielantigen	83
4.3	Generierung pp65-spezifischer T-Zelllinien mittels mini-LCLs	85
4.3.1	mini-LCLs als Stimulatoren und als Zielzellen	85
4.3.2	HLA-unrestringierte Reaktivitäten	87
4.3.3	pp65-spezifische T-Zelllinien aus CMV-seropositiven Spendern	88
4.3.4	Tetramer-Analysen	89
4.4	Strategien der Generierung CMV-reaktiver T-Zellkulturen	90
4.4.1	Dendritische Zellen	91
4.4.2	EBV-LCLs	93
4.4.3	Primäre T-Zellaktivierung	95
4.5	Ausblick	96
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>99</b>
	Abkürzungen	111

# 1 Einleitung

Wir sind einem unaufhörlichen Ansturm infektiöser Mikroben ausgesetzt. Ein komplexer mehrzelliger Organismus wie der des Menschen bietet Viren, einzelligen und mehrzelligen Mikroorganismen vielfältige Lebensräume. Viele unter diesen können Krankheiten verursachen oder sogar ihren Wirt töten. Daher hat sich ein komplexes System aus ineinandergreifenden Komponenten und Mechanismen entwickelt, um Eindringlinge zu bekämpfen, Infektionen zu verhindern oder zu kontrollieren: das Immunsystem.

## 1.1 Spezifische Immunität

Immunzellen wie Makrophagen oder Neutrophile sind in der Lage, eindringende Mikroorganismen anhand gemeinsamer und konstanter Oberflächenstrukturen, etwa bakterieller Lipopolysaccharide, zu erkennen, zu binden und zu zerstören. Diese *angeborene Immunität* bietet einen wichtigen ersten, schnell aktivierbaren Schutzwall gegenüber vielen Infektionserregern. Andere Erreger, insbesondere Viren, haben keine solchen gemeinsamen Oberflächenmerkmale, sondern können nur individuell erkannt und abgewehrt werden. Dazu ist der Erwerb einer *spezifischen* oder *adaptiven Immunität* notwendig. Deren Hauptakteure sind die *Lymphozyten*. Jeder Lymphozyt hat seine eigene, durch gesteuerte Zufallsprozesse zustandegekommene und nun feststehende Spezifität. In einem frühen Reifungsstadium werden zunächst diejenigen Lymphozyten eliminiert, deren Spezifität sich gegen körpereigene Strukturen richten könnte. Hat ein Lymphozyt diese Selektion überstanden, zirkuliert er durch den Körper und die lymphatischen Organe, zunächst *naiv* und inaktiv, aber stets bereit, auf die erste Begegnung mit dem *Antigen*, das von ihm und nur ihm erkannt wird, mit einer Vermehrung und Aktivierung zu reagieren und so eine effektive spezifische Abwehr zustande zu bringen. Nach Zurückdrängung des Erregers bleibt, zur Sicherung des *immunologischen Gedächtnisses*, eine Anzahl von besonders leicht aktivierbaren Gedächtnis-Lymphozyten zurück, die dafür sorgen,

daß die Reaktion gegenüber einer Zweitinfektion mit dem gleichen Erreger schneller und effizienter erfolgt.

## 1.2 Antigene und Antigenpräsentation

Seit den sechziger Jahren weiß man, daß Lymphozyten sich in – lichtmikroskopisch ununterscheidbare – B-Zellen und T-Zellen unterteilen, die dieses Prinzip auf ihre jeweils eigene Weise ausprägen. B-Zellen entwickeln sich nach entsprechender Aktivierung zu Plasmazellen, deren Aufgabe die Herstellung von Antikörpern ist. Antikörper begründen die „lösliche“, *humorale Immunität*. Ein Antikörper ist ein lösliches Proteinmolekül, das eine bestimmte dreidimensionale Molekülstruktur, ein *Epitop*, spezifisch bindet. Ein solches Epitop ist in der Regel ein Abschnitt eines löslichen Proteins oder eines Proteins eines Virus oder Mikroorganismus. Die Bindung des Antikörpers markiert das Antigen und vermittelt so dessen Aufnahme und Abbau durch Freßzellen, zum Beispiel Makrophagen. Lösliche Toxine oder Viren können allein durch die Bindung des Antikörpers bereits inaktiviert werden, etwa weil ihre (für den Wirt schädliche) Interaktion mit Zellen nun blockiert ist, man spricht dann von einem *neutralisierenden* Antikörper.

Zur Abwehr von bereits virusinfizierten oder anderswie krankhaft veränderten körpereigenen Zellen, die solche Epitope nicht auf ihrer Oberfläche aufweisen, hat sich ein System entwickelt, das die direkte Erkennung und Vernichtung der abnormen Zellen durch zytotoxische T-Zellen (CTL) erlaubt. Ein Teilschritt des normalen Stoffwechsels zellulärer Proteine ist ihr Abbau zu kurzen Peptidfragmenten durch einen proteinverdauenden Multienzymkomplex, das *Proteasom*, und weitere Enzyme des Zytoplasmas. Solche Peptide können durch einen Transporter ins endoplasmatische Retikulum befördert werden, auf dessen Innenseite sie eine stabile Bindung mit membranständigen *MHC-Klasse-I-Molekülen* eingehen. Die Klasse-I-Moleküle, beladen mit dem Peptid, gelangen an die Zelloberfläche und *präsentieren* das Peptid dem Immunsystem als Antigen. Eine T-Zelle der passenden Spezifität kann dann diesen MHC-Peptid-Komplex auf der antigenpräsentierenden Zelle (APC) erkennen. Dies geschieht durch Bindung des Komplexes durch dasjenige Molekül auf der T-Zelle, das ihre Spezifität definiert, den *T-Zell-Rezeptors (TCR)*. Während Klasse-I-Moleküle mitsamt dem dazugehörigen Antigen-



Prozessierungsapparat von den meisten Körperzellen exprimiert werden und diese so der Kontrolle durch das Immunsystem zugänglich machen, exprimieren sogenannte professionelle antigenpräsentierende Zellen (PAPC) ein zusätzliches analoges Antigenpräsentierungssystem auf der Basis von *MHC-Klasse-II-Molekülen*.

### 1.3 Professionelle antigenpräsentierende Zellen

PAPC sind Zellen, die gezielt Antigene aufnehmen und prozessieren, um sie T-Zellen in einem molekularen Kontext zu präsentieren, der eine optimale Stimulation gewährleistet und insbesondere auch die Aktivierung *naiver* T-Zellen bewirkt, die nie zuvor ihr spezifisches Antigen „gesehen“ haben. Die wichtigsten PAPC sind dendritische Zellen (DC), Makrophagen und aktivierte B-Zellen. Diesen Zelltypen gemeinsam ist die Expression von MHC Klasse I und II und die Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle wie *B7.1* und *B7.2*. Gemäß der „Zwei-Signal-Hypothese“ liefern kostimulatorische Moleküle das zweite Signal, das für die Aktivierung naiver T-Zellen zusätzlich zum präsentierten spezifischen Antigen notwendig ist. Da PAPC beide MHC-Klassen exprimieren, sind sie zur Aktivierung der beiden wichtigen Klassen antigenspezifischer T-Zellen befähigt, nämlich der CD4<sup>+</sup> und der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen. CD8<sup>+</sup>-T-Zellen erkennen Antigene im Kontext von MHC I; die meisten zytotoxischen T-Zellen fallen in diese Kategorie. Nach einer ersten Aktivierung durch die PAPC sind diese dann befähigt, gewöhnliche Körperzellen zu erkennen und zytotoxisch anzugreifen, die lediglich das MHC-I-präsentierte Antigen, ohne Kostimulus, präsentieren. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen dagegen erkennen MHC-II-restringierte Antigene. Ihre Aufgabe ist die Aktivierung von für das gleiche Antigen spezifischen B-Zellen, die deren Ausdifferenzierung zu Plasmazellen einleitet, und die Makrophagen-Aktivierung; daneben können CD4<sup>+</sup>-T-Zellen auch, wie CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, zytotoxisch aktiv sein.

Trotz dieses ausgefeilten Systems zur Infektionskontrolle gelingt es Infektionserregern immer wieder, die Kontrolle durch das Immunsystem zu unterlaufen. Besonders interessante Beispiele für die Koexistenz von Erreger und Immunsystem bieten dabei die *Herpesviren*.

## 1.4 Herpesviren

Die Herpesviren gehören, neben den Pockenviren, zu den größten und komplexesten Viren. Während Papillomviren, um ein Beispiel für „kleine“ Viren zu nennen, auf einem Genom von 8000 Basenpaaren lediglich 9 – 10 Gene in dichter Packung tragen, besteht das Genom von Herpesviren aus 150 000 bis 250 000 Basenpaaren und codiert für 100 bis über 200 Gene. Dieser Komplexität entspricht das komplexe Verhalten dieser Viren bei der Infektion. Typisch für Herpesviren ist die Befähigung zu latenter, nicht virusproduzierender Infektion. Bei dieser ist die virale Genexpression und damit auch die Möglichkeit der Bekämpfung der Infektion durch die zelluläre Immunität stark reduziert. So kommt es, daß Herpesviren in der Regel eine lebenslange Infektion etablieren, die oft asymptomatisch bleibt. Als Folge davon beträgt bei mindestens 4 der 8 bekannten humanen Herpesviren die Durchseuchungsrate der gesunden erwachsenen Bevölkerung jeweils über 90%, so beim Herpes-Simplex-Virus 1, beim Windpockenvirus (Varicella-Zoster-Virus, VZV), beim humanen Herpesvirus 6, das das Dreitagefieber verursacht, und beim Epstein-Barr-Virus. Auch die restlichen Herpesviren sind, soweit Daten vorliegen, weit verbreitet. Aus der latenten Infektion können Herpesviren zu lytischer, produktiver Infektion reaktiviert werden. Manche Herpesviren bewirken eine kontinuierliche lytische Replikation in bestimmten Zellen ihres Zielzellspektrums, während sie in anderen Zellen latent bleiben und diese als Virusreservoir nutzen (so das Epstein-Barr-Virus); andere Herpesviren werden sporadisch aus der Latenz reaktiviert, mit entsprechenden Symptomen wie den typischen Lippenbläschen beim Herpes-simplex-I-Virus oder auch symptomlos wie beim Cytomegalovirus.

## 1.5 Das Epstein-Barr-Virus

Über 95% der gesunden Erwachsenen sind mit Epstein-Barr-Virus (EBV) infiziert. EBV infiziert seinen Träger lebenslang, in der Regel ohne Krankheitssymptome hervorzurufen. Die Infektion erfolgt durch Speichelkontakt. Auch die Primärinfektion ist im Kindesalter in der Regel symptomlos. Durch veränderte Hygienegewohnheiten in den Industrieländern findet die Primärinfektion aber immer öfter erst im jugendlichen- oder frühen Erwachsenenalter statt. Bei einer solchen verspäteten Primärinfektion kommt es in bis zu 50% der Fälle (Faulkner et al., 2000) zur *infektiösen*

*Mononukleose* (dem „Pfeifferschen Drüsenfieber“), die durch Lymphoproliferation und allgemeine Entzündungserscheinungen gekennzeichnet ist. Die Symptome klingen normalerweise innerhalb einiger Wochen vollständig ab, es gibt aber auch chronische Verlaufsformen. Beim gesunden Infizierten persistiert das Virus in B-Zellen des peripheren Blutes. Eine von  $10^4$  –  $10^6$  B-Zellen ist in diesem Fall latent mit EBV infiziert. Lytisch repliziert das Virus in Epithelzellen der Rachenschleimhaut. Daher scheidet ein Infizierter lebenslang infektiöses Virus im Speichel aus. Ob beim ersten Viruskontakt die Infektion des Schleimhautepithels der Besiedlung des B-Zell-Kompartiments vorausgeht oder umgekehrt, ist nicht klar. In vitro infiziert das Virus hocheffizient humane B-Zellen, die Infektion von epithelialen Zellen ist möglich, aber weniger effizient (Imai et al., 1998). Wichtig für die effiziente Infektion von B-Zellen ist die Wechselwirkung des Komplementrezeptors 2 (CR2 oder CD21) auf der Zelloberfläche mit dem Glykoprotein gp350 auf dem Virus. Wie aber aus der Infizierbarkeit CD21-negativer epithelialer Zellen (Yoshiyama et al., 1997) und der Infektiosität gp350-deletierter Virusmutanten (Janz et al., 2000) zu ersehen ist, sind auf Virus- wie auf Zellseite alternative, wenngleich ineffektivere Infektionsmechanismen möglich. Auch Monozyten sind in vitro mit EBV infizierbar (Savard et al., 2000). Die prinzipielle Infizierbarkeit von T-Zellen wird insbesondere durch das Vorkommen von EBV-assoziierten T-Zell-Lymphomen demonstriert.

## 1.6 EBV-assoziierte Transformation in vivo: Tumorerkrankungen

EBV ist mit verschiedenen Tumorerkrankungen assoziiert und höchstwahrscheinlich an deren Entstehung beteiligt (Rickinson und Kieff, 1996). EBV-assoziierte Tumorerkrankungen leiten sich nicht nur von B-Zellen, sondern auch von epithelialen Zellen, T-Zellen und möglicherweise lymphoiden Vorläuferzellen ab. Für die jeweilige Tumorart charakteristisch ist das Muster der Expression latenter EBV-Gene in den virustragenden Zellen. Zuerst entdeckt wurde EBV in Zelllinien aus einem *Burkitt-Lymphom*, einem B-Zell-Tumor, der häufigsten Tumorerkrankung bei Kindern in bestimmten Regionen Afrikas. Die in Afrika endemische Form ist zu 100% mit EBV assoziiert. Das Burkitt-Lymphom ist das Musterbeispiel für die sogenannte Latenz I (Rowe et al., 1992), bei der nur ein einziges EBV-Protein exprimiert wird, nämlich das *Epstein-Barr nuclear antigen* EBNA1, und zwar durch Betätigung eines von mehreren möglichen Promotoren, des FQp-Promotors.

Der Epithel-Tropismus von EBV spiegelt sich wieder in seiner 100%-Assoziation mit *niedrig differenzierten Nasopharynxkarzinomen*, die insbesondere in Südchina häufig sind. Unterschiedlich stark ist die EBV-Assoziation verschiedener Formen des Morbus Hodgkin, bei dem es sich möglicherweise um ein Malignom B-lymphoider Vorläuferzellen handelt. Seltener sind verschiedene Typen von T-Zell-Lymphomen, darunter zu 100% EBV-assoziierte Formen. Diesen Tumorformen gemeinsam ist die EBV-Infektion des Latenztyps II, d.h. mit Expression von EBNA1 (vom FQp-Promotor) und zusätzlich von einem oder beiden der *latenten Membranproteine* LMP1 und LMP2.

*Immunoblastische Lymphome* treten hauptsächlich bei Immunsupprimierten auf, etwa bei medikamentöser Immunsuppression nach therapeutischer Transplantation oder in der Spätphase der AIDS-Erkrankung. Hier liegt EBV in der Latenz III vor. Das bedeutet, daß in diesen Zellen sämtliche latenten EBV-Proteine, nämlich die nukleären Antigene EBNA1 (diesmal exprimiert von den Cp/Wp-Promotoren), EBNA2, 3A, 3B, 3C und EBNA-LP und die latenten Membranproteine LMP1 und 2 exprimiert werden.

## 1.7 Transformation durch EBV in vitro

Diese variantenreiche Assoziation von EBV mit verschiedenen Tumorerkrankungen hat ihr Gegenstück in dem Phänomen, daß das Virus in vitro mit hoher Effizienz primäre humane B-Zellen infiziert und immortalisiert (Pope et al., 1968). Es entstehen unbegrenzt proliferierende B-Zelllinien, genannt lymphoblastoide Zelllinien (LCLs), in denen EBV überwiegend latent vorliegt. Diese EBV-Transformation ist die einfachste Möglichkeit der Herstellung einer permanenten Zelllinie aus einem beliebigen gesunden humanen Spender. Sie ist außerdem das einfachste in-vitro-Modell der EBV-Infektion und ein interessantes Modell der zelltypspezifischen Transformation. Daher wurde die Transformation von B-Zellen durch EBV detailliert untersucht. In LCLs liegt EBV überwiegend im Latenzzustand III vor, mit Expression sämtlicher latenter Proteine. Man beobachtet allerdings in der Regel, daß in einem kleinen Anteil der Zellen einer LCL spontan der lytische Zyklus induziert wird, lytische Antigene exprimiert werden und daher infektiöses Virus produziert wird.

Aus Untersuchungen mit Virusmutanten weiß man, daß die Mehrzahl der latenten Proteine für die B-Zell-Immortalisierung durch in-vitro-Infektion mit EBV unentbehrlich ist, also eine Immortalisierung durch Viren mit Mutationen oder Deletionen in einzelnen latenten Genen oft nicht mehr erfolgt. Umgekehrt gelang es, zu zeigen, daß ein DNA-Konstrukt aus Teilbereichen des EBV-Genoms, das weniger als die Hälfte der Basensequenz umfaßt und im wesentlichen sämtliche latente Gene enthält, zur Immortalisierung von B-Zellen ausreicht (Kempkes et al., 1995). Dieses Konstrukt wird *mini-EBV* genannt, die immortalisierte Zelllinie *mini-LCL*. Weiter unten wird näheres dazu erläutert.

## 1.8 Immunität gegenüber EBV

Die überschießende Expansion reaktiver T-Zellen bei der EBV-Primärinfektion jenseits des Kindesalters, die für die Symptome der infektiösen Mononukleose hauptverantwortlich ist, illustriert die starke Immunogenität von EBV für das zelluläre Immunsystem. Seit der Entwicklung von Techniken, die die Reaktivierung und Expansion von T-Zellen in Interleukin-2-konditioniertem Kulturmedium bei gleichzeitiger Bereitstellung eines geeigneten Antigen-Stimulus ermöglichen (Gillis et al., 1978), wird die T-Zell-Immunität gegenüber EBV eingehend in vitro untersucht. Das wird dadurch in besonderem Maß erleichtert, daß für EBV als antigenpräsentierende Zelle die autologe LCL zur Verfügung steht. Sie ist zur Verwendung als antigenpräsentierende Zelle zur T-Zell-Stimulation aus zwei Gründen gut geeignet. Zum einen exprimieren LCLs mehrere wichtige EBV-Antigene. Zum anderen führt die EBV-Infektion zu LCL-Zellen mit einem aktivierten B-Zell-Phänotyp, der nicht nur durch das entsprechende Proliferationsverhalten, sondern auch durch verstärkte Expression von Klasse I und II, T-zell-kostimulatorischen und Zelladhäsionsmolekülen sowie die Sekretion verschiedener Zytokine gekennzeichnet ist.

Es überrascht daher nicht, daß die in-vitro-Stimulation von peripheren Blutzellen gesunder viruspositiver Spender durch autologe LCLs als antigenpräsentierende Zellen zu einer massiven Reaktivierung und Expansion EBV-spezifischer, HLA-restringierter cytotoxischer T-Zellen führt (Rickinson et al., 1981). Dominante Zielantigene dieser überwiegend aus CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bestehenden cytotoxischen Antwort sind insbesondere die Proteine EBNA3A, 3B und 3C, aber auch in geringerem Maß

die anderen in LCLs exprimierten EBV-Proteine mit der Ausnahme von EBNA-LP. Inzwischen wurden über 50 CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope der latenten EBV-Proteine identifiziert (Khanna und Burrows, 2000). EBNA1 stellt einen interessanten Sonderfall dar: obwohl ein EBNA1-spezifisches CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Gedächtnis bei viruspositiven Spendern deutlich ausgeprägt und durch LCL-Stimulation gut reaktivierbar sein kann (Blake et al., 2000; Blake et al., 1997), können diese T-Zellen keine EBNA1-exprimierenden Zellen erkennen und angreifen. Eine Strukturkomponente von EBNA1, die Glycin-Alanin-Repeats, verhindern seine proteasomale Prozessierung und damit die Präsentation von Epitopen aus endogen exprimiertem EBNA1 auf HLA-Klasse-I-Molekülen (Levitskaya et al., 1997; Sharipo et al., 1998). Exogenes, also etwa mit Material aus abgestorbenen Nachbarzellen der LCL-Kultur endozytotisch aufgenommenes EBNA1 wird dagegen effektiv prozessiert und präsentiert. Da EBNA1 das einzige EBV-Protein ist, das für alle Formen der latenten Infektion unentbehrlich zu sein scheint, liegt hier ein Mechanismus vor, durch den EBV sich gezielt einer zytotoxischen Immunantwort gegenüber Latenz-I/II-infizierten Zellen entzieht.

Auch die Expression eines viralen Homologs des Zytokins Interleukin-10 wird oft als Strategie des EBV interpretiert, sich einer antiviralen Immunantwort zu entziehen. Das *virale Interleukin-10* wird exprimiert vom Leserahmen BCRF1 und ist exprimiert in Zellen des lytischen Zyklus, aber auch in der Frühphase der B-Zell-Infektion durch EBV. Die Expression von vIL-10 scheint notwendig für den in vitro darauf folgenden Immortalisierungsprozeß zu sein (Miyazaki et al., 1993). Die Expression eines für die HLA-Klasse-I-restringierte Antigenexpression wesentlichen Transporters, TAP1, wird durch vIL-10 in dieser Phase stark verringert (Zeidler et al., 1997). Nach abgelaufener Immortalisierung, also bei etablierten LCLs, wird statt des viralen vIL-10 das zelluläre Homolog (cIL-10) exprimiert. IL-10 gilt als antiinflammatorisches Zytokin; durch Wirkung auf APC kann es die T-Zell-Proliferation indirekt negativ beeinflussen (de Waal Malefyt et al., 1991; Steinbrink et al., 1999), dagegen wird die Proliferation aktivierter CD8<sup>+</sup>-T-Zellen direkt positiv beeinflusst (Groux et al., 1998). In einem Tumormodell der Maus wiederum wirkt vIL-10 immunsuppressiv, cIL-10 dagegen immunstimulatorisch (Berman et al., 1996). Immunsuppression als biologischer Sinn des viralen IL-10 im Rahmen der EBV-Infektion bleibt daher vorerst eine Hypothese. Die Expression des zellulären IL-10 verhindert letztlich jedenfalls nicht, daß LCLs einen stark T-zell-stimulatorischen Phänotyp ausprägen.

Die Dimension der zellulären Immunantwort gegenüber *lytischen* Proteinen des EBV (die von den latent infizierten Zellen innerhalb einer LCL, also der Mehrheit ihrer Zellen, nicht exprimiert werden) wurde ebenfalls vergleichsweise spät erkannt. Inzwischen ist klar, daß sie nicht nur bei der primären T-Zell-Aktivierung bei der infektiösen Mononukleose eine große Rolle spielt (Callan et al., 1998), bei der eine Vielzahl früher und später lytischer Proteine die Zielantigene sind. Auch bei latent infizierten Personen kann das für lytische EBV-Proteine spezifische T-Zell-Gedächtnis ähnlich stark ausgeprägt sein wie dasjenige für latente Proteine, wie am Beispiel von Epitopen aus den frühen lytischen EBV-Proteinen BMLF1 und BZLF1 gezeigt wurde (Tan et al., 1999). Interessanterweise lassen sich durch Stimulation mit der autologen LCL auch recht effizient T-Zellen reaktivieren, die für lytische EBV-Antigene spezifisch sind (Ibisch et al., 2000; Steven et al., 1997). Offenbar genügt dazu der geringe Anteil an lytisch infizierten Zellen innerhalb der LCL.

Bevor auf die dieser Arbeit zugrundeliegenden Vektoren auf der Basis des EBV näher eingegangen wird, wird noch ein weiteres für diese Arbeit wichtiges humanes Herpesvirus vorgestellt: das Cytomegalovirus.

## 1.9 Das humane Cytomegalovirus

Wie das Epstein-Barr-Virus ist das humane Cytomegalovirus (CMV) eines der humanen Herpesviren, die ihr lebenslanges Verweilen im menschlichen Körper und eine hohe Durchseuchungsrate durch Etablierung einer symptomlosen latenten Infektion bewerkstelligen. Auch bei CMV kann die latente Infektion selbst durch massive Gegenmaßnahmen des zellulären Immunsystems nicht unterbunden werden. Die Angaben über das Alter des Infektionserwerbs (0.2 – 2% *in utero*, 8 – 60% in den ersten 6 Lebensmonaten, 40 – 80% vor der Pubertät) und der Anteil der infizierten Erwachsenen (50 – nahe 100%) variieren stark je nach Land und sozialer Gruppenzugehörigkeit. Bei gesunden Blutspendern am Münchener Klinikum Großhadern (Altersschwerpunkt 20 – 40 Jahre) beträgt der Anteil CMV-Seropositiver etwa 50% (G. Wittmann, persönl. Mitteilung). Infektiöses Virus wird in Speichel, Muttermilch und verschiedene Körperflüssigkeiten ausgeschieden. Wahrscheinlich ist für die horizontale Infektion enger Kontakt erforderlich. Nach Primärinfektion ist man jahrelang Virusausscheider.

Später wird das Virus aus der latenten Infektion gelegentlich symptomlos reaktiviert, verbunden mit zeitweiliger Virusausscheidung.

Beim Gesunden bleibt die Infektion normalerweise symptomlos. In selteneren Fällen verursacht die Primärinfektion bei Erwachsenen ein Syndrom mit den gleichen Symptomen wie die EBV-assoziierte infektiöse Mononukleose. Von großer Bedeutung ist die kongenitale CMV-Infektion, die geschätzt bei etwa 10% der intrauterin Infizierten zu Schäden des zentralen Nervensystems führt. Damit könnte CMV die häufigste Ursache für neuronale Entwicklungsstörungen bei Kindern sein (Fowler et al., 1992). Am häufigsten sind Gehörschäden. Bei einer Primärinfektion der Mutter mit CMV während der Schwangerschaft ist das Risiko der Ansteckung des Ungeborenen hoch und liegt bei 35 – 50% (Stagno et al., 1986).

Ein bedeutendes klinisches Problem ist CMV nach wie vor bei Patienten mit Immunsuppression, sei sie medikamentös herbeigeführt wie nach einer Organ- oder Blutstammzelltransplantation oder bedingt durch das erworbene Immundefizienzsyndrom, AIDS. Die CMV-Infektion befällt und schädigt dabei verschiedene Organe wie die Lunge, den Magen-Darm-Trakt und die Leber. Bei Stammzelltransplantation besonders häufig ist eine interstitielle Pneumonie. Bei AIDS-Patienten ist oft auch das zentrale Nervensystem betroffen (Retinitis, Enzephalitis). Die klinisch apparente CMV-Infektion kann durch Virostatika wie Ganciclovir und Foscarnet unter Kontrolle gehalten werden. Ihre Nebenwirkungen (Leukopenie und Thrombopenie bei Gancyclovir, Nierentoxizität bei Foscarnet) setzen ihrem Einsatz aber Grenzen, und trotz routinemäßiger Gancyclovir-Anwendung bleibt CMV ein Risikofaktor, der die Mortalität nach Transplantation erhöht, sei es wegen nicht therapierbarer Infektionsfolgen oder wegen der Nebenwirkungen der antiviralen Therapie (Broers et al., 2000).

Als zelluläre Orte der latenten Infektion bei Gesunden wurden Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und ihre Vorläuferzellen beschrieben. Durch Zugabe inflammatorischer Zytokine, allogene Stimulation oder fibroblastenkonditioniertes Medium kann das Virus in diesen Zellen in vitro reaktiviert, also die lytische Virusproduktion provoziert werden (Hahn et al., 1998; Soderberg-Naucler et al., 1997). Bei klinisch apparenter CMV-Infektion befällt das Virus weitere Zelltypen, darunter besonders epitheliale Zellen der Nieren, des Magen/Darm-Trakts, der Lunge sowie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Hepatozyten. Während die Infektion von Fibroblasten in vivo seltener beobachtet wird, stellen Fibroblasten paradoxerweise die am besten



geeignete Zielzelle einer lytischen CMV-Infektion *in vitro* dar. Die *in-vitro*-Infektion von Fibroblasten durch CMV-haltige Körperflüssigkeiten wird daher als diagnostische Nachweismethode für Virusausscheidung (Virämie) verwendet, und die Passage über Fibroblasten ist die klassische Methode zur Kultivierung und Propagierung von CMV.

## 1.10 Immunität gegenüber CMV

CMV induziert wie andere Herpesviren, insbesondere EBV, eine massive Abwehrreaktion des zellulären und humoralen Immunsystems. Das wird etwa dadurch veranschaulicht, daß bei gesunden Seropositiven mehrere Prozent der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen des Patienten spezifisch für ein einziges CMV-Epitop sein können (Gillespie et al., 2000; Kern et al., 1999). Die große Bedeutung einer ständigen intakten Immunkontrolle wird durch die Inzidenz und Schwere von CMV-Komplikationen bei Immunsupprimierten deutlich, die durch ein bei Gesunden im allgemeinen harmloses Virus verursacht werden. Wie EBV infiziert CMV Blutzellen mit ausgeprägter Antigenpräsentationsfunktion, in diesem Fall Monozyten und Makrophagen, was ein Grund für die starke Immunogenität des Virus und die Evolution mehrerer immunevasiver Strategien (Loenen et al., 2001) durch das Virus sein könnte. Mindestens vier virale Proteine (US2, 3, 6 und 11) interferieren mit der HLA-restringierten Antigenpräsentation durch Inhibition von TAP-Peptidtransportern, Dislokation und Abbau von HLA-Molekülen. 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 *natural-killer*-vermittelte Virusabwehr beeinträchtigt. Zusätzlich kodiert CMV für mehrere Chemokinrezeptor- und Cytokin-Analoga.

Diese ganzen Vorkehrungen verhindern aber nicht die Etablierung eines ausgeprägten T-Zell-Gedächtnisses gegenüber CMV (Reddehase, 2000). Eine besonders starke cytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort richtet sich bei der Mehrzahl der CMV-Seropositiven gegen die viralen Antigene pp65 und IE1 (Gyulai et al., 2000; Kern et al., 1999). Das Glykoprotein pp65 ist eine Hauptkomponente des viralen Teguments und ist daher, schon vor dem Beginn der viralen Genexpression, als Protein in der neu infizierten Zelle vorhanden. Daher kann pp65 unmittelbar nach Infektion prozessiert und durch HLA Klasse I präsentiert werden (Riddell et al., 1991). Die Generierung

pp65-spezifischer T-Zellen in vitro wurde dadurch erleichtert, daß pp65 im Standard-CMV-Kultivierungssystem, d. h. von lytisch infizierten humanen Fibroblasten, besonders stark exprimiert wird. Die Bedeutung weiterer CMV-CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antigene, insbesondere IE1, wurde vielleicht deshalb unterschätzt, weil möglicherweise im Fibroblastensystem das pp65-Protein die Prozessierung oder Präsentation anderer Antigene selektiv blockiert (Gilbert et al., 1996). Inzwischen ist klar, daß pp65 und IE1 mehrere immundominante Epitope aufweisen, gegen die bei der Mehrzahl der Infizierten des passenden HLA-Typs spezifische Gedächtnis-T-Zellen gefunden werden. Spezifische tetramere HLA-Klasse-I/Peptid-Komplexe („Tetramere“) haben den Nachweis und die Quantifizierung solcher T-Zellen stark vereinfacht (Gillespie et al., 2000; Singhal et al., 2000).

### **1.11 Antivirale Therapie mit spezifischen T-Zellen**

Die starke antivirale zytotoxische T-Zell-Immunität gegen EBV und CMV sowie die jeweilige Existenz eines in-vitro-Kultivierungssystems haben ermöglicht, daß eine Prophylaxe oder Therapie von virusbedingten Syndromen durch Verabreichung von virusspezifischen T-Zellen bereits für beide Viren klinisch erprobt wurde. Wie beschrieben, werden beide Viren, obwohl sie im Gesunden normalerweise apathogen sind, zum gravierenden Problem nach der therapeutisch herbeigeführten fundamentalen Immunsuppression im Kontext der allogenen hämatopoetischen Stammzelltransplantation, aber auch nach Transplantation solider Organe. Mehrere klinische Zentren praktizierten und praktizieren bereits die prophylaktische oder therapeutische Gabe EBV-spezifischer T-Zellen, so Gruppen in Memphis (Heslop et al., 1996; Rooney et al., 1995; Rooney et al., 1998), Edinburgh (Haque et al., 1998; Haque et al., 2001), Stockholm (Gustafsson et al., 2000) und Brisbane (Khanna et al., 1999), meist erfolgreich und ohne gravierende Nebenwirkungen. In allen Fällen handelt es sich um polyklonale T-Zelllinien, die durch Restimulation mit der LCL des T-Zell-Spenders generiert wurden. Die besonderen biologischen Eigenschaften von EBV und von LCLs begünstigen ein solches Vorgehen.

Das klassische Kultivierungssystem für CMV dagegen, lytisch infizierte Fibroblasten (Borysiewicz et al., 1983), eignet sich zwar prinzipiell zur Generierung virusspezifischer T-Zellen in vitro, weist aber im Vergleich zu EBV mit LCLs als antigenpräsen-

tierenden Zellen Nachteile auf. Bei Fibroblasten handelt es sich nicht um professionelle antigenpräsentierende Zellen. Sie exprimieren nur begrenzt HLA Klasse I, dagegen werden Klasse-II-Moleküle und Zelladhäsionsmoleküle nur nach IFN- $\gamma$ -Behandlung in gewissem Maß exprimiert. Außerdem ist die Verwendung von autologen oder allogenen frischen peripheren Blutzellen bei der Restimulation der T-Zellen nötig, die als *feeder* parakrine Stimuli liefern und eventuell als akzessorische antigenpräsentierende Zellen fungieren. Im Resultat entstehen zytotoxische T-Zellpopulationen, bei denen der geringe Anteil an virusspezifischen T-Zellen vor dem klinischen Einsatz eine Klonierung der T-Zellen und anschließende Expansion durch nicht antigenspezifische Stimulation nötig macht. Mit dieser Methode wurden die Pionierarbeiten auf dem Gebiet des adoptiven Transfers mit virusspezifischen T-Zellen geleistet (Riddell et al., 1992; Walter et al., 1995), bei denen 14 Stammzelltransplantations-Patienten prophylaktisch CMV-spezifische T-Zellen erhielten und frei von CMV-assoziierten Krankheitsbildern blieben. Wohl wegen des besonders hohen Aufwandes dieser Methode ist sie für den klinischen Einsatz von anderen nicht aufgegriffen worden.

Stattdessen werden zur Zeit Systeme entwickelt, die durch Verwendung von Zellen mit professionell antigenpräsentierender Funktion und von definierten Proteinantigenen oder Peptidepitopen bessere Spezifität und Effektivität bei der Generierung CMV-spezifischer T-Zellen erzielen sollen. Als antigenpräsentierende Zellen werden insbesondere dendritische Zellen vorgeschlagen (Kleihauer et al., 2001; Peggs et al., 2001; Szmania et al., 2001). Eine andere zum klinischen Einsatz vorgesehene Methode verwendet als antigenpräsentierende Zellen EBV-immortalisierte LCLs, in denen durch retrovirale Vektoren das CMV-Antigen pp65 zur Expression gebracht wird (Sun et al., 2000; Sun et al., 1999b). In allen diesen Fällen sind noch keine klinischen Ergebnisse bekannt.

## **1.12 mini-EBV-Plasmide und EBV-Vektoren**

Die besondere Effizienz und Spezifität der Infektion von B-Zellen mit EBV und die dadurch bewirkte Immortalisation *in vitro* sind Eigenschaften, die die Entwicklung von EBV-Vektoren hochinteressant machen. Ein erster synthetischer, B-Zell-immortalisierender EBV-Vektor wurde durch Zusammenbau aus subgenomischen EBV-Frag-

menten realisiert: das *mini-EBV* (Kempkes et al., 1995). Abbildung 1 gibt einen Überblick über den Aufbau des EBV und des grundlegenden mini-EBV-Konstrukts mit der Codebezeichnung 1478.A. Das mini-EBV ist ein in *E.coli* propagierbares und modifizierbares Plasmid. Es wurde konsekutiv aus sieben Plasmidkonstrukten mit teilweise überlappenden Fragmenten des EBV-Genoms aufgebaut, deren Lage in der EBV-Genomkarte angedeutet ist. Die Konstruktion erfolgte in *E.coli* mit der „chromosomal building“-Technik (O'Connor et al., 1989), die mit homologer Rekombination funktioniert und den Um- und Aufbau von Plasmiden ermöglicht, deren Größe die Verwendung herkömmlicher gentechnologischer Methoden problematisch macht. Dieses mini-EBV umfaßt sämtliche für die latenten Proteine codierenden Sequenzen des EBV-Genoms sowie die regulatorischen Elemente, die für latente und lytische Replikation (oriP, oriLyt) sowie Verpackung in Viruspartikel (TR) nötig sind; es enthält 41% der Sequenz des EBV-Stamms B95.8.

Nachdem die Fähigkeit des mini-EBV zur Immortalisierung von B-Zellen gezeigt worden war, wurde am Beispiel des humanen Tumorantigens Mucin (MUC-1) erstmals untersucht, ob sich mini-EBVs als multifunktionelle Vektoren eignen, die nicht nur die Immortalisierung, sondern auch die Expression eines heterologen Antigens in den immortalisierten Zellen vermitteln können. In dieser Absicht wurde ein Mucin-mini-EBV konstruiert, mit dem die Herstellung konstitutiv Mucin exprimierender mini-LCLs gelang (Kilger et al., 1999). Die Immortalisierung von B-Zellen durch das mini-EBV wurde zunächst durch Transfektion mit der Plasmid-DNA bewerkstelligt, ein für den Routineeinsatz aufwendiges Verfahren, da B-Zellen notorisch schwer zu transfizieren sind. Eine Vereinfachung war die Benutzung des immortalisierungsinkompetenten EBV-Stamms HH514 als Helfervirus und der gleichnamigen Zelllinie als Verpackungszelllinie (Kilger et al., 1999). Es erwies sich, daß mini-EBV-DNA von der Zelllinie HH514 effizient in infektiöse Partikel verpackt werden konnte. Gleichzeitig wurden allerdings, wie zu erwarten, infektiöse HH514-Viren produziert, und es fand in gewissem, variablem Umfang Koinfektion von B-Zellen mit mini-EBV und HH514 statt. Das machte jeweils die individuelle Analyse einer Anzahl immortalisierter Klone zur Auffindung eines helfervirusfreien Klons notwendig. Auch wegen der prinzipiellen Möglichkeit der homologen Rekombination zwischen mini-EBV und HH514 in doppelt infizierten Klonen während der EBV-typischen Immortalisationszeit von mindestens 3 bis 4 Wochen erschien die Weiterentwicklung der Methode im Sinne eines „virusfreien“ Systems attraktiv.

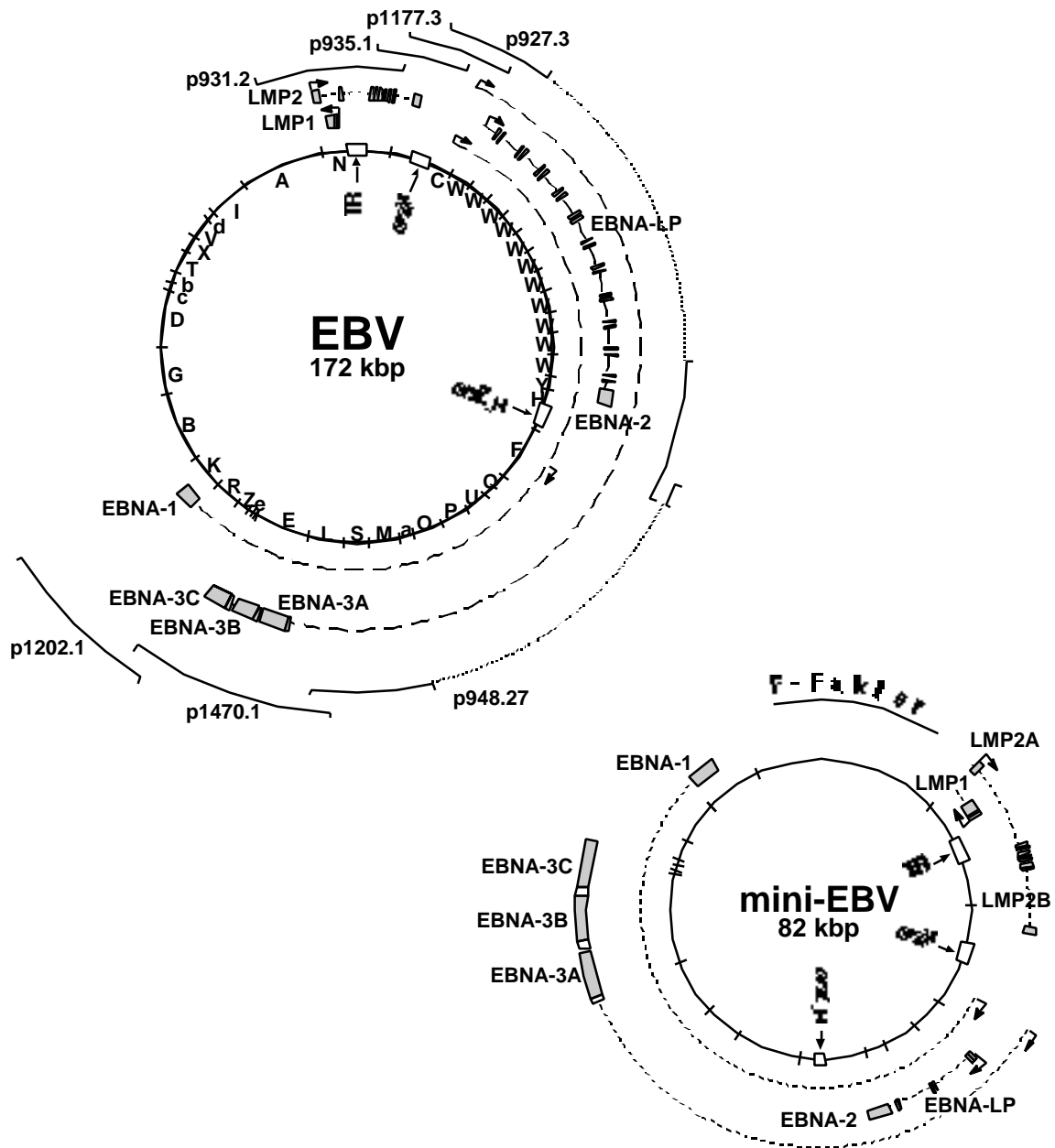


Abbildung 1-1. Das Genom des EBV-Stamms B95.8 (oben) und das mini-EBV-Plasmid 1478.A (unten). Die Nomenklatur der Elemente des EBV-Genoms baut auf der hier wiedergegebenen Bezeichnung für die bei *Bam*HI-Hydrolyse entstehenden Fragmente auf (Einzelbuchstaben in der EBV-Karte). Exemplarisch dargestellt sind die Leserahmen (Kästen in grau) und Primärtranskripte (gestrichelte Linien) der latenten Gene des EBV und ins mini-EBV übernommene regulatorische Elemente (Kästen in weiß). Um die EBV-Genomkarte herum sind die subgenomischen Fragmente gezeigt (mit Codenummern bezeichnet), aus denen das mini-EBV durch „chromosomal building“ konstruiert wurde (Kempkes et al., 1995).

Dieses Ziel wurde durch die Herstellung einer EBV-Verpackungszelllinie erster Generation erreicht (Delecluse et al., 1998). Die Voraussetzungen dafür wurden durch die Klonierung des gesamten EBV-Genoms in *E. coli* geschaffen, was die beliebige gezielte Modifikation des EBV-Genoms erstmals möglich machte. Durch Elimination der *terminal repeats* (TR), die als Signal in cis für die Verpackung des EBV-Genoms unentbehrlich sind, wurde nun ein unverpackbares EBV-Genom hergestellt, und durch stabile Transfektion der Standard-Zelllinie HEK293 mit dem TR<sup>-</sup>-EBV-Genom entstand eine Verpackungszelllinie für EBV-Vektoren, TR<sup>-</sup>2/293. In dieser Zelllinie kann durch Transfektion eines Expressionsplasmids für einen viralen Induktor, das Protein BZLF1, der lytische Zyklus induziert werden. Kotransfizierte mini-EBV-DNA wird daraufhin von der Zelllinie in infektiöse Virionen verpackt, die effizient humane B-Zellen infizieren und virusfrei immortalisieren (Delecluse et al., 1999).

Verschiedene Aspekte machen also aus dem mini-EBV einen attraktiven, neuartigen Vektor:

- in Form von EBV-ähnlichen Partikeln, die durch die Verpackungszelllinie dargestellt werden, infiziert es selektiv und effizient primäre humane B-Zellen,
- es induziert die unbegrenzte Proliferation dieser B-Zellen,
- es induziert einen aktivierten B-Zell-Phänotyp, der die infizierten Zellen zu guten antigenpräsentierenden Zellen machen sollte,
- das mini-EBV repliziert als episomales Plasmid, integriert nicht und interferiert daher nicht mit zellulären Funktionen auf Genomebene,
- die immortalisierten Zellen enthalten kein lytisch replikationsfähiges Virus, sind also „virusfrei“,
- ein um eine Expressionskassette für ein heterologes Antigen erweitertes mini-EBV kann dieses in den mini-LCLs zur konstitutiven Expression bringen.

### 1.13 Schlußfolgerung und Zielsetzung

Ein mini-EBV-Vektor sollte sich also dazu eignen, in einem Schritt eine immortale Zelllinie herzustellen, die zum einen gute generelle antigenpräsentierende Funktion hat und zum anderen ein beliebiges interessierendes Antigen konstitutiv exprimiert, prozessiert und HLA-restringiert präsentiert. Eine solche Zelllinie könnte wiederum ein effektives Werkzeug zur Stimulation einer spezifischen T-Zell-Antwort gegen dieses Antigen sein.

Die vorliegende Arbeit macht sich die Realisierung dieses Gedankens zum Ziel. Sie möchte, insbesondere am Modell des immundominanten HLA-restringierten CMV-Antigens pp65, den Weg von der Konstruktion des Vektors über die Herstellung der antigenpräsentierenden mini-LCLs bis hin zur in vitro-Reaktivierung und Expansion antigenspezifischer CD8<sup>+</sup>-T-Zellen und ihrer detaillierten phänotypischen und funktionellen Analyse darstellen. Sie untersucht, ob sich mit Hilfe von pp65mini-LCLs T-Zellen gewinnen lassen, die pp65-spezifisch, zytotoxisch aktiv und in hinreichender Zahl erhältlich sind, um sie klinisch in adoptiven Immuntherapieprotokollen anzuwenden.

Dazu waren folgende Aufgaben zu lösen:

- Konstruktion eines pp65-mini-EBV.
- Generierung von pp65mini-LCLs. Nachweis der Expression des Antigens pp65. Nachweis der Virusfreiheit.
- Generierung von polyklonalen T-Zelllinien verschiedener CMV-positiver und CMV-negativer Spender durch Stimulation mit der pp65mini-LCL.
- Analyse der zytotoxischen Aktivität der polyklonalen T-Zelllinien. Analyse der Spezifität für pp65 und für EBV-Antigene. Analyse der Epitopspezifität für pp65- und EBV-Epitope mittels HLA/Peptid-Tetrameren.

Die Ergebnisse werden diskutiert im Vergleich mit anderen vorgeschlagenen oder bereits klinisch erprobten Möglichkeiten der adoptiven Therapie mit spezifischen T-Zellen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
E. coli DH5	F <sup>-</sup> , 80dlacZ M15, (lacZYA-argF), U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk <sup>-</sup> , mk <sup>+</sup> ), supE44, <sup>-</sup> , thi-1, gyrA96, relA1
E. coli DH10B	F <sup>-</sup> , mcrA, (mrr-hsdRMS-mcrBC), 80dlacZ M15, lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, (ara, leu)7697, galU, galK, <sup>-</sup> , rpsL, nupG
E. coli CBTS	leu(am), trp(am), lacZ2210(am), galK(am), galE?, sueC, rpsL, supD43,74, sueB, metB1, RecA99(am)

E. coli CBTS wurde freundlicherweise von M. O'Connor zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.2 Zelllinien

Name	Art	Verwendung
B95.8	Krallenaaffe, lymphoid, latent/lytisch EBV-infiziert	Produktion von EBV B95.8
K562	human, Leukämie	NK-Zell-Target
BSC-40	Meerkatze, epithelial	Vaccinia-Propagierung
WI 38	human, embryonal, Lungenfibroblast	„feeder“ für B-Zell-Immortalisierung
MRC-5	human, embryonal, Lungenfibroblast	CMV-Propagierung
293/TR <sup>-</sup>	Adenovirus-immortalisierte Nierenzelle 293, mit „terminal repeat“-deletiertem EBV	mini-EBV-Verpackung



Zelllinien wurden über die ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA) oder die ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Großbritannien) bezogen. 293/TR<sup>-</sup> (Delecluse et al., 1999) wurden freundlicherweise von H.-J. Delecluse, München/Birmingham zur Verfügung gestellt.

Zusätzlich wurden verwendet:

1. primäre humane Fibroblastenzelllinien aus Oberhautbiopsien von freiwilligen Spendern; die Charakteristika dieser Spender sind weiter unten beschrieben.
2. im Rahmen dieser Arbeit hergestellte mini-LCLs und LCLs aus primären B-Lymphozyten verschiedener Spender; diese Zelllinien und Spender werden weiter unten beschrieben.

### 2.1.3 Viren

EBV B95.8	EBV-Laborstamm
CMV AD169	CMV-Laborstamm, fibroblastenadaptiert
vvpp65	rekombinantes Vacciniavirus (WR, Western Reserve) mit pp65-Expressionskassette
vvTR <sup>-</sup>	rekombinantes Vacciniavirus (WR, Western Reserve) ohne Expressionskassette

Viren wurden über die ATCC bezogen. Für die freundliche Überlassung von vvpp65 Dank an N. Blake, Birmingham; für die freundliche Überlassung von vvTR<sup>-</sup> Dank an A. B. Rickinson, Birmingham.

### 2.1.4 Plasmide

Für diese Arbeit wurden verwendet:

pSG-5	eukar. Expressionsplasmid mit SV40-Promotor (Stratagene)
p509	BZLF1-Expressionsplasmid
p1242.1	tet-shuttle zur Modifikation von EBV-Vektoren
p1478A (pV)	Mini-EBV (Kilger et al, 1999)

p1736 (pM)	Mini-EBV mit MUC-1-Expressionskassette (Kilger et al, 1999)
pDCM111	Resolvase-Expressionsplasmid

Im Rahmen dieser Arbeit wurden konstruiert und verwendet:

pT <sub>2</sub>	tet-shuttle (1242.1 mit SV40-Promotor-Kassette)
pE	mini-EBV mit EpCAM-Expressionskassette
pP (pp65-mini-EBV)	mini-EBV mit pp65-Expressionskassette
pV61,66,67	mini-EBV mit Expressionskassette für die Gene L1, E6, E7 des humanen Papillomvirus HPV-6
pV111,116,117	mini-EBV mit Expressionskassette für die Gene L1, E6, E7 des humanen Papillomvirus HPV-11

Alle mini-EBV-Plasmide mit Ausnahme von pE wurden konstruiert durch (1.) Einbau der codierenden genomischen Sequenz in einen Transfer-Vektor (tet-shuttle) mit SV40-Promotor-Expressionskassette (pT<sub>2</sub>), (2.) Vereinigung der Gesamtsequenz des Transfervektors mit der des mini-EBV 1478.A durch homologe Rekombination (das Produkt wird als Kointegrat bezeichnet) und (3.) Entfernung der nicht benötigten Teilsequenzen des Transfervektors aus dem Kointegrat durch *site-directed recombination*, dabei entsteht das fertige mini-EBV.

### 2.1.5 Antikörper

Für FACS-Analysen wurden monoklonale Antikörper gegen die Blutzell-Differenzierungsantigene CD3, CD4, CD8, CD11a/CD18, CD16, CD54, CD56, CD58, CD80 und CD86 sowie MHC I und II von Immunotech (Marseille), Dako (Hamburg) und Pharmingen/Becton-Dickinson (Heidelberg) bezogen. Der pp65-spezifische Antikörper 981 wurde von Biodesign (Saco, Maine), für den pp65-Antikörper 65-33 Dank an B. Plachter (Mainz). Diese beiden Antikörper wurden für intrazelluläre FACS-Analysen und *western blots* verwendet.

### 2.1.6 HLA/Peptid-Tetramere

Tetramere HLA/Peptid-Komplexe wurden von N. Khan, D. Croom-Carter, N. Blake und A. Hislop (alle vom CRC Institute for Cancer Studies, Birmingham) nach publizierten Methoden (Altman et al., 1996; Callan et al., 1998) hergestellt und freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

### 2.1.7 Sonstige Reagenzien

Agarose	Boehringer Mannheim/Roche
Anorganische Salze, Säuren, Basen	Merck
Antibiotika (Tetracyclin, Ampicillin, Chloramphenicol)	Sigma, Roche
Bakterienmedienkomponenten (Trypton, Hefeextrakt)	Gibco
BATDA-Ligand, Europium-Lösung	Wallac
Cäsiumchlorid	Sigma C-4036
Cyclosporin A	Sigma C-1832
DNA-modifizierende Enzyme -Estradiol	Fermentas, Roche, New England Biolabs Sigma E-2758
Ethidiumbromid	Merck
Fötales Kälberserum	Seromed/Biochrom, Chargen 569U und 611A
Glycerol (Transformation)	Sigma G-5150
Hygromycin B	Calbiochem
Interferon- $\gamma$ , human rekombinant	Boehringer Mannheim/Roche
Interferon- $\gamma$ -Secretion-Assay	Miltenyi
Interleukin-2, nativ, gereinigt	Boehringer Mannheim/Roche
Organische Lösungsmittel, Alkohole	Merck
PBS-Tabletten	Gibco
Plasmidpräparation („Minipräps“)	„Qiaprep Spin“, Qiagen
Plasmidpräparation („Maxipräps“)	„Jetstar“, Genomed
Restriktionsenzyme	Fermentas, Roche, New England Biolabs
Taq-Polymerase, PCR-Reagenzien	Fermentas

Transfektionsreagenz	„Fugene“, Roche
Trypsin	Seromed/Biochrom
Zellkulturmedien und Zusätze	Seromed/Biochrom
Zytokine	Boehringer Mannheim/Roche

### 2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten	Costar, Falcon
Elektroporationsküvetten	PeqLab
Membranen für Western-Blot	„Immobilon P“, Millipore
Pipettenspitzen	Gilson
Röhrchen, steril, Zellkultur	Greiner
Sterilfilter	Millipore
Tiefkühlgefäße/Kryoröhrchen	Nunc
Zellkultur-Multiwell-Platten	Falcon
Zellkulturflaschen und -schalen	Nunc, Falcon
Zentrifugengefäße 1,5ml/2ml	Eppendorf

### 2.1.9 Geräte

Durchflußzytometer	„FACSCalibur“, Becton-Dickinson; „Epics“, Coulter
Elektroporator	„Gene Pulser“, Biorad
Fluorimeter für zeitaufgelöste Messungen	Wallac Multilabel Counter
Gelelektrophorese-Dokumentation	Cybertech CS1
Gelelektrophorese-Kammern	Stratagene
Gelelektrophorese-Netzgeräte	Bio-Rad, Consort
Glasgeräte	Schott
Inkubator für Zellkultur, CO <sub>2</sub> -begast	Heraeus
Mikroskop, Phasenkontrast-/UV-	Zeiss
PCR-Maschine	Biometra UNO
Pipetten, Mikroliter-	Gilson
Schüttelinkubatoren	„Certomat“, Braun
Sicherheitswerkbank Klasse II	Heraeus

Stickstoff-Tiefkühlagereinrichtung	Messer
Szintillationszähler	„TopCount“, Packard
Thermomixer	Eppendorf
Ultrazentrifugen	Beckman, Kontron
UV-Mikrophotometer	„GeneQuant Pro“, Pharmacia
UV-Transilluminator	LKB
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall

### 2.1.10 Dienstleistungen

DNA-Sequenzierungen	Sequiserie (Dr. Metzger), Vaterstetten
Oligonukleotidsynthese	ARK, Darmstadt; Metabion, Martinsried
Peptidsynthese	Alta Bioscience, Birmingham

## 2.2 Arbeiten mit DNA und Proteinen

Grundlegende DNA-Arbeitstechniken wurden gemäß Standardprotokollen angewandt (Sambrook et al., 1989). Dazu gehörten Phenolextraktion, Ethanolpräzipitation, die Konzentrationsbestimmung im Spektralphotometer, die Analyse oder Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen, enzymatische Restriktionshydrolysen, die Dephosphorylierung von DNA mit alkalischer Phosphatase, die Auffüllung 3'-rezessiver DNA-Enden mit Klenow-Polymerase, die Ligation freier DNA-Enden, die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* durch alkalische Lyse und Affinitätsmatrix-Reinigung (Plasmidpräparations-Kits von Qiagen und Genomed) oder durch Cäsiumchlorid-Gradientenzentrifugation.

Für *western blot*-Analysen wurden Zellysate gemäß Standardprotokollen (Sambrook et al., 1989) durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und durch Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran übertragen. Auf der Membran gebundene Proteine wurden mit Primärantikörper (Maus, monoklonal) und Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-Konjugat, anti-Maus) gefärbt und mit einer Chemolumineszenz-Methode (ECL-System, Amersham) sichtbar gemacht.

## 2.3 Arbeiten mit Bakterien

### 2.3.1 Bakterienkultur

Zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurde für Plasmide üblicher Größe (bis 15 kbp) der Laborstamm DH5<sup>+</sup> des Bakteriums *Escherichia coli*, für größere Plasmide alternativ der *E. coli*-Stamm DH10B verwendet. Zur Neukonstruktion von Plasmiden durch homologe Rekombination fand der temperatursensitiv recA-positive *E. coli*-Stamm CBTS (O'Connor et al., 1989) Verwendung.

Bakterien wurden unmittelbar aus der gefrorenen Stammkultur auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Auf Platten gewachsene Einzelkolonien wurden zur Anzucht von Flüssigkulturen in LB-Medium mit Antibiotikum verwendet. Plasmide tragende Bakterien wurden immer unter Selektionsbedingungen mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Zum Anlegen von Stammkulturen wurden bis zur Sättigung gewachsene Flüssigkulturen mit 7% DMSO versetzt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert.

LB-Medium bestand aus 1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt und 0,5% Kochsalz. LB-Agarplatten enthielten zusätzlich 1,5% Bacto-Agar. Die verwendeten Selektionsantibiotika waren Ampicillin (50  $\mu\text{g/ml}$ ), Chloramphenicol (30  $\mu\text{g/ml}$ ) und Tetracyclin (30  $\mu\text{g/ml}$ ) (alle von Sigma).

### 2.3.2 Transformation von Bakterien

Plasmide wurden durch Elektroporation (Chuang et al., 1995) oder durch Hitzeschockbehandlung (Inoue et al., 1990) in Bakterien eingebracht.

Zur Vorbereitung der Elektroporation wurden Bakterien bei Raumtemperatur in Flüssigkultur in SOB-Medium vermehrt und während der exponentiellen Wachstumsphase geerntet ( $\text{OD} = 0,5$ ). Ein Liter Bakterienkultur wurde auf Eis gekühlt, die Bakterien abzentrifugiert und mehrmals mit kaltem destilliertem Wasser, schließlich mit kaltem 10%igem Glycerol gewaschen, in 2 ml 10%igem Glycerol resuspendiert, in 100- $\mu\text{l}$ -Anteilen aliquotiert, auf Trockeneis eingefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Für die Elektroporation wurden die elektrokompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut, bis zu einem Mikroliter Plasmid (bis zu 500 ng DNA) oder Ligationsprodukt zugegeben

und in gekühlten Küvetten mit 1 mm Spaltbreite unter Benutzung eines Elektroporationsgerätes (GenePulser, Bio-Rad) elektroporiert. Ein Kondensator der eingestellten Kapazität 25  $\mu\text{F}$  wurde durch Anlegen einer Spannung von 1.25 kV aufgeladen und über die Probe, mit einem in Reihe geschalteten Widerstand von 200 Ohm, entladen. Eine Entladungszeit von über 4, vorzugsweise 5 Millisekunden bestätigte den genügend hohen Widerstand der Probe. Die Bakterien wurden sofort in 1 ml SOB-Medium überführt, bei der geeigneten permissiven Temperatur geschüttelt (eine Stunde bei 37°C bzw. zwei Stunden bei 30°C) und auf Platten mit Selektionsantibiotikum ausplattiert.

## **2.4 Arbeiten mit eukaryonten Zellen**

### **2.4.1 Kultivierung permanenter Zelllinien**

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C unter 5% Kohlendioxid und in wasserdampfgesättigter Atmosphäre gehalten. Standardmedium für Suspensionszellen und adhärente Zellen war RPMI 1640, supplementiert mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und Antibiotika (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Streptomycin und 100 U/ml Penicillin). Glutamin war als N-Acetylalanylglutamin enthalten („stabiles Glutamin“). Medien und Zusätze wurden von Biochrom, Berlin, bezogen.

EBV- und mini-EBV-immortalisierte B-Zelllinien (LCLs und mini-LCLs) wurden wöchentlich zweimal subkultiviert, dabei wurden Zellen und altes Medium nicht stärker als dreifach verdünnt. Die Kultur von T-Zelllinien wird weiter unten beschrieben. Andere Suspensionszelllinien wurden ein- bis zweimal wöchentlich zwei- bis zehnfach verdünnt subkultiviert. Als Quelle für infektiöses Wildtyp-EBV des Stammes B95.8 diente die gleichnamige Zelllinie. Als eine Zielzelle in Zytotoxizitätsexperimenten diente die HLA-Klasse II-negative humane Leukämiezelllinie K562.

Adhärente Zellen wurden zur Subkultivierung mit PBS serumfrei gewaschen, dann mit 0.05% Trypsin/0.02% EDTA (Biochrom) von der Wachstumsfläche gelöst, einmal in Medium mit FCS gewaschen und in entsprechender Verdünnung wieder ausplattiert. Humane primäre Oberhautfibroblasten-Zellkulturen wurden aus Hautbiopsien freiwilliger Spender angelegt, sie fanden als Zielzellen in Zytotoxizitätsexperimenten

Verwendung. Die embryonalen humanen primären Lungenfibroblastenzelllinien WI38 und MRC-5 wurden als „feeder“-Zellen bei mini-EBV-Infektionsexperimenten (WI38) bzw. zur Propagierung von humanem Cytomegalovirus (MRC-5) verwendet. Primäre Fibroblasten wurden ein- bis zweimal wöchentlich subkultiviert, dabei wurde jeweils, ausgehend von einer konfluenten Kultur, die Zahl der Zellen pro Fläche nicht stärker als dreifach verringert. Die Zelllinie BSC-40 aus der Grünen Meerkatze diente zur Propagierung von rekombinanten Vacciniaviren. Die EBV-Verpackungszelllinie 293/TR<sup>-</sup> (Delecluse et al., 1999) wurde zur Selektion auf das enthaltene rekombinante EBV-Genom mit 100 µg/ml Hygromycin (Calbiochem) kultiviert.

Die Zentrifugation von eukaryontischen Zellen zum Zweck der Konzentrierung oder des Waschens erfolgte in der Regel in 50-ml-Einmal-Zentrifugengefäßen bei 350 *g* (entspricht 1200 rpm in den verwendeten Ausschwingbecher-Tischzentrifugen von Hettich und Jouan) für 5 – 10 min bei 20°C. – Ausnahme: Trennungsschritt bei der Ficoll-Dichtezentrifugation, siehe Abschnitt 2.4.2.

Zur Kryokonservierung wurden Zellen ( $10^6$  –  $10^7$ , bei primären peripheren Blutzellen bis zu  $5 \cdot 10^7$ ) pro Aliquot in 0,75 ml Kulturmedium resuspendiert, auf Eis gekühlt, mit 0,75 ml kaltem FCS/DMSO (v/v 4:1) gemischt und in ein 1,8-ml-Kryogefäß (Nunc) überführt. Zur langsamen Abkühlung wurden die Zellen zunächst in einem allseitig verschlossenen Styroporbehälter ins –80°C-Gefriergerät gestellt. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen zur Dauerlagerung in der Gasphase über flüssigem Stickstoff in den entsprechenden Lagertank überführt.

Zur Rekultivierung kryokonservierter Zellen wurde der gefrorene Röhrcheninhalt durch Resuspension mit warmem Kulturmedium (Zimmertemperatur) möglichst schnell aufgetaut und in mindestens 20 ml Kulturmedium verdünnt und zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in Medium resuspendiert und kultiviert. Da LCLs und mini-LCLs besonders auf autokrine Stimuli angewiesen sind, wurde beim Auftauen dieser Zellen darauf geachtet, das anfängliche Kulturvolumen nach Auftauen klein zu halten, etwa entsprechend der Zelldichte einer halb gesättigten Kultur ( $1$  –  $2 \cdot 10^5$  Zellen pro ml).



### 2.4.2 Isolierung primärer humaner Lymphozyten

Als Quelle für humane Lymphozyten dienten (1.) frisch abgenommenes venöses Blut freiwilliger erwachsener Spender, (2.) Leukozytenkonzentrate (buffy coats), die vom Blutspendedienst des Bayerischen Roten Kreuzes, München, oder der Abteilung für Transfusionsmedizin des Klinikums Großhadern, München, bezogen wurden, (3.) Nabelschnurblut, das von der Frauenklinik Großhadern zur Verfügung gestellt wurde, oder (4.) Adenoidproben von ambulant operierten Patienten, meist Kindern, der HNO-Klinik Großhadern. Aus Adenoiden wurden Lymphozytenkonzentrate hergestellt, indem das mit Skalpell zerkleinerte Material unter Waschen mit PBS durch ein Zellsieb (100 µm; Cell Strainer, Becton-Dickinson) passiert wurde. Blut und Konzentrate wurden mindestens zweifach mit PBS verdünnt und mit Ficoll-Trennlösung der Dichte 1,07 („Biocoll“, Biochrom KG, Berlin) unterschichtet. Durch Zentrifugation (1000 g, 15 min) wird die Anreicherung von Monozyten, B- und T-Lymphozyten im Grenzbereich zwischen schwerer und leichter Flüssigkeitsphase erreicht. Diese Fraktion der mononukleären Zellen, bei Gewinnung aus peripherem Blut PBMC genannt (*peripheral blood mononuclear cells*), wurde geerntet, mehrfach gewaschen und in der Regel ohne weitere Fraktionierung als Ausgangsmaterial einerseits für B-Zell-Infektionen mit EBV-Vektoren, andererseits für T-Zell-Reaktivierungen verwendet.

### 2.4.3 Generierung von mini-EBV-Virionen

Die Generierung von mini-EBV-Virionen erfolgte durch die EBV-Verpackungszelllinie 293/TR<sup>-</sup> (Delecluse et al., 1999). Zur fortlaufenden Kultivierung wurden 293/TR<sup>-</sup>-Zellen mit hygromycinhaltigem (100 µg/ml) Standardmedium kultiviert. Zur Produktion von infektiösen mini-EBV-Virionen wurden 293/TR<sup>-</sup>-Zellen mit zwei Plasmiden kotransfiziert, dem zu verpackenden mini-EBV-Plasmid und dem Expressionsplasmid p509 für den Kofaktor BZLF1 zur Induktion des lytischen EBV-Programms. Der zur Transfektion bestimmte Anteil der Zellen wurde jeweils von der Wachstumsfläche gespült, zweimal mit PBS gewaschen und in Standardmedium ohne Hygromycin ausplattiert. Die Transfektion erfolgte nach drei bis fünf Tagen mit 30-50% konfluenten Zellen. Die Zellen einer 15-cm-Schale wurden in serumhaltigem Standardmedium mit 24 µg mini-EBV-Plasmid und 12 µg Plasmid p509, komplexiert mit 60 µl des Transfektionsreagens Fugene (Roche, Basel) nach dem Protokoll des

Herstellers, transfiziert. Nach 24 und 72 Stunden wurde jeweils das überstehende Medium vorsichtig abgenommen, verworfen und durch frisches ersetzt (12 ml pro 15-cm-Schale). 96 Stunden nach Transfektion (Tag 4) wurde das virionhaltige überstehende Medium geerntet, zur Abtrennung von Zellbestandteilen zentrifugiert (400 *g*, 10 min), filtriert (0.7  $\mu$ m), aliquotiert und eingefroren gelagert ( $-80^{\circ}\text{C}$ ). Der geerntete Überstand wurde durch frisches Medium ersetzt und die Ernte an Tag 5 und Tag 6 wiederholt. In einigen Fällen wurden die Virionen in den Überständen nach der Ernte durch Zentrifugation (15 000 *g*, 2 h) angereichert, in einem kleinen Volumen Medium resuspendiert und dann zur Lagerung eingefroren.

#### 2.4.4 Infektion von B-Zellen mit EBV oder EBV-Vektoren

Für die Generierung von mini-LCLs durch Infektion wurden frische PBMC oder Lymphozytenpräparate und frisch hergestellte (maximal 1 Tag nach Ernte) oder eingefrorene mini-EBV-Virionpräparate verwendet. Zur Vorbereitung wurden humane WI38-Fibroblasten, die als „*feeder*“ fungieren, auf die *wells* (Einzelgefäße) von 96-*well*-Platten verteilt, bis zur lockeren Konfluenz (ca. 20 000 Zellen/*well*) kultiviert und durch Gammastrahlung (50 Gy) einer Cäsium-137-Quelle wachstumsarretiert. Solche Platten, mit 200  $\mu$ l Medium je *well*, blieben bei Kultivierung im Brutschrank bis zu drei Wochen verwendbar. Zur Infektion wurden eine halbe Million PBMC oder Lymphozyten in 100  $\mu$ l Medium und 100  $\mu$ l mini-EBV-virionhaltiger Zellkulturüberstand in jedes *well* gegeben. Für die Negativkontrolle (auf endogene EBV-Infektion) wurden statt des mini-EBV-Überstandes 100  $\mu$ l Medium, für die Positivkontrolle (Immortalisierbarkeit) wurden stattdessen 10  $\mu$ l B95.8-Kulturüberstand (mit Wildtypvirus des gleichnamigen EBV-Stamms) in weiteren 90  $\mu$ l Medium verwendet. Nach 24 Stunden, und danach alle drei bis sechs Tage, wurde die Hälfte des überstehenden Mediums durch frisches Medium ersetzt. In den meisten Fällen war ein Auswachsen immortalisierter Zellen erstmals nach drei bis sechs Wochen offensichtlich, erkennbar an den typischen runden Zellaggregaten. Die Zellen wurden erst nach starker Proliferation im jeweiligen *well*, mit Gelbfärbung des Mediums, vorsichtig in größere Kulturgefäße expandiert. Dabei wurde das alte Medium beibehalten und jeweils das ein- bis zweifache Volumen neues Medium zugesetzt.

Im Falle erwachsener Spender wurde dem Standardmedium während der ersten vier Wochen Cyclosporin A zugesetzt (1 $\mu$ g/ml; Sigma), um eine T-Zell-Reaktivierung zu

unterbinden, bei Nabelschnurblut und bei Adenoidspendern im Kindesalter unterblieb dieser Zusatz. Bei Verwendung von Cyclosporin A wurde oft ein beschleunigtes Absterben der Fibroblasten-*feeder*-Zellen beobachtet. In einigen Fällen wurde daher bei der mini-EBV-Immortalisierung auf Fibroblasten-*feeder* verzichtet.

#### 2.4.5 PCR-Analyse von mini-LCLs

Bei jeder mini-LCL wurde durch PCR die Anwesenheit von mini-EBV-spezifischen Sequenzen (des Gens für die Chloramphenicol-Acetyltransferase) und die Abwesenheit von Wildtyp-EBV-spezifischen Sequenzen (des viralen Glykoproteins gp85) verifiziert. Dafür wurden die Primer cam-up (5'-TTC TGC CGA CAT GGA AGC CAT C-3'), cam-down (5'-GGA GTG AAT ACC ACG ACG ATT TCC-3'), gp85c (5'-TGG TCA GCA GCA GAT AGT GAA CG-3') und gp85d (5'-TGT GGA TGG GTT TCT TGG GC-3') in derselben Reaktionsmischung verwendet. Das Protokoll bestand aus 30 Amplifikationszyklen mit jeweils 45 Sekunden Denaturierung bei 96°C, Primer-Hybridisierung bei 59°C und Elongation bei 72°C.

Zur Aufbereitung von mini-LCLs und LCLs für die DNA-PCR-Analyse wurden die Zellen alkalisch lysiert, ein schnelles Verfahren ohne Isolation der DNA (Jiwa et al., 1989). Der wachsenden Zellkultur wurde eine Probe mit etwa 1 mm<sup>3</sup> Zellvolumen entnommen, in ein 1,5-ml-Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert. Das Kulturmedium wurde vollständig abgenommen und verworfen. Das Zellpellet wurde in 25 µl NaOH (50mM) resuspendiert und dadurch lysiert, das Lysat mit 3 Tropfen Mineralöl abgedeckt und die Probe 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurde die Probe mit 4 µl Tris HCl, pH 7 (1M), neutralisiert. Die Probe wurde kurz zentrifugiert (1 Minute Maximalgeschwindigkeit), um eventuell ausgefällte Partikel abzusetzen, und von der überstehenden Lösung wurde ein Mikroliter pro PCR-Reaktionsansatz (50 µl) eingesetzt.

#### 2.4.6 Generierung polyklonaler T-Zelllinien

Als Quelle für T-Zellen dienten kryokonservierte oder aus frischen Blutproben isolierte mononukleäre periphere Blutzellen (PBMC). Durch Restimulation mit einer autologen antigenexprimierenden mini-LCL wurden daraus polyklonale T-Zelllinien generiert. Es wurde ein Restimulationsprotokoll verwendet, das gegenwärtig zum Zweck

des klinischen adoptiven T-Zell-Transfers in klinischer Anwendung ist (Roskrow et al., 1998). Pro *well* (Einzelgefäß) einer 24-*well*-Platte wurden zwei Millionen PBMC und 50 000 mit 50 Gy bestrahlte mini-LCL-Zellen in 2 ml Standardmedium kokultiviert. Das entspricht einem Effektor/Stimulator-Verhältnis von E:S = 40:1. An Tag 10, und daraufhin alle sieben Tage, wurden die Zellen geerntet, gezählt und jeweils eine Million Zellen in 2 ml frischem Medium pro *well* weiterkultiviert, unter Zugabe einer Viertelmillion frisch bestrahlter mini-LCL-Zellen (E:S = 4:1). Ab Tag 10 wurden die Zellen während der sieben Tage zwischen den Restimulationen mindestens zweimal entweder mit frischem Medium versorgt oder, bei starker Vermehrung, expandiert. Im ersten Fall wurde die Hälfte des Überstandes abgenommen und durch frisches Medium ersetzt, im zweiten Fall wurde das Kulturvolumen durch Zugabe von frischem Medium verdoppelt. Ab Tag 15 wurde dem Medium Interleukin-2 zugesetzt (6 U/ml natives IL-2 aus humanen Lymphozyten, bezogen von Boehringer Mannheim/Roche).

#### 2.4.7 FACS-Analysen

Mini-LCLs wurden mit monoklonalen Antikörpern auf die Oberflächenexpression verschiedener Antigene (HLA Klasse I und II, B7.1, B7.2, ICAM-1, LFA-1, LFA-3) untersucht. Bei T-Zellpopulationen wurde die Expression von CD3, CD4, CD8, CD16 und CD56 analysiert. In der Regel wurden mindestens 100 000 Zellen je Färbung, resuspendiert in PBS/2% FCS, mit einer empirisch bestimmten Menge des entsprechenden monoklonalen Antikörpers 30 Minuten auf Eis gefärbt. Im Falle unkonjugierter (nicht mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierter) Antikörper wurden die Zellen mehrfach gewaschen und anschließend ein zweiter analog durchgeführter Färbeschritt mit einem gegen die entsprechenden Maus-Immunglobuline gerichteten, fluoreszenzmarkierten Sekundäntikörper durchgeführt. Die Zellen wurden entweder sofort, als vitale Zellen, im Durchflußzytometer (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) analysiert, oder sie wurden mit 0.25% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert und bis zur Analyse maximal 24 Stunden bei 4°C aufbewahrt. Die verwendeten Durchflußzytometer waren ein „Epics“-Gerät der Firma Coulter und ein „FACSCalibur“-Gerät des Herstellers Becton-Dickinson. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm „CellQuest“ von Becton-Dickinson.

Die intrazelluläre Expression von pp65 in mini-LCLs wurde durch Antikörperfärbung permeabilisierter Zellen und anschließende durchflußzytometrische Analyse untersucht. Die Zellen wurden mit 0.25% Paraformaldehyd in PBS 30 Minuten bei 4°C fixiert, mit 0.2% Tween-20/PBS 15 Minuten bei 37°C permeabilisiert, auf Eis mit pp65-spezifischem monoklonalem Antikörper (Klon 981 von Biodesign, Saco, Maine, USA oder Klon 65-33, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Bodo Plachter, Mainz) und anschließend mit fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper (Dianova, Hamburg) gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

#### **2.4.8 Interferon- -Sekretionsanalyse**

Der Anteil der T-Zellen, die das Effektorzytokin Interferon- sekretieren, wurde durch ein Verfahren ermittelt, bei dem das sekretierte Zytokin an der Oberfläche der sekretierenden Zelle durch einen dort gebundenen Antikörper abgefangen und durch einen weiteren Antikörper sichtbar gemacht wird („*secretion assay*“, „*capture assay*“ des Herstellers Miltenyi, Bergisch-Gladbach). Zur Quantifizierung antigenspezifischer oder epitopspezifischer T-Zellen wurden die Zellen in ihrer Ruhephase, d.h. frühestens vier Tage nach der letzten Restimulation, für vier bis zwölf Stunden mit antigenpräsentierenden Zellen oder dem antigenen Peptid inkubiert. Anschließend wurde die Färbung nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Analyse erfolgte mit dem Durchflußzytometer.

#### **2.4.9 Tetramer-Analysen**

Die antigenspezifische Färbung von T-Zellen mit fluoreszenzmarkierten tetrameren HLA-Klasse-I/Peptid-Komplexen („Tetrameren“) wurde ebenfalls in der „Ruhephase“ frühestens vier Tage nach der letzten Restimulation durchgeführt. Jeweils  $1 - 5 \times 10^5$  Zellen einer polyklonalen T-Zelllinie wurden für 20 Minuten bei 37°C mit einer empirisch bestimmten Menge des Phycoerythrin-(PE)-markierten Tetramers inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und 30 Minuten auf Eis mit einem Fluorescein-(FITC)-markierten CD8-spezifischen Antikörper gegengefärbt. Die Zellen wurden gewaschen und sofort durchflußzytometrisch analysiert. Dabei wurde die Population der vitalen Lymphozyten durch ihre charakteristische Position in der zweidimensionalen

Vorwärts-/Seitwärts-Streulichtanalyse identifiziert und eingegrenzt. Die Datenanalyse erfolgte mit dem Programm „CellQuest“ von Becton-Dickinson.

#### 2.4.10 Zytotoxizitäts-Analysen

Die Zytotoxizität von T-Zelllinien wurde durch die Messung der freigesetzten Menge eines Markierungsreagenz aus zuvor zytoplasmatisch markierten lebenden Zielzellen ermittelt. Als Markierungsreagenzien verwendet wurden entweder radioaktives Chrom-51 in Form von Dichromat (klassischer „Chrom-Release“) (Brunner et al., 1968) oder der organische Komplexlignand BATDA (Bis-acetoxymethyl-2.2':6',2''-terpyridin-6,6''-dicarboxylat) (Blomberg et al., 1996), der im Zellinneren zu TDA hydrolysiert wird und dann die Zelle nicht mehr verläßt. Im ersten Fall wird nach der zytotoxischen Reaktion die Radioaktivität im Überstand gemessen, im zweiten Fall wird der in den Überstand freigesetzte Komplexlignand mit Europium(III)-Ionen umgesetzt, und der gebildete fluoreszierende Komplex durch zeitaufgelöste Fluorometrie nachgewiesen. Zytotoxizitätsanalysen wurden mit T-Zelllinien durchgeführt, bei denen die letzte Restimulation mindestens vier Tage zurücklag.

Für den „Chrom-Release“ wurde etwa eine Million Zielzellen (mini-LCL-Zellen, peptidgepulste mini-LCLs, uninfizierte, CMV-infizierte oder vacciniainfizierte Fibroblasten) in etwa 200 µl Medium suspendiert. Fibroblasten wurden zuvor von der Wachstumsfläche abtrypsinisiert. Die Zellen wurden mit 40 µCi  $^{51}\text{CrO}_4^{2-}$  (Amersham) 60 Minuten lang bei 37°C markiert, dann zweimal mit Medium gewaschen und auf die in 96-*well*-Platten vorgelegten Effektorzellen gegeben. Pro *well* einer solchen 96-*well*-Platte mit v-förmigen Gefäßböden wurden 2500 markierte Zielzellen mit einem definierten Vielfachen von Effektorzellen in insgesamt 200 µl Standardmedium für 4 Stunden bei 37°C kokubiert. Bei CMV-spezifischen polyklonalen T-Zelllinien wurden meist E:T-(Effektorzell-/Zielzell-)-Verhältnisse zwischen 8:1 und 1:1 verwendet. Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde die Hälfte des Überstandes, 100 µl, vorsichtig abgenommen und in 96-*well*-Platten aus undurchsichtigem Kunststoff überführt. Je *well* wurden 170 µl Szintillationsflüssigkeit (MicroScint-40, Packard) zugegeben, die Platten versiegelt, die Flüssigkeitsphasen durch vorsichtiges Vortexen gut gemischt und die Platten in einem Szintillationszähler (TopCount, Packard) ausgewertet. Für jede Zielzell-Spezies wurden parallel die Maximalfreisetzung M (vollständige Zellyse mit 0,5% Triton X-100) und die Spontanfreisetzung S (Zielzellen ohne Zugabe von

Effektoren) ermittelt. Die Ergebnisse wurden als relative spezifische Lyse  $L$  angegeben. Diese wurde aus den einzelnen Freisetzungswerten  $F$  wie folgt berechnet:  $L = (F-S) / (M-S)$ .

Für die BATDA-Freisetzungsanalyse wurden BATDA-Reagenz und Europium-Lösung von der Firma Wallac (Turku, Finnland) bezogen. Etwa eine halbe Million Zellen wurde mit 1  $\mu\text{l}$  BATDA-Reagenz 10 bis 15 Minuten bei 37°C markiert. Da diese Methode stärker als der Chrom-Release durch die Anwesenheit toter Zellen gestört wird, wurden die Zellen unmittelbar nach der Markierung verdünnt und einer Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation unterzogen. Die aus der Interphase geernteten Zellen wurden dreimal mit Medium gewaschen, wobei darauf geachtet wurde, möglichst vorsichtig zu resuspendieren. Bei der mikroskopischen Ermittlung der Zellzahl wurde kontrolliert, ob mehr als 90% vitale Zellen vorlagen. Verschiedene Zahlen von Effektorzellen wurden in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Standardmedium in 96-*well*-Rundbodenplatten vorgelegt und jeweils 5000 markierte Zielzellen in jeweils 100  $\mu\text{l}$  Medium dazugegeben. Nach einer Reaktionszeit von 2 Stunden bei 37°C wurden je 20 bis 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes abgenommen, in die *wells* einer üblichen 96-*well*-Flachbodenplatte überführt, je 200  $\mu\text{l}$  Europium-Lösung dazugegeben, 5 Minuten vorsichtig geschüttelt und die Fluoreszenz des gebildeten Europium-Chelatkomplexes zeitaufgelöst im Fluorimeter (Wallac Multilabel Counter) gemessen. Die Ermittlung von Maximal- und Spontanfreisetzung und die Auswertung und Berechnung der relativen spezifischen Lyse erfolgten wie beim Chrom-Release.

## 2.5 Arbeiten mit Viren

### 2.5.1 Epstein-Barr-Virus

Als Quelle für humanes Wildtyp-EBV zur Generierung von LCLs diente die mit dem Referenzstamm B95.8 partiell lytisch infizierte lymphoide Krallenaffen-Zelllinie gleichen Namens. B95.8-Zellen sezernieren bei fortlaufender Kultivierung mit Standardmedium laufend infektiöses EBV in den Kulturüberstand. Die Überstände dieser Zelllinie können nach Filtration (0.45  $\mu\text{m}$ ) unmittelbar für die Infektion und Immortalisation von B-Zellen verwendet werden. Solche Überstände bleiben bei Lagerung bei 4°C mehrere Wochen für diesen Zweck verwendbar.

### 2.5.2 Cytomegalovirus

Humanes Cytomegalovirus des Referenzstamms AD169 wurde durch Passage durch humane primäre Fibroblasten propagiert. Die Fibroblasten werden von CMV lytisch infiziert und entlassen größere Mengen infektiöses Virus nebst nichtinfektiösen Pseudovirionen in den Kulturüberstand. Zur Präparation möglichst hochtitriger Virusüberstände wurden semikonfluente Fibroblastenkulturen der Linie MRC-5 mit 0,1 infektiösen Viren pro Zelle (multiplicity of infection, MOI = 0.1) infiziert. Die Kultivierung wurde fortgesetzt, bis sämtliche Zellen ein infiziertes Aussehen angenommen hatten („zytopathischer Effekt“; runde oder elliptische Form, gelockerte Adhärenz, teils vergrößerte Zellen). Der Überstand wurde vorsichtig geerntet und nach niedertouriger Zentrifugation zur Entfernung von Zelltrümmern (zweimal 10 Minuten, 350 *g*) aliquotiert und zur Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Falls nach der Ernte des Überstandes die meisten infizierten Zellen noch adhärten, wurden sie vorsichtig mit frischem Medium überschichtet und nach 24 Stunden der Überstand erneut geerntet. Die Prozedur wurde solange wiederholt, wie die Zellen adhären blieben. Die zu den verschiedenen Zeitpunkten geernteten Überstände wurden auf ihren Virustiter getestet und derjenige mit dem höchsten Titer zur Infektion von Fibroblasten als Zielzellen für Zytotoxizitätsexperimente verwendet. Mit AD169 sind auf diese Weise Titer um  $1 - 5 \times 10^7$  infektiösen Einheiten pro Milliliter erreichbar.

Zur Abschätzung des Virustiters wurden Viruspräparate in Verdünnungsreihen zur Infektion von Fibroblasten in 96-*well*-Platten verwendet. Zwei Wochen nach Infektion wurden infizierte und nicht infizierte *wells* gezählt. Ein unterer Schätzwert für den Virustiter wurde aus dem Anteil der infizierten *wells* bei derjenigen Verdünnung ermittelt, bei der weniger als 50% der *wells* infiziert wurden. Dabei wurde angenommen, daß die infizierten *wells* jeweils nur genau ein infektiöses Virus erhalten hatten.

Für Zytotoxizitätsanalysen wurden humane Fibroblasten verschiedener Spender 12 Stunden vor dem Experiment mit CMV infiziert (10 infektiöse Einheiten je Zelle).

### 2.5.3 Rekombinante Vacciniaviren

Durch Infektion mit rekombinanten Vacciniaviren erreicht man die schnelle und starke Expression des rekombinanten Proteins in einer Vielzahl von Zellarten. Für



diese Arbeit wurde von N. Blake, Birmingham, freundlicherweise ein pp65-exprimierendes Vacciniavirus (vvpp65) auf der Basis des WR-(Western Reserve)-Derivats vRB12 (Blasco und Moss, 1995) zur Verfügung gestellt. Als Kontrolle diente das WR-Derivat vTK<sup>-</sup> (Murray et al., 1992).

Zur Propagierung von rekombinanten Vacciniaviren wurden Zellen der Linie BSC-40 (eine epitheliale Nierenzelllinie aus der Grünen Meerkatze) bald nach Erreichen der Konfluenz mit  $2 \times 10^7$  Viren je 175-cm<sup>2</sup>-Flasche infiziert. Dazu wurde frisch aufgetautes Virus unmittelbar in die Kulturflasche gegeben und die Zellen weiter bei 37°C kultiviert. Infizierte BSC-40-Zellen nehmen eine runde Form an und werden semi-adhärenz oder lösen sich vom Flaschenboden ab. Sobald sämtliche Zellen dieses Aussehen angenommen hatten, was gegen Tag 4 der Fall war, wurden die Zellen geerntet, indem noch adhärenz Zellen mit einer Pipette abgespült wurden. Die Zellen wurden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in 1 ml PBS (oder weniger, falls eine höhere Viruskonzentration erwünscht war) resuspendiert. Zum Zellaufschluß wurde diese Suspension dreimal im Wechsel in flüssigem Stickstoff eingefroren, im Wasserbad aufgetaut und 30 Sekunden kräftig geschüttelt (Vortex). Danach wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (350 g, 5 min) und der virushaltige Überstand bei -80°C gelagert. Nach diesem Verfahren sind Virustiter um  $10^9$ /ml erreichbar.

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

Zur Verwendung als Zielzellen in Zytotoxizitätsanalysen wurden Fibroblasten, mini-LCLs oder LCLs 12 Stunden vorher mit rekombinanten Vacciniaviren (10 Viren je Zelle) infiziert.

### 3 Ergebnisse

Diese Arbeit soll die gezielte Induktion einer MHC-restringierten zytotoxischen T-Zellantwort in vitro durch mini-EBV-immortalisierte B-Zelllinien (mini-LCLs) zeigen und analysieren. Zu Beginn der vorgestellten Arbeiten war bereits klar, daß die Generierung virusfreier mini-LCLs möglich ist, die konstitutiv ein Fremdprotein exprimieren, und zwar ein potentiell T-Zell-Antigen (Kilger et al., 1999). Als erstes solches Antigen war das humane epitheliale Mucin MUC1 ausgewählt worden. Ein mini-EBV-Vektor zur Generierung von MUC1-exprimierenden, immortalisierten B-Zelllinien (MUC-1-mini-LCLs) war konstruiert worden, und diese Zellen waren nach Behandlung mit Glykosylierungsinhibitor zur Stimulation allogener T-Zellen verwendet worden. Dadurch konnten zytotoxische T-Zellen gegen ein tumorspezifisches, nicht MHC-restringiertes T-Zell-Epitop des unterglykosylierten MUC1 durch MUC1-mini-LCLs induziert werden (Kilger et al., 1999).

Eine solche nicht MHC-restringierte T-Zell-Antwort ist allerdings ein Sonderfall. Im allgemeinen beruht die antigenspezifische zytotoxische T-Zell-Antwort auf der Erkennung von MHC-I- und in geringerem Maße auch von MHC-II-restringierten Antigenen. Der logische nächste Schritt bestand also darin, zu zeigen, daß mini-EBV-Vektoren die Herstellung von mini-LCLs ermöglichen, die konstitutiv MHC-restringierte Fremdanigene exprimieren, prozessieren und präsentieren und sich zur Generierung einer MHC-restringierten T-Zellantwort eignen. Die hier vorgestellten Ergebnisse sollen erstens zeigen, daß die Expression verschiedener membranständiger und zytoplasmatischer T-Zell-Antigene zellulären und viralen Ursprungs in B-Zelllinien durch mini-EBV-Vektoren bewirkt werden kann. Zweitens soll schwerpunktmäßig am Beispiel des gut charakterisierten MHC-I-restringierten T-Zellantigens pp65 aus dem humanen Cytomegalovirus die effiziente Generierung zytotoxischer T-Zellen demonstriert werden, die MHC-I-restringiert und spezifisch für das Fremdanigene sind.

Zu Beginn der hier gezeigten Arbeiten hatten Fortschritte in der genetischen Modifikation des gesamten EBV-Genoms (Delecluse et al., 1998) die Herstellung einer Verpackungszelllinie für EBV-Vektoren ermöglicht, die sich zur Herstellung verschiedenartiger EBV-Vektoren als geeignet erwies (Delecluse et al., 1999). Darauf aufbauend soll hier gezeigt werden, daß diese EBV-Verpackungstechnologie die Effizienz

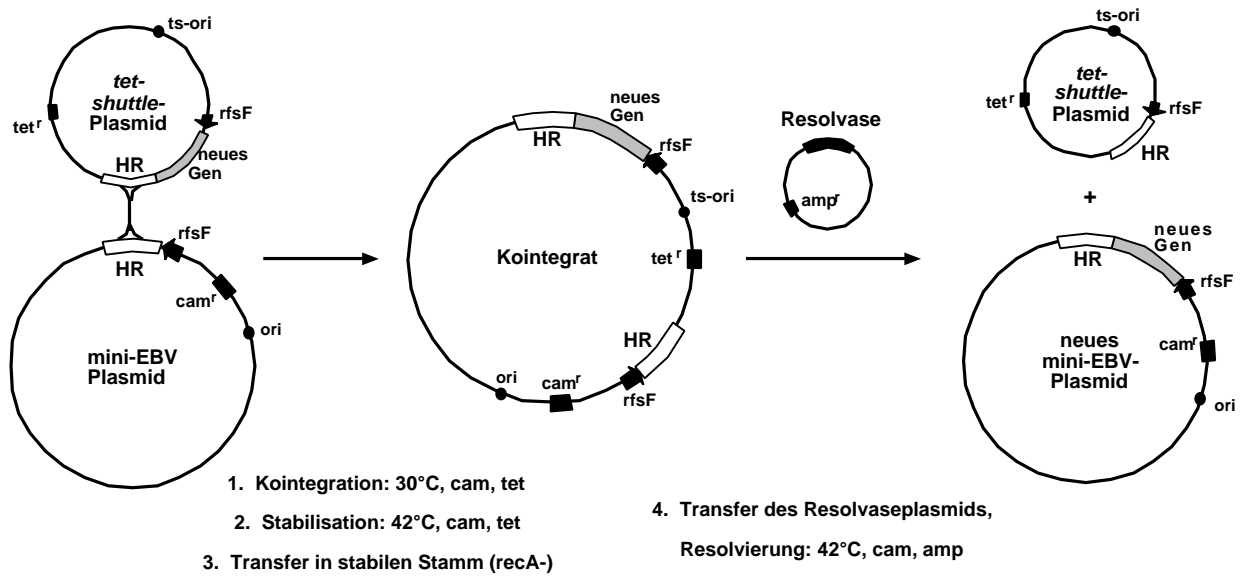
der Generierung von mini-LCLs so steigert, daß nun mini-LCLs, die frei von Wildtyp-Virus sind, aus einer kleinen Blutprobe normaler humaner Spender routinemäßig generiert werden können. Das ist eine wichtige Voraussetzung für den Einsatz von mini-LCLs in der breit angelegten Analyse der antigenspezifischen T-Zellantwort bei verschiedenen Spendern wie auch für ihren beabsichtigten Einsatz in der Immuntherapie von Tumor- oder Viruserkrankungen.

### **3.1 Konstruktion von mini-EBV-Plasmiden**

Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und verwendeten mini-EBV-Plasmide basieren auf dem Konstrukt 1478.A (Kilger et al., 1999). Dieses Plasmid enthält die für die 11 latenten Gene kodierenden Abschnitte des EBV-Genoms, die für die latente und lytische DNA-Replikation notwendigen Elemente oriP und oriLyt sowie die zur Verpackung nötigen *terminal repeats* (TR). Insgesamt enthält das mini-EBV 1478.A 41% der Sequenz des EBV-Genoms. Die Konstruktion neuer mini-EBV-Plasmide erfolgte mit der „chromosomal building“-Technik (O'Connor et al., 1989) durch homologe Rekombination und sequenzspezifische Rekombination in *E. coli*. Anders als gentechnische Standardmethoden wie Restriktionsenzym-Hydrolyse und Ligation ermöglicht eine solche Technik den gezielten Umbau auch sehr großer Plasmide, zu denen auch mini-EBVs (mehr als 80 Kilobasenpaare) zählen.

#### **3.1.1 Einbau eines Fremdgens in ein mini-EBV-Plasmid**

Die „chromosomal building“-Technik, die von O'Connor et al. für den Einsatz in der *Drosophila*-Genetik entwickelt wurde, ermöglicht den Zusammenbau großer, mit konventionellen gentechnischen Methoden schwer handhabbarer Plasmide aus kleineren Einheiten. Diese Technik war auch benutzt worden, um durch Zusammenbau von sieben Plasmiden mit Fragmenten des EBV-Genoms das dieser Arbeit als Standard-mini-EBV-Plasmid zugrundeliegende Molekül 1478.A herzustellen (Kempkes et al., 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wurden aus 1478.A durch Einbau jeweils eines neuen, für ein Fremdgen codierenden DNA-Abschnitts mehrere neue mini-EBV-Plasmide hergestellt.



**Abbildung 3-1.** Einbau eines Fremdgens in ein mini-EBV-Plasmid. HR, homologe Region auf dem mini-EBV und dem *tet-shuttle*-Plasmid; rfsF, Zielsequenz für ortsspezifische Rekombination; ts-ori, temperatursensitiver Replikationsursprung.

Abbildung 3-1 zeigt, wie ein solcher Aufbauschnitt durchgeführt werden kann. Zunächst muß das interessierende Fremdgen mit konventionellen Methoden in ein Transporterplasmid eingebaut werden. Dieses Plasmid (*tet-shuttle*) trägt ein Tetracyclin-Resistenzgen (*tet<sup>r</sup>*) und repliziert nur bei 30°C, nicht aber bei höherer Temperatur, bedingt durch seinen temperatursensitiven Replikationsursprung (*ts-ori*). Das Ziel der Operation, das mini-EBV-Plasmid, weist dagegen eine unabhängige Antibiotikums-Resistenz (Chloramphenicol, *cam<sup>r</sup>*) auf und repliziert auch bei höherer Temperatur. Des weiteren weisen beide Plasmide eine längere homologe DNA-Sequenz auf, in diesem Fall mehrere tausend Basenpaare des EBV-Genoms, und beide Plasmide tragen eine *rfsF*-Sequenz für Resolvase-vermittelte Rekombination. Auf dem mini-EBV liegen die gemeinsame EBV-Sequenz und die *rfsF*-Sequenz nebeneinander, auf dem *shuttle*-Plasmid wurde das Fremdgen dazwischen eingebaut.

Werden beide Plasmide nun zusammen in einen geeigneten *E. coli*-Stamm transferiert, etwa den Stamm CBTS, so kann aus den beiden Plasmiden durch homologe Rekombination ein neues Molekül entstehen, ein Kointegrat, das die gesamten Sequenzen beider Plasmide enthält. Durch Kultivierung mit beiden Antibiotika bei der für den *ts-ori* nichtpermissiven Temperatur wird auf Bakterien, die dieses Kointegrat tragen, selektiert. Gleichzeitig verliert bei hoher Temperatur der CBTS-Stamm seine Rekombinationsfähigkeit, dadurch wird das Kointegrat stabilisiert. Das Kointegrat wird isoliert und in einen rekombinationsdefizienten *E. coli*-Stamm überführt.

Im zweiten Schritt werden die vom *shuttle*-Plasmid herrührenden, nicht benötigten Sequenzen aus dem Kointegrat entfernt. Das geschieht durch ortsspezifische Rekombination, vermittelt durch ein als Resolvase bezeichnetes Enzym, das nach Transfektion eines entsprechenden Expressionsplasmids (mit Ampicillinresistenz) in der Bakterienzelle exprimiert wird. Die Resolvase vermittelt die Rekombination zwischen den beiden *rfsF*-Stellen auf dem Kointegrat, aus einem Plasmid werden wieder zwei, und es ist ein mini-EBV mit neu eingebautem Fremdgen entstanden. Da auf das Resolvat nicht direkt selektiert werden kann, besteht die praktische Aufgabe nun in der Auffindung eines Bakterienklons, der die *cam*-Resistenz behalten, die *tet*-Resistenz aber verloren hat. Da die Resolvase recht effizient wirkt, sind solche Klone aber in der Regel leicht zu finden. Aus diesen wird Plasmid-DNA isoliert, erneut in Bakterien transferiert und ein *cam*-resistenter, *amp*-sensitiver Klon ausgewählt. So

erhält man ein Bakterium, das nur das neue mini-EBV, nicht aber das Resolvaseplasmid repliziert. Abbildung 3-2 zeigt die Zusammensetzung eines so konstruierten mini-EBV-Plasmids, des weiter unten beschriebenen pp65mini-EBV.

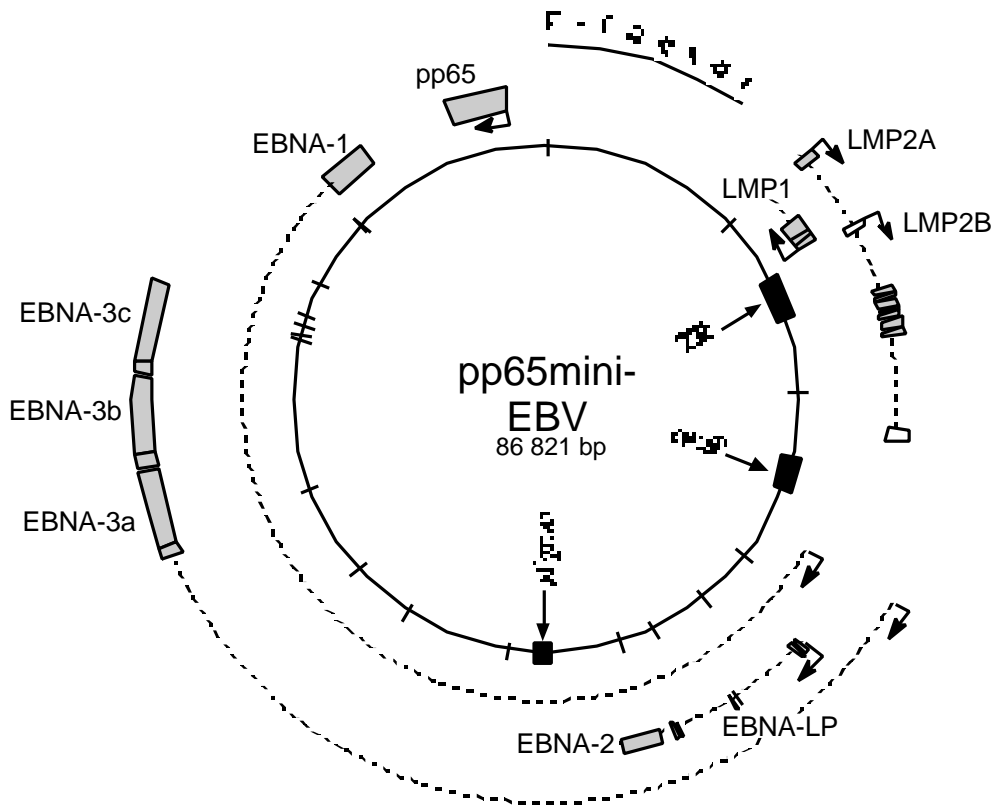


Abbildung 3-2. Struktur des pp65mini-EBV-Plasmids mit den für die B-Zellimmortalisierung notwendigen Genen und funktionellen Elementen.

### 3.1.2 Konstruktion von HPV-mini-EBV-Plasmiden

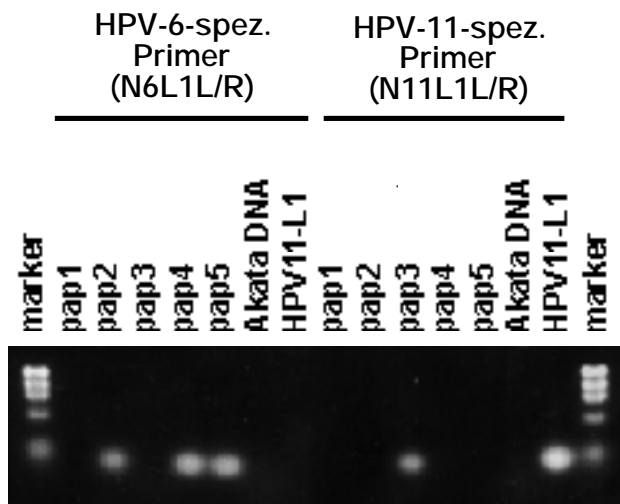
Die humanen Papillomviren (HPV) 6 und 11 gehören zu den mukösen (schleimhautinfizierenden) Papillomviren. Sie werden innerhalb dieser Gruppe zur *low risk*-Kategorie gerechnet, also nicht als potente Krebsauslöser angesehen. Sie sind aber in der Lage, gutartige Tumorerkrankungen zu verursachen, die sich stark auf die Lebensqualität der Erkrankten auswirken können (Genitalwarzen) und im Extremfall

lebensbedrohlich sein können (Atmungsbehinderung durch rezidivierende Larynxpapillomatose). Da einerseits eine wirkungsvolle Therapie der rezidivierenden Larynxpapillomatose bisher fehlt, andererseits über die Details der Immunantwort gegenüber diesen HPV-Typen nur wenig bekannt ist, wurden wichtige Antigene aus HPV-6 und HPV-11 ausgewählt, um die mini-EBV-Methode auf sie anzuwenden.

Aus Operationen an der HNO-Klinik des Klinikums Großhadern waren Larynxpapillomproben verfügbar. Zur Ermittlung des HPV-Infektionsstatus dieser Proben wurden PCR-Primer speziell in der Absicht entworfen, eine möglichst selektive Amplifikation und daher eine Unterscheidung zwischen HPV-6- und HPV-11-Sequenzen zu ermöglichen (Abbildung 3-3). Wegen der engen Verwandtschaft von HPV-6 und -11 war dazu das Aufsuchen von Regionen möglichst divergierender Sequenz erforderlich. Bei beiden Typen erwiesen sich Sequenzen aus dem L1-Gen als geeignet. In vier von fünf Proben konnten mit Hilfe dieser Primer entweder HPV-6- oder HPV-11-Sequenzen amplifiziert werden (Abbildung 3-4).

N6L1-L	HPV-6b L1 #6609-6629	5' -	AAGGGTAGTGGAAATCGCACG	-3'
vgl.	HPV-11 L1 #6593-6613	5' -	--A--GG--AAT--CA-AT-A	-3'
N6L1-R	HPV-6b L1 #6835-6811	5' -	GTGGAAGATGTAGTTACGGATGCAC	-3'
vgl.	HPV-11 L1 #6819-6795	5' -	--A-C-----T---AC--A-----	-3'
N11L1-L	HPV-11 L1 #6019-6040	5' -	TGATTCATCCCTGTTTGACCCC	-3'
vgl.	HPV-6b L1 #6037-6058	5' -	---C--G--T--T--C--T---	-3'
N11L1-R	HPV-11 L1 #6275-6252	5' -	CCTTACCCCAATGTTACCTAACG	-3'
vgl.	HPV-6b L1 #6290-6267	5' -	-T-----C--G--C--A-	-3'

**Abbildung 3-3.** Sequenz der typspezifischen PCR-Primerpaare für HPV-6 (N6L1-L / -R) und HPV-11 (N11L1-L / -R). Gezeigt ist jeweils die gesamte Primersequenz und darunter die homologe Sequenz des jeweils anderen HPV-Typs; bei dieser sind übereinstimmende Nukleotide durch „-“ angedeutet, abweichende Nukleotide sind ausgeschrieben. Die HPV-6b-Primer amplifizieren ein 227-bp-Fragment (Nukleotide 6609-6811), die HPV-11-Primer ein 257-bp-Fragment (Nukleotide 6019-6275). Die angegebenen Nukleotid-Koordinaten aus HPV-6b (Schwarz et al., 1983) und HPV-11 (Dartmann et al., 1986) folgen den von diesen Autoren in *GenBank* als X00203 bzw. M14119 niedergelegten genomischen Sequenzen dieser beiden Virustypen.



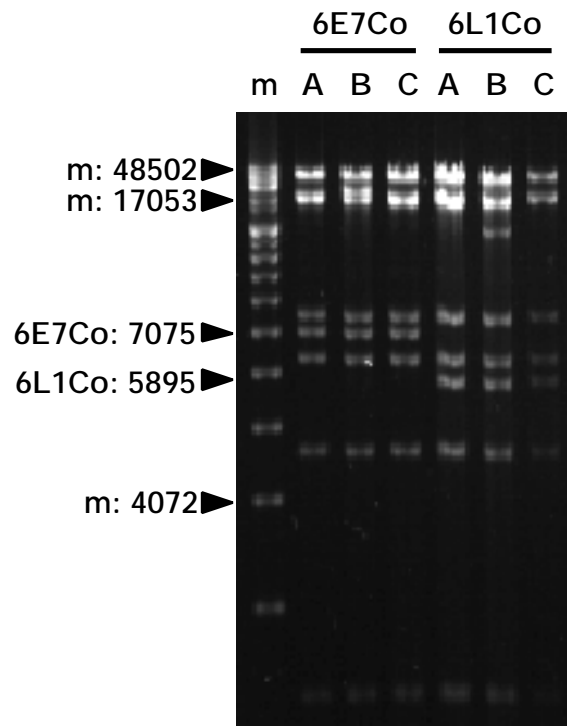
**Abbildung 3-4.** HPV-6/-11-spezifische PCR aus Biopsien von Larynxpapillomen. Untersucht wurden Proben von 5 verschiedenen Patienten (pap1-pap5). Als Kontrolle wurde DNA aus der HPV-negativen Lymphomzelllinie Akata verwendet und ein Plasmid (pCRII-11L1), das die gesamte HPV-11-L1-Sequenz enthält. In drei Biopsien (pap2, 4, 5) wurde HPV-6-DNA, in einer Biopsie (pap3) HPV-11-DNA nachgewiesen. In einer Biopsie (pap1) konnte keine HPV-DNA gefunden werden.

Aus den so charakterisierten Papillomproben wurden daraufhin die vollständigen Sequenzen der Gene E6, E7 und L1 von HPV-6 und von HPV-11 durch PCR amplifiziert. Die Amplifikate wurden über einen PCR-Klonierungsvektor (pCRII) in das *tet-shuttle* pT<sub>2</sub>, das eine Expressionskassette mit SV40-Promotor bereitstellt, und von dort über homologe/ortsspezifische Rekombination in das mini-EBV-Plasmid p1478.A eingebaut, wie oben beschrieben. Der Routine entsprechend wurden das mini-EBV-Plasmid/*shuttle*-Plasmid-Cointegrat und das fertige mini-EBV mehreren Restriktionsanalysen unterzogen, um den Einbau des gewünschten Fremdgens zu bestätigen und unerwünschte sonstige Rekombinationsereignisse auszuschließen. In Abbildung 3-5 ist ein Beispiel einer solchen Analyse gezeigt.

### 3.1.3 Konstruktion eines EpCAM-mini-EBV-Plasmids

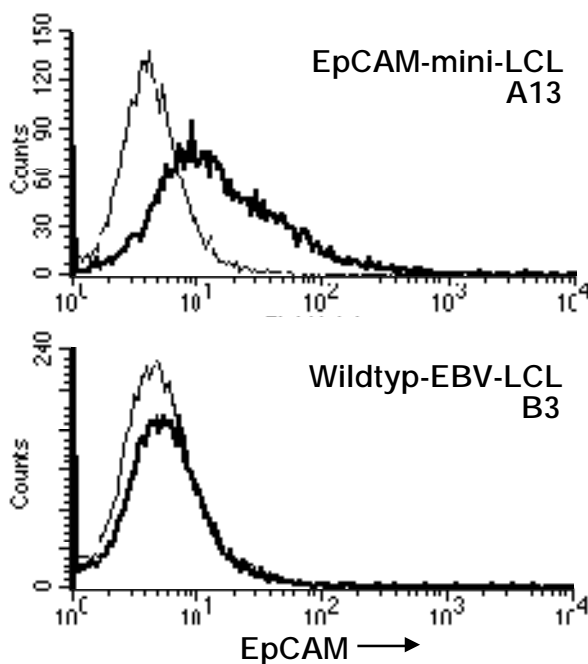
Das epitheliale Zelladhäsionsmolekül (EpCAM) wurde als Beispiel eines wichtigen HLA-restringierten Tumorantigens (Nagorsen et al., 2000; Trojan et al., 2001) ausgewählt, um mit Hilfe der mini-LCL-Methode die Generierung von spezifischen T-Zellen zu untersuchen. Die gesamte Gensequenz von EpCAM wurde unter die Kontrolle eines CMV-Promotors gestellt, in das *tet-shuttle*-Plasmid 1242.1 und auf diesem Wege durch Rekombination in das mini-EBV-Plasmid 1478.A eingebaut.





**Abbildung 3-5.** Analyse von mini-EBV-Plasmid-Kointegrationsprodukten durch Hydrolyse mit dem Restriktionsenzym MluI. Aus je drei unabhängigen Klonen des HPV-6-L1-Kointegrats (6L1Co) und des HPV-6-E7-Kointegrats (6E7Co) wurde durch CsCl-Gradientenzentrifugation Plasmid-DNA isoliert und analysiert. Alle drei 6L1Co-Klone weisen das vorhergesagte charakteristische Fragment von 7075 bp, alle drei 6E7-Klone ein Fragment von 5895 bp auf. Klon B von 6E7Co zeigt allerdings eine unerwartete weitere Bande bei über 17 kbp, Klon B von 6L1Co weist eine zusätzliche Bande bei unter 10 kbp auf. Solche Größenabweichungen beruhen in der Regel auf der Veränderung der Anzahl der *repeats* in den beiden hoch repetitiven Regionen des mini-EBV-Plasmids, der *terminal repeat*-Region (TR) und der *BamW repeat*-Region, die während der Propagierung des Plasmids im rekombinationskompetenten E.coli-Stamm CBTS stattfinden kann. Wie durch zusätzliche Restriktionsanalysen erhärtet wurde, beruht die Bande von unter 10 kbp wahrscheinlich auf dem Verlust eines *BamW repeat* (12194 kbp – 3072 kbp = 9122 kbp). Die Herkunft der Bande von über 17 kbp konnte nicht geklärt werden. Zur Weiterverarbeitung wurden nur solche Klone verwendet, bei denen mehrere verschiedene Restriktionsanalysen das erwartete Fragmentmuster ergaben.

Wie weiter unten für das pp65mini-EBV ausführlich beschrieben, wurden durch Infektion von primären B-Zellen, in diesem Fall aus Adenoiden gewonnen, mit dem verpackten EpCAM-mini-EBV-Vektor immortalisierte B-Zelllinien (mini-LCLs) hergestellt. Mittels PCR wurde bestätigt, daß die Linien frei von Wildtyp-Virus waren. Durch FACS-Analyse konnte nach Färbung mit dem EpCAM-spezifischen Antikörper C215 gezeigt werden, daß EpCAM-mini-EBV-immortalisierte B-Zelllinien, im Gegensatz zu Wildtyp-EBV-LCLs, auf ihrer Oberfläche EpCAM exprimieren (Abbildung 3-6).



**Abbildung 3-6.** EpCAM-Expression an der Zelloberfläche. Zellen der EpCAM-mini-LCL A13 und der Wildtyp-EBV-(B95.8)-LCL B3 vom selben Spender wurden mit dem EpCAM-spezifischen monoklonalen Antikörper C215 (starke Linie) oder einem Isotypkontroll-Antikörper (dünne Linie) gefärbt und im FACS analysiert.

### 3.1.4 Konstruktion eines pp65-mini-EBV-Plasmids

Das Phosphoprotein pp65 des humanen Cytomegalovirus (CMV) wurde als Beispiel für ein virales Antigen gewählt, das bei gesunden, virusinfizierten Normalspendern eine starke MHC-I-restringierte T-Zellantwort und eine lebenslang hohe Zahl an spezifischen Gedächtnis-T-Zellen induziert. Da über 50% der erwachsenen Normalbevölkerung CMV-positiv sind, sind Spender mit CMV-spezifischem T-Zell-Gedächtnis leicht zu finden. Da außerdem für pp65 ebenso wie für latente EBV-Proteine mehrere über verschiedene MHC-I-Allele restringierte T-Zell-Epitope bekannt sind, ist die detaillierte epitopspezifische Analyse spezifischer T-Zellen möglich. Daher erschien pp65 als Modellantigen für die Evaluierung der mini-EBV-Methode zur Generierung spezifischer T-Zellen am besten geeignet.

Zur Konstruktion des entsprechenden mini-EBV-Plasmids wurde die Sequenz des pp65-Gens aus dem CMV-Referenzstamm AD169 verwendet. Das Gen wurde zwischen SV40-Promotor und Polyadenylierungsstelle des Expressionsvektors pSG-5 plaziert und von dort in ein *tet-shuttle*-Plasmid und anschließend in das Standard-mini-EBV-Plasmid 1478.A eingebaut. Das im Ergebnis erhaltene Plasmid, pp65mini-EBV, wurde wie im folgenden beschrieben zur Generierung von mini-LCLs und autologen T-Zelllinien verwendet.

## **3.2 Generierung mini-EBV-immortalisierter B-Zelllinien (mini-LCLs)**

### **3.2.1 Herstellung infektiöser mini-EBV-Virionen**

Die Klonierung des gesamten EBV-Genoms in einen in *E.coli* propagierbaren Vektor (Delecluse et al., 1998) machte es möglich, durch gezielte genetische Modifikation des EBV-Genoms eine Verpackungszelllinie erster Generation für EBV-Vektoren zu konstruieren (Delecluse et al., 1999). Diese Zelllinie, 293/TR<sup>-</sup>, 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. 293/TR<sup>-</sup>-Zellen sind zur spontanen Virusproduktion nicht befähigt. Infektiöse EBV-Partikel können erst gebildet werden, wenn die Zelle mit einem verpackbaren, also TR enthaltenden EBV-Vektor, und einem Plasmid zur Überexpression des viralen Faktors BZLF1 transfiziert wird. Daraufhin induziert BZLF1 den lytischen Zyklus von EBV, das TR-negative EBV-Genom liefert die genetische Information zur Synthese der Kapsidproteine und sonstiger lytischer Faktoren, und die TR-positive EBV-Vektor-DNA wird in die neugebildeten Viruspartikel verpackt. Dieses System eignet sich zur Verpackung von EBV-Vektoren verschiedener Größe und Komplexität, des klonierten EBV-Gesamtgenoms, von Minimalkonstrukten, die lediglich die TR und den lytischen Replikationsursprung oriLyt enthalten, aber auch der hier beschriebenen mini-EBV-Vektoren. Die rekombinanten Viruspartikel werden in den Kulturüberstand freigesetzt. Bei Verwendung von mini-EBVs entstehen virusanalogue, aber wildtypvirusfreie EBV-Partikel, die effizient primäre B-Zellen infizieren und immortalisieren.

### 3.2.2 Generierung von pp65mini-LCLs

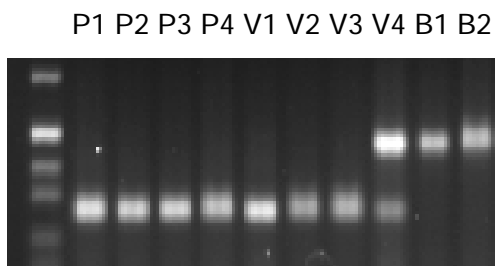
Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Linie 293/TR<sup>-</sup> erstmals zur Herstellung von mini-LCLs verwendet, die ein Fremdantigen exprimieren. Es zeigte sich, daß diese Methode zur effizienten Generierung wildtypvirusfreier mini-LCLs gut geeignet ist. Im Rahmen von Optimierungsexperimenten erwies sich die Verwendung von Virion-Präparaten als vorteilhaft, die durch Zentrifugation zehnfach aufkonzentriert worden waren. Um das Risiko einer Kontamination der neu generierten mini-LCL mit einer Wildtyp-LCL, die durch endogenes Virus des Spenders immortalisiert ist, zu minimieren, wurden die B-Zell-Infektionen für jeden Spender in mehreren separaten Mikrokulturen durchgeführt. Tabelle 3-1 zeigt die Effizienzen der Immortalisierung von primären B-Zellen von 9 gesunden Spendern durch Kontroll-mini-EBV und pp65-mini-EBV-Vektoren nach dem optimierten Protokoll. Angegeben ist jeweils die Zahl der Mikrokulturen (einzelner Gefäße einer 96-*well*-Platte), aus denen eine immortalisierte Zelllinie auswuchs, und die Gesamtzahl der angesetzten Mikrokulturen. Wie ersichtlich, konnten bei 8 von 9 Spendern pp65mini-LCLs, bei allen 9 Spendern Kontroll-mini-LCLs und B95.8-LCLs generiert werden.

Donor	pp65-mini-EBV	Kontroll-mini-EBV	ohne Viruszugabe	Wildtyp-EBV B95.8
MO	5 / 6	6 / 6	0 / 4	2 / 2
DW	5 / 6	6 / 6	0 / 4	2 / 2
MH	0 / 15	10 / 15	0 / 5	5 / 5
SL	5 / 15	8 / 15	0 / 5	5 / 5
PM	1 / 8	1 / 8	0 / 6	2 / 2
JS	6 / 8	8 / 8	0 / 6	2 / 2
DA	1 / 8	5 / 8	0 / 6	2 / 2
AX	4 / 8	7 / 8	0 / 6	2 / 2
SH	7 / 8	8 / 8	0 / 6	2 / 2

**Tabelle 3-1.** Immortalisierungseffizienz von B-Zellen verschiedener Spender mit mini-EBV-Vektoren. Angegeben ist jeweils die Zahl der Mikrokulturen, aus denen proliferierende Zellen expandiert werden konnten, und die Gesamtzahl angesetzter Kulturen. Pro Mikrokultur wurde eine halbe Million PBMC eingesetzt, pro Spender also 9, 12 oder 20 Millionen. Zur Gewinnung einer Million PBMC waren 0,5 ml bis 1 ml Blut notwendig.

### 3.2.3 Mini-LCLs sind frei von Wildtyp-Virus

Um zu verifizieren, daß die neu auswachsenden Zelllinien nicht ganz oder teilweise aus Zellen bestanden, die durch endogenes Wildtyp-EBV des Spenders immortalisiert waren, wurde mit jeder zu weiteren Experimenten bestimmten mini-LCL eine entsprechende PCR-Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Anwesenheit von spezifischen mini-EBV-Sequenzen aus dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen und die Abwesenheit spezifischer, auf dem mini-EBV fehlender Wildtyp-EBV-Sequenzen, nämlich des Gens für das virale Glykoprotein gp85, überprüft. Abbildung 3-7 zeigt ein Beispiel einer solchen Analyse, bei der eine von acht getesteten vermuteten mini-LCLs eines erwachsenen Spenders Wildtyp-Sequenzen aufwies. Bei der Mehrheit der erwachsenen Spender erwiesen sich alle getesteten mini-LCLs als frei von Wildtyp-Virus.



**Abbildung 3-7.** PCR-Analyse aus DNA von zehn unabhängigen mini-EBV-infizierten B-Zelllinien aus peripheren Blutzellen eines gesunden erwachsenen Spenders (Spender C6). Die B95.8-Wildtyp-EBV-Linien B1 und B2 zeigen eine Amplifikation eines Genabschnitts, der nur im Wildtyp-EBV vorkommt (gp85). Die Zelllinien P1 bis P4 und V1 bis V3 (P = pp65-mini-EBV-infiziert, V = Kontroll-

mini-EBV-infiziert) zeigen die Bande für das Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen (cam) auf dem mini-EBV-Plasmid und sind daher virusfreie transformierte Zelllinien, mini-LCLs. Allein Zelllinie V4 weist zusätzlich die Wildtyp-EBV-Sequenz auf, die auf endogenes EBV des Spenders zurückgeht. Linie V4 ist daher keine mini-LCL, sondern wahrscheinlich eine Mischpopulation aus mini-EBV-infizierten und Wildtyp-EBV-infizierten Zellen. Linie V4 wurde daher nicht weiterverwendet.

### 3.2.4 pp65 wird in mini-LCLs exprimiert

Die pp65-Expression in pp65mini-LCLs wurde durch *western blot* und intrazelluläre Immunfärbung mit FACS-Analyse untersucht. Abbildung 3-8 A zeigt im *western blot* die Expression in einer pp65mini-LCL im Vergleich mit CMV-infizierten Fibroblasten,

Kontroll-mini-LCL und Wildtyp-LCL. Erkennbar ist eine deutliche Bande bei P1, deren Intensität allerdings hinter der von CMV-infizierten Fibroblasten (die bekanntermaßen pp65 sehr stark exprimieren) zurückbleibt. In Abbildung 3-8 B werden die FACS-Analysen zweier permeabilisierter und dann gegen pp65 gefärbter pp65mini-LCLs mit zwei Kontroll-mini-LCLs und einer Wildtyp-LCL verglichen. Die Profile lassen darauf schließen, daß die Mehrzahl der Zellen in den pp65mini-LCLs tatsächlich das pp65-Antigen exprimieren.

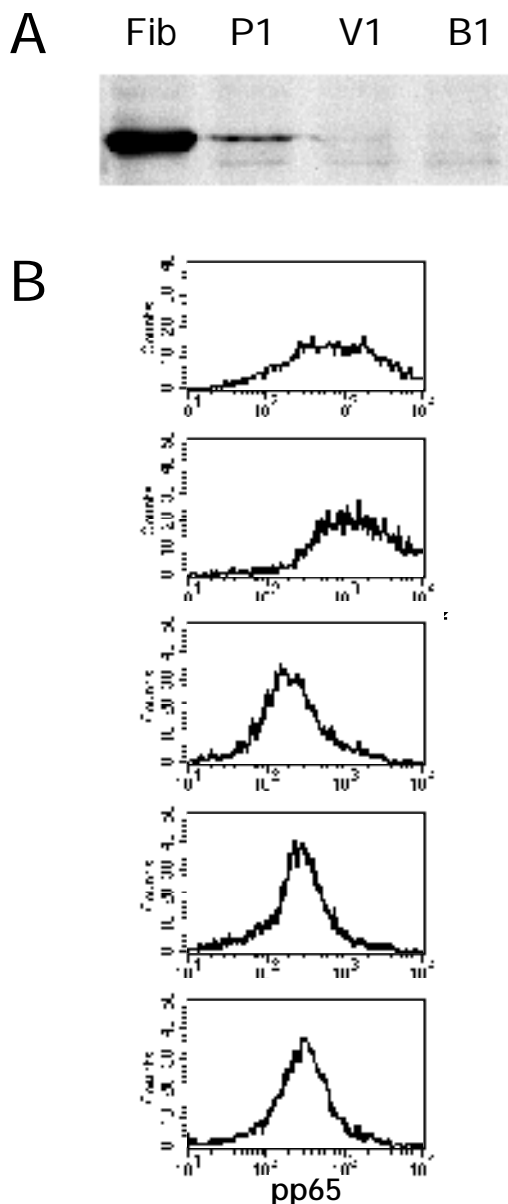
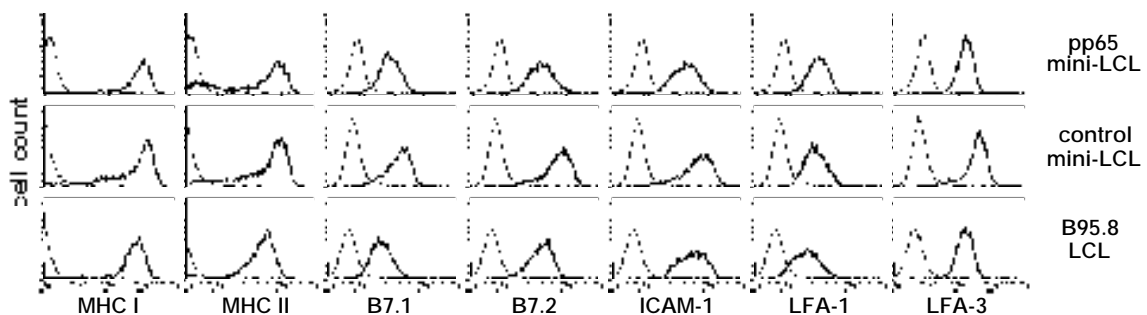


Abbildung 3-8. Analyse der pp65-Proteinexpression in pp65-mini-LCL-Linien. **A:** Immunblot-Analyse einer pp65-mini-LCL (P1), einer Basisvektor-mini-LCL (V1) und einer Wildtyp(B95.8)-LCL (B1), generiert aus B-Zellen desselben Spenders (A31) und gefärbt mit dem pp65-spezifischen Antikörper 981 (Biosdesign). Als Positivkontrolle dienen HCMV-infizierte primäre Fibroblasten (Fib). **B:** Intrazelluläre Immunfluoreszenzanalyse zweier unabhängiger pp65-mini-LCLs (P1, P2), zweier Kontroll-mini-LCLs (V1, V2) und einer Wildtyp-(B95.8)-LCL. Diese Zelllinien entstanden durch unabhängige Infektionen aus Zellen des Spenders A41.

### 3.2.5 pp65mini-LCLs exprimieren HLA Klasse I und II, Kostimulatoren und Adhäsionsmoleküle

Verschiedene virale Gene des Cytomegalovirus unterdrücken gezielt die MHC-Klasse-I- und -II-restringierte Antigenpräsentation in infizierten Zellen (Ploegh, 1998). Gilbert et al. beschrieben 1996, daß das HCMV-Protein pp65 spezifisch die Antigenprozessierung und Präsentation eines anderen HCMV-Proteins, des *immediate-early*-Proteins IE1, unterdrückt. Diese Beobachtung wurde bei humanen Fibroblasten gemacht, die mit dem HCMV-Laborstamm AD169 infiziert wurden; solche Zellen exprimieren sehr stark pp65. Es ist noch offen, ob bei anderen T-Zell-Antigenen oder anderen zellulären Systemen ebenfalls eine Unterdrückung der Prozessierung und Präsentation durch pp65 möglich ist. In vivo wird nämlich trotz alledem eine durchaus starke IE1-spezifische, Klasse-I-restringierte zelluläre Immunantwort hervorgerufen (Gyulai et al., 2000; Kern et al., 1999).



**Abbildung 3-9.** Expression von Oberflächenmolekülen, die für die T-Zell-Stimulation wichtig sind, auf pp65mini-LCLs. Die Expression von MHC (HLA) Klasse I und II, der kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) und der Adhäsionsmoleküle ICAM-1(CD54), LFA-1 (CD11a) und LFA-3 (CD58) auf einer pp65mini-LCL, einer Kontroll-mini-LCL und einer Wildtyp-(B95.8)-mini-LCL wurde durch Färbung vitaler Zellen mit monoklonalen Antikörpern und FACS-Analyse ermittelt. Die starke Linie in jedem Diagramm repräsentiert die Färbung mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper, die dünne Linie die Färbung mit einem irrelevanten Kontroll-Antikörper.

Da die Diskussion um immuninterferierende Eigenschaften von pp65 andauert, erschien es wichtig, zu zeigen, daß die konstitutive Expression von pp65 in mini-LCLs nicht das Expressionsmuster von Oberflächenproteinen verändert, die für die HLA-restringierte Antigenpräsentation bedeutsam sind. Daher wurde bei pp65-mini-LCLs, Kontroll-mini-LCLs und Wildtyp-EBV-LCLs die Expression von HLA Klasse I und II, B7.1 und B7.2, ICAM-1, LFA-1 und LFA-3 untersucht. Wie Abbildung 3-9 zeigt, sind alle diese Membranmoleküle auf pp65mini-LCLs ebenso wie auf den zu Kontrolle herangezogenen Zelllinien deutlich bis stark exprimiert. Dies sprach dafür, daß pp65mini-LCLs ähnlich gut für die antigenspezifische T-Zell-Stimulation geeignet sein könnten wie Standard-(Wildtyp)-LCLs.

### 3.3 Reaktivierung von pp65-spezifischen T-Zellen

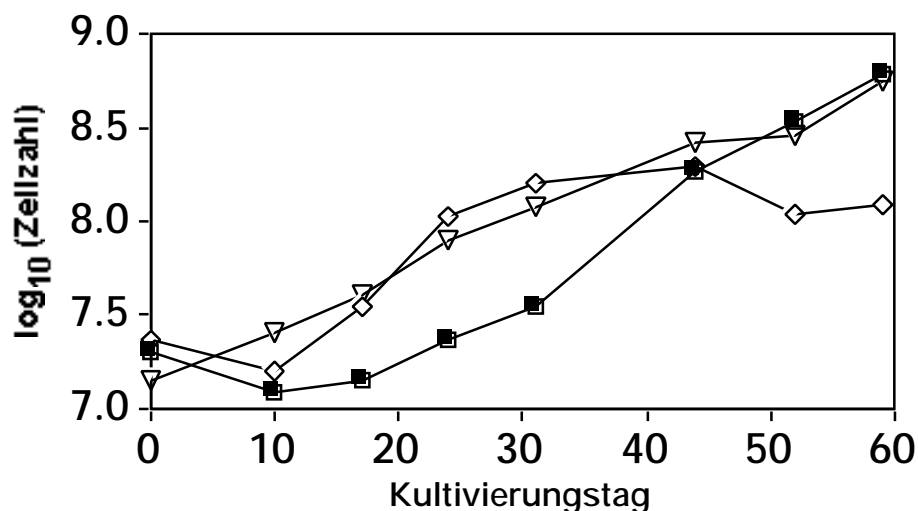
T-Zellen lassen sich nur kontinuierlich in Kultur halten, wenn verschiedene Anforderungen erfüllt sind. Zur Selektion von antigenspezifischen T-Zellen aus einer gemischten Population, etwa aus frischen mononukleären Blutzellen (PBMC), ist die Stimulation mit spezifischem Antigen nötig, in Form eines Komplexes aus spezifischem antigenem Peptid und MHC-Molekül. Im optimalen Fall wird dieser Komplex auf der Oberfläche einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle angeboten. Zusätzlich benötigen T-Zellen bei fortgesetzter Kultivierung die Zugabe von Interleukin-2 zum Medium und sind von weiteren noch nicht vollständig charakterisierten Faktoren abhängig. Diese Faktoren können von frisch präparierten mononukleären Blutzellen bereitgestellt werden, daher gibt man sie häufig als *feeder*-Zellen zur T-Zell-Kultur hinzu. Alternativ eignen sich als *feeder* aber auch EBV-immortalisierte B-Zelllinien, LCLs. Da LCLs gleichzeitig effektive antigenpräsentierende Funktion haben und spezifische EBV-Antigene exprimieren, gegen die bei EBV-positiven Spendern ein stark ausgeprägtes T-Zell-Gedächtnis vorliegt, ist die Reaktivierung und Expansion EBV-spezifischer T-Zellen in einfacher Weise im Zwei-Komponenten-System möglich, nämlich mit LCLs als Stimulatoren und PBMC als Responsoren. Lediglich Interleukin-2, als unentbehrlicher T-Zell-Wachstumsfaktor, muß in einem solchen System noch hinzugefügt werden. Im Verlaufe wiederholter Restimulation mit LCLs entwickelt sich aus einem solchen Ansatz bald eine spezifische T-Zell-Kultur, in der, in Abhängigkeit von der Ausgangssituation beim Spender, verschiedene EBV-Antigenspezifitäten vertreten sind. Im folgenden wurde untersucht, ob sich in



Analogie zu diesem System pp65-spezifische mini-LCLs zur Generierung von pp65-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Kulturen eignen.

### 3.3.1 Mit pp65mini-LCLs können T-Zelllinien stimuliert und expandiert werden

Die Experimente zur Generierung von T-Zelllinien durch pp65mini-LCL-Stimulation wurden auf der Basis von Protokollen durchgeführt, die sich bereits bei der Generierung von EBV-spezifischen T-Zelllinien für die Anwendung in der adoptiven Immuntherapie, also der Transfusion von T-Zellen in Patienten, bewährt hatten (Roskrow et al., 1998). Die einzige, allerdings grundlegende Veränderung bestand darin, daß Standard-LCLs als Stimulatoren durch pp65mini-LCLs ersetzt wurden. Bei der Methode werden frische oder kryokonservierte PBMC am ersten Tag, an Tag 10 und daraufhin alle 7 Tage durch Zugabe frischer autologer pp65mini-LCL-Zellen stimuliert. Vor der Zugabe werden die mini-LCL-Zellen radioaktiv bestrahlt, um ihre weitere Proliferation zu verhindern.

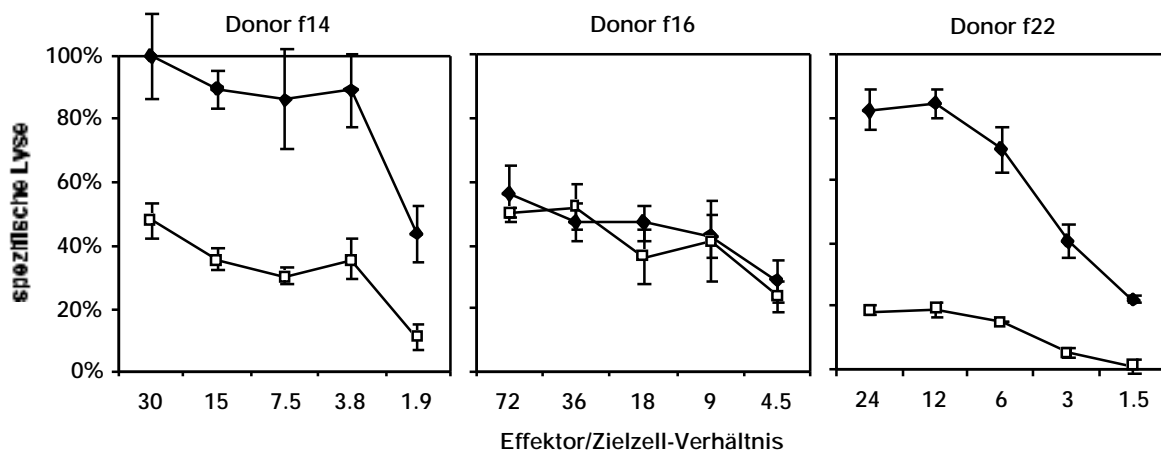


**Abbildung 3-10.** Proliferation von pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinien. Aus kryokonservierten mononukleären Blutzellen aus „buffy coats“ von drei anonymen Spendern, f14, f16 und f22, wurden durch Restimulation mit der autologen pp65mini-LCL T-Zelllinien generiert. Bei der Restimulation wurden Trypanblau-exkludierende Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt und durch Vergleich mit der für die vorige Stimulationsrunde eingesetzten Zellzahl die jeweilige Proliferationsrate errechnet. Quadrate: Spender f14; Rauten: Spender f16; Dreiecke: Spender f22.

Bei der erstmaligen Durchführung dieser Prozedur mit pp65mini-LCLs wurden kryokonservierte PBMC aus drei *buffy coats* verwendet, Leukozytenkonzentraten aus der Blutspende eines anonymen Spenders. In allen drei Fällen konnte so eine proliferierende T-Zelllinie generiert werden. Abbildung 3-10 zeigt die errechnete Zunahme der Zellzahl während des Kultivierungszeitraums.

### **3.3.2 pp65mini-LCL-stimulierte T-Zelllinien sind zytotoxisch aktiv und lysieren pp65mini-LCLs**

Die antigenspezifische Lyse von Zellen, die das Zielantigen exprimieren, ist die wichtigste Effektorfunktion von zytotoxischen T-Zellen. Zur Messung antigenspezifischer Zytotoxizität wird in der Regel eine geeignete Zellpopulation, die das fragliche Antigen exprimiert (Zielzelle oder Target), mit einer Markierungsreagenz behandelt, die nur im Falle des Zelltodes beim daraufhin erfolgenden Zerfall der Zellmembran wieder freigesetzt werden kann. Die T-Zellen (Effektoren) und Zielzellen werden zusammen inkubiert. Während der mehrstündigen Kokultivierungszeit werden die Zielzellen zytotoxisch angegriffen und setzen die Markierung frei. Anschließend kann die freigesetzte Markierung im Zellüberstand quantifiziert werden. Bei der klassischen Methode, der Chrom-Freisetzung (*chromium release*), werden die Zielzellen zur Markierung mit löslichem radioaktivem Chrom-51 in Form von Dichromat behandelt, und nach dem Experiment wird die Zahl radioaktiver Zerfälle im Überstand gemessen. Eine nichtradioaktive Alternative dazu ist die TDA-Freisetzung (Blomberg et al., 1996). Anstelle von Chrom-51 wird hierbei der organische Chelatligand BATDA zur Markierung eingesetzt. Im Zellinnern wird BATDA zu TDA hydrolysiert, das die Membran nicht mehr passieren kann, in der Zelle verbleibt und nur bei Zellyse wieder freigesetzt wird. Das in den Zellüberstand freigesetzte TDA wird quantifiziert, indem man es mit Europium(III)-Ionen umsetzt. Dabei bildet sich ein Chelatkomplex, der eine charakteristische Fluoreszenz mit langer Zerfallszeit hat, die seinen quantitativen Nachweis durch zeitaufgelöste Fluorometrie ermöglicht.



**Abbildung 3-11.** Zytotoxische Aktivität von pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinien dreier zufällig ausgewählter Normalspender. Die Lyse von autologen pp65mini-LCLs (Rauten) und autologen Kontroll-mini-LCLs (Quadrate) wurde durch TDA-Freisetzung untersucht. Die T-Zelllinien befanden sich an Kultivierungstag 17.

Nach 17 Tagen in Kultur wurde erstmals die Zytotoxizität der drei in Abbildung 3-10 gezeigten pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinien zufällig ausgewählter Blutspender untersucht. Als Zielzellen im TDA-Freisetzungsexperiment dienten jeweils die autologe pp65mini-LCL und die autologe Kontroll-mini-LCL. Abbildung 3-11 zeigt das Ergebnis: zwei der drei T-Zelllinien (f14 und f22) zeigten eine starke Lyse von autologen pp65mini-LCLs und eine weit schwächer ausgeprägte, aber deutliche Lyse von autologen Kontroll-mini-LCLs; eine der drei T-Zelllinien (f16) zeigte eine mittelstark ausgeprägte Lyse sowohl von pp65mini-LCLs als auch von Kontroll-mini-LCLs. Da die Zahl reaktivierbarer pp65-spezifischer Gedächtnis-T-Zellen bei gesunden CMV-Positiven groß ist (Gillespie et al., 2000), legt der klare Unterschied zwischen f14 und f22 einerseits und f16 andererseits unmittelbar die Interpretation nahe, daß die Spender f14 und f22 CMV-positiv waren und ein pp65-spezifisches T-Zell-Gedächtnis hatten. Durch Reaktivierung von pp65-spezifischen T-Zellen in vitro erhielten die T-Zelllinien dieser beiden Spender infolgedessen eine starke pp65-spezifische Zytotoxizität. Im Gegensatz dazu enthielt die T-Zelllinie von Spender f16 keine starke pp65-spezifische Komponente und könnte daher von einem CMV-negativen Spender stammen. Die T-Zelllinien aller drei Spender wiesen eine Reaktivität auch gegenüber Kontroll-mini-LCLs auf, die auf eine EBV-spezifische T-Zell-Reaktivierung und damit eine

EBV-Positivität aller drei Spender hindeuten könnte. Diese Interpretationen erscheinen statistisch plausibel, da 50-60% der Erwachsenen CMV-positiv, aber über 95% EBV-positiv sind. Um diese Interpretation zu überprüfen, wurden in einer weiter unten beschriebenen Serie von Experimenten T-Zelllinien von Spendern mit definiertem CMV- und EBV-Status untersucht.

### 3.3.3 pp65-reaktive T-Zelllinien werden von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dominiert

Eine phänotypische Analyse der pp65-reaktiven T-Zelllinien f14 und f22 erbrachte das Ergebnis, daß bei beiden Zelllinien CD8-positive T-Zellen dominierten, aber in geringerem Maß auch CD4-positive T-Zellen vorhanden waren, wie Abbildung 3-12 zeigt.

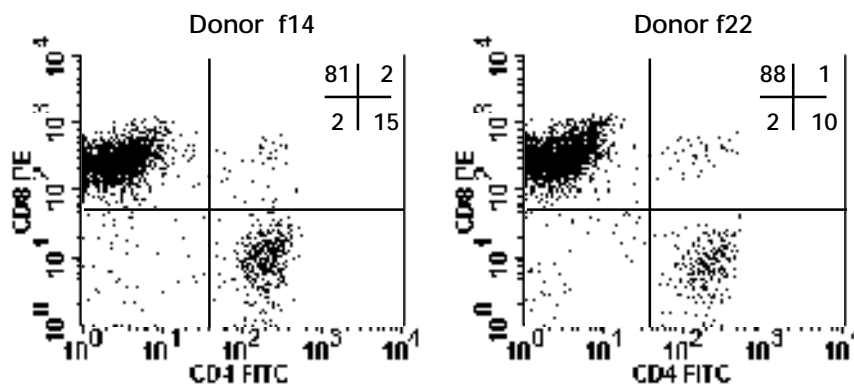


Abbildung 3-12. Phänotyp der pp65-reaktiven T-Zelllinien der Spender f14 und f22. Die Doppelfärbung mit monoklonalen fluoreszenzfarbstoffkonjugierten CD4- und CD8-Antikörpern wurde am Kultivierungstag 33 durchgeführt. In der Ecke der Diagramme sind die Anteile der in jedem Quadranten des Diagramms liegenden Zellen in Prozent der Gesamtzahl aufgeführt.

### 3.3.4 TDA-Freisetzung und Chrom-Freisetzung sind vergleichbar

Um die durch TDA-Freisetzung gezeigte pp65-Reaktivität der beiden pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinien der Spender f14 und f22 durch eine andere Methode zu bestätigen, wurde am Kultivierungstag 24 ein Zytotoxizitätstest durch Chrom-Freisetzung durchgeführt. Wie Abbildung 3-13 zeigt, bestätigte sich die stärkere Zytotoxi-

zität gegenüber pp65mini-LCLs im Vergleich zu Kontroll-mini-LCLs; die Reaktivität der T-Zelllinie f14 gegen die Kontroll-mini-LCL war gegenüber Tag 17 (vergl. Abbildung 3-11) noch weiter abgesunken, die pp65-Spezifität daher noch ausgeprägter geworden.

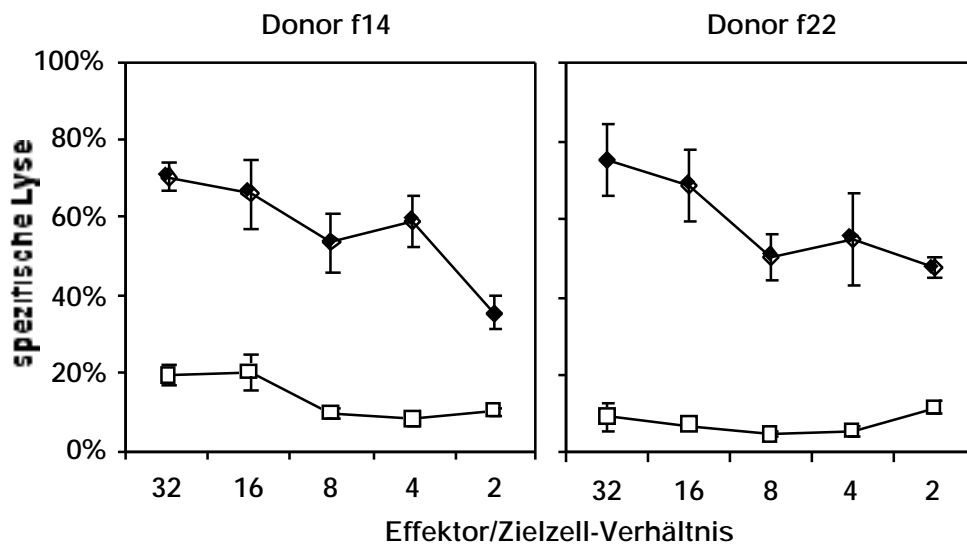


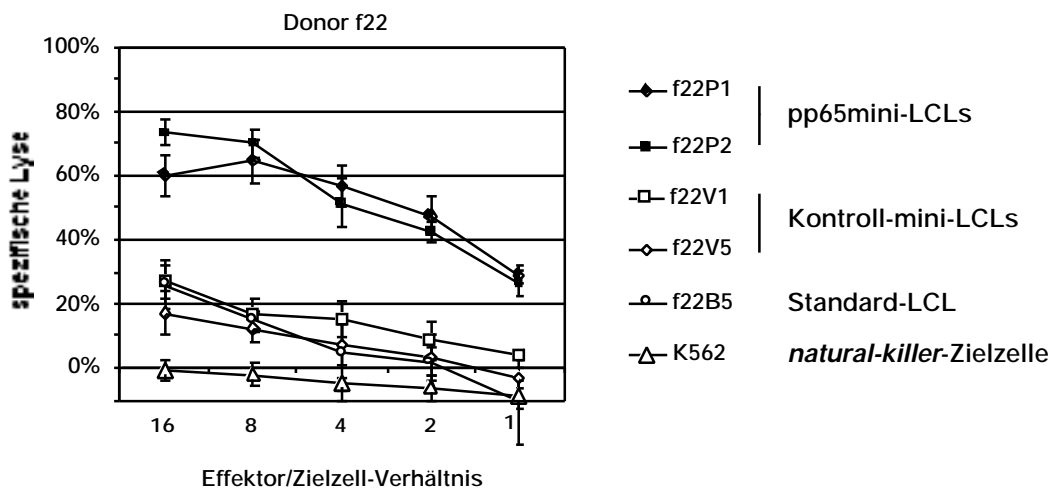
Abbildung 3-13. Zytotoxische Aktivität von pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinien der Spender f14 und f22, ermittelt durch Chrom-Freisetzung aus autologen pp65mini-LCLs (Rauten) und autologen Kontroll-mini-LCLs (offene Quadrate) an Kultivierungstag 24.

### 3.3.5 Unabhängig generierte mini-LCLs haben als Zielzellen gleiche Eigenschaften

Bei der Generierung von mini-LCLs durch mini-EBV-Immortalisation waren wegen der verhältnismäßig geringen Infektionseffizienz vermutlich oligoklonale, im Extremfall monoklonale mini-LCLs entstanden. Daher war nicht auszuschließen, daß eventuelle klon-spezifische phänotypische Unterschiede zwischen verschiedenen mini-LCLs bei ihrer Verwendung als Zielzellen in Zytotoxizitätsexperimenten die Ergebnisse beeinflussen konnten. Daher wurde durch TDA-Freisetzung die zytotoxische Aktivität pp65-reaktiver T-Zelllinien gegenüber verschiedenen unabhängigen pp65mini-

LCLs, Kontroll-mini-LCLs und Standard-LCLs (infiziert mit EBV-Wildtyp B95.8) miteinander verglichen. Abbildung 3-14 zeigt, daß zwei unabhängig generierte pp65mini-LCLs von Spender f22 durch die autologe T-Zelllinie (Kultivierungstag 33) vergleichbar stark lysiert wurden. Viel schwächer, aber wiederum untereinander vergleichbar stark, wurden zwei unabhängige Kontroll-mini-LCLs und eine Standard-LCL zytotoxisch angegriffen. Offenbar sind also unabhängig generierte mini-LCLs, die mit dem gleichen mini-EBV generiert wurden, in Hinsicht ihrer Antigenpräsentation untereinander vergleichbar, und die Präsentation der latenten EBV-Antigene, die die Zytotoxizität gegenüber Wildtyp-LCLs hervorruft, bewirkt auch die vergleichbar starke Lyse von Kontroll-mini-LCLs.

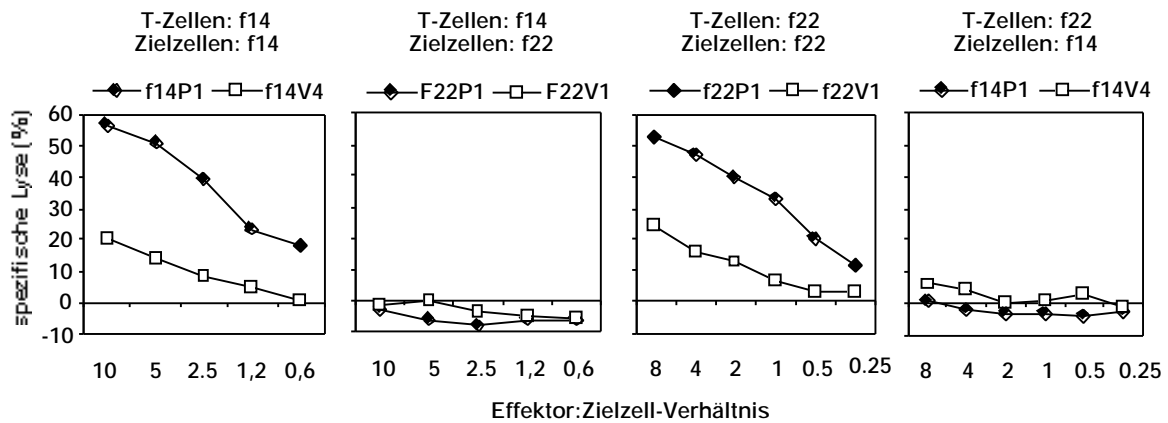
Keinerlei zytotoxische Aktivität war erkennbar gegenüber den HLA-Klasse-I-negativen K562-Zellen, die als sensitive Zielzellen zum Nachweis einer zytotoxischen Aktivität von *natural-killer*-Zellen (NK-Zellen) viel verwendet werden. Eine solche Aktivität lag also nicht vor, wogegen auch der sehr geringe Anteil von CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>-Zellen in der untersuchten T-Zelllinie von f22 spricht (vergl. Abbildung 3-12).



**Abbildung 3-14.** Zytotoxische Aktivität von pp65mini-LCL-stimulierten T-Zellen des Donors f22 gegenüber autologen B-Zelllinien (pp65mini-LCLs, Kontroll-mini-LCLs und einer Standard-LCL) und der Zelllinie K562. Gezeigt ist ein TDA-Freisetzungsexperiment an Kultivierungstag 33 der T-Zell-Population.

### 3.3.6 Allogene HLA-inkompatible mini-LCLs werden nicht lysiert

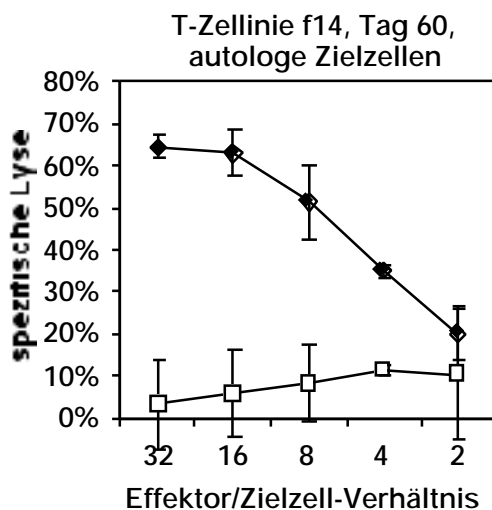
Die antigenspezifische Reaktivität von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ist HLA-Klasse-I-restringiert. Um dies für die vorliegenden T-Zelllinien zu überprüfen, wurden Zytotoxizitätsexperimente mit allogenen mini-LCLs als Zielzellen durchgeführt. Abbildung 3-15 zeigt Experimente, bei denen die T-Zelllinien der Spender f14 und f22 mit autologen mini-LCLs und mini-LCLs des jeweils anderen Spenders zur Reaktion gebracht wurden. Diese beiden Spender sind HLA-A- und HLA-B-inkompatibel (Spender f14: HLA-A1, A2, B13, B62, Cw3, Cw7; Spender f22: HLA-A11, A26, B49, B53, Cw4, Cw7). Autologe pp65mini-LCLs wurden in beiden Fällen, wie zuvor gezeigt, stark zytotoxisch angegriffen. Die Reaktivität gegenüber autologen Kontroll-mini-LCLs war merklich schwächer, aber dennoch deutlich ausgeprägt. Gegenüber den allogenen, HLA-inkompatiblen pp65- und Kontroll-mini-LCLs war dagegen keine Reaktivität detektierbar. Diese Ergebnisse deuten klar darauf hin, daß beide untersuchten T-Zelllinien Klasse-I-restringiert sind. Dies gilt sowohl für die EBV-spezifische Reaktivität, die für die Lyse der Kontroll-mini-LCLs verantwortlich ist und auch zur Lyse von pp65mini-LCLs beiträgt, als auch für die Reaktivität gegenüber pp65, die zur verstärkten Lyse von pp65mini-LCLs gegenüber Kontroll-mini-LCLs führt.



**Abbildung 3-15.** Zytotoxische Aktivität der pp65-reaktiven T-Zelllinien der Spender f14 und f22 gegenüber pp65mini-LCLs (Rauten) und Kontroll-mini-LCLs (offene Quadrate) desselben und des jeweils anderen Spenders. Gezeigt sind zwei Chrom-Freisetzungsexperimente, eines an Kultivierungstag 42 der T-Zelllinie f14 und eines an Kultivierungstag 62 der T-Zelllinie f22.

**3.3.7 pp65mini-LCL-stimulierte T-Zellen bleiben bei Langzeitkultivierung pp65-reaktiv**

Ein Vergleich der Lyseaktivitäten der T-Zelllinie von f22 an Tag 62 gegenüber autologen Zielzellen (Abbildung 3-15, drittes Diagramm von links) mit den in Abbildung 3-14 gezeigten Aktivitäten an Kultivierungstag 33 zeigt, daß die zytotoxische Aktivität während der fortgesetzten Expansion der T-Zelllinie nach Tag 33 konstant hoch blieb. Das entsprechende Experiment mit der Zelllinie von Donor f14, an Kultivierungstag 60 dieser T-Zelllinie, ist in Abbildung 3-16 dargestellt. Bei beiden T-Zelllinien blieb die ausgeprägte pp65-spezifische Zytotoxizität bei fortlaufender achtwöchiger Kultivierung erhalten.



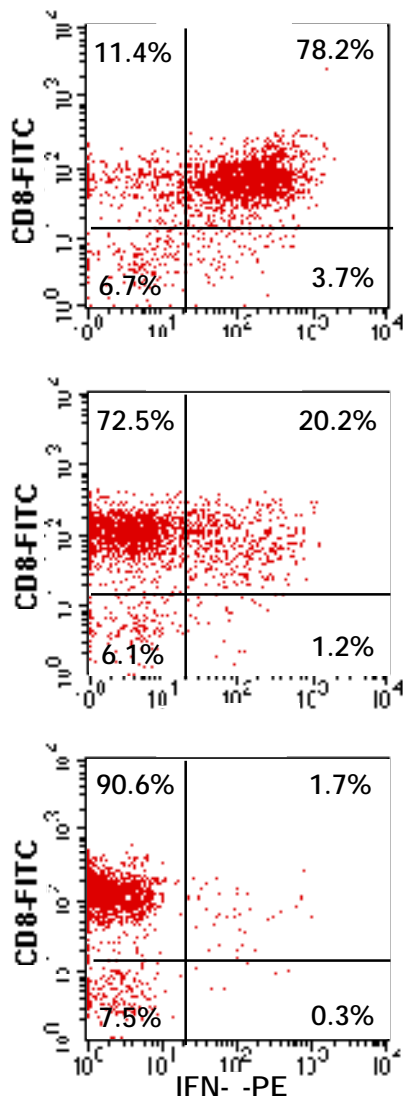
**Abbildung 3-16.** Zytotoxische Aktivität der pp65-reaktiven T-Zelllinie des Spenders f14 an Kultivierungstag 60. Als Zielzellen im TDA-Freisetzungsexperiment dienten autologe pp65mini-LCLs (Rauten) und Kontroll-mini-LCLs (offene Quadrate).

**3.3.8 pp65-reaktive T-Zelllinien sezernieren antigenspezifisch Interferon-**

Eine der wichtigsten T-Zell-Effektorfunktionen ist die Sekretion von Interferon- nach Aktivierung durch Antigenkontakt. Im Interferon- -Einfang-Experiment (*capture assay, secretion assay*) wird die quantitative Erfassung der Interferon-sezernierenden Zellen ermöglicht. Dazu werden die T-Zellen nach spezifischer Stimulation zunächst mit einem bispezifischen Antikörper beladen, der über einen CD45-spezifischen



schen Arm an die Zelle bindet; der andere, Interferon- $\gamma$ -spezifische Arm kann Interferon- $\gamma$  auf der Zelloberfläche einfangen. Bei geeigneter Wahl der Versuchsbedingungen, insbesondere genügend hoher Verdünnung der Zellen, stammt das eingefangene Interferon- $\gamma$  überwiegend von derselben Zelle, auf deren Oberfläche es anschließend gebunden wird. Durch einen weiteren, für ein anderes Interferon- $\gamma$ -Epitop spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper wird das an die Zelle gebundene Interferon sichtbar gemacht und so die sekretierende Zelle gefärbt. Die Analyse erfolgt durchflußzytometrisch.



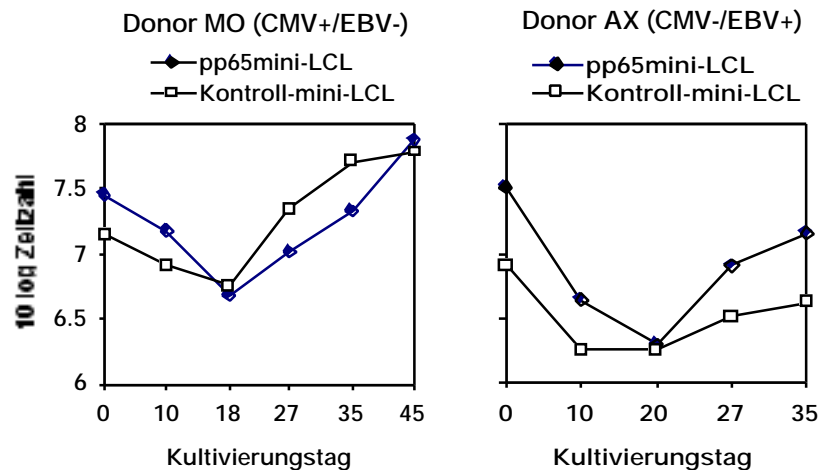
**Abbildung 3-17.** Antigen-spezifische Interferon- $\gamma$ -Sekretion durch eine pp65mini-LCL-generierte T-Zelllinie. Die T-Zelllinie von Spender f22, generiert durch Stimulation mit der pp65mini-LCL, wurde an Kultivierungstag 50 16 Stunden lang mit der autologen pp65-mini-LCL (oben) oder der autologen Kontroll-mini-LCL (Mitte) im Zahlenverhältnis T:LCL von 4:1 inkubiert oder ohne Zugabe einer Stimulatorzelle belassen (unten). Anschließend wurden Interferon- $\gamma$ -sekretierende Zellen durch Interferon- $\gamma$ -Einfang gefärbt und im Durchflußzytometer analysiert.

In Abbildung 3-17 sind die Ergebnisse eines solchen Experiments gezeigt. Zur Stimulation wurden autologe pp65mini-LCLs oder Kontroll-mini-LCLs zu den T-Zellen gegeben, in einem weiteren Kontrollansatz wurden die T-Zellen ohne Stimulatoren belassen. Durch Stimulation mit der pp65mini-LCL wurde die Mehrheit (78%) der T-Zellen zur Interferon-Sekretion angeregt; nur bei einer Minderheit der T-Zellen (20%) war das bei Stimulation mit der Kontroll-mini-LCL der Fall. Ein solches Experiment sollte insbesondere bei einer Aktivierung eines großen Teils der Zellen (wie hier bei der Stimulation mit pp65mini-LCL) nicht exakt quantitativ ausgewertet werden, da *bystander*-Effekte, bei denen nichtspezifische Zellen indirekt mitaktiviert werden, nicht auszuschließen sind. Dennoch kann das Experiment als semiquantitativer Hinweis gewertet werden, daß in der untersuchten T-Zelllinie ein großer Anteil pp65-spezifischer Effektor-T-Zellen und ein geringerer Anteil EBV-spezifischer T-Zellen vorlag.

### **3.3.9 pp65mini-LCLs reaktivieren pp65-reaktive T-Zellen nur aus CMV-positiven Spendern**

Die bisherigen Experimente wiesen eindeutig auf die erfolgreiche Reaktivierung einer starken pp65-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort durch pp65mini-LCLs hin. Da die bisherigen Ergebnisse auf der T-Zell-Reaktivierung aus *buffy coats* zufällig ausgewählter anonymer Spender beruhten und daher deren CMV- und EBV-Infektionsstatus nicht bekannt war, konnte die Effizienz der Generierung pp65-spezifischer und EBV-spezifischer T-Zellen nicht zweifelsfrei zur Ausgangssituation der Spender in Beziehung gesetzt werden. Des weiteren erschien es vorteilhaft, mit einigen Spendern zu arbeiten, bei denen schon Einzelheiten über immundominante in-vivo-CMV- oder EBV-Reaktivitäten auf Epitopebene bekannt waren. Insbesondere sollten Spender herangezogen werden, bei denen der zeitliche Verlauf der Reaktivierung und Expansion von T-Zellen verschiedener Epitopspezifität durch Analyse der pp65-mini-LCL-stimulierten T-Zelllinie mit HLA/Peptid-Tetrameren verfolgt werden konnte. Daher wurden in Zusammenarbeit mit dem Institute for Cancer Studies, Birmingham, neun weitere Spender ausgewählt. Der CMV- und EBV-Serostatus dieser Spender war bekannt, die Spender waren HLA-Klasse-I-typisiert, und zu einigen Spendern lagen bereits Erkenntnisse in bezug auf vorhandene immundominante pp65- und

EBV-Reaktivitäten vor. Bei acht dieser Spender gelang die Generierung von pp65-mini-LCLs und Kontroll-LCLs, und bei allen diesen acht Spendern wurde die T-Zell-Reaktivierung durch pp65mini-LCL-Stimulation untersucht. Tabelle 3-2 (Seite 64) informiert über die zu Beginn dieser Arbeiten bereits bekannten Charakteristika dieser Spender.

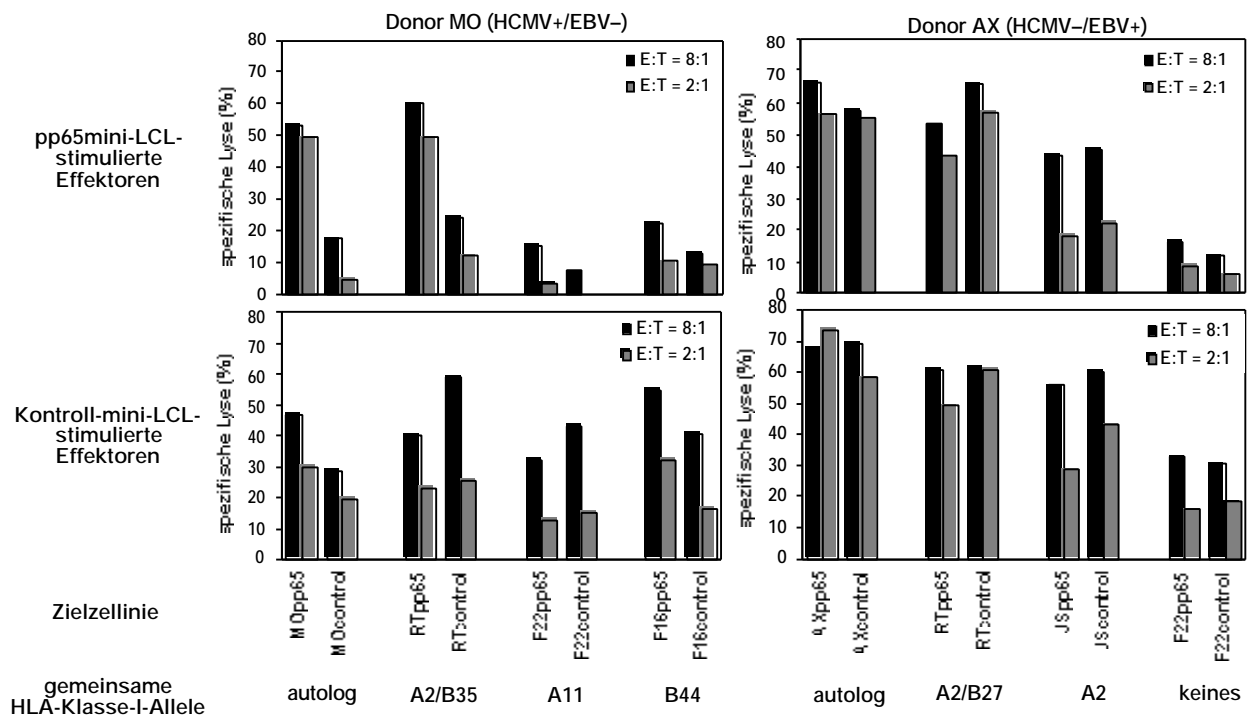


**Abbildung 3-18.** Proliferation von T-Zellkulturen der Spender MO und AX. An den angegebenen Tagen wurde jeweils mit der autologen pp65mini-LCL (Rauten) oder der Kontroll-mini-LCL (Quadrate) restimuliert.

Um die Reaktivierung CMV- und EBV-spezifischer T-Zellen separat untersuchen zu können, konzentrierten sich die ersten Experimente dieses Teils meiner Arbeiten auf den CMV-positiven/EBV-negativen Spender MO und den CMV-negativen/EBV-positiven Spender AX. Aus PBMC beider Spender wurden jeweils eine pp65mini-LCL-stimulierte T-Zellkultur und eine Kontroll-mini-LCL-stimulierte T-Zellkultur nach dem bereits für die ersten T-Zelllinien erprobten Protokoll generiert. Abbildung 3-18 zeigt das Proliferationsverhalten dieser Kulturen; ab der dritten Stimulation stieg die Gesamtzellzahl in den T-Zellkulturen beider Spender wieder an. Da mittlerweile ein größeres Sortiment an pp65mini-LCLs und Kontroll-mini-LCLs verschiedener Spender zur Verfügung stand, konnten zur Analyse der HLA-Restriktion einer T-Zellkultur neben autologen und vollständig HLA-Klasse-I-inkompatiblen (*mismatched*) mini-LCLs ver-

schiedene partiell HLA-Klasse-I-kompatible (*matched*) mini-LCLs als Zielzellen verwendet werden, und zwar jeweils paarweise die pp65mini-LCL und die entsprechende Kontroll-mini-LCL.

Abbildung 3-19 zeigt die zytotoxischen Aktivitäten dieser T-Zellkulturen. Die pp65-mini-LCL-stimulierten T-Zellen des CMV-negativen/EBV-positiven Spenders AX lysierten pp65-mini-LCLs jeweils gleich stark wie entsprechende Kontroll-mini-LCLs (Abbildung 3-19 rechts oben). Ebenso verhielten sich die Kontroll-mini-LCL-stimulierten T-Zellen desselben Spenders (Abbildung 3-19 rechts unten). Da beim Spender AX von einer EBV-spezifischen, nicht aber pp65-spezifischen T-Zell-Antwort auszugehen ist, zeigt dieses Ergebnis, daß pp65-mini-LCLs ebenso gute Stimulatoren und ebenso gute Zielzellen der EBV-spezifischen T-Zell-Antwort sind wie Kontroll-mini-LCLs. Die Lyseaktivität nahm mit dem Ausmaß der HLA-Übereinstimmung ab: auch das war für eine EBV-spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort zu erwarten. Beim EBV-negativen, CMV-positiven Spender MO zeigten die Kontroll-mini-LCL-stimulierten T-Zellen (Abbildung 3-19 links unten) ein nichtspezifisches Lyseverhalten ohne offensichtliche Anzeichen einer HLA-restringierten Lyse; das ist typisch für LCL-stimulierte T-Zellen von EBV-negativen Spendern (Gustafsson et al., 2000). Anders war das Bild bei den pp65mini-LCL-stimulierten T-Zellen von Spender MO (Abbildung 3-19 links oben): die nichtspezifische Aktivität fehlte hier, und es zeigte sich eine klare pp65-spezifische Zytotoxizität gegenüber autologen und gegenüber HLA-A2/B35-kompatiblen pp65-exprimierenden Zielzellen.



**Abbildung 3-19.** Zytotoxische Reaktivitäten von T-Zellkulturen der Spender MO und AX. Gezeigt ist ein Chrom-Freisetzungsexperiment an Tag 27 (Spender MO, CMV+, EBV-) bzw. Tag 24 (Spender AX, CMV-, EBV+). Als Zielzellen wurden Paare von pp65mini-LCLs und Kontroll-mini-LCLs verwendet. Bei allogenen Zielzellen sind alle gemeinsamen HLA-A- und B-Allele angegeben.

**Tabelle 3-2.** Übersicht über HLA-Typ, Virusstatus und bekannte Epitopreaktivitäten der untersuchten Spender und verwendeten Zelllinien. Näheres über die genannten Epitope findet sich in Tabelle 3-3.

Spender	HLA-A	HLA-B	HLA-C	EBV-Serostatus	CMV-Serostatus	EBV-Epitope aus latenten Proteinen	pp65-Epitope
Spender mit charakterisiertem Infektionsstatus							
RT	A2, A24	B2705, B35	Cw2, Cw4	+	+	YPS, RRIY, HPV, CLG	IPS, NLV
DW	A2, A3	B7, B8	Cw7	+	+	LLW, FLR, QAK	
SL	A1, A2	B16, B40	Cw3	+	+	IED, LLW	NLV
PM	A2	B7, B13		+	+		NLV
JS	A2	B15, B52	C0304, C1202	+	+		
MO	A2, A11	B35, B44	Cw4, Cw15	-	+		NLV, IPS
AX	A2, A32	B27	Cw1, Cw9	+	-		
SH	A2	B27, B44		+	-		
Uncharakterisierte Spender							
f14	A1, A2	B13, B62	Cw3, Cw7				
f16	A1, A23	B8, B44					
f22	A11, A26	B49, B53	Cw4, Cw7				
HB	A1, A2	B8, B60(40)	Cw15, Cw17				
C6	A3, A68	B18, B44	Cw7				
Fibroblasten-Linien							
MRC-5	A2, A29	B13, B44	Cw6				
KATS	A2, A11	B35, B40					
ALIL	A3	B15, B2705	Cw1, C0702				
IRIR	A24, A32	B51, B55	C0701, C1203				
JILB	A1	B7, B8					

Tabelle 3-3. In dieser Arbeit diskutierte CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope

Epitop	Sequenz	Protein	Amino- säure	HLA- Restr.	Referenz
pp65-Epitope					
NLV	NLVPMVATV	pp65	493-502	A2	(Wills et al., 1996)
TPR	TPRVTTGGGAM	pp65	417-426	B7	(Wills et al., 1996)
IPS	IPSINVHHY	pp65	123-131	B35	(Gavin et al., 1993)
EBV-Epitope aus Genprodukten des latenten Zyklus					
CLG	CLGGLLTMV	LMP2	426-434	A2	(Lee et al., 1993)
LLW	LLWTLVVLL	LMP2	329-337	A2	(Lee et al., 1997)
FLR	FLRGRAYGL	EBNA3A	325-333	B8	(Burrows et al., 1992)
QAK	QAKWRLQTL	EBNA3A	158-166	B8	(Rickinson und Moss, 1997)
RRIY	RRIYDLIEL	EBNA3C	258-266	B27	(Brooks et al., 1998)
HPV	HPVGEADYFEY	EBNA1	407-417	B35	(Blake et al., 1997)
YPL	YPLHEQHGM	EBNA3A	458-466	B35	(Rickinson und Moss, 1997)
IED	IEDPPFNSL	LMP2	200-208	B60(40)	(Lee et al., 1997)

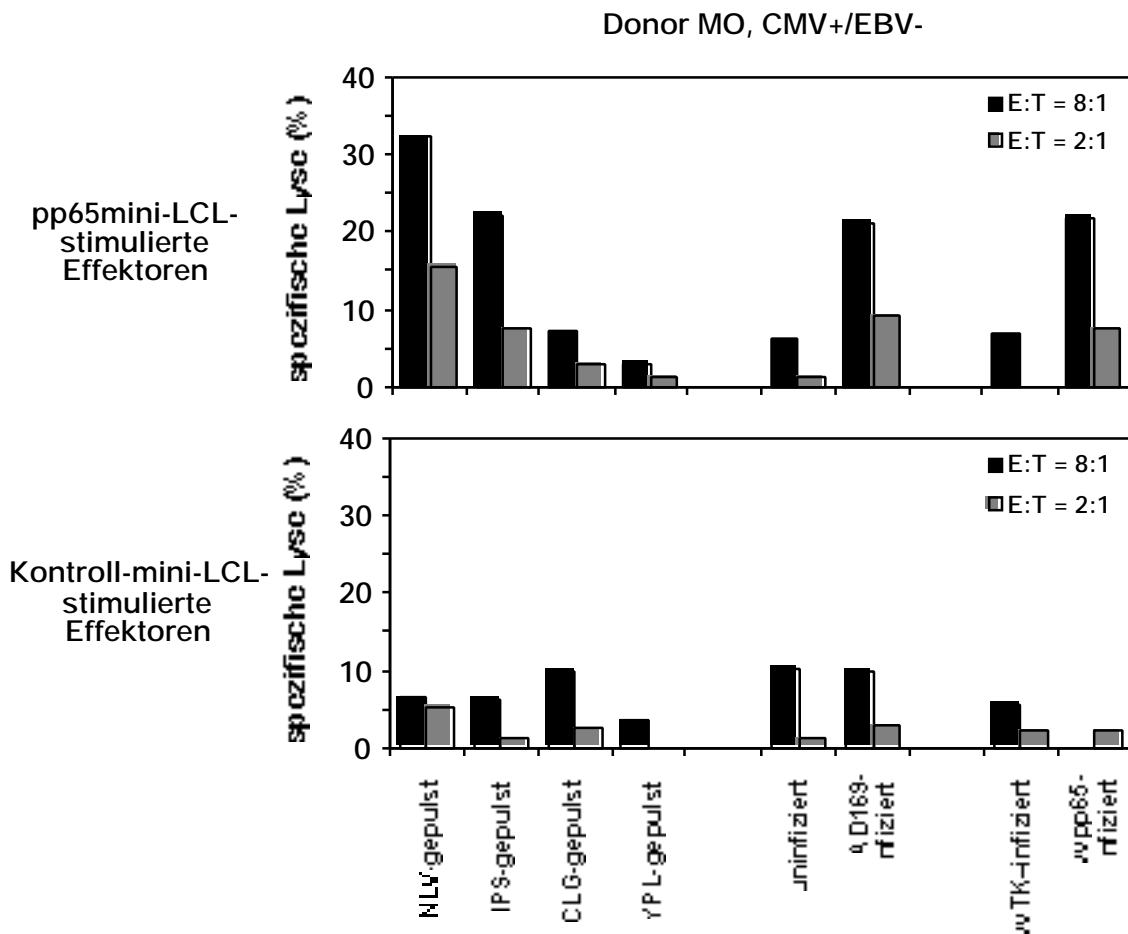
### 3.3.10 pp65-reaktive T-Zelllinien lysieren CMV-infizierte, pp65-Vaccinia-infizierte und pp65-Peptid-gepulste Fibroblasten

Um die pp65-spezifische Reaktivität in einem unabhängigen System zu verifizieren, wurde die spezifische Lyse von CMV-infizierten Fibroblasten durch pp65mini-LCL-stimulierte T-Zellen des Spenders MO untersucht. Fibroblasten sind diejenigen Zellen, die die CMV-Infektion und Replikation in vitro am besten unterstützen. Nach CMV-Infektion wird pp65 stark exprimiert, und die infizierten Fibroblasten werden einer Lyse durch pp65-spezifische T-Zellen zugänglich. Das System hat den zusätzlichen Vorteil, daß die Analyse der nur gegen CMV-Antigen gerichteten Zytotoxizität mög-

lich wird, ohne daß wie bei pp65mini-LCLs die EBV-spezifische Reaktivität zur Lyse beiträgt und durch Vergleich mit einer Kontroll-mini-LCL abgeschätzt werden muß. Allerdings sind die erreichbaren maximalen Lyseraten bei diesem System erfahrungsgemäß etwas geringer als bei Verwendung von potenteren antigenpräsentierenden Zellen wie mini-LCLs als Zielzellen. Da im Falle des Spenders MO mit einer durch HLA-A2 und HLA-B35 restringierten pp65-Spezifität gerechnet wurde, wie auch die Lyse A2/B35-kompatibler allogener pp65mini-LCLs zeigte (siehe Abbildung 3-19), wurden HLA-A2/B35-positive Fibroblasten verwendet. Eine weitere sehr effiziente generelle Möglichkeit, die hohe Expression eines Antigens in verschiedenen Zielzellen zu erreichen, bieten rekombinante Vacciniaviren. Da ein pp65-exprimierendes Vacciniavirus (vvpp65) verfügbar war (freundlicherweise bereitgestellt von N. Blake, Birmingham), wurden vvpp65-infizierte Fibroblasten ebenfalls als Zielzellen eingesetzt. Als dritte Möglichkeit der Bereitstellung des Antigens im zellulären Kontext wurden Fibroblasten unmittelbar mit Peptiden beladen („gepulst“), die immundominante A2- und B35-restringierte pp65-Epitope darstellen, nämlich NLV (NLVPM-VATV, pp65[495-503], A2-restringiert) und IPS (IPSINVHHY, pp65[123-131], B35-restringiert). Zur Kontrolle wurden in analoger Weise antigene Peptide aus latenten EBV-Proteinen verwendet, nämlich das immundominante B35-restringierte EBNA3A-Epitop YPL (YPLHEQHGM, EBNA3A [458-466]) und das subdominante A2-restringierte LMP2-Epitop CLG (CLGGLLTMV, LMP2 [426-434]).

Wie in Abbildung 3-20 (oben) gezeigt, wurden von pp65mini-LCL-stimulierten T-Zellen die mit pp65-Peptiden gepulsten Fibroblasten signifikant lysiert, wobei NLV vor IPS rangierte, nicht aber die mit EBV-Peptiden gepulsten Zellen. CMV-infizierte und vvpp65-infizierte Zielzellen wurden ebenfalls lysiert, nicht aber uninfizierte und Kontroll-Vacciniavirus-infizierte Zielzellen. Kontroll-mini-LCL-stimulierte T-Zellen zeigten dagegen keine signifikante Aktivität gegenüber gepulsten oder infizierten Zielzellen (Abbildung 3-20 unten). Diese Ergebnisse bestätigten die Spezifität der pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinie aus Donor MO für das Antigen pp65 und dessen Epitope NLV und IPS und führten im nächsten Schritt zur Frage nach der Quantifizierung der T-Zellen mit diesen Spezifitäten.





**Abbildung 3-20.** Lyse von Peptid-gepulsten, CMV-infizierten und pp65-Vaccinia-infizierten Fibroblasten. Gezeigt ist die zytotoxische Aktivität von pp65mini-LCL-stimulierten (oben) und Kontroll-mini-LCL-stimulierten (unten) T-Zelllinien des Donors MO am Kultivierungstag 42 durch Chrom-Freisetzung aus verschiedenartig vorbehandelten Fibroblasten der HLA-A2/B35-kompatiblen Zelllinie KATS. Die KATS-Zellen wurden zuvor (von links nach rechts) mit den pp65-Epitopen NLV oder IPS oder mit den EBV-Epitopen CLG oder YPL gepulst; unbehandelt belassen oder mit CMV des Stamms AD169 infiziert; mit dem rekombinanten Vacciniavirus wTK- oder mit dem pp65-exprimierenden Vacciniavirus wpp65 infiziert.

### 3.3.11 Direkte Visualisierung pp65-epitopspezifischer T-Zellen durch Tetramer-Färbung

Trotz der hohen Spezifität und Selektivität der Bindung des T-Zell-Rezeptors an den Komplex aus antigenem Peptid und HLA-Molekül ist deren Affinität zu gering, um die stabile Bindung eines einzelnen solchen Komplexes an eine antigenspezifische T-Zelle und damit eventuell ihre Färbung und Detektion zu erreichen. Die Lösung dieses Problems wurde durch Oligomerisierung, also Erhöhung der Avidität erreicht: ein tetrameres Aggregat aus biotinylierten HLA-Peptid-Komplexen, untereinander über die vier Koordinationsstellen des Streptavidins für Biotin verbunden, bindet selektiv und stabil an epitopspezifische T-Zellen und macht sie durch eine fluoreszierende Gruppe detektierbar und quantifizierbar (Altman et al., 1996). Solche „Tetramere“ sind inzwischen das Standardwerkzeug für die direkte Visualisierung antigenspezifischer T-Zellen. Da sie für jede Peptid-HLA-Kombination individuell präpariert und aufgereinigt werden müssen, sind Tetramere nach wie vor nur für eine begrenzte, allerdings stetig wachsende Zahl von Epitopen beschrieben.

Da Tetramere für die pp65-Epitope NLV und IPS zur Verfügung standen (freundlicherweise bereitgestellt von N. Khan, Birmingham), konnte die Zahl der für diese Epitope spezifischen T-Zellen in der T-Zelllinie von Donor MO quantifiziert werden. Als weitere Kontrolle wurde ein Tetramer für das EBV-Epitop YPL verwendet. Wie in Abbildung 3-21 gezeigt, waren an Kultivierungstag 52 zusammen fast 50% der CD8<sup>+</sup>-Zellen der pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinie spezifisch für NLV oder IPS. Dagegen waren, wie erwartet, in der Kontrollpopulation T-Zellen dieser Spezifität nicht nachzuweisen. Aus den Diagrammen sieht man auch, daß die pp65mini-LCL-stimulierten T-Zellen überwiegend CD8-positiv waren, während die Kontroll-T-Zelllinie überwiegend aus CD4<sup>+</sup>-T-Zellen bestand und außerdem einen höheren Anteil an CD16-positiven Zellen, wahrscheinlich *natural-killer*-Zellen, aufwies.

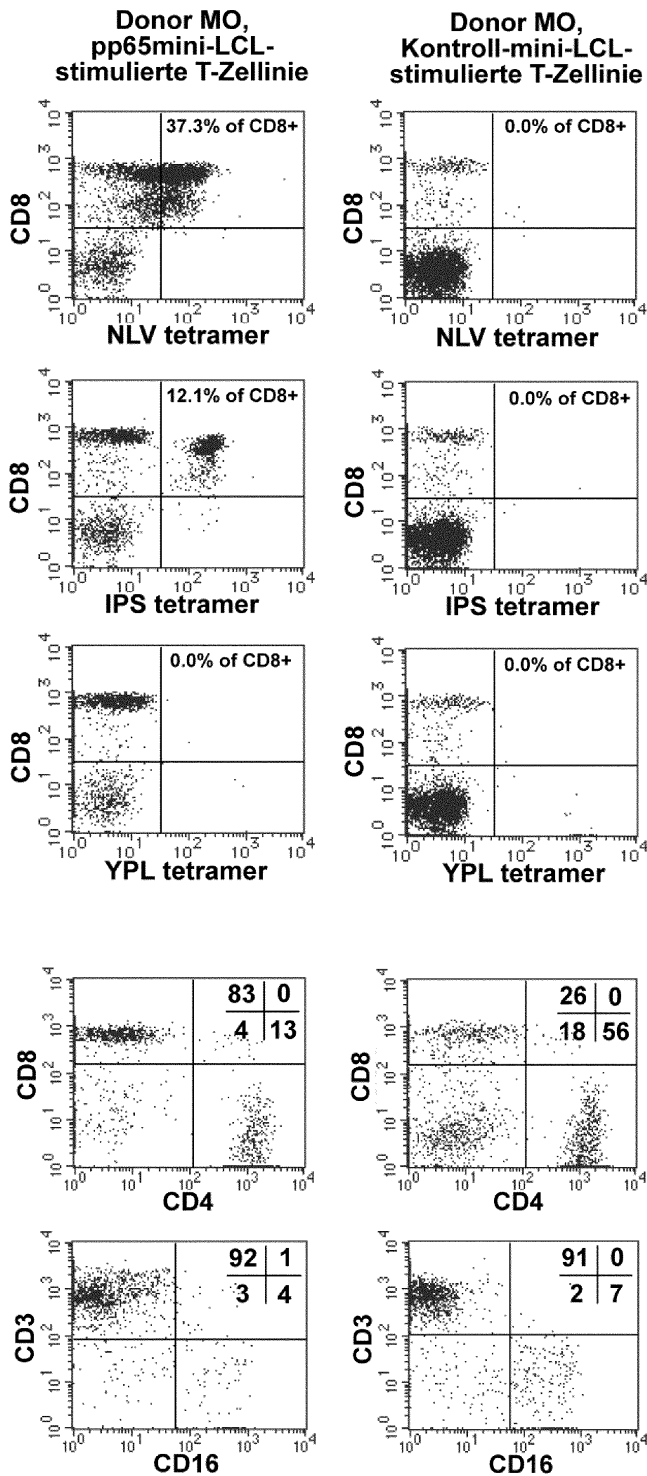


Abbildung 3-21. Tetramer-Analyse und phänotypische Analyse von T-Zelllinien des (CMV+/EBV-)Spenders MO. Die T-Zelllinie wurde mit Tetrameren für die immundominanten pp65-Epitope NLV und IPS sowie das immundominante EBV(EBNA3A)-Epitop YPL analysiert, außerdem wurden phänotypische Marker für T-Zellen (CD3), NK-Zellen (CD16) und T-Zell-Subspezies (CD4, CD8) untersucht.

Auch die T-Zellen des EBV-positiven/CMV-negativen Spenders AX wurden in analoger Weise untersucht (nicht gezeigt). Da dieser Spender HLA-A2, nicht aber HLA-B35 aufwies, konnte für die direkte Färbung CMV-spezifischer T-Zellen nur das NLV-Tetramer verwendet werden. Da bei Trägern von HLA-B27 oft eine starke T-Zellantwort gegen das EBV-Epitop RRIY (RRIYDLIEL, EBNA3C[258-266]) beschrieben

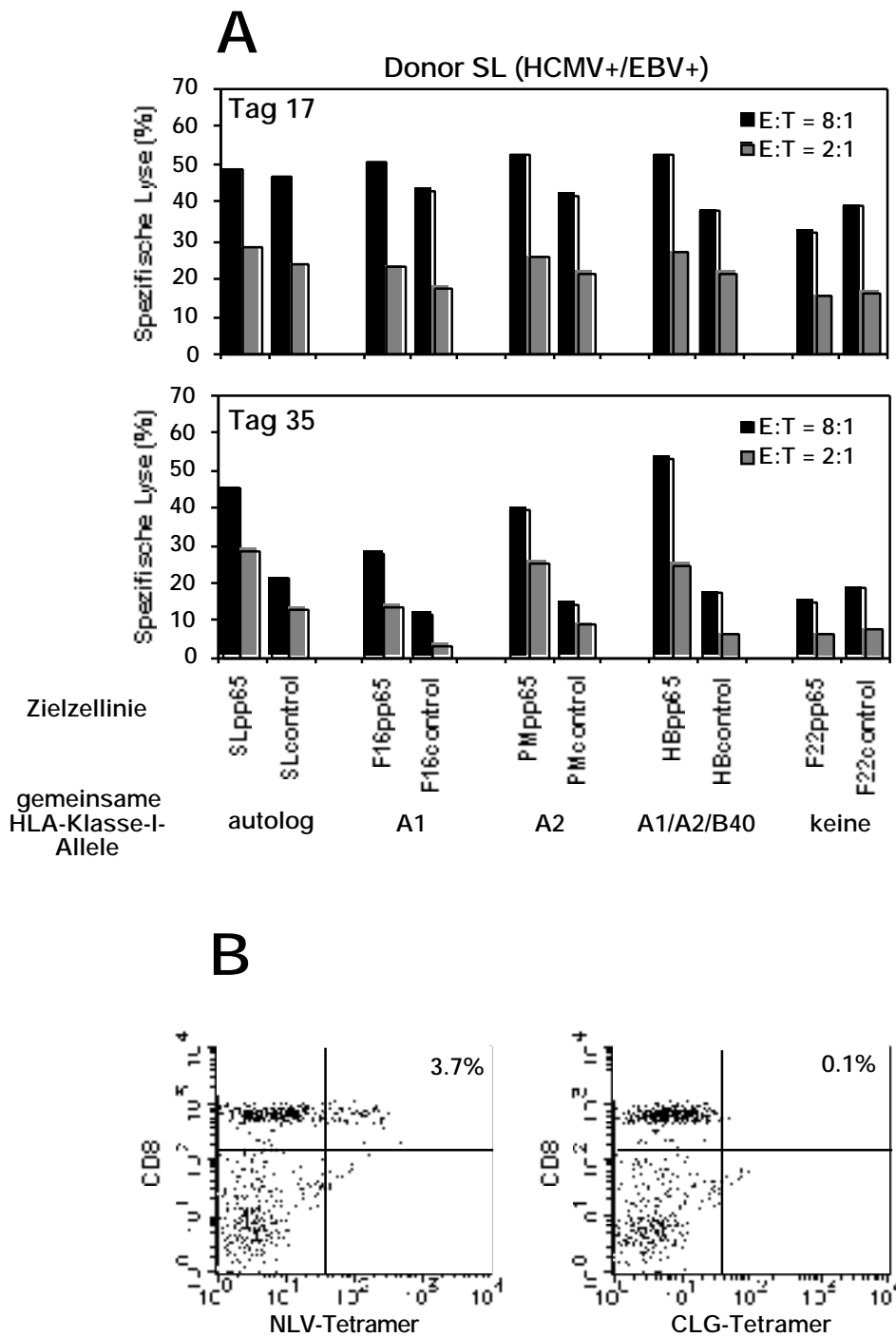
wird, wurde zum direkten Nachweis EBV-spezifischer T-Zellen das entsprechende Tetramer verwendet. Wie erwartet fanden sich bei der Tetramer-Analyse NLV-(pp65)-spezifische Zellen weder in der pp65mini-LCL-stimulierten noch der Kontroll-mini-LCL-stimulierten T-Zelllinie. Dagegen fanden sich in beiden T-Zelllinien RRIY-(EBV)-spezifische T-Zellen, allerdings in geringer Zahl (1,1% bzw. 0,9% der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen). Das Epitop RRIY scheint daher bei diesem Spender nicht immundominant zu sein. Beide Zelllinien wurden von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen dominiert; allerdings fanden sich wiederum in der pp65mini-LCL-stimulierten Linie höhere Anteile von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (88% versus 70%) und niedrigere Anteile von CD16-positiven NK-Zellen (1,7% versus 6,2%) als in der Kontroll-mini-LCL-stimulierten T-Zelllinie.

Diese Ergebnisse bestätigten, daß mit pp65mini-LCLs aus CMV-positiven, nicht aber negativen Spendern spezifische T-Zellen effektiv reaktiviert werden konnten. Sie zeigten, daß große Zahlen epitopspezifischer T-Zellen mit Hilfe von Tetrameren nachweisbar waren, und daß die Zahl epitopspezifischer Zellen mit der epitopspezifischen Lyse korrelierte. Das wurde beim Spender MO auch anhand der Hierarchie der beiden CMV-Epitope NLV und IPS deutlich: die Lyse von NLV-gepulsten Zielzellen war stärker als die von IPS-gepulsten Zielzellen (Abbildung 3-20), und damit korrelierte die höhere Zahl von NLV- gegenüber IPS-tetramerfärbenden T-Zellen (Abbildung 3-21).

### **3.3.12 Reaktivierung von T-Zelllinien aus (CMV+/EBV+)-Spendern**

Die parallele Analyse der zytotoxischen Reaktivität durch Lyseexperimente und der Epitopspezifität durch Tetramere wurde daraufhin auf T-Zelllinien aus Spendern ausgedehnt, die zugleich CMV-positiv und EBV-positiv waren.

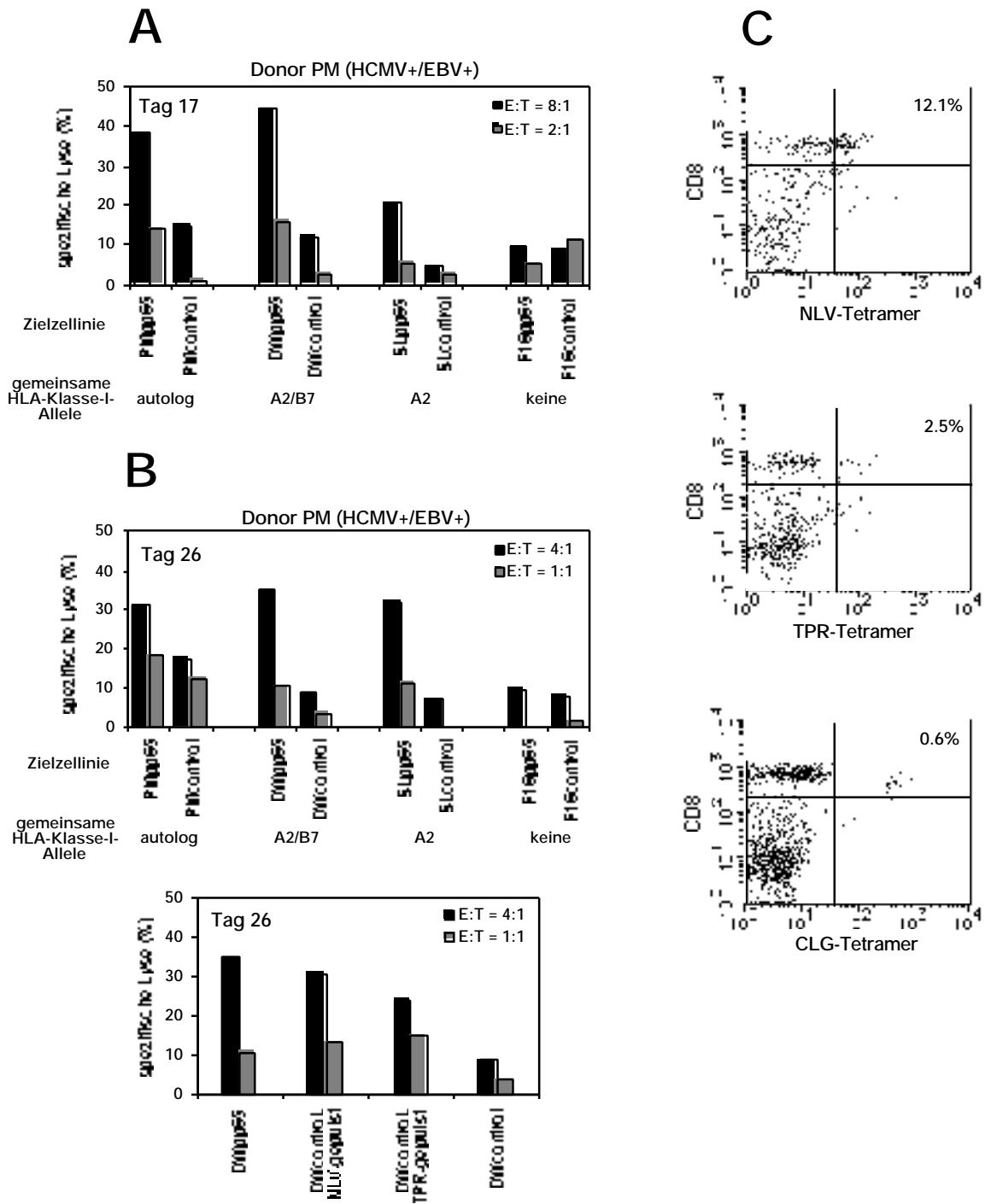
Bei Donor SL (siehe Tabelle 3-2) war bereits ein EBV-spezifisches T-Zell-Gedächtnis gegen ein HLA-B40-restringiertes Epitop (IEDPPFNSL, LMP2 [200-208]) (Lee et al., 1997) und gegen ein A2-restringiertes Epitop (LLWTLVVLL, LMP2[329-337]) (Redchenko und Rickinson, 1999) nachgewiesen worden. Erste Versuche zum pp65-spezifischen T-Zell-Gedächtnis hatten Hinweise auf T-Zellen mit Spezifität für das A2-restringierte Epitop NLV ergeben (M. Cobbold, persönliche Mitteilung). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine pp65mini-LCL-stimulierte T-Zelllinie aus Blutzellen dieses Spenders generiert.



**Abbildung 3-22.** Analyse der pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinie des Spenders SL (CMV+/EBV+). **(A)** Die zytotoxische Reaktivität der T-Zelllinie mit verschiedenen pp65mini-LCLs und Kontroll-mini-LCLs als Zielzellen wurde an Kultivierungstag 17 und an Kultivierungstag 35 durch Chromfreisetzung untersucht. **(B)** Analyse der T-Zelllinie mit Tetrameren für das pp65-Epitop NLV und das EBV-Epitop CLG an Kultivierungstag 32. Tetramerpositive Zellen sind angegeben in Prozent der CD8<sup>+</sup>-Zellen.

Die Analyse des Zytotoxizitätsmusters dieser Zellen ergab an Kultivierungstag 17 eine noch stark durch nichtspezifisches, HLA-unrestringiertes Verhalten geprägte Reaktivität. Bis Tag 35 hatte diese Reaktivität abgenommen, und ein pp65-spezifisches Lyseverhalten, unter anderem restringiert über HLA-A1, A2 und vielleicht B40, war klar erkennbar (Abbildung 3-22), und das trotz der für diesen Spender zu erwartenden EBV-spezifischen Reaktivität für manche dieser Allele. Die Analyse mit den Tetrameren NLV (pp65, A2) und CLG (EBV, A2) zeigte die Expansion mäßiger Zahlen pp65-spezifischer T-Zellen (NLV: 3,7%). Da bei diesem Spender aber eine über mehrere Klasse-I-Allele restringierte pp65-spezifische T-Zell-Antwort vorlag, war die Gesamtzahl pp65-spezifischer T-Zellen vermutlich höher. Damit steht in Einklang, daß sowohl für HLA-A1 wie für HLA-B3801/02 (zur serologischen Reaktivität HLA-B16 gehörend) pp65-Epitope und die Reaktivierung entsprechender T-Zellen bei der Mehrheit der CMV-positiven Träger dieser Allele beschrieben wurden (Longmate et al., 2001).

Um durch direkte Färbung die Expansion von T-Zellen zu demonstrieren, die für ein weiteres pp65-Epitop spezifisch sind, wurde als nächstes die pp65mini-LCL-stimulierte T-Zelllinie des Spenders PM untersucht, bei dem Hinweise auf eine durch A2 und B7 restringierte pp65-spezifische T-Zellantwort vorlagen. Tatsächlich fanden sich neben 12,1% NLV-epitopspezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei diesem Spender auch 2,5% CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Spezifität für das HLA-B7-restringierte pp65-Epitop TPR (TPRVGTGGAM, pp65[417-426]) (Abbildung 3-23 C). Im Unterschied zu Donor SL war die dementsprechende pp65-spezifische Zytotoxizität schon an Kultivierungstag 17 am Lyseverhalten gegenüber verschiedenen mini-LCLs ablesbar und nur von geringer nichtspezifischer Lyseaktivität gegenüber HLA-inkompatiblen mini-LCLs begleitet (Abbildung 3-23 A). Die erneute Analyse an Tag 26 bestätigte diesen Befund. Die Stärke der epitopspezifischen Zytotoxizität, ermittelt durch Lyse von Zielzellen nach deren Beladung mit Peptidepitopen, korrelierte wiederum mit der Häufigkeit der jeweiligen T-Zell-Spezifität in der Tetramer-Analyse. Eine solche Korrelation war schon bei Spender MO beobachtet worden (Abbildung 3-20, Seite 67). Bei Spender PM war, entsprechend der Tetramer-Analyse, die Lyse NLV-beladener Zellen höher als diejenige TPR-beladener Zellen, beide jedoch weit höher als die Lyse ungepulster Zellen (Abbildung 3-23 B).



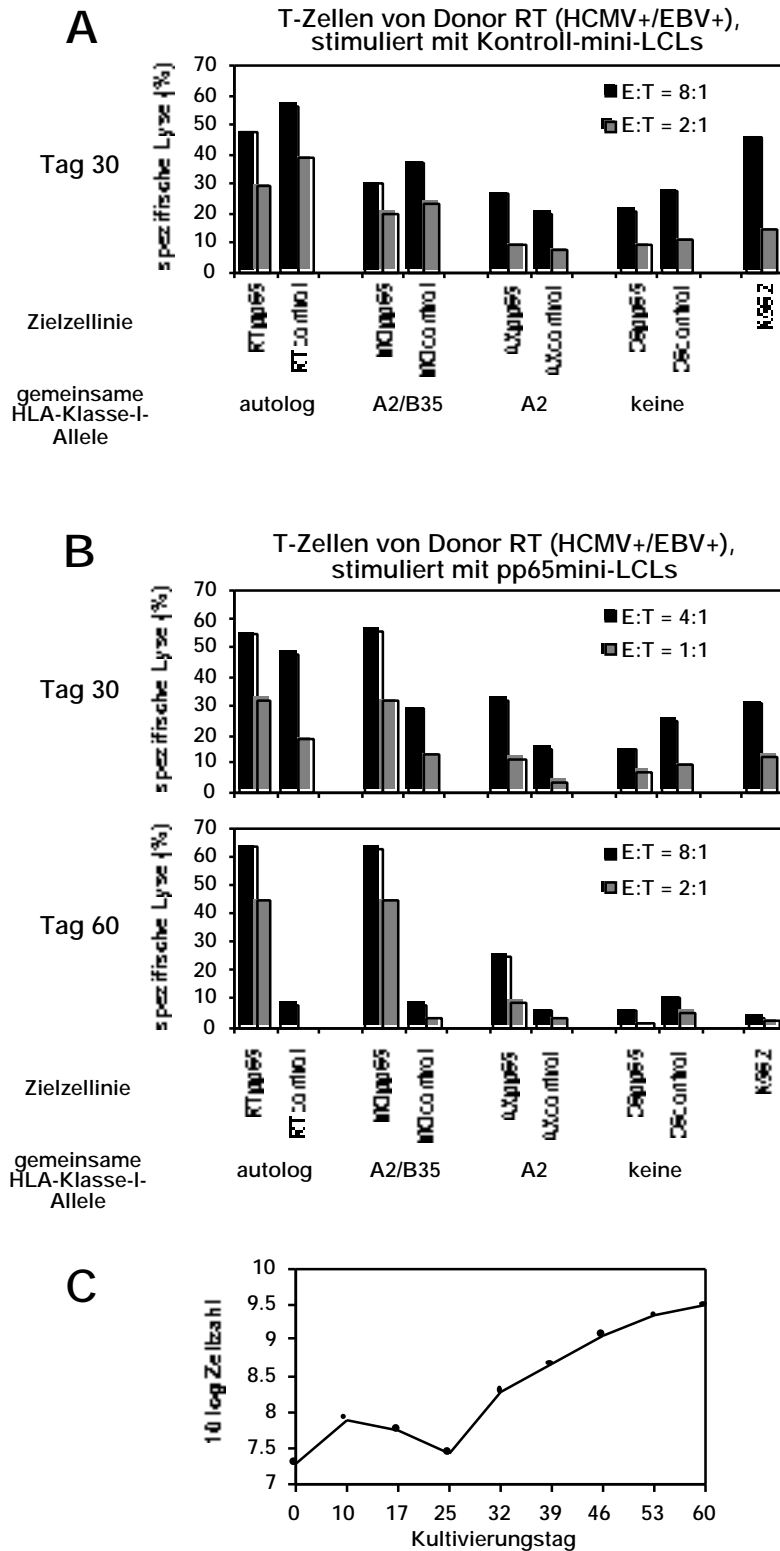
**Abbildung 3-23.** Entwicklung der pp65-Spezifität in der T-Zelllinie des Spenders PM. **(A)** Zytotoxische Reaktivität gegenüber verschiedenen mini-LCLs an Kultivierungstag 17. **(B)** Die zytotoxische Reaktivität gegenüber den gleichen Zielzellen wurde nochmals an Tag 26 getestet (oben), zusätzlich wurde die Zytotoxizität gegenüber peptidbeladenen Zielzellen untersucht (unten). **(C)** Tetramer-Analyse der T-Zelllinie an Kultivierungstag 23.

### 3.3.13 Verschiebung von Spezifitäten bei Langzeitkultivierung

Für den klinischen Einsatz beim adoptiven T-Zell-Transfer ist von Vorteil, wenn möglichst große Zahlen spezifischer T-Zellen verfügbar sind. In der Regel wird dies die kontinuierliche Kultivierung und Expansion der T-Zellen über einen Zeitraum von mehreren Wochen erfordern. Da durch pp65mini-LCL-Stimulation polyklonale T-Zelllinien mit verschiedenen nebeneinander vorliegenden Spezifitäten entstehen, stellt sich die Frage nach der Konstanz der Zusammensetzung solcher T-Zelllinien während des Kultivierungsprozesses. Insbesondere sollten wichtige Spezifitäten nicht durch Selektionsprozesse verlorengehen. Um sich dieser Frage zu nähern, wurde die Expansion und das Zahlenverhältnis von pp65- und EBV-spezifischen T-Zellen in der T-Zelllinie eines weiteren, für die Analyse besonders geeigneten Spenders, RT, während längerer Kultivierungszeit verfolgt. Die Ausgangssituation war bei diesem Spender besonders günstig, weil zwei immundominante pp65-Epitope und mehrere dominante EBV-Epitope des CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Gedächtnis-Repertoires des Spenders nicht nur bekannt, sondern auch entsprechende Tetramere verfügbar waren. Im einzelnen waren dies die pp65-Epitope IPS und NLV sowie die EBV-Epitope YPL, HPV und RRIY, jeweils in der Reihenfolge der Reaktionsstärke im ELISPOT-Assay aus Blutzellen ex vivo (N. Gudgeon, persönliche Mitteilung).

Abbildung 3-24 faßt einige Ergebnisse der Analyse der T-Zelllinien dieses Spenders zusammen. Bei der Kontroll-T-Zelllinie lag an Tag 30 eine EBV-spezifische Lyse autologer und kompatibler mini-LCLs ohne Unterschied zwischen pp65-exprimierenden und nicht exprimierenden Zielzellen vor (Abbildung 3-24 A). Daneben war noch eine signifikante HLA-unrestringierte Lyse festzustellen, erkennbar an der Lyse HLA-inkompatibler Zellen und an der Lyse von K562-Zellen, ein Zeichen für *natural-killer*-Aktivität. Bei der parallel generierten pp65-T-Zelllinie (Abbildung 3-24 B) zeigte sich an Tag 30 noch ein ähnliches Bild. Anders war nur die Lyse von HLA-A2-kompatiblen Zielzellen, wo eine pp65-Spezifität bereits deutlich wurde. Auch hier aber lag noch eine HLA-unrestringierte zytotoxische Komponente vor. Stark verändert hatte sich das zytotoxische Aktivitätsmuster allerdings an Tag 60: nicht nur die HLA-unrestringierte und K562-Zytotoxizität, sondern auch die EBV-spezifische Zytotoxizität gegenüber autologen und allogenen Kontroll-mini-LCLs war nahezu verschwunden, während die pp65-spezifische Reaktivität gleichbleibend hoch geblieben war.





**Abbildung 3-24.** Reaktivitäten und Proliferation von T-Zelllinien des Spenders RT, generiert durch Stimulation mit der Kontroll-mini-LCL oder der pp65mini-LCL. **(A)** Zytotoxische Reaktivität der Kontroll-T-Zelllinie gegenüber verschiedenen mini-LCLs an Kultivierungstag 30. **(B)** Zytotoxische Reaktivität der pp65-T-Zelllinie gegenüber mini-LCLs an Tag 30 und Tag 60. **(C)** Proliferationsentwicklung der pp65-T-Zelllinie.

Die in Abbildung 3-24 C gezeigte Proliferationskurve zeigt einen Verlauf in zwei Etappen, der diese Reaktivitätsentwicklung begleitete. Nach einem starken Anstieg der Zellzahl ganz zu Beginn der Kultur, der durch eine generelle, nicht antigenspezifische Stimulation zu erklären ist, fiel die Zellzahl ab, um dann erneut anzusteigen, diesmal durch die bevorzugte Proliferation antigenspezifischer T-Zellen.

Eine Analyse der Spezifitäten innerhalb der pp65- und der Kontroll-T-Zelllinie an Kultivierungstag 34 ist in Abbildung 3-25 gezeigt. Es wird deutlich, daß durch Stimulation mit der pp65-mini-LCL sowohl pp65- als auch EBV-spezifische T-Zellen mit jeweils mehreren Epitopspezifitäten expandiert werden konnten. Beide pp65-Spezifitäten, die ex vivo gefunden wurden und die durch verschiedene HLA-Allele restringiert sind, fanden sich in der T-Zelllinie wieder. Ebenso wurden alle drei Epitopspezifitäten reaktiviert, die das EBV-spezifische Gedächtnis des Spenders RT dominieren, und waren an Kultivierungstag 34 neben den pp65-Spezifitäten in der T-Zelllinie repräsentiert. Dabei handelt es sich um Epitope aus drei verschiedenen latenten EBV-Proteinen, die durch zwei verschiedene HLA-Allele restringiert sind. Die mit der Kontroll-mini-LCL restimulierte T-Zelllinie enthielt ebenfalls alle drei EBV-Epitopspezifitäten, dagegen keine Zellen mit pp65-Spezifität.

Die Ergebnisse der phänotypischen und Tetramer-Analysen, zusammengestellt in Tabelle 3-4, bestätigen zum einen die Interpretation der Proliferationskurve von Abbildung 3-24 C und machen zum zweiten die Entwicklung der Reaktivität der pp65-T-Zelllinie verständlich, wie sie in Abbildung 3-24 B gezeigt ist. In der pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinie gingen die Anteile von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von Tag 21 über Tag 34 bis Tag 56 immer weiter zurück, die Anteile der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen stiegen dagegen an, bis an Kultivierungstag 56 eine fast ausschließlich CD8-positive T-Zell-Population vorlag. Auch CD16-positive NK-Zellen waren zu diesem Zeitpunkt nicht mehr vorhanden. EBV-spezifische T-Zellen waren zunächst (Tag 21) in der T-Zelllinie stark repräsentiert, ihre Zahl ging nach Tag 34 dann aber auf nahe Null zurück, und zwar für alle drei untersuchten Epitopspezifitäten, während der Anteil der mit Tetrameren detektierbaren pp65-spezifischen T-Zellen weiter anstieg und an Tag 56 über 50% lag.

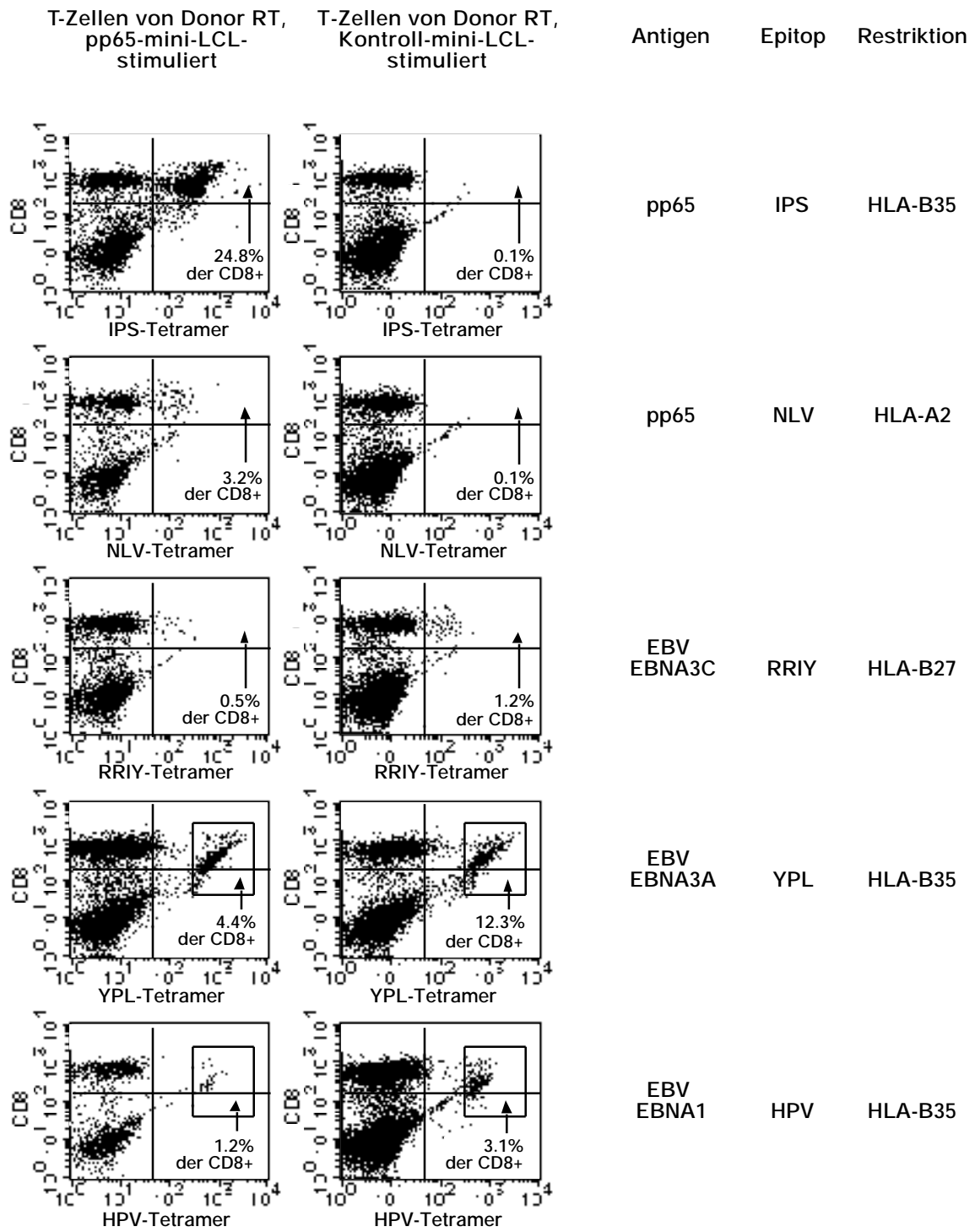


Abbildung 3-25. Tetramer-Analysen der pp65- und der Kontroll-T-Zelllinie an Kultivierungstag 34. Die Tetramer-positiven Zellen sind in Prozent der CD8-positiven Zellen angegeben. Siehe auch Tabelle 3-4.

Demnach können pp65-mini-LCLs also in einer Kultur T-Zellen verschiedener pp65- und EBV-Epitopspezifitäten parallel reaktivieren, die über verschiedene HLA-Klasse-I-Allele restringiert sind und im Fall von EBV verschiedenen antigenen Proteinen entstammen können. Bis zu einer gewissen Kultivierungszeit bleiben alle Spezifitäten in der polyklonalen T-Zelllinie repräsentiert, danach können einzelne Spezifitäten verlorengehen. Jedoch blieb in allen Fällen, in denen eine Kultivierung bis Tag 60 oder darüber hinaus fortgesetzt wurde, die pp65-spezifische Reaktivität in voller Höhe erhalten, sowohl bei Spender RT (Abbildung 3-24 und Tabelle 3-4) als auch bei den Spendern f14 (Abbildung 3-16) und f22 (Abbildung 3-15). pp65mini-LCLs sind demnach ein besonders geeignetes Werkzeug für die Generierung pp65-spezifischer T-Zelllinien. Für die Generierung EBV-spezifischer T-Zelllinien aus CMV-positiven Spendern dürften stattdessen Zelllinien wie die hier als Kontrolle verwendeten mini-LCLs ohne Fremdantigen-Expression das Werkzeug der Wahl sein.

**Tabelle 3-4.** Tetramer-Analysen und phänotypische Merkmale in T-Zelllinien von Donor RT

Tag in Kultur	Stimulation mit pp65-mini-LCL			Stimulation mit Kontroll-mini-LCL	
	21	34	56	21	34
<b>CMV-Epitope</b>					
NLV	3.8	3.2	3.2	0.0	0.1
IPS	9.6	24.8	51.1	0.1	0.1
<b>EBV-Epitope</b>					
RRIY	1.2	0.5	0.4	2.4	1.2
YPL	8.7	4.4	0.2	12.1	12.3
HPV	2.1	1.2	0.0	2.9	3.1
<b>Phänotypische Marker</b>					
CD8+	29.5	63.4	97.5	28.5	55.8
CD4+	52.6	23.4	0.7	53.6	27.4
CD16+	5.7	10.0	0.4	8.1	8.0

Tetramer-positive Zellen sind angegeben in Prozent der CD8<sup>+</sup>-Zellen, Zellen mit phänotypischen Markern in Prozent der Gesamtzellzahl.

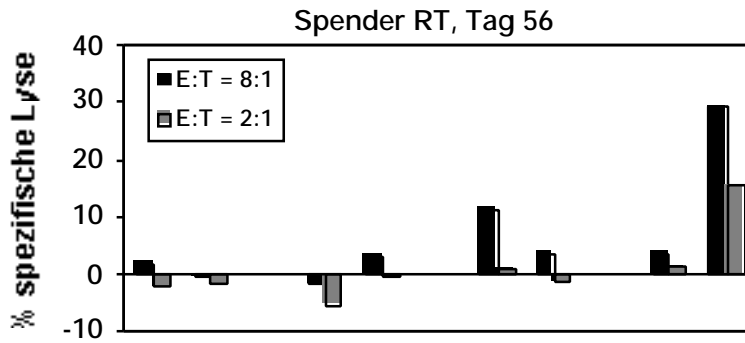
### 3.3.14 Ermittlung des HLA-Restriktionsspektrums mit CMV-infizierten

#### Fibroblasten

Die langzeitkultivierte pp65-T-Zelllinie von Spender RT bestand zum großen Teil aus HLA-B35- und A2-restringierten pp65-spezifischen T-Zellen. Das wurde durch Tetramerfärbung und durch Lyse allogener A2/B35-kompatibler mini-LCLs gezeigt (Abbildung 3-24). Nun war die Frage von Interesse, ob damit die wichtigen pp65-Epitope dieses Spenders bereits bekannt waren oder noch unbekannte, eventuell über andere HLA-Klasse-I-Allele restringierte Reaktivitäten enthalten waren. Als Hilfsmittel zur Klärung dieser Frage wurde ein Satz von humanen Fibroblastenzelllinien verschiedener Spender benutzt, die in einzelnen HLA-Allelen mit Spender RT übereinstimmten und zusammen alle HLA-A- und B-Allele von RT abdeckten. Diese Fibroblasten wurden entweder uninfiziert belassen oder mit CMV infiziert. Das in Abbildung 3-26 A gezeigte Experiment bestätigte die Reaktivität gegenüber A2/B35-restringierten CMV-Antigenen durch Lyse der CMV-infizierten A2/B35-kompatiblen Fibroblastenlinie KATS. HLA-A24-kompatible oder HLA-B2705-kompatible Fibroblasten wurden dagegen, ebenso wie nicht kompatible Fibroblasten, nicht zytotoxisch angegriffen. Dies spricht gegen die Anwesenheit größerer Zahlen funktioneller A24- oder B2705-restringierter CMV-spezifischer CTL in der Population. Allenfalls könnten noch T-Zellen mit Spezifität für weitere A2- oder B35-restringierte Epitope vorhanden sein. Das wäre möglich, da neben NLV und IPS noch weitere durch diese Allele restringierte pp65-Epitope bekannt sind (Solache et al., 1999; Wills et al., 1996), NLV und IPS sind allerdings die dominanten Epitope.

In Abbildung 3-26 B ist ein Kontrollexperiment mit dem gleichen Satz von Fibroblastenlinien und T-Zelllinien des Spenders MO gezeigt. Die Ergebnisse bestätigen, daß eine Lyse nur durch die pp65-mini-LCL-stimulierte T-Zelllinie, nicht aber durch die Kontroll-mini-LCL-stimulierte T-Zelllinie erfolgt und nur, wenn die Fibroblasten CMV-infiziert sind und gemeinsame HLA-Allele vorliegen.

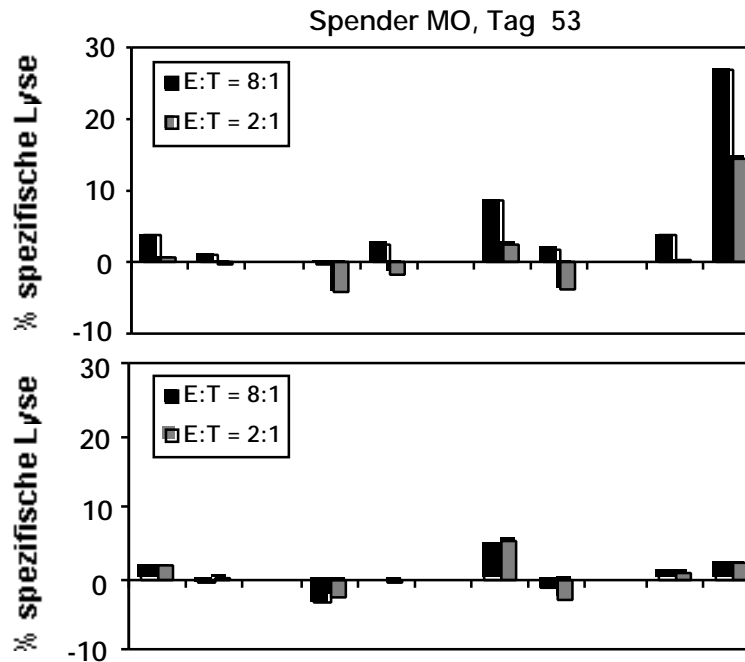
**A**



T-Zellen  
stimuliert mit  
pp65-mini-LCL

CMV-infiziert	-	+	-	+	-	+	-	+
gemeinsame HLA-Allele	B27.05		A24		-		A2/B35	
Fibroblastenlinie	ALIL		IRIR		JILB		KATS	

**B**



T-Zellen  
stimuliert mit  
pp65-mini-LCL

T-Zellen  
stimuliert mit  
Kontroll-mini-LCL

CMV-infiziert	-	+	-	+	-	+	-	+
gemeinsame HLA-Allele	-		-		-		A2/A11/B40	
Fibroblastenlinie	ALIL		IRIR		JILB		KATS	

Abbildung 3-26. Lyse CMV-infizierter Fibroblasten durch pp65mini-LCL-stimulierte T-Zellen. A. Der verwendete Satz an allogenen Fibroblastenlinien deckt das Spektrum an HLA-A- und B-Allelen des T-Zell-Spenders RT ab. B. Kontrollexperiment mit pp65-mini-LCL-stimulierten T-Zellen und Kontroll-mini-LCL-stimulierten T-Zellen des Spenders MO.

### 3.3.15 Überblick über die pp65-Tetramerfärbungen

Tabelle 3-5 gibt einen abschließenden Überblick über die mit Hilfe von Tetrameren nachgewiesenen pp65-epitopspezifischen T-Zellen in pp65mini-LCL-stimulierten Kulturen. Zur Verfügung standen Tetramere für die pp65-Epitope NLV (HLA-A2), TPR (HLA-B7) und IPS (HLA-B35). Alle Spender sind aufgeführt, mit denen pp65-Tetramerfärbungen durchgeführt wurden. Falls mit einer T-Zelllinie mehrere Analysen durchgeführt wurden, fand sich die höchste Zahl pp65-epitopspezifischer Zellen stets bei der Messung nach jeweils längster Kultivierungszeit. Diese Messung ist jeweils in der Tabelle gezeigt. Bei allen vier Kulturen aus CMV-Seropositiven wurden pp65-epitopspezifische T-Zellen nachgewiesen. Gleiches gilt für die einzige T-Zellkultur eines Spenders ohne CMV-serologische Daten (f14), die aufgrund ihres HLA-Typs mit den verfügbaren Tetrameren analysiert werden konnte. Dagegen konnten in keiner der beiden Kulturen aus CMV-Seronegativen pp65-epitopspezifische T-Zellen gefunden werden. Bei drei der fünf pp65-tetramer-positiven Kulturen, und zwar genau denjenigen, die nach Kultivierungstag 50 untersucht wurden, überstieg die Zahl der nachgewiesenen pp65-epitopspezifischen Zellen 40% der CD8<sup>+</sup>-Zellen.

**Tabelle 3-5.** Mit pp65-Tetrameren analysierte pp65mini-LCL-stimulierte T-Zelllinien. Untersucht wurden die Epitope die pp65-Epitope NLV (HLA-A2), TPR (HLA-B7) und IPS (HLA-B35).

Spender	CMV-Serostatus	HLA-Allel(e)	Tag der Analyse	% CD8+	% Tetramer-positive Zellen
RT	+	B35; A2	56	98	51; 3
MO	+	A2; B35	52	89	37; 12
f14	N.erm.	A2	50	70	41
PM	+	A2; B7	23	62	12; 3
SL	+	A2	30	67	4
AX	-	A2	29	70	0
SH	-	A2	38	30	0

Tetramer-positive Zellen sind angegeben in Prozent der CD8<sup>+</sup>-Zellen. HLA-Allele sind angegeben in der Reihenfolge der Reaktionsstärke beim jeweiligen Spender. Verzeichnet ist jeweils die Messung mit maximalem Anteil tetramer-positiver Zellen, was in allen Fällen mit der Messung nach längster Kultivierungszeit identisch war. „N. erm.“ = nicht ermittelbar.

## 4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Etablierung eines neuen, effizienten Systems zur Kultivierung und Expansion antigenspezifischer T-Zellen auf der Grundlage neuer Entwicklungen der EBV-Vektortechnologie. Im ersten Schritt wurden durch mini-EBV-Vektoren aus humanen B-Zellen immortalisierte, virusfreie B-Zelllinien hergestellt, sogenannte mini-LCLs. Der EBV-Vektor sorgt dabei sowohl für die Immortalisierung als auch für die konstitutive Expression eines beliebig gewählten Modellantigens in der mini-LCL. Diese mini-LCLs wurden im zweiten Schritt als antigenpräsentierende Zelle (APC) zur Stimulation und Expansion von autologen T-Zellen verwendet. Die Analyse von Spezifität, Aktivität und Phänotyp von T-Zellen, die mit dieser Methode generiert wurden, war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit.

### 4.1 Vektorkonstruktion und B-Zell-Immortalisierung

Neben der detaillierten Untersuchung der Restimulation zytotoxischer T-Zellen durch mini-LCLs wurden verschiedene Möglichkeiten der Konstruktion verschiedener mini-EBV-Vektoren zur Expression verschiedener Antigene in mini-LCLs erprobt. Am Beispiel des viralen Tumorantigens EpCAM wurde gezeigt, daß ein membranständiges Tumorantigen auf mini-LCLs zur Expression gebracht werden kann; am Beispiel des CMV-Proteins pp65 wurde das Entsprechende für ein intrazellulär exprimiertes Antigen gezeigt. Ebenfalls konstruiert wurden immortalisierende mini-EBV-Vektoren mit HPV-6/11-Antigenen, deren nähere Charakterisierung Gegenstand zukünftiger Arbeiten sein wird.

Tabelle 3-1 zeigt, daß die Immortalisierung primärer B-Zellen mit mini-EBV und pp65mini-EBV *in vitro* nach gegenwärtigem Methodenstand bereits bei den meisten, aber nicht allen Normal Spendern erfolgreich ist. Limitierende Faktoren könnten zum einen der verfügbare mini-EBV-Titer und zum anderen, wenn PBMC als B-Zell-Quelle verwendet werden, die Elimination von auswachsenden mini-LCLs durch *in vitro* reaktivierte EBV- und CMV-spezifische T-Zellen sein. Der Viriontiter dürfte durch Aufkonzentration mittels Zentrifugation oder Ultrafiltration nahezu beliebig erhöhbar



sein, die Optimierung der Methoden zur Transfektion der Verpackungszelllinie verspricht ebenfalls noch Verbesserungsmöglichkeiten.

Die Expression von pp65 in pp65mini-LCLs ist, wie in Abbildung 3-8 A zu sehen, im Vergleich zu der drastischen Expression in CMV-infizierten Fibroblasten nicht ausnehmend hoch. Immerhin wird pp65 vom größten Teil der pp65mini-LCL-Zellen exprimiert, wie die Analyse auf Einzelzellebene zeigt (Abbildung 3-8 B). Wie die folgenden Experimente bestätigten, war erwartungsgemäß eine Überexpression des Antigens zur erfolgreichen Stimulation spezifischer T-Zellen nicht notwendig.

## 4.2 pp65: Modellantigen und therapeutisches Zielantigen

Zur detaillierten Untersuchung der Reaktivierung antigenspezifischer T-Zellen durch mini-LCLs wurde als Modellantigen das virale Phosphoprotein pp65 des humanen Cytomegalovirus (CMV) ausgewählt. Für diese Wahl ausschlaggebend war zum einen die experimentell-praktische Eignung von pp65 als Modellantigen, zum anderen das große biologische und klinische Interesse. Das pp65-Protein ist eines der immundominanten CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antigene des CMV *in vivo*. Die durch pp65 hervorgerufene spezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellantwort ist in gesunden CMV-Infizierten sehr stark, von allen anderen bekannten CMV-Antigenen ruft nur noch das IE1-Protein eine ähnlich starke T-Zell-Antwort hervor. Da mehr als die Hälfte der gesunden Erwachsenen CMV-positiv sind, war ein Kollektiv aus einer Anzahl CMV-positiver Probanden und CMV-negativer Kontrollprobanden mit geringem Aufwand zusammenzustellen. Die Fähigkeit virusspezifischer T-Zellen, eine infizierte Zelle anzugreifen, kann für CMV und pp65 *in vitro* gut abgefragt werden, da sich Fibroblasten *in vitro* mit CMV effizient infizieren lassen und das Virus in den Zellen dann pp65 sehr stark zur Expression bringt. Auch die Charakterisierung der Spezifität von pp65-spezifischen T-Zellen auf genauester, nämlich Epitopebene, ist möglich, da annähernd 20 durch verschiedene HLA-Klasse-I-Allele restringierte CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Epitope des Proteins pp65 bereits charakterisiert sind (Longmate et al., 2001; Reddehase, 2000). Einige dieser Epitope sind so konserviert und so immundominant, daß eine starke epitopspezifische T-Zell-Effektorantwort in der Mehrzahl der CMV-Seropositiven des entsprechenden HLA-Typs gefunden wird, etwa gegen das A2-restringierte pp65-Epitop NLVPMVATV (NLV) und das B7-restringierte Epitop TPRVTGGGAM (TPR), wie durch direkte Fär-

bung epitopspezifischer T-Zellen mit entsprechenden HLA:Peptid-Tetrameren gezeigt wurde (Gillespie et al., 2000).

Das große klinische Interesse an pp65 beruht darauf, daß CMV ein gefürchteter Krankheitserreger in Situationen der erworbenen oder therapiebedingten Immundefizienz ist, also insbesondere nach Transplantation und bei AIDS. Das pp65-Protein macht einen Großteil der Proteinmasse des Virusteguments aus und gelangt so in signifikanten Mengen in die neu infizierte Zelle. Dadurch kann diese schon vor Beginn der viralen Genexpression gegenüber einer pp65-spezifischen zytotoxischen T-Zell-Antwort sensitiviert werden (Riddell et al., 1991). Mit dieser Sonderrolle von pp65 könnte die Dominanz pp65-spezifischer T-Zellen bei der CMV-spezifischen T-Zell-Antwort zusammenhängen. Zugleich könnte damit ein besonderer protektiver Effekt der pp65-spezifischen T-Zell-Antwort verbunden sein. Zwar folgt aus der quantitativen Dominanz einer Epitopspezifität innerhalb des T-Zell-Gedächtnisses nicht zwingend die dominierende Bedeutung dieses Epitops für die Virusabwehr. Dennoch mehren sich Hinweise auf die protektive antivirale Rolle pp65-spezifischer T-Zellen. Zum Beispiel wurde kürzlich in zwei Studien (Cwynarski et al., 2001; Gratama et al., 2001) mit HLA:Peptid-Tetrameren für die beiden pp65-Epitope NLV und TPR die Rekonstitution der pp65-spezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antwort nach allogener Stammzelltransplantation untersucht und ihre Korrelation mit dem Schutz gegen CMV-Reaktivierung und CMV-Erkrankung gezeigt.

Den endgültigen Beweis für einen Schutz durch pp65-spezifische T-Zellen werden nur therapeutische adoptive Immuntherapiestudien liefern können. Tierexperimentelle Untersuchungen weisen die wichtigste Rolle beim Schutz vor Infektion mit dem murinen Cytomegalovirus (MCMV) virusspezifischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu (Polic et al., 1998). Die Homologie zwischen murinem und humanem CMV ist allerdings begrenzt. Nicht das MCMV-Positionshomolog M83 des humanen pp65 (Leserahmen UL83), wohl aber das mit pp65 sequenzverwandteste Protein M84 (das allerdings kein MCMV-Strukturprotein ist) scheint denn auch eine protektive Immunantwort gegen MCMV zu induzieren und wirkt in dieser Hinsicht mit dem murinen IE1, pp89, synergistisch zusammen (Morello et al., 2000). Beim Menschen zeigten frühe prophylaktische adoptive T-Zelltransfer-Studien (Walter et al., 1995) die gute Verträglichkeit und potentielle prophylaktische Wirksamkeit von CMV-spezifischen T-Zell-Klonen, bei denen es sich, der Generierungsmethode der Klone nach zu schließen, neben pp150-

spezifischen Klonen vor allem um pp65-spezifische Klone gehandelt haben dürfte. Die Rekonstitution einer virusspezifisch zytotoxischen T-Zell-Antwort durch Infusion großer Zahlen von T-Zellen konnte bei den meisten der 14 prophylaktisch behandelten Patienten bis mindestens 8 Wochen nach der letzten Transfusion demonstriert werden, und keiner der Patienten entwickelte CMV-assoziierte Krankheitsbilder (Walter et al., 1995). Leider wurde bislang keine Langzeitverlaufsstudie vorgelegt (Riddell und Greenberg, 2000).

Den offensichtlichen Vorteilen einer Therapie mit CMV-spezifischen T-Zellen – hohe Spezifität, möglicherweise langdauernder Therapieeffekt, geringe Nebenwirkungen wegen der Nachahmung der physiologischen Situation – steht als klarster Nachteil der hohe Aufwand gegenüber, den die individuelle Kultivierung autologer spezifischer T-Zellen für jeden Patienten erfordert. Bei der ersten adoptiven Transfer-Studie wurde die klassische Methode der Restimulation CMV-spezifischer T-Zellen durch CMV-infizierte Fibroblasten und periphere Blutzellen verwendet, mit dem Erfordernis anschließender T-Zell-Klonierung. Die Studie fand wohl deshalb bislang keine Nachahmer, weil diese Methode als zu aufwendig galt. Dennoch wird von vielen Forschern die Etablierung eines therapeutischen adoptiven Transfers von CMV-spezifischen T-Zellen, auch in Anbetracht der Erfolge mit EBV-spezifischen T-Zellen (siehe Abschnitt 1.11), nach wie vor als wichtiges Ziel angesehen. Verschiedene Antigenpräsentationssysteme werden in der Literatur zu diesem Zweck vorgeschlagen (siehe unten), die charakteristische Vor- und Nachteile aufweisen. Die vorliegende Untersuchung diene daher auch dem Zweck, zu klären, ob pp65mini-LCLs eine interessante Möglichkeit sein könnten, eine effiziente Kultivierung und Expansion von zytotoxischen CMV-spezifischen T-Zellen für die adoptive Immuntherapie zu erreichen.

### **4.3 Generierung pp65-spezifischer T-Zelllinien mittels mini-LCLs**

#### **4.3.1 mini-LCLs als Stimulatoren und als Zielzellen**

Die in dieser Arbeit verwendeten APC zur T-Zell-Stimulation umfaßten im wesentlichen pp65mini-LCLs und Kontroll-mini-LCLs, erstere hergestellt durch Immortalisierung von B-Zellen mit einem pp65-mini-EBV, letztere mit einem identischen mini-EBV ohne pp65-Expressionskassette. Standard-LCLs zeigen ein charakteristisches Ex-

pressionsmuster latenter EBV-Proteine (Rickinson und Kieff, 1996), und die analoge Expression dieser latenten Proteine in mini-LCLs dürfte Voraussetzung für ihre Immortalisierung sein. Da die Mehrzahl dieser latenten EBV-Proteine auch CD8<sup>+</sup>-T-Zell-Antigene sind, und sich mini-LCLs von LCLs in der Expression akzessorischer Oberflächenmoleküle nicht unterscheiden (Abbildung 3-9), war zu erwarten, daß mini-LCLs sich, ebenso wie Standard-LCLs, für die Stimulation spezifischer T-Zellen gegen latente EBV-Proteine gut eignen sollten.

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). Für die weitere Untersuchung des mini-LCL-Systems war es daher wichtig zu zeigen, daß die Expression von pp65 in mini-LCLs die Präsentation anderer Antigene nicht gezielt beeinflusst, weder im Hinblick auf T-Zell-Stimulation noch auf die Zielzellfunktion im Zytotoxizitätstest. In den Abbildungen 3-19 (rechts unten) und 3-24 A sind entsprechende Zytotoxizitätsexperimente gezeigt. EBV-spezifische T-Zelllinien aus EBV-positiven Spendern, die durch Restimulation mit der Kontroll-mini-LCL generiert wurden, greifen die pp65mini-LCL und die Kontroll-mini-LCL eines Spenders jeweils nahezu gleich stark zytotoxisch an. Das bedeutet, daß die Prozessierung und Präsentation von EBV-Antigenen in mini-LCLs durch Koexpression von pp65 zumindest nicht in dem Maße verändert wird, daß deutliche Auswirkungen auf ihre Lyse durch EBV-spezifische T-Zellen entstehen. Dies gilt für pp65mini-LCL/Kontroll-mini-LCL-Paare vom autologen Spender ebenso wie für mini-LCLs von partiell HLA-übereinstimmenden und komplett HLA-differenten Spendern. Geringe Unterschiede in der Lyse von pp65- und Kontroll-mini-LCLs bestehen meistens in einer geringfügig stärkeren Lyse der Kontroll-mini-LCL, was sich durch eine teilweise Verdrängung von EBV-Epitopen durch pp65-Epitope auf den HLA-Peptidbindungsstellen erklären ließe. Gleichzeitig wird die HLA-Restriktion dieser EBV-spezifischen Lyse dadurch deutlich, daß die Reaktivität gegenüber Zielzellen mit abnehmender HLA-Übereinstimmung abnimmt.

Auch bei Restimulation mit der pp65mini-LCL zeigten T-Zelllinien von CMV-seronegativen Spendern eine gleich starke Reaktivität gegenüber pp65mini-LCLs und Kontroll-mini-LCLs (Abbildung 3-19 rechts oben). Das entspricht der Erwartung, daß es in CMV-Negativen/EBV-Positiven eine expandierte EBV-spezifische CTL-Vorläufer-Population, aber nur wenige, naive CMV-spezifische T-Zellen gibt. Daher überwiegen

in einer mit Antigenen beider Viren restimulierten T-Zell-Population die EBV-spezifischen Zellen stark. Die spezifischen Lyseraten von mini-LCL-stimulierten Effektoren gegenüber mini-LCLs entsprechen dabei durchweg dem, was für die LCL-Lyse durch LCL-stimulierte Effektoren aus Normalspendern berichtet wird. Solche T-Zelllinien lysieren die autologe LCL zu 40 – 70% bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von E:T = 10:1 im Chromfreisetzung-Experiment, abhängig vom Spender (Gustafsson et al., 2000; Khanna et al., 1999). Partielle Klasse-I-HLA-kompatible LCLs werden je nach Zahl und Art der gemeinsamen HLA-Allele gleich stark oder schwächer angegriffen. Die gute Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen zeigt, daß mini-LCLs in ihrer Eigenschaft als EBV-antigenpräsentierende Zellen mit LCLs gut vergleichbar sind.

#### 4.3.2 HLA-unrestringierte Reaktivitäten

Ebenfalls regelmäßig beschrieben wird bei der Analyse der Reaktivität von LCL-stimulierten T-Zelllinien eine HLA-unrestringierte Komponente, die eine relative Lyse von LCLs von 10 – 20% im Chrom-Freisetzungstest bewirkt. Hierzu tragen neben *natural-killer*-Zellen vor allem HLA-unrestringierte CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Reaktivitäten bei. Eine gleichartige Reaktivität ähnlichen Betrags wurde auch bei der mini-LCL-Stimulation regelmäßig festgestellt. Bei der Stimulation von T-Zellen EBV-negativer Spender tritt dieser „Hintergrund“ in den Vordergrund der Reaktivität, es entstehen von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen dominierte T-Zelllinien, die LCLs ohne HLA-Restriktion lysieren. Ein typisches Beispiel zeigen Gustafsson et al. (2000), und die analoge Situation im mini-LCL-System wurde beim EBV-negativen Spender MO nach Kontroll-mini-LCL-Stimulation beobachtet (Abbildung 3-19 links unten). Diese nicht MHC-restringierte CD4<sup>+</sup>-T-Zell-Reaktion wurde sogar schon als Reaktion auf ein EBV-codiertes Superantigen gedeutet (Sutkowski et al., 1996), das allerdings nicht identifiziert werden konnte.

Sollte ein solches Superantigen existieren, müßte es sich entweder um eines der bekannten latenten EBV-Proteine handeln oder um das Produkt eines Gens innerhalb der Bereiche des EBV-Genoms, die im mini-EBV enthalten sind, deren Expression in LCLs aber bisher nicht beschrieben wurde. Unabhängig davon wäre eine Eliminierung oder Abschwächung HLA-unrestringierter Reaktivitäten im Hinblick auf therapeutische Anwendungen von T-Zelllinien wünschenswert. Hier könnte die Zugabe von Th1-assoziierten Zytokinen wie Interleukin-12 (Metes et al., 2000) bei der T-Zell-

Restimulation oder, rigoroser, die Abreicherung von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen und NK-Zellen aus der Startpopulation hilfreich sein.

#### 4.3.3 pp65-spezifische T-Zelllinien aus CMV-seropositiven Spendern

Im Unterschied zu CMV-seronegativen Spendern wurde bei T-Zelllinien CMV-positiver Spender, die mit der pp65mini-LCL restimuliert worden waren, und nur bei diesen, in allen Fällen eine deutlich stärkere Reaktivität gegen pp65mini-LCLs als gegen Kontroll-mini-LCLs beobachtet. Es lag also offenbar eine pp65-antigenspezifische Lyse vor. Je nach Spender waren die EBV-spezifische Reaktivität und die nicht HLA-restringierte Reaktivität solcher T-Zell-Populationen unterschiedlich stark ausgeprägt, von unter 10% bis um 20% Lyse autologer Kontroll-mini-LCLs oder HLA-differenten mini-LCLs bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von E:T = 8:1 in der Chromfreisetzung. Die Lyse von pp65mini-LCLs, autolog oder in geeigneten HLA-Allelen übereinstimmend, war in allen Fällen weit stärker und erreichte je nach Spender zwischen 40% und 70% Lyse. Die Reaktivierung pp65-reaktiver Zellen durch pp65mini-LCLs aus PBMC war also bei allen CMV-positiven/EBV-positiven Spendern erfolgreich, und die dominierende Reaktivität der resultierenden T-Zelllinien war in allen Fällen nicht die EBV-spezifische, sondern die pp65-spezifische Reaktivität, entweder bereits von Anfang an (Spender PM, Abbildung 3-23) oder nach einer Anzahl Restimulationen (Spender SL und RT, Abbildung 3-22 und 3-24). Eine bereits zu Beginn dominierende pp65-spezifische Reaktivität konnte auch bei zwei der drei serologisch nicht charakterisierten *buffy coat*-Spender demonstriert werden (Spender f14 und f22, Abbildung 3-11). Daß solche pp65-spezifischen T-Zellkulturen auch zur Eliminierung CMV-infizierter Zellen befähigt sind, wurde im klassischen CMV-Zellkulturmodell, nämlich an CMV-infizierten Fibroblasten gezeigt (Abbildung 3-20, 3-26). Beide untersuchten pp65-spezifischen T-Zellkulturen CMV-positiver Spender lysierten HLA-kompatible, nicht aber inkompatible oder uninfizierte Fibroblasten.

Bei drei CMV-reaktiven T-Zelllinien verschiedener Spender wurde die Kultivierung durch wöchentliche pp65mini-LCL-Restimulation längere Zeit, d. h. bis Kultivierungstag 60 fortgesetzt; in allen Fällen war sowohl eine fortgesetzte Proliferation zu beobachten (2 der 3 Linien aus Abbildung 3-10, und Abbildung 3-24 C) als auch ein Erhalt der pp65-spezifischen Zytotoxizität auf hohem Niveau (Abbildung 3-15, 3-16, 3-24 B). Die Zellexpansion war etwa vergleichbar mit der von LCL-stimulierten EBV-

spezifischen T-Zellen, die von klinisch arbeitenden Labors für die therapeutische Anwendung hergestellt werden (Roskrow et al., 1998). Während die EBV-spezifische Reaktivität in zwei Fällen auf niedrigem Niveau erhalten blieb, in einem Fall dagegen auf nahe Null zurückging, verschwand die nicht HLA-restringierte zytotoxische Aktivität bei allen drei T-Zelllinien nahezu völlig (Abbildung 3-15, 3-24 B). Die kontinuierliche Restimulation mit der pp65mini-LCL für sechs bis acht Wochen ist also prinzipiell eine geeignete Methode, um ohne Klonierung, ohne Isolation bestimmter Subpopulationen und ohne Anwendung allogener oder autologer „feeder“-Zellen oder unspezifischer Stimuli CMV-spezifische T-Zellen so weit zu expandieren, daß Zellzahlen erreicht werden, die den Bedarf bei einer adoptiven T-Zell-Therapie decken würden. Als Anhaltspunkt können hier Protokolle der EBV-spezifischen T-Zell-Therapie dienen, die eine mehrmonatige Immunrestauration durch die zwei- bis viermalige Gabe von  $1 - 5 \cdot 10^7$  Zellen erzielen (Heslop et al., 1996). Solche Zellzahlen werden durch pp65mini-LCL-Restimulation problemlos erreicht.

#### **4.3.4 Tetramer-Analysen**

Die Herstellung von HLA:Peptid-Tetrameren mit ihren verschiedenen Umsetzungs- und Reinigungsschritten ist arbeitsaufwendig. Da außerdem verschiedene Klasse-I-Allele und verschiedene HLA:Peptid-Kombinationen sich unterschiedlich gut für die Konstruktion von Tetramer-Reagenzien eignen, ist die Herstellung neuer Tetramere nach wie vor eine technische Herausforderung und die Zahl bisher verfügbarer Allele und Spezifitäten begrenzt. Für diese Arbeit standen dank einer Zusammenarbeit mit dem Institute for Cancer Studies in Birmingham mehrere Tetramere sowohl für CMV- als auch für EBV-Epitope zur Verfügung. Die pp65-Tetramere umfaßten die Epitope NLV (HLA-A2-restringiert), TPR (HLA-B7-restringiert) und IPS (HLA-B35-restringiert), die verwendeten EBV-Tetramere umfaßten die subdominanten Epitope CLG (A2) und HPV (B35) und die immundominanten Epitope RRIY (B27) und YPL (B35). Bei der Auswahl der untersuchten T-Zell-Spender wurde darauf geachtet, daß mindestens eines, möglichst mehrere der entsprechenden HLA-Allele beim Spender vorliegen. Bei einem CMV-seronegativen/EBV-seropositiven Spender (AX), einem CMV-seropositiven/EBV-seronegativen Spender (MO) und drei positiv-positiven Spendern (SL, PM, RT) konnte gleichzeitig mit Tetrameren für potentiell immundominante pp65-Epitope und mindestens einem Tetramer gegen ein latentes EBV-Epitop die

Expansion entsprechender T-Zellen verfolgt werden. In einigen Fällen war die einzige über Tetramere zugängliche EBV-Spezifität das meist subdominante CLG. In zwei Fällen dagegen, nämlich für den HLA-B35-Spender MO und den HLA-B27/B35-Spender RT, konnten Tetramere für weitere, teils immundominante EBV-Epitope, nämlich RRIY (B27), YPL (B35) und HPV (B35) verwendet werden. Beim CMV-positiven/EBV-negativen Spender MO wurden erwartungsgemäß nur pp65-spezifische T-Zellen, nicht aber EBV-spezifische T-Zellen gefunden. Bei Spender RT wurde dagegen die interessante Beobachtung gemacht, daß während der ersten Kultivierungswochen CMV- und EBV-spezifische T-Zellen zunächst parallel expandiert, aber im weiteren Verlauf die EBV-spezifischen Zellen durch pp65-spezifische Zellen verdrängt wurden, die schließlich über 50% der Kultur ausmachten. Demnach scheinen pp65mini-LCLs also nicht das Werkzeug der Wahl für die Generierung CMV/EBV-bispezifischer T-Zelllinien, sondern besonders geeignet für die bevorzugte Expansion pp65-spezifischer T-Zellen zu sein.

Insgesamt zeigen die Tetramer-Analysen von T-Zell-Kulturen von vier CMV-seropositiven Spendern und einem weiteren stark CMV-reaktiven, daher höchstwahrscheinlich ebenfalls seropositiven Spender, daß pp65mini-LCLs ein generell gut geeignetes Werkzeug für die Reaktivierung CMV-spezifischer T-Zellen bei seropositiven Spendern sind (Tabelle 3-5), und bestätigen so die Zytotoxizitätsanalysen.

#### **4.4 Strategien der Generierung CMV-reaktiver T-Zellkulturen**

Zur Zeit werden vielfältige Methoden zur Generierung und Expansion pp65-spezifischer T-Zelllinien im Labor erprobt und für den Einsatz in der adoptiven Immuntherapie in Betracht gezogen. Dabei stehen oft dendritische Zellen (DC) als antigenpräsentierende Zellen und Stimulatoren im Mittelpunkt. Dies geht auf die Etablierung von Methoden zur in-vitro-Generierung von DC aus Monozyten des peripheren Bluts und den Nachweis der effektiven T-Zell-Stimulation durch DC (Sallusto und Lanzavecchia, 1994) zurück. Zu den für pp65 und CMV vorgeschlagenen Methoden gehören die Applikation des Antigens als definiertes antigenes Peptid (Kleihauer et al., 2001; Szmania et al., 2001), als rekombinantes Protein (pp65), als virusfreie Präparation aus CMV-infizierten Fibroblasten (Peggs et al., 2001), in Form von apoptotischen CMV-infizierten Fibroblasten (Arrode et al., 2000) oder durch Ko-



kultivierung mit vitalen CMV-infizierten Fibroblasten (Tabi et al., 2001). Es wäre auch möglich, CMV-Antigene durch direkte Infektion mit dem Virus in dendritischen Zellen zur Expression zu bringen (Riegler et al., 2000), insbesondere mit frischen klinischen CMV-Isolaten oder Stämmen, die über Endothelzellen, nicht Fibroblasten passagiert wurden. Bei der Verwendung CMV-infizierter dendritischer Zellen als APC müßte allerdings damit gerechnet werden, daß immunevasive CMV-Funktionen die Antigenpräsentation und T-Zell-Stimulation beeinträchtigen könnten. Daher werden CMV-infizierte DC zur Zeit als weniger attraktiv angesehen (Tabi et al., 2001). Die Verwendung rekombinanter CMV-Antigene als Zielantigene wurde für ein Szenario vorgeschlagen, bei dem periphere Blutzellen als APC dienen (Vaz-Santiago et al., 2001). Schließlich wurde auch die APC-Funktion von LCLs für die Restimulation pp65-spezifischer T-Zellen ausgenutzt. Dazu wurden herkömmliche EBV-immortalisierte LCLs entweder mit einem Expressionsplasmid für pp65 transfiziert (Retiere et al., 2000) oder mit retroviralen pp65-Expressionsvektoren infiziert (Sun et al., 1999b).

#### **4.4.1 Dendritische Zellen**

Szmania et al. (2001) präsentieren ihr Verfahren als Möglichkeit der Expansion epitopspezifischer T-Zellen bis zum klinischen Maßstab. Sie stimulierten dazu zunächst PBMC als T-Zell-Quelle mit pp65/NLV-peptidgepulsten, aus Monozyten generierten dendritischen Zellen, dann für die zweite und dritte Stimulation mit peptidgepulsten LCLs „oder“ PBMC und erhielten so aus 10 Millionen CD8<sup>+</sup>-Zellen Populationen von 100 – 200 Millionen Zellen mit 30 – 80 % NLV-tetramerpositiven Zellen. Aus dieser Population reicherten sie NLV-tetramerfärbende Zellen mit FACS oder MACS an und unterwarfen diese einer „Schnellexpansion“ mit CD3-Antikörper und allogenen PBMC als „feeder“. Das Ergebnis der Anwendung dieses komplexen Prozesses auf Zellen von CMV-positiven Spendern waren 60 bis 100 Millionen einer Zellpopulation mit 75 – 85 % tetramerpositiven Zellen. Während die ersten Stimulationen mit peptidgepulsten Zellen also, wie zu erwarten, NLV-spezifische Zellen effizient anreichern und expandieren konnten, lohnte der erzielte Zugewinn an Reinheit und Zellzahl nicht den Aufwand der anschließend durchgeführten Isolation und Expansion tetramerpositiver Zellen. Der nur mäßige Erfolg bei der Expansion von positiv isolierten tetramerbindenden Zellen könnte im Zusammenhang mit der Induktion von Anergie oder Zelltod in T-Zellen stehen, die durch die Tetramerbindung ein starkes

TCR-Aktivierungssignal in Abwesenheit von Korezeptor- und Kostimulationssignalen erhalten.

Kleihauer et al. (2001) verzichteten auf unspezifische Stimuli und restimulieren PBMC-Populationen bis zu siebenmal in Folge mit pp65/NLV-peptidgepulsten DC, erzielten aber eine pp65-spezifische Zytotoxizität nur in Kulturen aus 6 von 14 CMV-positiven Spendern. Durch Extrapolation der beobachteten beachtlichen Proliferationsraten errechnen sie eine theoretisch mögliche Expansion bis zu  $10^9$  –  $10^{10}$  T-Zellen nach sieben Restimulationen. Allerdings dürften bei ausschließlicher Verwendung von DC als Restimulatoren für die tatsächliche Realisierung dieser T-Zellzahlen kaum ausreichende Zahlen von Stimulatoren verfügbar sein. Andererseits ist fraglich, ob so hohe Zellzahlen wie  $10^9$  tatsächlich notwendig für eine effektive Immunrestitution sind. Im Fall von EBV scheinen beispielsweise Gaben von  $1 - 5 \cdot 10^7$  Zellen, zwei- bis viermal wiederholt, zur mindestens mehrere Monate andauernden Immunrestauration ausreichend zu sein (Heslop et al., 1996). Eine Generierung entsprechender Zahlen pp65-spezifischer T-Zellen (aus CMV-positiven Spendern) dürften sowohl DC-Methoden als auch mini-LCL-Methoden ermöglichen. Allerdings wird durch mini-EBV-Immortalisation in Form der mini-LCL eine unbegrenzte Quelle sowohl von Stimulator- als auch von Zielzellen zur Zytotoxizitätsanalyse verfügbar, während die Zahl der aus Monozyten generierten DC von vorneherein durch die Zahl der im peripheren Blut asservierten Monozyten beschränkt ist und ihre Anwendung an die koordinierte Ausführung eines mehrstufigen Kultivierungsprotokolls zur Ausdifferenzierung der DC gebunden ist. Die bisher beschriebenen DC-Methoden sind noch dazu auf die Generierung von T-Zellen gegen bekannte potente pp65-Epitope beschränkt.

Diese Einschränkung auf bekannte pp65-Epitope versuchen Peggs et al. (2001) zu überwinden, indem sie DC mit einem CMV-Antigenpräparat aus infizierten Fibroblasten beladen und dann als APC verwenden. Innerhalb des Kultivierungszeitraums von 14 bis 21 Tagen ließ sich so in Kulturen der Mehrzahl von 12 CMV-seropositiven Spendern eine im Betrag stark variable pp65-spezifische Zytotoxizität generieren. Im Median wurde eine zweifache Expansion der Gesamt-T-Zellpopulation erzielt. Die resultierende Population bestand allerdings in den meisten Fällen überwiegend aus  $CD4^+$ -Zellen. Ob auf diese Weise CMV-spezifische zytotoxische T-Zellen nicht nur reaktiviert, sondern auch effizient weiter expandiert und angereichert werden können,

wird durch Experimente mit längerer Kultivierung und zusätzlichen Restimulationen zu zeigen sein.

#### 4.4.2 EBV-LCLs

Zwei unterschiedliche Ansätze wurden in letzter Zeit beschrieben, wie LCLs, deren Potential zur effektiven Prozessierung und Präsentation endogen exprimierter Antigene bislang vor allem zur Reaktivierung EBV-spezifischer Zellen ausgenutzt wurde, als Werkzeug zur Stimulation einer CTL-Antwort gegen ein anderes interessierendes Antigen benutzt wurden. In beiden Fällen wurde auch pp65 als Modellantigen herangezogen.

Ein generelles Problem bei LCLs und B-Zelllinien ist ihre schlechte Transfizierbarkeit. Dennoch gelang Retière et al (2000) die Generierung pp65-exprimierender LCLs von zwei Spendern und einer IE1-exprimierenden LCL eines weiteren Spenders. Durch Restimulation mit diesen Zellen wurden polyklonale T-Zelllinien generiert und kloniert. Durch Nachweis der TNF-Sekretion bei Kontakt mit HLA- und Antigen-transfizierten COS-Zellen wurde die Spezifität der Klone ermittelt. Zum Zwecke der effizienten Stimulation spezifischer polyklonaler T-Zellpopulationen wurde die Methode von den Autoren nicht diskutiert; limitierend dürfte dabei unter anderem vermutlich die geringe Effizienz der Transfektion von LCLs sein.

Dagegen zielen Sun et al (1999) darauf ab, ihre Methode der Generierung pp65-spezifischer T-Zelllinien in der adoptiven T-Zell-Therapie anzuwenden. Sie verwenden zur Stimulation LCLs, in denen durch einen retroviralen Vektor pp65 zur Expression gebracht wird, und generieren so bispezifische T-Zellkulturen mit CMV- und EBV-spezifischer Zytotoxizität. Durch dreimal restimulierte Kulturen wird die autologe pp65-exprimierende LCL bei einem Effektor/Zielzell-Verhältnis von 12.5 zu 50% bis 90% lysiert; die Reaktivität gegen die Standard-LCL ist bei Kulturen aus zwei von vier CMV-positiven Spendern gleich hoch, bei zwei Spendern niedriger. Autologe CMV-infizierte Fibroblasten werden zu 15 bis 50%, allogene HLA-inkompatible LCLs werden zu 5 bis 20% lysiert. Die erzielten zytotoxischen Aktivitäten und das Ausmaß der Generierung antigenspezifischer und unspezifischer Reaktivität sind demnach mit den hier vorgestellten Ergebnissen des mini-LCL-Verfahrens recht gut vergleichbar, was angesichts der Ähnlichkeit des Restimulationsprinzips in beiden Fällen nicht

überraschend ist. Die Ergebnisse sind auch darin ähnlich, daß bei manchen CMV-positiven Spendern bereits nach relativ kurzer Kultivierungszeit die pp65-Reaktivität über die EBV-Reaktivität dominiert, bei anderen dagegen noch nicht. Dennoch legen Sun et al. großen Wert darauf, durch ihr Verfahren bispezifische T-Zellen zu generieren. Durch Untersuchungen mit EBV-Antigene exprimierenden rekombinanten Vacciniaviren zeigen sie in einer späteren Arbeit (Sun et al., 2000) anhand von drei T-Zell-Kulturen, daß pp65-LCLs die gleichen latenten EBV-Antigenspezifitäten reaktivieren, die beim jeweiligen Spender mit Standard-LCLs reaktiviert werden, und in vergleichbarer Intensität. Zu diesem konstanten Reaktivitätsmuster kommt in allen Fällen eine starke pp65-reaktive Komponente in der T-Zelllinie hinzu. Das Verhältnis von EBV-Reaktivität und CMV-Reaktivität bei den drei gezeigten Spendern ist viel weniger variabel als bei den zuvor präsentierten Ergebnissen (Sun et al., 1999b), obwohl die Methode der T-Zell-Kultivierung nicht verändert wurde. Das läßt darauf schließen, daß für die spätere Veröffentlichung nur Daten von besonders geeigneten Spendern zur Präsentation ausgewählt wurden. Trotzdem dürfte die Bispezifität der Kulturen an Kultivierungstag 21 in der Regel gegeben und daher ein adoptiver Transfer mit bispezifischen T-Zellkulturen möglich sein, falls man sich mit den in dieser kurzen Kultivierungszeit erreichbaren moderaten Zellzahlen und den entsprechenden Niveaus unspezifischer Reaktivität zufriedengeben will. Auf das bis dahin Erzielbare sind auch die wenig restriktiven Ausschlußkriterien des klinischen Protokolls abgestimmt, das von der gleichen Arbeitsgruppe veröffentlicht wurde (Lucas et al., 2000). Sollte dagegen allerdings die Generierung einer größeren Zahl spezifischerer Zellen angestrebt werden, dürfte, abgesehen von einer Abreicherung von NK- oder CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, eine Restimulation über einen längeren Zeitraum hinweg die einfachste Methode sein. In diesem Fall müßte das Ziel einer CMV/EBV-bispezifischen Kultur möglicherweise aufgegeben werden. Dies legen auch die Ergebnisse mit Spender RT nahe (Abbildung 3-24). Das Erfordernis der Generierung zweier monospezifischer anstelle einer bispezifischen Kultur dürfte allerdings nicht das Haupthindernis sein, das einer adoptiven Immuntherapie gegen CMV und EBV im Wege steht. Die Vorteile des mini-EBV-Systems gegenüber einem System wie dem von Sun et al. sind offensichtlich: es wird Zeit und Arbeitsaufwand erspart, da das mini-EBV-System B-Zell-Immortalisierung und Einführung der Antigenexpressionsvektors in einem Schritt und in einem Molekül vereinigt, und es wird weder replikationsfähiges EBV noch ein retroviraler Vektor benötigt.

#### 4.4.3 Primäre T-Zellaktivierung

Interessanterweise vermag auch die Verwendung von dendritischen Zellen als APC das Problem der Generierung CMV-spezifischer T-Zellen aus CMV-negativen Spendern, das heißt der primären Aktivierung naiver T-Zellen, in der Praxis nicht ohne weiteres zu lösen. Peggs et al. (2001) finden in keiner ihrer T-Zellkulturen von 6 CMV-negativen Spendern eine CMV-Reaktivität. Szmania et al. (2001) weisen eine pp65-spezifische Zytotoxizität in Kulturen von lediglich 2 von 10, Kleihauer et al. (2001) in Kulturen von 2 von 11 CMV-negativen Spendern nach. Bei Kleihauer et al. könnte ein Problem die präferentielle Expansion FCS-spezifischer T-Zellen gegenüber CMV-spezifischen Zellen aus einer naiven Startpopulation sein. Bei Szmania et al., die autologes Plasma verwendeten, reichten möglicherweise die durchgeführten drei bis vier Stimulationsrunden nicht aus für eine Expansion NLV-spezifischer T-Zellen bis hin zur Detektierbarkeit. Peggs et al. verwenden sowohl Humanserum als auch eine verlängerte Restimulationszeit. Hier könnte wiederum die CMV-Antigendichte der kritische Punkt sein, denn die Voraussetzung dieses Verfahrens ist, daß die dendritischen Zellen aus einem komplexen Präparat CMV-infizierter Zellen Antigene aufnehmen und prozessieren.

Wie könnten mini-LCLs zur Lösung des Problems beitragen? Ein leichter verfügbares Restimulationssystem, als DCs es sind, könnte die Expansion CMV-antigenspezifischer Zellen stark erleichtern. Hier wären pp65mini-LCLs zweifellos von Vorteil. Die Frage ist, ob auch die Primärstimulation mit DCs durch mini-LCLs ersetzt werden könnte. Prinzipiell scheinen LCLs zur Aktivierung einer primären MHC-restringierten, in diesem Fall EBV-spezifischen T-Zell-Antwort fähig zu sein, dabei werden bevorzugt CD4<sup>+</sup>-T-Zellen gefunden (Misko et al., 1991; Sun et al., 1999a). Analoge Experimente etwa mit pp65mini-LCLs zur Aktivierung primärer pp65-spezifischer T-Zellen sind ohne weiteres denkbar, soweit es sich um CMV- und EBV-negative Spender handelt. Bei EBV-positiven Spendern dürfte die effizientere und von viel höheren Effektorzahlen ausgehende Reaktivierung von EBV-spezifischen T-Zellen die CMV-spezifische Aktivierung überdecken. Eine Möglichkeit zur Lösung des Dilemmas könnte eine Kombination aus primärer Stimulation mit epitop- oder antigenbeladenen dendritischen Zellen und Expansion durch Restimulation mit der pp65-mini-LCL sein.

## 4.5 Ausblick

Am Beispiel des Modellantigens und potentiellen therapeutischen Zielantigens pp65 wurden in dieser Arbeit die Einsatzmöglichkeiten von mini-EBV-Vektoren zur Generierung potenter antigenpräsentierender Zellen, mini-LCLs, und zur anschließenden in-vitro-Induktion spezifischer zytotoxischer T-Zell-Antworten dargelegt.

Viele weitere Antigene kommen als Zielstrukturen einer potentiell therapeutisch wertvollen Restauration oder de-novo-Induktion einer zellulären Immunantwort in Frage. Bereits im Hinblick auf die Kontrolle der CMV-Infektion zeigen sich Erweiterungsmöglichkeiten. Da sich pp65 die Rolle als immundominantes CMV-Antigen mit mindestens einem weiteren CMV-Protein, IE1, teilt, und es gesunde CMV-Infizierte gibt, die nur gegen eines von beiden, kaum aber solche, die gegen keines dieser beiden Antigene reagieren (Gyulai et al., 2000), könnten mini-EBV-Vektoren, die neben pp65 auch IE1 exprimieren, noch umfassender verwendet werden. Auch wenn in vitro eine spezifische Zytotoxizität gegen *ein* CMV-Antigen, wie gezeigt, zur Eliminierung virusinfizierter Zellen ausreicht, könnte die Wirksamkeit von T-Zellkulturen verbessert sein, die auf mehrere virale Antigene zielen, die auf verschiedenen Stufen des viralen Replikationszyklus exprimiert werden. Die große Kapazität von mini-EBV-Vektoren für die Aufnahme zusätzlicher Gene würde hier nahezu beliebige Kombinationen ermöglichen.

Als nächstes wäre die Ausweitung des Systems auf therapeutisch relevante Antigene anzustreben, die im T-Zell-Gedächtnis weniger stark repräsentiert sind als EBV- und CMV-Antigene. Hier bieten sich zum Beispiel die humanen Papillomviren an, gegen die bei vielen Patienten mit Zervixneoplasie oder -karzinom spezifische T-Zellen gefunden werden, allerdings nur in geringen Zahlen (Youde et al., 2000). Papillomvirusantigene gehören zu den spezifischen Tumorantigenen, die eine tumorspezifische adoptive T-Zell-Therapie ermöglichen könnten. Die Ergebnisse der Anwendung des mini-EBV-Systems auf solche Antigene würden bei der Wahl der Methoden helfen, um mit dem mini-EBV-System die schwierigste der anstehenden Aufgaben zu lösen, nämlich die Aktivierung einer primären T-Zell-Antwort.

## 5 Zusammenfassung

Die gezielte Generierung antigenspezifischer T-Zelllinien, zum Beispiel für den Einsatz in der adoptiven Immuntherapie, erfordert die Stimulation der T-Zellen durch Kulturen mit anderen Zellen, die das Antigen in einem geeigneten molekularen Kontext auf ihrer Oberfläche präsentieren. Für den Spezialfall der Stimulation Epstein-Barr-Virus-(EBV)-spezifischer T-Zellen existiert ein besonders effizientes System: EBV-immortalisierte B-Zellen, genannt lymphoblastoide Zelllinien (LCLs). Solche LCLs sind leicht für jeden beliebigen humanen Spender herzustellen und proliferieren unbegrenzt. Sie exprimieren mehrere virale Proteine, die *in vitro* wie *in vivo* eine starke antivirale T-Zell-Antwort hervorrufen, und stimulieren effizient spezifische T-Zellen gegen diese EBV-Antigene.

EBV wurde genetisch modifiziert, um ein neues System zur rationellen Generierung antigenpräsentierender Zellen für die T-Zell-Stimulation ermöglichen. Dieses System beruht auf rekombinanten EBV-Vektoren, mini-EBVs, in die das Gen für ein beliebiges Antigen eingebaut wurde. Mini-EBVs immortalisieren B-Zellen, und in den entstehenden Zelllinien, genannt mini-LCLs, wird das gewünschte Antigen exprimiert. Zudem können mini-LCLs im Gegensatz zu LCLs kein infektiöses EBV bilden und sind daher im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz als besonders sicher anzusehen. In dieser Arbeit sollte die Eignung von mini-LCLs gezeigt werden, effizient ein Fremdantigen zu präsentieren, um antigenspezifische T-Zellen zu restimulieren und expandieren. Schwerpunkt der Arbeiten bilden Untersuchungen mit einem mini-EBV-Vektor, der als Modellantigen das Gen für pp65 trägt, ein immundominantes T-Zell-Antigen aus dem humanen Cytomegalovirus.

Die mini-EBV-Immortalisierung wurde so weit optimiert, daß schließlich bei acht von neun gesunden Normal Spendern aus einer kleinen Blutprobe pp65mini-LCLs etabliert werden konnten. Sie waren frei von Wildtyp-EBV, exprimierten intrazellulär pp65 und auf ihrer Oberfläche essentielle Präsentations- und Kostimulationsmoleküle. Durch Restimulation mit der autologen pp65mini-LCL wurden T-Zelllinien generiert. Detaillierte Zytotoxizitätsanalysen zeigten die HLA-restringierte, pp65-spezifische Zytotoxizität der pp65mini-LCL-stimulierten T-Zelllinien aus vier von vier CMV-seropo-

sitiven Spendern. Bei allen diesen T-Zelllinien dominierte nach wiederholter Restimulation die pp65-spezifische über die EBV-spezifische Zytotoxizität. T-Zelllinien aus EBV-seronegativen Spendern sowie Kontroll-T-Zelllinien, die mit Kontroll-mini-LCLs ohne pp65-Expression stimuliert worden waren, zeigten dagegen lediglich eine EBV-spezifische Zytotoxizität.

Durch Färbung mit HLA:Peptid-Tetrameren wurde die Expansion pp65-epitopspezifischer T-Zellen in allen pp65mini-LCL-restimulierten T-Zelllinien aus CMV-seropositiven Spendern nachgewiesen. Bei den drei pp65-T-Zelllinien mit einer Kultivierungsdauer von mindestens 50 Tagen, die mit Tetrameren untersucht werden konnten, wurden 40% oder mehr pp65-epitopspezifische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen. Auch EBV-epitopspezifische Zellen waren nachweisbar, jedoch bestätigten die Tetramer-Analysen, daß durch Restimulation mit pp65mini-LCLs bevorzugt pp65-spezifische T-Zellen expandiert wurden.

Der Vergleich mit den Resultaten verschiedener aktuell publizierter Protokolle zur in-vitro-Generierung pp65-spezifischer T-Zellen für die adoptive Immuntherapie zeigt, daß pp65mini-LCLs ein vorteilhaftes Werkzeug sein werden, um dieses Ziel zu erreichen. Die Erweiterung des mini-EBV-Systems auf andere therapierelevante Antigene ist die Aufgabe der Zukunft.



## 6 Literatur

Altman, J. D., Moss, P. A. H., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J. und Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-96.

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.

Berman, R. M., Suzuki, T., Tahara, H., Robbins, P. D., Narula, S. K. und Lotze, M. T. (1996). Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice. *J Immunol* 157, 231-238.

Blake, N., Haigh, T., Shaka'a, G., Croom-Carter, D. und Rickinson, A. (2000). The importance of exogenous antigen in priming the human CD8+ T cell response: lessons from the EBV nuclear antigen EBNA1. *J Immunol* 165, 7078-7087.

Blake, N., Lee, S., Redchenko, I., Thomas, W., Steven, N., Leese, A., Steigerwald-Mullen, P., Kurilla, M. G., Frappier, L. und Rickinson, A. (1997). Human CD8+ T cell responses to EBV EBNA1: HLA class I presentation of the (Gly-Ala)-containing protein requires exogenous processing. *Immunity* 7, 791-802.

Blasco, R. und Moss, B. (1995). Selection of recombinant vaccinia viruses on the basis of plaque formation. *Gene* 158, 157-162.

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.

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.

Broers, A. E., van Der Holt, R., van Esser, J. W., Gratama, J. W., Henzen-Logmans, S., Kuenen-Boumeester, V., Lowenberg, B. und Cornelissen, J. J. (2000). Increased transplant-related morbidity and mortality in CMV- seropositive patients despite highly effective prevention of CMV disease after allogeneic T-cell-depleted stem cell transplantation. *Blood* 95, 2240-2245.

Brooks, J. M., Colbert, R. A., Mear, J. P., Leese, A. M. und Rickinson, A. B. (1998). HLA-B27 subtype polymorphism and CTL epitope choice: studies with EBV peptides link immunogenicity with stability of the B27:peptide complex. *J Immunol* 161, 5252-5259.

Brunner, K. T., Mael, J., Cerottini, J. C. und Chapuis, B. (1968). Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51- Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14, 181-196.

Burrows, S. R., Rodda, S. J., Suhrbier, A., Geysen, H. M. und Moss, D. J. (1992). The specificity of recognition of a cytotoxic T lymphocyte epitope. *Eur J Immunol* 22, 191-195.

Callan, M. F., Tan, L., Annels, N., Ogg, G. S., Wilson, J. D., O'Callaghan, C. A., Steven, N., McMichael, A. J. und Rickinson, A. B. (1998). Direct visualization of antigen-specific CD8+ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 187, 1395-1402.

Chuang, S. E., Chen, A. L. und Chao, C. C. (1995). Growth of E. coli at low temperature dramatically increases the transformation frequency by electroporation. *Nucleic Acids Res* 23, 1641.

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.

Dartmann, K., Schwarz, E., Gissmann, L. und zur Hausen, H. (1986). The nucleotide sequence and genome organization of human papilloma virus type 11. *Virology* 151, 124-130.

de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H. und de Vries, J. E. (1991). Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the

antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *J Exp Med* 174, 915-924.

Delecluse, H. J., Hilsendegen, T., Pich, D., Zeidler, R. und Hammerschmidt, W. (1998). Propagation and recovery of intact, infectious Epstein-Barr virus from prokaryotic to human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8245-8250.

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.

Faulkner, G. C., Krajewski, A. S. und Crawford, D. H. (2000). The ins and outs of EBV infection. *Trends Microbiol* 8, 185-189.

Fowler, K. B., Stagno, S., Pass, R. F., Britt, W. J., Boll, T. J. und Alford, C. A. (1992). The outcome of congenital cytomegalovirus infection in relation to maternal antibody status. *N Engl J Med* 326, 663-667.

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.

Gillespie, G. M., Wills, M. R., Appay, V., O'Callaghan, C., Murphy, M., Smith, N., Sissons, P., Rowland-Jones, S., Bell, J. I. und Moss, P. A. (2000). Functional heterogeneity and high frequencies of cytomegalovirus-specific CD8(+) T lymphocytes in healthy seropositive donors. *J Virol* 74, 8140-8150.

Gillis, S., Baker, P. E., Ruscetti, F. W. und Smith, K. A. (1978). Long-term culture of human antigen-specific cytotoxic T-cell lines. *J Exp Med* 148, 1093-1098.

Gratama, J. W., van Esser, J. W., Lamers, C. H., Tournay, C., Lowenberg, B., Bolhuis, R. L. und Cornelissen, J. J. (2001). Tetramer-based quantification of cytomegalovirus (CMV)-

specific CD8+ T lymphocytes in T-cell-depleted stem cell grafts and after transplantation may identify patients at risk for progressive CMV infection. *Blood* 98, 1358-1364.

Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E. und Roncarolo, M. G. (1998). Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol* 160, 3188-3193.

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., Meri, C., Plotkin, S. 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.

Hahn, G., Jores, R. und Mocarski, E. S. (1998). Cytomegalovirus remains latent in a common precursor of dendritic and myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3937-3942.

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.

Haque, T., Taylor, C., Wilkie, G. M., Murad, P., Amlot, P. L., Beath, S., McKiernan, P. J. und Crawford, D. H. (2001). Complete regression of posttransplant lymphoproliferative disease using partially HLA-matched Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells. *Transplantation* 72, 1399-1402.

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.

Ibisch, C., Saulquin, X., Gallot, G., Vivien, R., Ferrand, C., Tiberghien, P., Houssaint, E. und Vie, H. (2000). The T cell repertoire selected in vitro against EBV: diversity, specificity, and improved purification through early IL-2 receptor alpha-chain (CD25)-positive selection. *J Immunol* 164, 4924-4932.

Imai, S., Nishikawa, J. und Takada, K. (1998). Cell-to-cell contact as an efficient mode of Epstein-Barr virus infection of diverse human epithelial cells. *J Virol* 72, 4371-4378.

Inoue, H., Nojima, H. und Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96, 23-28.

Janz, A., Oezel, M., Kurzeder, C., Mautner, J., Pich, D., Kost, M., Hammerschmidt, W. und Delecluse, H. J. (2000). Infectious Epstein-Barr virus lacking major glycoprotein BLLF1 (gp350/220) demonstrates the existence of additional viral ligands. *J Virol* 74, 10142-10152.

Jiwa, N. M., Van Gemert, G. W., Raap, A. K., Van de Rijke, F. M., Mulder, A., Lens, P. F., Salimans, M. M., Zwaan, F. E., Van Dorp, W. und Van der Ploeg, M. (1989). Rapid detection of human cytomegalovirus DNA in peripheral blood leukocytes of viremic transplant recipients by the polymerase chain reaction. *Transplantation* 48, 72-76.

Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R. und Hammerschmidt, W. (1995). immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5875-5879.

Kern, F., Sural, 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.

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.

Khanna, R. und Burrows, S. R. (2000). Role of cytotoxic T lymphocytes in Epstein-Barr virus-associated diseases. *Annu Rev Microbiol* 54, 19-48.

Kilger, E., Pecher, G., Schwenk, A. und Hammerschmidt, W. (1999). Expression of mucin (MUC-1) from a mini-Epstein-Barr virus in immortalized B-cells to generate tumor antigen specific cytotoxic T cells. *J Gene Med* 1, 84-92.

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.

Lee, S. P., Thomas, W. A., Murray, R. J., Khanim, F., Kaur, S., Young, L. S., Rowe, M., Kurilla, M. und Rickinson, A. B. (1993). HLA A2.1-restricted cytotoxic T cells recognizing a range of Epstein- Barr virus isolates through a defined epitope in latent membrane protein LMP2. *J Virol* 67, 7428-7435.

Lee, S. P., Tierney, R. J., Thomas, W. A., Brooks, J. M. und Rickinson, A. B. (1997). Conserved CTL epitopes within EBV latent membrane protein 2: a potential target for CTL-based tumor therapy. *J Immunol* 158, 3325-3334.

Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. und Masucci, M. G. (1997). Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12616-12621.

Loenen, W. A., Bruggeman, C. A. und Wiertz, E. J. (2001). Immune evasion by human cytomegalovirus: lessons in immunology and cell biology. *Semin Immunol* 13, 41-49.

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.

Lucas, K. G., Sun, Q., Burton, R. L., Tilden, A., Vaughan, W. P., Carabasi, M., Salzman, D. und Ship, A. (2000). A phase I-II trial to examine the toxicity of CMV- and EBV-specific cytotoxic T lymphocytes when used for prophylaxis against EBV and CMV disease in recipients of CD34-selected/T cell-depleted stem cell transplants. *Hum Gene Ther* 11, 1453-1463.

Metes, D., Storkus, W., Zeevi, A., Patterson, K., Logar, A., Rowe, D., Nalesnik, M. A., Fung, J. J. und Rao, A. S. (2000). Ex vivo generation of effective Epstein-Barr virus (EBV)-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes from the peripheral blood of immunocompetent Epstein Barr virus-seronegative individuals. *Transplantation* 70, 1507-1515.

Misko, I. S., Sculley, T. B., Schmidt, C., Moss, D. J., Soszynski, T. und Burman, K. (1991). Composite response of naive T cells to stimulation with the autologous lymphoblastoid cell line is mediated by CD4 cytotoxic T cell clones and includes an Epstein-Barr virus-specific component. *Cell Immunol* 132, 295-307.

Miyazaki, I., Cheung, R. K. und Dosch, H. M. (1993). Viral interleukin 10 is critical for the induction of B cell growth transformation by Epstein-Barr virus. *J Exp Med* 178, 439-447.

Morello, C. S., Cranmer, L. D. und Spector, D. H. (2000). Suppression of murine cytomegalovirus (MCMV) replication with a DNA vaccine encoding MCMV M84 (a homolog of human cytomegalovirus pp65). *J Virol* 74, 3696-3708.

Murray, R. J., Kurilla, M. G., Brooks, J. M., Thomas, W. A., Rowe, M., Kieff, E. und Rickinson, A. B. (1992). Identification of target antigens for the human cytotoxic T cell response to Epstein-Barr virus (EBV): implications for the immune control of EBV-positive malignancies. *J Exp Med* 176, 157-168.

Nagorsen, D., Keilholz, U., Rivoltini, L., Schmittel, A., Letsch, A., Asemissen, A. M., Berger, G., Buhr, H. J., Thiel, E. und Scheibenbogen, C. (2000). Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 60, 4850-4854.

O'Connor, M., Peifer, M. und Bender, W. (1989). Construction of large DNA segments in Escherichia coli. *Science* 244, 1307-1312.

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.

Ploegh, H. L. (1998). Viral strategies of immune evasion. *Science* 280, 248-253.

Polic, B., Hengel, H., Krmpotic, A., Trgovcich, J., Pavic, I., Luccaronin, P., Jonjic, S. und Koszinowski, U. H. (1998). Hierarchical and redundant lymphocyte subset control precludes cytomegalovirus replication during latent infection. *J Exp Med* 188, 1047-1054.

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.

Redchenko, I. V. und Rickinson, A. B. (1999). Accessing Epstein-Barr virus-specific T-cell memory with peptide-loaded dendritic cells. *J Virol* 73, 334-342.

Reddehase, M. J. (2000). The immunogenicity of human and murine cytomegaloviruses. *Curr Opin Immunol* 12, 390-396.

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.

Rickinson, A. und Kieff, E. (1996). Epstein-Barr Virus. In: Fields Virology, B. N. Fields, D. M. Knipe und P. M. Howley, Hg. (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), S. 2397-2446.

Rickinson, A. B. und Moss, D. J. (1997). Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol* 15, 405-431.

Rickinson, A. B., Moss, D. J., Allen, D. J., Wallace, L. E., Rowe, M. und Epstein, M. A. (1981). Reactivation of Epstein-Barr virus-specific cytotoxic T cells by in vitro stimulation with the autologous lymphoblastoid cell line. *Int J Cancer* 27, 593-601.

Riddell, S. R. und Greenberg, P. D. (2000). T-cell therapy of cytomegalovirus and human immunodeficiency virus infection. *J Antimicrob Chemother* 45 Suppl T3, 35-43.

Riddell, S. R., Rabin, M., Geballe, A. P., Britt, W. J. und Greenberg, P. D. (1991). Class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocyte recognition of cells infected with human cytomegalovirus does not require endogenous viral gene expression. *J Immunol* 146, 2795-2804.

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.



Riegler, S., Hebart, H., Einsele, H., Brossart, P., Jahn, G. und Sinzger, C. (2000). Monocyte-derived dendritic cells are permissive to the complete replicative cycle of human cytomegalovirus. *J Gen Virol* 81 Pt 2, 393-399.

Rooney, C. M., Smith, C. A., Ng, C. Y., Loftin, S., Li, C., Krance, R. A., Brenner, M. K. und Heslop, H. E. (1995). Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345, 9-13.

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.

Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 179, 1109-1118.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Savard, M., Belanger, C., Tardif, M., Gourde, P., Flamand, L. und Gosselin, J. (2000). Infection of primary human monocytes by Epstein-Barr virus. *J Virol* 74, 2612-2619.

Schwarz, E., Durst, M., Demankowski, C., Lattermann, O., Zech, R., Wolfspurger, E., Suhai, S. und zur Hausen, H. (1983). DNA sequence and genome organization of genital human papillomavirus type 6b. *EMBO J* 2, 2341-2348.

Sharipo, A., Imreh, M., Leonchiks, A., Imreh, S. und Masucci, M. G. (1998). A minimal glycine-alanine repeat prevents the interaction of ubiquitinated I kappaB alpha with the proteasome: a new mechanism for selective inhibition of proteolysis. *Nat Med* 4, 939-944.

Singhal, S., Shaw, J. C., Ainsworth, J., Hathaway, M., Gillespie, G. M., Paris, H., Ward, K., Pillay, D., Moss, P. A. und Mutimer, D. J. (2000). Direct visualization and quantitation of cytomegalovirus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocytes in liver transplant patients. *Transplantation* 69, 2251-2259.

Soderberg-Naucler, C., Fish, K. N. und Nelson, J. A. (1997). Reactivation of latent human cytomegalovirus by allogeneic stimulation of blood cells from healthy donors. *Cell* 91, 119-126.

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.

Stagno, S., Pass, R. F., Cloud, G., Britt, W. J., Henderson, R. E., Walton, P. D., Veren, D. A., Page, F. und Alford, C. A. (1986). Primary cytomegalovirus infection in pregnancy. Incidence, transmission to fetus, and clinical outcome. *JAMA* 256, 1904-1908.

Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J. und Enk, A. H. (1999). Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 93, 1634-1642.

Steven, N. M., Annels, N. E., Kumar, A., Leese, A. M., Kurilla, M. G. und Rickinson, A. B. (1997). Immediate early and early lytic cycle proteins are frequent targets of the Epstein-Barr virus-induced cytotoxic T cell response. *J Exp Med* 185, 1605-1617.

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., Palkama, T., Ciurli, C., Sekaly, R. P., Thorley-Lawson, D. A. und Huber, B. T. (1996). An Epstein-Barr virus-associated superantigen. *J Exp Med* 184, 971-980.

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.

Tan, L. C., Gudgeon, N., Annels, N. E., Hansasuta, P., O'Callaghan, C. A., Rowland-Jones, S., McMichael, A. J., Rickinson, A. B. und Callan, M. F. (1999). A re-evaluation of the frequency of CD8+ T cells specific for EBV in healthy virus carriers. *J Immunol* 162, 1827-1835.

Trojan, A., Witzens, M., Schultze, J. L., Vonderheide, R. H., Harig, S., Krackhardt, A. M., Stahel, R. A. und Gribben, J. G. (2001). Generation of cytotoxic T lymphocytes against native and altered peptides of human leukocyte antigen-A\*0201 restricted epitopes from the human epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Res* 61, 4761-4765.

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.

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.

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.

Yoshiyama, H., Imai, S., Shimizu, N. und Takada, K. (1997). Epstein-Barr virus infection of human gastric carcinoma cells: implication of the existence of a new virus receptor different from CD21. *J Virol* 71, 5688-5691.

Youde, S. J., Dunbar, P. R., Evans, E. M., Fiander, A. N., Borysiewicz, L. K., Cerundolo, V. und Man, S. (2000). Use of fluorogenic histocompatibility leukocyte antigen-A\*0201/HPV 16 E7 peptide complexes to isolate rare human cytotoxic T-lymphocyte- recognizing endogenous human papillomavirus antigens. *Cancer Res* 60, 365-371.

Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S. und Hammerschmidt, W. (1997). Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90, 2390-2397.

## Abkürzungen

Über T-Zell-Epitope (meist 3-Buchstaben-Codes) informiert Tabelle 3-3 (Seite 65), zu Spender-Codierungen (2- und 4-Buchstaben-Codes) siehe Tabelle 3-2 (Seite 64).

AIDS	acquired immune deficiency syndrome, <i>erworbenes Immundefizienz-syndrom</i>
amp	Ampicillin, Ampicillin-Resistenz
APC	antigenpräsentierende Zelle
BATDA	Bis-(acetoxymethyl)-2,2':6',2''-terpyridin-6,6''-dicarboxylat <i>Membrangängiger Chelatligand für Zytotoxizitätsanalysen. Wird von der Zelle zu TDA umgesetzt.</i>
bp	Basenpaare <i>der DNA oder RNA</i>
cam	Chloramphenicol, -Resistenz
CD...	cluster of differentiation, <i>Oberflächenmarker von Blut- und anderen Zellen</i>
CMV	Cytomegalovirus. <i>Gemeint ist das humane Cytomegalovirus, wenn nicht anders vermerkt</i>
DC	dendritische Zelle
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium, <i>Standardmedium für adhärente Zellkulturen</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
E : T	Effektor-zu-Zielzell-Verhältnis ( <i>effector to target</i> )
EBNA1 etc.	Epstein-Barr nuclear antigen 1 etc., <i>latente EBV-Proteine, in LCLs und mini-LCLs exprimiert</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EpCAM	epithelial cell adhesion molecule, <i>Oberflächenprotein, in Plattenepithelkarzinomen überexprimiert</i>
FACS	fluorescence-activated cell sorter, <i>Durchflußzytometer</i>
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat, <i>konjugierbarer Fluoreszenzfarbstoff</i>
<i>g</i>	Fallbeschleunigung im Schwerfeld der Erde, $g = 9,81 \text{ m/s}^2$

HCMV	humanes Cytomegalovirus
HLA	human leukocyte antigen, <i>bezeichnet MHC-Moleküle des Menschen</i>
HLA-A, B, C	MHC-Klasse-I-Moleküle des Menschen
IE1	immediate early-1, <i>frühes CMV-Protein</i>
IFN-	Interferon-gamma
IL-2	Interleukin-2
kbp	Kilobasenpaare <i>der DNA oder RNA</i>
LB	Luria-Bertani-Bakterienmedium
LCL	lymphoblastoide Zelllinie, <i>B-Zelllinie, die durch EBV immortalisiert ist</i>
LMP1, 2	latente Membranproteine 1, 2 <i>des EBV, in LCLs und mini-LCLs exprimiert</i>
MCMV	murines Cytomegalovirus
MHC	major histocompatibility complex, <i>bezeichnet die Moleküle der Antigenpräsentation und ihren genetischen Locus</i>
mini-EBV	mini-Epstein-Barr-Virus, <i>Plasmid basierend auf 41% des EBV-Genoms, bewirkt die B-Zell-Immortalisierung unter Entstehung einer mini-LCL</i>
mini-LCL	mini-lymphoblastoide Zelllinie, <i>B-Zelllinie, die durch ein mini-EBV immortalisiert ist</i>
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycocerythrin, <i>Fluoreszenzfarbstoff</i>
pp65	Phosphoprotein 65, <i>Tegumentprotein des CMV mit ca. 65 Kilodalton</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute, <i>Standardmedium zur Lymphozytenkultivierung</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
TDA	2,2':6',2''-Terpyridin-6,6''-dicarboxylat, siehe BATDA
tet	Tetrazyklin, -Resistenz
<i>tet-shuttle</i>	Transfervektor für EBV-Vektoren, enthält Tetrazyklin-Resistenzgen
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TR	terminal repeats, <i>Verpackungssignale des EBV-Genoms</i>

## Herzlichen Dank...

...an alle, die diese Arbeit und mich mit Rat und Tat unterstützt haben

...an Dr. Reinhard Zeidler für die hochinteressante Themenstellung, für Anregung, Hilfe, Rat und Unterstützung bei allen schwer- und leichtgewichtigen Problemen

...an Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt für unermüdliche Aufmunterung und unerschöpflichen Rat

...an Herrn Prof. Dr. Horst Domdey für die freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als Gutachter zu betreuen

...an Prof. Alan Rickinson und Prof. Paul Moss für die Einladung ans Institute for Cancer Studies nach Birmingham, die dortige Betreuung, Beratung und Gastfreundschaft und ihre Fortsetzung im „Fernverkehr“

...an Naeem Khan, Mark Cobbold und Andrew Hislop in Birmingham für die freundliche Aufnahme, den anregenden Austausch und die Versorgung mit mühevoll erarbeiteten Reagenzien, sowie an alle Kollegen in Birmingham für ihre Hilfsbereitschaft

...an Gabi Hollweck und Caroline Zentz für große Unterstützung und Hilfe

...an PD Dr. Barbara Wollenberg, deren Einsatz für neue Tumorthapieansätze dieses Forschungsgebiet an der HNO-Klinik ermöglicht hat

...an die Blutspenderinnen und -spender in München und Birmingham, ohne deren freundliche Bereitschaft diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, und an die Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter der Entbindung der Frauenklinik Großhadern

...an Barbara Mosetter, Dagmar Pich, Dr. Holm Bussler, Herrn Dr. Georg Wittmann und Frau Dr. Marie Roskrow für unschätzbare Hilfen

...an alle Kolleginnen und Kollegen der Abteilung Genvektoren für die ständige Bereitschaft, Eindringlinge willkommen zu heißen

...an alle Kolleginnen und Kollegen der HNO-Forschung für eine schöne und mehr als kollegiale Atmosphäre

Andreas Moosmann

HNO-Forschung  
Klinikum Großhadern  
Marchioninstr.15  
81547 München

Peißenbergstr. 21  
81547 München

Tel. 089-7095-3894  
Fax 089-7095-6896  
moosmann@hno.med.uni-muenchen.de

Tel. 089-69 25 52 8

## Lebenslauf

- |                           |   |
|---------------------------|---|
| 1970                      | Geboren in Tübingen   |
| 1990 – 1996               | Chemie-Diplomstudium an der Universität München<br>Wahlfach Biochemie   |
| 1997                      | Diplomarbeit am Institut für Biochemie /Genzentrum der Universität München<br>„Eine subtraktive cDNA-Bank aus humanen Knochenzellen“<br>Betreuer Prof. Dr. Horst Domdey   |
| 1997                      | Diplom-Chemiker, Universität München  |
| Dez. 1997<br>– Dez. 2000  | Doktorarbeit für den Dr. rer. nat.<br>"Gezielte Reaktivierung spezifischer zytotoxischer T-Zellen mit Epstein-Barr-Virus-Vektoren"<br>Betreuer Dr. Reinhard Zeidler,<br>HNO-Forschung, Universität München,<br>und Prof. Dr. Wolfgang Hammerschmidt,<br>Abteilung Genvektoren, Institut für Klinische Molekularbiologie,<br>GSF München |
| Sept. 2000<br>– Jan. 2001 | Aufenthalt am Institute for Cancer Studies,<br>Universität Birmingham, Großbritannien, bei den Arbeitsgruppen von<br>Prof. Alan Rickinson und Prof. Paul Moss   |
| Ab Februar 2001           | Mitarbeiter an der HNO-Forschung, Klinikum Großhadern<br>Arbeitsgebiet: immuntherapeutische Ansätze gegen<br>HPV-assoziierte Tumorerkrankungen und CMV-Erkrankungen   |

München, 15.1.2002

Andreas Moosmann